

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Zuwendungsempfänger:

TUM-Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie

Titel der Förderung:

Verbundprojekt: Entwicklung einer automatisierten Lösung für die drohnengestützte Bonitur von Feldversuchen (AutoDGB) - Teilprojekt 2

Verantwortliche/r Autor/Autorin:

Michael Rychlik

Förderkennzeichen: 2818407B18

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft unter dem Förderkennzeichen 2818407B18 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor und der Autorin.“

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I: Kurzbericht

| |
|--|
| Zuwendungsempfänger: TUM-Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie (LALC) |
| Förderkennzeichen: 2818407B18 |
| Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: Entwicklung einer automatisierten Lösung für die drohnengestützte Bonitur von Feldversuchen (AutoDGB) - Teilprojekt 2 |
| Laufzeit des Vorhabens 01.10.2019 - 30.06.2025 |

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Schimmelpilze bedrohen durch die Biosynthese von Mykotoxinen die Gesundheit der Verbraucher und sind nach aktuellen Schätzungen für die Kontamination von über 60 % der Lebensmittelrohprodukte weltweit verantwortlich. Weizen ist dabei das mit am meisten betroffene Getreide, das insbesondere von den Pilzgattungen *Fusarium* und *Alternaria* (A.) betroffen ist.

Im Laufe von AutoDGB sollte in unserem Teilprojekt eine Multimethode zur Quantifizierung von *Fusarium* und *Alternaria* Toxinen in Weizen mittels LC-MS/MS entwickelt, validiert und angewendet werden. Mit der Methode sollten vom Projektpartner Breun ausgesäte und mit *Fusarium graminearum* inokulierte Weizenproben auf ihren Mykotoxingehalt untersucht werden. Die ermittelten Toxingehalte sollten mit Boniturdaten, die während des Projekts gewonnen wurden, verglichen und korreliert werden. Abschließend sollten moderne Verfahren der Non-Targeted (ungerichtete) Metabolomics eingesetzt werden, um die komplexen Interaktionsdynamik zwischen dem Weizenwirt und Schimmelpilzen auf molekularer Metaboliten-Ebene zu entschlüsseln.

2. Ablauf des Vorhabens

Am Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie waren zum Beginn des Projekts validierte Methoden für die getrennte Analytik von *Alternaria* und *Fusarium* Toxinen in Gerste etabliert. Diese Methoden wurden als Grundlage verwendet, um die Analyse beider Mykotoxingruppen in Weizen zu kombinieren.

Es wurde eine auf QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) basierende Multimykotoxin-Methode entwickelt, mit der 24 *Alternaria*- und *Fusarium*-Toxine in Getreide mittels UHPLC-MS/MS analysiert werden konnten. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Kombination aus Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIDA) für neun Toxine und matrixangepasster Kalibrierung für zehn Toxine. Die Quantifizierung über einen strukturell ähnlichen internen Standard wurde für vier Analyten durchgeführt. Die Methode wurde im Rahmen einer Anwendungsstudie erfolgreich zur Analyse von 136 kommerziellen Getreideprodukten und Getreideerzeugnissen angewendet. Die analysierten Proben waren häufig mit *Alternaria*-Toxinen kontaminiert, was deren ubiquitäres Vorkommen belegt.

Ausgehend von der bestätigten Eignung der Methode wurden im Jahre 2022 Weizenkornproben aus 145 Parzellen in Doppelbestimmung auf die validierten Toxine analysiert und mit den vorab durch den Projektpartner Breun ermittelten Bonituren verglichen. Die untersuchten Weizenkornproben bestätigten den Zusammenhang zwischen niedrigen Boniturnoten (1–2) und

geringeren Gehalten an DON, DON-3-Glucosid und 3-Acetyl-DON. Ab Boniturnote 3 ließ sich jedoch keine eindeutige Beziehung mehr erkennen; die Noten 4–6 zeigten ähnliche Toxingehalte, während 7–8 teils sogar niedrigere Werte aufwiesen. Tenuazonsäure zeigte unabhängig von der Fusarium-Bonitur kein klares Muster.

Im Feldversuch 2023 wurde die Toxinbelastung direkt an Ähren zum Zeitpunkt der Bonitur erfasst. Als „nicht befallen“ klassifizierte Ähren enthielten weniger DON als „gemischte“ bzw. „befallene“ Ähren, wodurch sich eine gute Korrelation zwischen optischem Befall und DON-Gehalt ergab. Dennoch blieb eine eindeutige Zuordnung der Toxingehalte zu Boniturnoten schwierig: Die höchsten Werte für DON und seine Modifikationen traten bei einer Probe mit Note 2 auf. Abgesehen davon zeigten niedrige Noten (2–3) tendenziell geringere Belastungen als hohe (4–8), mit Note 4 als Übergangsbereich. Die Kornproben folgten diesem Muster noch deutlicher; hier lag der Höchstwert bei Note 7.

Um die Interaktion zwischen *F. culmorum* und Weizen auf molekularer Ebene zu verstehen, kombinierten wir quantitative Mykotoxinprofilierung mit ungerichteter Metabolomik aus dem Feldexperiment von 2023 mit dem Ziel, molekulare Signaturen von Infektion und Eindämmung unter agronomisch realistischen Bedingungen zu identifizieren. Die vorab quantifizierten Konzentrationen von DON dienten als robuste, kontinuierliche Variablen, um Metabolitenprofile mit dem Infektionsgrad zu korrelieren und so ein direktes biochemisches Maß für die Pathogenaktivität zu erhalten, das über die Einschränkungen rein visueller Diagnostik hinausgeht. Sesquiterpen-abgeleitete Metaboliten standen in engem Zusammenhang mit der DON-Toxinakkumulation, im Einklang mit den Biosynthesewegen der Fusarium-Trichothecene. Das wiederkehrende Auftreten von glykosylierten Diterpen-Konjugaten in Proben mit niedrigen Toxinwerten deuteten darauf hin, dass diese Metaboliten charakteristisch für Bedingungen sind, unter denen eine Fusarium-Infektion unter Kontrolle bleibt.

3. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungsinstituten

Die Zusammenarbeit mit den Projektpartnern HSWT, Saatzucht Breun und geo-konzept war von gegenseitigem Vertrauen und Verständnis gegenüber den jeweils komplementären Disziplinen geprägt. Nach einer Anlaufphase, die dem gegenseitigen Verständnis der jeweiligen Herausforderungen diente, wurde ein Ansatz gefunden, der für alle Partner eine optimale Kombination aus experimentellen Möglichkeiten und erfolgreichen Versuchsansätzen ermöglichte.

Die im Projekt erzeugten Proben aus mit *F. culmorum* infizierten und bonitierten Weizen wurden erfolgreich analysiert. Die Korrelation der Bonitur mit dem Gehalt an Trichothecenen war qualitativ möglich, quantitativ aber nur zu einem gewissen Grad. Dies war insbesondere daher schwierig, da die Körner nicht zum Zeitpunkt der Bonitur erhalten werden und zwischen Bonitur und Ernte weitere Einflussfaktoren zum Tragen kommen, die eine Korrelation abschwächen. Durch die durch die Projektpartner gezielt durchgeführte Inokulation mit *F. culmorum* unter Feldbedingungen konnten bei Realproben die Metaboliten näherungsweise identifiziert werden, die für die molekulare Interaktion zwischen dem Pilz und Weizen verantwortlich sind. Diese Ergebnisse sind bereits auf einem Preprintserver öffentlich verfügbar und werden in Kürze in einer internationalen Zeitschrift publiziert.

Teil II: Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten

| |
|--|
| Zuwendungsempfänger: TUM-Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie (LALC) |
| Förderkennzeichen: 2818407B18 |
| Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: Entwicklung einer automatisierten Lösung für die drohnengestützte Bonitur von Feldversuchen (AutoDGB) - Teilprojekt 2 |
| Laufzeit des Vorhabens 01.10.2019 - 30.06.2025 |

1. Wissenschaftlicher und technischer Hintergrund des Projekts

Schimmelpilze bedrohen durch die Biosynthese von Mykotoxinen die Gesundheit der Verbraucher und sind nach aktuellen Schätzungen für die Kontamination von über 60 % der Lebensmittelrohprodukte weltweit verantwortlich. Weizen ist dabei das mit am meisten betroffene Getreide, das insbesondere von den Pilzgattungen *Fusarium* und *Alternaria* (A.) betroffen ist.

Im Laufe des Teilprojekts 2 von AutoDGB sollte eine Multimethode zur Quantifizierung von *Fusarium* und *Alternaria* Toxinen in Weizen mittels LC-MS/MS entwickelt, validiert und angewendet werden. Mit der Methode sollten vom Projektpartner Breun ausgesäte und mit *Fusarium graminearum* inokulierte Weizenproben auf ihren Mykotoxingehalt untersucht werden. Die ermittelten Toxingehalte sollten mit Boniturdaten, die während des Projekts gewonnen werden, verglichen und korreliert werden. Die Strukturformeln der untersuchten Mykotoxine sind in den Abbildungen 1 bis 3 aufgeführt.

2. Darstellung der durchgeführten Arbeiten und Ergebnisse

2.1. Entwicklung und Validierung einer Multimethode für Alternaria- und Fusariumtoxine

Am Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie waren zum Beginn des Projekts validierte Methoden für die getrennte Analytik von *Alternaria* und *Fusarium* Toxinen in Gerste etabliert (Habler et al. 2016, Scheibenzuber et al. 2021). Die etablierten Methoden wurden als Grundlage verwendet, um die Analyse beider Mykotoxingruppen in Weizen zu kombinieren.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte schließlich nach dreifacher Extraktion mittels einer QuEhERS-Aufarbeitung, angelehnt an Dzuman et al. (Dzuman et al., 2014). Mit der entwickelten Aufarbeitung können 24 Proben in zwei Arbeitstagen vorbereitet werden.

Hierzu wird zunächst 1 g der gemahlten Probe mit 10 mL Wasser/Acetonitril (80/20) mit 1 % Ameisensäure extrahiert. Die Extraktion wird mit 5 mL desselben Gemischs und 5 mL Wasser/Acetonitril (70/30) mit 1 % Ameisensäure wiederholt. Die Überstände werden vereinigt und erneut mit Ameisensäure versetzt, um den Gesamtgehalt auf 2 % Ameisensäure zu erhöhen.

Im Anschluss wird der Extrakt mit Natriumchlorid und Magnesiumsulfat versetzt. Dies ermöglicht eine Phasentrennung zwischen Wasser und Acetonitril, wodurch eine Vielzahl der Störstoffe in der wässrigen Phase verbleiben. Durch den verringerten pH-Wert gehen auch acide Analyten (wie Tenuazonsäure) in die organische Phase über. Ein Aliquot der organischen Phase wird mit disperser Festphasenextraktion weiter aufgereinigt. Hier werden Magnesiumsulfat und Primäre/Sekundäre Amine (PSA) zu der Probe gegeben, um letzte Wasserreste und störende Matrixkomponenten zu entfernen.

