

Schnellmethode zur Pathogenitätsprüfung von *Fusarium* spp. an Spargeljungpflanzen

Fast assay to evaluate the pathogenicity of Fusarium spp. on asparagus plants

ALEXANDRA SCHOLZ, SUSANNE VON BARGEN, F. HENNIG, MONIKA GOßMANN &
CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

Zwei *F. proliferatum*-, und fünf *F. oxysporum*-Stämme aus Spargel sowie ein *F. verticillioides*-Stamm aus Mais wurden einer Schnellmethode zur Überprüfung der Aggressivität und Pathogenität an 14 Tage alten Spargeljungpflanzen unterzogen. Nach einer zweiwöchigen Inkubation wurden die Parameter Befallsgrad und Frischmasse von Wurzel und Spross erfasst.

Die Pathogenität der *F. proliferatum*- und der *F. oxysporum*-Stämme wurde durch die Verbräunung der Leitgefäße der Spargelwurzeln bestätigt. *F. verticillioides* rief nur Verbräunungen der äußeren Epidermis hervor. Die Infektion der Spargeljungpflanzen führte bei allen Stämmen zu einem signifikant erhöhtem Befallsgrad gegenüber der Kontrollvariante. Innerhalb der Varianten erwies sich *F. proliferatum* als signifikant aggressiv. Zudem wiesen alle drei Varianten eine signifikante Reduzierung der Frischmassen von Wurzel und Spross auf.

Die geprüfte Schnellmethode erwies sich als geeignet, die Pilzstämme innerhalb von 28 Tagen hinsichtlich ihrer Pathogenität zu evaluieren und deren Aggressivität an Spargel vergleichend zu bewerten.

Schlüsselwörter

F. oxysporum, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest, Spargel

Summary

A fast *in vitro* assay with asparagus plants was used to evaluate pathogenicity and compare the virulence of two Isolates of *F. proliferatum*, five Isolates of *F. oxysporum* from asparagus and one isolate of *F. verticillioides* from maize. Two weeks after inoculation of 14 days old asparagus plants with fungal isolates the disease rating class and the root and shoot fresh weights were determined and compared with untreated controls.

Pathogenicity of *F. proliferatum* and *F. oxysporum* could be shown by browning of the vascular bundles, whereas *F. verticillioides* colonized asparagus roots showed only browning of the epidermis. According to the disease rating, the *F. proliferatum*-Isolates were highly aggressive, whereas the *F. oxysporum*-Isolates exhibited a lower virulence. The inoculation of asparagus plants with different Isolates led to reduction of the fresh weight of roots and shoots.

Therefore it was possible to determine the aggressiveness and pathogenicity of the different isolates in only 28 days.

Key words

F. oxysporum, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *in vitro* assay, pathogenicity, asparagus

Einführung

Einige *Fusarium* spp. sind bedeutende Pathogene an Kulturpflanzen, einschließlich des Spargels und führen zu Qualitätsminderungen und Ernteeinbußen (GOßMANN et al. 2005, PAPST et al. 2007, SCHULTZ et al. 2007). Ein großes Problem ist zudem die mögliche Gefährdung von Mensch und Tier durch das Mykotoxinbildungspotential dieser Arten (MARASAS et al. 1984). Nicht alle *Fusarium*-Arten und deren Stämme sind in der Lage, Pflanzen zu infizieren. Um diese Saprophyten von pathogenen Stämmen zu unterscheiden, müssen Pathogenitätstests *ad planta* durchgeführt werden. Dabei sind herkömmliche Pathogenitätstest im Gewächshaus langwierig und platzaufwendig, während bei einem *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest unter kontrollierten Bedingungen in kürzerer Zeit die Pathogenität von Stämmen überprüft werden kann.

Material und Methoden

Zwei *F. proliferatum* (Fpro)- und fünf *F. oxysporum* (Foxy)-Stämme aus Spargel und ein *F. verticillioides* (Fver)-Stamm aus Mais (als Negativkontrolle) wurden für den Schnelltest an Spargeljungpflanzen eingesetzt. Oberflächendesinfizierte Spargelsamen wurden bei Dauerdunkel (25°C) bis zur Keimung auf Wasseragar inkubiert und nach 5 - 7 Tagen auf Hoagland-Agar umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in der Klimakammer bei 24°C (16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit). Die Inokulation von je 21 Spargelpflanzen erfolgte mit 0,5 ml Sporensuspension je *Fusarium* spp.-Isolat (Konz. 10^6 Sporen/ml) nach 14 Tagen Inkubation. Als Kontrolle dienten unbehandelte Spargelpflanzen. Nach einer zweiwöchigen Inkubationszeit unter o. g. Bedingungen wurden die Spargelpflanzen bonitiert, indem die Pflanzen aufgrund der Wurzelverbräunung in 4 Schadensklassen eingeteilt (Tab. 1) und der Befallgrad (MARTINEZ-LOPEZ 2007) errechnet wurde. Zudem wurden die Leitgefäße der Wurzeln mikroskopisch auf Verbräunungen überprüft sowie die Frischmassen der Wurzeln und Sprosse aller 21 Spargelpflanzen pro Variante erfasst.

