

Spargelstangenuntersuchungen zur Haupterntezeit auf Infektionen mit *Fusarium* spp. und Kontaminationen mit Fumonisin B₁

M. Goßmann¹, F. Beran¹, G. Bedlan², A. Plenck², S. Hamedinger³, R. Öhlinger⁴, H.-U. Humpf⁵, C. Büttner¹

¹Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Gartenbau, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, Germany

²AGES, Institut für Pflanzengesundheit, Spargelfeldstr. 191, 1220 Wien, Austria

³Landwirtschaftskammer Oberösterreich, Linzer Str. 4, 4070 Eferding, Austria

⁴AGES GmbH, CC Cluster Chemie, Wieningerstr. 8, 4020 Linz, Austria

⁵Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, 48149 Münster, Germany

Abstract

Investigation on asparagus spears during the main harvest by *Fusarium* spp.-infections and contamination by Fumonisin B₁

Asparagus spears collected from a total of six commercial plantings in Austria during the main harvest periods in May and June of 2003 and 2004 were examined for endophytic colonization by *Fusarium* spp., particularly *F. proliferatum*. Potentially toxigenic fungi such as *F. proliferatum* were isolated and identified by morphological characteristics using light microscopy. Fumonisin B₁ in *F. proliferatum*-infected asparagus spears was detected with IAS-HPLC-FLD or HPLC-MS/MS. The identity of endophytic fungi colonizing of a total of 816 individual spears was determined. The incidence of infection by *F. proliferatum* and other *Fusarium* spp. was highly dependent on location and sampling date. The dominant *Fusarium* species among the endophytic microflora was *F. oxysporum*. Other frequently isolated species included *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* and *F. equiseti*. The incidence of *F. proliferatum*-infected asparagus spears was less than 10% at four of the six sampling locations. At the two remaining locations, 20-47% of the spears examined were infected with *F. proliferatum*. Further exploration of FB₁ generation in asparagus is required because the low levels of FB₁ (10-50 µg/kg) detected in harvested spears in 2003 and 2004 cannot be explained by the results of this study.

Keywords: Spargel, Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, Fumonisin B₁

Einleitung

Verursacher von Fäulen der Wurzeln, Rhizome und der Triebe des Spargels (*Asparagus officinalis* L.), die zu irreversiblen Welken, Rückgang der Austriebs- und Ertragsleistung und vorzeitigen Absterberscheinungen führen können, sind hauptsächlich parasitäre Pilzarten der Gattung *Fusarium*, darunter *Fusarium oxysporum* Schlecht., *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. redolens* Wollenw., *F. solani* (Mart.) Sacc. und *F. subglutinans* (Wollenw. & Reink.) P. E. Nelson, Toussoun & Marasas (1, 2, 3, 4, 5).

Während *F. oxysporum* vorzugsweise die Wurzeln junger Spargelpflanzen besiedelt, ist *F. proliferatum*, ähnlich wie *F. redolens*, meist nicht nur in den Wurzeln, sondern auch in den Rhizomen und Trieben mehrjähriger Spargelpflanzen nachweisbar (1, 2). In Untersuchungen zum parasitären Nachweis von *Fusarium* spp. an Spargelpflanzen sind unterschiedliche Arten dominant. In Nord- und Mittelamerika (1, 4, 6), in Polen (3, 7), den Niederlanden (5), in Deutschland und Österreich (8, 9), in Spanien und in Großbritannien (10) werden meist *F. oxysporum* vor *F. proliferatum* als dominierende *Fusarium*-Arten genannt. Dagegen wird in Südamerika, so in Mexiko und Peru (11, 12) bzw. auch in Südafrika (13), *F. proliferatum* als der wichtigste Fußkrankheitserreger nach *F. oxysporum* an Spargel angegeben.

Correspondence: Monika Goßmann, Humboldt Universität Berlin, Institut für Gartenbau, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, Germany (monika.gossmann@agr.ar.hu-berlin.de)

Received 7 April 2008; accepted 25 June 2008

Neben *F. oxysporum* und *F. proliferatum* können in den Spargelanbaugebieten je nach klimatischen Verhältnissen in unterschiedlicher Abundanz noch andere *Fusarium*-Arten am Krankheitskomplex der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule beteiligt sein, so *F. redolens* in Polen (3), den Niederlanden (2) und Deutschland bzw. in Österreich (8, 9). Zum Vorkommen von *F. subglutinans* an Spargelpflanzen liegen u.a. Berichte aus den USA (1) und Österreich (8) vor. Daneben gibt es Nachweise von *F. solani* in Südafrika (10), in Polen (3) und in Deutschland (8). Darüber hinaus wurden bei Untersuchungen von mehrjährigen erkrankten Spargelpflanzen in Deutschland und in Österreich auch noch *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sambucinum* Fuckel und *F. acuminatum* Ell. & Kellerm. in geringeren Befallshäufigkeiten gefunden (8).

Die an erkrankten Spargelpflanzen häufig nachgewiesenen Pilzarten, wie *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, gehören zu den *Fusarium*-Arten, die Kulturpflanzen nicht nur durch Infektionen schädigen, sondern auch Mykotoxine bilden (14). Dabei zählt *F. proliferatum* zu den Hauptbildnern von Fumonisinen (15, 16, 17). Ende der neunziger Jahre wurde in Italien in mit *F. proliferatum* infizierten Spargelpflanzen Fumonisin B₁ (FB₁) und B₂ (FB₂) nachgewiesen (18). 2002 gelang in Deutschland erstmals

der Nachweis von FB₁ in *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen (19).

