Pathogenitätsuntersuchungen von *Fusarium* spp.- Isolaten an Spargel (*Asparagus officinalis* L.) und Charakterisierung von Fumonisin-Biosynthesegenen von *F. proliferatum*

O. Martinez, I. Schadock, S. von Bargen, M. Goßmann, C. Büttner
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55 – 57, D- 14195 Berlin
phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einführung

Fusarium oxysporum, F. proliferatum, *F. redolens* und *F. subglutinans* (Abb.1) sind bodenbürtige, parasitische Pilze die am Spargel (*Asparagus officinalis* L.) Wurzel- Kronen- bzw. Stängefäule (Abb.2) verursachen. Als Folge erheblicher Schädigung unterirdischen Organe kommt es zu verringerter Austriebsleistung, Wachstumsdepression, Chlorosen, Welken und vorzeitigem Absterben infizierter Spargelpflanzen [1]. Einige dieser *Fusarium*-Arten sind in der Lage durch die Synthese von Mykotoxinen mögliche Qualitätseinbußen beim Ernteprodukt hervorzurufen [2]. Neben *Fusarium proliferatum* können auch *F. oxysporum*, *F. redolens* und *F. subglutinans* potentielle Fumonisinbildner sein. Die untersuchten *Fusarium* spp.-Isolate stammen aus Probenahmen in österreichischen und deutschen Spargelerwerbsanlagen der Jahre 2000 bis 2004. HPLC- und LC-ESI-MS-Analysen von *F. proliferatum*-infizierten Stangen zeigten eine natürliche Kontamination mit dem Mykotoxin Fumonisin B_1. Im Pathogenitätstest 2006 (Abb. 3) wurden ausgewählte Isolate dieser *Fusarium*-Arten auf ihre Virulenz an Spargeljungpflanzen überprüft. Eine LC-ESI-MS-Analyse von Mischproben der verschiedenen Infektionsvarianten sollte über eine Fumonisinbildung in den Wurzel-, und Kronenbereichen der Jungpflanzen Aufschluss geben. Im Rahmen dieser Arbeit finden Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der *fum1*- und *fum8*-Gene statt, mit dem Ziel der Etablierung eines spezifischen Nachweisverfahrens dieser essentiellen Gene der Fumonisin-Biosynthese auf PCR-Basis *in vivo* an infizierten Spargelpflanzen.

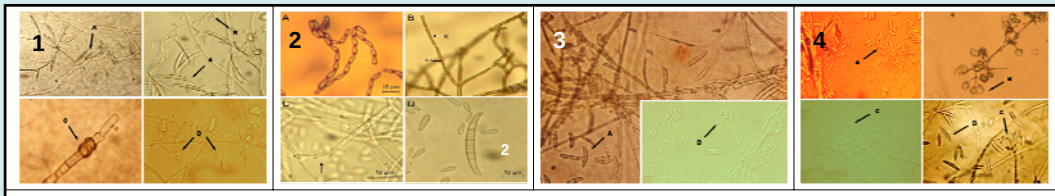

Abb.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen morphologischer Merkmale der verwendeten *Fusarium* spp.-Isolate auf SNA.
1) ***Fusarium oxysporum*** (100x) A: Makrosporen; B: Mikrokonidien; C: Clamydosporen; D: Mikrokonidien als Köpfchen an Monophialiden.
2) ***Fusarium proliferatum*** (400x) A: Mikrokonidien in Ketten; B: Mikrokonidien in Ketten [K] an primären Konidienträger [KT]; C: Polyphialide; D: Mikro- und Makrokonidien.
3) ***Fusarium redolens*** (100x) A: Makrokonidien; B: Mikrokonidien.
4) ***Fusarium subglutinans*** (100x) A: Mikrokonidien B: Mikrokonidien in Köpfchen; C: primäre Konidienträger, Polyphialiden; D: Makrosporen.

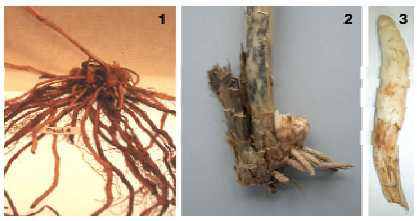

Abb.2: Symptome der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule. 1) infizierter Wurzel- und Kronenbereich einer 1-jährigen Spargelpflanze durch *Fusarium proliferatum;* 2) Stängelfäule durch *Fusarium* sp.; 3) *Fusarium* sp.-infizierte Spargelstange.

Material und Methoden

Prüfumfang: je Variante 25 Pflanzen in 4-facher Wiederholung
Sorte: RAMOS (Südwestdeutsche Saatzucht GmbH)
Saatgutdesinfektion: Heißwasserbehandlung (55°C / 20 min)
Inokulation: Einmischen von 5g infiziertem Weizenkornsubstrat pro Liter Topferde (Torfsubstrat : Sand = 2 : 1)
Inokulationszeitpunkt: 8-Wochen alte Spargeljungpflanzen

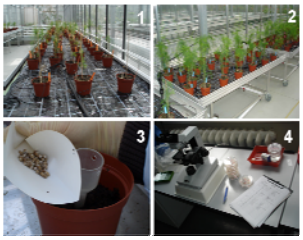

Abb. 4: Aufstellung der Pflanzen auf Tischen [Bild 1 und 2]; Inokulation des Substrates mit infiziertem Weizenkorn [Bild 3]; Lichtmikroskopische Kontrolle der Infektion bei Rückisolierung auf morphologischer Basis [Bild 4].