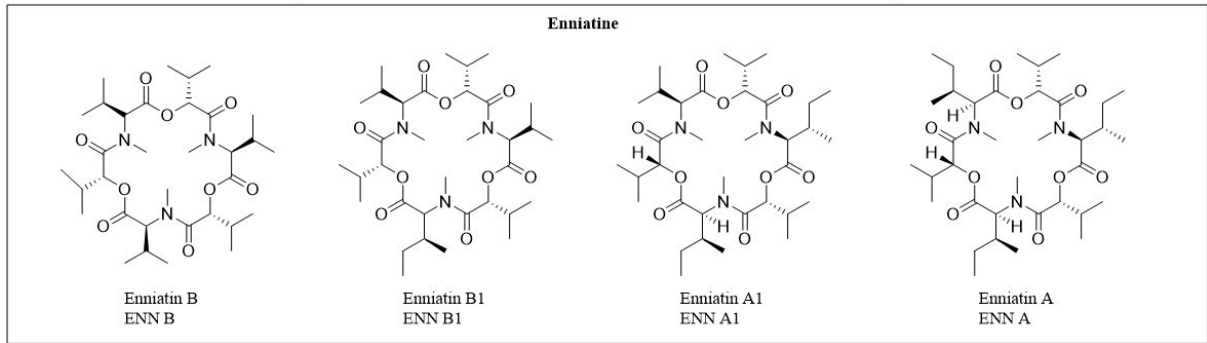
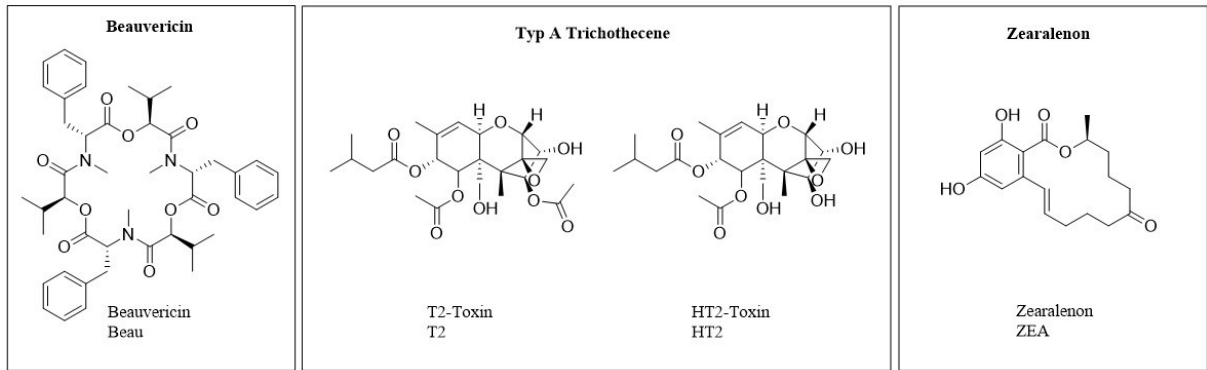
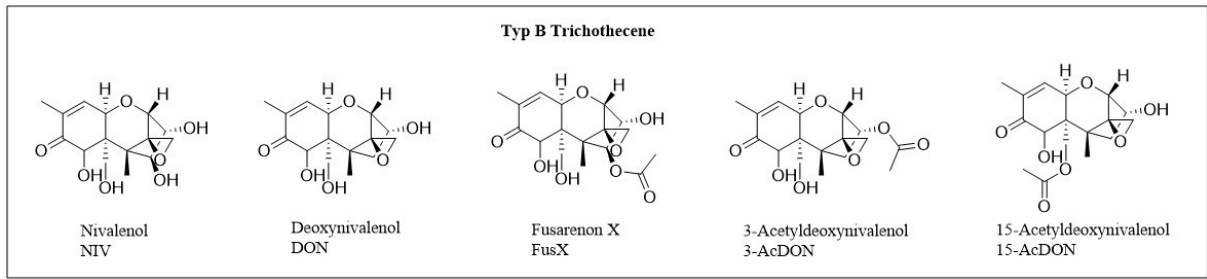


Abbildung 1: Strukturformeln der untersuchten Fusarium Toxine.

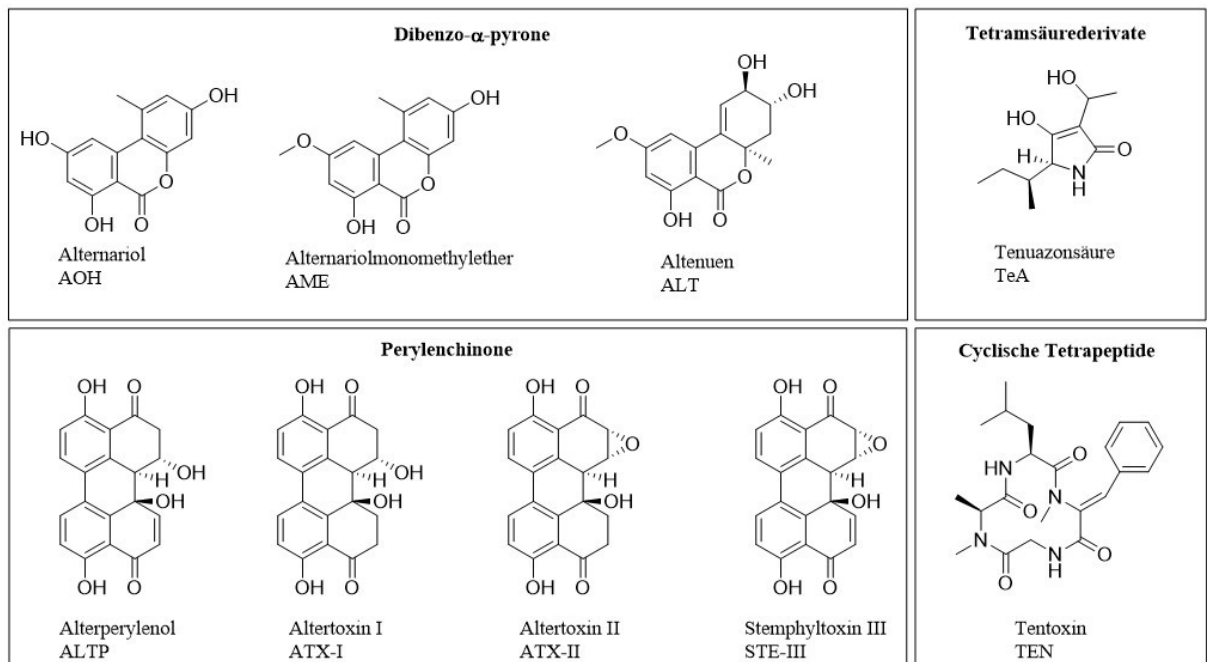


Abbildung 2: Strukturformeln der untersuchten Alternaria Toxine.

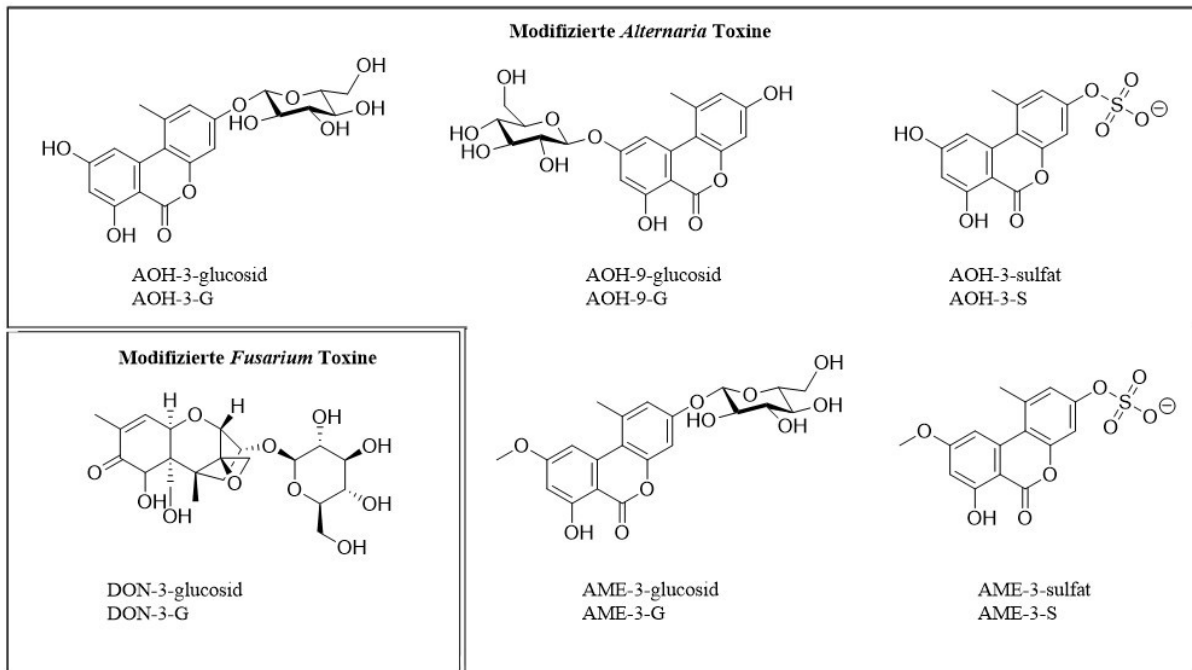


Abbildung 3: Strukturformeln der untersuchten modifizierten Mykotoxine.

Die Probe wird im Stickstoffstrom getrocknet und in 200 µL Methanol/Wasser (60/40) resuspendiert. Nachdem letzte Trübungen durch Ausfrieren, Zentrifugieren und Filtrieren entfernt werden, erfolgt die Analyse mittels LC-MS/MS. Ein Fließschema der entwickelten Methodik zur Proben Aufarbeitung wird in Abbildung 4 gezeigt.

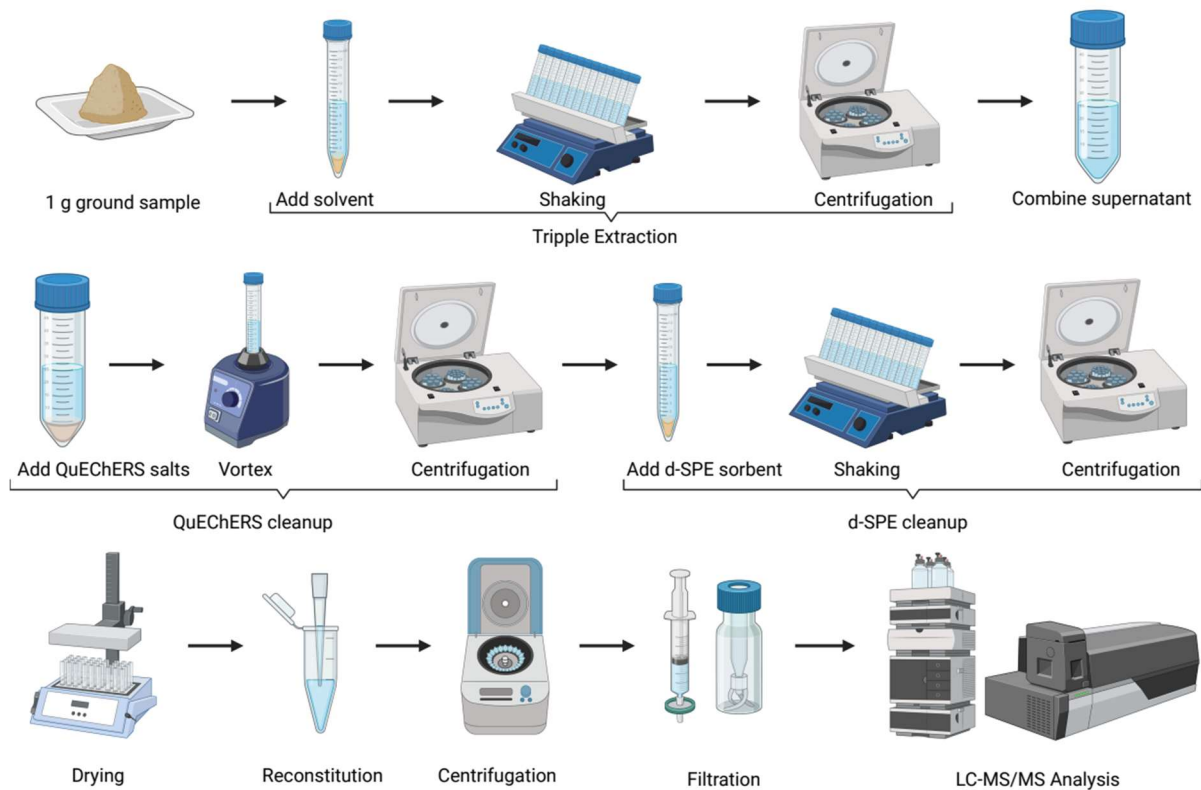


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Getreideproben.

