

Untersuchungen von *Fusarium proliferatum*-Isolaten aus Spargelstangen



I. Schadock¹, S. von Barga¹, M. Goßmann¹, W. Xu², A. Kofoel², C. Büttner¹

¹Humboldt Universität Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin-Dahlem, Kontakt: shadock@imk.fg
²Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren

Einführung

Fusarium proliferatum ist ein bodenbürtiger Pilz, welcher vor allem in tropischen Regionen zu Wurzel- und Fruchtfäule an Mais, Sorghum, Datteln, Miscanthus und Reis führt. An Spargel (*Asparagus officinalis*) ist er weltweit Mitverursacher der Wurzel- und Kronfäule (¹). Neben *Fusarium verticillioides*, *F. anthophilum* etc. zählt *F. proliferatum* zu den potentiellen Mycotoxinbildnern und bildet u.a. das Toxin Fumonisin B1. Inwieweit dieser Pilz im Rahmen der menschlichen Ernährung ein Gesundheitsrisiko darstellt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch

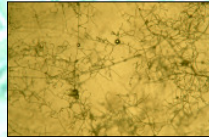


Abb. 1 *Fusarium proliferatum* Mycel auf SNA: Mikroskopische Ansicht in 20facher Vergrößerung

nicht eingeschätzt werden.

In einem Pathogenitätstest wurden zwei *F. proliferatum* Isolate auf ihre Pathogenität an Spargelpflanzen überprüft. Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden der Pilzapplikation miteinander verglichen. Parallel dazu wurden 45 *F. proliferatum* Isolate, die aus österreichischen Spargelstangen isoliert wurden, mit Hilfe zweier PCR-Fingerprinting Methoden molekularbiologisch untersucht, um eventuell vorhandene genetische Unterschiede festzustellen.

Pathogenitätstest

Material und Methoden

Für den Pathogenitätstest wurden sechs Wochen alte Spargelpflanzen der Sorten Ramos und Ravel verwendet. Die Inokulation erfolgte zum Einen dadurch, dass die Pflanzen in sterile Erde gepflanzt wurde, die mit unterschiedlichen Mengen (9 g, 5 g, 2 g) an *F. proliferatum* bewachsenen Weizenkornsubstrat versetzt worden war. Zum Anderen wurden Pflanzen mit den Wurzeln für zwei Minuten in unterschiedlich konzentrierten *F. proliferatum* Sporensuspensionen (eine Gruppe in 10⁶, eine zweite in 10⁸ Sporen je ml) getaucht. In einer Klimakammer wurden die Pflanzen über einen Zeitraum von 50 Tagen bei 22°C und ca. 50% Luftfeuchte beobachtet und Symptome im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle bonitiert.

Ergebnisse

Sowohl die Spargelsorte Ramos, als auch Ravel waren anfällig für beide *F. proliferatum*-Isolate. Dabei wirkte sich die Art der Inokulation entscheidend auf den Infektionsverlauf aus (Abb. 6 und 7, bzw. 8 und 9): Während die mit einer Sporensuspension inokulierten Pflanzen kaum Symptome entwickelten (Abb. 3 und 5), war bei den über Weizenkornsubstrat infizierten Versuchspflanzen sowohl stagnierendes Wachstum als auch partielles bis hin zu vollständigem Absterben von Pflanzen zu verzeichnen (Abb. 2 und 4). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war sowohl die Anzahl der Triebe bei *F. proliferatum* infizierten Spargelpflanzen reduziert (Abb. 7), als auch die ausgebildete Wurzelmasse nach 50 Tagen deutlich verringert (Abb. 5).



Abb. 2 Spargelpflanzen der Sorte Ravel mit 9 g Weizenkornsubstrat inokuliert, nach 50 Tagen



Abb. 4 Spargelwurzeln der Sorte Ravel, mit 9 g Weizenkornsubstrat inokuliert, nach 50 Tagen



Abb. 3 Spargelpflanzen der Sorte Ravel, inokuliert mit 10⁸ Sporen/ml, nach 50 Tagen



Abb. 5 Spargelwurzeln der Sorte Ravel, inokuliert mit 10⁸ Sporen/ml, nach 50 Tagen

