

# *Fusarium oxysporum*- und *F. proliferatum*-Isolate aus Spargel und deren Pathogenitätsüberprüfung in einer modifizierten *in vitro*-Schnelltestmethode

Monika Goßmann · Alexandra Scholz · Frank Hennig ·  
Susanne von Barga · Carmen Büttner

Eingegangen: 1. August 2011 / Angenommen: 20. August 2011 / Online publiziert: 8. September 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Zusammenfassung** *Fusarium oxysporum* und *Fusarium proliferatum* sind wichtige Erreger der Kronen- und Wurzelfäule an Spargel. Um Unterschiede in der Pathogenität und Aggressivität zu detektieren, wurden sowohl Einsporisolate von zwei *F. proliferatum*- und fünf *F. oxysporum*-Herkünften aus Spargelstangen aus österreichischen und deutschen Anlagen, als auch Reinkulturen von insgesamt 55 Isolaten von *F. oxysporum* aus Spargelwurzeln einer hessischen Spargelanlage und einem *F. oxysporum*-Isolat aus einer Spargelstange einer österreichischen Anlage, einem insgesamt 28-tägigen *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest auf einem Hoagland-Agar in Glasröhrchen unterzogen. Unter sterilen und kontrollierten Bedingungen in der Klimazelle wurden ca. 14 Tage alte Spargeljungpflanzen mit einer Sporensuspensionen der jeweiligen Isolate inokuliert. Nach einer zweiwöchigen Inkubation wurde mittels visueller Wurzelbonitur nach Schadklassen, der Parameter Befallsgrad ermittelt. Bei der Prüfung der Einsporkulturen wurde zusätzlich noch die Frischmasse von Wurzel und Spross erfasst.

Die Pathogenität der meisten *F. proliferatum*- und der *F. oxysporum*-Isolate wurde in diesem Test bestätigt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich, sowohl bei der Inokulation mit Rein-, als auch Einsporkulturen von *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, ein erhöhter Befallsgrad der Wurzeln. Insbesondere die beiden *F. proliferatum*-Iso-

late erwiesen sich aggressiver, als die von *F. oxysporum* geprüften Isolate. Zudem wiesen alle Einsporisolate eine Reduzierung der Frischmassen von Wurzel und Spross im Vergleich zur Kontrolle auf. Hinsichtlich der Sortenunterschiede bestätigte sich, dass „Ramos“ anfälliger gegenüber den geprüften *F. oxysporum*-Isolaten reagierte, als „Ravel“.

Insgesamt erwies sich die geprüfte *in vitro*-Schnelltestmethode als geeignet, die Pilzstämmen aller eingesetzten *F. oxysporum*- und *F. proliferatum*-Isolate innerhalb von 28 Tagen hinsichtlich ihrer Pathogenität zu evaluieren und deren Aggressivität an Spargel vergleichend zu bewerten.

**Schlüsselwörter** *Fusarium oxysporum* ·  
*Fusarium proliferatum* · Spargel · Pathogenität ·  
*In vitro*-Schnelltestmethode

**Evaluation of the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum* isolates from asparagus using a modified *in vitro* quick test method**

**Abstract** *Fusarium oxysporum* and *Fusarium proliferatum* are important causal agents of crown and root rot of asparagus. In order to detect differences in pathogenicity and aggressiveness, two *F. proliferatum* and five *F. oxysporum* single spore isolates from asparagus spears from plantings in Austria and Germany, 55 pure cultures of *F. oxysporum* from asparagus roots from a planting in Hesse, Germany, and a single *F. oxysporum* isolate from an asparagus shoot collected in Austria were evaluated in a 28-day quick test on Hoagland's agar in glass culture tubes. Plantlets were inoculated with spore suspensions from each respective isolate after 14 days of growth under sterile, controlled conditions in a growth chamber. A severity scale was used

A. Scholz (✉) · M. Goßmann · S. von Barga · C. Büttner  
Department Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften,  
Fachgebiet Phytomedizin, Humboldt-Universität zu Berlin,  
Lentzeallee 55–57, 14195 Berlin, Deutschland  
E-Mail: alexandra.scholz.1@agrar.hu-berlin.de

F. Hennig  
Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt  
e. V., Kühnhäuser Str. 101, 99189 Kühnhausen, Deutschland

to assess symptoms on roots two weeks after inoculation. The effects of the single-spore isolates on root and shoot fresh weights of the plantlets were also determined.

The pathogenicity of the majority of the *F. proliferatum* and *F. oxysporum* isolates included in this study was confirmed. Inoculation with pure and single-spore cultures resulted in elevated disease severity in comparison to non-inoculated controls. In particular, the two *F. proliferatum* isolates were found to be more aggressive than the *F. oxysporum* isolates. Moreover, all single spore isolates caused a reduction in fresh weight of roots and shoots in comparison to the controls. With respect to differences among asparagus cultivars, “Ramos”, was found to be more susceptible than “Ravel”.

Overall, the quick test method was found to be capable of evaluating the pathogenicity and aggressiveness of the tested *F. oxysporum* and *F. proliferatum* isolates towards asparagus within 28 days.

