

# **Auftreten von *Fusarium* spp. und Mykotoxinen im niedersächsischen Spargelanbau – Ertragsrelevanz und determinierende Faktoren**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

DOKTORIN DER GARTENBAUWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. hort.  
genehmigte Dissertation  
von

**Diplom Ingenieurin (FH) Tanja Koch**  
geboren am 12.06.1972 in Salzgitter

2011

Referent: Prof. Dr. Hans-Michael Poehling

Korreferentin: Prof. Dr. Kerstin Wydra

Tag der Promotion: 18.05.2011

## Zusammenfassung

Unter den in Deutschland angebauten Gemüsearten nimmt der Anbau von Spargel wegen der großen Anbauflächen und des mehrjährigen Anbaus eine Sonderstellung im Gemüsebau ein. Innerhalb der bis zu 10-jährigen Standzeit der Kultur kommt es durch bodenbürtige Schaderreger zu Fäulnis- und letztendlich zu frühzeitigen Absterbeerscheinungen. Die weltweit im Spargelanbau verbreitete Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule wird durch parasitäre Pilze der Gattung *Fusarium* Link verursacht, darunter *F. oxysporum* Schlecht. und *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg. *Fusarium* spp. Infektionen führen zu einer reduzierten Anzahl und zu einem geringeren Durchmesser der Stangen, verursachen ein Welken an Wurzel und Stangen bis zur Fäule an Wurzeln, Rhizom und Stängeln. Am Rhizom und an der Stängelbasis können vaskuläre Verfärbungen auftreten sowie braune Läsionen an Wurzel-, Rhizom- und Stängeloberfläche. Eine weitere Qualitätseinschränkung wird durch die mögliche Mykotoxin-Produktion hervorgerufen. Aber nicht nur pilzliche Erreger spielen eine Rolle sondern auch zahlreiche Insekten, wobei besonders die Spargelfliege (*Plioreocepta poeciloptera*) verheerende Schäden verursachen kann. Die Larven fressen sich basipetal durch den Trieb und mindern die Assimilationsleistungen, wodurch der Ertrag im Folgejahr negativ beeinflusst wird.

Im ersten Abschnitt dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass auf niedersächsischen Spargelanlagen das Erntegut unterschiedlich starke Infektionen durch *Fusarium* spp. aufwies. Abhängig von Ort und Zeitpunkt der Probenahme sowie von der vorherrschenden Witterung wurde 2008 ein hoher Infektionsdruck von bis zu 68 % ermittelt, dagegen wiesen die Spargelstangen 2009 eine wesentlich geringere Infektion von bis zu 38 % auf. Zur Laubabreife im Herbst stieg auf allen Feldern die *Fusarium*-Infektion durchschnittlich bis auf 95 % an. Die dominanteste *Fusarium*-Art an den infizierten Spargelstangen war *F. oxysporum*, gefolgt von *F. proliferatum*, allerdings verschob sich das Verhältnis im Herbst zugunsten von *F. proliferatum*.

An Spargeljungpflanzen wurden im Gewächshaus Virulenztests durchgeführt, um die Beziehungen zwischen Schädigung und Befallsgrad für die getesteten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate zu bewerten. Die Wurzelparameter (Trockenmasse und Befallsgrad) erwiesen sich im Vergleich zu den Triebparametern als aussagekräftiger. Die Wurzeltrockenmasse und der Befallsgrad der Wurzel korrelierten mit einem  $R^2 = 0,74$  eng miteinander. Alle getesteten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate waren im Vergleich zur Kontrolle pathogen. Zwischen den jeweils sechs Isolaten (einer *Fusarium*-Art) wurden

nur signifikante Unterschiede zwischen den *F. oxysporum* Isolaten ermittelt. Von allen Isolaten bewirkte das *F. oxysporum* Isolat O-6 die stärksten Krankheitssymptome. Keinen Einfluss auf die Virulenz der Isolate hatten Faktoren wie Herkunft (Feld) und Zeitpunkt der Entnahme der Isolate sowie die Intensität der Symptome des Spargelgewebes, von dem die Isolate isoliert wurden. Insbesondere zeigen die Ergebnisse, dass sich Isolate aus Gewebe mit typischen Krankheitssymptomen in der Virulenz nicht von Isolaten aus symptomfreiem Spargelgewebe unterscheiden. Unter optimierten Verhältnissen auf PDA konnten mittels des Myzelwachstums weitere Differenzierungen zwischen den *Fusarium*-Arten vorgenommen werden. Die *F. oxysporum* Isolate wiesen im Vergleich zu *F. proliferatum* bei 15 °C, 20 °C und 25 °C ein schnelleres Wachstum auf. Eine deutliche Steigerung des Myzelwachstums wurde bei *F. oxysporum* bei 15 °C gemessen und bei *F. proliferatum* bei 20 °C. Signifikante Unterschiede innerhalb der *F. oxysporum* Isolate wurden ab 20 °C ermittelt und bei *F. proliferatum* ab 15 °C und höheren Temperaturen.

Die Untersuchung auf Fumonisin-Produktion zeigte, dass alle auf Reis kultivierten Einsporenkulturen der *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate des Virulenztests in der Lage waren FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub> zu bilden. Die Werte der *F. proliferatum* Isolate lagen im hohen Bereich bis zu 65,30 ppm (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>). Die der *F. oxysporum* Isolate variierten zwischen 0,89 und 17,69 ppm. Die Kontamination in den Erntestangen von 2008 und 2009 befand sich dagegen auf einem geringen Level mit einem Median von 0,06 ppm und 0,16 ppm. Nur vereinzelt Stangen auf einem Feld wiesen hohe Werte von bis 281,70 ppm auf. Auf diesem Feld wurde keine konventionelle Ernte durchgeführt, wodurch die vaskuläre Ausbreitung der Fusarien bis in die Triebspitzen schon von Beginn der Triebwachstumsphase an möglich war.

Des Weiteren erfolgte auf denselben niedersächsischen Spargelanlagen in drei aufeinanderfolgenden Jahren (2007 bis 2009) ein Monitoring über das Auftreten von *P. poeciloptera*. Mittels grüner Stableimfallen konnte die Flugaktivität der Fliege ab April bis Ende Juli auf den Feldern erfasst werden, wobei auf den einzelnen Spargelanlagen während einer Vegetationszeit mehrere Flugspitzen ermittelt wurden. Eine Unterscheidung zwischen den Anlagen ließ sich hinsichtlich des Alters und der Lage durchführen. Auf jüngeren ( $\leq 3$  Jahre) Spargelfeldern ergab sich eine Tendenz zu einem früheren Flugbeginn mit einem stärkeren Flug in den Monaten April und Mai, wohingegen auf den Altanlagen ( $\geq 4$  Jahre) noch im Juni und Juli vermehrt Adulte gefangen wurden. Die Aufnahme der Flugaktivität ermöglichte den Anbauern eine gezielte Anwendung von Insektiziden auf die Flugspitzen, um somit entbehrliche Spritzungen zu vermeiden. Mit der Erfassung des Befalls nach der Laubabreife wurde eine genauere Einschätzung des

Befalls ermöglicht und somit auch die Überprüfung der Bekämpfungsversuche. Ebenfalls wurde das Gefährdungspotenzial für die nächste Saison aufgezeigt.

In Freilandversuchen, in denen Insektizide und eine UV-reflektierende Folie gegen die Fliege eingesetzt wurden, haben alle Varianten den Befall durch *P. poeciloptera* reduzieren können. Allerdings konnten nur die UV-reflektierende Folie und das Insektizid Coragen die Anzahl der Puppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzieren. Von allen Varianten bewirkte die UV-reflektierende Folie den besten Bekämpfungserfolg. Durch die unnatürlich hohe Abstrahlung von kurzen Wellenlängen vom üblicherweise dunklen Hintergrund der Pflanzen wird offensichtlich das Verhalten der Fliege bei der Wirtswahl so gestört, dass es nicht zu einer intensiven Besiedlung und Eiablage kommt. Ein Einsatz im konventionellen Spargelanbau ist indes noch nicht möglich. Dazu müsste die Ausbringung der Folie auf dem Spargelfeld technisch verbessert werden.

Der dritte Abschnitt dieser Studie befasste sich mit der möglichen Interaktion zwischen *P. poeciloptera* und *F. proliferatum*. Von anderen Kulturen ist bekannt, dass Insekten Überträger und Verbreiter von Pilzsporen sein können, insbesondere von Fusarien. Die mehrjährige Erhebung der Besiedlungsintensität der Fliege in Relation zum *Fusarium*-Befall auf verschiedenen Spargelanlagen konnte bereits die Tendenz aufzeigen, dass mit einem erhöhten Puppenbesatz, also einer vorher hohen Larvendichte, auch die *Fusarium* spp. Infektion steigt. Unter kontrollierten Bedingungen gelang der Nachweis, dass die Verletzungen, hervorgerufen durch den Legebohrer des Weibchens, die Verbreitung und damit auch den Infektionsdruck fördern. Die Ergebnisse zeigten, dass eine *F. proliferatum* Kontaminationen an verletzten Trieben sowie mit Sporensuspension kontaminierte Weibchen der Spargelfliege eine starke Infektion im Spargeltrieb verursachten (bestimmt mittels quantitativer Real-time PCR). Durch den Larvenfraß wurde insbesondere die basipetale Verbreitung von *F. proliferatum* begünstigt. Dagegen erwies sich der Infektionsweg über die Wurzel innerhalb der vierwöchigen Versuchsdauer als weniger aggressiv. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Bekämpfung der Fliege zusätzliche Eintrittspforten für Fusarien verhindert und somit einer Ausbreitung entgegenwirken kann. Allerdings müssen im Spargelanbau auch die kulturbedingten Infektionsquellen betrachtet werden. Die während des Ernteprozesses am Stängelgrund entstehenden Schnittstellen können ebenfalls Eintrittspforten darstellen und somit zur Ausbreitung von *Fusarium* spp. in der Pflanze beitragen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule auch ohne *P. poeciloptera* über kurz oder lang während der bis zu 10-jährigen Kulturdauer auftritt. Jedoch würden Maßnahmen zur Reduzierung des Insektenbesatzes, insbesondere des Hauptschädling *P. poeciloptera*, dazu führen, dass die Verletzungen am oberirdischen Trieb verringert

werden und damit auch die Befallshäufigkeit der *Fusarium* spp. Infektionen. Für eine lange Kulturführung der Spargelanlagen ist insbesondere der Schutz der Junganlagen notwendig.

Kennwörter: *Fusarium*, *Asparagus officinalis*, Virulenz, *Plioreocepta poeciloptera*, Interaktion, Fumonisin

## Abstract

Asparagus occupies a special position among vegetable crops grown in Germany because it is grown perennially and large crop acreage is devoted to its cultivation. With cultivation periods lasting up to 10-years, soil-borne pathogens can cause rot, which results in early growth damage. The root, crown, and stem rot found worldwide in asparagus cultivation is caused by parasitic fungi of the genus *Fusarium* Link, including *F. oxysporum* Schlecht., *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg. *Fusarium* spp. infections lead to decreased numbers of stems and stems having smaller diameters. These infections also cause wilting in stems and roots, including rot in roots, rhizomes and stems. Rhizomes and stem bases may experience vascular discoloration as well as brown lesions on the roots, rhizomes and stem surfaces. Another reduction in quality is caused by the possibility of mycotoxin production. Besides fungal pathogens, many insects, in particular the asparagus fly (*Plioreocepta poeciloptera*) can cause devastating damage. Larvae eat their way basipetally through the shoots, thereby reducing assimilation efficiency, which results in crop yields being adversely affected in the subsequent year.

The first part of this study was able to show that asparagus crops in Lower Saxony exhibited varying degrees of infection caused by *Fusarium* spp. Dependent on the location and time of sampling, as well as prevailing weather conditions in 2008, a high infection rate of up to 68% was measured, whereas the shoots in 2009 showed a significantly lower infection rate of up to 38%. During fall defoliation, *Fusarium* rates rose up to an average of 95% in all the fields. The most dominant *Fusarium* species infecting asparagus stems was *F. oxysporum*, followed by *F. proliferatum*, however, the ratio shifted in favor of *F. proliferatum* during fall.

Virulence tests were conducted with young asparagus plants in the greenhouse to assess the relationship between infection rates and virulence for some *F. oxysporum* and *F. proliferatum* isolates. In comparison, root parameters (dry matter and degree of infection) were found to be more reliable than the shoot parameters. Root dry matter and the degree of root infestation were narrowly correlated ( $R^2 = 0.74$ ). All tested *F. oxysporum* and *F. proliferatum* isolates were pathogenic when compared to the control. Among the both *Fusarium* species only the *F. oxysporum* isolates displayed significant differences in virulence between each other. Of all isolates, the *F. oxysporum* isolate O-6 caused the strongest disease symptoms. Virulence of the isolates was not affected by the isolate origin (field) and sampling time, and not related the intensity of symptoms in the infected asparagus shoots serving as source for isolation. In particular, results show there

is no difference in the virulence of isolates taken from tissue showing typical symptoms of disease and isolates from asymptomatic asparagus tissue. Under optimal conditions using PDA, further differentiation between *Fusarium* species could be made by means of radial fungal growth pattern. *F. oxysporum* isolates displayed in comparison to *F. proliferatum*, faster growth at 15 °C, 20 °C and 25 °C. A significant increase in fungal growth was measured in *F. oxysporum* at 15 °C but for *F. proliferatum* at 20 °C. Significant differences among the *F. oxysporum* isolates were determined at 20 °C and above but for *F. proliferatum* at temperatures of 15 °C and higher.

All single spore isolates of *F. oxysporum* and *F. proliferatum* taken from rice cultures were capable of forming FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>. The values of *F. proliferatum* isolates were in the high range of up to 65.30 ppm (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>). The *F. oxysporum* isolates ranged from 0.89 to 17.69 ppm. By contrast, stems harvested in 2008 and 2009 showed a much lower level of contamination, with a median of 0.06 ppm and 0.16 ppm. In selected individual stems high levels of up to 281.70 ppm could be determined, however these stems originated from a field without harvest, as a result of that the *Fusarium* spp. infection could spread out in the stems.

Furthermore, the existence of *P. poeciloptera* was monitored in the same asparagus fields in Lower Saxony for three consecutive years (2007 to 2009.) Using green sticky-traps, the flight activity of the flies could be recorded from April until the end of July. In younger asparagus fields ( $\leq 3$  years), the tendency was towards earlier flight, with a peak in April and May. Whereas in older fields ( $\geq 4$  years), high numbers of adults were still being caught in June and July. Recording the period of highest flight intensity allowed growers to appoint the most convenient time point for efficient pesticide treatments. Due to long hatching periods and temperature torpidity thresholds occurring at  $< 15$  °C, spraying should be carried out in the early morning or evening when numbers are high. A more accurate evaluation of real infestation levels was obtained by counting pupa within stems after defoliation. These counts allow a more exact estimation of efficacy of control measures and evaluation of the risk potential for the next season.

In field trials where insecticides and reflective mulches (UV) were used on the fly, all variants were able to reduce infestation by *P. poeciloptera*. However, only the reflective mulches and the insecticide Coragen significantly reduced the number of pupae in comparison to the untreated control. The reflective mulches provided the most successful control of all treatments. Due to the unnaturally high emission of short wavelengths from the normally dark background of the plants, the host finding behavior of the fly is so



disrupted that intensive infestation and ovipositioning is prevented. At the moment, however, use of this technology is not yet possible in conventional asparagus cultivation due to difficulties in proper establishing the mulch film without affecting the plant development.

The third part of this study dealt with the possible interaction between *P. poeciloptera* and *Fusarium* spp. It is well known that herbivorous insects can be carriers and disseminators of fungal spores, in particular *Fusarium* spp. The multi-year survey of fly populations in relation to *Fusarium* infection rates in different asparagus fields already could show a tendency that high larval densities and *Fusarium* spp. infection rates are correlated. Under controlled conditions, it was proven that damage caused by the ovipositor of the female increased the spread of *Fusarium* spp. Results showed that damaged shoots contaminated with *F. proliferatum*, as well as asparagus fly females contaminated with spore suspensions, caused heavy infection rates in asparagus shoots (determined by quantitative real-time PCR). The damage caused by larvae benefited the basipetal spread of *F. proliferatum* in particular. In comparison, during the four-week trial period, the infection path through the roots proved to be less aggressive. Results suggest that controlling the fly prohibits additional entry routes for *Fusarium*, thus counteracting its spread. However, transmission by means of asparagus cultivation itself must also be considered. Cut surfaces on stem bases, which occur during the harvesting process can also provide entry routes, thus contributing to the spread of *Fusarium* spp. in the plant. Even without *P. poeciloptera*, it can be assumed that root, crown, and stem rot will sooner or later occur during cultivation periods lasting up to 10-years. However, measures to reduce the occurrence of insects, particularly the main pest *P. poeciloptera*, will lead to a reduction in injuries to shoots above the ground, therefore, reducing the incidence of *Fusarium* spp. infection. Protecting young fields in particular, is necessary for the long-term cultivation of asparagus crops.

Keywords: *Fusarium*, *Asparagus officinalis*, *virulens*, *Plioreocepta poeciloptera*, interaction, Fumonisin

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>2</b>
Spargel ( <i>Asparagus officinalis</i> L.).....	2
<i>Fusarium</i> spp. ....	4
Mykotoxine.....	5
Spargelfliege.....	7
Zielstellung.....	10
<b>1 <i>Fusarium</i> spp. Infektion und mögliche Fumonisin-Kontamination an Spargel ...</b>	<b>11</b>
1.1 Zusammenfassung.....	11
1.2 Einleitung .....	12
1.3 Monitoring von <i>Fusarium</i> spp. und Fumonisine .....	13
1.3.1 Material und Methoden.....	13
1.3.2 Ergebnisse.....	19
1.4 Diversität von <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> Isolaten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	25
1.4.1 Material und Methoden.....	25
1.4.1.1 Virulenz an Spargeljungpflanzen ( <i>in vivo</i> ) .....	25
1.4.1.2 Temperaturtoleranz <i>in vitro</i> .....	29
1.4.1.3 Mykotoxinbildung <i>in vitro</i> .....	30
1.4.2 Ergebnisse.....	30
1.4.2.1 Virulenz an Spargeljungpflanzen.....	30
1.4.2.2 Temperaturtoleranz <i>in vitro</i> .....	35
1.4.2.3 Mykotoxinbildung <i>in vitro</i> .....	38
1.5 Diskussion.....	39
<b>2 Populationsdynamik und Bekämpfung von <i>Plioreocepta poeciloptera</i>.....</b>	<b>47</b>
2.1 Zusammenfassung.....	47
2.2 Einleitung .....	47
2.3 Populationsverlauf der Spargelfliege.....	48
2.3.1 Material und Methoden.....	48
2.3.2 Ergebnisse.....	50

---

2.4 Bekämpfungsmöglichkeiten der Spargelfliege.....	54
2.4.1 Material und Methoden.....	54
2.4.2 Ergebnisse.....	55
2.5 Diskussion.....	57
<b>3 Interaktion zwischen Spargelfliege und <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>61</b>
3.1 Zusammenfassung.....	61
3.2 Einleitung .....	61
3.3 Interaktion unter Feldbedingungen.....	63
3.3.1 Material und Methoden.....	63
3.3.2 Ergebnisse.....	63
3.4 Interaktion unter kontrollierten Bedingungen .....	65
3.4.1 Material und Methoden.....	65
3.4.1.1 Simulierter Fliegenbefall mit <i>Fusarium proliferatum</i> Infektion .....	65
3.4.1.2 Spargelfliegenbefall und <i>Fusarium proliferatum</i> Infektion .....	67
3.4.2 Ergebnisse.....	73
3.4.2.1 Simulierter Fliegenbefall mit <i>Fusarium proliferatum</i> Infektion .....	73
3.4.2.2 Spargelfliegenbefall und <i>Fusarium proliferatum</i> Infektion .....	75
3.5 Diskussion.....	79
<b>Allgemeine Diskussion.....</b>	<b>82</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>88</b>
Spezieller nährstoffarmer Agar.....	88
<i>Fusarium</i> spp. Dauerkulturen .....	88
Wetterdaten .....	89
Mykotoxin Kontamination an den Spargelstangen von 2008 und 2009.....	92
Interaktion unter Feldbedingungen.....	96
Interaktion unter kontrollierten Bedingungen .....	97
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
d. h.	das heißt
dpi	Tage nach der Inokulation
et al.	et altera
FB	Fumonisine
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
M	Molar
mM	Milimolar
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
min	Minuten
nm	Nanometer
o.g.	oben genannte
ppm	Parts per million (Teile von einer Million)e
sek	Sekunden
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle
u. a.	und andere
u.s.w	und so weiter
U/min	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
xg	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
z. T.	zum Teil
Ø	Durchmesser

## Allgemeine Einleitung

### Spargel (*Asparagus officinalis* L.)

*A. officinalis* L. gehört innerhalb der Klasse der *Monocotyledoneae* zur Ordnung *Liliales* und der Familie der *Liliaceae*. Morphologisch zählt der Spargel zu den Wurzelsukkulenten und es handelt sich um eine zweihäusige Staude mit unterirdischen Speicherorganen (Strasburger, 1987). Das dicke und derbfleischige Rhizom ist eine waagrecht bzw. schräg (plagiotrop) wachsende Sproßachse mit extrem kurzen Internodien (Hartmann, 1989). Das Rhizom besteht aus zahlreichen Sproßgenerationen und entwickelt sich sympodial, auf der Oberseite werden Niederblätter und auf der Unterseite Speicherwurzeln ausgebildet. Von hinten her stirbt das Rhizom ab und verlängert sich von seiner Spitze aus. Spargel bildet unter der Erde aufrechte, kahle Sprosse mit spiralig stehenden chlorophyllfreien Schuppenblättern (Franke, 1997), wobei die Stärke dieser Sprosse und somit des Ernteprodukts unmittelbar von der Stärke einer Knospe abhängt, da die Organe der Monocotyledonen nicht zu einer sekundärem Dickenwachstum befähigt sind. Oberirdisch entwickeln sich aus den Achsen der Schuppenblätter die Seitensprosse mit den büschelartigen Kurztrieben (Phyllokladien). Sie sind die chlorophyllführenden Assimilationsorgane der Pflanze, die nadelförmig, stielrund gestaltet sind und einen Durchmesser von 0,5 mm und eine Länge von über 2 cm erreichen können (Hartmann, 1989). An Blütenstielen, die axillar am Grund einzelner Phyllokladien entspringen, erscheinen kleine, unscheinbare Blüten. Die männlichen Blüten besitzen sechs Staubblätter und einen unfruchtbaren Fruchtknoten und die weiblichen einen dreifächrigen Fruchtknoten mit maximal sechs Samenanlagen und sechs verkümmerten Staubblättern. Bei männlichen Pflanzen werden auch Übergänge gefunden (Andromonözisten), die sich in der unterschiedlich starken Ausbildung der Griffel und Narbe zeigen (Beeskow, 1967, Franke, 1997). Bei weiblichen fertilen Andromonözisten Blüten kann auch eine Selbstbefruchtung vorkommen. Die weibliche Blüte entwickeln sich zur erbsengroße, kugeligen Beere, die im Verlauf der Reife ziegelrot wird und 3 bis 4 mm breite, runzlige Samen enthält. Die für die Samenreifung verbrauchte Energie, lässt den Ertrag bei weiblichen Spargelpflanzen niedriger ausfallen als bei männlichen (Robb, 1984; Hughes et al., 1990). Männliche Pflanzen weisen ein längeres Wurzelsystem auf, haben eine längere Lebensdauer, akkumulieren mehr Kohlenhydrate und produzieren zahlreichere Knospen im Vergleich zu den weiblichen Pflanzen (Lazarte & Garrison, 1980; Abe & Kameya, 1986; Sinton & Wilson, 1999). Aus diesem Grund werden im Ertragsanbau hauptsächlich männliche Hybriden angebaut.

Der Spargel stellt in Deutschland die bedeutendste Gemüseart dar, mit einer Anbaufläche von 21628 ha und 22028 ha in den Jahren 2008 und 2009 und steigender Tendenz (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2009). Somit nimmt alleine der Spargelanbau ein Fünftel der gesamten Feldgemüseanbaufläche ein. 2008 wurden Ernteerträge von 50,3 Dezitonnen je Hektar erwirtschaftet. Über die Hälfte (57 %) davon wird in den drei bedeutendsten Spargelanbauländern, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und Brandenburg, erzeugt, wobei Niedersachsen mit 4956 ha die meisten Anbauflächen aufweist. In Deutschland wird überwiegend weißer Spargel angebaut, nur 4 % des Anbaus entfällt auf grünen Spargel. Spargel ist eine mehrjährige Kultur und unterscheidet sich somit deutlich von anderen Kulturen im Gemüsebau (Hartmann, 1989). Die Anbaudauer ist abhängig von der Sorte und Intensität des Anbaus und liegt zwischen sechs und zehn Jahren. Für die Pflanzung einer Neuanlage ist die gebräuchliche Methode, einjährige Kronen im Frühjahr zu pflanzen. Die Anzucht der Jungpflanzen wird in spezialisierten Betrieben durchgeführt, die im April/Mai das Saatgut auf Freilandbeeten aussähen und im darauf folgenden Februar/März die einjährigen Spargelpflanzen roden. Eine andere Methode liegt in der Verwendung von Erdpresstöpfen, in denen die Saatkörner im Gewächshaus ausgesät und nach sechs bis zwölf Wochen ins Freiland gepflanzt werden. Allgemein benötigt Spargel tiefgründige, lehmige oder humose Sandböden mit einem optimalen pH-Wert zwischen 5,8 und 6,2. Die Spargelpflanzen werden von April bis Juni in Reihen mit Abständen zwischen 1,6 bis 2,0 m und Pflanzabständen von 0,3 bis 0,45 m gepflanzt (Standardpflanzweite: 1,80 m x 0,35 m = 1,6 Pflanzen/m<sup>2</sup>). Dazu werden 30 - 40 cm tiefe Gräben ausgehoben und die Pflanzen eingepflanzt. Sobald die Triebe etwa 30 cm hoch sind, werden die Pflanzgräben eingeebnet. Die erste Ernte findet bei den einjährigen gepflanzten Kronen ab dem zweiten Jahr statt und bei den Erdpresstöpfen ab dem dritten Jahr. Allerdings wird in den ersten zwei Jahren nur 15 – 30 Tage geerntet, um eine Etablierung der Pflanzen am Endstandort zu gewährleisten, und erst ab dem dritten Erntejahr gehen die Anlagen in den Vollertrag. Für die Produktion von Bleichspargel ist es notwendig, dass die Pflanzen vor der Ernte mit Erddämmen von ca. 40 cm Höhe aufgehäufelt werden. Um die Dämme schneller zu erwärmen und somit den Austrieb der Triebe zu beschleunigen werden Schwarz-Weiß-Folien, Tunnel sowie Antitaufolie eingesetzt. Die Ernte endet mit dem 21. Juni (südliches Deutschland 24. Juni), damit sich das Rhizom nicht erschöpft und in der folgenden Zeit mit dem Auswachsen der Laubsprossen wieder Assimilate bilden können.

Die Ertragshöhe und die Qualität des Spargels bestimmen die Erlöse, die für den Anbauer das ausschlaggebende Kriterium darstellen. Für den nächstjährigen Austrieb ist die Einlagerung von Reservekohlenhydrate (RKH) in die Wurzeln von entscheidender

Bedeutung (Martin, 1989; Ernst & Krug, 1998). Ab dem Beginn der Ernte bis zum Sommer (Juni/Juli), bis die oberirdischen Pflanzenorgane aufgebaut sind, nehmen die Kohlenhydrate ständig in den unterirdischen Organen ab, da zum Austrieb der Triebe Energie in Form von freien Zuckern (Glucose, Fructose, Saccharose) vorliegen muss (Martin, 1989). Von Juli bis Oktober werden die von den Sprossen, insbesondere den Phyllokladien, gebildeten Assimilate in die unterirdischen Pflanzenteile rückverlagert. Die durch die Assimilate gewonnenen Kohlenhydrate werden in Form der Disaccharide, und zwar als Saccharose, und nach weiteren Polymerisationen als nieder- oder höhermolekulare Fruktane transportiert. Im Winter erfolgt dann eine zunehmende Mobilisierung der Fruktane zu den Monosen Glucose und Fructose. Die Speicherwurzeln speichern von allen Organen das größte Volumen der Kohlenhydrate, wodurch maßgeblich der Aufwuchs der Triebe des nächsten Jahres bestimmt wird.

### ***Fusarium* spp.**

Zu der Gattung *Fusarium* (Link) gehören saprophytisch und / oder parasitisch ubiquitär verbreitete Pilze, die weltweit aus vegetativem und reproduktivem Pflanzenmaterial verschiedener Pflanzenarten isoliert werden konnten (Wollenweber & Reinking, 1935b). Die Gattung ist ohne Organisation in künstliche Ordnungen und Familien der Gruppe mitosporischer Pilze zugeordnet (Kirk et al., 2001). Auf der Grundlage morphologischer Merkmale gemäß internationalem Code der botanischen Nomenklatur haben Wollenweber und Reinking 1935 die erste Monographie zur Differenzierung von Arten der Gattung *Fusarium* angefertigt. Herangezogen wurden Unterscheidungsmerkmale wie Typ der Konidienträger, die Gestalt, Form und Größe der Mikrokoniden und Makrokonidien, das Auftreten von Chlamydosporen und die Pigmentierung des Stromas (Nelson et al., 1981). Die Taxonomie von Wollenweber und Reiniken (1935a) teilt die Fusarien in 16 Sektionen, 65 Arten, 55 Varietäten und 22 Formen ein. Seither gab es zahlreiche andere taxonomische Systeme, die immer auf der Grundlage von Wollenweber & Reinking (1935b) geschrieben wurden (Nelson et al., 1983). Die Unterscheidung dieser Systeme liegt in der Anzahl der Arten und Varietäten, die durch die starke Variationsbreite morphologischer Merkmale durch nicht standardisierte Kulturcharakteristika vorliegen (Burnett, 1984; Nelson et al., 1983). Für einige *Fusarium*-Arten ist die Telemorphe „*Gibberella*“ nachgewiesen, z. B. *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. avenaceum* (*Gibberella avenacea*). Viele *Fusarium*-Arten zählen zu den bedeutendsten Schaderregern an Nutzpflanzen und verursachen Umfallkrankheiten, echte Welken und rufen Fäulen an Wurzel, Stängelbasis und Früchten hervor (Nelson et al., 1983). Ebenfalls kann es zu Nachernte- und Lagerschäden an landwirtschaftlichen und gärtnerischen

Produkten kommen. In der Tat sind viele Fusarien in den meisten landwirtschaftlichen Böden vertreten, so dass es selten vorkommt, dass von einer nekrotisierten Wurzel kein *Fusarium* isoliert werden kann. Das Gleiche gilt im Spargelanbau, bei dem weltweit in allen Spargelanbaugebieten *Fusarium*-Arten mit Infektionen an Wurzel, Rhizom und Spargelstange in Verbindung gebracht werden (Blok & Bollen, 1995; Elmer et al., 1997; Schreuder & Lamprecht, 1995; Goßmann et al., 2001). Abhängig von der Region wurden verschiedene *Fusarium*-Arten wie *F. oxysporum* Schlecht., *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *F. culmorum* (W. G. Schmith) Sacc., *F. redolens* Wollenw., *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. subglutinans* (Wollenw. & Reink.) P. E. Nelson, Toussoun & Marasas, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg u.a. von symptomatischem Spargelgewebe isoliert, wobei meist *F. oxysporum* Schlecht. und *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg als dominante *Fusarium*-Arten genannt werden.

### **Mykotoxine**

Der Begriff Mykotoxine bezeichnet toxische chemische Substanzen, die hauptsächlich von Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Stachybotrys* und *Myrothecium* produziert werden (Müller et al., 1979; Bennet, 1987). Bislang sind ca. 250 toxinbildende Schimmelpilzarten bekannt, die mehr als 400 verschiedene Mykotoxine produzieren können. Allerdings sind davon etwa 20 Mykotoxine von größerer Bedeutung, weil sie häufig und in höheren Konzentrationen in Nahrungsmitteln auftreten. Nach Angaben der FAO (Food and Agriculture Organization der UN) sind weltweit bis zu 25 % aller landwirtschaftlich angebauten Produkte mit Mykotoxinen belastet. Bei Mykotoxinen handelt es sich um sekundäre Stoffwechselprodukte (Metabolite) der Schimmelpilze, die während des Wachstums und der Lagerung von pflanzlichen Substraten in Abhängigkeit verschiedener äußerer Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Nährstoffangebot gebildet werden (Smith et al., 1994). Kennzeichnend sind die vielfältigen toxischen Eigenschaften, die bereits in geringen Mengen auf Mensch und Tier giftig wirken können. Ihre schädlichen Wirkungen reichen u. a. von karzinogenen, neurotoxischen, immunsuppressiven, mutagenen bis zu allergischen Reaktionen. Eine durch Mykotoxine hervorgerufene Erkrankung wird Mykotoxikose genannt (Bennett, 1987; Sugiura et al., 1999). Im Allgemeinen sind Mykotoxine chemisch sehr stabil und somit führen hohe Temperaturen, UV-Strahlung oder Sauerstoff zu keiner wesentlichen Verringerung der Konzentrationen (Scott, 1984, Eriksen & Alexander 1998).