Tab. 1: Schadensklassen 0-3 der Wurzelbonitur zur Ermittlung des Befallsgrades

Schadensklasse	Beschreibung
0	keine Symptome
1	Haupt- und Seitenwurzeln leicht verbräunt: < 25 %
2	Haupt- und Seitenwurzel verbräunt: 25-50 %
3	Haupt- und vor allem auch Seitenwurzeln stark verbräunt: 50-75 % zudem Vermorschungen

Ergebnisse

Mikroskopische Untersuchungen der Wurzeln zeigten bei den *F. proliferatum*- und den *F. oxysporum*-Varianten eine Verbräunung der äußeren Epidermis, des Parenchyms und der Leitbahnen. *F. verticillioides* rief nur Verbräunungen der äußeren Epidermis hervor.

Die *F. proliferatum*-Stämme unterschieden sich in ihrer Aggressivität signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$) von den restlichen Varianten und wiesen Befallsgrade von über 55 % auf, während die der *F. oxysporum*-Stämme zwischen 31 und 43 % lagen. Diese unterschieden sich untereinander nicht signifikant, aber von der *F. verticillioides*-Variante und der Kontrolle. Die mit *F. verticillioides* infizierten Spargelpflanzen zeigten nur leichte Verbräunungen der äußeren Epidermis, unterschieden sich aber mit 6 % Befallsgrad signifikant von der Kontrolle (Abb. 1).

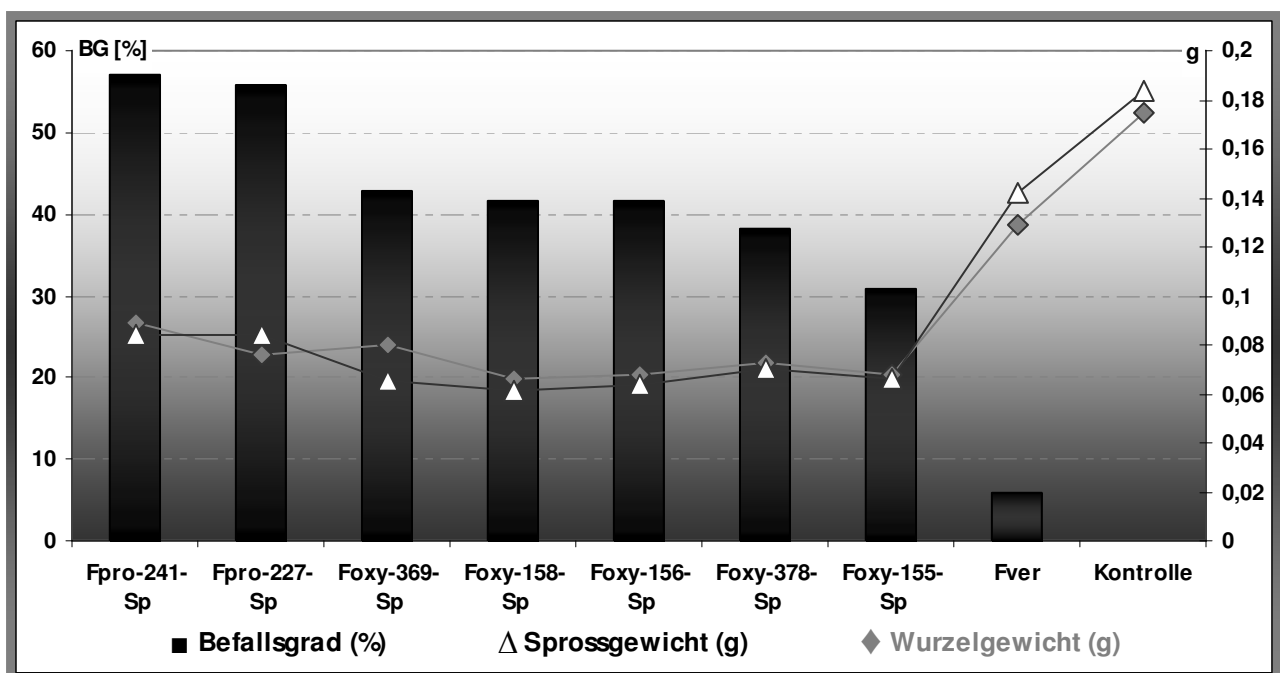


Abb. 1: Befallsgrade (BG) sowie Mittelwerte von Spross- und Wurzelgewicht (g), der mit den verschiedenen *F. oxysporum*-, *F. proliferatum*- und *F. verticillioides*-Pilzstämmen infizierten Spargelpflanzen 14 dpi