Die Analyse der aufgearbeiteten Probe erfolgt mittels LC-MS/MS in Anlehnung an die Methode von Puntcher et al., die sich mit freien und modifizierten *Alternaria* Toxinen befasst haben (Puntcher et al, 2019). Nach zahlreichen Tests hat sich die Messung mit einer pH-stabilen UPLC-Säule (Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm)) mit Methanol und Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat bei pH 9 als am besten geeignet erwiesen. Der leicht basische pH-Wert ermöglicht die Analyse von Tenuazonensäure mit einem scharfen Peak sowie die Trennung der Positionsisomere AOH-3-Glucosid und AOH-9-Glucosid. Um eine gute Sensitivität für alle quantifizierten Toxine zu erzielen, wird die Polarity Switching Funktion verwendet, um sowohl im negativen als auch im positiven Modus messen zu können. Ein Chromatogramm der untersuchten Toxine ist in Abbildung 5 gezeigt.

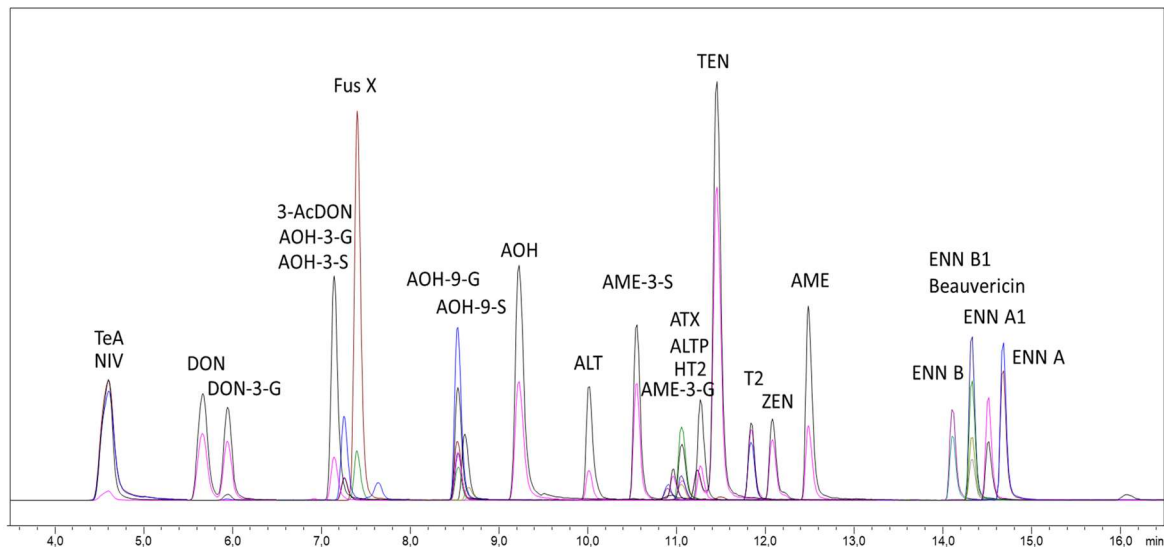


Abbildung 5: Chromatogramm mit allen quantifizierten Toxinen.

Die Methode wurde nach Hädrich und Vogelgesang validiert (Vogelgesang, J.; Hädrich J., 1998). Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Auch die Wiederfindungen liegen in dem von Hädrich und Vogelgesang geforderten Bereich zwischen 70 und 120 %. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind zur Quantifizierung aller untersuchten Mykotoxine in relevanten Konzentrationen geeignet. Die Methode inkl. Validierungsdaten wurden im Verlauf des Projekts publiziert (Dick et al., 2024).

2.2. Einsatz der Multimethode für *Alternaria*- und *Fusarium*toxine bei handelsüblichen Getreidemehlen

Die entwickelte Methode wurde zur Analytik verschiedener Getreideproben aus dem Handel angewandt. Untersucht wurden unter anderem Weizen, Roggen, Hirse, Reis, Hafer und Quinoa. Exemplarisch sind die quantitativen Ergebnisse von zwölf untersuchten Weizenmehlen und zwei Roggenmehlen aufgeführt. In der Übersicht in Tabelle 2 ist zu erkennen, dass ein simultanes Auftreten der beiden Mykotoxin Produzenten wahrscheinlich ist. So sind die Proben überwiegend mit *Fusarium* Toxinen belastet, aber auch das *Alternaria* Toxin Tentoxin konnte in allen Proben detektiert werden. Eine umfassende Mykotoxinanalyse kann interessante Einblicke in die Gesamtbelastung liefern und Rückschlüsse auf die Toxinbildung im Hinblick auf ein Konkurrenzverhalten der Pilze ermöglichen.

Tabelle 1: Ausgewählte Validierungsdaten für die Multimykotoxinmethode

| | | Analyt | Nachweisgrenze [µg/kg] | Bestimmungsgrenze [µg/kg] |
|-------------------|------------|-------------|---------------------------|------------------------------|
| SIVA | Fusarium | 3-AcDON | 0,07 | 0,21 |
| | | DON | 0,14 | 0,54 |
| | | DON-3-G | 1,96 | 7,42 |
| | | ENN A1 | 0,01 | 0,02 |
| | | ENN A | 0,01 | 0,03 |
| | | ENN B1 | 0,01 | 0,03 |
| | | ENN B | 0,01 | 0,03 |
| | | Beauvericin | 0,01 | 0,02 |
| | | HT2 | 0,13 | 0,48 |
| | | T2 | 0,02 | 0,08 |
| | Alternaria | AME | 0,01 | 0,02 |
| | | AOH | 0,20 | 0,79 |
| | | TeA | 0,14 | 0,50 |
| Matrixkalibration | Fusarium | FUS X | 0,26 | 1,05 |
| | | NIV | 3,16 | 11,8 |
| | | ZEN | 0,08 | 0,30 |
| | Alternaria | AME-3-G | 0,74 | 3,33 |
| | | AME-3-S | 0,03 | 0,11 |
| | | AOH-3-G | 0,07 | 0,27 |
| | | AOH-3-S | 0,01 | 0,03 |
| | | AOH-9-G | 0,16 | 0,50 |
| | | ATX I | 1,86 | 7,99 |
| | | ALTP | 2,12 | 6,54 |
| | | TEN | 0,11 | 0,46 |

2.3. Einsatz der Multimethode für Alternaria- und Fusariumtoxine in Körnern aus mit *Fusarium graminearum* infiziertem Weizen und Korrelation zur Bonitur im Jahr 2022

Im Jahre 2022 wurden Proben aus 145 Parzellen in Doppelbestimmung auf die validierten Toxine analysiert. Hierzu wurde die oben beschriebene QuEChERS-Methode verwendet. Bei einem maximalen Deoxynivalenol (DON)-Gehalt von ca. 5000 µg/kg lagen alle Proben im Arbeitsbereich der entwickelten Methode und konnten mit dieser analysiert werden.

Deoxynivalenol konnte in jeder Probe detektiert werden, was durch die Inokulation mit *Fusarium graminearum* zu erwarten war. Die Deoxynivalenol-Gehalte der Proben bewegen sich in einem Bereich zwischen 2 und 5000 µg/kg. Dieses große Spektrum ist vermutlich auf die unterschiedliche Anfälligkeit der Züchtungen sowie auf unterschiedliche Verläufe in der Inokulation zurückzuführen. Die Gehalte an Deoxynivalenol-3-glucosid bewegen sich meist im Bereich zwischen 5 und 20 % des Deoxynivalenol-Gehalts, während die 3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON)-Gehalte in den meisten Fällen darunter liegen. Während der Anteil von DON-3-glucosid im Vergleich zu DON variiert, scheint seine quantitative Bildung nicht den Grund für

mögliche Resistenzen darzustellen, da es jeweils einen geringen Anteil des gesamten DON-Gehalts ausmacht. Andere Fusarium Toxine wie T2- und HT2-Toxin, Zearalenon oder die Enniatine konnten in den Proben detektiert werden, scheinen aber durch eine zufällige Infektion mit anderen *Fusarium* Arten in die Proben eingeführt worden zu sein und liegen allgemein in niedrigen Konzentrationen. Da diese Toxine nicht die primär gebildeten Toxine von *Fusarium graminearum* sind, entspricht das sporadische Auftreten dieser Toxine den Erwartungen.

Tabelle 2: Ergebnisse der Mykotoxinanalyse in verschiedenen kommerziellen Weizen- und Roggenmehlen. Obere Hälfte: Fusariumtoxine, untere Hälfte: Alternariatoxine

| | Weizenmehl [µg/kg] | | | | | | | | | | | | Roggenmehl [µg/kg] | |
|---------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------|-----------|
| | M11 | M12 | M13 | M14 | M15 | M16 | N17 | N18 | N19 | N20 | N21 | N22 | N23 | N24 |
| 3-AcDON | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| DON | 200±9 | 106±2 | 32,8±3,7 | 32,3±1,1 | 124±2 | 81,8±2,2 | 32,5±1,5 | 53,5±1,4 | 137±4 | 25,9±1,6 | 77,4±2,9 | 45,8±1,2 | 26,8±1,1 | 11,2±1,8 |
| ENN A1 | 5,13±2,33 | 10,5±1,2 | 2,53±0,29 | 0,50±0,07 | 5,01±0,38 | 6,03±1,63 | 0,39±0,04 | 2,76±0,72 | 3,71±0,22 | 0,19±0,02 | 1,89±0,23 | 2,46±3,58 | 5,74±8,00 | 0,34±0,21 |
| ENN B1 | 35,7±7,9 | 50,8±4,5 | 11,4±1,0 | 3,15±0,27 | 44,5±3,7 | 31,7±6,6 | 2,31±0,40 | 14,3±3,7 | 20,9±2,2 | 1,01±0,07 | 13,7±1,0 | 12,1±8,6 | 51,7±28,1 | 4,81±1,95 |
| HT2 | 5,21±3,12 | 1,01±0,34 | 0,84±0,45 | n.n. | n.n. | N | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | 1,70±0,71 | 1,96±2,22 |
| T2 | 0,84±0,45 | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | 0,45±0,19 | 0,69±0,56 |
| DON-3-G | 15,6±2,7 | 20,9±4,9 | N | 11,5±1,0 | 26,0±7,1 | 13,8±3,0 | N | N | 24,3±4,9 | N | 7,88±0,76 | 10,6±2,4 | n.n. | n.n. |
| FUS X | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| NIV | N | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| ZEN | 8,28±7,85 | 0,80±0,29 | n.n. | n.n. | 2,40±0,40 | 0,67±0,06 | n.n. | 0,43±0,03 | 0,51±0,09 | n.n. | 0,60±0,04 | 0,49±0,03 | 0,47±0,02 | n.n. |
| AME | 0,29±0,07 | n.n. | n.n. | n.n. | 0,65±0,32 | 0,04±0,01 | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | 0,04±0,01 | n.n. | 0,20±0,12 | n.n. |
| AOH | N | N | N | n.n. | 2,51±0,15 | N | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | N | n.n. |
| TeA | 0,89±0,10 | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | 1,88±0,24 | 3,47±0,50 |
| AME-3-G | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| AME-3-S | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | 0,16±0,02 | n.n. | n.n. | n.n. |
| AOH-3-G | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| AOH-3-S | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| AOH-9-G | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. |
| ATX I | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | N | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | n.n. | N | n.n. |
| TEN | 2,46±0,15 | 1,05±0,09 | 0,93±0,07 | 0,47±0,02 | 0,59±0,06 | 0,65±0,03 | 0,47±0,05 | N | N | N | N | N | 3,02±0,59 | 2,42±0,54 |

n.n.: nicht nachgewiesen
N: nachgewiesen
Zahl: quantifizierter Gehalt

Von den zehn untersuchten *Alternaria* Toxinen konnte Tenuazonsäure in 140 der 145 Proben quantifiziert werden. Die Werte erstrecken sich über einen Bereich von 0,79 bis 60 µg/kg, stehen aber nach bisherigen Erkenntnissen weder im Zusammenhang mit dem gemessenen DON-Gehalt bzw. allgemein *Fusarium* Toxin Gehalten noch zur gegebenen Boniturnote. Das Toxin Tentoxin konnte als das zweite *Alternaria* Toxin in etwa zwei Drittel der Proben detektiert werden. Die Konzentration lag jedoch meistens unterhalb der Bestimmungsgrenze. Mit einem Maximalgehalt von 1,2 µg/kg war die Konzentration des Toxins allgemein niedrig. Die anderen untersuchten *Alternaria* Toxine konnten in keiner der Proben detektiert werden.