**Keywords** *Fusarium oxysporum* · *Fusarium proliferatum* · Asparagus · Pathogenicity · *In vitro* quick test method

## Einleitung

Die Wurzel- und Kronenfäule am Spargel (*Asparagus officinalis* L.) wird von bodenbürtigen Pilzarten vor allem aus der Gattung *Fusarium* L. verursacht. In Abhängigkeit von den jeweiligen Standortbedingungen treten dabei weltweit am häufigsten *F. oxysporum* Schlecht. und *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg auf (Blok und Bollen 1995; Elmer et al. 1996; Goßmann et al. 2001, 2005, 2008; Logrieco et al. 1998; Weber et al. 2006). Fäulen an den Wurzeln, den Rhizomen und der Stängelbasis, irreversible Welken und Degenerationen, sowie Mykotoxine, die durch diese *Fusarium*-Arten gebildet werden können, bedingen Ertragsminderungen in Quantität und Qualität bei Spargel. Gebildete Fumonisine und andere Mykotoxine rufen Krankheiten bei Mensch und Tier hervor (Gelderblom et al. 1988; Rheeder et al. 1992; Yoshizawa et al. 1994). In mit *F. proliferatum* infizierten Spargelpflanzen bzw. Stangen wurde Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) und B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) bereits nachgewiesen (Logrieco et al. 1998; Seefelder et al. 2002; Goßmann et al. 2008).

Durch reichliche Mikrosporenbildung haben beide *Fusarium*-Arten eine hohe Vermehrungsrate mit meist windbürtiger Verbreitung. Unterirdisch breiten sich beide Pilze durch Myzelwachstum in der Rhizosphäre aus. Das Myzel, insbesondere die Chlamydosporen von *F. oxysporum*, können zudem auf abgestorbenen Wurzel- und Pflanzenresten, die im Boden verbleiben, sehr lange überdauern und so ein langjähriges, zunächst saprophytisches Überleben dieses fakultativen Parasiten im Boden sichern (Goßmann 2009).

Zu Infektionen der Spargelpflanzen kommt es vor allem durch mechanische Verletzungen der Rhizome beim Stechen der Spargelstangen während der Ernte. Auch Nematoden und Schadinsekten, die an den unterirdischen Wurzeln parasitieren, bedingen Eintrittspforten für Pilzsporen und Hyphen. Über feine Geweberisse, die bei der Seitenwurzelbildung entstehen, können Hyphen direkt durch Wurzelrindengewebe eindringen. Inter- und intrazellulär breitet sich das Myzel im Rindenparenchym aus und kann bis zum Zentralzylinder der Speicherwurzeln vordringen, ohne dass zunächst sichtbare Symptome an der Spargelpflanze zu erkennen sind. Während des häufig mehrere Wochen andauerndem Entwicklungsprozesses ernähren sich die in den Speicherwurzeln lebenden Pilze von den eingelagerten Assimilaten der Spargelpflanze. Der hohe Infektionsdruck führt sukzessiv zur Degeneration der Pflanze (Goßmann et al. 2008; Goßmann 2009). Je nach Standortbedingungen und abiotischen bzw. biotischen Stressfaktoren zeigen sich die Auswirkungen einer anfangs endophytischen, später parasitischen Pilzbesiedlung erst in den folgenden Anbaujahren in einem mangelhaften Austrieb, Welken, Chlorosen und vorzeitigem Absterben der infizierten Pflanzen. Die Myzel- und Sporenbildung in den unterirdischen Kronen- und Wurzelteilen kann auch einhergehen mit einem vaskulären Transport der meist massenhaft von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* gebildeten Mikrosporen in die oberirdischen Stangen- bzw. Triebteile. Vor allem bei Stresssituationen kommt es durch die Myzelbildung zum Verstopfen der Leitgefäße. Der normale Wasser- und Nährstofftransport wird unterbrochen und irreversible Welke, verbunden mit Absterben zunächst einzelner Triebe, später der ganzen Pflanze, ist die Folge (Elmer et al. 1996).

*F. proliferatum* schädigt als Wurzel-, Stängel- und Frucht-fäulerreger sowohl in tropischen Klimagebieten Amerikas und Asiens, als auch in Mittel- und Südeuropa wirtschaftlich bedeutsame Kulturpflanzen wie den Mais (Logrieco et al. 2002; Saß et al. 2007; Dorn et al. 2009), Weizen (Chulze et al. 1996; Desjardins et al. 2000), Miscanthus (Goßmann 1995), Sorghum (Bhat et al. 2000), Datteln (Abdalla et al. 2000), Palmen (Armengol et al. 2005), Reis (Desjardins et al. 1997; Abbas et al. 1999), Knoblauch (Seefelder et al. 2002; Dugan et al. 2003; Goßmann et al. 2007) und Zwiebeln (du Toit et al. 2003; Stankovic et al. 2007). Bei futter- und nahrungsmittelerzeugenden Pflanzenarten steht er aufgrund seines Mykotoxinpotentials im Fokus der Produktqualität. *F. oxysporum* ist weltweit als bodenbürtiger Pilz verbreitet (Booth 1971) und hat vor allem als Welkerreger an zahlreichen Kulturpflanzen große Bedeutung (Baayen et al. 2000; Smith 2007). Mehrjährige Untersuchungen am Spargel (Goßmann et al. 2001, 2005, 2008) in verschiedenen deutschen und österreichischen Anbaugebieten haben gezeigt, dass *F. oxysporum* neben *F. proliferatum* die dominierende *Fusarium*-Art ist, unabhängig

