ORIGINALBEITRAG

Monika Goßmann · Sylvia Kleta · Hans-Ullrich Humpf · Carmen Büttner

Untersuchungen zum endophytischen Befall von *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg in geernteten Stangen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.)

Eingegangen: 20 Dezember 2004 / Angenommen: 10 Januar 2005 / Online veröffentlicht: 2 März 2005 © Springer-Verlag 2005

Zusammenfassung Erstmalig wurden mit den vorliegenden Untersuchungen Spargelstangen zur Haupterntezeit auf endophytischen Pilzbefall untersucht. Sie zeigen, dass im Ernteprodukt zwar Fusarium proliferatum als potenzieller Mykotoxinbildner zu finden ist. Eine mögliche natürliche Kontamination mit Fumonisinen bestätigte sich nicht. Von den mit F. proliferatum infizierten Stangen wies nur eine Stange mit grau-rosa-orange farbenen Gewebeveränderungen an der Basis sichtbare Symptome auf. Allgemeine Rückschlüsse auf eine mögliche Gefährdung oder Nichtgefährdung des Verbrauchers beim Verzehr von mit F. proliferatum kontaminierten, symptomlosen Stangen können aus der Analyse nicht gezogen werden. Hierzu müssen weitergehende Untersuchungen zur Wirt-Pathogen-Interaktion erfolgen und die phänotypischen und genotypischen Einflussfaktoren in diesem Prozess noch näher untersucht werden.

Schlüsselwörter Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg · Asparagus officinalis L. · Gewebeveränderungen · Kontamination · Mykotoxinbildner

Investigation on contamination of asparagus spears (Asparagus officinalis L.) with Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg during main harvest

Abstract This is the first report on the occurrence of endophytic fungi in asparagus spears during the main harvest from a German site in 2002. The data confirm the presence of *Fusarium proliferatum* — a potential myco-

M. Goßmann (☑) · S. Kleta · C. Büttner Fachgebiet Phytomedizin, Humboldt-Universität zu Berlin, Lentzeallee 55–57, 14195 Berlin E-Mail: monika.gossmann@agrar.hu-berlin.de

H.-U. Humpf Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster, Corrensstraße 45, 48149 Münster toxin producer — in harvested asparagus spears, but contamination with Fumonisin B1 could not be verified. Only one of the spears infected with *F. proliferatum* showed visible symptoms such as grey/orange-coloured basal tissue. However, this result does not sufficiently indicate a health risk for consumers. Thus, further investigations are needed concerning the host-pathogen interaction and especially for identifying phenotypic and genotypic factors of the disease process.

Keywords Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg · Asparagus officinalis L. · Tissue changes · Contamination · Mycotoxin producer

Einleitung

Spargel (Asparagus officinalis L.) aus der Klasse der Monocotyledoneae, Familie der Liliaceae, ist eine der bedeutendsten perennierenden Gemüsekulturen. Deutschland hat die Anbaufläche in den letzten Jahren stetig zugenommen, 2003 betrug diese 18.200 ha und die Erntemenge lag bei 57.000 t (ZMP 2004). Bedingt durch die enorme Erweiterung des Spargelanbaus stellt sich immer mehr die Frage nach geeigneten Anbauflächen. Das Problem mangelnder Flächenverfügbarkeit führt dazu, dass zunehmend Spargel auf nicht geeigneten Böden an- und nachgebaut wird. Die damit verbundenen Risiken wie eine möglicherweise reduzierte Lebensdauer der Anlagen, Wachtumsdepressionen, mangelhafter Austrieb, absterbende Pflanzen und verminderte Stangenqualität werden dabei meist aus wirtschaftlichen Gründen in Kauf genommen. Sukzessive entsteht ein ansteigender Infektionsdruck bodenbürtiger pilzlicher Krankheitserreger. Hauptverursacher im Komplex von Wurzel-, Kronenund Stängelfäuleerreger sind parasitäre Pilzarten der Gattung Fusarium, darunter F. oxysporum Schlecht... F. proliferatum (Matsushima) Nirenberg, F. culmorum (W.G. Smith) Sacc., F. redolens Wollenw., F. solani (Mart.) Sacc., F. subglutinans (Wollenw. u. Reink.) Nelson et al. (Sadowski u. Knaflewski 1990; Hartung et al. 1990; Blok u. Bollen 1995; Elmer et al. 1996).