In 2-jährigen Untersuchungen wurden Spargelstangen mehrjähriger Anlagen verschiedener Standorte zur Haupterntezeit auf Infektionen mit *Fusarium* spp. analysiert. In nachweislich mit *F. proliferatum*-infizierten Stangen wurde die natürliche Kontamination mit FB₁ bestimmt.

Material und Methoden

Probennahme der Spargelstangen

Insgesamt sechs österreichische Ertragsanlagen (Standort A-F) wurden in den Jahren 2003 und 2004 zur Haupterntezeit zu drei Terminen beprobt. In beiden Jahren erfolgte die erste Probennahme (PN) Anfang Mai und ca. vier Wochen später, Anfang Juni, wurde die zweite PN (Tab. 1) durchgeführt. Die Anzahl der beprobten Erntestangen richtete sich nach der Größe und Form der Anbauflächen und lag zwischen 10 und maximal 50 Stangen je Standort und PN-Zeitpunkt (Tab. 2). Je Standort wurden zu den PN-Terminen an vorher vermessenen und markierten PN-Punkten maximal 2 Stangen kronennah entnommen. Die Anzahl der PN-Punkte pro Standort lag in der Regel bei 20, die bis zu 50 m voneinander entfernt lagen.

Tabelle 1. Österreichische Standorte und Termine der Probennahmen (PN) in den Untersuchungsjahren 2003 und 2004

Standort	PN Mai 2003	PN Juni 2003	PN Mai 2004	PN Juni 2004
A (Oberösterreich)	8. 5.	12. 6.	12. 5.	3. 6.
B (Burgenland)	5. 5.	10. 6.	-	-
C (Burgenland)	5. 5.	10. 6.	10. 5.	1. 6.
D (Niederösterreich)	7. 5.	11. 6.	11. 5.	2. 6.
E (Niederösterreich)	7. 5.	11. 6.	11. 5.	2. 6.
F (Niederösterreich)	5. 5.	10. 6.	10. 5.	1. 6.

Tabelle 2. Anzahl Erntestangen (n), die von den sechs Standorten zu den Probennahmen (PN) in 2003 und 2004 auf Pilzbefall untersucht wurden

Standort	Anzahl Erntestangen (n)				Insgesamt Stangen (n)
	PN Mai 2003	PN Juni 2003	PN Mai 2004	PN Juni 2004	
A	38	35	40	40	153
B	15	11	-	-	26
C	45	45	48	51	189
D	43	49	46	46	184
E	39	35	36	40	150
F	32	35	24	23	114
Insgesamt Stangen (n)	212	210	194	200	816

Wenn zu den jeweiligen Stechterminen am PN-Punkt keine erntefähigen Stangen vorhanden waren, wurden benachbarte Pflanzen beprobt. Insgesamt wurden in beiden Versuchsjahren 816 Spargelstangen untersucht (Tab. 2). Der Transport und die Lagerung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgten in gekühlten Behältern innerhalb von 4 Tagen.

Standort- und Witterungsverhältnisse

Es handelte sich bei allen 2003 und 2004 beprobten Standorten in Ober- und Niederösterreich bzw. im Burgenland um mehrjährige Spargelanlagen, die zwischen 1993 und 1996 gepflanzt worden waren. Vorfrüchte des Spargels waren meist landwirtschaftliche Kulturarten wie Getreide, insbesondere Weizen, die in der Fruchtfolge nach Kartoffeln, Rüben oder Mais angebaut wurden. Die Spargelsorten Gijnlim, Backlim, Boonlim, Spaganiva und Vulkan wurden entweder als Grün- oder als Bleichspargel angebaut. Bleichspargel wurde

zur Ernteverfrühung mit Folie abgedeckt (Tab. 3).

Bei den Witterungsdaten der beprobten Standorte in Österreich, wurden für die jeweiligen Erntemonate Mai und Juni die mittlere Monatstemperatur (Tab. 4) und die mittlere Niederschlagsmenge (Tab. 5) im Vergleich zum langjährigen Temperatur- und Niederschlagsmittel erfasst. Es ist festzustellen, dass sich die Temperatur- bzw. Niederschlagswerte in beiden Versuchsjahren im Einzelnen beträchtlich voneinander unterschieden. So war es am Standort A im Mai bzw. Juni 2003 mit ca. 17 °C bzw. 22 °C überdurchschnittlich warm, und die Abweichung vom langjährigen Mittel betrug in diesen beiden Monaten bis zu 5 °C, während die Niederschlagsneigung zumindest im Mai mit 76% unter dem Normalwert lag. In 2004 war die Witterung in den beiden Erntemonaten im Allgemeinen etwas kühler und auch feuchter als im Vorjahr (Tab. 4, 5).