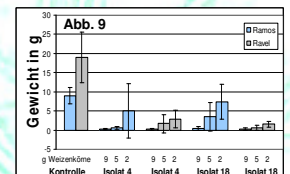
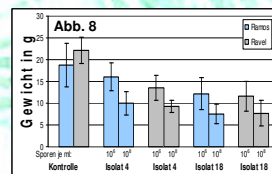
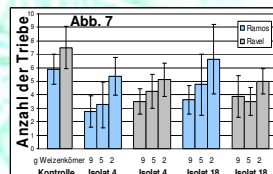
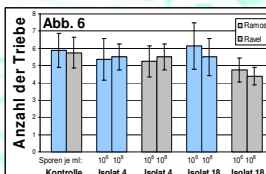


Abb. 6 und 7 zeigen die durchschnittliche Anzahl der Triebe je Pflanze, wobei die Versuchsgruppen der Abb. 6 durch Tauchen in eine *F. proliferatum* Sporensuspensionen und in Abb. 7 durch *F. proliferatum* Weizenkornsubstrat inokuliert wurden.

Abb. 8 und 9 zeigen das durchschnittliche Frischgewicht der Wurzel je Pflanze, wobei die Versuchsgruppen der Abb. 8 durch Tauchen in eine *F. proliferatum* Sporensuspensionen und in Abb. 9 durch *F. proliferatum* Weizenkornsubstrat inokuliert wurden.

Molekularbiologische Untersuchung

Material und Methoden

Um Unterschiede von 45 *F. proliferatum*-Isolaten auf genetischer Ebene zu untersuchen, wurden zwei verschiedene „Fingerprint“-Methoden angewendet: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) und DNA Amplification Fingerprinting (DAF). Bei der DAF-PCR wurden zwei, bei der RAPD-Analyse wurde ein kurzes 10er Oligonukleotid zur Amplifikation der aus *F. proliferatum* aufgereinigten DNA eingesetzt (Primer Q1, Q6, Roth).

Ergebnisse

Für die RAPD-PCR erwiesen sich zwei Primer als geeignet reproduzierbare, veränderte Bandenmuster aus *F. proliferatum*-Isolaten zu erzeugen. Bei der DAF-PCR erwiesen sich drei verschiedene Primer-Kombinationen als geeignet, DNA-Polymorphismen innerhalb der untersuchten Isolate aufzudecken.

Die Einteilung von acht Isolaten in Gruppe A (↔), ließ sich mit Hilfe zweier DAF-PCR Analysen bestätigen (Abb. 10 und 11).

Eine Einteilung der Isolate in vier Gruppen, erfolgte auf Grundlage der RAPD-PCRs (Tab. 1, Abb. 12 und 13). Diese Klassifizierung korreliert jedoch weder mit den Entnahmestandorten bzw. Erntezeitpunkten der Spargelstangen, noch mit der beprobten Spargelsorte.

Die Gruppe D enthält Isolate die sich mit ihren Bandenmustern nicht in eine der drei Gruppen A bis C einteilen ließen.

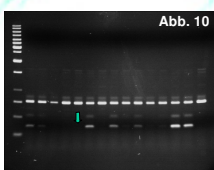


Abb. 10

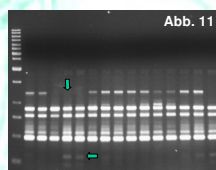


Abb. 11

Tab. 1 Gruppeneinteilung der *F. proliferatum* Isolate anhand der RAPD-PCR mit Primer Q1 bzw. Q6

Gruppe	Anzahl der Isolate
A ↔	8
B ↔	12
C ↔	11
D	14

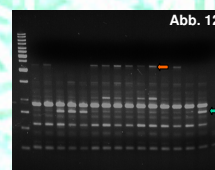


Abb. 12

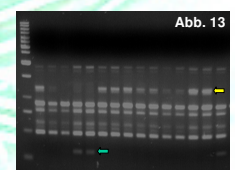


Abb. 13

Die Abb. 10 und 11 zeigen die Ergebnisse der DAF-PCR mit Isolat 16 bis 30 (von links nach rechts) in den Primerkombinationen: Q11 Q20 (Abb. 10) und Q2 Q6 (Abb. 11)

Die Abb. 12 und 13 zeigen die Ergebnisse der RAPD-PCR mit Isolat 16 bis 30 (von links nach rechts): Primer Q1 (Abb. 12) und Primer Q6 (Abb. 13)