Bei Untersuchungen erkrankter Spargelpflanzen aus Jung- und Ertragsanlagen Deutschlands bzw. Österreichs zur Problematik parasitär verursachter Absterbeerscheinungen wurde in den Kronen-, Wurzel- und Stängelteilen relativ häufig eine endophytische Kontamination mit Fusarium-Arten festgestellt. Neben dem Nachweis von F. oxysporum als dominierende Art wurde in diesem Zusammenhang auch erstmalig F. proliferatum nachgewiesen (Goßmann et al. 2001). Diese Fusarium-Art kolonisiert als Wurzel-, Stängel- und Fruchtfäulerreger vor allem in tropischen Anbaugebieten wirtschaftlich bedeutsame Kulturpflanzen wie den Mais, Weizen, Sorghum, Dattelbäume und Reis (Chulze et al. 1996; Leslie et al. 1992; Abdalla et al. 2000; Desjardins et al. 1997). Gemeinsam mit F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg zählt F. proliferatum zu den Hauptbildnern von Fumonisinen. Fumonisine sind Aminopolyalkohole, die kanzerogene Wirkungen haben und zu schweren gesundheitlichen Problemen bei Tieren und Menschen führen können (Gelderblom et al. 1988; Nelson et al. 1992).

Nachdem Ende der 1990er Jahre in Italien, in F. proliferatum infizierten Spargelstangen Fumonisin B₁ (FB₁) nachgewiesen werden konnte (Logrieco et al. 1998), gelang auch in Deutschland erstmals der Nachweis. So fand Seefelder et al. (2002) in 9 von 10, mit F. proliferatum infizierten, Spargelstangen das Fumonisin B₁. Die Stangen wurden nach der Ernteperiode, Ende Juli 2000, von Pflanzen aus mehrjährigen Anlagen mit starken Wuchsdepressionen entnommen. In den Stangen konnten in mykologischen Untersuchungen neben F. proliferatum, auch eine natürliche Kontamination mit F. sambucinum und F. oxysporum festgestellt werden. Mittels Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) wurde in diesen Stangen eine FB₁-Konzentration von 36,4-4513,7 ng/g Trockengewicht nachgewiesen.

Die Ergebnisse waren Anlass, Spargelstangen während der Haupternteperiode auf die Kontamination mit *F. proliferatum* bzw. mit Fumonisinen zu untersuchen.

Material und Methoden

In einer 1998 gepflanzten Ertragsanlage in Deutschland wurden zur Hauptstechperiode Anfang Juni 2002 von 11 Sorten ('Ariane', 'Andreas', 'Backlim', 'Gijnlim', 'Grolim', 'Horlim', 'Huchel's Alpha', 'Eposs', 'Ramos', 'Ravel' und 'Thielim') Bleichspargelstangen geerntet. Je Sorte wurden unmittelbar nach dem Stechen jeweils bis zu 25 Stangen mit einer maximalen Länge von 22 cm zufällig entnommen. Einzeln in Papiertüten verpackt erfolgte der Transport gekühlt mit anschließender visueller Bonitur.

Nach einer Oberflächendesinfektion der Stangen mit NaOCl 2% für 2 min und mehrmaligem Spülen mit sterilem aq. dest. wurde aus dem unteren, mittleren und oberen Bereich der Stangen jeweils eine 0,3–0,5 cm dünne Scheibe herausgeschnitten. Davon wurden jeweils drei kleine Stücke aus den Bereichen Epidermis, Perizykel und Gefäßzylinder auf eine Platte mit slight nutrient agar

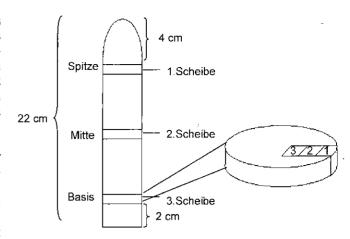


Abb. 1 Aus einer 22 cm langen Spargelstange wurden aus der Basis, der Mitte und der Spitze 0,3-0,5 cm dicke Scheiben herausgeschnitten und daraus je drei Segmente aus den Bereichen Epidermis (1), Perizykel (2) und Gefäßzylinder (3) auf SNA ausgelegt

(SNA) nach Nirenberg (1976) ausgelegt (Abb. 1), um die diese Gewebe besiedelnden endophytischen Pilze zu bestimmen. Die Inkubation erfolgte 7 bis 10 Tage bei 20°C unter UV-Licht im Wechsel einer 14-stündigen Hell- und einer 10-stündigen Dunkelphase. Danach erfolgte eine mikroskopische Bonitur auf morphologischer Basis mit entsprechender Artendeterminierung nach Gerlach u. Nirenberg (1982); Booth (1971), Nirenberg (1976).