Tabelle 3. Sorte, Pflanzjahr, Vorfrüchte, Anbauform mit Folienabdeckung der beprobten Flächen 2003 und 2004

Standort	Sorte	Pflanzjahr	Vorfrüchte	Anbauform, Folienabdeckung
A	Gijnlim, Backlim	1995	Getreide	Grünspargel
B	Spaganiva	1993	nicht bekannt	Grünspargel
C	Spaganiva	1995	Chinakohl, Luzerne	Grünspargel
D	Boonlim	1996	Weizen, Mais, Rübe	Bleichspargel unter Folie
E	Boonlim	1994	Weizen, Kartoffel	Bleichspargel unter Folie, Grünspargel
F	Gijnlim, Vulkan	1996	Weizen, Mais, Rübe	Bleichspargel unter Folie, Grünspargel

Tabelle 4. Mittlere Monatstemperatur in den Erntemonaten Mai und Juni in 2003 und 2004 im Vergleich zum langjährigen Mittel (in °C) an den beprobten Standorten

Standort	Temperatur (in °C) im Monat Mai		Temperatur (in °C) im Monat Juni	
	2003	2004	2003	2004
A	17,3 (+3,6)*	13,3 (-0,4)	21,7 (+4,9)	16,9 (+0,1)
B/C	18,1 (+2,8)	14,2 (-1,1)	22,6 (+4,4)	18,3 (-0,2)
D/E	17,7 (+3,3)	13,8 (-0,5)	22,1 (+4,7)	17,5 (+0,1)
F	18,2 (+3,1)	14,5 (-0,6)	22,6 (+4,4)	18,1 (-0,1)

* Zahl in Klammer ist Abweichung vom Normalwert 1961-1990 in °C

Tabelle 5. Niederschlag in den Erntemonaten Mai und Juni in 2003 und 2004 im Vergleich zum langjährigen Mittel (in mm) an den beprobten Standorten

Standort	Niederschlag (in mm) im Monat Mai		Niederschlag (in mm) im Monat Juni	
	2003	2004	2003	2004
A	55 (72%)*	72 (95%)	100 (106%)	119 (126%)
B/C	68 (112%)	86 (143%)	43 (61%)	109 (155%)
D/E	73 (96%)	55 (71%)	46 (53%)	118 (136%)
F	112(183%)	55 (90%)	30 (40%)	123 (166%)

*Zahl in Klammer ist Niederschlagshöhe in % der Normalmenge (1961-1990)

Die Witterungsverhältnisse auf den beiden Standorten B und C zeigten im PN-Zeitraum Mai bis Juni 2003 und 2004 eine ähnliche Tendenz wie die des Standortes A, so lagen auch an den Standorten B und C die mittleren Monatstemperaturen 2003 mit 18 °C und 23 °C um bis zu 4 °C über dem jährlichen Temperaturmittel. In 2004 war es im gleichen Erntezeitraum mit 14 °C bzw. 18 °C kühler (Tab. 4). Während es im Mai 2003 relativ feucht war, lag im Juni 2003 die Niederschlagsmenge mit 43 mm weit unter dem Normalwert. Demgegenüber stehen wesentlich höhere Niederschlagsmengen in den Monaten Mai und Juni des Erntezeitraumes 2004 (Tab. 5).

Anhand der ermittelten Witterungsdaten an den drei Standorten D, E und F bleibt festzustellen, das auch hier, im Erntejahr 2003, sehr hohe mittlere monatlichen Temperaturen, die über dem Normalwerten lagen, zu verzeichnen waren. Im Erntejahr 2004 war es dagegen im Mai bzw. Juni an diesen Standorten relativ kühl (Tab. 4). Während die Niederschlagsmenge, vor allem im Erntemonat Mai 2004, meist unter den Normalwerten lagen, war im Juni des gleichen Jahres eine wesentlich höhere Niederschlagsneigung zu verzeichnen (Tab. 5).

Aufbereitung der geernteten Spargelstangen und Untersuchungen auf endophytische Pilzbesiedlung

Die gereinigten und mit Natriumhypochlorid (NaOCl) oberflächendesinfizierten Spargelstangen wurden an der Basis, Mitte und Spitze in der Weise beprobt, dass ca. 2 mm dünne Scheiben im Abstand von 35, 25 und 20 cm von der Stangenspitze ausgehend, herausgeschnitten wurden. Die Scheiben wurden einzeln auf einen Speziellen Nährstoffarmen Agar (SNA) ausgelegt und bei 20 °C, 14 h UV-Licht und 10 h Dunkelphase 10 Tage inkubiert. Danach wurde der endophytische Pilzauswuchs lichtmikroskopisch bonitiert. Die *Fusarium*-Arten sowie sonstige Pilzarten wurden anhand morphologischer Merkmale determiniert (20, 21, 22, 23, 24, 25). Nach der Entnahme der mykologisch zu untersuchenden Gewebestücke wurde das übrige Stangenmaterial im Untersuchungsjahr 2003 kurzfristig bei -20 °C eingefroren. Im Jahr 2004 wurde für die Mykotoxinanalysen das restliche Stangenmaterial in ca. 1 cm³ große Stücke zerkleinert, luftdicht verpackt in flüssigem Stickstoff eingefroren, gefriergetrocknet, pulverisiert und anschließend luftdicht gelagert.