Die Wurzeln und Sprosse der Spargeljungpflanzen, die mit dem *F. verticillioides*-Stamm sowie den *F. proliferatum*- und *F. oxysporum*- Stämmen infiziert waren, wiesen Reduzierungen der Biomasse auf und unterschieden sich diesbezüglich signifikant von der unbehandelten Kontrollvariante. *F. proliferatum*- und *F. oxysporum*-infizierte Pflanzen unterschieden sich dabei untereinander nicht (Tukey-Test, $p \leq 0,05$). Bei den *F. proliferatum* und *F. oxysporum*- Varianten mit einem hohen Befallsgrad ist die sichtbare Schädigung auch mit einer Reduzierung der Spross- bzw. Wurzelgewichte verbunden, während bei der Varianten mit dem niedrigen Befallsgrad (*F. verticillioides*) bzw. der nicht geschädigten, unbehandelten Kontrolle, die Frischmassen von Wurzel und Spross deutlich höher liegen (Abb.1).

Diskussion

Die *F. proliferatum*- und *F. oxysporum*-Stämme waren in der Lage, sich in den Spargeljungpflanzen zu etablieren und Schädigungen hervorzurufen. *F. verticillioides* als Maispathogen (DESJARDINS & PLATTNER 2000) besiedelte nur die äußere Epidermis und drang innerhalb dieser zwei Wochen nicht bis zu den Leitgefäßen der Spargelpflanzen vor. Ob *F. verticillioides* dies beim Spargel überhaupt gelingt und eine potenzielle Gefahr dieser Art als Pathogen an Spargel ausgeht, müsste noch überprüft werden. Bislang sind an Spargel hauptsächlich *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. solani* (GOßMANN et al. 2005, WEBER et al. 2006) als Pathogene nachgewiesen. Der *F. proliferatum*-Stamm erwies sich am aggressivsten, während die ausgelöste Tracheomykose durch *F. oxysporum* sich weniger im Befallsgrad, als mit einem größeren Verlust an Frischmasse bei Wurzel und Spross bemerkbar machte.

Pathogenitätstests mit einer Versuchsdauer von mehr als 80 Tagen im Gewächshaus kamen zu ähnlichen Ergebnissen (MARTINEZ-LOPEZ 2007, STEPHENS & ELMER 1988). Zudem stellten STEPHENS & ELMER (1988) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gewächshausstudie und der *in vitro*-Methode fest, so dass der vorgestellte *in vitro*-Pathogenitätstest als Schnellmethode innerhalb von vier Wochen mit Hilfe der Parameter Befallsgrad, Leitgefäßbonitur und Frischmasse von Wurzel und Spross pathogene von apathogenen Stämmen differenzieren kann. Darüber hinaus können durch diesen Test auch Aggressivitätsunterschiede von Stämmen an Spargel ermittelt werden.

Literatur

GOßMANN M, KLETA S, HUMPF H-S, BÜTTNER C (2005) Untersuchungen zum endophytischen Befall von *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nierenberg in geernteten Stangen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) Gesunde Pflanzen **57**, 53-58

MARASAS WFO, NELSON PE, TOUSSOUN TA (1984) Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA

MARTINEZ-LOPEZ O (2007) Pathogenität und Toxizität von *Fusarium* spp. an *Asparagus officinalis* L. und Differenzierung zweier initialer Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges. Diplom-Arbeit im Studiengang: - Gartenbauwissenschaften - Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin

PAPST C, ZELLNER J, VENKATARATNAM S, EDER J (2007) *Fusarium*-Problematik bei Körnermais (*Zea Mays* L.). Gesunde Pflanzen **59**, 7-16

SCHULTZ B, ELLNER FM, GOßMANN M, BÜTTNER C (2007) Untersuchungen zur Pathogenität und Mykotoxinbildung von *Fusarium sambucinum*, dem Erreger der Trockenfäule von Kartoffeln. Mycotoxin Research **23**, 78-84

STEPHENS CT & ELMER WH (1988) An In Vitro Assay to Evaluate Sources of Resistance in *Asparagus* spp. to *Fusarium* Crow and Root Rot. Plant Disease **72**, 334-337

WEBER Z, KOSTECKI M, VON BARGEN S, GOßMANN M, WASKIEWICZ A, BOCIANOWSKI J, KNAPLEWSKI M, BÜTTNER C, GOLINSKI P (2006) *Fusarium* Species Colonizing Spears and Forming Mycotoxins in Field Samples of Asparagus from Germany and Poland. Journal of Phytopathology **154**, 209-216

Autoren

Alexandra SCHOLZ, Dr. Susanne VON BARGEN, Dr. Monika GOßMANN & Prof. Dr. Carmen BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Dr. F. HENNIG, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V., Kühnhäuser Str. 101, 99189 Kühnhausen, hennig@erfurt.igzev.de