### *Fumonisine*

Die erfolgreiche Isolierung und Aufklärung der Strukturen von Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (FB<sub>1</sub> gelang 1988 durch Gelderblom et al. in Tygerberg (Südafrika). Auslöser der Untersuchungen war eine Vieherkrankung, die sich in einer Nekrose der weißen Gehirnmasse äußerte (ELEM – equine Leukoencephalomalacia) (Bezuidenhout et al. 1988). Verschimmelter Mais wurde als indirekter Auslöser ausfindig gemacht, der mit dem Pilz *F. verticillioides* (Synonym: *F. moniliforme* Sheldon) Nirenberg kontaminiert war. Seither wurden 15 *Fusarium*-Arten in vier Sektionen als Fumonisin-Produzenten an unterschiedlichen Kulturen ausgemacht, darunter *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai*, *F. oxysporum* u. a. (Cawood et al., 1991; Thiel et al., 1991; Chelkowski & Lew, 1992; Nelson et al. 1992; Abbas et al., 1995; Seo et al., 1996; O'Donnell et al., 1998; Rheeder et al., 2002). Die bisher höchsten Fumonisin-Werte wurden von *Fusarium*-Arten der Sektion *Liseola* produziert. Unter diesen finden sich *F. verticillioides*, *F. proliferatum* und *F. nygamai*, wobei *F. verticillioides* als bedeutendster Fumonisin-Produzent gilt (Nelson et al., 1992; Thiel et al., 1991).

Fumonisine sind langkettige, methylverzweigte Aminoalkohole, deren Kohlenwasserstoff-Grundgerüst in der Regel 20 C-Atome umfasst. Ein typisches Merkmal ist die Veresterung der OH-Gruppe in Position 14 und 15 mit 1,2,3-Propantricarbonsäure (Sydenham et al., 1995). Fumonisine werden in sogenannte A-, B-, C- und P-Reihen gegliedert, wobei die B-Reihe aufgrund ihrer weiten Verbreitung die größte Bedeutung aufweist (Musser et al., 1995). Die Gefährdung durch Fumonisine beruht auf der Hemmung der Ceramidsynthese (Shingosin- und Sphingalin-*N*-Acyltransferase), einem Schlüsselenzym des Sphingolipidmetabolismus (Wang et al., 1991; Merrill et al., 1996). Die Sphingolipide sind wichtige Bestandteile bei der Zellkommunikation, beim Zellwachstum, sowie bei der Zelldifferenzierung. Es wird angenommen, dass die Inhibierung der Ceramidsynthese den Schlüsselschritt bei der Toxikogenese der Fumonisine darstellt. Über die Toxikologie der Fumonisine liegen eine Reihe von Studien und Informationen vor. In diesen wird belegt, dass durch die regelmäßige intravenöse oder orale Aufnahme von Fumonisine bei Tieren Lungenödeme, Leucoencephalie (ELEM), Leber- und Nierenschäden sowie Leberzirrhose und Leberkrebs entstehen können (Wilson et al., 1991; Harrison et al., 1990; Gelderblom et al., 1992; Colvin et al., 1993). Obwohl der Effekt auf den Menschen schwer abzuschätzen ist, deuten epidemiologische Studien aus Afrika, China und Italien auf eine Korrelation zwischen der Kornkontamination mit *F. verticillioides* und einer hohen Krebsgefährdung beim Menschen hin (Marasas et al., 1981; Sydenham et al., 1991; Rheeder et al., 1992; Chu et al., 1994; Doko & Visconti, 1994). FB<sub>1</sub> wurde 2002 von der

IARC (International Agency for Research on Cancer) als möglich kanzerogen für den Menschen eingestuft.

Am 1. März 2007 trat auf dem Gebiet der Europäischen Union die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 in Kraft, die ab dem ersten Oktober 2007 einen verbindlichen Grenzwert von 400 µg/kg FB (Summe aus FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub>) für Lebensmittel aus Mais vorschreibt.

### **Spargelfliege**

Im Spargel sind zahlreiche Insekten wie z. B. *Phyllopertha horticola*, *Agromyza simplex*, *Ophiomyia simplex*, usw. dafür bekannt, die Pflanze zu schädigen (Dingler, 1934; Otto, 2002, Tuell, 2003). Allerdings spielen diese Schädlinge nur eine untergeordnete Rolle neben den beiden Spargelkäfern (*Crioceris asparagi*, *C. duodeimpunctata*) und der Spargelfliege (*Plioreocepta* (syn. *Platyparea*) *poeciloptera* Schrank). Die zwei Käfer und die Fliege sind in der Lage, vor allem in Junganlagen verheerende Schäden zu verursachen (Dingler, 1934; Hennequin & Coutin, 1961; Crüger, 1991; Otto, 2002), wobei besonders durch das starke Auftreten von *P. poeciloptera* die Neupflanzung und Erhaltung von Junganlagen noch bis in die 50er Jahre gefährdet waren (Becker, 1950; Kotte, 1960). Die Spargelfliege gehört zur Familie der echten Frucht- oder Bohrflieden (*Tephritidae*) und wurde von Merz (1994) der Gattung *Plioreocepta* zugeordnet. Obwohl die Verbreitung dieser Familie weltweit mit dem Schwerpunkt auf den Tropen liegt (Robinson & Hooper, 1989), wird *P. poeciloptera* nur in europäischen Ländern wie Deutschland (Eckstein, 1934; Hassan, 1970; Kolata, 1980), Frankreich (Lesne, 1913; Thibout & Auger, 1999), Niederlande (Nijvelt, 1957), Belgien (Decraemer & Gillard, 1966), Schweiz (Freuler & Fischer, 1985), Spanien (Salmeron de Diego, 1973), Griechenland (Chlapoutakis, 1999), Ungarn, Tschechoslowakei und Rußland (Dingler, 1934) als Schaderreger beschrieben.

Die Spargelfliege ist durch das für Bohrflieden typische gebänderte Flügelmuster, wie es auch die Kirschfruchtfliege (*Rhagoletis cerasi*) aufweist, und einer Körperlänge von etwa 6 mm gut von anderen Schadflieden im Spargel zu unterscheiden. Die Adulten verfügen über eine Flügellänge von 5 mm, ein schwarz glänzendes Scutellum, gelbliche Halteren und rotbraune am Ende dunkler werdende Beine. Die Weibchen unterscheiden sich vom Männchen durch ein nicht einziehbares Basalglied des Ovipositor. Die Eier sind ca. 1,2 mm lang und 0,3 mm breit, die Oberfläche ist glatt und weißlich gefärbt. Das Eistadium dauert etwa zwei bis vier Tage. Die Larven sind typische beinlose Fliegenmaden, deren Oberfläche glatt ist und in der Färbung gelblichweiß. Am Vorderende befinden sich die erst braunen, später schwarzen Mundhaken (Mandibeln). Während der Entwicklung, die

drei bis vier Wochen dauert, häutet sich die Larve dreimal und erreicht eine Länge von ca. 1 cm und eine Dicke von 3 mm. Die Puppen sind hell- bis dunkelbraun, ca. 7,7 mm lang und 2,3 mm breit. Die Überwinterung erfolgt im Puppenstadium, was ca. zehn Monate andauernde und somit nur eine Generation pro Jahr ermöglicht (univoltin) (Dingler, 1934; Hendel, 1949; Merz, 1994).

Der Schlupf der Imagines aus den Puppen erfolgt ab dem Frühjahr (Mitte April) und kann sich über mehrere Monate hinziehen (Eckstein, 1934; Otto, 2002). Eine Begründung für den lang andauernden Schlupfzeitraum wurde bisher nicht gefunden. Eckstein (1934) und Kotte (1960) vermuten als Ursache die ungleichmäßige Erwärmung des Bodens. Otto (2002) sieht den Schlupfzeitpunkt in Zusammenhang mit dem Alter der Spargelanlagen und der Temperatur. Unmittelbar nach dem Schlupf verfügt das Weibchen bereits über ausgereifte Eier und eine Anzahl unreifer Eier, es wird angenommen dass insgesamt 60 - 80 Eier pro Spargelfliegenweibchen abgelegt werden können (Lesne, 1913; Dingler, 1934; Otto, 2002). Durch die bereits vorhandenen reifen Eier und die sofortige Paarung nach dem Schlupf besitzt die Spargelfliege keine Präovipositionsperiode (Otto, 2002). Unmittelbar nach der Paarung begibt sich das Weibchen auf die Suche nach geeigneten Stellen zum Einstich und zur Eiablage, dabei werden die Eier mittels Ovipositor ca. 0,75 mm tief ins Parenchym von jungen, noch nicht verholzten Spargeltrieben abgelegt (Dingler, 1934). Aber nicht nur zur Eiablage werden die Spargeltriebe angestochen, sondern auch zur Aufnahme von Pflanzensäften. Die Lebensdauer der Männchen und Weibchen beträgt im Durchschnitt 20 Tage, wobei die Nahrungsaufnahme und die Temperatur eine große Rolle spielen (Otto, 2002). Die in Faserrichtung abgelegten Eier haben eine von der temperaturabhängige Entwicklungszeit von drei bis zehn Tagen. Die aus den Eiern geschlüpften Larven fressen sich basipetal durch den Trieb und hinterlassen dabei geradlinig verlaufende Bohrgänge. Im unterirdischen Teil des Spargeltriebes, in der Nähe des Rhizoms findet die Verpuppung statt. Durch die Schädigung der Spargeltriebe wird deren Assimilationsleistung herabgesetzt und somit der Ertrag im Folgejahr negativ beeinflusst.

Bis in die 50er Jahre hinein wurde zur Bekämpfung von *P. poeciloptera* vor allem das Vernichten des Spargellaubes nach der Ernte im Herbst empfohlen (Dinkler, 1931; Straib, 1944). Heute wird das Laub gehäckselt und in den Boden eingearbeitet. Die Bekämpfung wird mit dem Ausbringen von Insektiziden (dimethoathaltige Präparate) nach der Ernte durchgeführt (Landwirtschaftskammer Hannover, 2009). Die Beachtung des Flugverhaltens von *P. poeciloptera* kann dabei zum Erfolg beitragen. Das Wärmebedürfnis der Fliege ist groß und sorgt dafür, dass sich mit Abnahme der Außentemperatur alle Lebensäußerungen verringern. Unter kühlen Bedingungen befinden

sich die Adulten starr an der Pflanze oder am Boden und reagieren somit nicht auf Bewegungen. Nach der Kältestarre ab Temperaturen  $> 15\text{ °C}$  beginnt der Flug und damit auch die Fortpflanzungstätigkeit der Fliege (Dingler, 1933). Für eine Bekämpfung der Adulten und die damit verbundene Verhinderung der Eiablage empfiehlt sich, das Insektizid während der Kältestarre früh am Morgen oder spät am Abend anzuwenden (Landwirtschaftskammer Hannover, 2009).

Eine Alternative zur chemischen Bekämpfung bildet der Einsatz von Sexualpheromonen, die durch kleinste Wirkstoffmengen starke Verhaltensreaktionen (Verwirrung) bewirken. Untersuchungen im Labor von Thibout & Auger (1999) und Thibout et al. (2005) zeigten, dass die sexuelle Aktivität von den Duftorganen der Männchen abhängig ist. Die Männchen lokalisieren die Spargeltriebe schneller als die Weibchen, und erst durch das Gemisch von Pflanzenduft und männlichen Pheromonen finden die Weibchen zur Wirtspflanze. Informationen über Freilandanalysen fehlen bisher. Parasitoide von *P. poeciloptera* wurden bislang nicht beschrieben. Auch Otto (2002) konnte während seiner umfangreichen Untersuchungen keine Nützlinge beobachten.

Eine weitere alternative Bekämpfungsmöglichkeit wird seit mehreren Jahren im Gemüsebau untersucht, die auf Verwirrung und Abschreckung der Schädlinge basiert. Viele Insektenarten nutzen zur Erkennung von Wirtspflanzen neben der Differenzierung von Formen und Kontrasten auch das Farbsehen. Über das Farbsehen von Insekten ist bekannt, dass die meisten herbivoren Insekten drei Typen von Farbsensoren in den Komplexaugen zur Verfügung haben, mit Empfindlichkeitsmaxima im grünen (530 nm), blauen (470 nm) und ultravioletten Bereich (300 - 400 nm) sensitiv sind (Gillott, 2005). UV-Licht dient der Orientierung im Raum („take-off“-Verhalten), der Navigation oder reflektiert zur Identifizierung besonders wichtiger Pflanzenteile, wie beispielsweise von Blütenblättern oder Pollen (Raviv & Antignus, 2004; Antignus, 2007). Auf der anderen Seite nutzen viele Herbivore den Kontrast zwischen Farbreflexionen von Pflanzen und dem reflektionsarmen Hintergrund (Boden) zur Lokalisierung der Wirtspflanzen. Farbige insbesondere kurzweilige Reflexionen des Bodens, wie sie durch Farbmulche (Folien) oder AL-beschichtete Folien (hoher UV-Anteil im reflektierten Licht) erreicht werden, verändern diesen Kontrast oder lösen ganz im Gegensatz dazu ein Dispersions- und kein Anflugverhalten aus. Eine hohe UV-Reflektion von der Basis des Pflanzenbestandes könnte damit die Orientierung der Insekten so stark beeinträchtigen, dass es nicht zum Kontakt zwischen Wirtspflanze und Schädlingen kommt.

## Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Befallssituation von *Fusarium* spp. und *P. poeciloptera* auf niedersächsischen Spargelanlagen über mehrere Jahre betrachtet wiederzugeben. Neben einer mehrjährigen Dokumentation der Befallssituation sollen Untersuchungen an mit *Fusarium* spp. infiziertem Erntegut die potenzielle Gefährdung durch Fumonisin-Kontaminationen beleuchten. Weiterführende Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen sollen für die häufig vorkommenden Arten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Hinweise auf eine mögliche unterschiedliche Virulenz an Spargeljungpflanzen erbringen, wobei die Frisch- und Trockenmasse als Parameter der Pflanzenschädigung und der Befallsgrad des Wurzel- und Kronenbereichs zur Quantifizierung des *Fusarium*-Befalls herangezogen und korreliert werden. Die Erfassung der Myzelwachstumsrate auf PDA soll ebenfalls zur Differenzierung der zwei *Fusarium*-Arten dienen. Um einen Überblick über das Fumonisin-Bildungspotenzial zu erhalten, werden Einsporenkulturen hergestellt und auf Reis kultiviert. Im Blickfeld der Untersuchung steht auch die mögliche Verstärkung von *Fusarium* spp. Infektionen an Spargel durch das Auftreten von *P. poeciloptera*. Unter kontrollierten Bedingungen sollen mögliche Interaktionen zwischen Pilz und Insekt aufgezeigt werden. Um erste Ansätze für die neuen Kontrollmöglichkeiten auf der Basis von Verhaltensmanipulationen zu untersuchen, die den Befall durch *P. poeciloptera* effektiv eingrenzen können, werden Feldversuche durchgeführt, in denen eine UV-reflektierende Folie und ein Insektizid vergleichend zum Einsatz kommen.

# 1 *Fusarium* spp. Infektion und mögliche Fumonisin-Kontamination an Spargel

## 1.1 Zusammenfassung

Spargelstangen von neun niedersächsischen Spargelanlagen wurden während der Erntezeit im Mai und Juni sowie im Herbst zur Laubabreife auf endophytische Besiedlung durch *Fusarium* spp. in zwei aufeinanderfolgenden Jahren untersucht. Die Befallshäufigkeit auf den Spargelfeldern war abhängig vom Ort und Zeitpunkt der Entnahme sowie von den Witterungsverhältnissen. Juni 2008 war ein hoher Infektionshäufigkeit von bis zu 68 % ermittelt worden, dagegen wiesen die Spargelstangen 2009 eine wesentlich geringe Infektion von bis zu 38 % auf. Zur Laubabreife im Herbst stieg auf allen Feldern die *Fusarium*-Infektion durchschnittlich bis auf 95 % an. Die dominanteste *Fusarium*-Arten war *F. oxysporum*, gefolgt von *F. proliferatum*, wohingegen sich das Verhältnis im Herbst zugunsten von *F. proliferatum* verschob. Unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus erwiesen sich an Spargeljungpflanzen die jeweils sechs getesteten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate als pathogen. Für die Bewertung der Krankheitsausprägung waren die Wurzelparameter (Trockenmasse und Befallsgrad) durch ihre enge Korrelation ( $R^2 = 0,74$ ) aussagekräftiger als die Triebparameter ( $R^2 = 0,41$ ). Die erfassten Parameter zeigten zwischen den beiden *Fusarium*-Arten keine eindeutige Unterscheidung in der Virulenz. Allerdings konnten Unterschiede zwischen den Isolaten innerhalb der einzelnen *Fusarium*-Arten errechnet werden. Von allen Isolaten bewirkte das *F. oxysporum* Isolat O-6 die stärkste Beeinflussung der Wirtspflanzen. Unter optimierten Verhältnissen auf PDA konnten mittels des Myzelwachstums weitere Unterscheidungen vorgenommen werden. Es zeigte sich, dass die *F. oxysporum* Isolate im Vergleich zu *F. proliferatum* ab einer Temperatur von 15 °C schneller wuchsen. Des Weiteren wurden Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Analysen mittels HPLC-MS/MS durchgeführt. Die auf Reis kultivierten Einsporenkulturen der *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate aus dem Virulenztest produzierten alle FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub>. Die Werte der *F. proliferatum* Isolate lagen im hohen Bereich bis zu 65,30 ppm und die der *F. oxysporum* Isolate variierten zwischen 0,89 bis 17,69 ppm. Die Kontamination in den Erntestangen von 2008 und 2009 lag dagegen auf einem geringen Level mit einem Median von 0,06 ppm (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) und 0,16 ppm. Einzelne Stangen

wiesen hohe Werte von bis 281,70 ppm auf, wobei diese Stangen längere Standzeiten auf dem Feld und somit längere Infektions- und Inkubationszeiten für *Fusarium* spp. zeigten.

## 1.2 Einleitung

Parasitäre Pilze der Gattung *Fusarium* Link, darunter *F. oxysporum* Schlecht., *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, werden weltweit mit der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule assoziiert (Hartung et al., 1990; Sadowski & Krawlewski, 1990; Blok & Bollen, 1995; Elmer et al., 1996; Baayen et al., 2000; Goßmann et al., 2005). *Fusarium* spp. Infektionen führen zu einer reduzierten Anzahl und zu einem geringeren Durchmesser der Stangen, verursachen Welken an Wurzeln und Stangen (Cohen & Heald, 1941) bis zur Fäule an Wurzeln, Rhizom und Stängel (Johnston et al., 1979), am Rhizom und an der Stängelbasis können vaskuläre Verfärbungen auftreten (Schreuder & Lamprecht, 1995) sowie braune Läsionen an Wurzel-, Rhizom- und Stängeloberfläche (Blok & Bollen, 1995; Schreuder & Lamprecht, 1995; Martinez Lopez, 2007). Eine weitere Qualitätseinschränkung wird durch die mögliche Mykotoxin-Produktion hervorgerufen. Die zwei Hauptverursacher der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sind beide in der Lage, verschiedene Toxine zu produzieren (Liu et al., 2007; Logrieco et al., 1998; Moretti et al., 2002; Weber et al., 2006; Seefelder et al., 2002). Beide *Fusarium*-Arten können das Mykotoxin Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> bilden, wobei von den zwei Arten der bedeutendste Fumonisin-Produzent *F. proliferatum* ist (Ross et al., 1990; Visconti & Doko, 1994). Diese relativ beständigen Toxine, die lediglich aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit auswaschbar sind, stehen im Verdacht, beim Menschen kanzerogen zu wirken und embryonale Fehlbildungen auszulösen (Rheeder et al., 2002). Untersuchungen an Erntematerial aus verschiedenen Ländern wie China (Liu et al., 2007), Mexico und Amerika (Nigh et al., 1999), Polen (Weber et al., 2006; Krawlewski et al., 2008), Italien (Logrieco et al., 1998) und Deutschland (Goßmann et al. 2001; Seefelder et al., 2002; Weber et al., 2006; Goßmann et al., 2008) eruierten unterschiedlich hohe Fumonisin-Kontaminationen an Spargelstangen, die *Fusarium* spp. Infektionen aufwiesen.

Ein 2-jähriges Monitoring sollte Aufschluss über das Auftreten von *Fusarium* spp. auf niedersächsischen Spargelfeldern geben und das Erntegut auf mögliche Mykotoxin-Kontaminationen untersuchen. Um die Pathogenität und Virulenz der im *Fusarium* spp. Komplex der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule häufig vorkommenden Arten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* zu testen, wurden verschiedene Parameter aufgenommen und versucht die *Fusarium*-Isolate zu charakterisieren und Unterschiede festzustellen. Hierfür wurde das Wachstumsverhalten auf PDA unter verschiedenen

Temperaturbedingungen gemessen sowie die an inokulierten Spargeljungpflanzen erfasste Einflussgröße Trockenmasse der unter- wie oberirdischen Pflanzenorgane und deren Symptomausprägung. Weiterhin sollte das Fumonisin-Bildungspotenzial dieser Isolate analysiert werden.

### 1.3 Monitoring von *Fusarium* spp. und Fumonisine

#### 1.3.1 Material und Methoden

##### *Spargelfelder*

Das Monitoring auf *Fusarium* spp. Infektionen erfolgte auf neun Spargelfeldern in vier niedersächsischen Spargelregionen (Tab. 1). Alle Felder, außer Feld I - ein Versuchsfeld am JKI -, waren konventionell bewirtschaftete Spargelfelder, auf denen mit der Erstellung von Dämmen Bleichspargel geerntet wurde. Während der Erntezeit wurde das Wachstum der Spargelstangen mittels Schwarz-Weiß-Folie und auf Junganlagen mit Antitaufolie beeinflusst. Der Einsatz von Insektiziden, Fungiziden und Herbiziden erfolgte nach der Ernte und diente zum Schutz der Pflanze vor pilzlichen Erregern, wie *Puccinia asparagi* oder Schädlingen wie *Plioreocepta poeciloptera* oder *Crioceris asparagi*, usw. und störendem Unkrautbewuchs.

Tab. 1: Für das Monitoring 2007 bis 2009 genutzte Spargelfelder in Niedersachsen.

Felder (Lage)	Pflanzung	Größe [ha]	Spargelsorte	Vorfrucht
A (Martfeld)	2006	3,0	Rapsody, Ramada	Roggen
B (Martfeld)	2005	2,5	Rapsody, Ramada	Roggen
C (Gifhorn)	2008	2,0	Gijnlim, Ravel	Weizen
D (Gifhorn)	2007	1,5	Gijnlim, Ravel	Kartoffeln
E (Gifhorn)	2006	3,0	Backlim, Ravel	Zuckerrüben
F (Gifhorn)	2003	2,5	Gijnlim, Thielim	Kartoffeln
G (Buchholz)	2005	12,0	Ravel	Sommerraps
H (Buchholz)	2005	7,0	Ravel	Grassamen
I (Braunschweig)	2006	1200 m <sup>2</sup>	Gijnlim	-

##### *Probeentnahme der Spargelstangen*

Zur Haupterntezeit 2008 und 2009 wurden zu zwei Terminen Spargelstangen entnommen (Tab. 2). Die erste Probeentnahme erfolgte zwischen Anfang April und Mitte Mai, ca. vier



Wochen später, im Juni, wurde die zweite Entnahme durchgeführt. Ein weiterer Termin folgte im September/Okttober zur Abreife des Spargelkrauts (2007 – 2009). Die Anzahl der entnommenen Erntestangen pro Feld betrug während der Stechperiode in der Regel zwischen 35 und 60 Stangen. Im Herbst wurde die Anzahl bis auf 15 Stangen reduziert. Die Probeentnahme erfolgte aus festgelegten Reihen, aus denen bis zu zehn Spargelstangen, die eine minimale Länge von 25 cm aufwiesen, entnommen wurden. Die Probeentnahme im Herbst 2008 umfasste neben Stangen auch Rhizom und Wurzel der Spargelpflanzen. Insgesamt wurden 1670 Spargelstangen während der Stechperiode auf *Fusarium* spp. untersucht. Weitere 574 Stangen, 82 Rhizome und 81 Wurzeln wurden im Herbst untersucht. Alle Spargelstangen wurden randomisiert vom Feld entnommen und in gekühlten Behältern ins Labor transportiert.

#### *Untersuchung auf endophytische Pilzbesiedlung*

Die Aufbereitung im Labor erfolgte innerhalb von 24 Stunden (h) nach Probenahme, dafür wurden die Spargelstangen, Rhizom und Wurzelsegmente unter fließendem Wasser sorgfältig vom Substrat gesäubert. Anschließend erfolgte eine Bonitur der Stangen auf Symptome (rötlich-braune Verfärbungen), indem die am stärksten verfärbte Stangenseite angeschaut und in die Schadensklassen (SK) 1 bis 4 eingestuft wurde (Tab. 3). Nachdem die Spargelstangen senkrecht geteilt wurden, erfolgte die Gewebeentnahme für die Untersuchung auf endophytische Pilzbesiedlung, indem randomisiert aus dem mittleren Stangenbereich (15 cm von der Spitze abwärts) sowie von Gewebe mit Läsionen (wenn vorhanden) eine ca. 2 cm lange Probe aus der Stange geschnitten wurde. Aus Rhizom und Wurzel wurden ebenfalls 2 cm lange Gewebestücke randomisiert entnommen. Anschließend folgte eine zweiminütige Oberflächendesinfektion mit 2 % Natriumhypochlorid (NaClO, Diagonal GmbH & Co KG) und zweimaliges Waschen in autoklaviertem, deionisiertem Wasser (aqua dest.). Unter sterilen Bedingungen wurden aus den 2 cm langen Pflanzenstücken zwei ca. 2 mm dünne Dreiecke herausgeschnitten und auf einen „Speziellen Nährstoffarmen Agar“ (SNA) mit Antibiotika (siehe Anhang: Spezieller Nährstoffarmer Agar) ausgelegt und bei 20 °C unter UV-Licht (Philips TLD 18w/08, 250 – 350 nm) für sieben bis zehn Tage kultiviert. Danach erfolgte die lichtmikroskopische Determinierung der Arten auf morphologischer Basis nach Gerlach und Nirenberg (1982). Das restliche Stangenmaterial wurde kurzfristig bei -20 °C gelagert.

Tab. 2: Probeentnahme und Anzahl Spargelstangen in den Jahren 2007 – 2009 für das Monitoring auf *Fusarium* spp. und Mykotoxine auf neun niedersächsischen Spargelanlagen.

Felder	Datum der Probenahme						
	2007 Oktober	2008			2009		
		Mai	Juni	Sept.	Mai	Juni	Sept.
A	10.10. (42)*	07.5. (66)	03.6. (49)	04.9. (15)	28.4. (50)	26.5. (50)	01.9. (36)
B	08.10. (41)	15.5. (50)	09.6. (50)	04.9. (15)	05.5. (50)	03.6. (50)	01.9. (27)
C	-	-	-	02.9. (15)	21.4. (50)	12.5. (50)	08.9. (45)
D	23.10. (23)	29.4. (35)	28.5. (50)	02.9. (12)	21.4. (50)	18.5. (50)	08.9. (27)
E	24.10. (42)	20.5. (50)	17.6. (50)	-	12.5. (50)	09.6. (50)	-
F	22.10. (38)	29.4. (40)	28.5. (49)	02.9. (15)	21.4. (50)	18.5. (50)	08.9. (36)
G	16.10. (29)	13.5. (53)	09.6. (50)	-	07.5. (50)	03.6. (50)	-
H	17.10 (21)	07.5. (49)	03.6. (49)	-	28.4. (50)	26.5. (50)	-
I	25.10. (60)	20.5. (30)	18.6. (50)	15.8 (15)	12.5. (50)	09.6. (50)	09.9. (20)

\* Anzahl Spargelstangen

Tab. 3: Schadensklassen (SK) der Symptombonitur an Spargelstangen.

SK	Beschreibung
1	Keine Läsionen, weiße Spargelstange
2	Leichte Läsionen, bis zu 50 % Läsionen
3	Mittlere Läsionen, zwischen 50 – 75 % Läsionen
4	Starke Läsionen, zwischen 75 – 100 % Läsionen

### Probenaufbereitung und DNA-Isolierung

Die morphologische Determinierung der Spargelstangen auf SNA berücksichtigte nur einen kleinen Teil des Stangengewebes, unterstützend wurden Spargelstangen mittels spezifischen Primern auf die zwei Hauptverursacher *F. oxysporum* und *F. proliferatum* per PCR getestet. Dabei wurden 76 Stangen, die auf SNA keinen *Fusarium*-Befall gezeigt haben, auf *F. oxysporum* und *F. proliferatum* getestet und weitere 38 mit *F. oxysporum* infizierte Spargelstangen wurden hinsichtlich *F. proliferatum* analysiert.

Die tiefgefrorenen Spargelstangen wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff bei -20 °C gefriergetrocknet (Christ Gefriertrocknung, Beta 1-6, LDC-2M) und anschließend mittels einer Schwingmühle homogenisiert (Retsch Schwingmühle MM2). Die DNA der Spargelproben wurde leicht modifiziert nach der Methode, beschrieben in Möller et al. (1992), isoliert. Dafür wurden 100 mg vom homogenisierten Spargelmaterial in ein 2 mL

Eppendorf-Gefäß abgewogen und 3 bis 6 mal mit Methanol gewaschen und für 10 min bei 16089 xg zentrifugiert, bis der Überstand farblos war. Nach der Zugabe von 500 µL TES-Puffer (siehe Lösung 1) erfolgte eine Inkubation bei 55 – 60 °C für eine Stunde. Während dieser Zeit wurden die Proben in regelmäßigen Abständen invertiert. Anschließend wurden 140 µL von einer 5 M NaCl (Natriumchlorid) zugefügt, um die Salzkonzentration auf 1,4 M einzustellen und nach Zugabe von 65 µL 10 % CTAB (Cetyl Trimethylammoniumbromid, auf 50 – 55 °C im Vorfeld erwärmt) erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min bei 65 °C. Danach wurden 700 µL Chloroform : Isoamylalkohol 24 : 1 zugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (16089 xg) bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und 225 µL 5 M NH<sub>4</sub>AC (Ammoniumacetat) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach mindestens 30 min bei -20 °C wurde die Lösung noch einmal 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und nach Zugabe von 510 µL Isopropanol zur DNA-Ausfällung mindestens 30 min auf Eis platziert. Anschließend folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 16089 xg und Raumtemperatur. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet dreimal mit 70 % EtOH (Ethanol) gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µL TE aufgenommen (siehe Lösung 2). Um die DNA möglichst rein vorliegen zu haben, erfolgte eine Reinigung mittels PEG-Lösung (siehe Lösung 3). Dafür wurde der Probe das gleiche Volumen PEG zugegeben. Die Probe wurde gemixt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13709 xg wurde der Überstand abgenommen. Durch Zugabe von 100 µL EtOH und 30 sek vortexen wurde das Pellet gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach der Trocknung wurde das Pellet wieder in 50 µL TE aufgenommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

**Lösung 1:****TES-Puffer (pH-Wert 8):**

Tris	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	2 %ig

**Lösung 2:****TE-Puffer:**

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

**Lösung 3:****PEG-Lösung (pH-Wert 8):**

Polyethylenglykol (PEG 6000)	20 %
NaCl	2,5 M

### Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe der UV-Absorption bei 260 nm (Implen, Nano-Photometer). Um eine Aussage über die Reinheit der Probe zu erhalten, wurde bei 280 nm die optische Dichte (OD) der Proteine gemessen. Eine Probe wurde nach der Isolierung als rein bezeichnet, wenn das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280} \approx 1,8$  betrug.

### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die spezifischen Primer für *F. oxysporum* und *F. proliferatum* wurde aus Mulè et al. (2004) entnommen (Tab. 4). Der PCR-Ansatz setzte sich aus 1,25 Einheiten Taq Polymerase (Fermentas, Germany), 1x PCR Puffer II, 1,5 mM  $MgCl_2$  (Magnesiumchlorid, Fermentas, Germany) und 10 pmol pro Primer zusammen. Ein  $\mu L$  genomische DNA der Proben wurde zum PCR-Ansatz zugefügt, insgesamt wurde eine Arbeitskonzentration von 25  $\mu L$  verwendet. Die PCR-Amplifikation startete mit einer Denaturierungsphase bei 94 °C für 4 min, gefolgt von einem 35-fachen Zyklus mit Denaturierung bei 95 °C für 30 sek, Annealing bei 57 °C für 30 sek und einer Elongation bei 72 °C für 1 min, beendet wurde das PCR-Programm durch 7 min Elongation bei 72 °C und eine abschließende Abkühlung auf 10 °C.

Tab. 4: Sequenz der Oligonukleotid Primer innerhalb des Calmodulin Gens.

Primer Name	Primer Sequenze	bp	<i>Fusarium spp.</i>
CLOX1 (hin)	5'-CAGCAAAGCATCAGACCACTATAACTC-3'	524	<i>F. oxysporum</i>
CLOX2 (zurück)	5'-CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT-3'		
CLPRO1 (hin)	5'-TGCATCAGACCACTCAAATCCT-3'	585	<i>F. proliferatum</i>
CLPRO2 (zurück)	5'-TGTCAGTAACTGGACGTTGGTTGTT-3'		

### Mykotoxinanalyse

Für die Fumonisin ( $B_1$  und  $B_2$ ) Analyse wurden die positiv auf *F. proliferatum* und *F. oxysporum* getesteten Spargelstangen, die bei -20 °C gelagert wurden, unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet (Christ Gefriertrocknung, Beta 1-6, LDC-2M) und anschließend fein gemahlen (Retsch Schwingmühle MM2). Von den Spargelproben wurden von jeder Spargelstange je 4 g abgewogen und mit 20 mL MeOH (Methanol)/Wasser (75 : 25, v/v) über Nacht extrahiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert für 10 min bei 4500 xg und anschließend der Überstand in ein neues 15 mL Falcon überführt. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels SAX Säulen (Varian, Inc.).