FB₁-Bestimmung im Untersuchungsjahr 2003
Im Untersuchungsjahr 2003 wurden die als positiv getesteten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen mittels HPLC auf den Gehalt an FB₁ untersucht (26). Für die Analyse des FB₁-Gehaltes wurden 20 g des aufgetauten und mechanisch zerkleinerten Probenmaterials verwendet. Die Fumonisin-Extraktion aus der Analysenprobe erfolgte mit einem Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril. Das im Filtrat enthaltene FB₁ wurde spezifisch an eine Immunoaffinitätssäule gebunden und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer einrotiert und das isolierte FB₁ in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch aufgenommen. Nach erfolgter Derivatisierung mit o-Phtaldialdehyd/2-Mercaptoethanol wurden die Fumonisin-Derivate mittels HPLC aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor (Ex. 225 nm; Em. 440 nm) detektiert. Die Nachweisgrenze lag bei 50 µg/kg FB₁. Die FB₁-Mengen der Proben aus 2003 wurden bezogen auf das Frischgewicht ermittelt. Zum Vergleich der FB₁-Werte aus dem nächsten Untersuchungsjahr 2004 wurden sie nachträglich auf das Trockengewicht des Spargels umgerechnet, dabei wurde zugrunde gelegt, dass der Spargel zu mindestens 90% aus Wasser besteht.

FB₁-Bestimmung im Untersuchungsjahr 2004
Die gefriergetrockneten bzw. vorher als positiv getesteten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen beider Probennahmen 2004 wurden mittels HPLC-Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung der Elektrospray Ionisierung (HPLC-MS/MS) nach der Methode von Seefelder *et al.* (19) auf den Gehalt an FB₁ untersucht. Die Nachweisgrenze betrug bei diesem Verfahren 0,2 µg/kg.

Ergebnisse

Fusarium spp.-Infektionsrate in den Erntestangen

Der Nachweis von *Fusarium* spp. in den untersuchten Gewebestücken der beprobten Spargelstangen variiert sehr stark in Abhängigkeit vom Standort und vom Probennahmezeitpunkt (Tab. 6).

Am Standort A sind die absoluten Werte der Infektionsraten in den untersuchten Erntestangen mit *Fusarium* spp. in beiden Jahren bzw. zu den einzelnen PN-Terminen relativ ähnlich.

Tabelle 6. *Fusarium* spp.-Infektionsraten der untersuchten Spargelstangen auf den beprobten sechs Standorten zur Haupterntezeit im Mai und Juni 2003 und 2004

Standort mit Stangenanzahl (n)	<i>Fusarium</i> spp.-Infektionsrate (%) untersuchter Spargelstangen			
	Mai 2003	Juni 2003	Mai 2004	Juni 2004
A (153)	18	49	18	50
B (26)	40	9	-	-
C (189)	16	29	33	57
D (184)	93	80	96	98
E (150)	90	89	72	90
F (114)	84	91	21	70

Tabelle 7. Infektionsrate und *Fusarium*-Artenspektrum in den untersuchten Spargelstangen zur Ernte in beiden Untersuchungsjahren 2003 bzw. 2004

<i>Fusarium</i> spp.*	<i>Fusarium</i> spp.-Infektionsrate (%) untersuchter Spargelstangen in 2003/04					
	Standort A (n=153)	Standort B (n=26)	Standort C (n=189)	Standort D (n=184)	Standort E (n=150)	Standort F (n=114)
<i>F. oxysporum</i>	20	19	21	82	80	67
<i>F. proliferatum</i>	7	4	7	37	20	5
<i>F. culmorum</i> o.	0	8	6	0	11	9
<i>F. sambucinum</i>						
<i>F. avenaceum</i>	7	0	0	0	0	0
<i>F. spp.</i>	10	4	6	9	0	0

*Mischinfektionen möglich

Zu Anfang der Haupterntezeit, im Mai 2003 bzw. 2004, waren ca. 20% der untersuchten Spargelstangen mit *Fusarium* spp. infiziert. Ca. vier Wochen später, im Juni 2003 und 2004, waren an 50% der untersuchten Stangen *Fusarium* spp. nachzuweisen.

Der endophytische Pilzbefall in den geernteten Grünspargelstangen am Standort B wurde nur im Jahr 2003 untersucht. Es zeigte sich, dass hier im Mai schon ca. 40% der untersuchten Stangen mit *Fusarium* spp. infiziert waren. Im Juni konnten nur noch in 10% der untersuchten Stangen *Fusarium* spp. nachgewiesen werden. Am Standort C war zu beobachten, dass die Werte der Infektionsrate mit *Fusarium* spp. in den untersuchten Erntestangen über den zweijährigen Versuchszeitraum von 16% (Mai 2003), 30% (Juni 2003), 33% (Mai 2004) und schließlich von 57% (Juni 2004) kontinuierlich zunahm.

Die Untersuchungen der Erntestangen des Standortes D ergaben mit 93% (Mai 2003) bzw. im Juni 2003 mit 80% sehr hohe *Fusarium* spp.-Infektionsraten, ähnlich wie auch 2004. Hier waren fast alle der untersuchten

Stangen mit *Fusarium* spp. infiziert: 96% im Mai und 98% im Juni. Auch am Standort E waren 70 bis 90% der untersuchten Stangen mit *Fusarium* spp. zu allen vier PN-Terminen in 2003 und 2004 infiziert.