davon, ob sie aus erkrankten oder symptomlosen Wurzeln, Rhizomen- oder Stängelteilen isoliert wurden. Zahlreiche Isolate dieser beiden *Fusarium*-Arten wurden aus diesen unterschiedlichen Organen gewonnen. Untersuchungen zur Pathogenität der Isolate von *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. redolens* wurden von Martinez et al. (2007, 2008) an Spargeljungpflanzen der Sorte „Ramos“ in einem mehrwöchigen Versuch unter Gewächshausbedingungen durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Isolate von *F. proliferatum* und *F. redolens* als hochvirulente Wurzelfäuleerreger, während das *F. oxysporum*-Isolat eine insgesamt schwächere Virulenz zeigte. Um nun in möglichst kurzer Zeit sichere Pathogenitäts- und Virulenzunterschiede zu erhalten, sollte eine bereits von Davis (1963) entwickelte *in vitro*-Methode, die zur Pathogenitätsprüfung verschiedener *formae speciales* von *F. oxysporum* diente, hinsichtlich ihrer Eignung mit *Fusarium* spp.-Isolaten an Spargel geprüft werden. Die Methode basierte auf der sterilen Anzucht von Pflanzen in Röhrchen mit Hoagland-Agar (Hoagland und Arnon 1938). Da auch die von Schreuder et al. (1995) und Stephens und Elmer (1988) durchgeführte Pathogenitätsuntersuchungen, sowohl unter Gewächshaus- als auch *in vitro*-Bedingungen, die grundsätzliche Eignung von *in vitro*-Tests bestätigten, setzten wir uns das Ziel, einen auf diesen Untersuchungen aufbauenden, modifizierten *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest mit Isolaten von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* an Spargeljungpflanzen zu entwickeln, der in möglichst kurzer Zeit verlässliche Evaluierungsergebnisse zur Pathogenität bzw. Virulenz der Isolate erbringt und Sortenunterschiede feststellen kann.

## Material und Methoden

Insgesamt wurden 62 Spargelisolat geprüft, davon 55 *F. oxysporum*-Isolate (Foxy-580 bis Foxy-635), die aus Wurzeln von Pflanzen einer mehrjährigen Spargelanlage aus Hessen gewonnen wurden (Tab. 1). Zwei *F. proliferatum*-

(Fpro-227 und -241) und fünf *F. oxysporum*-Isolate (Foxy-155, -156, -158, -369 und -378) stammen aus Spargelstangen mehrjähriger Anlagen Niederösterreichs, Rheinland-Pfalz und Brandenburgs.

Das Isolat Foxy-155 wurde als Einsporkultur geprüft und diente bei den Reinkulturen mehrfach als Positivkontrolle. Es hatte sich in vorangegangenen Gewächshausversuchen (Martinez et al. 2008) als pathogen an inokulierten Spargelpflanzen erwiesen.

Die Isolatgewinnung erfolgte nach Oberflächendesinfektion der Wurzel- bzw. Stangenteile mit Natriumhypochlorid (NaOCl), Auslegung der Gewebestücke auf einem speziellen nährstoffarmen Nährmedium (SNA nach Nirenberg 1976), mehrtägiger Inkubation bei 20 °C unter UV-Licht im Wechsel von 14 Stunden (h) Licht und 10 Stunden Dunkelheit sowie nachfolgender lichtmikroskopischer Bonitur. Nach erfolgter morphologischer Artendeterminierung wurden die Isolate in Erdkulturen bei 6 °C aufbewahrt (Goßmann et al. 2008).

Die 56 Reinkulturen von *F. oxysporum* (Foxy-580 bis -635 und Foxy-155) wurden aus Erdkulturen, die länger als ein Jahr bei 6 °C gelagert worden waren, reaktiviert, indem die Erde auf SNA ausgekrümelte und bei normalen Laborbedingungen für 3–7 Tage inkubiert wurde. Danach erfolgte die Herstellung einer Sporensuspension, indem je Isolat 20 ml Bilay's-Flüssigmedium nach Reid et al. (1996) in 100 ml Erlmeyerkolben mit drei pilzbewachsene SNA-Plättchen (Ø5 mm) beimpft wurden. Die verschlossenen Erlmeyerkolben wurden mit dem beimpften Nährmedium bei 20–22 °C, auf einem Horizontalschüttler bei 100 U/min und 16 h Licht, im Wechsel mit 8 h Dunkelheit für 7–10 Tage geschüttelt.

Von einigen Reinkulturen wurden Einsporlinien (Foxy-227-E, -241-E, -155-E, -156-E, -158-E, -369-E, -378-E) hergestellt und als Glycerindauerkulturen bei –80 °C mehrere Wochen als Sporensuspension mit 10<sup>7</sup> Sporen pro ml gelagert. Zur Inokulation der Spargeljungpflanzen wurde diese Sporensuspension nach kurzem Auftauen direkt verwendet.

**Tab. 1** Herkunft der verwendeten Spargelisolat von *Fusarium oxysporum* [n=61] und *F. proliferatum* [n=2] für den *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest an den Sorten „Ramos“ und „Ravel“

Isolat	Isolatanzahl (n)	Pflanze bzw. -teil, aus dem Isolat gewonnen wurde	Herkunft und Datum der Probenahme
Fpro-227-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Österreich, Mai 2003
Fpro-241-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Österreich, Mai 2003
Foxy-155-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Österreich, September 2000
Foxy-156-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Rheinland-Pfalz, Juli 2000
Foxy-158-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Rheinland-Pfalz, Juli 2000
Foxy-369-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Brandenburg, Juni 2007
Foxy-378-E <sup>a</sup>	1	Spargelstange	Brandenburg, Juni 2007
Foxy-155	1	Spargelstange	Österreich, September 2000
Foxy-580 bis Foxy-635	55	Spargelwurzel	Hessen, Oktober 2008

<sup>a</sup>Einsporkulturen

Während für den *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest mit den Einsporkulturen nur Pflanzen der Sorten „Ramos“ zur Prüfung kamen, wurden die Reinkulturen an zwei Sorten geprüft, der pilzanfälligen Sorte „Ramos“ und der pilztoleranteren Sorte „Ravel“ (Herkunft Südwestdeutsche Saatzucht). An der Sorte „Ravel“ wurden 56 Isolate von *F. oxysporum* geprüft, bei der Sorte „Ramos“ 49. Fünf Isolate (598 bis 603) standen nicht zur Verfügung.