Auswertung: Erfassung von Frisch- und Trockenmasse des Wurzel- und Kronenbereiches, sowie der oberirdischen Organe; Anzahl Wurzeln, Triebe und Rhizomknospen; regelmäßige Symptombonituren nach definierten Schadensklassen; Untersuchung von Mischproben auf Fumonisingehalt (FB_1, FB_2, FB_3) durch Prof. Humpf / Universität Münster; Molekularbiologischer Nachweis von fum1 und fum8 auf DNA-Ebene in infizierten Wurzel- und Kronenbereichen.

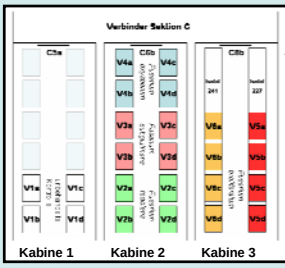

Abb. 3: Versuchsaufbau

Pflanztisch mit je einem Prüfglied

Kulturbedingungen:
- Temperatur: ca. 22 °C Tag / 16 °C Nacht
- Licht: Langtag 16 h (Tageslänge + Zusatzbelichtung)
- Tropfbewässerung
- Luftfeuchte: ca. 40 %
- Nährstoffversorgung nach Bedarf

Versuchsdauer: 10 Wochen
Rückisolierung: 28 dpi und 56 dpi - Auslegung von Wurzeln, Kronen und basisnahen Triebstücken auf synthetischen nährstoffarmen Agar (SNA).

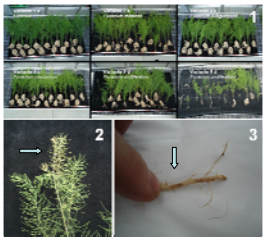

Abb. 5: Ausgewählte Prüfglieder aus allen Varianten; 62 dpi [Bild 1]; chlorotische Aufhellungen an den Triebspitzen verursacht durch *F. redolens;* 36 dpi [Bild 2]; *W*urzel-nekrose verursacht durch *F. oxysporum;* 62 dpi [Bild 3].

Ergebnis

Alle *Fusarium*-Isolate bewirkten unter den Versuchsbedingungen eine signifikant geringere Biomasseproduktion der Spargeljungpflanzen. Die Isolate von *Fusarium proliferatum* erwiesen sich dabei von allen geprüften *Fusarium*- Arten bzw. deren ausgewählten Isolate am aggressivsten. Die ermittelte ober- und unterirdische Trockenmasse wies signifikante Unterschiede, sowohl zur unbehandelten Kontrolle, als auch zu den anderen Infektionsvarianten auf. *F. oxysporum* und *F. subglutinans* zeigten an den infizierten Spargeljungpflanzen von allen behandelten Varianten die schwächste Schadwirkung. *F. redolens* nahm hinsichtlich der ermittelten Parameter innerhalb der Infektionsvarianten eine Mittelstellung ein (Abb.6). In den Mischproben aus dem Wurzel- und Kronenbereich der mit *F. proliferatum* und *F. redolens* infizierten Varianten wurden relativ hohe Fumonisingehalte gemessen. *F. oxysporum* und *F. subglutinans* zeigten dagegen nur leicht erhöhte Fumonisingehalte (Tab.1, Abb.7). Inwieweit aber eine schon in Jungpflanzen auftretende Mykotoxinkontaminationen eine phytotoxische Schadwirkung induziert, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden und soll in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

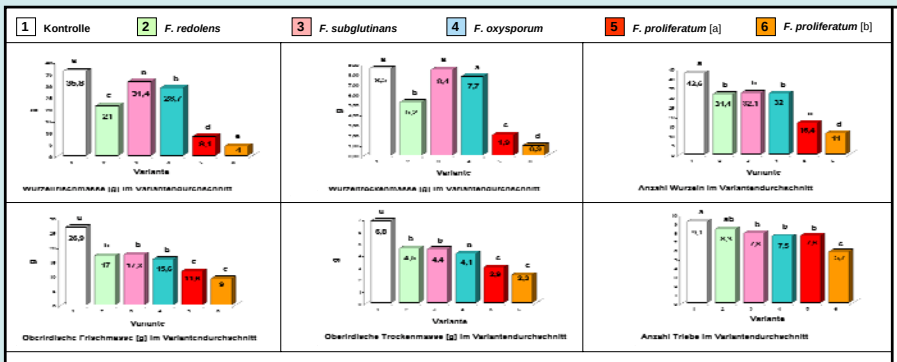

Abb. 6: Ergebnisse Pathogenitätstest 68 dpi.

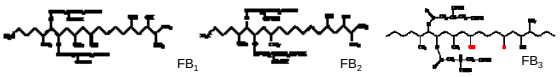

Abb. 7: Struktur der Fumonisine B_1; B_2; B_3

Tab. 1: Ergebnisse der der LC-ESI-MS-Untersuchungen der Wurzel- und Kronen-Mischproben 57 dpi [Doppelbestimmung, Werte gemittelt].

Varinate	Variante	FB_1 [µg/ kg TM]	FB_2 [µg/ kg TM]	FB_3 [µg/ kg TM]
1	Kontrolle	49	60	11
2	*Fusarium redolens*	218	424	46
3	*Fusarium subglutinans*	109	272	42
4	*Fusarium oxysporum*	67	154	26
5	*Fusarium proliferatum*	141	144	35
6	*Fusarium proliferatum*	259	151	58

Literatur:
[1] ELMER, W. H. et al. (1996): Epidemiology and Management of the Diseases Causal to Asparagus Decline. Plant disease 80: 117- 125.
[2] SEEFELDER et al. (2002): Analysis of Fumonisin B_1 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.