Zusammensetzung des *Fusarium*-Artenspektrums in den Erntestangen des Spargels

Am Standort A war in beiden Jahren *F. oxysporum* mit ca. 20% die dominierende *Fusarium*-Art. Zweithäufigste *Fusarium*-Arten waren mit jeweils 7% *F. proliferatum* und *F. avenaceum*. In ca. 10% der Stangen waren noch in geringeren Infektionsraten weitere *Fusarium* spp. zu finden, wie *F. tricinctum*, *F. equiseti* und *F. flocciferum* (Tab. 7).

In den nur in 2003 am Standort B untersuchten Spargelstangen dominierte ebenfalls *F. oxysporum* mit ca. 20% Infektionsrate. In ca. 8% der Stangen wurde *F. sambucinum* festgestellt. Die Infektionsrate für *F. proliferatum* betrug ca. 4% (Tab. 7).

Auch am Standort C ist *F. oxysporum* mit ca. 21% die dominierende Art. *F. proliferatum* wurde in ca. 7% der untersuchten Stangen ge-

funden. In ca. 6% der untersuchten Stangen wurden noch *F. sambucinum* bzw. *F. culmorum* nachgewiesen. *F. equiseti* und *F. flocciferum* konnten zusammen in ca. 6% der Erntestangen gefunden werden (Tab. 7).

Auf den beiden Standorten D und E wurden meist zu allen PN-Terminen in 2003 und 2004 mit über 90%, die höchsten *Fusarium* spp.-Infektionsraten in den Erntestangen des Spargels ermittelt (Tab. 6). *F. oxysporum* war mit ca. 80% die dominierende *Fusarium*-Art. Mit ca. 37% bzw. 20% war *F. proliferatum* auf diesen beiden Standorten die zweithäufigste nachgewiesene *Fusarium*-Art. Sowohl am Standort D als auch E wurden in wenigen Stangen weitere *Fusarium*-Arten bestimmt, wie *F. equiseti*, *F. lateritium*, *F. merismoides* und *F. tricinctum*. Am Standort E waren in 11% der Stangen *F. culmorum* und *F. sambucinum* zu finden (Tab. 7).

Mit insgesamt 67% konnte *F. oxysporum* am Standort F ebenfalls als die häufigste *F.*-Art nachgewiesen werden (9% *F. sambucinum* und 5% *F. proliferatum*) (Tab. 7).

Natürliche FB₁-Gehalte in *Fusarium proliferatum*-infizierten Erntestangen des Spargels

In beiden Untersuchungsjahren wurde der FB₁-Gehalt in 111 Stangen (14%) der insgesamt 816 beprobten Erntestangen aus sechs Standorten bestimmt. Es kamen dabei nur die Stangen zur Überprüfung, deren Gewebestücke aus der Stangenbasis, der -mitte bzw. der -spitze als positiv mit *F. proliferatum* eingestuft worden waren.

Die FB₁-Bestimmung aus 54 mit *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen erfolgte 2003 nach Aufreinigung über Immunoaffinitäts-Säulen (IAS) und Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol mittels HPLC-FLD. 2004 wurden insgesamt 47 *F. proliferatum*-infizierte Erntestangen mittels HPLC-MS/MS auf FB₁-Gehalt untersucht. Die FB₁-Gehalte in den Erntestangen in 2003 (Tab. 8) lagen zwischen 10 und 37 µg/kg bezogen auf das Trockengewicht pro Einzelstange.

Die Daten der FB₁-Kontaminationen aus 2004 weisen ähnlich niedrige Werte auf (Tab. 9).

Tabelle 8. Mittels IAS-HPLC-FLD ermittelte Fumonisin B₁-Werte in den *Fusarium proliferatum*-infizierten Spargelstangen 2003

Standort	Probennahme Mai 2003		Probennahme Juni 2003	
	Anzahl Stangen (n)	Mittelwert FB ₁ (µg/kg)*	Anzahl Stangen (n)	Mittelwert FB ₁ (µg/kg)*
A	3	11	0	-
B	0	-	0	-
C	1	11	4	37
D	14	19	21	16
E	8	13	10	16
F	1	10	2	13
Insgesamt (n)	27		37	

*umgerechnet auf das Trockengewicht pro Einzelstange

Tabelle 9. Mittels HPLC-MS/MS ermittelte Fumonisin B₁-Werte in den *Fusarium proliferatum*-infizierten Spargelstangen 2004

Standort	Probenahme Mai 2004		Probenahme Juni 2004	
	Anzahl Stangen (n)	Mittelwert FB ₁ (µg/kg)*	Anzahl Stangen (n)	Mittelwert FB ₁ (µg/kg)*
A	2	11 und 308	2	0
B	-	-	-	-
C	3	20	1	0
D	11	24	16	a**
E	3	1	8	b**
F	1	23	0	0
Insgesamt (n)	20		27	

*bezogen auf das Trockengewicht pro Einzelstange

a** nur 4 von 16 Stangen FB₁-Gehalte von 3 bis 213 µg/kg

b** nur 2 von 8 Stangen FB₁-Gehalte von 2 und 14 µg/kg

Hier konnten bei drei *F. proliferatum*-infizierten Stangen keine FB₁-Kontaminationen nachgewiesen werden. Bei der großen Mehrzahl des untersuchten Stangenmaterials lagen die FB₁-Mittelwerte bei ca. 20 µg/kg. Nur in einzelnen Stangen waren erhöhte FB₁-Werte von 213 bis max. 308 µg/kg feststellbar (Tab. 9).