Die Parzellen des Feldes wurden während des Reifens der Ähren zweimal bonitiert. Da der Toxingehalt mit optischen Parametern korreliert werden sollte, sind im Folgenden die Toxingehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] gegen die Boniturnoten aufgetragen. Um die unterschiedlichen Größenordnungen des Toxingehalts gut darstellen zu können, wurde eine logarithmische Skala verwendet.

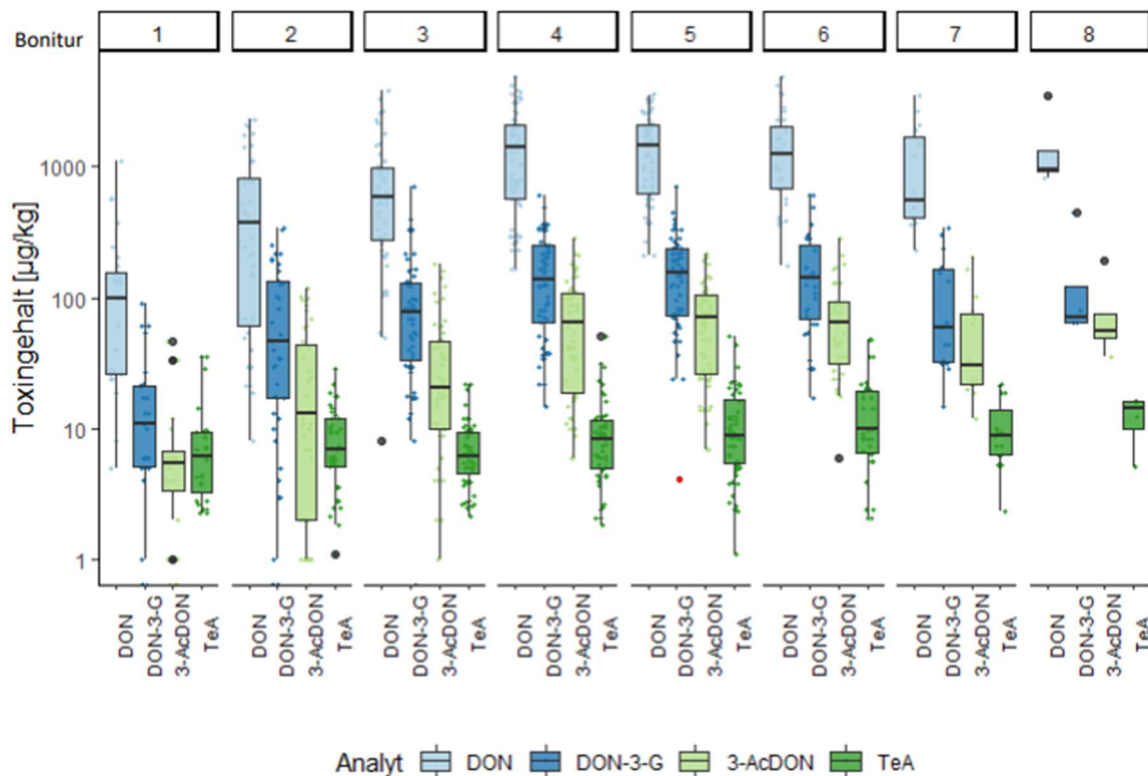


Abbildung 6: Gehalt an Toxinen der Deoxynivalenol (DON)-Gruppe und Tenuazonsäure (TeA) in Abhängigkeit von der Bonitur

In der Abbildung ist zu erkennen, dass bei den niedrigen Boniturnoten 1 und 2 weniger DON und dementsprechend auch weniger DON-3-glucosid und 3-AcDON enthalten ist als bei höheren Noten. Ab einer Boniturnote von 3 können die Toxingehalte nicht mehr zuverlässig mit der Boniturnote in Verbindung gebracht werden. Die Toxingehalte der Noten 4 bis 6 können nicht unterschieden werden, während die Bonituren 7 und 8 sogar niedrigere Toxingehalte aufweisen, dies ist aber vermutlich auf die geringe Probenanzahl mit diesen Boniturnoten zurückzuführen. Im Gegensatz zu den *Fusarium* Toxinen folgt der Gehalt an Tenuazonsäure keinem klaren Muster und scheint unabhängig von der *Fusarium* Bonitur zu sein.

Um den Zusammenhang des Gehalts der Toxine im Bezug zu DON zu zeigen, wird im Folgenden der Gehalt der Toxine DON-3-glucosid, 3-AcDON und Tenuazonsäure gegenüber dem DON-Gehalt aufgetragen. Während der Gehalt an DON-3-glucosid und 3-AcDON bei steigendem DON-Gehalt zunimmt, steht der DON-Gehalt nicht im Zusammenhang mit dem Tenuazonsäure-Gehalt.

Von den zehn untersuchten *Alternaria* Toxinen war Tenuazonsäure das Toxin, das in fast jeder Probe enthalten war. In zwei Drittel der Proben war außerdem das Toxin Tentoxin ent-

halten. Entgegen den Erwartungen konnten weder die Dibenzo- α -pyrone Alternariol und Alternariolmonomethylether noch ihre modifizierten Formen detektiert werden. Möglicherweise ist die geringe Belastung mit *Alternaria* Toxinen auf das allgemein trockene Jahr 2022 zurückzuführen.

Basierend auf der geringen *Alternaria* Belastung ist leider weder auf mögliches Konkurrenz Verhalten der Pilze noch auf synergistische Effekte durch den sequentiellen Pilzbefall der Pflanze zu schließen.

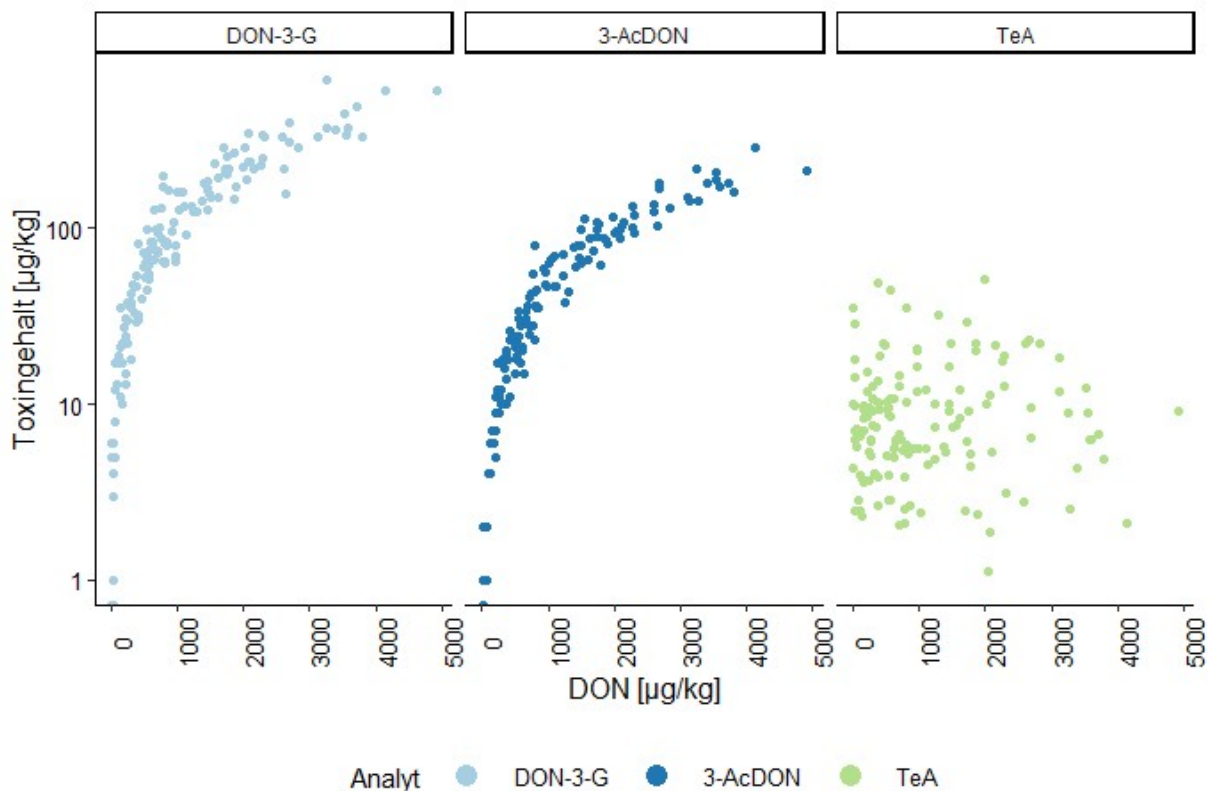


Abbildung 7: Gehalt an Toxinen der Deoxynivalenol (DON)-Gruppe und Tenuazonsäure (TeA) in Abhängigkeit vom DON-Gehalt

2.4. Einsatz der Multimethode für Alternaria- und Fusariumtoxine in Proben aus mit *Fusarium graminearum* infiziertem Weizen und Korrelation zur Bonitur im Jahr 2023

Der Ansatz des Feldversuchs von 2023 war es, im Gegensatz zu 2022 die Boniturnote mit der Toxinbelastung der Weizenähren zum Zeitpunkt der Bonitur zu vergleichen, um einen klareren Zusammenhang zwischen Toxinbelastung und Boniturnote zu erkennen. Hierzu wurden von insgesamt 20 inokulierten Parzellen je drei Ähren-Proben und später eine Kornprobe bei Erntereife untersucht. Bei den Ähren-Proben soll außerdem der Zusammenhang zwischen der durch *Fusarium graminearum* verursachten Taubährigkeit, und dem Toxingehalt untersucht werden. Hierzu wurden pro untersuchter Parzelle jeweils drei Teilproben, bestehend aus je 20 Ähren, genommen. Probe 1 gilt als optisch nicht befallen, hier wurden Ähren ohne erkennbare Symptome des *Fusarium* Befalls ausgewählt. Probe 2 ist eine Mischprobe, hier wurden die 20 Ähren blind ausgewählt, und Probe 3 besteht aus befallenen Ähren, mit erkennbaren „Fusarium Head Blight“-Symptomen. Zum Erntezeitpunkt wurde aus den entsprechenden Parzellen eine Kornprobe von ca. 100 g entnommen.