Die Säulen wurden mit 8 mL MeOH 100 % und 8 mL MeOH/Wasser (75 : 25, v/v) konditioniert, es folgte das Auftragen der Probe (10 mL), dabei betrug die Durchflussgeschwindigkeit der Probe 2 mL/min. Die Waschung der Säule wurde mit 8 mL MeOH/Wasser (75:25, v/v) und 4 mL MeOH 100 % durchgeführt. Die Elution der Proben erfolgte mit 10 mL MeOH/Essigsäure (95 : 5, v/v). Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 30 °C eingedampft. Die Proben wurden nach dem Trocknen in 500 µL MeOH/Wasser (50 : 50, v/v) aufgenommen und filtriert. Die Auftrennung der Toxine erfolgte auf einer polar modifizierten C18-Säule (Polaris-Ether, Varian GmbH, Darmstadt), dabei wurde mit einem binären Methanol-Wasser-Gradienten gearbeitet, bei dem der Methanolanteil von 20 % auf 70 % erhöht wurde. Die Detektion der Toxine erfolgte mit einer Tandem-Massenspektrometrie wie bei Adejumo et al. (2007) beschrieben. Als Standard diente fumonisinfreies Material, welches mit einer definierten Menge Fumonisinen (Certified Analytical Standards, BioPure, Tulln, Austria) versehen wurde.

Durchgeführt wurde die HPLC-MS/MS im Labor von Prof. Dr. Karlovsky, Institut für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen.

#### *Quantifizierung der Pilz DNA*

Für die Quantifizierung der *F. proliferatum* DNA wurden 100 mg vom gefriergetrockneten und fein gemahlten Spargelmaterial abgewogen und nach der CTAB-Methode extrahiert (Brandfass und Karlovsky, 2008). Die Real-time PCR (qRT-PCR) wurde am Thermocycler iCycler (Bio-Rad) mit der Sybr® Green-Methode durchgeführt (Nutz et al. 2010). Die Berechnung der DNA-Menge der unbekanntenen Proben erfolgte mittels einer Standardkurve. Dafür wurde reine *F. proliferatum* DNA verwendet, die im Vorfeld aus einem flüssigen Medium gewonnen wurde (Brandfass & Karlovsky, 2008). Der Standard wurde mit einer 10-fachen Verdünnung von 0,5 pg bis 0,5 ng mitgeführt.

Durchgeführt wurde die qRT-PCR im Labor von Prof. Dr. Karlovsky, Institut für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen.

#### *Statistische Auswertung*

Die Klimadaten der vier Spargelregionen wurden vom Deutschen Wetterdienst bezogen. Dabei handelt es sich um die Temperatur- und Niederschlagswerte 2007 – 2009 sowie die langjährigen Mittelwerte (1961 – 1990) der vier niedersächsischen Regionen.

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS (SAS Institute, 2001). Für die Analyse wurde die PROC GLM Prozedur verwendet. Nach signifikanten Unterschieden in der Varianzanalyse (ANOVA,  $P < 0,05$ ) wurden die Mittelwerte mit dem Tukey-Test

(HSD,  $P < 0,05$ ) verglichen. Für den Zusammenhang zweier Variablen wurde die lineare Regressionsanalyse PROC REG verwendet.

### 1.3.2 Ergebnisse

#### *Fusarium spp. Monitoring*

Zur Haupterntezeit 2008 und 2009 wurden zu zwei Terminen an vier Standorten in Niedersachsen Spargelstangen entnommen und auf endophytische Pilzbesiedlung, *Fusarium* spp., untersucht. Zum einen wurde die Determinierung der Fusarien durch die Isolierung von Gewebestücken auf SNA und eine anschließende Bestimmung mittels morphologischer Merkmale nach Gerlach und Nirenberg (1982) durchgeführt, zum anderen wurden insgesamt 114 Spargelstangen auf *F. oxysporum* und *F. proliferatum* mittels PCR und spezifischer Spezies Primern getestet (Tab. 4).

Die DNA-Analyse machte deutlich, dass von 76 Erntestangen, die auf SNA keine Infektion mit *Fusarium* spp. gezeigt hatten, 14 mit *F. oxysporum* und 23 mit *F. proliferatum* infiziert waren (keine Mischinfektionen). An weiteren vier Spargelstangen von insgesamt 38, die eine Infektion mit *F. oxysporum* aufwiesen, wurde *F. proliferatum* detektiert.

Die Ergebnisse beider Bestimmungstechniken für *Fusarium* spp. (morphologisch und molekular) zeigten, dass die Infektionsstärke der Spargelstangen zum Teil stark zwischen den Feldern und den Jahren variierte (Tab. 5). In der Ernteperiode 2008 konnte eine hohe Befallshäufigkeit durch *Fusarium* spp. ermittelt werden, die im Mai durchschnittlich bei 57 % lag und bis Juni auf 68 % anstieg. Die Probenahmen 2009 wiesen dagegen ein geringeres Auftreten von *Fusarium* spp. auf, durchschnittlich 35 % im Mai und 38 % im Juni. Die *Fusarium*-Infektionshäufigkeit stieg zum Herbst bis auf 95 % (2009) stark an.

Die Unterscheidung des Befalls in Spargelstange, Rhizom und Wurzel zeigte, dass die Infektionsstärke an den Stangen mit 95 % am höchsten war, sich allerdings nicht signifikant von Rhizom (79 %) und Wurzel (80 %) unterschied ( $F_{(2, 15)} = 193,83$ ,  $p = 0,1144$ ) (Abb. 2).

An den infizierten Stangen bildete *F. oxysporum* an allen vier Standorten die dominante *Fusarium*-Art, gefolgt von *F. proliferatum* (Tab. 6). So betrug die Befallshäufigkeit mit *F. oxysporum* während der Erntezeit zwischen 67,34 % und 93,79 % und mit *F. proliferatum* zwischen 12,02 % und 51,02 %. Im Herbst verstärkte sich das Auftreten von *F. proliferatum* auf allen Standorten, z. B. stieg die Befallshäufigkeit in Martfeld von 32,30 % auf 55,40 % an, dagegen nahm *F. oxysporum* von 85,71 % auf 59,71 % ab. Dieser Verlauf konnte auf allen Feldern beobachtet werden. In geringem Umfang wurden

auch *F. equiseti*, *F. sambucinum*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. redolens* und *F. solani* isoliert.

Die visuelle Bonitur der Spargelstangen zeigt, dass vom Anfang der Ernte (Mai) bis zum Herbst das Auftreten von Läsionen an den Spargelstangen stieg. 2008 wiesen im Mai durchschnittlich 68 %, im Juni 75 % und im Herbst 100 % der untersuchten Spargelstangen rötlich-braune Läsionen auf. Im Jahr 2009 lagen die durchschnittlichen Werte bei 59 % im Mai, 48 % im Juni und 100 % zur Laubabreife im Herbst. Zwischen Läsionen und den *Fusarium* spp. Infektionen an diesen Läsionen konnte eine starke Korrelation von  $R^2 = 0,85$  berechnet werden (Abb. 1). Der Zusammenhang zwischen den beiden Variablen lässt sich mit der folgenden linearen Regressionsgleichung beschreiben,  $y = -23,29 + 1,07x$  ( $N = 44$ ,  $F = 245,53$ ,  $P < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,85$ ).

Die *Fusarium* spp. Infektionshäufigkeiten in den zwei Versuchsjahren wiesen starke Unterschiede auf (Tab. 5). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Temperatur und Niederschlag für die einzelnen Regionen untersucht. Es ist festzustellen, dass sich die Versuchsjahre zum Teil beträchtlich voneinander unterschieden (Tab. 7). Im April 2008 wurden auf allen vier Standorten kühle Temperaturen um die 8 °C bis 9 °C gemessen, die sich nur geringfügig vom langjährigen Mittelwert unterschieden. Bei der Betrachtung des Temperaturverlaufes war auf allen Standorten ein kontinuierlicher Anstieg der Temperatur bis zum Ende des Monats April zu erkennen (siehe Anlage Abb. 19, 20, 21). Im Erntemonat Mai stiegen die mittleren Monatstemperaturen auf 14,65 °C bis 15,92 °C an (Tab. 7). Am Standort A und B schwankten die Temperaturen zwischen 9,5 °C und 22 °C, wobei die kühle Witterung in der Monatsmitte auftrat (siehe Anhang: Abb. 19, 20, 21). Dieser Trend war auf allen Standorten zu beobachten. Eine weitere Erwärmung brachte der Juni mit mittleren Monatswerten zwischen 17,07 °C und 18,89 °C (Tab. 7). Der Temperaturverlauf verhielt sich analog zum Monat Mai (siehe Anhang: Abb. 19, 20, 21). Im Gegensatz zu 2008 war der April 2009 ein warmer Monat mit Temperaturen zwischen 12,67 °C und 13,55 °C, mit Abweichungen zum langjährigen Mittelwert bis zu 5,65 °C. Im Gegensatz zu 2008 stieg die Temperatur während des Erntemonats Mai nur geringfügig zwischen 13,76 °C und 15,26 °C an und im Juni lagen die Werte sogar unterhalb des langjährigen Mittels. In beiden Jahren und auf allen Standorten befanden sich die Niederschlagsmengen weit unter dem langjährigen Mittelwerten (Tab. 8).

Tab. 5: *Fusarium* spp. Befallshäufigkeit [%] an den untersuchten Spargelstangen auf neun Standorten zur Haupterntezeit im Mai und Juni 2008/2009 sowie im Herbst 2007, 2008 und 2009.

Standorte	<i>Fusarium</i> spp. Befallshäufigkeit [%]						
	Herbst `07	Mai `08	Juni `08	Herbst `08	Mai `09	Juni `09	Herbst `09
A	66	60	58	98	24	38	100
B	97	70	30	89	10	16	100
C		-	-	64	10	16	80
D	50	31	58	78	32	14	92
E	61	58	78	-	38	34	-
F	86	50	63	91	40	36	100
G	84	58	86	-	56	60	-
H	67	49	82	-	42	36	-
I	88	83	88	91	60	96	100
MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup>	75 ±16	57 ±15	68 ±20	85 ±12	35 ±18	38 ±26	95 ±8

<sup>1</sup> Mittelwert über alle Standorte<sup>2</sup> Standardabweichung über alle StandorteTab. 6: Häufigkeiten der *Fusarium*-Arten isoliert von infizierten Spargelstangen während der Ernte 2008/2009 sowie im Herbst 2007, 2008, 2009, sortiert nach geographischen Regionen in Niedersachsen.

<i>Fusarium</i> spp. <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i> spp. [%]							
	Martfeld		Buchhold		Gifhorn		Braunschweig	
	Ernte (n=161) <sup>2</sup>	Herbst (n=139)	Ernte (n=223)	Herbst (n=31)	Ernte (n=258)	Herbst (n=183)	Ernte (n=147)	Herbst (n=49)
<i>F. oxysporum</i>	85,71	59,71	92,37	54,84	93,79	75,41	67,34	42,86
<i>F. proliferatum</i>	32,30	55,40	21,08	32,26	12,02	33,33	51,02	79,59
<i>F. equiseti</i>	1,86	5,04	1,79	6,45	1,94	10,38	4,08	22,49
<i>F. sambucinum</i>	0,00	0,00	0,45	0,00	1,55	2,19	8,16	4,08
<i>F. acuminatum</i>	0,00	1,44	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00
<i>F. avenaceum</i>	0,00	0,00	0,45	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
<i>F. redolens</i>	0,00	1,44	0,45	0,00	1,55	1,09	0,00	0,00
<i>F. solani</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	2,04

<sup>1</sup> Mischinfektionen möglich<sup>2</sup> Anzahl Spargelstangen mit *Fusarium* spp. infiziert



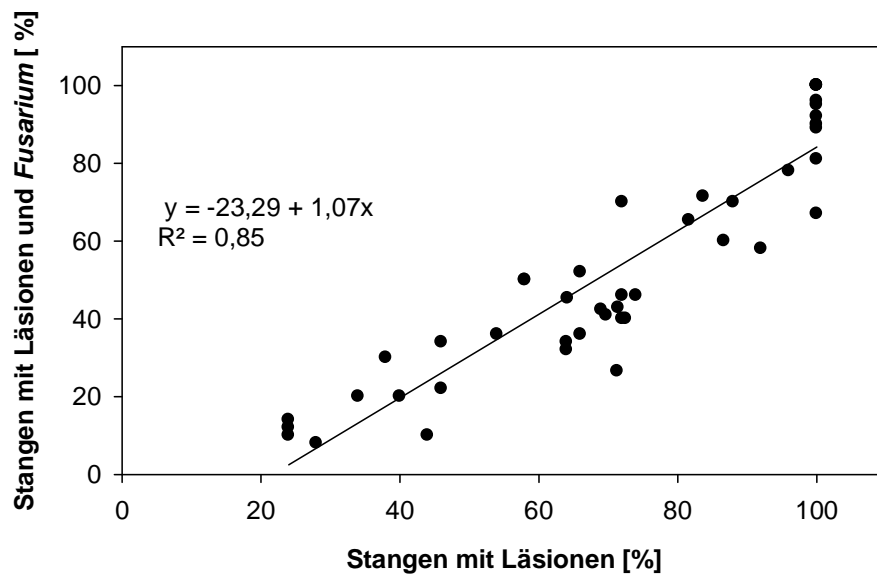


Abb. 1: Korrelation zwischen Anzahl Spargeltriebe mit Läsionen und Anzahl Spargeltriebe mit Läsionen und *Fusarium* spp. Infektionen während der Ernteperiode (Mai und Juni) und im Herbst 2008 und 2009 der neun untersuchten Spargelfelder.

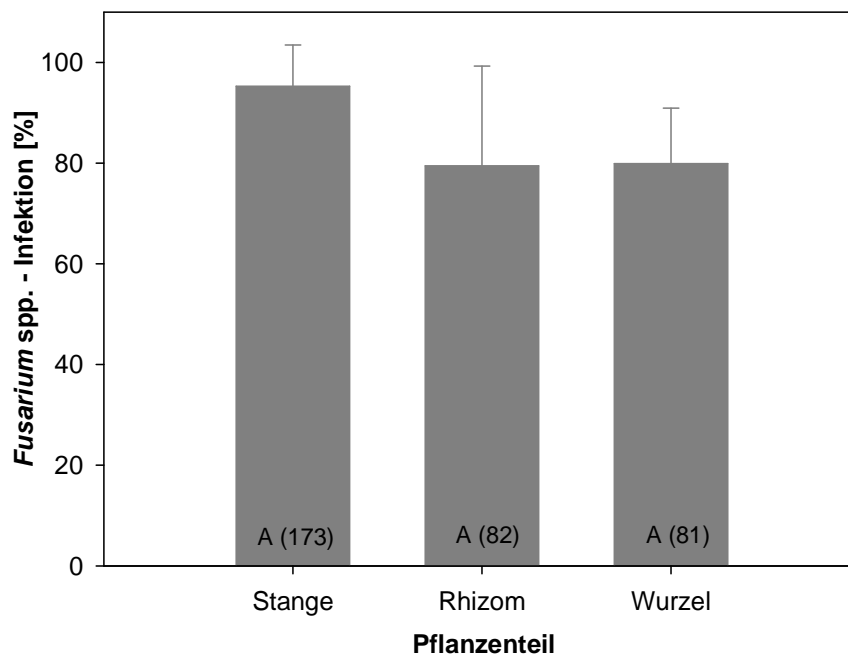


Abb. 2: *Fusarium* spp.-Infektion [%] an Spargelstangen, Rhizom und Wurzeln im Herbst 2008. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede nach ANOVA, HSD,  $P < 0,05$ , die Zahlen in den Klammern repräsentieren die Anzahl untersuchter Pflanzenteile.

Tab. 7: Mittlere Monatstemperatur [°C] im April, Mai und Juni 2008 und 2009 im Vergleich zum langjährigen Mittelwert (Abweichung in °C) auf den vier Standorten des *Fusarium* spp. Monitorings.

Standort	2008 Temperatur [°C]			2009 Temperatur [°C]		
	April	Mai	Juni	April	Mai	Juni
A / B	8,04 (+0,14)	14,65 (+1,95)	17,07 (+1,07)	12,86 (+4,96)	13,76 (+1,06)	15,09 (+0,71)
C – F	8,36 (+0,36)	14,77 (+1,87)	17,50 (+1,60)	12,67 (+4,67)	14,05 (+1,15)	15,01 (-0,89)
G / H	8,36 (+0,46)	15,29 (+2,39)	18,00 (+2,00)	12,74 (+4,84)	14,15 (+1,25)	15,27 (-0,73)
I	9,11 (+1,21)	15,92 (+3,02)	18,89 (+2,99)	13,55 (+5,65)	15,26 (+2,56)	16,23 (+0,43)

Tab. 8: Mittlere Niederschlagsmenge [mm] im April, Mai und Juni 2008 und 2009 im Vergleich zum langjährigen Mittelwert (Abweichung in %) auf den vier Standorten des *Fusarium* spp. Monitorings.

Standort	2008 Niederschlag [mm]			2009 Niederschlag [mm]		
	April	Mai	Juni	April	Mai	Juni
A / B	11,03 (74%)	2,97 (95%)	12,87 (80%)	7,00 (83%)	12,84 (78%)	20,20 (69%)
C – F	28,70 (40%)	9,10 (84%)	14,47 (80%)	6,54 (86%)	16,14 (72%)	14,75 (80%)
G / H	15,63 (68%)	8,45 (86%)	13,90 (80%)	5,70 (88%)	14,71 (76%)	12,33 (82%)
I	9,11 (81%)	15,92 (72%)	18,89 (73%)	13,55 (72%)	15,26 (73%)	16,23 (77%)

### Mykotoxinanalyse

Von den 89 untersuchten Spargelstangen aus der Ernte 2008 wiesen über die Hälfte der Stangen (59 Stangen) Fumonisine B<sub>1</sub> und/oder B<sub>2</sub> (FB) auf, mit Maximalwerten zwischen 0,065 ppm und 172,20 ppm (µg/g) (Tab. 9), wobei die hohen Fumonisin-Werte nur auf dem Versuchsfeld am JKI (Standort I, keine kommerzielle Ernte) zu finden waren. Auf den kommerziell genutzten Spargelfeldern (Standorte A bis G) lag der Höchstwert bei 0,39 ppm und der Median bei 0,06 ppm. Im Versuchsjahr 2009 war die Anzahl der mit FB<sub>1</sub> und/oder B<sub>2</sub> kontaminierten Stangen mit 36 % geringer als im Vorjahr und die Maximalwerte auf den einzelnen Feldern lagen unterhalb der Werte von 2008. Nur auf dem Feld G war das Maximum mit 30,64 ppm und der Median mit 5,62 ppm höher als 2008. Die höchsten Kontaminationen 2009 kamen wieder am Standort I vor, mit einem Maximum von 281,70 ppm und einem hohen Median von 5,45 ppm.

Um die Beziehung zwischen der FB-Menge und der Pilz Menge in der Spargelstange näher zu betrachten, wurde die *F. proliferatum* DNA aus den getrockneten Spargelstangen der Mykotoxinanalyse 2008 und 2009 quantifiziert. Die Betrachtung der Daten ergab eine schwache Korrelation von  $R^2 = 0,61$ . Der Zusammenhang zwischen den

beiden Variablen lässt sich mit der folgenden linearen Regressionsgleichung beschreiben,  $y = 1,06 + 22,75x$  (N = 55, F = 84,54, P < 0,0001, R<sup>2</sup> = 0,61) (Abb. 3).

Tab. 9: Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (FB) [ppm] in Spargelstangen zur Erntezeit 2008 und 2009, Maximalwert und Median an den jeweiligen Standorten.

Standort	FB <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> [ppm]					
	2008			2009		
	Anzahl Stangen Gesamt / mit FB	Max.	Median	Anzahl Stangen Gesamt / mit FB	Max.	Median
A	8 / 5	0,33	0,12	17 / 2	0,07	0,05
B	9 / 7	0,28	0,05	1 / 0	0	0
C	-	-	-	2 / 0	0	0
D	16 / 9	0,39	0,05	8 / 3	0,07	0,07
E	10 / 8	0,11	0,06	7 / 3	30,64	5,62
F	14 / 9	0,20	0,06	9 / 2	0,22	0,16
G	11 / 5	0,06	0,05	15 / 0	0	0
I	21 / 16	172,20	0,46	34 / 23	281,70	5,45
Alle Standort	89 / 59	172,20	0,07	93 / 33	281,70	1,56
A bis G	69 / 43	0,39	0,06	59 / 10	30,64	0,16

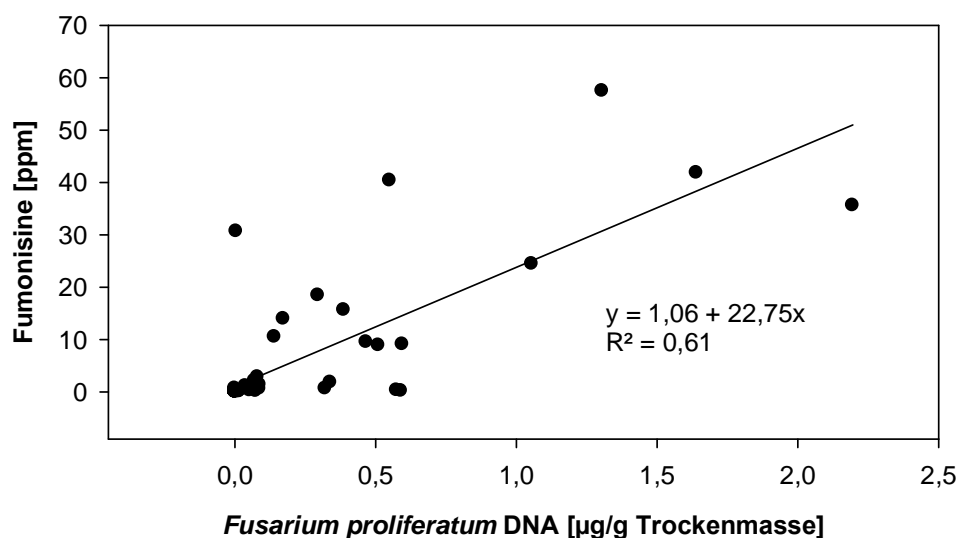


Abb. 3: Korrelation zwischen der Fumonisin-Menge [ppm] und der *Fusarium proliferatum* DNA-Menge [µg/g Trockenmasse] in Spargelstangen aus den Ernten 2008 und 2009.

## 1.4 Diversität von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolaten *in vivo* und *in vitro*

### 1.4.1 Material und Methoden

#### 1.4.1.1 Virulenz an Spargeljungpflanzen (*in vivo*)

##### *Isolate und deren Erhaltung*

Bei ersten Untersuchungen 2007 wurden einzelne Spargelstangen zur Erntezeit und im Herbst von den neun niedersächsischen Spargelflächen (Tab. 1) entnommen und auf endophytischen Pilzbesatz untersucht (siehe 1.3.1 *Untersuchung auf endophytische Pilzbesiedlung*). Zur Erlangung von Reinkulturen wurden mehrfach Sporentransfers auf SNA durchgeführt. Die Kulturen von *Fusarium* spp. wurden kurzfristig auf SNA aufbewahrt. Da die genetische Veränderung von Isolaten bei langfristiger Lagerung auf Kulturmedien bekannt ist, erfolgte die Herstellung von Erdkulturen, auf denen die Fusarien bei konstanten 4 °C gelagert wurden (siehe Anhang: *Fusarium* spp. Dauerkulturen).

Aus den *Fusarium* spp. Reinkulturen wurden sechs *F. oxysporum* und sechs *F. proliferatum* Isolate herausgesucht, die sich hinsichtlich Herkunft, Entnahmeterrain und der von ihnen hervorgerufenen Intensität von Symptomen (Läsionen) unterschieden (Tab. 10).

Tab. 10: Unterscheidungsmerkmale der *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate.

Name	<i>Fusarium</i> spp.	Pflanzenteil	Symptome*	Entnahme 2007	Feld
O-1	<i>F. oxysporum</i>	Trieb	3	Juni	A
O-2	<i>F. oxysporum</i>	Trieb	2	Juni	B
O-3	<i>F. oxysporum</i>	Trieb	3	Juni	F
O-4	<i>F. oxysporum</i>	Trieb	1	Juni	G
O-5	<i>F. oxysporum</i>	Trieb	1	Oktober	H
O-6	<i>F. oxysporum</i>	Trieb	2	Oktober	I
P-1	<i>F. proliferatum</i>	Trieb	3	Juni	A
P-2	<i>F. proliferatum</i>	Trieb	2	Juni	B
P-3	<i>F. proliferatum</i>	Trieb	4	Juni	F
P-4	<i>F. proliferatum</i>	Trieb	2	Oktober	G
P-5	<i>F. proliferatum</i>	Trieb	1	Juni	H
P-6	<i>F. proliferatum</i>	Trieb	1	Oktober	I

\*Visuelle Bonitur der Spargelstangen auf Läsionen: 1 = keine Läsionen, 2 = leichte Läsionen (bis 50 %), 3 = mittlere Läsionen (50 – 75 %), 4 = starke Läsionen (75 – 100 %)

*Molekularbiologische Überprüfung der F. oxysporum und F. proliferatum Isolate*

Die auf ihre Virulenz, Temperaturtoleranz und das Mykotoxin-Bildungspotenzial getesteten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate wurden nach der morphologischen Bestimmung mittels PCR molekularbiologisch auf ihre Artzugehörigkeit überprüft. Nach der Reaktivierung aus den Erdkulturen auf PDA erfolgte die Anzucht auf SNA zur Überprüfung der *Fusarium*-Arten auf morphologischer Basis nach Gerlach und Nirenberg (1982). Anschließend wurden die Kulturen erneut auf PDA überimpft und im Dunklen für 14 Tage bei Zimmertemperatur (22 °C) angezogen. Die Isolierung der Pilz-DNA erfolgte nach Cenis (1992). Dazu wurde das Myzel von der Agarplatte mittels eines Spatels abgenommen und unter Zugabe von hitzesterilisiertem Sand (Korngröße ca. 1 mm) zermörsert. Nach der Überführung in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß wurden 900 µL Extraktionspuffer (siehe Lösung 4) und eine Spatelspitze steriler Glasperlen (Korngröße 1 mm) zugegeben. Für den vollständigen Zellaufschluss wurde das Homogenat für zwei Stunden auf einem Kolbenschüttler bei 250 U/min und Zimmertemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße zentrifugiert (1 min bei 11519 xg) und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgten die Zugabe von 450 µL Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und vorsichtiges Mischen. Die Proben wurden für 10 min bei -20 °C platziert und anschließend nochmals für 5 min bei 11519 xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und dem Überstand wurde das gleiche Volumen Isopropanol hinzugefügt. Nach einer Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 11519 xg und Raumtemperatur. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet dreimal mit 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µL TE aufgenommen (siehe Lösung 2).

## Lösungen 4:

## Extraktionspuffer (pH-Wert 8,5):

Tris	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 %ig

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und die Durchführung der PCR mit den spezifischen Primern für die *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Arten (Tab. 4) wurde wie im Abschnitt 1.3.1 durchgeführt.

### *Pflanzenanzucht*

Spargelsamen der Sorte ‚Gijnlim‘ (Limseeds GmbH) wurden nach einer Heißwasserbeizung (55 °C / 20 min) in Quickpot-Standardplatten (Einzeltopfgröße von 38 x 38 x 75 mm) in Perlite ausgesät und bei Bedarf gewässert. Die erste Düngung (Wuxal Super flüssig 0,1 %) erfolgte ab der Entfaltung der Phyllokladien im wöchentlichen Rhythmus. Nach sechs Wochen fand das Pikieren der Spargelpflanzen in 10er Töpfen, in einem Gemisch aus gedämpfter Einheitserde (Fruhstorfer Erde Typ P) und hitze sterilisiertem Sand (100 °C, 24 h; im Verhältnis 2 : 1) statt. Es wurden nur homogene Pflanzen mit zwei entwickelten Trieben und einem gut ausgebildeten Wurzelsystem verwendet.

### *Versuchsbedingungen*

Jede Variante wurde dreimal wiederholt, mit je 15 Spargelpflanzen. Der Versuchsaufbau erfolgte randomisiert im Gewächshaus. Der Versuch fand unter Gewächshausbedingungen statt bei 22 °C Tag- und 16 °C Nachttemperatur und bei einem 16/8 h Tag-/Nacht-Rhythmus (bei 30 K lux). Die Wässerung der Versuchspflanzen erfolgte nach Bedarf und gedüngt wurde im 14-tägigen Rhythmus. Sieben Wochen nach der Inokulation wurde der Versuch beendet.

### *Inokulation*

Nach Reaktivierung der *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate aus einer Dauer-Erdkultur auf PDA, erfolgte eine Überimpfung auf SNA-Platten. Nach 14tägiger Inkubationszeit fand eine morphologische Überprüfung des Isolats mittels Mikroskop statt und anschließend wurde das Isolat in einer Schüttelkultur angezogen. Für das Flüssigmedium wurden 150 g tiefgefrorener Spargel in 500 mL destilliertem Wasser 15 min gekocht, dekantiert und mit 5 g Glucose und destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt und mit einer 5 M HCL-Lösung auf pH-Wert 5 eingestellt. Nach der Abfüllung in Erlenmeyerkolben wurden diese für 15 min bei 120 °C autoklaviert. In 200 mL Kolben wurden 100 mL Flüssigmedium abgefüllt und mit je zwei bewachsenen SNA-Agarstückchen (Ø 5 mm) belegt. Die Inkubation fand bei Zimmertemperatur (22 °C) statt, natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus und bei 115 Bewegungen pro Minute. Nach sieben bis zehn Tagen erfolgte die Auszählung der Konidien mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer. Für die Inokulation wurde eine Sporensuspension von  $8 \times 10^6$  Sporen/mL<sup>-1</sup> verwendet.

Die Inokulation der sechswöchigen Versuchspflanzen wurde durch Tauchen der Wurzeln für eine Stunde in die jeweilige Konidiensuspension ( $8 \times 10^6$  Sporen/mL<sup>-1</sup>) vollzogen. Im

Vorfeld wurde eine Hauptwurzel an der Spitze leicht verletzt, um die Infektion zu begünstigen.

#### *Symptombonitur der oberirdischen Pflanzenorgane*

In regelmäßigen Abständen (wöchentlich) wurden die Triebe aller Versuchspflanzen auf Schadsymptome bonitiert. Schadensklassen halfen den Grad der Symptome zu klassifizieren (Tab. 11). In fünf Klassen wurden die Schadsymptome erfasst, wobei ein gesunder Triebe mit SK 1 bewertet wurde und ein abgestorbener Trieb mit SK 5. Mittels eines Befallsindex wurden die Ergebnisse dargestellt (siehe Gleichung 1).

Tab. 11: Schadensklassen (SK) für die Klassifizierung der Symptome an den Trieben

SK	Beschreibung
1	Keine Symptome
2	Leichte Symptome – vereinzelte Spitzen der endständigen Phyllokladien sind vergilbt
3	Mittlere Symptome – Phyllokladien sind fast vollständig vergilbt
4	Schwere Symptome – auch der Stängel ist vergilbt
5	Nekrosen – Triebe abgestorben

Gleichung 1:

$$BG \% = \frac{\sum_{v=0}^z (n_v * v)}{(z * n)} * 100$$

BG = prozentualer Befallsgrad

$n_v$  = Anzahl der untersuchten Objekte

v = Zahlenwert der Kategorien der Boniturskala

Z =  $v_{max}$

n = Gesamtzahl der untersuchten Objekte

#### *Symptombonitur am Ende des Versuches und Rückisolierung*

Der Versuch wurde nach sieben Wochen beendet, indem die Versuchspflanzen ausgetopft und die Wurzeln unter fließendem Wasser vom Substrat gründlich gesäubert wurden. Anschließend erfolgte die Bonitur der Wurzeln auf Schadsymptome, wofür von jeder Pflanze fünf Hauptwurzeln untersucht wurden (Tab. 12). Für die Überprüfung der Infektion mit den applizierten *Fusarium*-Isolaten wurden von drei Versuchspflanzen je vier Wurzeln entnommen. Diesen wurden im Labor unter sterilen Bedingungen und nach einer Oberflächendesinfektion mit 3%igem Natriumhypochlorit (NaClO) vier Gewebestücker pro

Wurzel entnommen und auf SNA kultiviert. Bei den restlichen Spargelpflanzen wurde nach der Trennung von Trieb und Wurzel das Frischgewicht und nach einer Trocknung bei 100 °C für 48 h die Trockenmasse erfasst.

Tab. 12: Schadensklassen (SK) für die Klassifizierung der Symptome an den Wurzeln

SK	Beschreibung
0	Keine Symptome
1	25 % Nekrosen an den Wurzeln
2	50 % Nekrosen an den Wurzeln
3	75 % Nekrosen, Wurzelschläuche können auftreten
4	100 % Nekrosen, Wurzel abgestorben

### *Statistische Auswertung*

Der Parameter Trockenmasse von Wurzel und Trieb sowie Befallsgrad der Wurzeln zur Erfassung der Virulenz der verschiedenen Isolate wurden auf signifikante Unterschiede mittels der Varianzanalyse (ANOVA,  $P < 0,05$ ) getestet, bei Varianzhomogenität wurde ein Vergleich der Mittelwerte mit dem T-Test (LSD,  $P < 0,01$ ) angeschlossen. Bei vorliegender Normalverteilung und Varianzheterogenität wurden signifikante Unterschiede mittels Dunnett T3 ( $P < 0,01$ ) errechnet. Die Berechnung der Zusammenhänge erfolgte mittels linearer Regressionen (PROC REG). Soweit nicht anders angegeben, fand die statistische Auswertung mit dem SAS statt (Institute, 2001).