Diskussion

Fusarium spp.-Befallsituation in den Erntestangen und mögliche Einflussfaktoren

Die *Fusarium* spp.-Infektionsrate der untersuchten Gewebestücke aus den Spargelstangen der sechs beprobten Standorte variierte in den beiden Untersuchungsjahren sehr stark in Abhängigkeit vom Standort (Tab. 6). 90% und mehr der untersuchten Stangen wiesen *Fusarium* spp. an den Standorten D und E auf. Bei den vier anderen Standorten (A, B, C, F) waren weniger Stangen infiziert, hier waren *Fusarium* spp.-Infektionen in 20% bis maximal 70% der untersuchten Stangen zu beobachten.

F. oxysporum ist die an der endophytischen Besiedlung der Spargelstangen aller sechs Standorte beteiligte dominierende *Fusarium*-Art. Diese Ergebnisse betätigen, dass *F. oxysporum* nicht nur an den Spargelpflanzen (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sondern auch in den Erntestangen während der Haupterntezeit die am häufigsten nachgewiesene *Fusarium*-Art ist. Die insgesamt zweithäufigste Art ist nach vorliegenden Ergebnissen *F. proliferatum*. *F. proliferatum* war an vier Standorten (A, B, C, F) in unter 10% der untersuchten Stangen nachweisbar. Nur an zwei Standorten wurde *F. proliferatum* mit 20% bis 37% nachgewiesen. Immerhin zeigen diese Untersuchungen, dass diese *Fusarium*-Art an Spargel, die vorzugsweise die unterirdischen Rhizome-, Wurzel- und Triebteile der Spargelpflanzen besiedeln kann (8, 10, 13), auch in den Erntestangen zur Hauptstechzeit nachweisbar ist. Weltweit gilt *F. proliferatum* als ein wichtiger Wurzel-, Stängel- und Fruchtfäuleerreger an Mais (27), Weizen (28), Reis (29, 30), Datteln (31), Knoblauch (32, 19) und Zwiebeln (33). Neben bevorzugtem Auftreten vor allem in tropischen Anbaugebieten ist *F. proliferatum* aber auch eine Pilzart mit weiter geographischer Verbreitung und wird zunehmend in gemäßigten Klimaten an Kulturpflanzen nachgewiesen. In Deutschland wurde *F. proliferatum* an der mehrjährigen Grasart *Miscanthus x giganteus*

Greif et Deu. nachgewiesen (34). Wie aktuelle Maisuntersuchungen im Oderbruch, Brandenburg zeigten (35), sind Maisstängel- und Kolbenproben relativ häufig mit *F. proliferatum* kolonisiert.

Standortabhängig lag die Nachweishäufigkeit mit *F. sambucinum*, *F. culmorum* bzw. *F. avenaceum* in der Regel in den Erntestangen unter 10%.

Die Ergebnisse dieser zweijährigen Untersuchungen zeigen, dass *Fusarium* spp., wie schon in vorangegangenen Untersuchungen (9), die Stangen zur Erntezeit latent systemisch besiedeln können. Da es sich bei den häufig nachgewiesenen *Fusarium* spp. um bodenbürtige Pilzarten handelt, können diese in ihrer saprophytischen Phase durch Myzel- bzw. Chlamydosporenbildung die unterirdischen Wurzel- und Kronenteile des Spargels besiedeln und relativ lange daran überlebensfähig sein. Diese saprophytische Pilzkolonisierung an den unterirdischen Pflanzteilen des Spargels, einschließlich endophytische Besiedlung bzw. der mögliche vaskulären Transport der meist massenhaft gebildeten Mikrokonidien stellt auch für die sich entwickelnden Sprossen zum Austrieb im Frühjahr eine potentielle Gefahr dar (36). Eine mögliche Verbreitung von Myzel bzw. anderen pilzlichen Entwicklungsstadien wie z.B. den Mikro- oder Makrosporen ist auch über mechanische Verletzungen beim Stechvorgang denkbar. Durch die Schnittverletzungen am Stängelgrund ist davon auszugehen, dass diese auch Eintrittspforten für bodenbürtige Pilze sein können, vorausgesetzt, diese parasitieren die Krone der Spargelpflanzen, wie das bei den *Fusarium* spp. der Fall ist. Für die vorliegenden Untersuchungen dienten Spargelstangen aus mehrjährigen Anlagen, die zum Zeitpunkt der Beprobung in 2003 bzw. 2004 im siebten bzw. achten Anbaujahr (Standort D und F), an Standort A und C im achten bzw. neunten Anbaujahr, am Standort E im neunten bzw. zehnten Anbaujahr und am Standort B sogar im zehnten bzw. elften Jahr standen (Tab. 3).

Die Witterungsverhältnisse 2004 unterscheiden sich von 2003 dahingehend, dass es im Mai und Juni 2003 sehr warm war und die Temperaturen mit bis zu 4 °C meist über dem Normalwerten lagen. Demgegenüber war es zumindest im Mai 2004 wesentlich kühler. Die Niederschlagsneigung wies standortbedingt stärkere Abweichungen von den Normalwerten auf. Während in 2003 zur Haupterntezeit meist

zu wenige Niederschläge zu verzeichnen waren, war es 2004 meist feuchter (Tab. 4, Tab. 5). Trotz dieser unterschiedlichen Temperatur- und Niederschlagsbedingungen in den beiden Versuchsjahren kann man aber davon ausgehen, dass es die grundlegende Befallssituation mit *Fusarium* spp. in den Spargelstangen zu den jeweiligen zwei PN-Terminen Anfang Mai und Juni nur unwesentlich beeinflusst hat.

