

Untersuchungen zu *Fusarium* spp. und Fumonisin-Kontaminationen an Spargel (*Asparagus officinalis*)

Monika GOSSMANN, Franziska BERAN, Astrid PLENK, Gerhard BEDLAN, Stefan HAMEDINGER, Richard ÖHLINGER, Hans-Ulrich HUMPF, Carmen BÜTTNER

Zusammenfassung

2003 und 2004 wurden in fünf österreichischen Ertragsanlagen zur Haupterntezeit ca. 800 Spargelstangen auf Pilzkontaminationen, insbesondere mit *Fusarium* spp. untersucht. Die Befallshäufigkeit in den untersuchten Gewebestücken aus den Spargelstangen mit *Fusarium* spp. variierte stark in Abhängigkeit von Standort und Zeitpunkt der Probennahme. Dominierende *Fusarium*-Art bei der endophytischen Besiedlung der Spargelstangen war *Fusarium oxysporum*. Weitere, häufig auftretende Arten waren *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. equiseti*. Die Befallshäufigkeit (BH) mit *F. proliferatum* lag bei drei von fünf Standorten bei weniger als 10%. Auf den beiden anderen Standorten wurde *F. proliferatum* in BH von 20% bis zu 40% der untersuchten Stangen gefunden. 110 *Fusarium proliferatum*-infizierte Spargelstangen wurden mittels IAS-HPLC bzw. LC-ESI-MS auf den Gehalt an Fumonisin B₁ detektiert. Der Befund geringer FB₁-Werte, zwischen 10 und 50 µg/kg pro Trockengewicht Einzelstange in den untersuchten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen, sowohl in 2003, als auch in 2004, lässt keine eindeutige Erklärung zu. Ebenso Untersuchungen zur Wirt-Pathogen-Interaktion und den möglichen phänotypischen bzw. genotypischen Einflussfaktoren müssen weiter verfolgt werden, um die Bedeutung der Toxinbildung in der Pathogenese von *F. proliferatum* bei Spargel zu verstehen.

Schlüsselwörter: Spargel, *Fusarium* spp., Fumonisin B₁

Einleitung

Die Gesunderhaltung von Spargelpflanzen und die Sicherung der Erntequalität ist ein wichtiger Aspekt beim Anbau dieser mehrjährigen Gemüsebaukultur. Infektionen mit bodenbürtigen *Fusarium* spp., darunter *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. redolens* und *F. subglutinans*, führen an Spargel weltweit zu wirtschaftlich bedeutsamen Schädigungen im Wurzel-, Kronen- und Stängelbereich [1]. Dies bestätigten auch eigene 2001er Untersuchungen in Jung- und Ertragsanlagen Deutschlands bzw. Österreichs [2]. Es ist zu berücksichtigen, dass *Fusarium proliferatum* neben Spargel auch an zahlreichen anderen Kulturpflanzen, vor allem in tropischen Anbaugebieten, darunter bei Mais, Weizen, Sorghum, Reis u.a.m. diverse Fäuleerkrankungen hervorruft. Da diese *Fusarium*- Art ebenso wie *F. verticillioides* zu den Hauptbildnern von Fumonisinen zählt [3], stellt sein Befall bei Gemüsepflanzen, wie dem Spargel, ein potentielles Gefahrenrisiko für die menschliche Ernährung dar. Darum ist es von Interesse, ob die zum Verzehr verwendeten Stangenteile mit diesem Pilz infiziert sind bzw. von einer Kontamination mit Fumonisinen betroffen sein können. Erstmals wurde 1998 in Italien in *F. proliferatum* infizierten

Spargelpflanzen Fumonisin B₁ (FB₁) und B₂ (FB₂) nachgewiesen [4]. 2002 gelang auch in Deutschland erstmals der Nachweis von FB₁ in *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen. In 9 von 10 mit *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen wurde das Fumonisin B₁ (FB₁) gefunden [5]. Die Stangen wurden nach der Ernteperiode, Ende Juli 2000, von Pflanzen aus mehrjährigen Anlagen mit starken Wuchsdepressionen entnommen. In den Stangen wurde neben *F. proliferatum*, auch eine natürliche Kontamination mit *F. sambucinum* und *F. oxysporum* festgestellt. Mittels HPLC-ESI-MS wurde in diesen Stangen eine FB₁-Konzentration von 36,4 bis 4513,7 µg/kg basierend auf dem Einzelstangentrockengewicht gemessen. Auf diesen Befunden aufbauend, sollte durch die 2003/04er Untersuchungen in Ertragsanlagen Österreichs geprüft werden, inwieweit Spargelstangen während der Stechperiode mit *Fusarium* spp., insbesondere mit *F. proliferatum* kontaminiert bzw. inwieweit und in welcher Höhe in diesen Stangen Fumonisine nachzuweisen sind.