#### **1.4.1.2 Temperaturtoleranz *in vitro***

Die je sechs verschiedenen *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate (Tab. 10) wurden auf Unterschiede im Myzelwachstum bei 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C bei Dunkelheit untersucht. Hierfür wurde Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA; Merz GmbH) unter Zugabe von Antibiotika (auf einen Liter: 50 mg Streptomycin, 10 mg Chloretetracycline, 100 mg Penicillin G) hergestellt. Die Petrischalen wurden mit je einer Myzelscheibe von 5 mm Durchmesser einer 14 Tage alten Kultur beimpft und bei den unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Das radiale Myzelwachstum wurde das erste Mal nach 24 h und dann jeden Tag erfasst. Jedes *Fusarium*-Isolat wurde pro Temperatur sechs Mal wiederholt.



### *Statistische Auswertung*

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS (SAS Institute, 2001). Für die Analyse wurde die PROC GLM Prozedur verwendet. Nach signifikanten Unterschieden in der Varianzanalyse (ANOVA,  $P < 0,05$ ) wurden die Mittelwerte mit dem Tukey-Test (HSD,  $P < 0,05$ ) verglichen und bei inhomogenen Varianzen wurde der Mann-Whitney-U-Test ( $P < 0,05$ ) mit der PROC NPAR1WAY Prozedur verwendet. Für den Zusammenhang zweier Variablen wurde die lineare Regressionsanalyse PROC REG genutzt.

#### **1.4.1.3 Mykotoxinbildung *in vitro***

##### *Einsporenkulturen*

Die zwölf *Fusarium* spp. Isolate aus dem Virulenztest (Tab. 10) wurden zur Ermittlung ihres Mykotoxinbildungspotenzials als Einsporenkulturen vermehrt. Dafür wurden die Isolate nach der Reaktivierung aus der Erdkultur für zehn Tage auf SNA angezogen. Unter sterilen Bedingungen erfolgte das Abschwämmen der Sporen von der SNA-Kultur mittels sterilem aqua dest. Die dadurch entstandene Sporensuspension wurde bis zu einer Sporendichte von 1 – 5 Sporen/ $\mu$ L verdünnt und wieder auf SNA auspipettiert. Nach 24 h fand eine Auslese der Sporen statt, die Sporen mit Keimschlauch wurden einzeln auf eine neue SNA-Platte überimpft für 14 Tage bei Zimmertemperatur (22 °C) natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus angezogen. Die Anzucht der *Fusarium*-Einsporenkulturen erfolgte auf Reis (50 g Reis, 50 mL steriles aqua dest. in 200 mL Erlenmeyerkolben, 2x autoklaviert) für 28 Tage, unter den gleichen Bedingungen wie bei den SNA-Kulturen. Die Kolben wurden täglich einmal kräftig geschüttelt, um eine Verklumpung zu vermeiden und ein gutes Durchwachsen zu gewährleisten.

##### *Mykotoxinanalyse*

Die Analyse auf Fumonisine B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> sowie auf Moniliformin der Reiskulturen wurde auf die gleiche Art und Weise durchgeführt, wie bei den Spargelstangen aus der Ernte 2008 und 2009 (siehe 1.3.1 *Mykotoxinanalyse*).

#### **1.4.2 Ergebnisse**

##### **1.4.2.1 Virulenz an Spargeljungpflanzen**

Um Mischinfektionen auszuschließen und die morphologische Artendeterminierung zu überprüfen, wurden die *Fusarium* spp. Isolate per PCR unter Einsatz spezifischer Arten-Primer noch einmal getestet. Das Primerpaar CLOX1/CLOX2 (524 bp) amplifizierte

spezifische Produkte bei den Isolaten O-1 bis O-6 (Abb. 4, rechtes Foto). Bei den Isolaten P-1 bis P-6 erfolgte die spezifische PCR mit den CLPPRO1/CLPRO2 Primern, wobei alle Isolate ein amplifiziertes spezifisches Produkt (585 bp) aufwiesen (Abb. 5, rechtes Foto). Der für *F. oxysporum* geeignete Primer hatte mit der DNA von den *F. proliferatum* Isolaten (P-1 bis P-6) keine Amplifikate ergeben (Abb. 4, linkes Foto) und umgekehrt genauso (Abb. 5, linkes Foto).

Im Gewächshaus wurden an Spargeljungpflanzen je sechs verschiedene *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate auf ihre Virulenz getestet (Tab. 10). Nach einer siebenwöchigen Inkubationszeit wurden die Parameter Trockenmasse und Befallsgrad der Wurzeln und Triebe der Versuchspflanzen getrennt erfasst und bewertet. Die Rückisolierung der einzelnen Isolate ergab, dass die entsprechenden *Fusarium*-Isolate isoliert werden konnten und keine Mischinfektion zwischen *F. oxysporum* und *F. proliferatum* vorlag.

Die Einflussgröße Wurzel trockenmasse wies für alle getesteten *Fusarium*-Isolate signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf (Abb. 6, A und B) (*F. oxysporum*  $F_{(6)} = 6,16$ ,  $P = 0,002$ ; *F. proliferatum*  $F_{(6)} = 6,50$ ,  $P = 0,002$ ). Die Trockenmasse von den Wurzeln der Kontrolle lag bei fast 3 g, dagegen wiesen die Wurzeln der mit *F. oxysporum* inokulierten Pflanzen geringere Gewichte zwischen 0,41 g (O-6) und 1,59 g (O-5) auf, somit wurde die Wurzelmasse zwischen 86 % und 46 % reduziert (Abb. 6, A). Die *F. proliferatum* Isolate bewirkten eine ebenfalls starke Reduzierung der Wurzel trockenmasse zwischen 42 % (P-1 = 1,71 g) und 76 % (P-4 = 0,71 g) (Abb. 6, B). Obwohl die Isolate, abhängig von der *Fusarium*-Art, untereinander ersichtliche Unterschiede aufwiesen, konnte dies nur zwischen O-5 und O-6 signifikant bestätigt werden (T-Test,  $P = 0,025$ ).

Die visuelle Bonitur der Wurzel zeigte leichte Verbräunungen und Läsionen an den Kontrollwurzeln, die zu einem Befallsgrad von 4,5 % führten (Abb. 6, A und B). Die Wurzeln der mit *F. oxysporum* inokulierten Spargelpflanzen wiesen rötlich-braune, punktförmige bis langgezogene Läsionen auf, bis hin zu Wurzelschläuchen, in denen das Rindenparenchym gänzlich zersetzt war und nur die äußere Exodermis zurückblieb. Auch die Feinwurzeln wiesen bräunliche Verfärbungen auf und waren teilweise nicht mehr vorhanden. Der berechnete Befallsgrad der sechs *F. oxysporum* Isolate lag zwischen 21 % (O-4) und 33 % (O-6). Alle getesteten Isolate von *F. oxysporum* zeigten im paarweisen Vergleich mittels T-Test (LSD,  $P < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle signifikante stärkere Symptome an den Wurzeln auf. Im Vergleich untereinander bewirkte Isolat O-4 die geringsten Symptomausprägungen und O-6 die stärksten (LSD,  $P = 0,031$ ) (Abb. 6, A). Die Wurzeln der mit *F. proliferatum* inokulierten Pflanzen unterschieden sich symptomatisch kaum von den *F. oxysporum* Isolaten. Rötlich-braune, punktförmige

Läsionen an den Speicher- und Feinwurzeln wurden nach sieben Wochen detektiert. Alle *F. proliferatum* Isolate bewirkten im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant erhöhten Befallsgrad ( $F_{(6)} = 6,50$ ,  $P = 0,002$ ) (Abb. 6, B). Allerdings konnten anhand des T-Tests ( $P < 0,05$ ) keine Unterscheidungen zwischen den Isolaten errechnet werden.

Zwischen Trockenmasse und Befallsgrad der Wurzeln konnte eine enge Korrelation von  $R^2 = 0,74$  ermittelt werden. Der Zusammenhang beider Variablen lässt sich mit einem linearen Regressionsmodell nach Gleichung  $y = -9,188x + 34,697$  darstellen ( $N = 12$ ,  $F = 32,61$ ,  $P < 0,0001$ ).

Das Trockengewicht der Triebe wurde ebenfalls durch die Inokulation der verschiedenen *Fusarium*-Isolate reduziert, alle Isolate unterschieden sich signifikant von der Kontrolle (*F. oxysporum*  $F_{(6)} = 8,01$ ,  $P = 0,001$ ; *F. proliferatum*  $F_{(6)} = 3,52$ ,  $P = 0,024$ ) (Abb. 7, A und B). Die Minderung des Triebgewichtes war bei allen Isolaten von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* annähernd gleich und betrug durchschnittlich 50 % und 52 %. Deutliche Unterschiede wiesen die *F. oxysporum* Isolate untereinander auf, wobei sich nur Isolat O-6 mit einer starken Reduzierung der Triebtrockenmasse von 86 % (0,9 g) signifikant von den anderen Isolaten, außer O-3 mit einer Reduzierung von 75 % (1,7 g), unterschied (LSD,  $P < 0,01$ ) (Abb. 7, A).

Die Triebe der Kontrollpflanzen wiesen vereinzelt vergilbte Spitzen der endständigen Phyllokladien auf, diese Symptome wurden mit einem Befallsgrad von 0,4 % bewertet (Abb. 7, A und B). Beide *Fusarium*-Arten verursachten nur geringe Chlorosen am Spargelkraut, allerdings konnten insbesondere an der Triebbasis rötlich-braune, punktförmige bis längliche Läsionen beobachtet werden, welche bei *F. proliferatum* stärker ausgeprägt waren.

Die Triebe der mit *F. oxysporum* inokulierten Spargelpflanzen wiesen geringe Befallsgrade zwischen 0,6 % und 15 % auf (Abb. 7, A). Signifikant stärkere Symptome zur Kontrolle zeigte nur Isolat O-6 (Dunnett T3,  $P = 0,02$ ). Untereinander unterschied sich lediglich das Isolat O-4 mit O-6 (Dunnett T3,  $P = 0,001$ ), wobei O-4 mit einem Befallsgrad von 0,6 % fast keine Symptome an den Trieben verursachte.

Bei den sechs *F. proliferatum* Isolaten lag der Befallsgrad der Triebe zwischen 8 % und 17,73 %. Alle Isolate, außer P-4 (LSD,  $P = 0,088$ ), wiesen einen signifikant höheren Befallsgrad im Vergleich zur Kontrolle auf (LSD,  $P < 0,01$ ) (Abb. 7, B). Signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten wurden nur zwischen Isolat O-4 und O-6 ermittelt (LSD,  $P = 0,034$ ).

Die Korrelation zwischen Triebtrockenmasse und dem Befallsgrad der Triebe war mit einem  $R^2$  von 0,41 nur im schwachen Bereich vorhanden ( $y = -5,24x + 41,50$ ;  $N = 12$ ,  $F = 7,60$ ,  $P = 0,0187$ ).

Eine Beziehung zu den Unterscheidungsmerkmalen (Tab. 10) konnte nicht hergestellt werden. Die Isolate asymptomatischer Gewebe (z.B. O-4) reduzierten ebenfalls die Trockenmassen der Wurzeln und Triebe wie die symptomatischer Gewebe (z. B. P-3). Auch die Herkunft (Feld) zeigte keine Auswirkung auf die Virulenz.

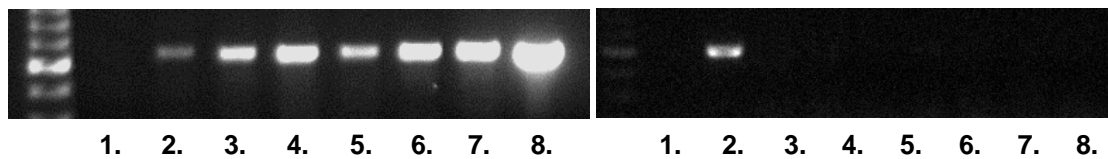


Abb. 4: Gel-Dokumentation der PCR-amplifizierten DNA-Fragmente der sechs *Fusarium proliferatum* Isolate, rechtes Gel PCR mit CLPRO1 und 2 Primer (585 bp): 100bp, 1. negativ Kontrolle (TE), 2. P-1, 3. P-2, 4. P-3, 5. P-4, 6. P-5, 7. P-6, 8. positiv Kontrolle (241); linkes Gel PCR mit CLOX1 und 2 Primer: 100 bp: 1. negativ Kontrolle (TE), 2. positiv Kontrolle (155), 3. P-1, 4. P-2, 5. P-3, 6. P-4, 7. P-5, 8. P-6.

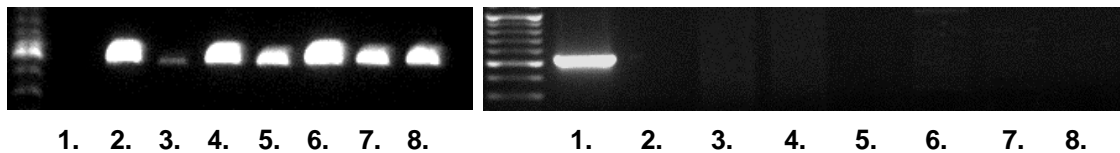


Abb. 5: Gel-Dokumentation der PCR-amplifizierten DNA-Fragmente der sechs *Fusarium oxysporum* Isolate, rechtes Gel PCR mit CLOX1 und 2 Primer (524 bp): 100bp, 1. negativ Kontrolle (TE), 2. positiv Kontrolle (155), 3. O-2, 4. O-3, 5. O-4, 6. O-5, 7. O-6, 8. O-1; linkes Gel PCR mit CLPRO1 und 2 Primer (585): 100 bp: 1. positiv Kontrolle (241), 2. negativ Kontrolle (TE), 3. O-1, 4. O-2, 5. O-3, 6. O-4, 7. O-5, 8. O-6.

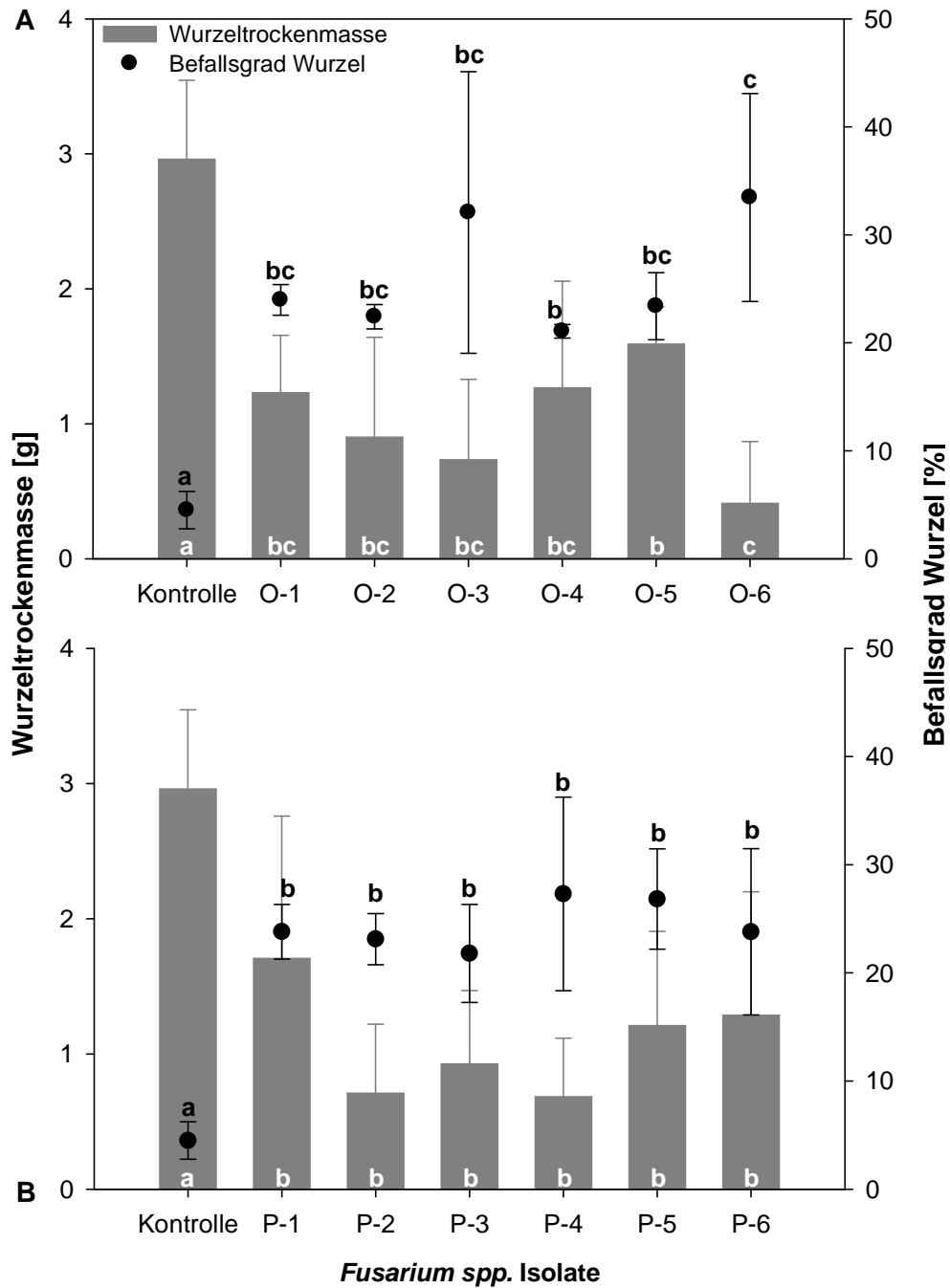


Abb. 6: Mittlere Wurzeltrockenmasse und Befallsgrad ( $\pm$  Standardabweichung) der inokulierten Spargeljungpflanzen, sieben Wochen nach Inokulation mit den jeweils sechs verschiedenen *Fusarium oxysporum* (A) und *F. proliferatum* (B) Isolaten. Unterschiedliche Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede nach T-Test,  $P < 0,01$ .

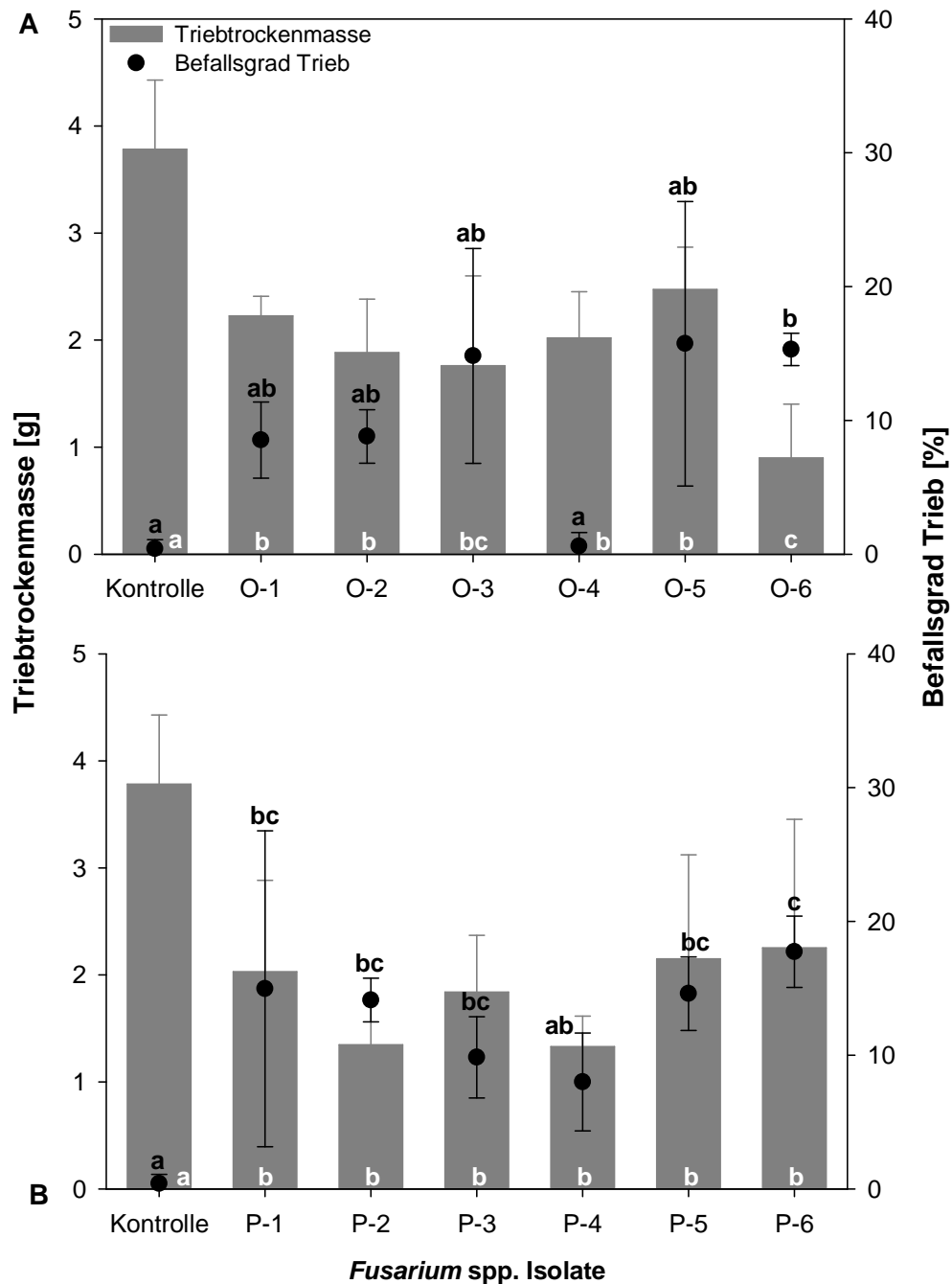


Abb. 7: Mittlere Triebtrockenmasse und Befallsgrad ( $\pm$  Standardabweichung) der inokulierten Spargeljungpflanzen, sieben Wochen nach Inokulation mit den verschiedenen *Fusarium oxysporum* (A) und *F. proliferatum* (B) Isolaten. Unterschiedliche Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede nach T-Test,  $P < 0,01$ , bei nicht homogenen Varianzen nach Dunnett T3,  $P < 0,01$ .

#### 1.4.2.2 Temperaturtoleranz *in vitro*

Eine einfache Methode zur biologischen Differenzierung von Erregern stellt die Untersuchung hinsichtlich Unterschiede in der Temperaturtoleranz dar. Getestet wurden

alle zwölf *Fusarium*-Isolate bei Temperaturen von 10 °C, 15 °C, 20 °C und 25 °C. Der Vergleich der Myzelwachstumsrate zeigte, dass die höchste Wachstumsrate nach sieben Tagen für alle Erreger bei 25 °C lag und dass bei 10 °C das Myzel nur geringfügig bis gar nicht wuchs (Abb. 8, A und B). Der Vergleich nach sieben Tagen begründete sich mit der mittleren Wachstumsgeschwindigkeit der Spargelstangen während der Erntezeit bei einer durchschnittlichen Temperatur von 15 °C (Hartmann, 1989).

Die *F. oxysporum* Isolate wiesen bei 20 °C und bei 25 °C signifikante Unterschiede untereinander auf (Tukey-Test,  $P < 0,05$ ) (Abb. 8, A). Bei einer Temperatur von 10 °C konnte nur bei zwei Isolaten, O-1 und O-2, ein geringes Wachstum ermittelt werden. Dagegen war eine deutliche Steigung der Myzelwachstumsrate der *F. oxysporum* Isolate bei 15 °C messbar. Innerhalb der *F. proliferatum* Isolate konnten signifikante Wachstumsunterschiede ab 15 °C und höheren Temperaturen ermittelt werden (HSD,  $F_{(5)} = 3,34$ ,  $P = 0,004$ ) (Abb. 8, B). Das Isolat P-6 wies von allen *F. proliferatum* Isolaten das langsamste Wachstum über alle geprüften Temperaturen auf. Signifikant davon verschieden verhielt sich P-4, dessen Wachstum bei 20 °C und 25 °C schneller erfolgte (Tukey-Test,  $P < 0,05$ ). Das Wachstumsverhalten der *F. proliferatum* Isolate nahm oberhalb von 20 °C deutlich zu.

Der Vergleich zwischen den gemittelten Myzelwachstumsraten von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* zeigte, dass *F. oxysporum* ab einer Temperatur von 15 °C ein signifikant schnelleres Wachstum aufwies (Tukey-Test,  $P < 0,05$ ) (Tab. 13). Allerdings wurde der Abstand zwischen den zwei *Fusarium*-Arten ab 20 °C auf Grund des stark ansteigenden Wachstums der *F. proliferatum* Isolate geringer.

Auch in Bezug auf die Wachstumsrate konnte keine Beziehung zu den Unterscheidungsmerkmalen (Tab. 10) hergestellt werden.

Tab. 13: Durchschnittliches Myzelwachstum [mm] ( $\pm$  Standardabweichung (SD)) der *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate nach 7 Tagen, signifikante Vergleich mittels Tukey-Test ( $P < 0,05$ ) und bei nicht normalverteilten Daten Wilcoxon-Test ( $P < 0,05$ ).

<i>Fusarium spp.</i>	Wachstums [mm] $\pm$ SD			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
<i>F. oxysporum</i>	0,75 $\pm$ 2,17	36,84 $\pm$ 2,08	58,49 $\pm$ 3,46	71,89 $\pm$ 4,13
<i>F. proliferatum</i>	6,35 $\pm$ 1,22	19,33 $\pm$ 1,52	53,97 $\pm$ 2,96	65,99 $\pm$ 2,78
Tukey-Wilcoxon*-Test P-Werte	< 0,0001*	< 0,0001	< 0,0002	< 0,0001

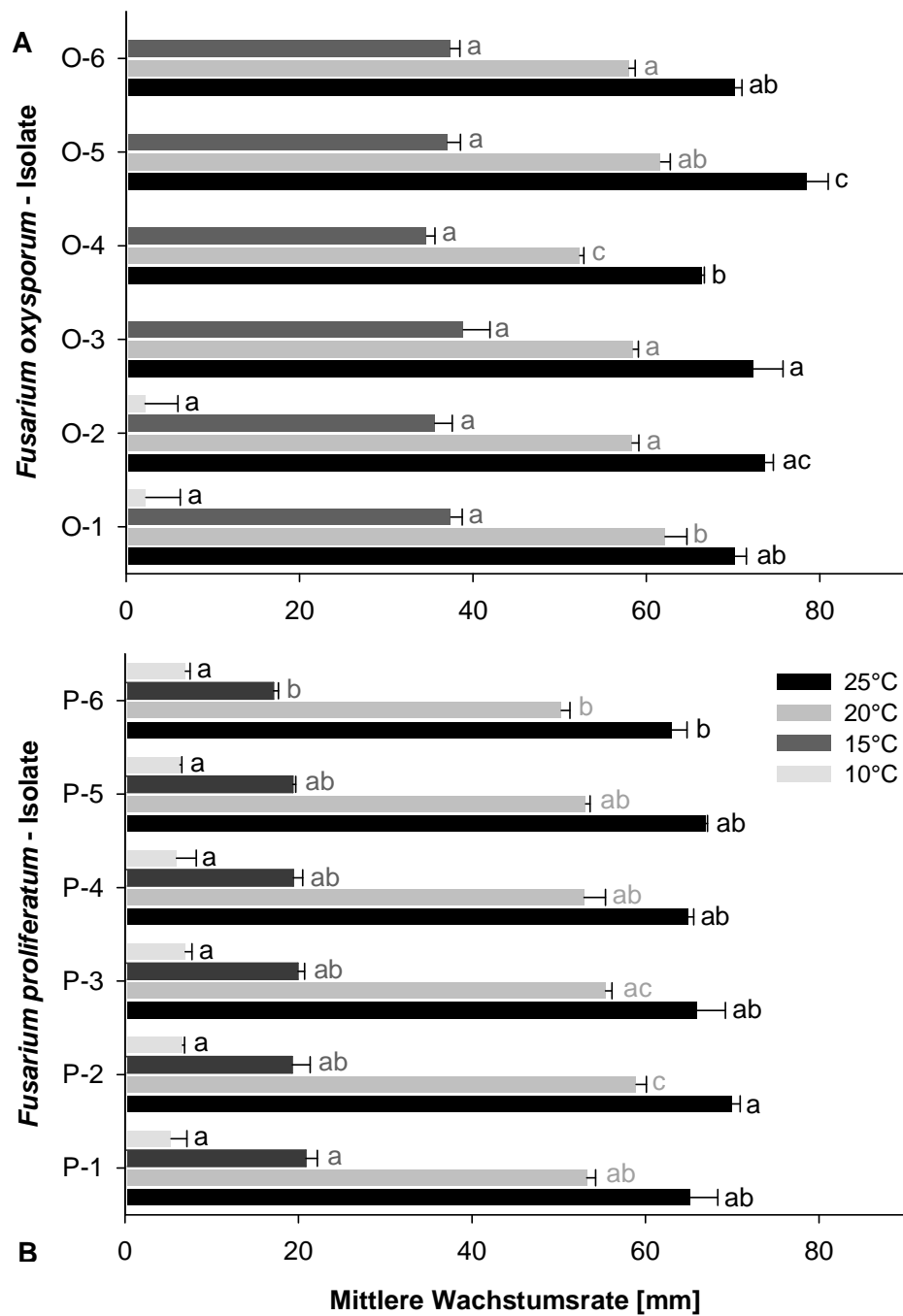


Abb. 8: Mittlere Myzelwachstumsrate in mm von *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* Isolaten bei Inkubationstemperaturen von 10 °C, 15 °C, 20 °C und 25 °C. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Temperatur unterscheiden sich signifikant nach Tukey-Test,  $P < 0,05$ .



### 1.4.2.3 Mykotoxinbildung *in vitro*

Die auf Reis vermehrten Einsporenkulturen der zwölf *Fusarium* spp. Isolate wurden mittels HPLC-MS/MS auf Fumonisine B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (FB) analysiert. Nach 28 Tagen Kulturdauer waren alle Isolate in der Lage Fumonisine zu produzieren (Tab. 14). Bei den *F. oxysporum* Isolaten variierte die Summe der FB (total) Werte zwischen 0,89 ppm und 17,69 ppm. Im Gegensatz dazu waren die Werte der *F. proliferatum* Isolate homogen und mit 57,90 ppm bis 62,80 ppm generell höher. Keine Beziehung konnte zu den Unterscheidungsmerkmalen hergestellt werden (Symptome, Entnahme und Feld). Isolate von Spargelgewebe mit Läsionen produzierten im Vergleich zu den ohne Symptomen nicht mehr FB.

Tab. 14: Fumonisin-Werte (FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub>) der *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* Einsporenkulturen mit den Unterscheidungsmerkmalen Symptome, Entnahme und Feld.

Name	<i>Fusarium</i> spp.	Fumonisin [ppm]			Symptome	Entnahme	Feld
		FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Total			
O-1	<i>F. oxysporum</i>	14.80	2.89	17.69	3	Juni	A
O-2		0.80	0.09	0.89	2	Juni	B
O-3		5.80	1.19	6.99	3	Juni	F
O-4		12.60	2.49	15.09	1	Juni	G
O-5		7.90	1.59	9.49	1	Oktober	H
O-6		0.90	0.19	1.09	2	Oktober	I
P-1	<i>F. proliferatum</i>	54.40	5.60	60.00	3	Juni	A
P-2		47.90	11.90	59.80	2	Juni	B
P-3		49.10	13.70	62.80	4	Juni	F
P-4		53.00	12.30	65.30	2	Oktober	G
P-5		46.50	11.40	57.90	1	Juni	H
P-6		49.00	10.80	59.80	1	Oktober	I

## 1.5 Diskussion

Die Untersuchungen der Spargelstangen auf *Fusarium* spp. Infektionen wurden auf niedersächsischen Spargelanlagen in zwei aufeinander folgenden Jahren durchgeführt. In dieser Zeit konnten am Erntegut immer wieder die für den Stängelbereich beschriebenen Symptome, rötlich-braune ovale Läsionen (van Bakel & Kerstens, 1970; Elmer et al., 1996), ausgemacht und mit *Fusarium* spp. in Verbindung gebracht werden ( $R^2 = 0,85$ ). Allerdings konnte auch vom asymptomatischen Gewebe *Fusarium* spp. isoliert werden. Das Ergebnis lässt sich mit anderen Felduntersuchungen vergleichen, die ebenfalls vom asymptomatischen Spargelgewebe Fusarien isoliert haben (LaMondia & Elmer, 1989; Vujanovic et al., 2006). Eine Erklärung dafür könnte in dem Auftreten von nicht pathogenen *Fusarium* spp. Isolat an Spargel liegen. Die *Fusarium*-Art *F. oxysporum* kommt weltweit in allen Bodentypen vor und wird in mehr als 120 *formae speciales* klassifiziert, wovon die meisten ein hohes Maß an Wirtspflanzenspezifität aufweisen (Armstrong & Armstrong, 1966; Olivain & Alabouvette, 1997; Fravel et al., 2003). Ebenfalls könnten Spargelsorten tolerant gegenüber *Fusarium* spp. Infektionen sein (Sadowski & Knaflewski, 1990). Jedoch traten in den vorliegenden Beobachtungen die Infektionen an Spargelgewebe ohne visuelle Krankheitssymptome unabhängig vom Standort gleichmäßig auf.