Im Labor wurden diese Proben jeweils in Doppelbestimmung aufgearbeitet, sodass pro untersuchter Parzelle insgesamt 8 Proben untersucht wurden. Quantitativ analysiert wurden die

Fusarium Toxine DON, DON-3-glucosid und 3-Acetyl-DON, sowie das *Alternaria* Toxin Tenuazonsäure. Allgemein war die Toxin-Belastung der Proben von 2023 höher als die aus 2022, so hatte die am höchsten konzentrierte DON-Probe einen Gehalt von über 10000 µg/kg. Im Vergleich hierzu war die Toxinbelastung der Ähren nochmal stark erhöht, so konnte in den Ähren ein maximaler DON-Gehalt von 130.000 µg/kg quantifiziert werden.

Übersicht Toxingehalt der Ähren und Körner:

DON konnte in fast allen Ähren- und Körner-Proben detektiert werden, was durch die Inokulation mit *Fusarium graminearum* zu erwarten war. Die Toxingehalte in den Ähren sind oft, besonders in den optisch befallenen Ähren, deutlich höher als die gemessenen Gehalte der Körner. Die DON Gehalte der Ähren Proben bewegen sich in einem Bereich zwischen 2 und 132000 µg/kg. Dieses große Spektrum ist vermutlich auf die unterschiedliche Anfälligkeit der Züchtungen sowie auf unterschiedliche Verläufe in der Inokulation zurückzuführen. Diese teils sehr hohen Gehalte sind vermutlich mit der Analyse der Ähren zum Zeitpunkt der gut erkennbaren Ährenfusariose begründbar. Ähnlich wie bei den Proben von 2022 entsprechen die DON-3-Glucosid Gehalte ca. 5 bis 20 % der DON Gehalte, während die 3-ADON Gehalte nochmals niedriger, zwischen 1 und 10 %, der DON Gehalte liegen. Der DON-Gehalt war somit deutlich der höchste gemessene Toxingehalt, während die modifizierten Toxine einen geringeren Anteil zur Gesamtbelastung beitragen.

Während der Anteil von DON-3-glucosid im Vergleich zu DON variiert, scheint seine quantitative Bildung nicht den Grund für mögliche Resistenzen darzustellen, da es jeweils einen geringen Anteil des gesamten DON-Gehalts ausmacht.

Die DON-Gehalte der Körner liegen zwischen 700 und 10500 µg/kg, somit sind die Gehalte der Körner von 2023 gegenüber den Proben von 2022 erhöht, die einen Maximalgehalt von 5000 µg/kg zeigten. Wie auch schon in den Proben aus dem Jahr 2022 konnten andere *Fusarium* Toxine wie T2- und HT2-Toxin, Zearalenon oder die Enniatine in den Proben detektiert werden, scheinen aber wiederum durch eine zufällige Infektion mit anderen *Fusarium* Arten in die Proben eingeführt worden zu sein.

Von den zehn untersuchten *Alternaria* Toxinen konnte nur Tenuazonsäure in den meisten Proben detektiert werden. Mit einem Maximalgehalt von 230 µg/kg ist der Tenuazonsäure Gehalt deutlich niedriger als die Gehalte der *Fusarium* Toxine. Analog zu den Ergebnissen von 2022 traten andere *Alternaria* Toxine nur sporadisch in sehr niedrigen Konzentrationen auf, weswegen sie nicht weiter untersucht wurden. Auch in 2023 steht der Tenuazonsäure-Gehalt in keinem direkten Zusammenhang zu den gemessenen *Fusarium* Toxin Gehalten oder zu den Boniturnoten.

Übersicht Toxingehalt der Ähren:

Die Parzellen des Feldes wurden während des Reifens der Ähren zweimal bonitiert. Die Probennahme der Ähren ist kurz nach der ersten Bonitur erfolgt. Aus diesem Grund wird die erste Bonitur zur Darstellung der Toxingehalte herangezogen. In den folgenden vier Abbildungen sind die gemessenen Toxingehalte gegen die gemessene Boniturnote aufgetragen. So sind die Toxingehalte der Körner in Abbildung 8, die der nicht befallenen Ähren in Abbildung 9 dargestellt, die Gehalte der Mischprobe in Abbildung 10 und die befallenen Ähren in Abbildung 11 dargestellt.

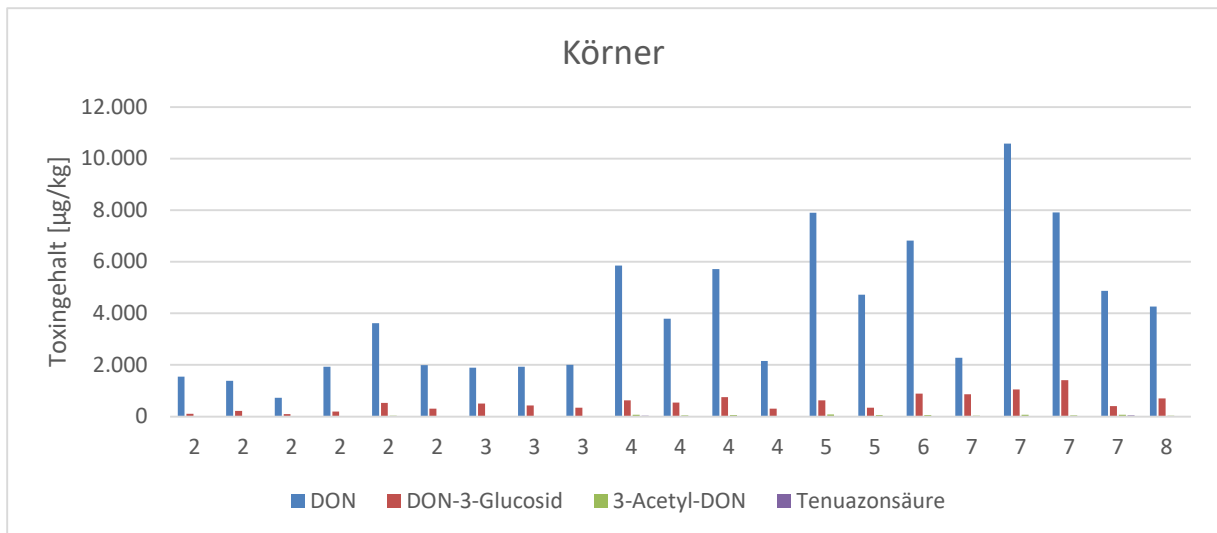


Abbildung 8: Toxingehalte der Körner für Parzellen mit den angegebenen Boniturnoten.

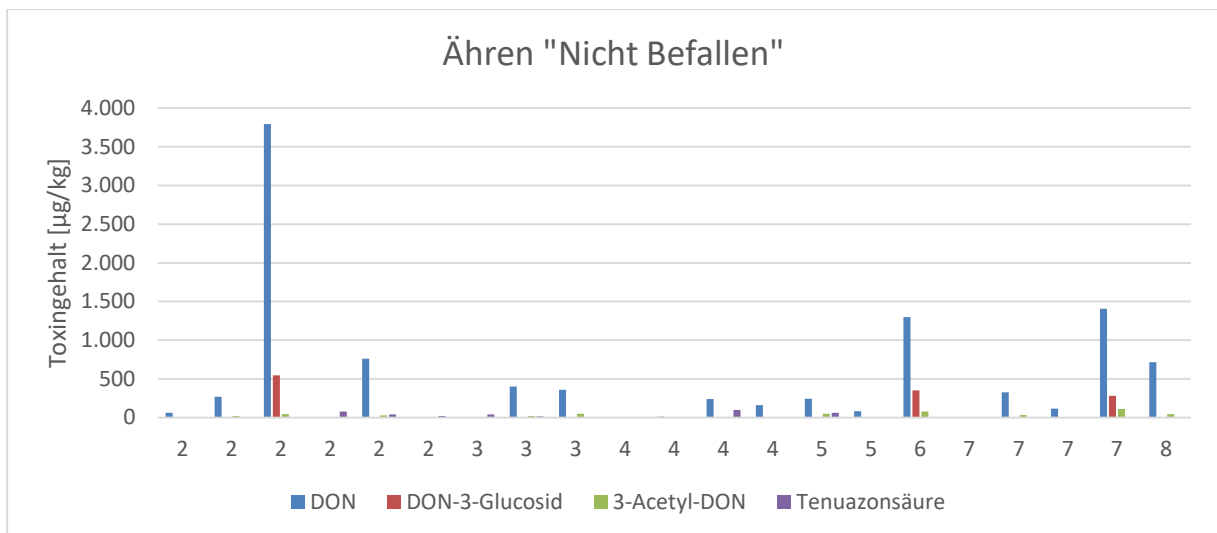


Abbildung 9: Toxingehalte der nicht befallenen Ähren für Parzellen mit den angegebenen Boniturnoten.

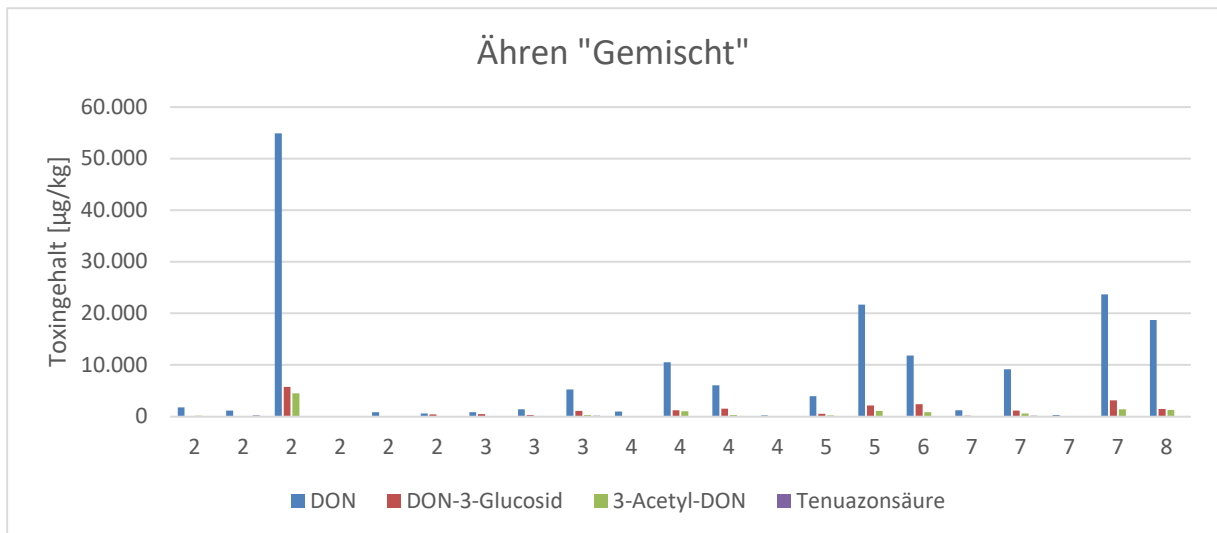


Abbildung 10: Toxingehalte der gemischten Ähren für Parzellen mit den angegebenen Boniturnoten.