Das restliche Stangenmaterial wurde in Alufolie eingewickelt, kurzzeitig bei -20°C gelagert, gefriergetrocknet und pulverisiert.

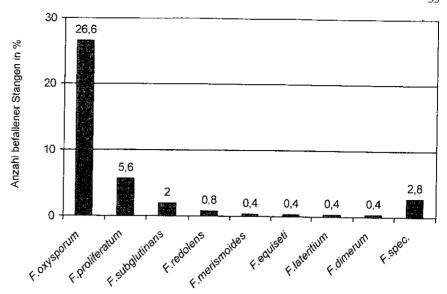
Wurde in den auf SNA ausgelegten Segmenten ein Pilzauswuchs durch *F. proliferatum* festgestellt, erfolgte bei dem entsprechend gefriergetrockneten und pulverisierten Stangenmaterial die Untersuchung auf eine mögliche Kontamination mit dem Fumonisin FB₁ mittels Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) nach Seefelder et al. (2002).

Mittels In-vitro-Untersuchungen erfolgte die Überprüfung des Mykotoxinbildungspotenzials der aus den Spargelstangen gewonnenen *F.-proliferatum*-Isolate. Hierzu wurden 20 g handelsübliches Maismehl und 20 ml aq. dest. mit einer Sporensuspension von 2×10⁴ Konidien/ml inokuliert und für 19 Tage bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach Extraktion mittels Methanol und aq. dest. (70:30) wurde das Filtrat direkt für den ELISA-Test NEOGEN Veratox-Fumonisin Kit (Firma BAG) verwendet.

Ergebnisse

In den aus einer 4-jährigen Ertragsanlage in Deutschland zur Hauptstechperiode Anfang Juni 2002 zufällig entnommenen Spargelstangen (n=248) wurde in ca. einem Drittel der Stangen (n=80) eine endophytische Besiedlung mit Pilzarten der Gattung *Fusarium* nachgewiesen. Dabei wurden sowohl Einzel- als auch Mischinfektionen meh-

Abb. 2 Nachgewiesene Fusarium-Arten, die die untersuchten Spargelstangen (n=248) zur Ernte Anfang Juni 2002 endophytisch besiedelten



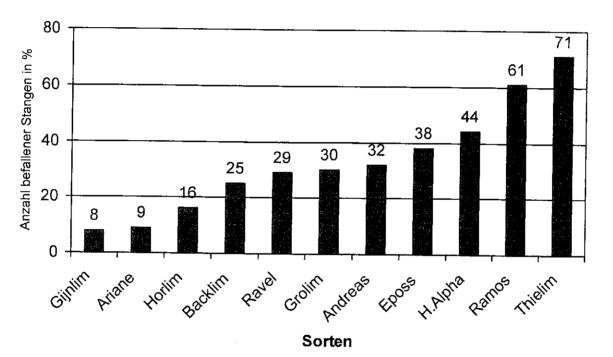


Abb. 3 Vergleich der mit Fusarium sp. befallenen Spargelstangen (n=248) verschiedener Sorten zur Ernte im Juni 2002

rerer Fusarium-Arten festgestellt. In 26,6% aller untersuchten Stangen war F. oxysporum die dominierende Fusarium-Art. In 5,6% der Stangen wurde eine Kontamination mit F. proliferatum gefunden. Nur sehr vereinzelt konnten F. subglutinans, F. redolens, F. merismoides, F. equiseti, F. dimerum, F. lateritium u.a. F. sp. nachgewiesen (Abb. 2) werden.