Zum Nachweis sonstiger Pilze in den Erntestangen des Spargels

Zu den auf allen Standorten häufig nachgewiesenen Pilzen gehört *Idriella bolleyi* (R. Sprague) Arx (Syn. *Microdochium bolleyi* (R. Sprague) de Hoog & Herm-Nijh), eine endophytische Pilzart, die einen großen Wirtspflanzenkreis hat und vermutlich auch beim Spargel einer normalen "Begleitflora" zuzuordnen ist. *Idriella bolleyi* besiedelt häufig Wurzeln und die Stängelbasis von Getreide, Gräsern und weist eine hohe Aktivität beim Abbau von Pektinen, Xylan und Carboxymethylcellulose auf (25). Es ist aber keine parasitäre Pilzart, auch wenn sie in Zusammenhang mit Keimlingskrankheiten bei Getreide, Luzerne und Kürbis angegeben wird (23). Möglicherweise pathogenrelevante Pilzarten wie *Rhizoctonia* sp. oder *Pythium* sp. wurden in nur sehr geringem Maße in den untersuchten Spargelstangen gefunden. Auch Arten der Pilzgattungen *Alternaria*, *Stemphylium* u.a.m. wurden zwar bei der Befallshäufigkeit erfasst, aber nicht im Einzelnen bewertet.

Bedeutung des Nachweis einer natürlichen FB₁-Kontamination in den Spargelstangen zur Haupterntezeit

Bei der Bewertung der FB₁-Gehalte in den Erntestangen ist zu berücksichtigen, dass zur Ermittlung der Werte in den beiden Untersuchungsjahren unterschiedliche Nachweismethoden angewandt wurden. Während in 2003 die zuvor kurzfristig eingefrostenen und wieder aufgetauten *F. proliferatum*-infizierten Stangen mittels IAS-HPLC detektiert wurden, erfolgte 2004 der Nachweis an gefriergetrocknetem Stangenmaterial mittels HPLC-MS/MS. Um die FB₁-Werte von 2003 mit denen von 2004 vergleichen zu können, wurden die 2003er Werte nachträglich auf das Stangentrockengewicht umgerechnet.

In den insgesamt 111 untersuchten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen wurden mit bis zu durchschnittlich 37 µg/kg FB₁, bezogen

auf das Trockengewicht pro Einzelstange, nur eine relativ geringe natürliche Kontamination der Spargelstangen während der Erntezeit nachgewiesen. Nur in wenigen Einzelstangen wurden Werte bis maximal 308 µg/kg FB₁-Konzentrationen gemessen. Ein Bezug zu möglichen Ursachen für diese vereinzelt hohen FB₁-Werte lässt sich nicht herstellen. Die sehr geringe, natürliche FB₁-Kontamination der Erntestangen liegt sowohl in 2003 als auch in 2004 weit unter den Werten, die in einer anderen Anlage in Deutschland in 2001 nach der Hauptstechperiode erhalten wurden (19). Hier konnten in 9 von 10 mit *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen, die nach der Ernteperiode Ende Juli von Pflanzen aus mehrjährigen Anlagen mit starken Wuchsdepressionen entnommen wurden, FB₁-Gehalte von 36,4 bis 4513,7 µg/kg Trockengewicht nachgewiesen werden. Diese Stangen waren neben *F. proliferatum* auch mit *F. sambucinum* und *F. oxysporum* infiziert. Es kann vermutet werden, dass bei dieser Befallssituation mit mehreren an den Infektionen beteiligten *Fusarium*-Arten in einer Stange die Fumonisin-Bildung eine induzierende Schlüsselfunktion hat (36).

Die sehr geringen FB₁-Werte zur Haupterntezeit in den Spargelstangen könnten damit in Verbindung stehen, dass die nachwachsenden Spargelstangen in den Erntemonaten von Mai bis Juni kontinuierlich abgeschnitten werden und der vaskuläre Transport dieser toxischen Stoffwechselprodukte des Pilzes ständig unterbrochen wird. Erst nach der Ernte, wenn die Sprosse auswachsen, ist ein stärkerer vaskulärer Transport der Toxine denkbar, der zu den in den Untersuchungen von 2001 bestimmten höheren Toxingehalten in den Spargelsprossen führen könnte (19). Inwieweit auch noch andere abiotische und biotische Stressfaktoren Einfluss auf die Fumonisinbildung bei Spargel vor und nach der Stechperiode haben bzw. welche Rolle diese sekundären Stoffwechselprodukte in der Pathogenese spielen, muss in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden.

Danksagung

Für die Ermöglichung der Probennahme und die sehr gute Zusammenarbeit danken wir den Spargelanbauern der beprobten Flächen. Für die umfangreiche technische Unterstützung aller beteiligten technischen Mitarbeiter möchten wir unseren besonderen Dank aussprechen.