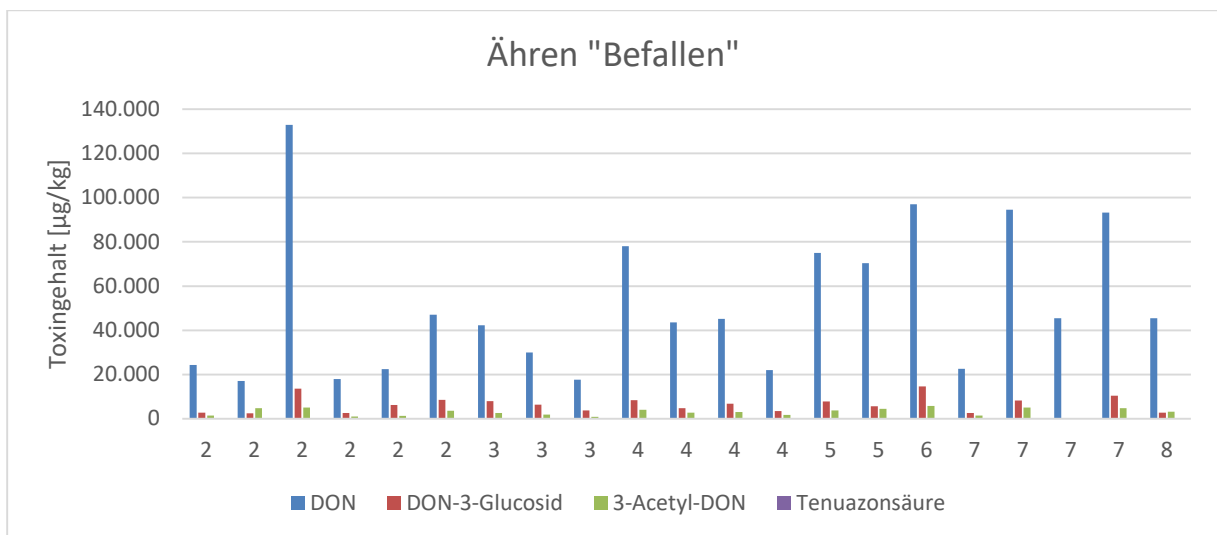


Abbildung 11: Toxingehalte der befallenen Ähren für Parzellen mit den angegebenen Boniturnoten.

Betrachtet man die Toxingehalte der untersuchten Ähren, dann ist gut erkennbar, dass der Toxingehalt der „nicht befallenen“ Ähren niedriger ist als der gemischten Probe, die wiederum niedrigere Toxingehalte als die „befallenen“ Ähren zeigen. Der optische Befall der Ähren scheint somit innerhalb einer Parzelle gut mit dem enthaltenen DON-Gehalt zu korrelieren. Eine klare Zuordnung der Toxin Gehalte entsprechend der Boniturnote ist trotz der Probenahme zum Zeitpunkt der Bonitur nicht möglich. So treten die maximalen DON, DON-3-glucosid und 3-Acetyl-DON Gehalt alle bei einer Probe mit der Boniturnote 2 auf. Mit Ausnahme dieser Probe scheinen die Proben mit niedrigen Boniturnoten (2 bis 3) tendenziell weniger belastet zu sein als die Proben mit hohen Boniturnoten (4 bis 8), wobei die Note 4 als Grenzfall erscheint. Die Kornproben scheinen diesem Muster noch deutlicher zu entsprechen, da der Maximalgehalt hier bei der Boniturnote 7 festgestellt wurde.

Von den zehn untersuchten *Alternaria* Toxinen war Tenuazonsäure das Toxin, das in den meisten Proben enthalten war. Ein Zusammenhang zwischen dem Tenuazonsäure Gehalt und dem Gehalt der *Fusarium* Toxine oder der Boniturnote ist nicht ersichtlich. Basierend auf der geringen *Alternaria* Belastung ist leider weder auf mögliches Konkurrenz Verhalten der Pilze

noch auf synergistische Effekte durch den sequentiellen Pilzbefall der Pflanze zu schließen. Eine erneute Interpretation der *Alternaria* Toxin Gehalte scheint in diesem Versuchsaufbau keinen weiteren Informationsgewinn zu ermöglichen.

Die Verhältnisse der Toxine DON, DON-3-glucosid und 3-Acetyl-DON sind auch in den Proben des Jahres 2023, sowohl in den Ähren als auch in den Körner Proben in einem ähnlichen Verhältnis wie in den Körner Proben der Ernte 2022. So ist DON das *Fusarium* Toxin, das im Fokus der Untersuchung steht. Die Auswahl der Ähren entsprechend des optischen Befalls korreliert sehr gut mit dem gemessenen DON-Gehalt, so sind die optisch befallenen Ähren stärker belastet als die gemischten und die nicht befallenen Ähren. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Boniturnote und dem Toxingehalt ist jedoch auch in diesem Jahr, trotz der direkten Untersuchung der Ähren nicht möglich. Niedrige Boniturnoten (2 bis 3) scheinen allgemein weniger befallen zu sein als höhere, eine genauere Interpretation scheint jedoch nicht möglich zu sein.

2.5. Non-targeted (Ungerichtete) Metabolomics von infizierten Weizenproben im Jahr 2023

Eingesetzte Methodik der Non-targeted Metabolomics:

Das Ziel der Non-Targeted Metabolomics des mit *Fusarium graminearum* infizierten Weizens lag auf der Entschlüsselung der komplexen Interaktionsdynamik zwischen dem Weizenwirt und dem Pilz. Ein zentraler Aspekt dieser Untersuchung war die Analyse der Stoffwechselprozesse sowohl der Pflanze als auch des Pilzes. Von besonderem Interesse war dabei die Interaktion zwischen den Organismen, z.B. den Entgiftungsmechanismen, die der Weizen als Reaktion auf die Fusarium-Infektion einsetzt und die zur Bildung modifizierter Mykotoxine wie DON-3-Glucosid führen.

Die Methodik basiert auf der Anwendung der Flüssigchromatographie mit der Time-of-Flight-Massenspektrometrie (LC-ToFMS) auf infizierte Weizenproben aus dem Auto-DGB Feldversuch 2023. Ergänzt wurde dies durch die systematische Integration bereits vorliegender Daten zur Mykotoxin-Quantifizierung, um ein umfassendes Bild der metabolischen Reaktionen während der Fusarium-Infektion zu gewinnen.

Analysenbedingungen

Die QuEChERS-Extrakte wurden auf einem Sciex X500R QTOF UHPLC–ToF–MS-System (Sciex, Framingham, MA, USA) mit einer ACQUITY UPLC BEH C18-Säule (Waters, Milford, MA, USA) analysiert. Die Datenerfassung erfolgte sowohl im positiven als auch im negativen Elektrospray-Ionisationsmodus (ESI) unter Verwendung der SWATH-Akquisition (Gillet et al., 2012). Der UPLC-Gradient und die Geräteparameter entsprachen zuvor veröffentlichten Methoden (Piezconka et al., 2025). Eine gepoolte QC-Probe, hergestellt durch das Zusammenführen gleicher Aliquots aller Extrakte, wurde alle 15 Läufe doppelt injiziert, um die Signalstabilität im gesamten Batch zu überwachen und zu normalisieren. Da die negative Ionisation nur begrenzt ergänzende Informationen lieferte, konzentrierte sich die nachfolgende Datenverarbeitung und -interpretation auf den ESI-Positivmodus.

Die resultierenden .wiff2-Profildateien wurden in die Open-Source-Datenverarbeitungsumgebung MS-DIAL 4.2 41 importiert. Eine Ausschlussmassenliste wurde angewendet, um Massen zu entfernen, die der Kalibrantmischung und üblichen Lösungsmittelverunreinigungen entsprechen, wodurch Rauschsignale reduziert wurden. Die SWATH-Spektrumdekonstruktion nutzte den integrierten, maschinellen Lernansatz der Software, um überlappende Fragmentationensignale aufzulösen und sie anhand von Retentionszeit- und m/z-Profilen den Precursor-Ionen zuzuordnen. Für das Peak-Alignment dienten die QC-Messungen als Referenzdateien; dabei wurden Retentionszeitkorrekturen, MS1-Anpassungen, Peakanzahlfilterung und abundanzbasierte Filterung (2 von 2 Replikaten) innerhalb der Probengruppen angewendet. Eine Leerwertkorrektur wurde durchgeführt. Nach der Erstellung der Alignment-Tabelle wurden Batch-Effekte mittels LOWESS-Regression korrigiert, um die Feature-Intensitäten über alle QC-Messungen hinweg anzugleichen. Die finale Feature-Matrix wurde im .mgf-Format für die weitere Analyse mit SIRIUS 5.8.2 42 exportiert.

Multivariate Statistikmethoden werden eingesetzt, um Muster in den Metabolomprofilen zu identifizieren. Darüber hinaus kommen Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) und *in silico* Netzwerke zum Einsatz, um die Identifikation von Metaboliten zu verbessern.

Ergebnis der Non-targeted Metabolomics

Die Datenanalyse umfasste zunächst die Prüfung mittels Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis, PCA), wobei keine signifikante Clusterbildung der Proben entlang der ersten beiden Komponenten festgestellt wurde (Abb. 12).

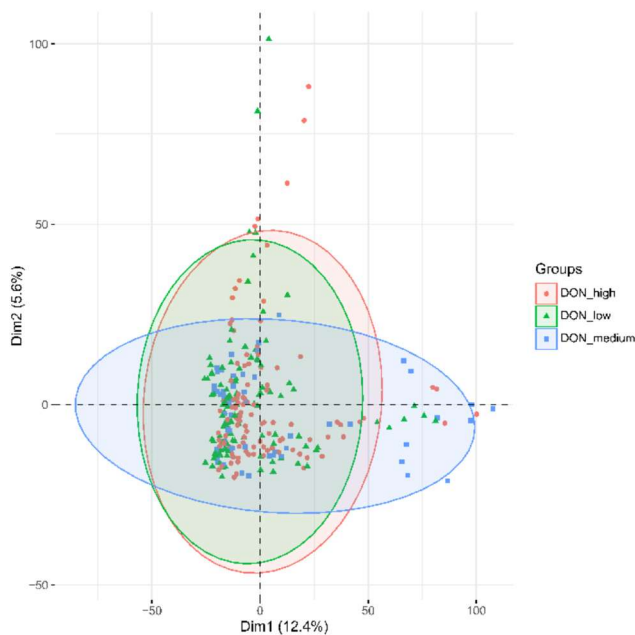


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis, PCA) der inokulierten Weizenproben im negativen ESI-Modus der LC-ToFMS/MS, unterschieden nach hohem (rot), niedrigem (Grün) und mittlerem (blau) DON-Gehalt.

Dies führt zu dem Schluss, dass die Varianz zwischen den Proben nicht auf der DON-Konzentration basiert. Anschließend deuteten überwachende statistische Verfahren, insbesondere die Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), auf einen Trend von niedriger zu hoher DON-Konzentration hin, jedoch ohne eine klare Klassentrennung.

Eine weiterführende Analyse mittels Orthogonaler Partial Least Squares (OPLS) zeigte einen Trend entlang der ersten Komponente in Bezug auf die quantitative y-Variable (DON-Konzentration) (Abb. 13).