Beim Vergleich der Sorten deuten sich Befallsunterschiede mit *Fusarium* sp. an. So waren bei den Sorten 'Gijnlim' und 'Ariane' nur 8 bzw. 9% der untersuchten Stangen mit *Fusarium* sp. befallen. Bei den Sorten 'Horlim', 'Backlim', 'Ravel' und 'Grolim' wurde *Fusarium* sp. in 16–30% und bei 'Andreas', 'Eposs' und 'H. Alpha' in 32–44% der untersuchten Stangen nach-

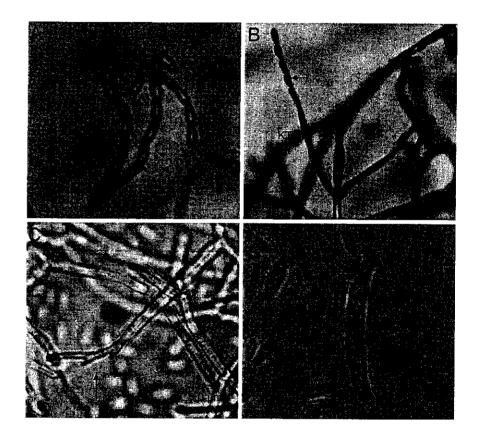
gewiesen. Bei den Sorten ,Ramos' und ,Thielim' zeigten sich mit über 60% relativ hohe Befallsraten von mit Fusarium sp. infizierten Spargelstangen (Abb. 3).

Die Bestimmung des Pilzbesatzes in den einzelnen Stangenbereichen (Basis, Mitte, Spitze) ermöglichte eine genauere Lokalisation von Fusarium sp. (Tabelle 1). Danach wurde Fusarium sp. in 54% der untersuchten Stangen im Basisteil bei ca. 20 cm nachgewiesen. In 17% der Stangen gelang der Nachweis von Fusarium sp. im mittleren Stangenbereich und in 9% in der Spargelspitze. In meist unter 10% der Stangen wurde darüber hinaus ein 2- bzw. 3fach positiver Fusarium-Befall sowohl in der Basis als auch im mittleren und oberen Stangenbereich registriert.

Tabelle 1 Übersicht zur Lokalisation des positiven Nachweises von Fusarium sp. in kontaminierten Spargelstangen (n=80)

Sorte	Basis	Basis+Mitte	Basis+Mitte +Spitze	Basis+Spitze	Mitte	Mitte+Spitze	Spitze	Summe Positiver Nachweise
,Ariane'	2	0	0	0	0	0	2	4
,Andreas`	8	0	0	0	I	0	Ī	10
,Backlim'	3	0	0	0	1	0	ī	5
,Gijnlim'	2	0	0	0	Ō	Ō	ò	2
,Grolim'	I	1	5	0	$\tilde{2}$	Ĭ	Ĭ	11
,Horlim'	4	0	0	Ö	$\bar{0}$	Ô	Ô	4
'H. Alpha'	5	1	1	0	4	1	ĭ	13
,Eposs'	3	2	0	ő	$\dot{2}$	i	Ô	8
,Ramos'	12	0	0	Ö	5	1	ŏ	18
,Ravel	5	0	0	Õ	2	ò	ž	0
,Thielim'	8	4	Ĭ	ĺ	õ	ñ	ĩ	15
Positiver	53	8	7	Î	17	4	0	99
Nachweis [nges]		_	•	•	.,	•	1))
Positiver Nachweis [%]	54	8	7	1	17	4	9	100

Abb. 4 Fusarium proliferatum auf SNA, Mikrokonidien (K) an Konidienträgern (KT) in Ketten (a,b), Polyphialide (c), Makrokonide und Mikrokonidien (d). Vergr. 1:400



In 14 von 248 untersuchten Stangen wurde *F. proliferatum* nachgewiesen, das entspricht 5,6% der Anzahl befallener Stangen (Abb. 2). Hierbei war *F. proliferatum* (Abb. 4) bei mehr als der Hälfte der kontaminierten Stangen meist nur in der Stangenbasis zu finden (Tabelle 2). Hinzu kamen einige wenige Stangen, in denen *F. proliferatum* noch in den Segmenten aus dem mittleren und apikalen Stangenbereich isoliert wurden. Eine weitergehende Differenzierung des Nachweises des endophytischen Pilzbefalls aus den Segmenten der Epidermis, dem Perizykel und des Gefäßzylinders war nicht möglich.