Das Saatgut beider Sorten wurde vor der Aussaat im Wasserbad bei 55 °C für 20 min oberflächendesinfiziert und nach der Trocknung auf sterilem Filterpapier wurden jeweils fünf Samen auf Petrischalen mit Wasseragar (pro Liter 12,0 g Agar-Agar, 100 mg Penicillin G-Kaliumsalz, 10 mg Chlortetracyclin Hydrochlorid, 50 mg Streptomycinsulfatsalz) ausgelegt. Die Inkubation der Spargelsamen erfolgte im Dunkeln bei 25 °C. Die Keimdauer betrug in der Regel 7–14 Tage. Keimlinge, die eine Keimwurzel von mindestens 0,5 cm ausgebildet hatten, wurden steril in Kulturröhrchen (Ø 3 cm, Höhe 25 cm), die mit 25 ml verfestigten Hoagland-Agar (Hoagland und Arnon 1938) befüllt waren, umgesetzt. Pro Röhrchen wurde ein Keimling eingesetzt. Die Röhrchen wurden entweder mit Wattestopfen oder mit Nescofilm verschlossen. Die Kultivierung der Spargelkeimlinge in den Röhrchen erfolgte für mindesten zwei Wochen in der Klimakammer bei 20–22 °C und einem Belichtungsrythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Nach zwei Wochen hatten die Spargeljungpflanzen mindesten einen Trieb mit einer Länge von ca. 10 cm erreicht und eine Hauptwurzel mit ersten Seitenwurzeln ausgebildet (Abb. 1). In diesem Stadium wurde jede Pflanze mit 0,5 ml einer Sporensuspension ( $10^6$  Sporen pro ml) des entsprechend zu testenden Isolates inokuliert. Die Röhrchen wurden wieder mit Nescofilm verschlossen und erneut in der Klimakammer bei 20–22 °C und einem Belichtungsrythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit für weitere 14 Tage aufgestellt. Die Pflanzen der Negativkontrolle wurden entweder mit sterilem aqua dest. oder mit Bilay's Flüssigmedium ohne Pilzzusatz behandelt. Die Anzahl (n) der inokulierten Pflanzen pro Isolat lag bei fünf bis 21 Spargelkeimlingen.

Zwei Wochen nach der Inokulation (14 dpi) erfolgte eine visuelle Bonitur der Spargeljungpflanzen. Dabei wurde die Intensität und der Anteil der Verbräunung der Haupt- und Seitenwurzel bewertet und den Schadensklassen 0–5 zugeordnet (Tab. 2). Schadensklasse 0 weist keinerlei Verbräunungen und Symptome auf, die Wurzeln sind weiß. In den Schadensklassen 1–3 ist eine zunehmende Verbräunung von bis zu 25–75 % berücksichtigt (Abb. 2). Schadensklasse 4 entspricht einer kompletten Verbräunung der Wurzeln. Anhand der Schadensklassen wurde der Befallsgrad (BG) je Variante berechnet, der die prozentuale Befallsintensität widerspiegelt und einen Gradmesser zur Einschätzung von Virulenzunterschieden bzw. Virulenzabstufungen zwischen den Isolaten darstellt.



**Abb. 1** Zwei Wochen alte Spargeljungpflanzen in Röhrchen mit einem, in Hoagland-Agar ausgebildeten, ca. 10 cm langen Trieb mit Haupt- und Nebenwurzeln. (Foto: A. Scholz)

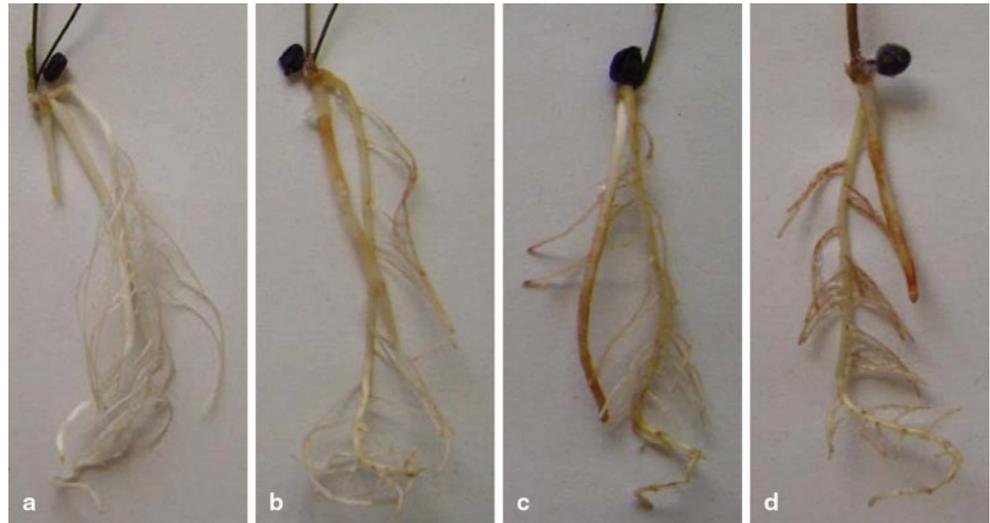
**Tab. 2** Skala mit den Schadensklassen 0–4 für die visuelle Bonitur der Wurzeln der Spargeljungpflanzen, 14 dpi

Schadensklasse	Beschreibung
0	Wurzeln weiß, keine Symptome
1	bis zu 25 % der Oberfläche der Haupt- und Seitenwurzeln sind verbräunt
2	25–50 % der Oberfläche der Haupt- und Seitenwurzel sind verbräunt
3	50–75 % der Oberfläche der Haupt- und Seitenwurzeln sind verbräunt und z. T. vermorscht
4	75–100 % der Oberfläche der Haupt- und Seitenwurzeln sind verbräunt und vermorscht

Beim Einsporkulturentest von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* wurde zusätzlich die Frischmasse der Wurzeln und Sprosse der einzelnen Pflanzen 14 Tage nach der Inokulation (14 dpi) erfasst und mit in die Pathogenitäts- bzw. Virulenzbewertung einbezogen.