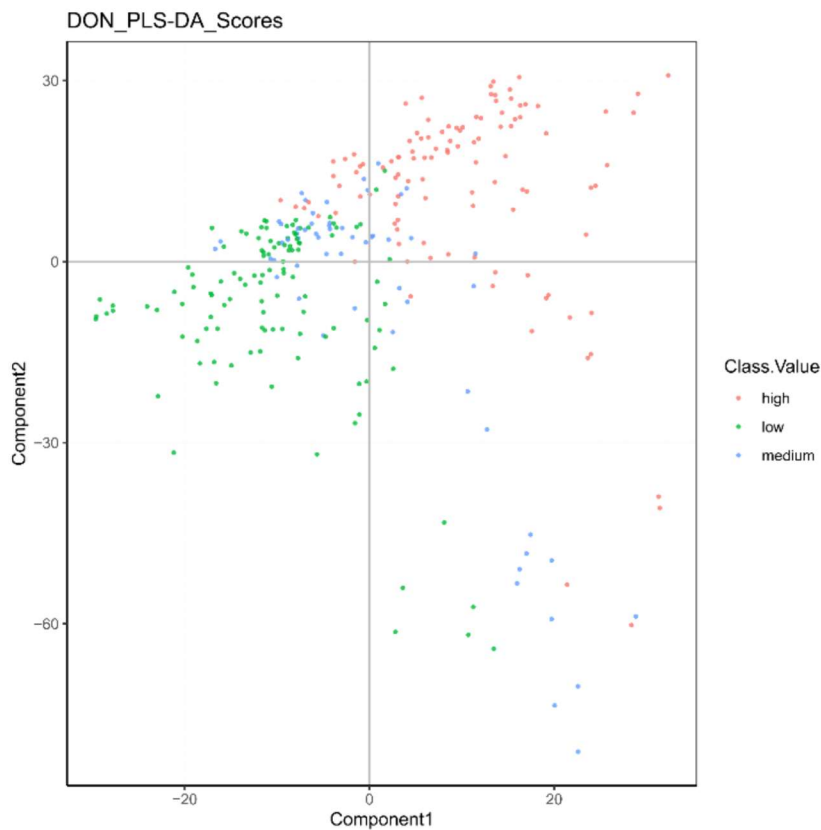


Abbildung 13: Orthogonaler Partial Least Squares (OPLS) Datenanalyse der inokulierten Weizenproben im negativen ESI-Modus der LC-ToFMS/MS, unterschieden nach hohem (rot), niedrigem (Grün) und mittlerem (blau) DON-Gehalt.

Die aus OPLS abgeleiteten Loadings-Plots lieferten entscheidende Merkmale, deren Korrelation mit der DON-Konzentration untersucht wurde. Besonders Merkmale mit sehr hohen VIP-Werten („Variable Importance in Projection“) zeigten eine lineare Beziehung – sowohl positiv als auch negativ – zur DON-Konzentration. Die positiv korrelierenden Merkmale wiesen eine starke lineare Korrelation mit DON auf, untermauert durch Pearson-Koeffizienten von 0,9 für die zwei wichtigsten Features im positiven wie auch im negativen Ionisationsmodus sowie R^2 -Werten größer als 0,8. Diese starke Korrelation ist bemerkenswert, insbesondere im Hinblick auf die biologischen Unterschiede zwischen den untersuchten Proben. Die MS-Signale mit den höchsten positiven Korrelationen waren m/z 265,1801 und 201,1641 (Abb. 14) in positiver Ionisation sowie m/z 295,1553 und 445,2446 in negativer Ionisation. Die MS-Signale mit den höchsten negativen Korrelationen waren m/z 501,3061 in positiver Ionisation sowie m/z 517,3019 in negativer Ionisation.

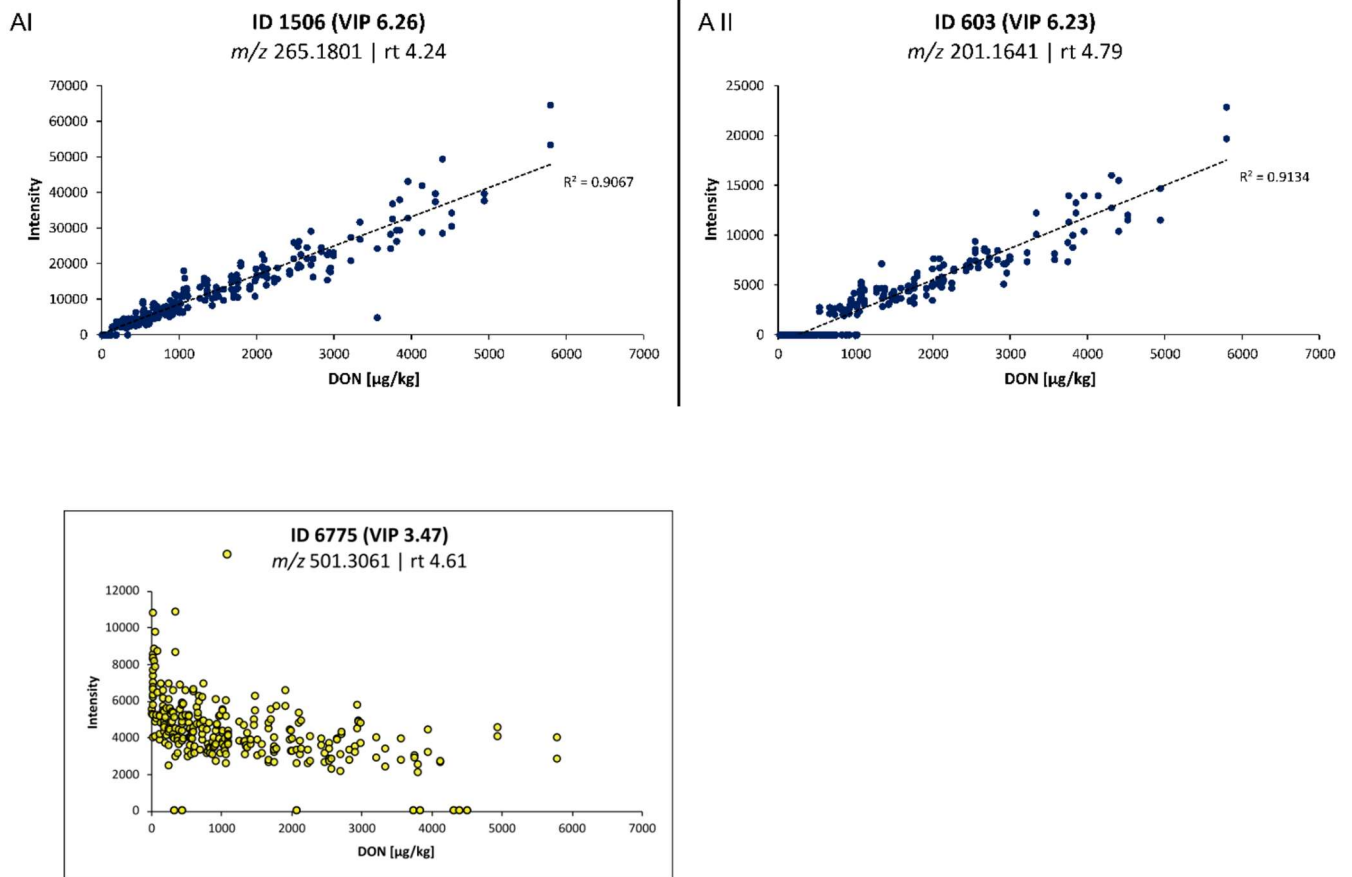


Abbildung 14: Intensitätskurven für m/z 265,1801, 201,1641 und 501,3061 in Abhängigkeit von der DON-Konzentration

Um von statistischen Zusammenhängen zu einer biochemischen Interpretation zu gelangen, wurde im nächsten Schritt die Stoffklasse der Metaboliten untersucht, die mit der Toxinakkumulation verknüpft sind. Aus MS-DIAL exportierte Tandem-Massenspektraldaten wurden in der SIRIUS-Umgebung (Duhrkop et al., 2019) analysiert, in der fragmentierungs-basierte Summenformelvorhersagen und Stoffklassenannotationen die Einordnung dieser Merkmale in metabolische Netzwerke ermöglichten. Die strukturelle und chemische Klassifizierung der Metaboliten erfolgte mit CANOPUS (Class Assignment and Ontology Prediction Using Mass Spectrometry), einem Deep-Learning-Framework, das auf nahezu 25.000 Referenzverbindungen aus NIST 2017, GNPS und MassBank trainiert wurde (Djombou Feunang et al., 2016)

Die Metaboliten, die am stärksten mit dem Fortschreiten der *F. culmorum*-Infektion zunahm, waren konsistent mit dem Sesquiterpenstoffwechsel verknüpft. Die Sesquiterpenoid-Annotation im CANOPUS-Framework basiert auf dem charakteristischen C_{15} -Rückgrat und diagnostischen MS^2 -Fragmentationen (z. B. m/z 93.0700 $[C_7H_9]^+$, m/z 105.0700 $[C_8H_9]^+$, m/z 109.1012 $[C_8H_{12}]^+$ oder m/z 121.1012 $[C_9H_{12}]^+$). Sesquiterpene sind farnesylabgeleitete C_{15} -Terpenoide, die eine zentrale Rolle in der Virulenz von *Fusarium* spielen. Dabei sind Trichothecene ihre stärksten phytotoxischen Vertreter. Unter diesen sind DON und seine Derivate – unsere abhängige Variable, die nicht Teil des non-targeted Metabolomik-Datensatzes ist – als wesentliche Virulenzfaktoren etabliert, die die Proteinsynthese des Wirts stören und maßgeblich den Schweregrad der Erkrankung bestimmen (Harris et al., 1999, Hohn et al., 1998, Masuda

et al., 2007). Mehrere mit der Trichothecenbiosynthese verknüpfte Sesquiterpen-Zwischenstufen nahmen mit steigender Toxinbelastung an Intensität zu, darunter Hydroxytrichodien (C₁₅H₂₄O), Isotrichodiol (C₁₅H₂₂O₂), Isotrichotriol/Trichodermol (C₁₅H₂₂O₃), Isotrichodermin (C₁₅H₂₂O₄), Decalonectrin/Calonectrin (C₁₅H₂₂O₅) und Nortrichodiene (C₁₃H₁₈, C₁₃H₂₀, C₁₃H₂₀O). Diese Annotationen wurden durch in-silico-Fragmentierungsanalysen via CSI:FingerID (Duhrkop et al., 2015) unterstützt und anhand von Referenzspektren in der MassBank of North America (University of California, Davis) überprüft. Die ausgeprägte Anreicherung sesquiterpenabgeleiteter Metaboliten spiegelt etablierte Fusarium-Infektionswege wider, und ihre nahezu lineare Beziehung zu DON-Konzentrationen verstärkt den mechanistischen Zusammenhang zwischen metabolischen Signaturen und Pathogenvirulenz.

Im Gegensatz dazu sind biochemischer Ursprung und funktionale Rolle der Metaboliten, die mit konstitutiven oder induzierbaren pflanzlichen Abwehrprozessen verknüpft sind, schwerer zu bestimmen. Diese Verbindungen, die bei niedrigen Toxinkonzentrationen konsistent angereichert waren, ordneten sich überwiegend dem Diterpenstoffwechsel zu. Ihr gemeinsames C₂₀-Rückgrat, diagnostische Fragmente eines erweiterten terpenoiden Kerns sowie der wiederkehrende neutrale Hexosylverlust (-162.0534 [C₆H₁₀O₅]) klassifizieren sie als glykosylierte Diterpene. Diese Metaboliten erreichten ihre höchsten Intensitäten in Proben mit minimaler DON-Kontamination, und ihre inverse Assoziation nahm mit steigender Toxinbelastung kontinuierlich ab. Da ihre Häufigkeit mit zunehmender Pilzaktivität sinkt – im Gegensatz zu den gut dokumentierten Anreicherungen pilzlicher Metaboliten wie DON und DON-3-Glucosid –, ist ein pilzlicher Ursprung mit nachfolgender pflanzlicher Glykosylierung unwahrscheinlich, wenn auch nicht vollständig auszuschließen. Die konsistente Detektion dieser glykosylierten Metaboliten sowie ihre Assoziation mit effektiver Pathogenbegrenzung stützen ihre Interpretation als endogene Bestandteile des sekundären Weizenstoffwechsels und nicht als Detoxifikationsprodukte pilzlicher Herkunft.