Insgesamt war der Spargel im Jahr 2008 mit einer durchschnittlichen Infektionshäufigkeit von 57 % im Mai und 67 % im Juni stärker befallen als im Jahr 2009, in dem nur 35 % und 38 % der untersuchten Spargelstangen *Fusarium* spp. aufwiesen. Die Untersuchungen von Doohan et al. (2003) an Weizen weisen darauf hin, dass Temperatur, Niederschlag und Luftfeuchte auf die Produktion und Verbreitung von *Fusarium* Krankheiten einen starken Einfluss haben. Auch für die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule an Spargel hat Elmer (2000) festgestellt, dass Spargelstangen aus wärmeren Ländern wie Mexiko und Peru eine höhere Infektionsstärke aufwiesen als aus nördlicheren Regionen wie Connecticut und Washington. Die höheren Temperaturen während der Erntezeit 2008 von durchschnittlich 15 °C im Mai und 18 °C im Juni können somit die *Fusarium* spp. Befallshäufigkeiten stärker beeinflusst haben als die niedrigeren Temperaturen 2009 von 14 °C im Mai und 15 °C im Juni (Tab. 7). Gleichermaßen können auch die Infektionsunterschiede zwischen den Erntemonaten Mai und Juni innerhalb eines Jahres erklärt werden. Der *in vitro* Test auf PDA hat gezeigt, dass die Myzelwachstumsrate bei *F. oxysporum* bereits ab 15 °C deutlich ansteigt (Abb. 8, A). Aber nicht nur die Witterungsbedingungen fördern die Ausbreitung des Pilzes in der Spargelpflanze. Leslie & Summerell (2006) fanden heraus, dass unter Stress leidende Pflanzen eine geringe

Widerstandskraft gegen *Fusarium* spp. aufweisen und so eine schnellere Verbreitung in der Pflanze mittels Myzel und Konidien erfolgt. Zum Ende der Spargelsaison sind die Kohlenhydratreserven aufgrund der ständigen Entfernung der Triebe stark reduziert, was zu einer geringeren Widerstandskraft gegen Pathogene führen kann (Shelton, 1980; Elmer, 2000). Allerdings wird die Entwicklung des Pilzes während der Ernte durch Faktoren wie schnelles Wachstum der Triebe und regelmäßige Ernte auch eingegrenzt. Das führt zu einem überwiegenden Befall an der Basis der Spargelstange (Guerrero et al. 1997; Elmer, 2000; Goßmann et al. 2005). Erst nach der Ernte, wenn die Spargeltriebe herauswachsen, um neue Reservestoffe einzulagern, werden die Transportwege im Trieb nicht mehr unterbrochen und somit können sich Krankheitserreger vaskulär bis in die Triebspitze ausbreiten. Die Herbstbonituren haben ergeben, dass die Triebe auf einigen Feldern bis zu 100 % Befall aufwiesen (Tab. 5). Die Unterscheidung zwischen Trieb, Rhizom und Wurzel zeigte, dass in den Trieben die höchste *Fusarium*-Besiedlung stattgefunden hatte (Abb. 2). Neben den vaskulären Verbreitungsmöglichkeiten in der Pflanze können auch äußere Einflüsse wie mechanische Verletzungen sowie Insektenbefall zu Triebinfektionen mit *Fusarium* spp. führen. Weidenböner (1999) und Goßmann et al. (2008) gehen davon aus, dass die Verletzungen am Trieb im unterirdischen Bereich, hervorgerufen durch den Stechvorgang während der Ernte, als Eintrittspforten für bodenbürtige Pathogene dienen und somit zur Verbreitung von Fusarien beitragen können (Weidenböner, 1999; Goßmann et al. 2008). In anderen Kulturen, wie beispielsweise bei Mais, verursachen tierische Schadinsekten durch Fraßschäden an Wurzel, Stängel und Kolben, wie Maiszünsler und Maiswurzelbohrer, eine Intensivierung des Befalls von *Fusarium* spp. (Chiang & Wilcoxson, 1961; Dowd, 1998; Gilbertson et al., 1986; Munkvold & Desjardins, 1997; Munkvold et al., 1999).

Die *Fusarium*-Arten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* werden weltweit als die Hauptverursacher der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule beschrieben (Logrieco et al., 1998; Elmer et al., 1996, Goßmann et al., 2005). Abhängig von den vorherrschenden Witterungsbedingungen wird in wärmeren Regionen mit sommerlichen Temperaturen zwischen 30 °C bis 40 °C, wie z. B. in Italien, Mexiko, Australien *F. proliferatum* (synonym *F. moniliforme*) aus der Sektion Liseola als dominante Spezies an Spargel beschrieben (Blok & Bollen, 1995; Elmer et al., 1997; Logrieco et al., 2003; Nigh et al., 1999), während in kälteren klimatischen Regionen (Temperaturen im Sommer von 20 °C bis 30 °C) *F. oxysporum* als Hauptverursacher auftritt, wie auch in unseren Untersuchungen bestätigt wurde (Elmer et al., 1996; Goßman et al., 2008; Nigh et al., 1999; Wong & Jeffries, 2006). Als zweithäufigste *Fusarium*-Art wurde *F. proliferatum* auf niedersächsischen Spargelfeldern identifiziert. Eine Veränderung in der Gewichtung der

*Fusarium*-Arten wurde im Herbst festgestellt. Zur Laubabreife hatten sich Infektionen mit *F. proliferatum* potenziert, welche im Einzelfall (Feld I 79,59 %) sogar häufiger als *F. oxysporum* isoliert werden konnte (Tab. 6). Unter *in vitro* Bedingungen auf PDA wurde bei verschiedenen *F. proliferatum* Isolaten ab 15 °C ein leichter Anstieg des Myzelwachstums ermittelt, dass sich ab 20 °C deutlich steigerte (Abb. 8, B). In Niedersachsen vorherrschende Durchschnittstagestemperaturen von 17 °C in den Sommermonaten Juli und August (Deutscher Wetterdienst) können somit die Ausbreitung von *F. proliferatum* gefördert haben. Ooka & Kommodahl (1977) stellten fest, dass asexuell gebildete Mikro- und Makrokonidien von *F. proliferatum* durch Regen und Wind im Pflanzenbestand und über diesen hinaus verbreitet werden. Untersuchungen im Maisanbau zeigten, dass sich in der Ackerkrume hohe Inokulumquellen durch die mit *Fusarium*-Arten aus der Sektion Liseola infizierten Ernterückstände befinden (Cotten & Munkvold, 1998). *Fusarium*-Arten sind befähigt, saprophytisch über mehrere Vegetationsperioden in der Ackerkrume auf Pflanzenresten zu überdauern (Cotten & Munkvold, 1998; Rossi et al., 2009). Im Spargelanbau wurde *F. proliferatum* vermehrt von Trieben, Blüten und Früchten isoliert, indessen wird *F. oxysporum* hauptsächlich mit der Wurzel assoziiert (Baayen et al., 2000; Elmer et al., 1996; Gilbertson & Manning, 1983). Die Einarbeitung des Spargelkrauts nach der Laubernte im Herbst könnte ebenfalls zu einer primären Infektionsquelle für die Ausbreitung von *Fusarium* spp. im Spargelbestand beitragen, wobei die Ausbreitung und die Infektion spezifischer *Fusarium*-Arten im Folgejahr stark von abiotischen und biotischen Faktoren beeinflusst werden (siehe *Fusarium* spp. Befallshäufigkeiten 2008 und 2009). Inwieweit das eingearbeitete Spargelkraut zur Intensivierung des *Fusarium*-Befalls beiträgt, muss noch festgestellt werden. Ebenfalls sollte in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden, welche Auswirkung steigende Temperaturen im Spargelanbau in Deutschland während der Erntemonate auf die *Fusarium*-Arten und deren Befallshäufigkeit haben.

Eine weitere Gefährdung geht vom Mykotoxin-Bildungspotenzial der beiden Hauptverursacher *F. oxysporum* und *F. proliferatum* aus. *F. proliferatum* aus der Sektion Liseola gilt neben *F. verticillioides* als Hauptproduzent von Fumonisine (FB) (Nelson et al., 1992). Bisher wurde Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) nach einer natürlichen *F. proliferatum* Infektion primär in Mais analysiert (Thiel et al., 1991; Marasas et al., 2000; Logrieco et al., 1995), aber auch in Reis (Abbas et al., 1999) und in Spargel (Logrieco et al., 1998; Seefelder, 2002; Lui et al., 2007) konnte FB<sub>1</sub> bereits nachgewiesen werden. Obwohl *F. oxysporum* hauptsächlich als Moniliformin-Produzent gilt (Logrieco et al., 2003), ergaben Untersuchungen von Mais Isolaten (Seo & Lee, 1996; Rheeder et al., 2002) und Spargel Isolaten (Martinez Lopez, 2007; Waskiewicz et al., 2010), dass *F. oxysporum* ebenfalls in

der Lage ist, Fumonisine mit einer großen Variabilität zu bilden. Unter *in vitro* Bedingungen produzierten die *F. oxysporum* Isolate z. T. sehr variable  $FB_1$ ,  $FB_2$  Werte sowie Fumonisine aus der C-Gruppe. Vergleichbare Ergebnisse brachten die  $FB_1$ ,  $FB_2$  Analysen der sechs *F. oxysporum* Isolate, isoliert von Spargeltrieben (Tab. 14). Alle sechs Isolate waren in der Lage  $FB_1$  und  $FB_2$  bei Temperaturen von 22 °C und einer Inokulationszeit von 28 Tagen zu produzieren, wobei die Werte im Bereich von 0,89 ppm und 17,69 ppm FB (total) stark variierten. Im Vergleich dazu wiesen die sechs *F. proliferatum* Isolate mit Werten zwischen 57,90 ppm und 65,30 ppm eine um ein Vielfaches höhere und einheitlichere Produktion auf. Die Erntestangen von 2008 und 2009 zeigten im Vergleich zu den *in vitro* Kulturen auf Reis angezogen wesentlich geringe FB-Werte (Tab. 9). Der Höchstwert 2008 von 0,334 ppm FB (total) befand sich im Bereich der Unbedenklichkeit und auch 2009 konnte nur an einer Erntestange ein hoher und damit bedenklicher Wert von 30,63 ppm gemessen werden. Eine Einschätzung der Werte ist lediglich auf der Grundlage der Grenzwerte für Mais möglich, wobei in unverarbeitetem Mais das Maximum bei 4 ppm ( $FB_1 + FB_2$ ) liegt (European Community, 2009). Nur die Stangen vom Feld I, auf dem keine Ernte stattfand, wiesen bedenklich hohe FB (total) Werte bis zu 281,70 ppm auf. Durch die fehlende Ernte war die vaskuläre Ausbreitung von *Fusarium* spp. im Trieb von Beginn der Vegetationszeit an möglich. Dies führte im Vergleich zu den acht anderen Spargelanlagen zu sehr hohen *Fusarium* spp. Befallshäufigkeiten, die im Mai schon bis zu 83 % (2008) betragen (Tab. 5). Die erhöhte Pilzbiomasse könnte zu den höheren Mykotoxinwerten geführt haben. Seefelder et al. (2002) analysierten in Spargelstangen, die im Juli nach der Ernte entnommen wurden, ebenfalls erhöhte  $FB_1$  Werte bis zu 4,513 ppm. Betrachtet man die Beziehung zwischen der *F. proliferatum* DNA und der Fumonisinmenge in den Spargelstangen der Ernten 2008 und 2009, konnte lediglich eine mittlere Relation von  $R^2 = 0,60$  ausgemacht werden (Abb. 3). *In vitro* Untersuchungen von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate, zeigten das die Temperatur einen starken Einfluss auf die Pilzbiomasse und die Produktion von FB hat (Marin et al., 1999; Waskiewicz et al. 2010). Die von Mais isolierten *F. proliferatum* Isolate produzierten mit ansteigender Temperatur geringere Mengen FB (Marin et al., 1999). Bei einer Temperatur von 15 °C wurde die höchste FB Menge von 17628 mg/kg (ppm) gemessen. Im Gegensatz dazu lagen die FB-Werte bei 30 °C nur bei 73,67 ppm. Ferner konnte bereits bei einer Temperatur von 10 °C die Produktion von FB belegt werden. *In vitro* auf Reis angezogene *F. proliferatum* und *F. oxysporum* Isolate isoliert von Spargelpflanzen aus Polen wiesen ebenfalls bei der niedrigsten Temperatur von 18 °C, im Vergleich zu 25 °C und 32 °C, die höchsten FB-Werte auf (Waskiewicz et al. 2010). Die Witterungsbedingungen beeinflussen insofern nicht nur die Ausbreitung von

*Fusarium* spp., sondern auch die Produktion von FB. Allerdings nimmt das Pilzwachstum (Myzel, Konidien) mit ansteigenden Temperaturen zu (Tab. 13), wohingegen die Produktion von FB bei höheren Temperaturen abnimmt. Inwieweit sich Temperatur und Inkubationsdauer auf die Produktion von FB in Spargelstangen auf dem Feld auswirken, muss noch festgestellt werden, wobei für niedersächsische Spargelanlagen insbesondere die Bedingungen für die Mykotoxin-Produktion bei *F. oxysporum* von Bedeutung sind. Generell kann die hohe Produktion von FB bei niedrigen Temperaturen eine Gefahr in infizierten Spargelstangen darstellen, da die durchschnittlichen Temperaturen während der Erntezeit in Niedersachsen zwischen 13 °C und 16 °C liegen (Deutscher Wetterdienst). Ebenfalls kann es auch zu Kontaminationen mit anderen Mykotoxinen wie z. B. Beauvericin, Moniliformin oder Fusarin kommen (Shephard et al., 1990; Logrieco et al., 2003; Waskiewicz et al., 2010).

Zur biologischen Differenzierung der zwei Hauptverursacher der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule wurden mehrere Isolate von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* auf ihre Pathogenität und Virulenz untersucht (Tab. 10). Die Isolate wurden im Vorfeld von Spargelstangen unterschiedlicher Herkunft isoliert und mittels morphologischer Artendeterminierung nach der Monographie von Gerlach und Nirenberg (1982) und mittels molekularbiologischer PCR unter Einsatz spezifischer *Fusarium*-Arten Primer (Mulè et al., 2004) bestimmt.

Für die Topfversuche wurde die häufig angebaute männliche F1-Hybrid-Sorte ‚Gijnlim‘ verwendet, die sich durch Frühzeitigkeit, hohes Ertragspotenzial und gute Eignung für den Anbau unter Folie in gemäßigttem Klima auszeichnet. Die Verwendung dieser Sorte begründete sich mit der Tatsache, dass auf niedersächsischen Spargelanlagen ‚Gijnlim‘ häufig anzutreffen ist, wie auch auf den Spargelfeldern des *Fusarium* spp. Monitorings (Tab. 1). Um die Pathogenität und Virulenz der einzelnen *Fusarium*-Isolate zu testen, wurden Topfversuche im Gewächshaus an Spargeljungpflanzen durchgeführt. Sieben Wochen nach der Tauchinokulation der Wurzeln erfolgte die visuelle Bonitur auf Symptome an Wurzel und Trieb, dabei wurde auf die in der Literatur beschriebenen Symptome geachtet. *F. oxysporum* verursacht an Spargelwurzeln rötlich-braune Läsionen, die strichförmig und oft in Längsrichtung auf den Hauptwurzeln und Feinwurzeln zu finden sind. Weiterhin führt der Befall mit *F. oxysporum* dazu, dass es zu hohlen Wurzelschläuchen kommt, in denen das Rindenparenchym gänzlich zersetzt ist und nur die äußere Exodermis zurückbleibt (Cohen & Heald, 1941; Crüger, 1991; Elmer et al., 1996; Martinez Lopez, 2007). Auch für Infektionen mit *F. proliferatum* werden Läsionen an Speicher- und Feinwurzeln sowie größere Fäulen im Wurzelbereich beschrieben (Gilbertson & Manning, 1983). Daneben liegen weitere Beschreibungen von Endo &

Burkholder (1971) über Anzeichen für Trockenfäule im Wurzelbereich vor. Mit Ausnahme der größeren Wurzelfäulen wurden die charakteristischen Merkmale an den Spargelpflanzen beobachtet und in Schadensklassen eingeordnet (Tab. 11, Tab. 12). Mittels des aus den Schadensklassen errechneten Befallsgrads konnte festgestellt werden, dass alle Isolate eine krankheitsauslösende Wirkung im Wurzelbereich der Spargelpflanzen aufwiesen. Während sich die *F. proliferatum* Isolate nicht signifikant unterschieden, zeigte bei *F. oxysporum* das Isolat O-6 die stärkste Symptombildung an den Wurzeln. Als Folge der Schädigung an den Wurzeln werden chlorotische Aufhellungen an den Trieben und Welkeerscheinungen bis hin zum Absterben der ganzen Triebe beschrieben (Hartung et al., 1990; Blok & Bollen, 1995; Schreuder & Lamprecht, 1995; Elmer et al., 1996). Die Versuchspflanzen wiesen nur schwache Chlorosen an den Trieben auf. Dennoch können diese Aufhellungen auf eine beginnende vaskuläre Verbreitung des Pathogens hinweisen sowie auch auf die Zerstörung des Wurzelapparats, wodurch die Wasseraufnahme und die Transportwege in der Spargelpflanze gehemmt werden (Domsch & Gams, 1970). Die geringen Symptome an den Spargeltrieben führten dazu, dass von den *F. oxysporum* Isolaten nur O-6 als pathogen eingestuft werden konnte. Bei den *F. proliferatum* Isolaten waren die Chlorosen am Trieb stärker ausgeprägt. Alle Isolate außer P-4 erwiesen sich anhand der Krankheitsausprägung am Trieb als pathogen, wobei P-6 die stärksten Symptome bewirkte.

Eine weitere Bewertung der Virulenz ermöglichte die Erfassung der Frisch- und Trockenmasse der Wurzeln und Triebe. Im Vergleich zur Kontrolle reduzierten alle Isolate die Trockenmasse der beiden Pflanzenabschnitte, somit erwiesen sich anhand der Trockenmassen sämtliche Isolate als pathogen. Obwohl sich die Isolate innerhalb der *Fusarium*-Arten z. T. deutlich unterschieden, konnten durch die hohe Streuung innerhalb der Wiederholungen nur vereinzelt signifikante Unterschiede bei *F. oxysporum* Isolaten ermittelt werden, wobei O-6 die stärkste Reduzierung beider Pflanzenteile hervorrief.

Um die Krankheitsausprägung der *Fusarium*-Isolate bewerten zu können, wurden wie bei Blok & Bollen (1995) die Befallsstärke und die Trockenmasse in Beziehung gesetzt. Dabei erwiesen sich die Wurzelparameter als aussagekräftiger, denn die ermittelten Parameter korrelierten eng miteinander ( $R^2 = 0,74$ ). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Anstieg der Symptome die Wurzelmasse reduziert. Dagegen wiesen die oberirdischen Pflanzenorgane eine geringere Korrelation auf ( $R^2 = 0,41$ ) und bestätigen somit die Aussage von Crüger (1991), dass insbesondere bei *F. oxysporum* Infektionen die Triebe über lange Zeit keine Symptome zeigen können. Unter Berücksichtigung der Wurzelparameter erwies sich Isolat O-6 (Feld I) mit einer Wurzelreduktion von 86 % und

einem Befallsgrad von 33 % als hoch virulent an den Spargelpflanzen. Dagegen zeigten die Isolate O-4 und O-5 eine schwächere Virulenz, mit einer Reduzierung von 57 % und 46 % und geringerer Symptomausprägung von 21 % und 23 %. Bei den *F. proliferatum* Isolaten erwies sich P-4 und P-2 (77 % und 76 % Wurzelreduktion und einem Befallsgrad von 27 % und 23 %) als hoch und P-1 (42 % Wurzelreduktion und Befallsgrad 23 %) eher als schwach virulent.

Die Bedingungen des Versuches wie Inokulationsmethode, Inkubationszeit, Sorte, Temperatur, Bewässerung, Düngung, pH-Wert usw. können Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Die *in vitro* Wachstumsversuche auf PDA zeigten, dass bei beiden *Fusarium*-Arten das Myzelwachstum von der Temperatur abhängig ist (Abb. 8). Im Maisanbau tritt die *Fusarium*-Fäule insbesondere bei warmem, trockenem Wetter während der Aussaat (Marasas et al., 2000) und dagegen bei feuchten Bedingungen während der Kornreife vermehrt auf (Sutton, 1982). Ein Vergleich der beurteilten Virulenz mit anderen Studien ist auf Grund der unterschiedlich eingesetzten Versuchsparameter schwer möglich. Die ermittelten Daten der Virulenz besitzen nur für die gewählten Versuchsbedingungen eine Gültigkeit. Eine längere Kulturführung und Trockenstress würden vermutlich zu einer stärkeren Ausprägung der Krankheitssymptome führen, insbesondere an oberirdischen Pflanzenteilen. Die Ergebnisse der Gewächshausversuche von Martinez Lopez (2007) zeigten, dass 81 Tage nach der Inokulation mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* die erfassten Parameter (Trockenmasse, Befallsgrad) deutlich stärker ausgeprägt waren und dass *F. proliferatum* virulenter war als *F. oxysporum*. Nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen erwiesen sich beide *Fusarium*-Arten als pathogen, aber hinsichtlich der Virulenz unterschieden sie sich kaum (Abb. 6, Abb. 7). Das Isolat O-6 (*F. oxysporum*) beeinflusste von allen Isolaten die erfassten Parameter am meisten und zeigt somit die stärkste Virulenz. Keinen Einfluss auf die Virulenz der Isolate wiesen die Unterscheidungsmerkmale (Tab. 10) wie Herkunft (Feld), Zeitpunkt der Entnahme und auch nicht die Symptomausprägung des Spargelgewebes auf, von dem die Isolate isoliert wurden. Insbesondere zeigen die Ergebnisse, dass sich Isolate aus Geweben mit typischen Krankheitssymptomen nicht hinsichtlich der Virulenz von Isolaten aus symptomfreien Spargelgewebe unterscheiden. LaMondia & Elmer (1989) und Xu et al. (2008) wiesen ebenfalls die Virulenz für *F. proliferatum* Isolate nach, die von asymptomatischem Spargelgewebe isoliert wurden. Eine weitere Möglichkeit, Erreger zu charakterisieren, besteht in der Untersuchung der Unterschiede in der Temperaturtoleranz auf PDA. Wie bei Gerlach & Nirenberg (1982) beschrieben, sind beide *F. oxysporum* und *F. proliferatum* als schnell wachsende Arten zu bezeichnen. Die Ergebnisse nach sieben Tagen auf PDA bei 25 °C bestätigen diese



Aussage, das Myzel wuchs zwischen 65,99 mm und 71,89 mm (Tab. 13). Beide *Fusarium*-Arten wiesen bei 25 °C die optimalste Wachstumsrate auf, wobei *F. oxysporum* im Vergleich zu *F. proliferatum* schneller wuchs. Bei einer niedrigen Temperatur von 10 °C zeigten alle *F. proliferatum* Isolate ein geringes Wachstum, wohingegen das Myzel bei den meisten *F. oxysporum* Isolaten keinen Zuwachs ergab. Erst bei 15 °C erfolgte das Wachstum der *F. oxysporum* Isolate deutlich schneller als bei den *F. proliferatum* Isolaten. Erst ab 20 °C nahm das Myzelwachstum von den *F. proliferatum* Isolaten rapide zu (Abb. 8, B). Ähnlich wie im Topfversuch konnten nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten der jeweiligen *Fusarium*-Art ermittelt werden. Für die Bewertung der Pathogenität und der Virulenz wurde die Wachstumsrate nicht mit hinzugezogen, weil für die Krankheitsausprägung mehrere Einflussfaktoren, wie Temperatur, Feuchtigkeit, Nährsubstrat, Enzyme, Toxine u. a. eine entscheidende Rolle spielen (Ryker, 1935; Hoffmann et al., 1994; Desjardins et al., 1996; Kang & Buchenauer, 2002).

Generell erwiesen sich die *Fusarium*-Arten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* als hoch virulent gegenüber Spargeljungpflanzen der Sorte Gijnlim. Die *Fusarium* spp. Infektion an den Wurzeln bewirkte innerhalb von sieben Wochen eine starke Reduzierung der Wurzelmasse. Dagegen wiesen die oberirdischen Pflanzenteile, mit Ausnahme von den Läsionen an der Triebbasis, kaum Symptome auf. Alle *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate waren an Spargel pathogen, allerdings konnten mittels der Gewächshausversuche keine Unterschiede hinsichtlich der Virulenz ermittelt werden. Weitere Untersuchungen auf molekularbiologischer Basis (RAPD, RFLP) könnten Aufschluss über genetische Diversität geben.

# 2 Populationsdynamik und Bekämpfung von *Plioreocepta poeciloptera*

## 2.1 Zusammenfassung

Auf neun niedersächsischen Spargelanlagen wurde das Auftreten von *P. poeciloptera* in drei aufeinanderfolgenden Jahren erfasst. Die Flughöhepunkte waren abhängig von der Lage und vom Alter der Anlagen. Auf jüngeren Feldern ( $\leq 3$  Jahre) begann und endete der Flug früher als auf älteren Anlagen ( $\geq 4$  Jahre), auf denen auch noch Ende Juli Adulte mittels Stableimfallen erfasst werden konnten. Die Bestimmung der Flugspitzen ermöglicht einen gezielten Einsatz von Insektiziden, wodurch entbehrliche Spritzungen vermieden werden können. Freilandversuche zeigten Bekämpfungserfolge mit dem Insektizid Coragen und einer UV-reflektierenden Folie. Das Auslegen von UV-reflektierender Folie erwies sich prinzipiell als eine mögliche alternative Bekämpfungsmaßnahme, allerdings ist die großflächige Handhabung solcher Folien auf dem Feld schwierig und ein Einsatz kann zurzeit für die Praxis noch nicht empfohlen werden. Die Erfassung des Puppenbesatzes zur Laubabreife ermöglicht eine Überprüfung der Effizienz der Bekämpfungsversuche und gibt eine Einschätzung des Gefährdungspotenzials für die nächste Saison ab.

## 2.2 Einleitung

Die Spargelfliege (*Plioreocepta poeciloptera*) gehört zu den bedeutendsten Schadinsekten im Spargelanbau (Dingler, 1934; Eckstein, 1943; Straib, 1944; Crüger, 1991; Otto, 2002). Insbesondere junge Triebe können vom Larvenfraß stark geschädigt werden, ältere Triebe weisen zwar kümmerlichen Wuchs auf, bleiben aber am Leben und können sich bisweilen erholen (Straib, 1944). In Junganlagen verursacht der Larvenfraß somit verheerende Schäden (Straib, 1944; Kotte, 1960; Otto, 2002). Durch die Schädigung der Spargeltriebe wird deren Assimilationsleistung herabgesetzt und somit der Ertrag im Folgejahr negativ beeinflusst. Auf den herkömmlichen Spargelfeldern erfolgt die Bekämpfung der Spargelfliege mittels Insektiziden, die nach der Ernte ausgebracht werden. Neben der spezifischen Toxizität und dem Wirkungsmechanismus sowie der Dosis ist der Wirkungsgrad eines Pflanzenschutzmittels auch abhängig von Applikationszeitpunkt, -technik und der Witterung (Heitefuss, 2000). Insbesondere der

Zeitpunkt der Spritzung ist bei der Bekämpfung der Adulten von Bedeutung, denn sobald die Tagestemperaturen steigen, werden die Adulten aktiv und reagieren auf Erschütterungen, was eine Bekämpfung mit Kontaktinsektiziden erschwert (Dingler, 1933; Hassan, 1970; Otto, 2002). Zur alternativen Bekämpfungsmethode zählte die Verbrennung des Spargelkrautes nach der Rodung im Herbst (Dingler, 1933). Allerdings wird dies heute nicht mehr praktiziert, das Spargelkraut wird nach der Entnahme gehäckselt und auf dem Feld eingearbeitet (Landwirtschaftskammer Niedersachsen, 2009). Natürliche Gegenspieler sind bisher nicht bekannt. Eine weitere alternative Bekämpfungsmethode, die seit mehreren Jahren im Gemüsebau im Freiland eingesetzt wird, sind Mulchfolien, insbesondere metallbedampfte Folien, die einen hohen Anteil kurzwelliges UV-Licht reflektieren. Die Reflektion von UV-Strahlen (280 - 400 nm) ist für viele Insekten ein wichtiger Hinweis zur Erkennung der Wirtspflanzen oder Teile derselben (Kay, 1979; Owens & Prokopy, 1978; Kevan & Baker, 1983). Eine sehr hohe UV-Reflektion im gesamten Pflanzenbestand kann dann die Orientierung des Insekts und die Differenzierung der Wirtspflanze so stark beeinträchtigen, dass es nicht zum Kontakt zwischen Wirtspflanze und Schädling kommt (Summers et al., 2004). Das Ausbringen von UV-reflektierender Folie hat bei einigen herbivoren Insekten, wie Thripse (Greenough et al., 1990; Stavisky et al., 2002; Riley & Pappu, 2004), Weiße Fliege (Summers & Stapleton, 2002a; Summers et al., 2004) und Blattläuse (Wilson, 1999; Brust, 2000; Döring et al., 2004) dazu geführt, dass diese ihre Wirtspflanzen (Tomaten) nicht besiedelten oder nur in reduzierter Anzahl.

Die Untersuchungen sollten die aktuelle Befallssituation von *P. poeciloptera* auf niedersächsischen Spargelflächen wiedergeben und die Wirkung der UV-reflektierenden Folie auf die Spargelfliege im Freiland testen und im Vergleich zum Einsatz von Insektiziden betrachtet werden.

## **2.3 Populationsverlauf der Spargelfliege**

### **2.3.1 Material und Methoden**

#### *Versuchsanlagen*

Für die Überwachung der Populationsdynamik der Spargelfliege wurden dieselben kommerziell genutzten Spargelanlagen und die Versuchsfläche am Julius-Kühn-Institut in Braunschweig (JKI) verwendet, wie für das Monitoring *Fusarium* spp. und Mykotoxine an Spargel in Kapitel 1.3 (Tab. 15). Die Felder unterschieden sich hinsichtlich des Alters der Pflanzen, der Größe der Felder und Erntedauer (Tab. 15). Auf allen Feldern, außer JKI (Feld I), erfolgte die Bewirtschaftung mit Schwarz-Weiß-Folie oder bei Junganlagen mit

Antitaufolie, nach der Ernte wurden die herauswachsenden Trieben mehrfach (bis zu fünf Spritzungen nach der Ernte) mit Insektiziden (Perfekthion, Spruzit Neu u. a.) gegen *P. poeciloptera*, *Crioceris asparagi*, *C. duodecimpunctata* u.a. geschützt.

Tab. 15: Unterscheidungsmerkmale der für das Spargelfliegen Monitoring genutzten Felder.

Felder (Lage)	Pflanzung	Größe [ha]	Monitoring	Ende der Spargelernte		
				2007	2008	2009
A (Martfeld)	2006	3,0	seit 2007	-	14.5.	3.6.
B (Martfeld)	2005	2,5	seit 2007	15.5.	19.5.	20.6.
C (Gifhorn)	2008	2,0	seit 2008	-	-	27.4.
D (Gifhorn)	2007	1,5	seit 2007	-	13.5.	23.6.
E (Gifhorn)	2006	3,0	seit 2007	15.5.	4.6.	23.6.
F (Gifhorn)	2003	2,5	seit 2007	10.6.	20.6.	21.6.
G (Buchholz)	2005	12,0	seit 2007	22.5.	30.5.	21.6.
H (Buchholz)	2005	7,0	seit 2007	22.5.	30.5.	21.6.
I (Braunschweig)	2006	1200 m <sup>2</sup>	seit 2007	-	-	-

#### *Erfassung des Flugverlaufs*

Auf allen Spargelfeldern wurde seit 2007 der Flugverlauf zwischen Mitte April und Anfang August ermittelt. Die Ausnahme bildete Feld C, dieses wurde 2008 gepflanzt und somit erst zu diesem Zeitpunkt in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Adulten wurden mittels grüner Stableimfallen (Temmen GmbH) erfasst. Pro Feld wurden fünf Fallen verwendet, wobei eine in der Feldmitte platziert wurde und je eine an den Feldecken mit 5 m Abstand zum Rand. Die Kontrolle der Stableimfallen erfolgte wöchentlich, dabei wurden die Adulten nach Geschlechtern getrennt und die Anzahl erfasst. Anschließend wurden die Fallen gereinigt und wieder mit Insektenleim versehen. Alle zwei bis drei Wochen, abhängig von der Witterung, erfolgte ein Austausch der Fallen.

#### *Erfassung der Populationsdynamik im Herbst und Sammeln von Puppen*

Für die Feststellung des Befalls Ende September, wenn das Spargelkraut anfängt sich gelb zu färben, wurde über alle Versuchsfelder ein regelmäßiges Gitterraster gelegt, das mit 25 x 25 m die Probepunkte markierte. Die Anzahl der Probepunkte variierte mit der Feldgröße, unterschritt jedoch nie die 45. An jedem Punkt wurden fünf Triebe einer Pflanze kurz über dem Erdboden abgeschnitten und auf Fraßgänge in den Trieben untersucht. Bei Befall wurden die unterirdischen Triebteile ausgegraben und die Puppen

im Labor aus den Trieben seziert. Die Aufbewahrung der Puppen erfolgte in feuchten Sand bei konstanten 4 °C.