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit der Statistiksoftware XLStat und SigmaXL. Bei den Einsporkulturen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $p \leq 0,05$ ) die Befallsgrade und mit dem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ) die Biomassewerte auf Signifikanz geprüft.

**Abb. 2** Ansicht der Spargeljungpflanzen zur visuellen Bonitur 14 dpi in den Schadensklassen a-d. **a:** Wurzeloberfläche weiß, ohne Symptome, **b:** bis 25 % der Wurzeloberfläche mit Verbräunungen, **c:** 25–50 % der Wurzeloberfläche mit Verbräunungen, **d:** 50–75 % der Wurzeloberfläche mit Verbräunungen. (Fotos: A. Scholz)



**Tab. 3** Prozentualer Anteil Pflanzen (n=21) in den Schadensklassen 0–4, die mit den Einsporisolen von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* inokuliert und deren Wurzeln zur visuellen Bonitur (14 dpi) bewertet wurden

Schadensklasse	Prozentualer Anteil Pflanzen (n=21) 14 dpi							
	Fpro-227-E	Fpro-241-E	Foxy-155-E	Foxy-156-E	Foxy-158-E	Foxy-369-E	Foxy-378-E	Negativkontrolle
0	0	0	0	0	0	0	0	100
1	19,0	19,0	52,4	52,4	47,6	47,6	57,2	0
2	38,1	33,3	28,6	28,6	38,1	33,4	33,3	0
3	42,9	47,7	19,0	19,0	14,3	19,0	9,5	0
4	0	0	0	0	0	0	0	100

## Ergebnisse und Diskussion

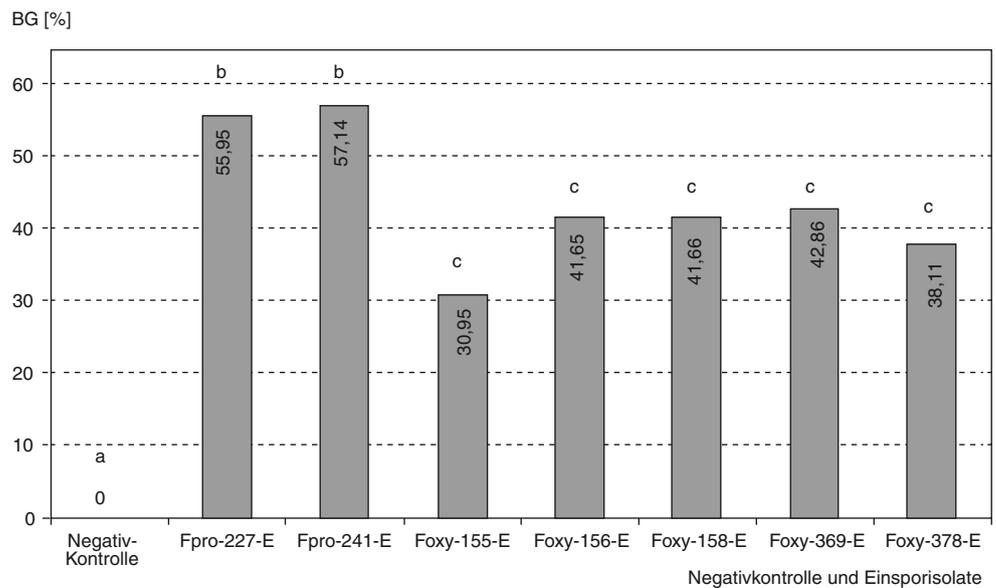
Bei allen geprüften Rein- bzw. Einsporkulturen der Isolate von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* zeigte sich 14 Tage nach der Inokulation (14 dpi) an den Wurzeln inokulierter Spargelpflanzen eine mehr oder weniger starke Verbräunung, die mit den entsprechenden Schadensklassen bewertet wurden (Tab. 2). So wurde bei den beiden *F. proliferatum*-Isolaten Fpro-227-E und -241-E die Schadensklasse 1 (Haupt- und Seitenwurzeln bis zu 25 % verbräunt), nur an 19 % der Wurzeln (Tab. 3) und bei den fünf *F. oxysporum*-Einsporisolen Foxy-155-E, -156-E, -158-E, -369-E und -378-E an ca. 48 bis 57 % der Wurzeln beobachtet. Die Schadensklasse 2 (bis zu 50 % der Haupt- und Seitenwurzeln verbräunt) war sowohl bei den beiden *F. proliferatum*-, als auch den fünf *F. oxysporum*-Isolaten an ca. 30 bis 38 % der Wurzeln zu verzeichnen. Die Schadensklasse 3 (bis zu 75 % der Haupt- und Seitenwurzeln verbräunt) wurde bei den zwei *F. proliferatum*-Isolaten an über 40 bis 48 % der Wurzeln und bei den *F. oxysporum*-Isolaten nur an ca. 10 bis 19 % der Wurzeln vergeben. Die Schadensklasse 4 (bis zu 100 % der Haupt- und Seitenwurzeln verbräunt) wurde an keinen der Wurzeln der inokulierten Spargelpflanzen festgestellt. Alle Pflanzen der Negativkontrolle, die mit sterilem

aqua dest. ohne Pilzzusatz behandelt wurden, zeigten keinerlei Wurzelverbräunungen und wurden mit der Schadensklasse 0 (keine Symptome) bewertet (Tab. 3).