Literatur

- 1 Elmer WH, Johnson DA, Mink GI (1996) Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. *Plant Dis* 80: 117-125
- 2 Baayen RP, van den Boogert PHJF, Bonants PJM, Poll JTK, Blok WJ, Waalwijk C (2000) *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. *Eur J Plant Pathol* 106: 907-912
- 3 Sadowski CZ, Knowlowski M (1990) Susceptibility of selected asparagus cultivars to *Fusarium* spp. under fields conditions. *Acta Hort* 271: 343-351
- 4 Hartung AC, Stephens CT, Elmer WH (1990) Survey of *Fusarium* population in Michigan's asparagus fields. *Acta Horticulturae* 271: 395-401
- 5 Blok WJ, Bollen G (1995) Fungi on roots and stem bases of asparagus in the Netherlands: species and pathogenicity. *Eur J Plant Pathol* 101: 15-24
- 6 Vujanovic V, Hamel C, Yergeau E, St-Arnaud M (2006) Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species nordeasten North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. *Microb Ecol* 51: 242-255
- 7 Weber Z, KostECKI M, von BARGEN S, GOSSMANN M, WASKIEWICZ A, KNAFLEWSKI M, BÜTTNER C, GOLINSKI P (2006) *Fusarium* species colonizing spears and forming mykotoxins in field samples of asparagus from Germany and Poland. *J Phytopathol* 154: 209-216
- 8 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
- 9 Goßmann M, Kleta S, Humpf HU, Büttner C (2005) Untersuchungen zum endophytischen Befall von *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg in geernteten Stangen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.). *Gesunde Pflanze* 57: 53-58
- 10 Wong JY, Jeffries P (2006) Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol* 55: 331-342
- 11 Guerrero C, Nigh EL, Stanghellini ME (1999) Incidence of *Fusarium* spp. in asparagus fields in Mexico and south California. *Acta Hort* 479: 231-236
- 12 Nigh EL, Guerrero G, Stanghellini ME (1999) Evaluation of *Fusarium* spp. infected asparagus spears for fumonisin mykotoxins. *Acta Hort* 479: 247-252
- 13 Schreuder W, Lamprecht SC, Marasas WFO, Calitz FJ (1995): Pathogenicity of three *Fusarium* species associated with asparagus decline in South Africa. *Plant Dis* 79, 177-181
- 14 Seifert KA, Levesque CA (2004) Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *Eur J Plant Pathol* 110: 449-471
- 15 Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasa WFO, Thiel P, Horak RM, Vlegaar R, Kriek NPJ (1988) Fumonisin-novel mykotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54: 1808-1811
- 16 Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins A (1992) Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl Environ Microbiol* 58: 985-989
- 17 Humpf HU, Voss KA (2004) Effects of thermal food-processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mykotoxins. *Mol Nutr Food Res* 48: 255-269
- 18 Logrieco A, Dako A, Moretti A, Frissullo S, Visconti A (1998) Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. *J Agr Food Chem* 46: 5201-5204
- 19 Seefelder W, Goßmann M, Humpf HU (2002) Analysis of Fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum* – infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography – Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Agr Food Chem* 50: 2778-2781
- 20 Gerlach W, Nirenberg H (1982) The Genus *Fusarium* - a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, H. 209
- 21 Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Inst., Kew, Surrey, England, 237 p.
- 22 Nirenberg H (1976) Untersuchungen über die morphologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, H. 169
- 23 Domsch KH, Gams W (1970) Pilze auf Agarböden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 24 Gams W (1971) Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag Jena
- 25 Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980) Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London
- 26 Visconti A, Solfrizzo M, De Girolamo A (2001) Determination auf Fumonisin B₁ and B₂ in Corn and Corn Flakes by Liquid Chromaography with Immunoaffinity Column Cleanup: Collaborative Study. *J AOAC International* 84: 1828-1837
- 27 Velutti A, Marin S, Betucci L, Ramos AJ, Sanchis V (2000) The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium*

- moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B₁ and zearalenone formation. *Int J Food Microbiol* 59: 59-66
- 28 Chulze SN, Ramirez ML, Farnochi MC, Pascale M, Visconti A, March G (1996) *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *J Agr Food Chem* 44: 2797-2801
- 29 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
- 30 Abbas HK, Cartwright RD, Xie W, Mirocha CJ, Richard JL, Dvorak TJ, Sciumbato GL, Shier WT (1999) Mycotoxin Production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Mycopathologia* 147: 97-104
- 31 Abdalla MY, Al-Rokibah A, Moretti A, Mule G (2000) Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Dis* 84: 321-324
- 32 Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL (2003) First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathol* 52: 426
- 33 Du Toit LJ, Inglis DA (2003) *Fusarium proliferatum* Pathogenic on Onion Bulbs in Washington. *Plant Dis* 87: 750
- 34 Goßmann M (1995) Einfluss von Anzuchtverfahren und Anbaumaßnahmen auf den pilzparasitären Befall von *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu., insbesondere mit *Fusarium* spp. *Gesunde Pflanze* 47: 23-27
- 35 Saß M, Schorling M, Goßmann M, Büttner C (2007) Artenspektrum und Befallshäufigkeit von *Fusarium* spp. in *Bt*- und konventionellem Mais im Maiszünsler-Befallsgebiet Oderbruch. *Gesunde Pflanze* 59: 119-125
- 36 Desjardins A (2006) *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, Minnesota