### *Statistik*

Um die Darstellungen der einzelnen Flugverläufe besser vergleichen zu können, wurde mit einer Transformation ( $\log + 1$ ) die Anzahl Adulten pro Falle auf der y-Achse vereinheitlicht. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde das Statistik Programm SAS (Institut, 2001) verwendet. Nach der Aufteilung der Felder in jung ( $\leq 3$  Jahre) und alt ( $\geq 4$  Jahre) wurden signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl Adulten pro Monat mittels Mann-Whitney U-Test,  $P < 0,05$  errechnet (Proc npar1way). Die Verteilung der Geschlechter (Weibchen und Männchen) auf den Stableimfallen wurde mit dem Chi-Quadrat ( $\chi^2$ ) Unabhängigkeitstest mit der Prozedur FREQ und mit der Option EXACT durchgeführt. Regressionen wurden mit der Prozedur REG analysiert.

### **2.3.2 Ergebnisse**

Auf neun Spargelfeldern wurden die Flugverläufe von *P. poeciloptera* mittels Stableimfallen von Mitte April bis Anfang August erfasst. Auf alle Felder wurde eine Flugaktivitäten zwischen April und Ende Juli in den Jahren 2007 bis 2009 beobachtet (Abb. 10). Die Betrachtung der Felder untereinander zeigt eine hohe Variabilität in der Flugintensität. Die Felder in der Region Buchholz (G und H) wiesen über die gesamte Zeit mit bis zu 2,5 Adulten pro Falle eine sehr geringe Flugaktivität auf. Dagegen wurden in den drei anderen Regionen höhere Aktivitäten beobachtet. Tendenziell ließ sich die erste Flugspitze im Mai ermitteln, gefolgt von einer weiteren im Juni. Eine Unterscheidung der Felder lässt sich zwischen jungen ( $\leq 3$  Jahre) und alten ( $\geq 4$  Jahre) Anlagen herstellen. Auf den jüngeren Spargelfeldern wurden erste Flugspitzen Ende April/Anfang Mai und ein weiteres Ende Mai / Anfang Juni erfasst (Feld C 2007 – 2009 und Feld A 2008). Dagegen erfolgte der erste Flughöhepunkt auf Altanlagen erst Ende Mai und der zweite Ende Juni/Anfang Juli (Feld F 2007 – 2009, Feld E 2009). Allerdings zeigten direkt aneinander grenzende Felder (C, D und E sowie A und B) ähnliche Flugspitzen, trotz unterschiedlichen Alters. Das Versuchsfeld am JKI in Braunschweig (Feld I), dessen Anbau ohne Schwarz-Weiß-Folie und ohne konventionelle Ernte erfolgte, wies mit Anfang/Mitte April in allen drei Jahren den zeitigsten Flugbeginn auf.

Um den Einfluss des Spargelfeldalters auf die Flugaktivität von *P. poeciloptera* näher zu betrachten, wurden die mittleren Monatsfänge aller Junganlagen ( $\leq 3$  Jahre) und aller Altanlagen ( $\geq 4$  Jahre) gegenübergestellt (Tab. 16). Die zwei Felder in Buchholz wurden

auf Grund des geringen Fliegen-Aufkommens ausgeschlossen. Die Auswertung zeigt, dass im April auf den Junganlagen prozentual mehr Adulte mittels der Stableimfallen gefangen wurden als auf den älteren Spargelfeldern, allerdings konnte diese Aussage nicht signifikant abgesichert werden (Mann-Whitney U-Test  $Z = 0,388$ ,  $P = 0,351$ ). Entgegengesetzt verhielt es sich in den Monaten Juni und Juli, in denen auf den Altanlagen mehr Fliegen gefangen wurden (Mann-Whitney U-Test,  $P < 0,05$ ). Der Mai erwies sich in beiden Altersklassen als der Monat mit der höchsten Flugaktivität (Mann-Whitney U-Test  $Z = 1,431$ ,  $P = 0,0717$ ).

Die Geschlechtsbestimmung von *P. poeciloptera* wurde auf allen Flächen außer Feld I durchgeführt. Für die Berechnung des Verhältnisses wurden lediglich die Fänge von den Spargelfeldern in Martfeld und Gifhorn berücksichtigt. Aufgrund der geringen Fangrate wurden auch hier die Felder in Buchholz nicht mit einbezogen. Das Verhältnis zwischen den Geschlechtern war auf allen Feldern, außer D, geringfügig Richtung Weibchen verschoben (Tab. 17). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtmenge Weibchen und Männchen errechnet werden ( $\chi^2(5) = 8,813$ ,  $P = 0,116$ ).

Mit der Herbstbonitur war es möglich den Befall jedes Feldes genauer einzuschätzen. Die Anzahl der Puppen pro Feld variierte zum Teil stark zwischen den Spargelfeldern. Um den Zusammenhang zwischen den gefangenen Fliegen und der Befallsstärke im Herbst (Anzahl Puppen pro 100 Stangen) zu betrachten, wurden nur Fänge berücksichtigt, die nach dem Stechende erfolgten, da lediglich zu diesem Zeitpunkt ein Befall mit *P. poeciloptera* eintreten konnte. Es wurde eine starke Korrelation ( $R^2 = 0,78$ ) zwischen der Anzahl Puppen und dem Auftreten der Adulten ermittelt (Abb. 9). Der Zusammenhang beider Variablen lässt sich mit einem linearen Regressionsmodell nach Gleichung  $y = 0,091 + 0,92x$  darstellen ( $N = 24$ ,  $F = 83,29$ ,  $P < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,78$ ).

Tab. 16: Einfluss des Spargelfeldalters (N = Anzahl Felder) auf die Anzahl Adulter [%] von *Pliorecepta poeciloptera* in den Jahren 2008 und 2009. Multiple paarweise Vergleiche mit Mann-Whitney U-Test, P < 0,05.

Monat	Anzahl Adulte 2008 und 2009 [%]				Mann-Whitney U-Test, P < 0,05
	≤ 3 Jahre (N = 7)		≥ 4 Jahre (N = 6)		
	x	SD	x	SD	
April	22,16	± 23,27	13,16	± 16,88	0,351
Mai	70,93	± 74,53	67,80	± 61,37	0,071
Juni	6,79	± 2,03	16,64	± 18,40	0,024
Juli	0,11	± 0,15	2,39	± 3,33	0,021

Tab. 17: Geschlechterverhältnis der gefangenen Spargelfliegen in Prozent vom gesamten Aufkommen pro Feld. Statistischer Vergleich mittels  $\chi^2$  Test, P = 0,05.

Geschlecht	Anzahl Adulte [%] pro Feld						x		SD	$\chi^2$ N=4935
	A	B	C	D	E	F				
♀	50,09	54,07	66,67	49,30	58,47	51,69	55,05	6,01	0,116	
♂	49,91	45,93	33,33	50,70	41,53	48,31	44,95	6,01		

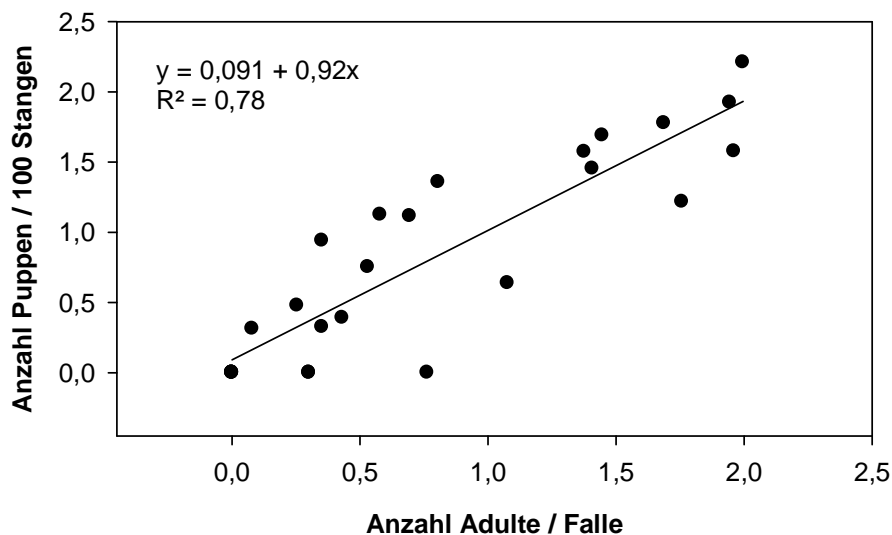


Abb. 9: Zusammenhang zwischen befallene Pflanzen mit *Pliorecepta poeciloptera* Puppen im Herbst und Anzahl Adulter pro Feld nach der Ernte, auf acht untersuchten Spargelfeldern in den Jahren 2007 – 2009.

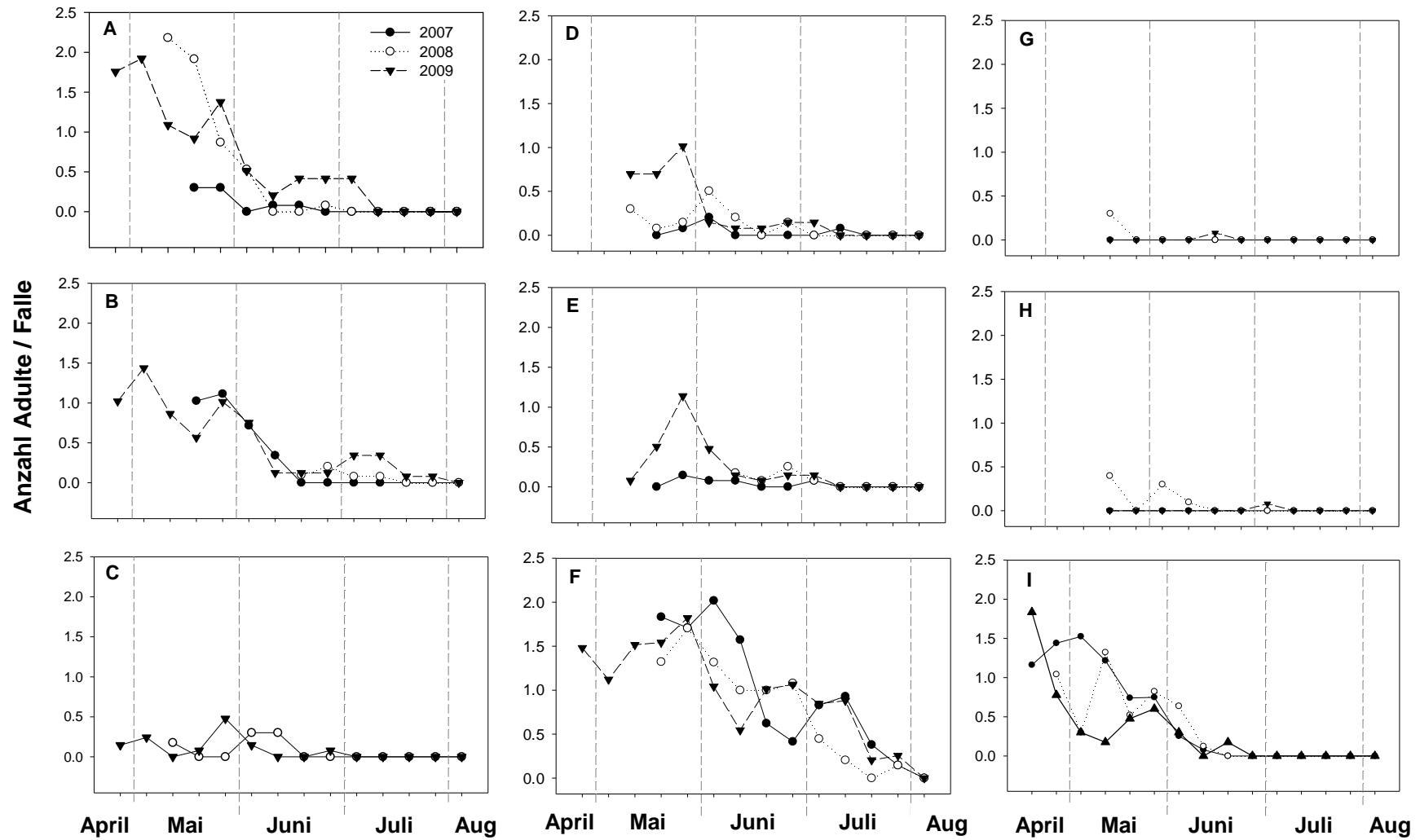


Abb. 10: Flugverlauf von *Pliorecepta poeciloptera* ab April bis August 2007 (schwarzer Punkt), 2008 (weißer Punkt mit schwarzen Rand) und 2009 (schwarzes Dreieck) auf den Feldern A bis I. Aufgrund der Variabilität der Flugintensität wurde die Anzahl Puppen/Falle transformiert ( $\log + 1$ ).



## 2.4 Bekämpfungsmöglichkeiten der Spargelfliege

### 2.4.1 Material und Methoden

#### *Versuchsaufbau und Varianten*

Die Untersuchungen fanden in zwei aufeinander folgenden Jahren (2008 und 2009) auf einem Spargelfeld am Julius-Kühn-Institut (JKI) in Braunschweig statt, auf dem seit 2006 die Sorte ‚Gijnlim‘ als Grünspargel angebaut wurde. Das Feld hatte eine Länge von ca. 40 m und eine Breite von 25 m, der Reihenabstand betrug 2 m und der Pflanzabstand 0,30 m. Für den Versuch wurde das Feld in 25 gleich große Blöcke eingeteilt (Länge 4 m x Breite 3 Reihen), auf denen randomisiert die Versuchsvarianten verteilt wurden (Lateinisches Quadrat). Insgesamt wurden vier Insektizide und eine aluminiumbedampfte Folie (Star Metallizing, Escondido, USA), die das UV-Licht in den Pflanzenbestand reflektierte, gegen *P. poeciloptera* getestet (Tab. 18). Gleichzeitig mit dem Austrieb der Triebe wurde die Folie (3 m Breite) ausgelegt, so dass die Triebe ungehindert herauswachsen konnten (Abb. 11). Der Einsatz der Insektizide variierte zwischen den zwei Versuchsjahren. Im Jahr 2008 erfolgte zum ersten Flugzeitpunkt der Spargelfliege (30.04.) die erste Spritzung, und diese wurde danach noch zweimal wiederholt (14.05. und 04.06.). 2009 wurde am 24.04. mit dem Einsetzen der Fliegenaktivität die erste Spritzung durchgeführt und in sieben bis acht Tagesabständen noch fünf weitere. Die Aufwandmengen richteten sich nach dem Hersteller (Tab. 18).

Tab. 18: Varianten des Feldversuches zur Bekämpfung von *Plioreocepta poeciloptera* 2008/2009.

Variante	Behandlung	Aufwandsmenge	Versuchsjahr
1	Kontrolle	-	08 / 09
2	Aluminiumfolie	-	08 / 09
3	Perfekthion	0,6 L / ha	08 / 09
4	SpinTor	500 mL / ha	08 / 09
5	Karate Zeon	75 mL / ha	08
6	Coragen	60 mL / ha	09



Abb. 11: Versuchsvariante mit der UV-reflektierenden Folie.

### *Erfassung der Parameter*

Während des Versuches bis Anfang August wurde der Flugverlauf von *P. poeciloptera* mittels Stableimfallen wöchentlich erfasst. Damit wurde die Populationsdichte der Fliege beobachtet. Im Herbst zur Laubabreife erfolgte die Auswertung des Versuches. Pro Variante wurden insgesamt 75 Spargeltriebe entnommen und im Labor auf Puppenbesatz überprüft. Dabei wurden die Anzahl Puppen pro Trieb erfasst.

### *Statistische Analyse*

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde das Statistik Programm SAS (Institut, 2001) verwendet. Der Befall mit *P. poeciloptera* Puppen wurde mit der PRC GLM Prozedur statistisch berechnet. Nach signifikanten Unterschieden in der Varianzanalyse (ANOVA,  $P < 0,05$ ) wurden die Mittelwerte mit dem Tukey-Test (HSD,  $P < 0,05$ ) verglichen.

### **2.4.2 Ergebnisse**

Die Auswertung des Befalls von Spargelstangen aus behandelten Parzellen ergab, dass die Behandlungen mit den Insektiziden und der Einsatz der UV-reflektierenden Folie den Befall mit *P. poeciloptera* in beiden Behandlungsjahren verringern konnten (Abb. 12). Der Blockfaktor zeigt in beiden Jahren keine hohen Niveauunterschiede zwischen den Blöcken (2008  $F_{(0,313)} = 1,557$   $P = 0,234$ ; 2009  $F_{(28,24)} = 0,438$   $P = 0,780$ ). In beiden Versuchsjahren reduzierte die UV-reflektierende Folie signifikant gegenüber der Kontrolle den Befall durch *P. poeciloptera* (2008, Tukey-Test,  $P = 0,000$ ; 2009 Tukey-Test,  $P = 0,006$ ). 2008 erzielte die UV-reflektierende Folie auch im Vergleich zu den getesteten

Insektiziden eine signifikante Reduzierung des Befalls (Tukey-Test,  $P < 0,05$ ). Von den getesteten Insektiziden konnte nur „Coragen“ die Anzahl Puppen signifikant zur Kontrolle reduzieren (Tukey-Test,  $P = 0,031$ ).

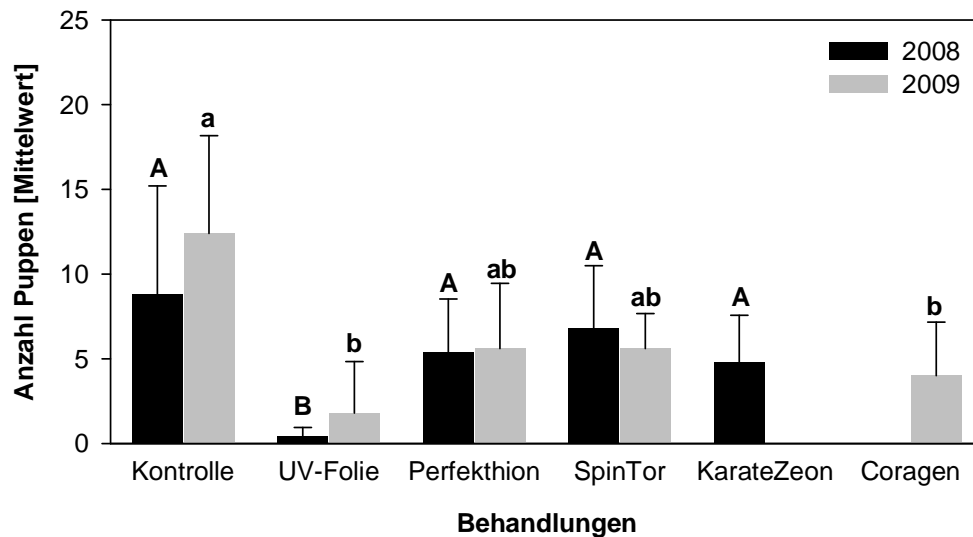


Abb. 12: Anzahl Puppen (Mittelwert + SD) in den behandelten Varianten in zwei aufeinander folgenden Jahren 2008 (schwarz) und 2009 (hellgrau). Signifikante Unterschiede werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet nach Tukey-Test,  $P < 0,05$ , 2008 mit großen Buchstaben und 2009 mit kleinen Buchstaben.

## 2.5 Diskussion

Durch den Einsatz der grünen Stableimfallen konnte während der Vegetationsperiode die Aktivität von *P. poeciloptera* von Mitte April bis Ende Juli wiedergegeben werden. Die Feldbeobachtungen zeigten, dass tendenziell die höchste Flugaktivität im Mai und Juni stattfindet (Abb. 10). Der Flug von *P. poeciloptera* ist von der Umgebungstemperatur abhängig, erst bei Tagestemperaturen ab 15 °C wird die Fliege aktiv, vorher befindet sie sich in einer Kältestarre, die sie an der Pflanze oder am Boden verbringt (Dingler, 1934). Es ist anzunehmen, dass die Unterschiede im Flugverlauf und das Auftreten von Flugspitzen aufgrund regionaler Temperaturverhältnisse zustande gekommen sind. Beispielsweise nahm auf allen vier Feldern in der Region Gifhorn (Feld C bis F) Ende Mai 2009 die Anzahl Adulter pro Falle stark zu (Abb. 10). Zur selben Zeit stiegen in dieser Region die Temperaturen auf bis zu 20 °C (siehe Anhang: Abb. 20). Aufgrund der teilweise geringen Fallenfänge, wahrscheinlich bedingt von einer insgesamt geringen Abundanz der Fliege, konnte diese Annahme nicht für alle Anbauregionen belegt werden. Trotz der auf allen Feldern, mit Ausnahme von Feld I, angewendeten Insektizide gegen die Spargelfliege wurde ein fortdauernder, aber auch variabler Schlupf der Adulten von April bis Juli verzeichnet (Abb. 10).

Eine Unterscheidung zwischen den Anlagen lässt sich hinsichtlich des Alters und der Lage durchführen. Auf jüngeren Spargelfeldern lässt sich eine Tendenz zu einem früheren Flugbeginn mit einem stärkeren Flug in den Monaten April und Mai erkennen (Tab. 16), wohingegen auf den Altanlagen noch im Juni und Juli vermehrt Adulte gefangen wurden. Gegenläufig zu Otto (2002) wies keine der neun Anlagen im August noch Fliegen auf. Das könnte am Alter der Felder liegen, denn nur auf Feldern älter als sieben Jahre beobachtete Otto (2002) im August noch Spargelfliegen. Die neun niedersächsischen Felder überschritten dieses Alter während des Monitorings nicht. Eine weitere Beobachtung, dass aneinandergrenzende Felder ähnliche Flugspitzen trotz unterschiedlichen Alters aufweisen (Abb. 10), stützt die Theorie von Dingler (1934) und Otto (2002), dass die eigentlich standorttreuen Fliegen auf der Suche nach Wirtspflanzen aktiv längere Entfernungen zurücklegen und benachbarte Felder besiedeln. Ebenfalls konnten die Untersuchungen die Aussage der beiden Autoren über das ausgewogene Zahlenverhältnis der beiden Geschlechter bestätigen (Tab. 17).

Eine genauere Einschätzung des Aufkommens für das folgende Jahr und eine Überprüfung der Effizienz der Kontrollmaßnahmen konnten durch die Bonitur im Herbst durchgeführt werden. Die erfasste Anzahl Puppen korrelierte stark mit den Fliegenfängen nach der Ernte (Abb. 9). Zur Erfassung der Puppen im Herbst hat es sich bewährt, die

Triebe kurz oberhalb der Dämme abzuschneiden (Otto, 2002). Die sehr gradlinig verlaufenden Bohrgänge der Spargelfliegen Larven ließen sich schnell und einfach erkennen.

Im konventionellen Spargelanbau wird die Spargelfliege mittels Einsatz von Insektiziden bekämpft, wobei die Spritzung von Insektiziden meistens routinemäßig durchgeführt wird. Zugelassener Wirkstoff gegen *P. poeciloptera* ist Dimethoat (Perfekthion). Der Wirkstoff gehört zu den Dithiophosphorsäureestern und wirkt als Kontaktgift, das auch systemisch von der Pflanze aufgenommen wird. Es ist als umweltgefährlich und gesundheitsschädlich mit der höchsten Bienengefährlichkeit (B1) eingestuft. Nach der Spargelernte darf das Insektizid fünfmal in der Kultur angewendet werden. Günstige Spritztermine mit einem hohen Aufkommen der Adulten lassen sich durch die von den Stableimfallen bezogenen Fangdaten ermitteln. Die Mehrfachanwendungen, die durch den langanhaltenden Schlupfzeitraum von April bis Juli notwendig sind, sollten gezielt auf die Flugspitzen eingesetzt werden, um somit entbehrliche Spritzungen zu vermeiden. Ferner sollte für eine erfolgreiche Bekämpfung der Adulten auf die Tagestemperatur geachtet werden. Die Erwärmung nach der morgendlichen Kälte lässt die Fliegen schnell aktiv werden und stark auf Erschütterungen reagieren (Dingler, 1933). Die Effektivität der Kontaktinsektizide erhöht sich, wenn sich die Adulten während der Kältestarre ( $< 15\text{ °C}$ ) an den Spargeltrieben oder am Boden aufhalten. Ebenfalls kann es durch die systemische Wirkung von Dimethoat zur Bekämpfung der Larven kommen, während sich diese in das Pflanzengewebe fressen. Allerdings erscheint eine Bekämpfung der Adulten als sinnvoller, weil somit die Eiablage bereits verhindert wird und es somit nicht zum Befall kommt.

An alternativen Bekämpfungsmethoden wird im Bereich der biotechnischen Verfahren gearbeitet. Thibout & Auger (1999) und Thibout et al. (2005) untersuchten im Labor die Bedeutung der männlichen und weiblichen Pheromone und konnten feststellen, dass die sexuelle Aktivität von den Duftorganen der Männchen abhängig ist. Das Männchen lokalisiert die Wirtspflanze vor dem Weibchen, welches ohne männliche Pheromone und Pflanzenduft nicht zur Wirtspflanze findet und somit auch nicht zum Männchen. Im Obstbau werden schon lange die weiblichen Pheromone des Apfelwicklers (*Cydia pomonella*) in Pheromonfallen eingesetzt, um die männlichen Falter anzulocken, die dann auf dem Leimboden der Falle kleben bleiben. Zum einen kommt es somit nicht zur Begattung der weiblichen Falter und zum anderen dienen die Fallenfänge zur gezielten Ausbringung von Pflanzenschutzmitteln (MacLellan, 1976; Cardé & Minks, 1995; Lösel et al., 1999). Eine weiterführende Methode, Attract and Kill (Appeal), kombiniert die

Biotechnologie mit der chemischen Bekämpfung. Mit dem Pheromon werden die Männchen des Schädling angelockt und anschließend mit einem Kontaktinsektizid (meistens Pyrethroide) abgetötet. Inwieweit Fallen, bestückt mit männlichen Pheromonen, das Aufkommen der Spargelfliege auf dem Feld reduzieren können und somit zu einer besseren Überwachung oder vielleicht sogar Bekämpfung beitragen, ist bisher noch nicht bekannt. Die kulturtechnischen Verfahren, wie die Vernichtung des Spargellaubs im Herbst, zählen ebenfalls zu den alternativen Bekämpfungsmethoden. Allerdings wird heutzutage aus Gründen der Düngungsfunktion das Spargelkraut nicht mehr vernichtet sondern in den Boden eingearbeitet (Landwirtschaftskammer Niedersachsen, 2009). Eine weitere alternative Methode stellt der gezielte Einsatz von UV-Licht dar. Der Wellenlängenbereich von UV-Strahlung (UV-B 280 - 315 nm, UV-A 315 - 400 nm) wird von vielen Insekten zur Orientierung genutzt (Raviv & Antignus, 2004; Antignus, 2007). Auf der einen Seite führt die Verringerung der UV-Intensität zu einer Befallsverringerng von phytophagen Insekten an Pflanzen, wie Thripse (Kumar, 2006), Weiße Fliege (Antignus et al., 1996) und Blattläuse (Costa, 2002). Auf der anderen Seite kann durch eine überproportional hohe Reflektion von UV-Licht im Pflanzenbestand die Orientierung des Insekts so stark beeinträchtigen werden, dass es nicht zum Kontakt zwischen Wirtspflanze und Schaderreger kommt. Herbivore Insekten benötigen zur Findung der Wirtspflanze neben Form- und chemischen Reizen den Kontrast zwischen dem Grün der Pflanze (Chlorophyll) und dem dunklen Boden. Die Besiedlung durch die Weiße Fliege (*Bemisia argentifolii*) an Zucchini, Kürbis und Gurke konnte durch den Einsatz von UV-reflektierender Folie reduziert werden (Summer & Stapleton, 2002a). Auch bei Blattläusen und Thripsen an verschiedenen Kulturpflanzen bewirkte die UV-reflektierende Folie eine Minderung des Befalls (Kring & Schuster, 1992; McLaren & Fraser, 2001; Stavisky et al., 2002; Reitz et al, 2003; Riley & Pappu, 2004; Summer et al., 2004).

In Freilandversuchen in den Jahren 2008 und 2009 wurde die Wirkung von UV-reflektierender Folie im Vergleich zu im Gemüsebau zugelassenen Insektiziden getestet. Neben dem gegen *P. poeciloptera* zugelassenen Wirkstoff Dimethoat (Perfekthion) wurde ein synthetisches Pyrethroid (Karate Zeon) getestet, welches eine starke Fraß- und Kontaktwirkung aufweist. Karate Zeon hat im Spargel eine Zulassung gegen beißende und saugende Insekten sowie Erdräupen. Des Weiteren wurde aus der Wirkstoffgruppe der Bisamide das Chlorantraniliprole (Rynaxypyr) (Coragen) auf seine Wirkung geprüft, welches als erster Vertreter seiner Wirkstoffklasse als Insektizid zugelassen ist. Auch bei diesem Insektizid wird der Wirkstoff über Fraß und Kontakt aufgenommen und führt durch eine Muskellähmung zu einem unmittelbaren Fraß-Stopp. Für eine mögliche Bekämpfung im biologischen Anbau wurde SpinTor in die Versuche mit einbezogen. Der Wirkstoff

Spinosad besteht aus Stoffwechselprodukten des natürlich vorkommenden Bodenbakteriums *Saccharopolyspora spinosa* und hat für den Öko-Landbau seit 2008 eine Zulassung für die Bekämpfung von Wickler-Arten, schädlichen Raupen, Thripse und andere Schadinsekten.

Die Ergebnisse der Freilandversuche zeigen, dass in beiden Versuchsjahren die angewendeten Insektizide zwar die Anzahl der Puppen im Bestand reduzieren konnten, aber nur das Präparat Coragen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen signifikant reduzierten Befall bewirkte (Abb. 12). Das zugelassene Präparat Dimethoat konnte trotz der systemischen Wirkungsweise den Befall nur geringfügig reduzieren. Die UV-reflektierende Folie erzielte in beiden Versuchsjahren einen signifikant geringeren Befall im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und unterschied sich 2008 ebenfalls signifikant von den getesteten Insektiziden. Folglich kam es durch die starke Abstrahlung von UV-Licht in den Parzellen mit UV-reflektierender Folie zu einer Verwirrung der Adulten, bei der die Orientierung der Insekten so stark beeinträchtigt wurde, dass es nicht zum Kontakt zwischen Wirtspflanze und Schädling gekommen ist. Neben dem guten Bekämpfungseffekt erweist sich allerdings die Ausbringung der Folie auf Spargelfelder als schwierig. Beispielweise im Salat- oder im Tomatenanbau kann die Folie mittels Löchern an der Stelle der Pflanzung so konstruiert werden, dass die Pflanzen ungehindert herauswachsen können. Im Spargelanbau wächst nach der Ernte pro Pflanze eine Vielzahl Sprosse heraus, deren Ausdehnung nicht genau definiert werden kann. Eine Auslegung auf dem Feld müsste demnach links und rechts neben der Pflanze erfolgen, wobei noch geklärt werden müsste, wie die UV-reflektierende Folie auf den Dämmen befestigt werden könnte. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass die UV-reflektierende Folie im Spargelanbau sehr gute Bekämpfungserfolge erzielen kann, aber für den Einsatz auf dem Feld muss noch im Bereich der Technik Entwicklungsarbeit geleistet werden. In wieweit die Folie auch andere Schaderreger wie *C. asparagi* oder *C. duodecimpunctata* im Spargelanbau abhält, müssen weitere Versuche zeigen.

# 3 Interaktion zwischen Spargelfliege und *Fusarium*

## 3.1 Zusammenfassung

Die Spargelfliege (*P. poeciloptera*) wird seit den 30er Jahren als Schädling auf deutschen Spargelanlagen beschrieben. Neben der durch den Larvenfraß herabgesetzten Assimilationsleistung der Spargeltriebe verursachen die Weibchen bei der Eiablage und durch Host-feeding Verletzungen am Trieb. Versuche unter kontrollierten Bedingungen zeigten, dass eine *F. proliferatum* Kontamination an verletzten Trieben sowie mit Sporensuspension kontaminierte Weibchen der Spargelfliege eine starke Infektion im Spargeltrieb verursachten (bestimmt mittels quantitativer Real-time PCR). Durch den Larvenfraß wurde die insbesondere basipetale Verbreitung von *F. proliferatum* begünstigt. Der Infektionsweg über die Wurzel erwies sich innerhalb der vierwöchigen Versuchsdauer als weniger aggressiv. Um die Infektionsquellen für die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule gerade bei Jungpflanzen zu reduzieren, ist es nach unseren Beobachtungen erforderlich eine Kontrolle des Insektenbesatzes durchzuführen.

## 3.2 Einleitung

Im Spargelanbau verursachen Fäulen an Wurzel, Rhizom und Trieb irreversible Welken, reduzierte Ertragsleistungen bis zum vorzeitigen Absterben der Spargelpflanzen (*Asparagus officinalis* L.). Die Hauptverursacher sind parasitäre Pilzarten der Gattung *Fusarium* spp., wobei insbesondere zwei Arten, *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, mit der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule am Spargel assoziiert wurden (Hartung et al., 1990; Sadowski & Knowlewski, 1990; Elmer et al., 1996; Baayen et al., 2000; Goßmann et al., 2008).