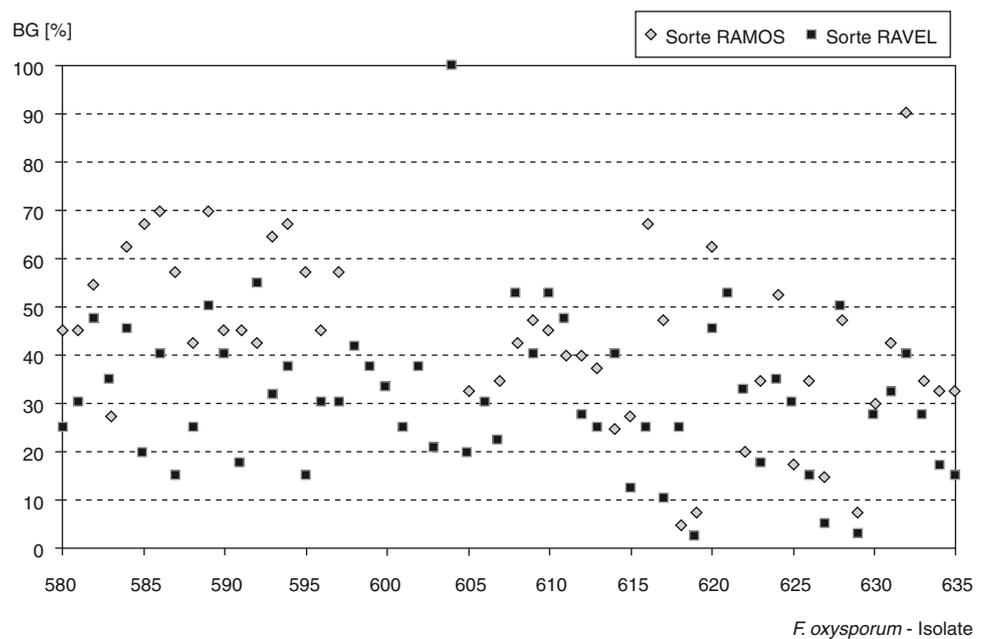
Dass die *F. proliferatum*-Isolate aggressiver waren als die fünf *F. oxysporum*-Isolate zeigte sich auch am Befallsgrad. So wiesen die Wurzeln der Spargeljungpflanzen, die mit den *F. proliferatum*-Einsporisolen Fpro-227-E und Fpro-241-E inokuliert worden waren, mit 55,95 und 57,14 % die höchsten BG-Werte auf (Abb. 3). Die beiden *F. proliferatum*-Einsporisolate unterschieden sich im BG signifikant von dem der Negativkontrolle und denen der *F. oxysporum*-Einsporisolate. Bei den *F. oxysporum*-Einsporisolen Foxy-155-E, -156-E, -158-E, -369-E und -378-E lagen die BG zwischen 30,95 und 42,86 %. Deren Virulenzunterschiede waren untereinander nicht signifikant, unterschieden sich jedoch von der Negativkontrolle. Wie schon bei Pathogenitätsuntersuchungen von Schreuder et al. (1995), Stephens und Elmer (1988) und Martinez et al. (2007) bestätigte sich auch in vorliegenden Untersuchungen, dass die Isolate von *F. proliferatum* aggressiver als die Isolate von *F. oxysporum* an Spargelpflanzen waren.

Bei den insgesamt 49 bzw. 56 geprüften Reinisolaten von *F. oxysporum* an den Spargelpflanzen der Sorten „Ramos“ und „Ravel“ zeigten sich 14 Tage nach der Inokulation

**Abb. 3** Befallsgrade (BG in %) der Wurzeln 14 Tage nach der Infektion mit Einsporisolen von *F. oxysporum* und *F. proliferatum*