Frühere Arbeiten von Gauthier et al. (2015) fassten metabolische Signaturen zusammen, die mit der Getreideabwehr gegen Fusarium assoziiert sind, darunter die Akkumulation von Diterpenoiden in Gerste (Bollina et al., 2011, Chamarthi et al., 2013, Kumaraswamy et al., 2011). Diese Metaboliten stellten jedoch nur einen kleinen Anteil der berichteten abwehrassoziierten Profile dar und wurden überwiegend unter kontrollierten Laborbedingungen charakterisiert, so dass ihre ökologische Relevanz unklar blieb. Diterpenoide hingegen sind in Mais und Reis gut etablierte Phytoalexine, die nach Chitinerkennung pilzliche Membranen schädigen (Koga et al., 1997; Schmelz et al., 2014). Unsere Ergebnisse liefern ergänzende Evidenz unter Feldbedingungen und unterstützen die Hypothese, dass der Diterpenstoffwechsel des Weizens eine funktionale Rolle bei der Abwehr von Fusarium-Infektionen spielt.

Die Dominanz glykosylierter Diterpene in unserer Studie weist auf eine aktive Modulation des sekundären Stoffwechsels während der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen hin. In Getreidearten sind Diterpenoide als Vorstufen vielfältiger antimikrobieller Phytoalexine bekannt, doch ihr überwiegendes Auftreten in glykosylierter Form deutet auf zusätzliche Regulationsebenen hin. Eine solche Konjugation könnte einen Detoxifikations- und Speichermechanismus widerspiegeln, bei dem reaktive oder bioaktive Diterpene glykosyliert werden, um ihre Zytotoxizität zu verringern und eine vakuoläre Speicherung zu ermöglichen. Unter erneutem Stress könnten diese Konjugate entweder hydrolysiert werden, um das aktive Aglykon freizusetzen und damit eine phytoanticipinartige Funktion zu erfüllen, oder die glykosy-

lierten Konjugate könnten direkt als induzierbare phytoalexinartige Substanzen mit antimikrobieller Aktivität wirken. Letzteres wurde für mehrere glycosidische Phytoalexine vorgeschlagen, die ihre antifungale Aktivität beibehalten oder sogar steigern, während ihre Löslichkeit und Transportfähigkeit verbessert wird (Křen, 2008).

Die Anreicherung von Diterpenglykosiden, insbesondere in Proben mit geringer Fusarium-Infektionseffizienz, könnte auf eine wirksame Wirtsreaktion hindeuten, in der (glykosylierte) Diterpene Teil einer frühen Eindämmungsstrategie sind. Dieses Muster weist auf eine potenzielle biochemische Rolle des Diterpenstoffwechsels in der pflanzlichen Abwehr hin und unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zum biosynthetischen Ursprung, den beteiligten Enzymen und der funktionellen Bedeutung von Diterpenen und ihren Glycosiden in der Weizen-Fusarium-Interaktion.

3. Vergleich der Vorhabensdurchführung mit der ursprünglichen Beschreibung

Die kombinierte Analytik für Fusarien- und Alternariatoxine konnte wie geplant entwickelt, validiert und auf eine Reihe von Körner- und Ährenproben angewendet werden.

Die im Projekt erzeugten Proben aus mit *F. culmorum* infizierten und bonitierten Weizen wurden erfolgreich analysiert. Die Korrelation der Bonitur mit dem Gehalt an Trichothecenen war qualitativ möglich, quantitativ aber nur zu einem gewissen Grad. Dies war insbesondere daher schwierig, da die Körner nicht zum Zeitpunkt der Bonitur erhalten werden und zwischen Bonitur und Ernte weitere Einflussfaktoren zum Tragen kommen, die eine Korrelation abschwächen. Die Analytik der Ähren zum Boniturzeitpunkt ergab auch einen qualitativen Zusammenhang, ermöglichte aber keine gute Vorhersage für den DON-Gehalt.

Alternaria toxine spielten nach einer Fusariuminfektionen offenbar keine Rolle, es gab keine, auch keine negative Korrelation mit der Fusariuminfektionen.

Durch die Non-targeted metabolomics konnten beschriebene Klassen von Metaboliten aus der Interaktion von Weizen mit *Fusarium culmorum* bestätigt und neue Metaboliten näherungsweise identifiziert werden.

4. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises - nicht zur Veröffentlichung bestimmt

5. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die im Projekt entwickelte Multimycotoxinanalytik wurde als Grundlage für die erweiterte Multimycotoxinmethode genommen, die in vielen Projekten des Lehrstuhls an der TUM und bei TUMCREATE in Singapur erfolgreich eingesetzt wird: Mycotoxine in pflanzenbasierten Milch- und Fleischalternativen sowie vielen anderen Probenarten.

Daneben sind mit den Projektergebnissen weitere Antragstellungen beim BMEL, BMBF, AIF/FEI, und EU „Horizon Europe“ mit Partnern aus dem ESFRI-Projekt METROFOOD-RI vorgesehen. Weiterhin wurde ein CREATE Seed Grant Antrag im Rahmen des in Singapur geförderten TUMCREATE-Projekts Proteins4Singapore gestellt. Eine solche Antragstellung mit genannten Partnern hat inzwischen zur erfolgreichen Einwerbung des Folgeprojekts HORIZON-INFRA-2023-DEV-01/Project no. 101130162, Titel: METROFOOD-RI Early Phase Implementation (METROFOOD-EPI) geführt.

6. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nachdem nur wenige Forschungsgruppen weltweit die Interaktion von Fusarium und Weizen auf derart hohem analytischen Niveau durchführen, waren keine relevanten Erkenntnisse von dritter Seite im Berichtszeitraum zu verzeichnen.

7. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Die Entwicklung der Mykotoxinanalytik wurde in der internationalen Zeitschrift mit Peer Review Analytical and Bioanalytical Chemistry publiziert (Dick et al., 2024).

Ein Manuskript mit dem Titel: „Glycosylated diterpenes associate with early containment of *Fusarium culmorum* infection across wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties under field conditions“ wurde im Preprint-Server bioRxiv am 03.12.2025 hinterlegt (Pieczonka et al., 2025) und wird in Kürze in einer internationalen Zeitschrift mit Peer Review eingereicht.

Literatur

Bollina, V.; Kushalappa, A. C.; Choo, T. M.; Dion, Y.; Rioux, S. Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. *Plant Mol Biol* **2011**, 77 (4-5), 355-370. DOI: 10.1007/s11103-011-9815-8.

Chamarthi, S. K.; Kumar, K.; Gunnaiah, R.; Kushalappa, A. C.; Dion, Y.; Choo, T. M. Identification of fusarium head blight resistance related metabolites specific to doubled-haploid lines in barley. *European Journal of Plant Pathology* **2013**, 138 (1), 67-78. DOI: 10.1007/s10658-013-0302-8.

Dick, F; Dietz, A; Asam, S; Rychlik, M (2024) Development of a high throughput UHPLC-MS/MS method for the analysis of *Fusarium* and *Alternaria* toxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416:5619–5637, DOI10.1007/s00216-024-05486-4

Djombou Feunang, Y.; Eisner, R.; Knox, C.; Chepelev, L.; Hastings, J.; Owen, G.; Fahy, E.; Steinbeck, C.; Subramanian, S.; Bolton, E.; et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *J Cheminform* **2016**, 8, 61. DOI: 10.1186/s13321-016-0174-y.

Duhrkop, K.; Fleischauer, M.; Ludwig, M.; Aksenov, A. A.; Melnik, A. V.; Meusel, M.; Dorrestein, P. C.; Rousu, J.; Bocker, S. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat Methods* **2019**, 16 (4), 299-302. DOI: 10.1038/s41592-019-0344-8.

Duhrkop, K.; Shen, H.; Meusel, M.; Rousu, J.; Bocker, S. Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112* (41), 12580-12585. DOI: 10.1073/pnas.1509788112.

Dzuman, Zbynek, Zachariasova, Milena, Lacina, Ondrej, Veprikova, Zdenka, Slavikova, Petra, Hajslova, Jana (2014) A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices, *Talanta*, 121: 263-272.

Gauthier, L.; Atanasova-Penichon, V.; Chereau, S.; Richard-Forget, F. Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *Int J Mol Sci* **2015**, *16* (10), 24839-24872. DOI: 10.3390/ijms161024839.

Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Rost, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* **2012**, *11* (6), O111 016717. DOI: 10.1074/mcp.O111.016717.

Habler, K, Rychlik, M (2016) Multi-mycotoxin Stable Isotope Dilution LC-MS/MS Method for *Fusarium* Toxins in Cereals, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408: 307-317.

Harris, L. J.; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Nicholson, P.; Butler, G.; Young, J. C.; Weston, G.; Proctor, R. H.; Hohn, T. M. Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. *Plant Dis* **1999**, *83* (10), 954-960. DOI: 10.1094/PDIS.1999.83.10.954.

Hohn, T. M.; McCormick, S. P.; Alexander, N. J.; Desjardins, A. E.; Proctor, R. H. Function and Biosynthesis of Trichothecenes Produced by *Fusarium* Species. In *Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease*, Kohmoto, K., Yoder, O. C. Eds.; Vol. 13; Springer, 1998; pp 17-24.

Kumaraswamy, G. K.; Kushalappa, A. C.; Choo, T. M.; Dion, Y.; Rioux, S. Differential metabolic response of barley genotypes, varying in resistance, to trichothecene-producing and -nonproducing (*tri5*-) isolates of *Fusarium graminearum*. *Plant Pathology* **2011**, *61* (3), 509-521. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02528.x.

Koga, J.; Ogawa, N.; Yamauchi, T.; Kikuchi, M.; Ogasawara, N.; Shimura, M. Functional moiety for the antifungal activity of phytocassane E, a diterpene phytoalexin from rice. *Phytochemistry* **1997**, *44* (2), 249-253. DOI: 10.1016/s0031-9422(96)00534-1.

Křen, V. Glycoside vs. Aglycon: The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity. In *Glycoscience*, Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K., Thiem, J. Eds.; Springer, 2008.

Masuda, D.; Ishida, M.; Yamaguchi, K.; Yamaguchi, I.; Kimura, M.; Nishiuchi, T. Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **2007**, *58* (7), 1617-1626. DOI: 10.1093/jxb/erl298.

Pieczonka, S. A.; Dzemajili, A.; Heinzmann, S. S.; Rychlik, M.; Schmitt-Kopplin, P. The high-resolution molecular portrait of coffee: A gateway to insights into its roasting chemistry and comprehensive authenticity profiles. *Food Chem* **2025**, *463* (Pt 4), 141432. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.141432.

Pieczonka, S. A., Dick, F., Bentele, M., Ramgraber, L., Prey, L., Kupczyk, E., Seidl-Schulz, J., Hanemann, A., Noack, P. O., Asam, S., Schmitt-Kopplin, P., Rychlik, M. (2025) Glycosylated

diterpenes associate with early containment of *Fusarium culmorum* infection across wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under field conditions, bioRxiv 2025.12.02.691979; doi: <https://doi.org/10.64898/2025.12.02.691979>

Puntscher, H., et al. (2019) Quantitation of free and modified *Alternaria* mycotoxins in European food products by LC-MS/MS, *Food Control* 102: 157–165.

Scheibenzuber S, Dick F, Asam A, Rychlik M (2021) Analysis of 13 *Alternaria* mycotoxins including modified forms in beer, *Mycotoxin Res.* 37:149-159, <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00424-0>

Schmelz, E. A.; Huffaker, A.; Sims, J. W.; Christensen, S. A.; Lu, X.; Okada, K.; Peters, R. J. Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins. *Plant J* 2014, 79 (4), 659-678. DOI: 10.1111/tpj.12436.

Vogelgesang, J. and J. Hädrich (1998) Limits of detection, identification and determination: A statistical approach for practitioners, *Accreditation and Quality Assurance* 3(6): 242–255.

Walravens, J, Mikula, H, Rychlik, M, Asam, S, Njumbe, Ediage E, Diana, Di Mavungu J, Van Landschoot, A, Vanhaecke, L, and De Saeger, S (2014) Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuff. *J. Chromatography A*, 1372: 91-101