Material und Methoden

Probennahme der Spargelstangen

In den Jahren 2003 und 2004 wurden insgesamt fünf mehrjährige Ertragsanlagen in Österreich zur Haupterntezeit im Mai und Juni beprobt. Drei der untersuchten Standorte waren im Anbaugebiet Niederösterreich lokalisiert. Die anderen beprobten Felder befanden sich im Burgenland und in Oberösterreich. Der Entwicklungsverlauf der Pilzinfektion an Einzelpflanzen wurde über einen zweijährigen Versuchszeitraum beobachtet. Hierfür erfolgte die Probennahme der Erntestangen je Standort in beiden Jahren nach einem festgelegten Boniturschema. An 25 Probennahmepunkten auf der Spargelfläche, im Abstand von bis zu 50 bzw. 75m wurden maximal zwei Stangen bis zu einer Länge von 35cm, also möglichst kronennah entnommen und luftdurchlässig verpackt. Der Transport und die Lagerung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte in gekühlten Behältern. Zwischen Probennahme und Aufbereitung im Labor lagen ca. 1-4 Tage.

Untersuchung der Spargelstangen auf endophytische Pilzbesiedlung

Für die mykologischen Untersuchungen im Labor wurden die Spargelstangen zunächst mit Leitungswasser abgespült. Nachdem die gesamte Stange für 2min in 2% Natriumhypochlorid (NaOCl) oberflächlich desinfiziert und anschließend dreimal mit sterilem Aqua dest. gespült wurde, erfolgte die Entnahme von ca. 2mm dünnen Scheiben mit einem Skalpell aus dem oberen, bei 20 cm, dem mittlerem Stangenbereich, bei 25cm, und aus der Basis der Stange, bei ca. 35cm. Die Scheiben wurden einzeln auf SNA (slight nutrient agar) ausgelegt und bei 20°C, 14h UV-Licht und 10h Dunkelphase 10 Tage inkubiert. Danach wurde der endophytische Pilzauswuchs lichtmikroskopisch bonitiert. Die *Fusarium*-Arten wurden anhand morphologischer Merkmale charakterisiert. Nach der Entnahme der mykologisch zu untersuchenden Gewebestücke wurde das übrige Stangenmaterial im Untersuchungsjahr 2003 kurzfristig bei -20°C eingefroren. Im Jahr 2004 wurde das restliche Stangenmaterial in ca. 1cm³ große Stücke zerkleinert, luftdicht verpackt

und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Mykotoxinanalysen wurde das Probenmaterial gefriergetrocknet und pulverisiert luftdicht gelagert.

FB₁- Bestimmung

Im Untersuchungsjahr 2003 wurden die *Fusarium proliferatum*-infizierten und kurzfristig eingefrorenen Spargelstangen mittels HPLC untersucht. 2004 wurden das gefriergetrocknete und mit *F. proliferatum*-infizierte Stangenmaterial mittels Hochleistungsflüssig-chromatographie in Kombination mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) nach SEEFELDER et al. (2002) auf den Gehalt an Fumonisin B₁ untersucht. .

Ergebnisse und Diskussion

An fünf Standorten in Österreich wurden 2003 und 2004 zu zwei Probennahmeterminen in der Haupterntezeit insgesamt 790 Spargelstangen kronennah gestochen und im Labor auf endophytische Pilzkontaminationen, insbesondere mit *Fusarium* spp. untersucht. Die Befallshäufigkeit (BH) in den untersuchten Gewebestücken aus den Spargelstangen mit *Fusarium* spp. variierte stark in Abhängigkeit vom Standort (Tab. 1). So betrug die BH der Erntestangen mit *Fusarium oxysporum* an zwei Standorten bis zu 80%, während ansonsten ein Befall von 20% bis 67% der Stangen zu verzeichnen war. An allen beprobten Standorten ist *Fusarium oxysporum*, die an der endophytischen Besiedlung der Spargelstangen beteiligte, dominierende *Fusarium*-Art. Am zweithäufigsten wurde *F. proliferatum* nachgewiesen. Die BH mit *F. proliferatum* lag bei drei Standorten bei weniger als 10% der untersuchten Stangen. Auf zwei Standorten wurde *F. proliferatum* in BH von 20% bis 37% der untersuchten Stangen gefunden. Meist standortabhängig wurden noch *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. equiseti* bei den Spargelstangenkontaminationen determiniert.