Die mittels LC-ESI-MS durchgeführten Fumonisin-Analysen des im mykologischen Nachweisverfahren als mit *F. proliferatum* positiv getesteten Stangenmaterials ergab in den 14 gefriergetrockneten und pulverisierten Proben keine detektierbaren Gehalte an FB₁ (Tabelle 2).

Beim Screening der aus dem Stangematerial gewonnenen *F.-proliferatum*-Isolate mit Hilfe des ELISA-Tests in vitro zeigten sich 18 von 19 als positiv hinsichtlich ihres Mykotoxinbildungsvermögens. Sie bildeten auf Maismehl das Fumonisin FB₁ in Konzentrationen von ca. 50–100 ppm (Tabelle 2).

Tabelle 2 Fumonisin-B₁-Nachweis in Spargelstangen (Ernte 06.2002) und in Isolaten aus Stangenabschnitten

Fumonisin-l	B ₁ -Nachweis in Spargelstange	en mittels LC-ESI-MS	In-vitro-Fumonisin-B ₁ -Nachweis mittels ELISA				
Sorte	Fusarium-proliferatum- infizierte Spargelstange	FB ₁ -Konzentration ^a pro Stange	Fusarium-prolifera- tum-Isolat	Infizierter Stangenabschnitt	FB ₁ -Konzentration in Maismehl		
		[µg/g]					
,Ravel	1	ND	1	Basis	82,7		
,Eposs'	2	ND	2	Basis	75,8		
	3 .	ND	$\bar{3}$	Mitte	85,2		
,Ramos'	4	ND	4	Basis	90,7		
	5	ND	5	Basis	87,9		
	6	ND	6	Mitte	87,9		
,Backlim'	7	ND	7	Mitte	84,7		
,Thielim'	8	ND	8	Basis	73,0		
	9	ND	9	Basis	68,0		
			10	Mitte	59,6		
	10	ND	11	Spitze	73,0		
,Grolim'	11	ND	12	Basis	62,2		
			13	Mitte	50,7		
			14	Spitze	89,4		
	12	ND	15	Basis	102,91		
			16	Mitte	99,9		
	13	ND	17	Basis	80,5		
			18	Mitte	84,7		
'H. Alpha'	14	ND	19	Basis	- '		

^a Basierend auf dem Trockengewicht; LC-ESI-MS Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, ND nicht detektiert.

Diskussion

Die an Spargelstangen erstmalig während der Haupterntezeit vorgenommenen mykologischen Untersuchungen zeigen, dass in den 248 beprobten, ca. 22 cm langen Spargelstangen Kontaminationen mit endophytischen Pilzarten, insbesondere der Gattung Fusarium nachweisbar waren. Dominierende Fusarium-Art war mit 26,6% infizierter Stangen F. oxysporum, gefolgt von F. proliferatum mit 5,6%. Am häufigsten war dabei die Stangenbasis befallen. Aber auch in der Mitte und der Spitze der Stangen war eine endophytische Pilzbesiedlung feststellbar.

Im Untersuchungsjahr 2002 war meist die Infektion mit F. proliferatum makroskopisch symptomlos, lediglich in einer Stange war eine grau-rosa Gewebeverfärbung an der Stangenbasis beobachtet worden. Dieser weitestgehend symptomlose Befall mit F. proliferatum ist möglicherweise auf den relativ frühen Untersuchungszeitraum zur Probennahme Anfang Juni zurückzuführen. Vorangegangene Untersuchungen von beprobten Spargelstangen, deren mehrjährige Pflanzen nach der Stechperiode, Anfang Juli 2000, an einem anderen Standort in Deutschland, Wuchsdepressionen zeigten, wiesen demgegenüber deutliche Symptome auf. Die zum Zeitpunkt Juli 2000 mit F.-proliferatum-infizierten, ca. 20-25 cm langen Stangen waren meist hohl und wiesen äußerlich an der Basis sichtbare kleine, runde rosa-braune, eingesunkene Flecken auf (Seefelder et al 2002). Ähnliche Befallssymptome an der Basis von Spargelstangen durch F. proliferatum verursacht wurden auch von Elmer et al. (1996) beschrieben. F. proilferatum gilt vor allem in den USA neben F. oxysporum als wichtigster Erreger der

Kronen- und Wurzelfäule an Spargelpflanzen (Endo et al. 1971; Johnston et al. 1979; Elmer et al. 1996).