Neben pilzlichen Schaderregern schädigen auch biotische Faktoren wie Insekten die Spargelpflanzen (Damicone & Manning, 1985; Elmer, 1989; Hartmann, 1989; Otto, 2002; Tuell, 2003). In fast allen europäischen Ländern, in denen Spargel angebaut wird, ist die Spargelfliege (*Plioreocepta poeciloptera*) der bedeutendste Schädling (Lesne, 1913; Dingler, 1934; Salmeron de Diego, 1973; Thibout & Auger, 1999; Fischer et al. 1989; Otto, 2002). Die Weibchen verletzen die oberirdischen Spargeltriebe in dem sie zum einen die Eier (60 bis 80 pro Weibchen) mittels Ovipositor direkt in das Pflanzengewebe ablegen und zum anderen um sich von dem austretenden Pflanzensaft zu ernähren. Nach dem Schlupf fressen sich die Larven während ihrer Entwicklung basipetal in den unterirdischen



Teil des Triebes, dabei ernähren sie sich vom Pflanzengewebe und hinterlassen relativ geradlinig verlaufende Fraßgänge. Die Verpuppung findet im Trieb kurz über dem Rhizom statt. (Dingler, 1934; Hassan, 1970, Otto, 2002). Vor allem junge Spargelfelder sind wegen ihrer verkürzten Erntezeit, dem somit früheren Durchbrechen der Spargeltriebe und des möglichen Zuflugs der Weibchen von *P. poeciloptera* aus älteren Anlagen besonders gefährdet (Dingler, 1934; Hassan, 1970).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Insekten Überträger und Verbreiter von Pilzsporen sind, insbesondere von Fusarien (Leach, 1940; Booth, 1971; Chiang & Wilcoxson, 1961). Im Maisanbau sorgt der Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera* Lec.) durch die Fraßschäden der Larven an den Wurzeln und der Adulten an den Narbenfäden sowie den milchreifen Maiskörnern für die Verbreitung von *Fusarium* spp. (Palmer & Kommedahl, 1969; Gilbertson et al., 1986; Hammack et al., 2003; Kurtz et al., 2010). Aber nicht nur Vertreter aus der Familie der *Chysomelidae* schädigen den Mais, auch der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) aus der Familie der *Lepidoptera* fördert durch den Larvenfraß am Stängel die Verbreitung von *Fusarium*-Arten, die einerseits Fäulen verursachen und andererseits Mykotoxine bilden können (Dowd, 2000; Magg et al, 2002). Untersuchungen an Spargel auf amerikanischen Anlagen ergaben, dass aus der Familie der *Agromyzidae* die Minierfliege (*Ophiomyia simplex*) durch ihre Bohrlöcher am Trieb die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule an Spargel verstärkt (Gilbertson & Manning, 1983; Damicone et al., 1987; Tuell, 2003). Bekämpfungsversuche von *O. simplex* zeigten, dass nicht nur die Verletzung im Trieb reduziert werden konnte, sondern ebenfalls die Infektion mit *Fusarium* spp. (Damicone et al., 1987).

Ziel dieser Studien war es, die mögliche Interaktion zwischen *P. poeciloptera* und *Fusarium* spp. dahingehend zu untersuchen, ob mit einer Kontrolle der Spargelfliegen die Ausbreitung und Intensität von der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule verringert werden können. Einerseits wurden in mehrjährigen Erhebungen die Flugaktivität und Besiedlungsintensität der Fliege in Relation zum *Fusarium*-Befall erfasst und andererseits wurde unter kontrollierten Bedingungen an Jungpflanzen überprüft, ob feine Verwundungen, wie vom Legebohrer der Weibchen verursacht werden, die Besiedlung der Spargelpflanzen mit *Fusarium* spp. bei künstlicher Infektion von Pflanzen und/oder Fliegen mit Sporensuspension fördern können.

### 3.3 Interaktion unter Feldbedingungen

#### 3.3.1 Material und Methoden

*Fusarium spp. assoziiert mit Adulten und Puppen von P. poecilopectera*

Für die Feststellung der Interaktion zwischen *Fusarium spp.* und *P. poecilopectera* auf den Spargelfeldern wurden die Daten aus dem Monitoring 2007, 2008 und 2009 verwendet (siehe Kapitel 1 und 2). Die Daten für die Interaktion zwischen adulten Spargelfliegen und *Fusarium spp.* wurden im Herbst und zur Haupterntezeit erfasst. Die zwei Probenahmen für die Feststellung endophytischer Pilzbesiedlung mit *Fusarium spp.* während der Ernte erfolgten zwischen Ende April und Mitte Mai sowie vier Wochen später, im Juni (2008, 2009). Ein weiterer Termin folgte im September/Okttober zur Abreife des Spargelkrauts (2007 – 2009) (Kapitel 1, Tab. 2). Die Erfassung der Flugaktivität der Spargelfliege erfolgte mittels Stableimfallen, wobei pro Feld vier Fallen am Rand und eine in der Mitte aufgestellt wurden. Die Kontrolle der Leimfallen auf Fliegenbesatz erfolgte wöchentlich.

#### *Statistische Auswertung*

Die Beziehung zwischen der *Fusarium spp.* Infektion und der Anzahl der Adulten sowie Puppen von *P. poecilopectera* vom Monitoring 2007 – 2009 auf den Spargelfeldern wurden mit der Pearson-Korrelation oder bei einer nicht normalverteilten Variable mit der Spearman-Korrelation ermittelt (PROC CORR). Die Art der Beziehung zwischen den jeweiligen Parametern wurde mit einer Regressionsanalyse PROC REG errechnet (SAS Institute, 2001).

#### 3.3.2 Ergebnisse

Im Herbst 2007, 2008 und 2009 wurden die Daten zur Prüfung des Zusammenhangs zwischen dem Besatz der Spargeltriebe mit Spargelfliegen Puppen und der *Fusarium spp.* Infektionsstärke der Triebe erhoben. Dafür erfolgte zur Abreife des Spargelkrauts die Entnahme von insgesamt 574 Spargelstangen, die im Labor auf Puppenbesatz und *Fusarium spp.* untersucht wurden.

Um den Zusammenhang zwischen *Fusarium spp.* Infektionsstärke und Fliegenbesatz näher zu betrachten, wurden der Befall mit *Fusarium spp.* und der Besatz mit Puppen von *P. poecilopectera* gegenübergestellt, erfasst im Herbst 2007, 2008 und 2009. Die Regressionsanalyse des Herbstbefalls auf allen untersuchten Spargelfeldern zeigte, dass eine Korrelation mit  $R^2 = 0,60$  ( $P = 0,0002$ ) zwischen beiden Krankheitserregern besteht (Abb. 13). Die Korrelation zwischen den beiden Variablen lässt sich mit der folgenden

linearen Regressionsgleichung beschreiben,  $y = -59,63 + 0,47x$  ( $N = 17$ ,  $F = 24,03$ ). Bei der Betrachtung der Felder unter dem Gesichtspunkt des Alters der Anlagen zeigte sich, dass auf den jungen Spargelfelder ( $\leq 3$  Jahre) die Korrelation mit  $R^2 = 0,70$  stärker war ( $y = 56,37 + 0,50x$ ;  $N = 9$ ,  $F = 19,99$ ,  $R^2 = 0,70$ ,  $P = 0,002$ ) (. Dagegen lag die Korrelation auf den Altanlagen ( $\geq 4$  Jahre) im schwachen Bereich von  $R^2 = 0,14$ , ( $y = 74,78 + 0,16x$ ;  $N = 5$ ,  $F = 0,78$ ,  $P = 0,42$ ) (Abb. 13, graue Punkte). Während der Erntezeit im Juni ließ sich zwischen der Befallshäufigkeit mit *Fusarium* spp. und dem Auftreten der Spargelfliegen, wobei die Anzahl der Fliegen auf Stableimfallen als Parameter erfasst wurde, keine Korrelation feststellen ( $R^2 = 0,0007$ ,  $P = 0,92$ ) (siehe Anhang: Abb. 22).

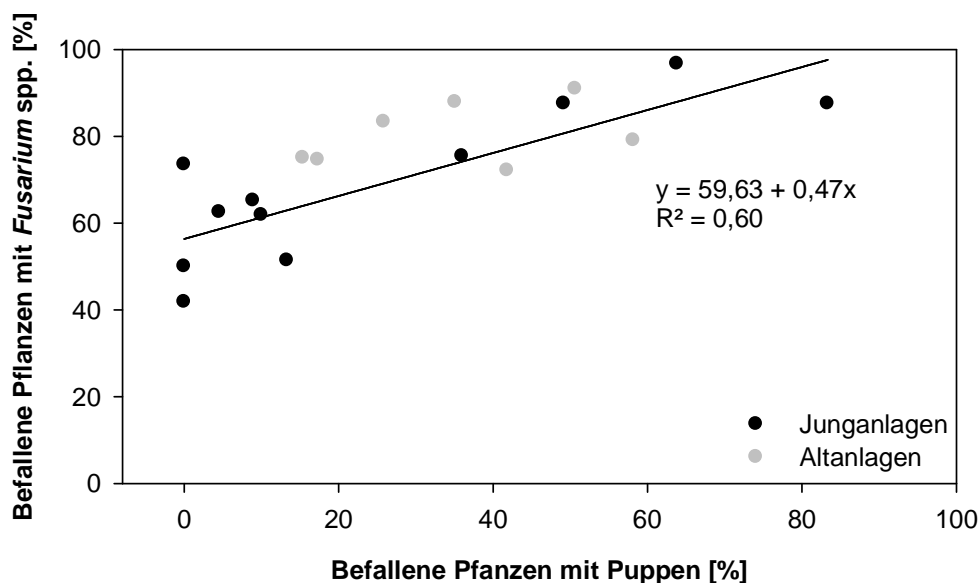


Abb. 13: Zusammenhang zwischen Pflanzen mit *Fusarium* spp. Infektion [%] und befallene Pflanzen mit *Plioreocepta poeciloptera* Puppen [%] zur Herbstbonitur 2007 - 2009 auf allen Feldern (schwarze Punkte und graue Punkte).

### 3.4 Interaktion unter kontrollierten Bedingungen

#### 3.4.1 Material und Methoden

##### 3.4.1.1 Simulierter Fliegenbefall mit *Fusarium proliferatum* Infektion

###### *Vorversuch*

###### *Pflanzenanzucht und Versuchsbedingungen*

Spargelsamen der Sorte ‚Gijnlim‘ (Limseeds GmbH) wurden nach einer Heißwasserbeizung (55 °C / 20 min) in Quickpot-Standardplatten (Einzeltopfgröße von 38 x 38 x 75 mm) in Perlite ausgesät und bei Bedarf gewässert. Die erste Düngung (Wuxal Super flüssig 0,1 %) erfolgte ab der Entfaltung der Phyllokladien im wöchentlichen Rhythmus. Nach sechs Wochen fand das Pikieren der Spargelpflanzen in 10er Töpfen und einem Gemisch (im Verhältnis 2 : 1) aus gedämpfter Einheitserde (Fruhstorfer Erde Typ P) und hitzesterilisiertem Sand (100 °C, 24 h) statt. Es wurden nur homogene Pflanzen mit zwei entwickelten Trieben und einem gut ausgebildeten Wurzelsystem verwendet. Der Versuch fand unter Gewächshausbedingungen bei 22 °C Tag- und 16 °C Nachttemperatur und bei einem 16 / 8 h Tag-Nacht-Rhythmus (bei 30K lux) statt. Die Wässerung der Versuchspflanzen erfolgte nach Bedarf, gedüngt wurde alle 14 Tage.

###### *Inokulation*

Nach Reaktivierung des *F. proliferatum* Isolats 241 (Österreich Mai 2003, Spargelstange, Humboldt-Universität zu Berlin) aus einer Dauer-Erdkultur auf PDA, erfolgte eine Überimpfung auf SNA-Platten. Nach 14tägiger Inkubationszeit fand eine morphologische Überprüfung des Isolats mittels Mikroskop statt und anschließend wurde das Isolat in einer Schüttelkultur angezogen. Für das Flüssigmedium wurden 150 g tiefgefrorener Spargel in 500 mL destilliertem Wasser 15 min gekocht, dekantiert und mit 5 g Glucose und destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt und mit einer 1 M HCL-Lösung auf pH-Wert 5 eingestellt. Nach der Abfüllung in Kolben wurden diese für 15 min bei 120 °C autoklaviert. In 200 mL Rundkolben wurden 100 mL Flüssigmedium abgefüllt und mit je zwei bewachsenen SNA-Agarstückchen (Ø 5 mm) beimpft. Die Inkubation fand bei Zimmertemperatur (22 °C) statt, natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus und mit 115 U/min geschüttelt. Nach 10 bis 14 Tagen erfolgte die Auszählung der Konidien mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer. Für die Inokulation wurde ein Titer von  $4 \times 10^6$  Sporen/mL<sup>-1</sup> eingestellt. Für die Bodeninokulation wurden pro Topf 6 mL *F. proliferatum* Sporensuspension mit Hilfe einer Pipette direkt an die Wurzeln gebracht. Die Triebbehandlung sollte eine Kontaminierung des Triebes durch den Ovipositor des

Spargelfliegen Weibchens simulieren. Um die Oberflächenspannung der Sporensuspension herabzusenken und den Trieb besser benetzen zu können, wurde 0,1 % Tween20 beigefügt und mit Hilfe eines Pinsels auf den Trieb gebracht. Die Triebverletzung erfolgte 8 cm oberhalb des Rhizoms mittels einer Nadel (0,24 mm Ø), die nach jedem Gebrauch mit 70 % EtOH und Abflammen desinfiziert wurde.

#### *Varianten*

Der Versuchsaufbau beinhaltete sechs Varianten (Tab. 19), mit je 40 Spargelpflanzen pro Variante. Um eine statistische Auswertung zu gewährleisten, wurde der Versuch drei Mal wiederholt.

Tab. 19: Beschreibung der Versuchsvarianten

<b>Variante</b>	<b>Beschreibung</b>
1	Kontrolle – angegossen mit Wasser
2	Trieb mit Verletzung, bestrichen mit destilliertem Wasser
3	Trieb ohne Verletzung mit <i>F. proliferatum</i> Suspension inokuliert
4	Trieb mit Verletzung mit <i>F. proliferatum</i> Suspension inokuliert
5	Bodeninokulation mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
6	Boden- und Triebinokulation mit <i>F. proliferatum</i> Suspension, wobei der Trieb verletzt wurde

#### *Untersuchung der Infektion*

Zur Überprüfung der Infektion mit dem applizierten *F. proliferatum* Isolat wurden in regelmäßigen Abständen [5, 8, 13 und 28 Tage nach Inokulation (dpi)], jeweils sieben Pflanzen zufällig entnommen. Dazu wurden die Pflanzen in Trieb und Wurzel geteilt und sorgfältig unter fließendem Wasser gereinigt. Anschließend wurden acht Speicherwurzeln randomisiert entnommen, sowie der behandelte Trieb (bei den Varianten ohne Triebbehandlung der älteste Trieb) einer dreiminütigen Oberflächendesinfektion mit 3 % Natriumhypochlorid unterzogen, gefolgt von zweimaligem Waschen in autoklaviertem, deionisiertem Wasser. Die so behandelten Pflanzenstücke wurden auf SNA-Platten ausgelegt. Dabei wurde der Trieb der Länge nach in acht 0,5 cm lange Teilstücke zerteilt und von jedem Wurzelteil randomisiert je ein 0,5 cm langes Gewebestück entnommen. Die Kultivierung der SNA-Platten erfolgte unter UV-Licht (Philips TLD 18w/08, 250 – 350 nm) für sieben bis zehn Tage. Danach fand die lichtmikroskopische

Artendeterminierung auf morphologischer Basis statt. Der Versuch wurde 28 dpi beendet, indem die Frischmasse und nach einer Trocknung bei 100 °C für 48 h die Trockenmasse von Trieb und Wurzel bestimmt wurden.

### 3.4.1.2 Spargelfliegenbefall und *Fusarium proliferatum* Infektion

#### *Hauptversuch*

#### *Pflanzenanzucht*

Die Aussaat der Spargelsamen ‚Gijnlim‘ erfolgte wie im *Vorversuch* beschrieben. Die Jungpflanzen wurden nach sechs Wochen in 13er Töpfe in ein Gemisch aus gedämpfter Einheitserde (Fruhstorfer Erde Typ P) und hitzesterilisiertem Sand (100 °C, 24 h; Gemisch 2 : 1) pikiert. Die sechsmonatige Anzucht fand im Gewächshaus bei 22 °C Tag- und 16 °C Nachttemperatur statt und bei einem 16 / 8 h Tag-Nacht-Rhythmus. In dieser Zeit wurden die Pflanzen nach Bedarf gewässert und 14-tägig gedüngt. Während der Anzucht, der für den Versuch benötigten sechs Monate alten Spargelpflanzen, wurde eine regelmäßige Kontrolle auf Schaderreger durchgeführt. Bei Bedarf erfolgte eine Behandlung mit *Aphidius ervi* und *A. colemani* Mumien Mix gegen Blattläuse sowie mit dem Raubmilbenmix *Amblyseius cucumeris* und *A. barkeri* gegen Thripse eine biologische Bekämpfung (Katz Biotech AG). Für den Versuch wurden sechs Monate alte Spargelpflanzen verwendet, die möglichst homogen gewachsen waren. Vier Tage vor der Inokulation und Infektion wurden die oberirdischen Triebe entfernt, um einen Neuaustrieb zu fördern. Der Versuch fand unter Gewächshausbedingungen statt (22 °C mit 16 h Licht pro Tag bei 30 K lux).

#### *Spargelfliege* (*Plioreocepta poeciloptera*)

Die bei dem Herbst-Monitoring gesammelten *P. poeciloptera* Puppen (Kapitel 2) wurden in feuchten Sand eingeschlagen und bekamen für einen Monat eine Wärmebehandlung bei 20 °C, um eine Verkürzung der Diapause zu erreichen (Otto, 2002). Danach folgte die Überwinterung unter konstanten Bedingungen bei 4 °C in der Kühlung. Für den Versuch wurden die überwinterten Puppen in der Klimakammer bei 22 °C zum Schlupf gebracht. Weibchen und Männchen blieben zusammen in den Käfigen, um eine Befruchtung des Weibchens zu gewährleisten. Während dieser Zeit bekamen die Adulten Honigwasser und Pollen als Nahrung angeboten. Je ein Weibchen pro Versuchspflanze kam mittels Plexiglaszylinder (30 cm hoch, 10 cm Ø) für 6 – 8 h an die jungen Spargeltriebe. Zur Kontrolle der Eiablage fand eine visuelle Beobachtung statt.

### Inokulation

Die Herstellung und die Einstellung der Sporendichte ( $4 \times 10^6$  Sporen/mL<sup>-1</sup>) der *F. proliferatum* Sporensuspension erfolgten wie im Vorversuch (simulierter Fliegenbefall kombiniert mit *F. proliferatum* Infektion). Bei der Bodeninokulation wurden pro Topf 8 mL *F. proliferatum* Suspension ( $4 \times 10^6$  Sporen/mL<sup>-1</sup>) mit Hilfe einer Pipette direkt an die Wurzeln gebracht. Bei den Varianten, bei denen der „Trieb inokuliert“ wurde, erfolgte ein Bestreichen des Triebes (Tab. 20). Bei „Fliege kontaminiert“ wurden die Weibchen im Vorfeld aus dem Schlupfkäfig einzeln in Deckelgläsern abgesammelt, um dann mit der Sporensuspension besprüht zu werden. Bei beiden Behandlungsvarianten wurde der *F. proliferatum* Suspension 0,1 % Tween20 zugegeben.

### Varianten

Der Versuch wurde mit acht Varianten angesetzt (Tab. 20), dreimal wiederholt und mit je zehn Spargelpflanzen pro Variante und Wiederholung durchgeführt.

Tab. 20: Beschreibung der Versuchsvarianten

Variante	Beschreibung
1	Kontrolle – angegossen mit Wasser
2	Trieb inokuliert mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
3	Fliege + Trieb inokuliert mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
4	Fliege kontaminiert mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
5	Bodeninokulation mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
6	Bodeninokulation + Fliege + Trieb inokuliert mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
7	Bodeninokulation + Fliege kontaminiert mit <i>F. proliferatum</i> Suspension
8	Fliege alleine und unbehandelt

### Rückisolierung

Zur Überprüfung der Infektion mit dem applizierten *F. proliferatum* Isolat 241 wurde vier Wochen nach der Inokulation von je fünf Pflanzen eine Rückisolierung vorgenommen, wobei Trieb und Wurzel getrennt voneinander betrachtet wurden. Je Pflanze wurden acht Speicherwurzeln sowie der behandelte Trieb (bei den Varianten ohne Triebbehandlung der älteste Trieb) randomisiert entnommen. Nach einer Oberflächendesinfektion wie für den Vorversuch (siehe *Untersuchung der Infektion*) beschrieben, wurden Wurzel und

Trieb in je drei Teilabschnitte zerschnitten und auf SNA ausgebracht. Nach zehn Tagen erfolgte die morphologische Determinierung von *F. proliferatum*.

#### *Probenaufbereitung und DNA-Isolierung für die qRT-PCR*

Für die quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) wurde eine weitere Spargelpflanze pro Variante und Wiederholung in Trieb und Wurzel geteilt und unter fließendem Wasser vom Substrat befreit. Nach einer 2-minütigen Oberflächendesinfektion (3 % NaOCl) wurden die Proben bis zur qRT-PCR-Analyse bei -20 °C gelagert.

Die gefrorenen Spargelstangen wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff bei -20 °C gefriergetrocknet (Christ-Gefrier Trocknung, Beta 1-6, LDC-2M) und anschließend mittels einer Schwingmühle homogenisiert (Retsch-Schwingmühle MM2). Die DNA-Isolierung fand wie im Kapitel 1, Abschnitt 1.3 Monitoring von *Fusarium* spp. und Fumonisine (*Probenaufbereitung und DNA-Isolierung*) statt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### *Bestimmung der DNA-Konzentration*

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe der UV-Absorption bei 260 nm (Implen, Nano Photometer). Um eine Aussage über die Reinheit der Probe zu erhalten, wurde bei 280 nm die optische Dichte (OD) der Proteine bestimmt. Eine Probe wurde nach der Isolierung als rein bezeichnet, wenn das Verhältnis OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> mindestens 1,8 betrug.

#### *Primer Design für die qRT-PCR*

Primer für die qRT-PCR-Analyse (Tab. 21) wurden mit Vector NTI v1 Software (Invitrogen) konstruiert. Die Primer erfüllten die Bio-RAD Kriterien: Länge der Primer zwischen 75 – 200 bp, GC-Gehalt zwischen 40 – 60 %, Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) zwischen 56 – 60 °C. Die Spezifität des Primerpaars wurde durch die BLAST Ähnlichkeitssuche (The Gene Index Project) überprüft. Als Basisequenz für die Primer dienten die Spezies spezifische Primer CLPRO1 und CLPRO2 mit 526 bp (Tab. 21) von Mulè et al. 2003.



Tab. 21: Sequenz der Oligonukleotid Primer innerhalb des Calmodulin Gens.

Primer-Name	Verwendung	Primer Sequenz
CLPRO1	PCR	5'-TGCATCAGACCACTCAAATCCT-3'
CLPRO2		5'-TGTCAGTAACTGGACGTTGGTTGTT-3'
RTPRO1	qRT-PCR	5'-TGCATCAGACCACTCAAATCCTTTA-3'
RTPRO2		5'-TCCTTGGTGGTATCTGGCCTAGAG-3'

### *Primer Überprüfung und Kalibrierung der DNA in den Proben*

Die Überprüfung auf Sensitivität und Spezifität auf dsDNA-Basis der spezifischen qRT-PCR-Primer fand mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) statt. Für die Analysen wurde die DNA der auf PDA gewachsenen *F. proliferatum* Isolate 241, P-1, P-2 und P-3 (siehe Kapitel 1) nach Cenis (1992) isoliert (siehe Kapitel 1, *Molekularbiologische Überprüfung der Fusarium oxysporum und F. proliferatum Isolate*).

Um die Sensitivität der qRT-Primer für den *Fusarium*-Nachweis im inokulierten Pflanzenmaterial zu bestimmen, wurde eine mit *F. proliferatum* Isolat 241 kontaminierte Spargelprobe getestet. Die Isolierung der Pilz-DNA erfolgte wie im Abschnitt *Probenaufbereitung und DNA-Isolierung für die qRT-PCR* beschrieben. Eine weitere Intention war die Kalibrierung der gesamten DNA-Menge für die Pflanzenproben des Versuches, aufgrund des unbekanntes Verhältnisses von Pflanzen und Pilz DNA in den Proben. Dafür wurde die *Fusarium*-DNA-Konzentration des infizierten Triebes ermittelt und eine 10fache Verdünnungsreihe von  $10^0$  bis  $10^5$  überprüft.

Der PCR-Ansatz setzte sich aus 1,25 Einheiten Taq Polymerase (Fermentas, Germany), 1 x PCR-Puffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Germany) und 10 pmol pro Primer zusammen. Ein  $\mu$ L genomische DNA der Proben wurde zum PCR-Ansatz zugefügt, insgesamt wurde ein Probenvolumen von 25  $\mu$ L verwendet. Die PCR-Amplifikation startete mit einer Denaturierungsphase von 94 °C für 4 min, gefolgt von einem 35-fachen Zyklus mit Denaturierung bei 95 °C für 30 sek, Annealing bei 57 °C für 30 sek und einer Elongation bei 72 °C für 1 min, beendet wurde das PCR-Programm durch 7 min Elongation bei 72 °C und eine abschließende Abkühlung auf 10 °C.

### *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction und die Daten-Analyse*

Alle Untersuchungen wurden mit dem Real Time PCR-Gerät "Bio-Rad iQTM" durchgeführt, welches mit Hilfe des Softwareprogramms BioRad iQTM5 Optical System Software Version 2.0 gesteuert wurde. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mittels Sybr® Green-Methode, die auf einem herkömmlichen PCR-Ansatz aufbaut, dem ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green SuperMix for iQTM, Quanta Biosciences) zugesetzt wurde. Dieser fluoreszierende Farbstoff lagert sich in der exponentiellen PCR-Phase in doppelsträngiger DNA ein. In dieser Phase, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt (Amplifikationseffizienz), wird der Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, als  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle) angegeben. Zur Berechnung der unbekanntenen Proben wurde ein Standard (*F. proliferatum*-Isolat 241 auf PDA gewachsen) mit einer 10-fachen Verdünnungsreihe bei jedem Durchgang mitgeführt. Mittels dieser bekannten Ausgangsmenge wurde eine Standard-Kurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den  $C_T$ -Wert konstruiert. Die Berechnung des DNA-Gehalts der unbekanntenen Proben erfolgt durch die Geradengleichung:

$$x = (C_T - b) / m$$

x = relative DNA-Menge

b = Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse

m = Steigung der Geraden

Die Amplifikationseffizienz (E) errechnete sich aus der Steigung der Grade (m) der Standardkurve:

$$E = 10^{-1/m}$$

$$\% \text{ Effizienz} = (E-1) * 100 \%$$

Eine optimale PCR-Effizienz liegt bei 2, d. h. dass sich die Anzahl der Zielsequenzen mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt.

Für die qRT-PCR-Analyse wurde pro Variante (Tab. 20) je eine Spargelpflanze pro Wiederholung einbezogen, aufgeteilt in Trieb und Wurzel. Jede Variante wurde in der qRT-PCR dreimal wiederholt sowie in jedem Ansatz eine Negativkontrolle (TE) und der

Standard einbezogen. Die Standardkurve wurde mit reiner Pilz-DNA (*F. proliferatum*, Isolat 241) in sechsfacher Verdünnung von 1 pg bis 100.000 pg erstellt. Die unbekanntes Pflanzenproben wurden auf eine Gesamt-DNA von 10.0000 pg, auf Grund der unbekanntes Menge an Pflanzen-DNA in den Proben bezogen. Der PCR-Mix enthielt 1 µL dsDNA, 12,5 µL PerfeCTa™ SYBR® Green SuperMix for iQ™ (Quanta Biosciences), 1 µL je spezifischem Primer (10 mM) und doppelt sterilisiertem aqua dest., mit dem bis zu einem gesamt Volumen von 25 µL aufgefüllt wurde. Die qRT-PCR wurde mit dem Real-time Thermocycler Bio-Rad iQ™ durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach einer initialen Denaturation von 3 min bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit je 30 sek bei 95 °C und 30 sek bei 57 °C. Anschließend folgte für die Schmelzkurvenanalyse ein erneuter Denaturierungsschritt bei 95 °C für 1 min, 57 °C für 1 min und 77 Zyklen für je 10 sek bei 57 °C.

#### *Verrechnung der quantifizierten Pilz-DNA*

Die *F. proliferatum* Befallsstärke in den Trieben und in den Wurzeln der Versuchspflanzen wurde anhand der quantifizierten Pilz-DNA und unter Berücksichtigung der standardisierten DNA-Menge in den Proben mittels der Gleichung 2 errechnet.

Gleichung 2:

$$BS \% = \frac{P \times V \times 100}{Z}$$

BS = Befallsstärke [in % von Gesamt-DNA]

P = quantifizierte Pilz-DNA [pg]

V = Verdünnungsfaktor

Z = Probenvolumen [µl]

#### *Statistische Auswertung*

Die varianzanalytische Auswertung der Befallshäufigkeiten im Vorversuch und Hauptversuch erfolgte mit dem Statistikprogramm R (<http://www.R-project.org>) mittels eines generalisierten linearen gemischten Modells (GLMM) unter Annahme von Binomialverteilung (link = logit), indem die Varianten, die Isoliertermine und die Pflanzenvariabilität zwischen den Individuen feste Effekte darstellten (R Development Core Team, 2009; Bates und Maechler, 2009).

Die Pilz-DNA in den Pflanzenproben des Hauptversuches wurde mit der PRC GLM Prozedur statistisch berechnet. Nach signifikanten Unterschieden in der Varianzanalyse (ANOVA,  $P < 0,05$ ) wurden die Mittelwerte zwischen den Varianten mit dem Dunnett-T3-Test ( $P < 0,05$ ) errechnet (SAS Institute, 2001).

### 3.4.2 Ergebnisse

#### 3.4.2.1 Simulierter Fliegenbefall mit *Fusarium proliferatum* Infektion

##### Vorversuch

Die simulierte Ovipositor-Verletzung am Trieb kombiniert mit der *F. proliferatum* Inokulation (Variante 4: Trieb mit Verletzung mit *F. proliferatum* Suspension inokuliert, Variante 6: Boden- und Triebinokulation mit *F. proliferatum* Suspension, wobei der Trieb verletzt wurde), verursachte eine starke Infektion des Triebes (Abb. 14, A). Die inokulierten Triebe (Varianten 4 und 6) unterschieden sich signifikant von den Trieben der Bodeninokulation (Variante 5: Bodeninokulation mit *F. proliferatum* Suspension) (Tukey-Type-Test,  $P < 0,0001$ ). Im Gegensatz dazu war *F. proliferatum* nicht in der Lage, unverletztes Gewebe innerhalb von 28 Tagen zu penetrieren (Variante 3: Trieb ohne Verletzung mit *F. proliferatum* Suspension inokuliert) (Abb. 14, A). Auch die Varianten 1 und 2 wiesen während des Versuchs keine Infektion mit *F. proliferatum* auf. Somit kann angenommen werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines Befalls gering ist. Ferner wurde ein linearer Anstieg der *F. proliferatum* Triebinfection zwischen den Probeentnahmen (5, 8, 13, 28 dpi) ermittelt (Linear,  $P < 0,001$ ) (siehe Anhang: Abb. 23, A).

Auch der Infektionsverlauf in den Wurzeln stieg vom 5. bis zum 28. dpi linear in den behandelten Varianten an (Linear,  $P < 0,001$ ) (siehe Anhang: Abb. 23, B). Im Gegensatz zu den Trieben wurde in allen Varianten ein *F. proliferatum* Befall ermittelt (Abb. 14, B). Allerdings wiesen die Varianten 1, 2 (ohne Inokulation) und 3 (Trieb mit *F. proliferatum* Suspension bestrichen) eine geringe Befallshäufigkeit zwischen 2 % und 3 % auf. Dagegen war der Befall in den Varianten 4, 5 und 6 signifikant höher (Tukey-Type-Test,  $P < 0,001$ ). Die Wurzeln mit dem stärksten Befall wiesen die Varianten 5 und 6 (Bodeninokulation; Bodeninokulation und Triebinokulation) auf, die sich von allen anderen Varianten signifikant unterschieden (Tukey-Type-Test,  $P < 0,0001$ ).

Nach der vierwöchigen Versuchsdauer zeigten die Pflanzen keine Unterschiede zwischen der Frisch- und Trockenmasse der Triebe und Wurzeln. Somit wurde dieser Faktor nicht zur Ermittlung von Behandlungsunterschieden angeführt (Daten nicht gezeigt).