Tab.1: Prozentuale Befallshäufigkeit von nachgewiesenen *Fusarium* spp. in den untersuchten Spargelstangen (n= 790) zur Ernte 2003 und 2004

<i>Fusarium</i> spp.*	Befallshäufigkeit (%) in den Spargelstangen (n=790)				
	Standort 1 (n = 153)	Standort 2 (n = 189)	Standort 3 (n = 184)	Standort 4 (n = 150)	Standort 5 (n = 114)
<i>F. oxysporum</i>	20	21	82	80	67
<i>F. proliferatum</i>	7	7	37	20	5
<i>F. culmorum</i> o. <i>F. sambucinum</i>	0	6	0	11	9
<i>F. avenaceum</i>	7	0	0	0	0
<i>F. spp.</i>	10	6	9	0	0

*Mischinfektionen möglich

Fusarium proliferatum-infizierte Spargelstangen wurden 2003 mittels IAS-HPLC bzw. 2004 mittels LC-ESI-MS auf den Gehalt an Fumonisin B₁ detektiert. Die Befunde wiesen in beiden Jahren mit 10 und 50 µg/kg pro Trockengewicht Einzelstange relativ geringer FB₁-Werte, in den untersuchten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen auf. Nur in einzelnen Stangen waren erhöhte FB₁-Werte bis max. 308 µg/kg feststellbar (Tab. 2 und Tab. 3).

Tab. 2: Mittels HPLC ermittelte Fumonisin B₁-Werte in den *Fusarium proliferatum*-infizierten Spargelstangen 2003

Standort	Probenahme Mai 2003		Probenahme Juni 2003	
	Anzahl Stangen(n)	Mittelwert FB ₁ [µg/kg]*	Anzahl Stangen(n)	Mittelwert FB ₁ [µg/kg]*
1	3	11	0	-
2	1	11	4	37
3	14	19	21	16
4	8	13	10	16
5	1	10	2	13
Insgesamt	27		37	

*bezogen auf das Trockengewicht pro Einzelstange

Tab. 3: Mittels HPLC-ESI-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]*
1	2	11 und 308	2	0
2	3	20	1	0
3	11	24	16	a*
4	3	1	8	b*
5	1	23	0	0
Insgesamt	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

Literatur

- [1] ELMER, W. H.; JOHNSON, D. A. and MINK, G. I. (1996): Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. *Plant Disease* 80: 117 - 125.
- [2] GOßMANN, M., BÜTTNER, C., BEDLAN, G. (2001): Untersuchungen zum Spargel (*Asparagus officinalis* L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland u. Österreich auf Infektionen mit *Fusarium*- Arten. *Pflanzenschutzberichte* 59 (2), 45–54.
- [3] NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; 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.
- [4] LOGRIECO, A., B. DAKO, A. MORETTI, S. FRISULLO and A. VISCONTI 1998: Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in *Fusarium proliferatum* infected Asparagus Plants. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5201-5204.
- [5] SEEFELDER, W., GOßMANN, M., HUMPF, H.-U. (2002): Analysis of fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic tubers from germany by liquid chromatography-elektrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (10), 2778–2781.

Autoren

Dr. Monika GOSSMANN*, Dipl.-Biol. Franziska BERAN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin; Astrid PLENK und Dr. G. BEDLAN: AGES GmbH, Institut für Pflanzengesundheit, Wien; S. HAMEDINGER: Verband Obst- und Gemüseproduzenten Oberösterreich, Eferding; Dr. R. ÖHLINGER: AGES GmbH, CC Cluster Chemie, Linz; Prof. Dr. H.-U. HUMPF: Westfälische Wilhelms-Universität, Institut Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, 48149 Münster.

*Email: monika.gossmann@agr.ar.hu-berlin.de