Insgesamt zeigten die vorgenommenen Untersuchungen der Probennahmen zum Erntezeitpunkt Anfang Juni 2002, dass in den Spargelstangen *F. proliferatum* meist symptomlos nachweisbar war und die infizierten Stangen nicht mit Fumonisinen kontaminiert waren. Die Nachweisgrenze für FB₁ lag hierbei bei 3 ng/g Trockensubstanz. Darunter liegende Werte konnten nicht mehr erfasst werden. Für den Einzelstangennachweis stand teilweise zu wenig Probenrestmaterial für eine Zweifachanalyse zur Verfügung. Dass die aus diesen Stangen gewonnenen *F.-proliferatum*-Isolate das Potenzial haben, Fumonisine zu bilden, zeigten die In-vitro-Analysen mittels ELISA-Test (Tabelle 2).

Die vorliegenden Untersuchungen deuten ferner auf eine unterschiedliche Sortenanfälligkeit des Spargels gegenüber *Fusarium* sp. hin. Diese interessanten Ergebnisse sind jedoch aufgrund der einmalig durchgeführten Untersuchungen nicht zu verallgemeinern und müssen in weiteren Versuchen bestätigt werden.

Literatur

Abdalla MY, Al-Rokibah A, Moretti A, Mule G (2000) Pathogenicity of toxigenic Fusarium proliferatum from date palm in Saudi Arabia. Plant Disease 84:321–324

Blok WJ, Bollen (1995) Fungi on roots and stem bases of asparagus in the Netherlands: species and pathogenicity. European J Plant Path 101:15–24

Booth C (1971) The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Inst Kew, Surrey, England, p 237

Chulze SN, Ramirez ML, Farnochi MC, Pascale M, Visconti A, March G (1996) Fusarium and Fumonisin occurrence in Ar-

- gentian corn at different ear maturity stages. J Agric Food Chem 44:2797-2801
- Desjardins AE, Plattner AD, Nelson PE (1997) Production of Fumonisin B₁ and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. Appl Environ Microbiol 63:1838–1842
- Elmer WH, Johnson DA and MinK GI (1996) Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. Plant Disease 80:117-125
- Endo RM, Burkholder EC (1971) The association of *Fusarium moniliforme* with the crown rot complex of asparagus. Phytopath 61:88–93
- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasa WFO, Thiel P, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NPJ (1988) Fumonisins-novel mykotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol 54:1808–1811
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) The Genus Fusarium a Pictoral Atlas. Mitt Biol Bundesanst Land- und Forstwirt, Berlin-Dahlem, H 209
- Goßmann M, Büttner C, Bedlan G (2001) Untersuchungen zum Spargel (Asparagus officinalis L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland und Österreich auf Infektionen mit Fusarium-Arten. Pflanzenschutzberichte 59:45–54
- Hartung AC, Stephens CT, Elmer WH (1990) Survey of Fusarium population in Michigan's asparagus fields. Acta Horticult 271:395-401

- Johnston SA, Springer JK, Lewis GD (1979) Fusarium monitiforme as a cause of stem and crownrot of asparagus and its association with asparagus decline. Phytopath 69:778–780.
- Leslie, JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klttich CJR (1992): Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (Fusarium section Liseola). Phytopathology 81:1058 1060
- Logrieco A, Dako B, Moretti A, Frisullo S, Visconti A (1998) Occurrence of fumonisins B1 and B2 in Fusarium proliferatum infected Asparagus Plants. J Agric Food Chem 46: 5201–5204
- Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins A (1992) Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforeme* in section *Liseola* and by some related species. Appl Environ Microbiol 58:985–989
- Nirenberg H (1976) Untersuchungen über die morphologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion Liseola. Mitt Biol Bundesanst Land- und Forstwirtsch, Berlin Dahlem, H 169
- Sadowski CZ, Knawlewski M (1990) Susceptibility of selected asparagus cultivars to *Fusarium* spp. under fields conditions. Acta Horticult 271: 343–351
- Seefelder W, Goßmann M, H-U Humpf (2002) Analysis of Fumonisin B₁ in Fusarium proliferatum infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. J Agric Food Chem 50 (10): 2778–2781
- ZMP (2004) Statistisches Bundesamt. In: Spargel-Marktinfo. ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH, September 2004