**Abb. 4** Befallsgrade (BG) in % der Reinkulturen von *F. oxysporum* (n=55)



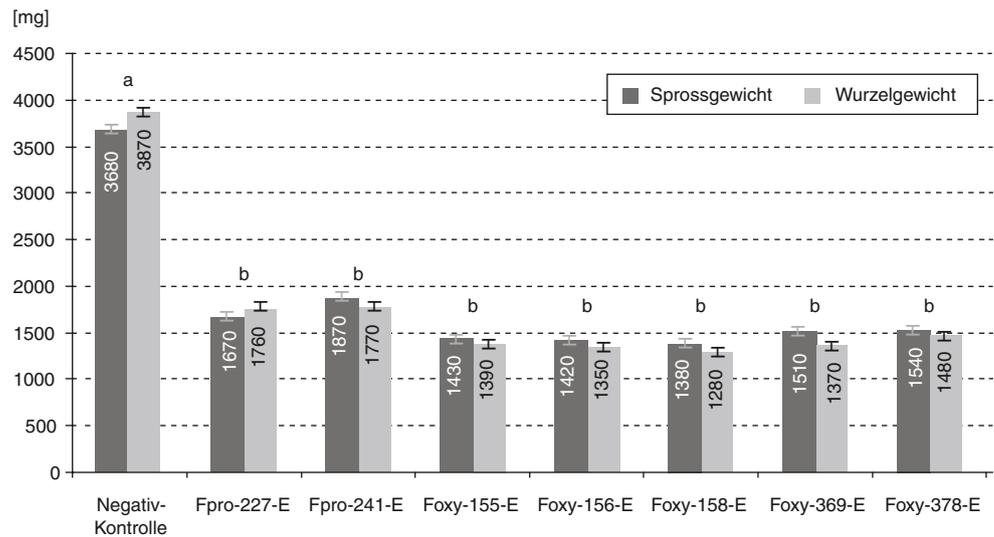
Unterschiede in den BG der Wurzeln (Abb. 4). Einen BG-Wert kleiner als 10 %, der als apathogen eingestuft wird, wiesen nur 6 bzw. 7 % der Isolate auf (Tab. 4). 63 % der Isolate bei der Sorte „Ramos“ und 84 % bei der Sorte „Ravel“ wiesen einen BG zwischen 10 und 50 % auf und zeigten sich somit als pathogen, ebenso wie die 31 % der Isolate bei „Ramos“ und 9 % bei „Ravel“, deren BG mehr als 50 % betragen.

Bei dem mehrfach geprüften Reinisolat Foxy-155 zeigten die Wurzeln inokulierter Spargelpflanzen 14 dpi in allen Untersuchungsdurchgängen sowohl an der Sorte „Ramos“, als auch bei „Ravel“ stets BG-Werte größer als 50 %.

**Tab. 4** Prozentualer Anteil der *F. oxysporum*-Reinisolate in den Virulenzabstufungen des Befallsgrades (BG) <10, 10–50 und >50–100 % bei den Spargeljungpflanzen der Sorte „Ramos“ (n=49) und „Ravel“ (n=56), 14 dpi

Befallsgrad (BG) [in %] in Virulenzabstufungen	Anteil <i>F. oxysporum</i> -Isolate [in %]	
	bei der Sorte „Ramos“ (n=49)	bei der Sorte „Ravel“ (n=56)
<10	6	7
10–50	63	84
>50–100	31	9

**Abb. 5** Mittleres Sproß- und Wurzelfrischgewicht der mit den Einsporisolen von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* infizierten Spargeljungpflanzen (je Isolat Pflanzen n=21) im *in vitro*-Pathogenitätstest (14 dpi)



In der Bewertung der Anfälligkeit gegenüber *F. oxysporum* der beiden Sorten „Ravel“ und „Ramos“ sind deutliche Unterschiede sichtbar. Die Sorte „Ramos“ erwies sich insgesamt als anfälliger.

Die Wurzeln und Sprosse bzw. die Gesamtbiofrischmasse der Spargeljungpflanzen, die mit den fünf Einsporisolen von *F. oxysporum* und den zwei von *F. proliferatum* inokuliert waren, wiesen 14 dpi eine Reduzierung von 35 % (Foxy-158-E) bis zu 46 % (Fpro-227-E) gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf (Abb. 5). Damit unterschieden sich die *F. oxysporum*- und *F. proliferatum*-Einsporisolate signifikant von der Negativkontrolle, aber nicht untereinander.

Der in vorliegenden Untersuchungen geprüfte *in vitro*-Schnelltest erscheint aufgrund der ermittelten Ergebnisse geeignet, bei einer Versuchsdauer von insgesamt 28 Tagen die Pathogenität von *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* festzustellen und Aggressivitätsunterschiede zu detektieren. Ein Vorteil dieses *in vitro*-Schnelltests auf einem agarverfestigtem, hyalinen Medium ist, dass die Wurzeln während des gesamten Versuchszeitraumes beobachtet und bewertet werden können. Die sterile Aufzucht der Pflanzen auf dem Hoagland-Agar in Glasröhrchen unter kontrollierbaren Bedingungen in der Klimakammer erweist sich zudem als platzsparend und schafft vor allem vergleichbare Bedingungen zwischen den geprüften Varianten.

## Literatur

- Abbas HK, Cartwright RD, Xie W, Mirocha CJ, Richard JL, Dvorak TJ, Sciombato GL, Shier WT (1999) Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Mycopath* 147:97–104
- 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

- Armengol J, Moretti A, Perrone G, Vicent A, Bengoechea JA, Garcia-Jimenez J (2005) Identification, incidence and characterization of *Fusarium proliferatum* on ornamental palms in Spain. *Eur J Plant Pathol* 112:123–131
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJM, Cigelnik E, Kroon LPMN, Roebroek EJA, Waalwijk G (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopath* 90:891–900
- Bhat RV, Shetty HPK, Vasanthi S (2000) Human and animal health significance of mycotoxins in sorghum with special reference to fumonisins. In: Chandrashekar A, Bandyopadhyay R, Hall AJ (Hrsg) Technical and institutional options for sorghum grain mold management: proceedings of an international consultation 18–19 May 2000, ICRISAT, Patancheru, India, S 107–115
- Blok WJ und Bollen GJ (1995) Fungi on roots and stem bases of asparagus in the Netherlands: species and pathogenicity. *Eur J Plant Pathol* 101:15–24
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. C.M.I. Kew, Surrey
- 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 Agric Food Chem* 44:2797–280
- Davis I (1963) Investigations on physiology of selective pathogenicity in *Fusarium oxysporum* in test tube culture. *Phytopath* 53:133–139
- 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
- Desjardins AE, Manandhar G, Plattner RD, Maragos CM, Shresta K, McCormick SP (2000) Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *J Agric Food Chem* 48:1377–1383
- Dorn B, Forrer HR, Schürch A, Vogelsang S (2009) *Fusarium*-Arten und Mykotoxine auf Mais in der Schweiz. *AGRARForschung* 16:232–237
- Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL (2003) First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathol* 52:426
- Du Toit LJ, Inglis DA, Pelter GQ (2003) *Fusarium proliferatum* Pathogenic on Onion Bulbs in Washington. *Plant Dis* 87:750
- Elmer WH, Johnson DA, Mink GI (1996) Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. *Plant Dis* 80:117–125

- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R, Kriek NPJ (1988) Fumonisinis – Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol 54:1806–1811
- Goßmann M (1995) Einfluss von Anzuchtverfahren und Anbaumaßnahmen auf den pilzparasitären Befall von *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu., insbesondere mit *Fusarium* spp. Ges Pfl 47:23–27
- Goßmann M, Büttner C, Bedlan G (2001) Untersuchungen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland und Österreich auf Infektionen mit *Fusarium*-Arten. Pflanzenschutzberichte 59:45–54
- Goßmann M, Kleta S, Humpf H-S, Büttner C (2005) Untersuchungen zum endophytischen Befall von *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg in geernteten Stangen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.). Ges Pfl 57:53–58
- Goßmann M, Kadau R, Büttner C, Humpf HU (2007) Untersuchungen zu *Fusarium* spp. und Fumonisin-Kontamination in Knoblauch (*Allium sativum* L.). ALVA-Mitteilungen 10:122–124
- Goßmann M, Beran F, Bedlan G, Plenk A, Hamdinger S, Öhlinger R, Humpf H-U, Büttner C (2008) Spargelstangenuntersuchungen zur Haupterntezeit auf Infektionen mit *Fusarium* spp. und Kontamination mit Fumonisin B1. Mycotox Res 24:88–97
- Goßmann M (2009) Bodenbürtige Pilze im Spargelanbau. Ist das *Fusarium*-Risiko minimierbar? Gemüse 9:29–30
- Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water culture method for growing plants without soils. California Agriculture Experimental Station Circular 347, Berkeley, California
- Logrieco A, Dako A, Moretti A, Frissullo S, Visconti A (1998) Occurrence of fumonisin B1 and B2 in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. J Agric Food Chem 46:5201–5204
- Logrieco A, Mule G, Moretti A, Bottalico A (2002) Toxicogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. Eur J Plant Pathol 108:597–609
- Martinez O, Schaddock I, von Barga S, Goßmann M, Büttner C (2007): Pathogenitätsuntersuchungen von *Fusarium* spp.-Isolaten an Spargel (*Asparagus officinalis* L.). BHGL-Tagungsband 25:35
- Martinez O, von Barga S, Goßmann M, Eisold AM, Humpf HU, Büttner C (2008) Pathogenität von fumonisinbildenden *Fusarium* spp. an Spargel (*Asparagus officinalis* L. und Differenzierung zweier essentieller Gene des Fumonisin-Genclusters. ALVA-Mitteilungen 6:14–18
- Nirenberg H (1976) Untersuchungen über die morphologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. Mitteilungen der biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 169
- Olivain C, Albouvette C (1997) Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. New Phytol 137:481–494
- Olivain C, Albouvette C (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. New Phytol 141:497–510
- Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ (1992) *Fusarium moniliforme* and fumonisinis in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopath 82:353–357
- Reid LM, Hamilton RI, Mather DE (1996) Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot. In: Technical Bulletin 1996–5E, Agriculture and Agri-Food Canada: Ottawa, Canada, S 1–40
- Saß M, Schorling M, Goßmann M, Büttner C (2007) Artenspektrum und Befallshäufigkeit von *Fusarium* spp. in Bt- und konventionellem Mais im Maiszünsler-Befallsgebiet Oderbruch. Ges Pfl 59:119–125
- 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
- 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 Agric Food Chem 50:2778–2781
- Smith SN (2007) An overview of ecological and habitat aspect in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathol Bull 16:97–120
- Stankovic S, Levic J, Petrovic T, Logrieco A, Moretti A (2007) Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. Eur J Plant Pathol 118:165–172
- Stephens CT, Elmer WH (1988) An In Vitro Assay to Evaluate Sources of Resistance in *Asparagus* spp. to *Fusarium* Crown and Root Rot. Plant Dis 72:334–337
- Weber Z, Kostecki M, von Barga S, Goßmann M, Waskiewicz A, Bocianowski J, Knaflewski M, Büttner C, Golinski P (2006) *Fusarium* Species Colonizing Spears and Forming Mycotoxins in Field Samples of Asparagus from Germany and Poland. J Phytopath 154:209–216
- Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y (1994) Fumonisin Occurrence in Corn from High- and Low-Risk Areas for Human Esophageal Cancer in China. Appl Environ Microbiol 60:1626–1629

**Monika Goßmann**, geb. Weiffenfels, absolvierte von 1968–1972 ein Hochschulgartenbaustudium an der Humboldt-Universität zu Berlin. 1975 erfolgte die Promotion zur Thematik der Viren und Virosen des Spargels.

Seit mehr als 20 Jahren ist Monika Goßmann als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der HUB, in dem Fachgebiet Phytomedizin tätig. Schwerpunkt Ihrer Tätigkeit sind Untersuchungen zur Epidemiologie und Schadrelevanz bodenbürtiger, pflanzenparasitärer Pilze, insbesondere *Fusarium* spp., an gärtnerischen und landwirtschaftlichen Kulturpflanzen wie Mais, Weizen, Triticale, Miscanthus, Erbse, Spargel u. a. m.