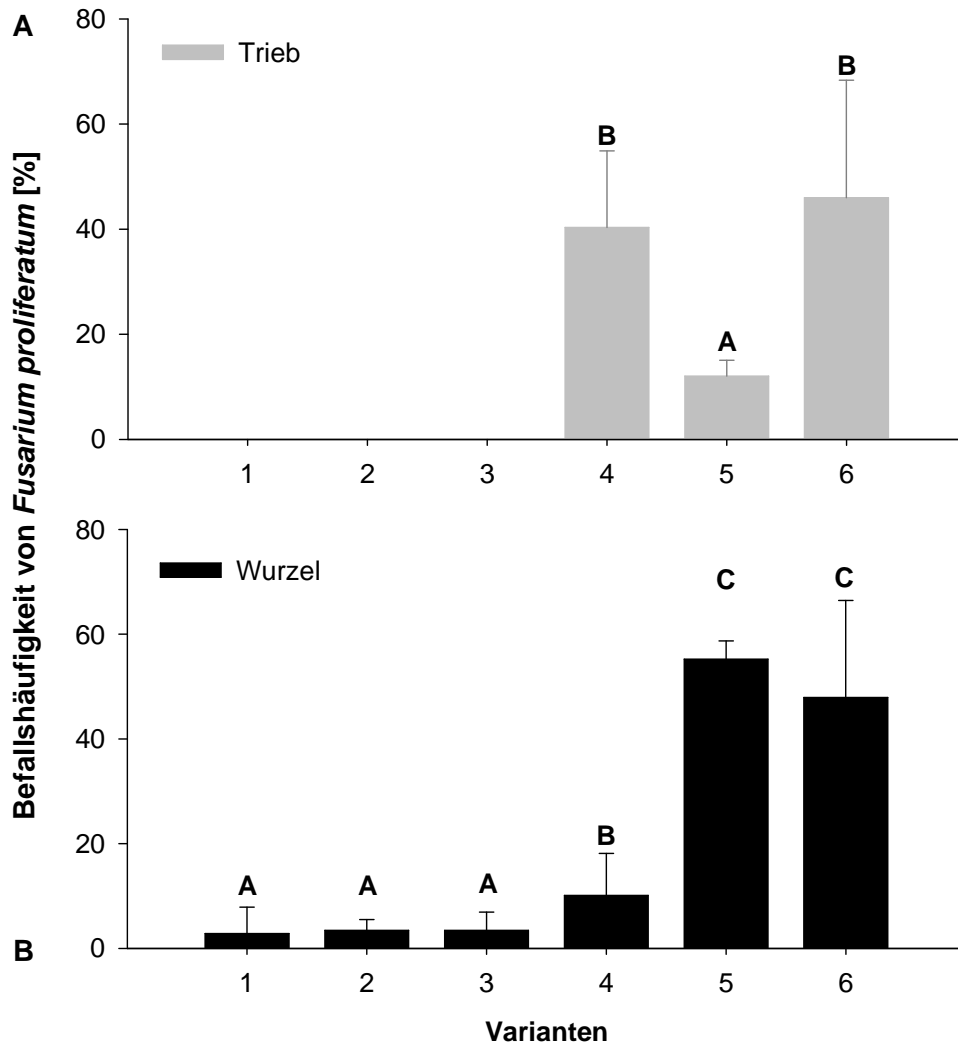


Abb. 14: Befallshäufigkeit von *Fusarium proliferatum* 28 Tage nach der Inokulation (dpi) an *Asparagus officinalis* L. cv. Gijnlim an Trieb (A) und Wurzel (B). Es wurden sechs Varianten getestet: 1 = Kontrolle, angegossen mit Wasser, 2 = Trieb mit Verletzung, bestrichen mit destilliertem Wasser, 3 = Trieb mit *F. proliferatum* Suspension bestrichen, 4 = Trieb mit Verletzung, mit *F. proliferatum* Suspension inokuliert, 5 = Bodeninokulation mit *F. proliferatum* Suspension, 6 = Boden- und Triebinokulation. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet nach Tukey-Typ-Test,  $P < 0.5$  (Modell GLMM), dabei wurde die gesamte Befallshäufigkeit nach 28 dpi berücksichtigt.

### 3.4.2.2 Spargelfliegenbefall und *Fusarium proliferatum* Infektion

#### Hauptversuch

#### Primer Überprüfung und Kalibrierung der DNA-Proben

Beide Primerpaare (Tab. 21) wiesen gegenüber den vier *F. proliferatum* Stämmen (241, P-1, P-2, P-3) eine Spezifität auf (Abb. 15). Das Primerpaar RTPRO1 und RTPRO2 zeigte in der PCR auf genomischer DNA-Basis der Trieb-Probe (316.000 pg DNA Ausgangskonzentration) eine hohe Sensitivität bis zu einer Verdünnung von  $10^2$  auf (3.160 pg genomische DNA Pilz/Pflanze) (Abb. 16). Die Verdünnungen  $10^0$  bis  $10^2$  (316.000 pg bis 31.600 pg) zeigten die höchste Sensitivität. Um eine Detektion des Pilzes mittels qRT-PCR zu erzielen und auf Grund des unbekanntem Anteils von Spargel-DNA in den Proben, wurden die unbekanntem Trieb und Wurzel-DNA-Proben mit unbekanntem Befall aus dem Hauptversuch auf 100.000 pg gesamt DNA normalisiert.

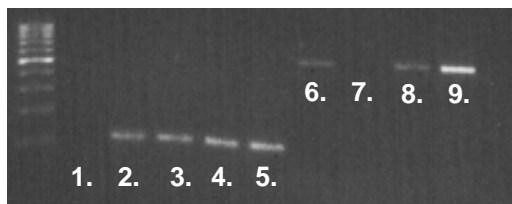


Abb. 15: Geldokumentation der Primer Überprüfung mit genomischer DNA, links 100 bp Marker, PCR-Analyse mit RTPRO1 und 2 (175 bp) Primer: 1. Negativ Kontrolle (TE), 2. 241, 3. P-1, 4. P-2, 5. P-3; CLPRO1 und 2 (565 bp) Primer 6. 241, 7. P-1, 8. P-2, 9. P-3

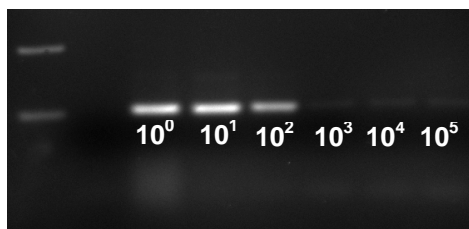


Abb. 16: Geldokumentation der PCR-Analyse mit dem RFPRO1 und RFPRO2 Primerpaar (175 bp). Von links nach rechts 100 bp Marker, TE, fünf Verdünnungsstufen von  $10^0$  bis  $10^5$  der kontaminierten Probe (Ausgangsdichte 316.000 pg =  $10^0$ ).

#### Relative Quantifizierung

Um die Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes zu beurteilen, wurde das DNA-Fragment in der qRT-PCR durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. Die Kontrolle der Amplifikationsprodukte wies nur einen Peak bei einer Schmelztemperatur von 79 °C auf, somit kann davon ausgegangen werden, dass lediglich

ein Produkt (*F. proliferatum*) amplifiziert wurde (Abb. 17). Aus drei qRT-PCR-Durchgängen (Tab. 22) wurden die Standardkurven gemittelt (Abb. 18, A). Die durchschnittliche Standardkurve zeigt eine Steigung von -3,35 und somit eine gute Amplifikationseffizienz von 102,98 % und die Linearität im hohen Bereich von 0,98 %.

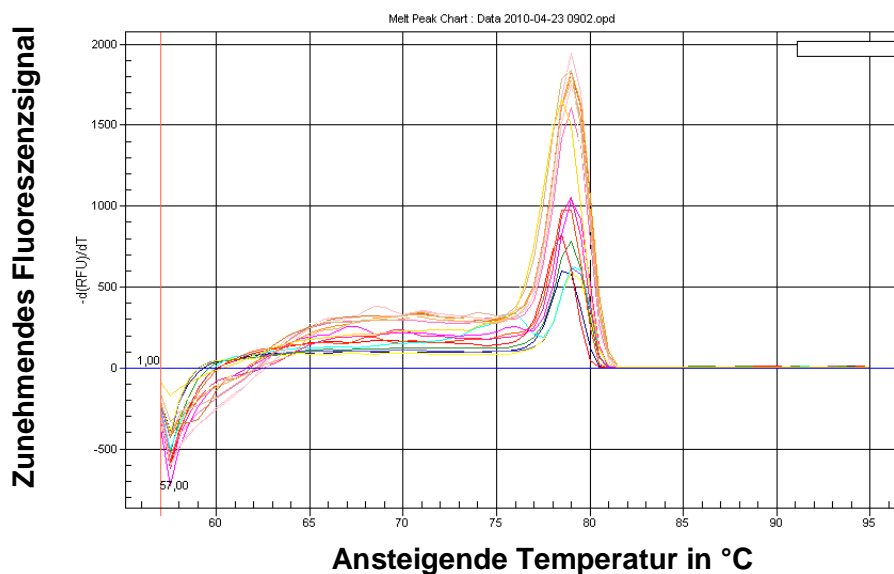


Abb. 17: Schmelzkurven Analyse des amplifizierten PCR-Produkts, *F. proliferatum*.

Tab. 22: Werte der Standardkurven aus den drei qRT-PCR Durchgängen.

Durchgang	R <sup>2</sup>	m	b	E %
1	0,984	-3,296	37,531	98,96
2	0,952	-3,035	33,818	113,00
3	0,932	-3,218	35,252	104,5

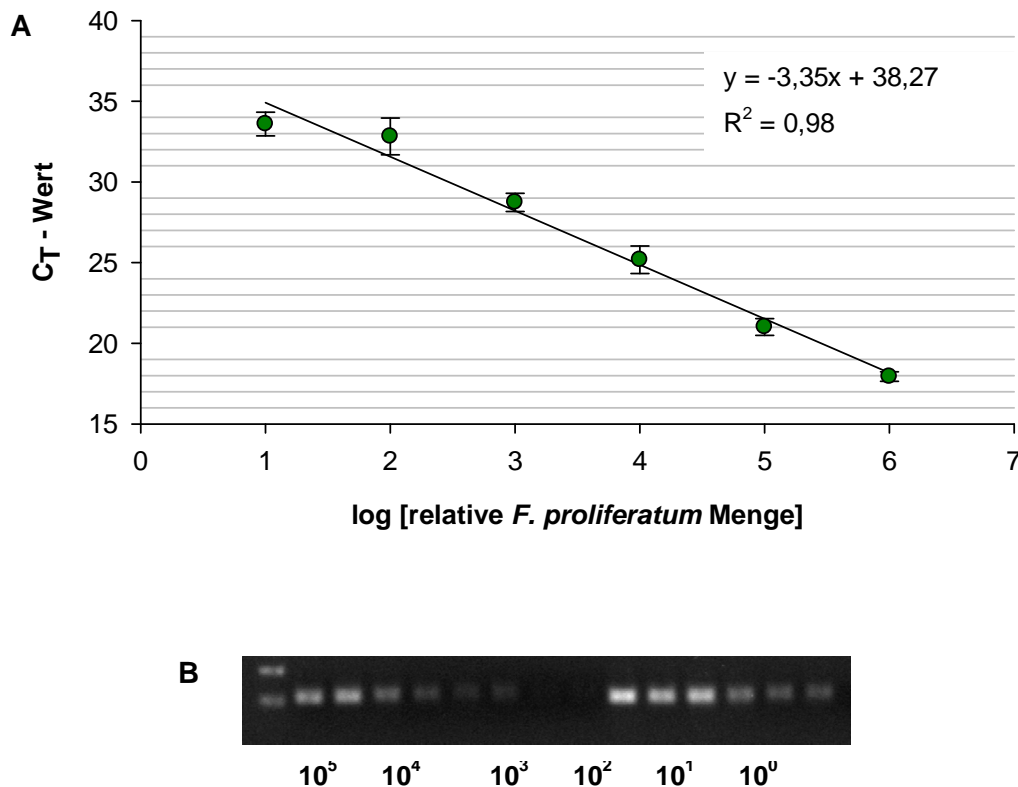


Abb. 18: Eichgerade mit  $C_T$ -Werte und 10er Logarithmus der reinen genomischen DNA von *Fusarium proliferatum* (Isolat 241) (A). Unteres Foto (B), Geldokumentation von zwei Standardreihen (*F. proliferatum* Isolat 241) mit 100 bp Marker und je Verdünnungsreihe von  $10^5$  bis  $10^0$  (von rechts nach links).

#### Quantifikation von *F. proliferatum* in Trieb und Wurzel mittels qRT-PCR

Aus den Versuchspflanzen konnte *F. proliferatum* DNA mittels spezifischer Primer zwischen 1 pg und 100.000 pg detektiert werden (Tab. 23). Die unbehandelte Kontrolle wies an den Trieben keine Infektion mit *F. proliferatum* auf. Der Einsatz der Spargelfliege in den Varianten 3, 4, 6 und 7 bewirkte eine signifikant erhöhte Befallsstärke mit *F. proliferatum* im Trieb im Vergleich zu den Varianten ohne Fliege (1 und 2) ( $F_{(7, 16)} = 5,07$ ,  $P = 0,004$ ). Die Varianten 6 und 7 (Bodeninokulation + Fliege + Trieb inokuliert mit *F. proliferatum* Suspension; Bodeninokulation + Fliege kontaminiert mit *F. proliferatum* Sporen) unterschieden sich trotz der hinzukommenden Bodeninokulation nicht signifikant von den Varianten 3 und 4 (Fliege + Trieb inokuliert mit *F. proliferatum* Suspension; Fliege kontaminiert mit *F. proliferatum* Sporen) (Dunnnett T3,  $P < 0,05$ ). Dagegen zeigte die Variante 2 (Trieb inokuliert mit *F. proliferatum* Suspension) keine Infektion mit



*F. proliferatum* und unterschied sich somit nicht signifikant von der Kontrolle (Dunnett T3,  $P = 1,00$ ). In der Variante 8 (Fliege unbehandelt) wurden sehr hohe  $C_T$ -Werte von 39 gemessen, diese lagen außerhalb der Standardkurve und waren somit kleiner als 1 pg.

Im Allgemeinen konnte in den Wurzeln nur ein sehr geringer *F. proliferatum* Befall quantifiziert werden (Tab. 23). Die Wurzeln der Kontroll-Variante waren frei von *F. proliferatum* DNA. Ebenfalls konnte kein Befall in den Varianten 4 und 8 (Fliege kontaminiert; Fliege unbehandelt) festgestellt werden. Dagegen wies die Variante 3 (Fliege + Trieb inokuliert) mit einer Befallsstärke von 0,03 % einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle auf (Dunnett T3,  $P = 0,027$ ). Die Bodeninokulation kombiniert mit der Fliege und *F. proliferatum* Inokulation (Variante 6) erzielte mit 0,56 % die höchste Befallsstärke in den Wurzeln (Dunnett T3,  $P = 0,001$ , im Vergleich zur Kontrolle).

Die Rückisolierung und somit die morphologische Kontrolle auf *F. proliferatum* Befall zeigte, dass aus den infizierten Trieb- und Wurzelgewebe auf den SNA-Platten nur *F. proliferatum* herauswuchs.

Tab. 23: *Fusarium proliferatum* Befallsstärke ( $\pm$  Standardabweichung (SD)) [%] in Trieb und Wurzel, mit qRT-PCR ermittelt, bezogen auf 100.000 pg genomische Gesamt-DNA.

Nr.	Varianten	Befallsstärke von <i>Fusarium proliferatum</i> [%] $\pm$ SD			
		Trieb (n=3)		Wurzel (n=3)	
1	Kontrolle	0,00 $\pm$ 0,00	a <sup>1</sup>	0,00 $\pm$ 0,00	A
2	Trieb inokuliert	0,00 $\pm$ 0,00	a	0,02 $\pm$ 0,04	ABC
3	Fliege + Trieb inokuliert	32,47 $\pm$ 25,05	b	0,03 $\pm$ 0,01	B
4	Fliege kontaminiert	9,06 $\pm$ 3,05	b	0,00 $\pm$ 0,00	A
5	Bodeninokulation	0,02 $\pm$ 0,01	a	0,16 $\pm$ 0,05	C
6	Bodeninokulation + Fliege + Trieb inokuliert	25,32 $\pm$ 11,97	b	0,56 $\pm$ 0,07	C
7	Bodeninokulation + Fliege kontaminiert	5,15 $\pm$ 1,09	b	0,29 $\pm$ 0,26	BC
8	Fliege unbehandelt	n.d. <sup>2</sup>		0 $\pm$ 0	A

<sup>1</sup> Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach Dunnett T3,  $P < 0,05$ .

<sup>2</sup> n.d. = nicht detektierbar, Wert lag außerhalb der Standardkurve ( $< 1$  pg).

### 3.5 Diskussion

Um die Interaktion zwischen dem Auftreten von *Fusarium* spp. und *P. poeciloptera* zu untersuchen, wurden in drei aufeinanderfolgenden Jahren Feldproben zum Zeitpunkt der Laubabreife genommen. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die Larven der Spargelfliege durch die Spargeltriebe gefressen und sich im unteren Triebabschnitt verpuppt. Das auf neun niedersächsischen Spargelfeldern durchgeführte Monitoring zeigte die Tendenz, dass mit dem Puppenbesatz auch die *Fusarium* spp. Infektion steigt ( $R^2 = 0,60$ ). Insbesondere auf Junganlagen ( $\leq 3$  Jahre) war dies verstärkt zu beobachten ( $R^2 = 0,70$ ), wobei sich die Anfälligkeit der Junganlagen durch die verkürzte Ernte erklären lässt. Während die älteren Anlagen ( $\geq 4$  Jahre) bis in den Juni abgeerntet werden, wachsen die Spargeltriebe auf den jüngeren Feldern bereits Mitte Mai heraus (Hartmann, 1989; Otto, 2002). Das hat zur Folge, dass die Junganlagen früher dem Befall mit *P. poeciloptera* ausgesetzt sind und somit auch früher die Ausbreitung von *Fusarium* spp. über Triebverletzungen stattfinden kann. Allerdings können auf den Feldern auch andere Schaderreger die Infektion mit *Fusarium* spp. begünstigt haben (van Bakel & Krom-Kerstens, 1974; Gilbertson et al., 1985). In den Jahren des Monitorings konnten tierische Schaderreger wie Spargelhähnchen (*Crioceris asparagi*) und Spargelkäfer (*C. duodecimpunctata*) sowie die pilzlichen Erreger *Stemphylium botryosum* (Spargellaubkrankheit) und *Puccinia asparagi* (Spargelrost) beobachtet werden. In anderen Kulturen wie beispielsweise bei Mais ist bekannt, dass die Infektion mit Fusarien insbesondere durch die Aktivität von tierischen Schaderregern gefördert wird. Eine Erhöhung der Fusarien in Mais konnte mit dem Auftreten des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) (Munkvold et al., 1999; Sobek & Munkvold, 1999; Piva & Pietri, 2002), des Westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Gilbertson et al., 1986; Kurtz et al., 2010) sowie mit dem Picknick-Käfer (*Glischrochilus quadrisignatus*) (Windels & Windels, 1974; Windels et al., 1976; ) in Verbindung gebracht werden. Sie schädigen die Maispflanze durch die Fraßaktivität der Larven an Wurzel und Stängel sowie der Adulten an jungen milchreifen Maiskörnern und schaffen somit Eintrittspforten für pilzliche Erreger, womit deren Verbreitung gefördert wird. Insbesondere die *Fusarium*-Arten aus der Sektion Liseola, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* u. a., werden mit Insekten in Verbindung gebracht (Munkvold, 2003). Aufgrund ihrer in Ketten angeordneten Mikrokonidien können diese Arten leicht via Wind und Wasser verbreitet werden (Nelson et al., 1981).

Aufschluss über den Einfluss der Spargelfliege auf die *Fusarium* spp. Verbreitung gaben die Gewächshausversuche an jungen Spargelpflanzen. Es konnte festgestellt werden, dass bereits die simulierte Ovipositor Verletzung dazu führte, dass sich *F. proliferatum* im

Triebgewebe ausbreitete und sogar die unbehandelten Wurzeln eine Befallshäufigkeit von 10 % aufwiesen. Allerdings wurde auch aus den Wurzeln der unbehandelten Kontrolle *F. proliferatum*, mit einer geringen Befallshäufigkeit von 2,83 % isoliert. Durch die randomisierte Anordnung des Versuches kann eine Verbreitung der Mikrokonidien durch Bewegungen (z.B. Wind) nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Vorversuches lassen darauf schließen, dass durch Schaffung kleinster Verletzungen die *F. proliferatum* Infektion begünstigt wird.

Durch den kontrollierten Einsatz von *P. poeciloptera* Weibchen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Bohrlöcher am oberirdischen Trieb, hervorgerufen durch den Ovipositor des Weibchens, ideale Eintrittspforten für *F. proliferatum* Sporen darstellen. Der direkte Kontakt der Sporensuspension mit dem Bohrloch und der folgende Larvenfraß führten zu einer schnellen Verbreitung des Pilzes im Trieb, deren Befallsstärken bis zu 32,47 % betragen. Aber nicht nur die direkte Inokulation mit einer *F. proliferatum* Suspension war ausschlaggebend, sondern die Adulten selber waren in der Lage die am Körper getragenen Sporen direkt am Bohrloch zurückzulassen und damit eine Befallsstärke der Triebe von 9,06 % zu bewirken. Entsprechend Dinkler (1934) und Otto (2002) konnte beobachtet werden, dass sich die Adulten während der 6 h im Plexiglaszylinder an den Pflanzen immer wieder auf den Boden zurückzogen. Eine dadurch entstehende Kontamination der Adulten mit *Fusarium* spp. Sporen auf den Spargelfeldern ist wahrscheinlich. Insbesondere *F. proliferatum* wurde immer wieder mit oberirdischem Spargelgewebe (Blüten, Samen, Triebe) assoziiert (Inglis, 1980; Gilbertson & Manning, 1983; LaMondia & Elmer, 1989). Analysen auf amerikanischen Spargelfeldern zeigten, dass die Minierfliege (*O. simplex*) durch den Larvenfraß an dem unterirdischen Spargeltriebabschnitt und den akropetal verlaufenden Bohrgängen zur Verbreitung von *Fusarium*-Sporen beiträgt und somit eine Verstärkung die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule verursacht (Gilbertson et al., 1985; Tuell, 2003). Weiterhin wurden alle Entwicklungsstadien von *O. simplex* mit *Fusarium* spp. in Verbindung gebracht. Bekämpfungsversuche reduzierten nicht nur die Minierfliege sondern auch die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule (Damicone et al., 1987).

Auffallend war die unterschiedlich hohe *F. proliferatum* Befallsstärke zwischen Trieb und Wurzel im Hauptversuch (Tab. 23). Gestützt auf die Aussage von Gilbertson et al. (1985), dass eine geschädigte und/oder tote Epidermis ein hervorragendes Nährmedium für Fusarien darstellt, kann angenommen werden, dass die Triebverletzung eine gute Infektionsquelle und die Bohrgänge einen schnellen Verbreitungsweg ergeben. Beim Eindringen über die Wurzel muss der Pilz zuerst eine Hyphenanhäufung auf der Wurzeloberfläche bilden, mit deren Hilfe Penetrationshyphen über Stomata oder

Wurzelspitzen eindringen (Pennypacker, 1981; Smith & Peterson, 1985). Laut Kamula et al. (1994) kann die Infektion über die Wurzel mehrere Tage dauern. Durch die angewendete qRT-PCR-Technik war es möglich, diese räumlichen Verteilungsunterschiede des *F. proliferatum* Inokulums im Spargel zu detektieren und somit den Krankheitsverlauf über unterschiedliche Infektionsquellen zu bewerten.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Bekämpfung des Schaderregers zusätzliche Eintrittspforten für Fusarien abwendet und somit einer Ausbreitung entgegenwirkt. Bekämpfungsmaßnahmen von *O. nubilalis* im Maisanbau konnten die Ausbreitung von *F. verticillioides* u. a. verringern (Lew et al., 1991; Magg et al., 2002; Saß et al., 2007). Auch im Spargelanbau zeigten Behandlungen mit Insektiziden in einem angelegten Feldversuch gute Erfolge, bei denen *O. simplex* sowie die *Fusarium* spp. Infektionen an den Jungpflanzen reduziert werden konnten (Damicone & Manning, 1985). Allerdings müssen im Spargelanbau auch die kulturbedingten Infektionsquellen betrachtet werden. Phytopathogene Fusarien sind fakultative Parasiten, die in der Lage sind sowohl in der Pflanze als auch saprophytisch an organischer Bodensubstanz bzw. Pflanzenresten zu überleben und die somit natürlicherweise im Boden vorkommen (Gerlach & Nirenberg, 1982). Die während des Ernteprozesses am Stängelgrund entstehenden Schnittstellen können ebenfalls Eintrittspforten darstellen und somit zur Ausbreitung von *Fusarium* spp. in der Pflanze beitragen (Weidenböcker, 1999; Goßmann, 2008). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule auch ohne *P. poeciloptera* auf kurz oder lang während der bis zu 10-jährigen Kulturdauer auftritt. Jedoch würden Maßnahmen zur Reduzierung des Insektenbesatzes, insbesondere des Hauptschädling *P. poeciloptera*, dazu führen, dass die Verletzungen am oberirdischen Trieb verringert werden und damit auch die Befallshäufigkeit der *Fusarium* spp. Infektion. Für eine lange Kulturführung der Spargelanlagen ist insbesondere der Schutz der Junganlagen notwendig.

## Allgemeine Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte zur Befallssituation von *Fusarium* spp. und der Spargelfliege (*P. poeciloptera*) im Spargel untersucht sowie die potenzielle Gefährdung durch Fumonisin-Kontamination (Kapitel 1). Zum einen wurden mehrjährige Felduntersuchungen zur Erntezeit und im Herbst auf niedersächsischen Spargelfeldern zur Ermittlung der Befallshäufigkeit durchgeführt, und zum anderen haben Versuche unter kontrollierten Bedingungen die Beziehung zwischen Befall und Virulenz der Fusarien an Spargeljungpflanzen näher betrachtet (Kapitel 1 & 2). Des Weiteren wurden Verbreitungsmöglichkeiten von Fusarien im Spargel untersucht, insbesondere die Interaktion zwischen *Fusarium* spp. und *P. poeciloptera* (Kapitel 3). Die verschiedenen Ansätze dienen dem Ziel, den Verlauf des *Fusarium*-Befalls besser einzuschätzen und erste Bekämpfungsmöglichkeiten zu entwickeln, insbesondere für junge Spargelfelder. In Freilandversuchen wurden Möglichkeiten zur Reduzierung des Befalls durch die Spargelfliege mittels konventioneller Insektizide und alternativ durch UV-reflektierende Mulchfolie untersucht, mit dem Ziel, durch die Bekämpfung der Fliege zu einer indirekten Kontrolle von *Fusarium* spp. beizutragen (Kapitel 2).

Das 2-jährige Monitoring auf den Spargelfeldern zeigte, dass *Fusarium* spp. von den Spargelstangen auf alten wie auf jungen Spargelfeldern isoliert werden konnte (Kapitel 1.3). Die Befallshäufigkeit stieg kontinuierlich im Laufe eines Jahres an. Am Anfang der Ernte im Mai wiesen durchschnittlich 35 % (2009) bzw. 57 % (2008) der Spargelstangen Fusarien auf. Im Juni stiegen die Befallshäufigkeiten auf 38 % (2009) und 68 % (2008) an, und zur Laubabreife im Herbst waren sogar durchschnittlich 95 % aller Stangen befallen. Es ist bekannt, dass Temperaturen und die vorherrschende Feuchtigkeit das Myzelwachstum, die Keimung der Konidien sowie die Bildung von Chlamydosporen beeinflussen (Smith & Peterson, 1985; Nelson et al., 1981). Es ist anzunehmen, dass der Befallsverlauf von Mai bis September auf Einflüssen abiotischer Art beruht. Die zum Juni ansteigenden Temperaturen können folglich zu einer Beschleunigung der *Fusarium* spp. Verbreitung geführt haben. Van Bakel & Krom-Kerstens (1974) stellten fest, dass mit steigenden Temperaturen (> 17 °C) in 10 cm Bodentiefe eine vermehrte Infektion der Spargeltriebe mit *F. culmorum* unterhalb der Bodenoberfläche erfolgte und dass hohe Niederschläge und Wind zum Anstieg oberirdischer Infektionen führen. Temperaturen von 15 °C bewirkten bei *F. oxysporum* bereits eine Steigerung des Myzelwachstums auf PDA (Kapitel 1.4.1.2). Außerdem wird davon ausgegangen, dass die Ausbreitung von *Fusarium* spp. durch den Ernteprozess selbst begünstigt wird (Weidenböner, 1999;

Goßmann et al., 2008). Durch das Entfernen aller Triebe wird die Pflanze aufgrund der für die Regeneration aufgewendeten Kohlenhydrate geschwächt (Hartmann, 1989). Für die Pflanze stellt der Erntevorgang eine Stresssituation dar, der zu einer reduzierten Widerstandskraft gegenüber Pathogenen führt (Endo & Burholder, 1971). Allerdings kommt es durch das regelmäßige Stechen der Triebe auch zur Eingrenzung der *Fusarium* spp. Entwicklung. Erst nach der Ernte, wenn die Spargeltriebe herauswachsen, kann sich der Pilz akropetal bis in die Phyllokladien ausbreiten, was im Zusammenhang mit der Witterung, höheren Temperaturen im Juli und August sowie Sporenverbreitung via Wind und Regen, zu den extremen Befallshäufigkeiten im Herbst geführt haben kann.

Neben den abiotischen Faktoren können biotische Einflüsse ebenfalls zur Intensivierung des *Fusarium*-Befalls beigetragen haben. Bereits seit dem 19. Jahrhundert ist bekannt, dass Insekten als Überträger von Pflanzenkrankheiten fungieren (Böning, 1929). Beispielsweise bildet der Mutterkornpilz (*Claviceps purpurea*) Honigtau bei der Zersetzung des Getreidesamens, diese süße Flüssigkeit lockt Insekten an, die dann die Konidien an andere Pflanzen (z. B. blühende Gräser) weitergeben. Neben der Kontaktübertragung von Sporen kann es durch Insekten auch zur Wundübertragung kommen (Börner, 1997). Im Spargel tritt die Spargelfliege (*P. poeciloptera*) als bedeutendster Schädling in Europa auf. Auf den neun niedersächsischen Spargelanlagen konnte eine z. T. starke Aktivität von *P. poeciloptera* nachgewiesen werden (Kapitel 2.3). Ein fortdauernder Schlupf der Adulten von April bis Ende Juli wurde in den drei Untersuchungsjahren erfasst, wobei das Aufkommen abhängig vom Standort, von der Temperatur und vom Alter der Spargelfelder war. Generell kann davon ausgegangen werden, dass *P. poeciloptera* auf jüngeren Spargelanlagen ( $\leq 3$  Jahre) verstärkt im April und Mai auftritt, wohingegen die Adulten auf den älteren Anlagen ( $\geq 4$  Jahre) vermehrt im Juni und Juli zu beobachten sind. Die Weibchen der Fliege fügen den oberirdischen Spargeltrieben Wunden zu, in dem sie für die Eiablage und das Host-feeding mit dem Ovipositor in die Triebe stechen. Kontrollierte Versuche im Gewächshaus zeigten, dass geringe Verletzungen von 1 mm  $\varnothing$  bereits Eintrittsporten für *F. proliferatum* Sporen darstellen (Kapitel 3.4). Der kontrollierte Einsatz von *P. poeciloptera* Weibchen erbrachte den Nachweis, dass der direkte Kontakt der *Fusarium*-Sporensuspension mit dem Bohrloch des Ovipositors und der folgende Larvenfraß zu einer sehr schnellen Verbreitung des Pilzes in der Pflanze führen können. Im Vergleich zur Besiedlung über die Wurzel zog die Infektion über die Einstichstelle am Trieb eine wesentlich höhere Befallsstärke nach sich. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass die Adulten als Überträger der Sporen dienen. Die Kontamination der Fliegen mit *Fusarium*-Sporen könnte beispielsweise über kontaminierte Erde stattfinden, da sich die Adulten immer

wieder am Boden aufhalten. Die Verwundungen am Trieb tragen folglich zur Ausbreitung des Pilzes in der Pflanze bei. Insbesondere infizierte oberirdische Pflanzenteile, wie Triebe, Blüten und Früchte, stellen nach der Einarbeitung im Herbst eine bedeutende Inokulumquelle für das nächste Jahr dar. Durch die Einarbeitung des infizierten Pflanzenmaterials kann es zu einer homogenen Verbreitung des Pilzes im Bestand kommen. Allerdings kann auf Grundlage der vorliegenden Studien davon ausgegangen werden, dass die Befallshäufigkeit während der Erntezeit stark von der vorherrschenden Witterung abhängig ist. An dieser Stelle kann diesbezüglich nur spekuliert werden, da diese Fragestellung in der Arbeit nicht berücksichtigt wurde.

Mit dem Anstieg der *Fusarium* spp. Befallshäufigkeit von Mai bis September wurde ebenfalls ein erhöhtes Aufkommen der für die Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule an Spargel beschriebenen Symptome beobachtet, wie rötlich-braune Läsionen an den befallenen Pflanzenteilen, oberirdische Aufhellungen der Phyllokladien, Welketrachten bis hin zum Absterben der ganzen Pflanze (van Bakel & Kerstens, 1970; Endo & Burkholder, 1971; Unerecker, 1972; Wolterstorff, 1990) (Kapitel 1.3.2). Die Felduntersuchungen zeigten, dass das rötlich-braune Spargelgewebe mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* infiziert war und die Symptome mit der *Fusarium*-Infektion stark korrelierten ( $R^2 = 0,85$ ), wobei unabhängig vom Standort und Alter der Anlage *F. oxysporum* als dominanteste *Fusarium*-Art ermittelt wurde, gefolgt von *F. proliferatum*. Es liegt nahe, davon auszugehen, dass die abiotischen Einflussfaktoren nicht nur die Inokulumdichte beeinflussen, sondern auch die Entwicklung der sichtbaren Krankheitssymptome. Nach siebenwöchiger Inkubationszeit mit *F. oxysporum* oder *F. proliferatum* bei einer für beide *Fusarium*-Arten idealen Entwicklungstemperatur von 22 °C (Kapitel 1.4.2.2) wurden an den Spargeljungpflanzen ebenfalls rötlich-braune Läsionen an Wurzel und Triebbasis beobachtet (Kapitel 1.4.2.1). Die Infektion mit *Fusarium* spp. führt zum einen dazu, dass durch die Läsionen an den Stangen die Qualität gemindert wird und zum anderen wird die Wurzelmasse stark reduziert, beides mindert den Ertrag. Die Gewächshausversuche zeigten, dass die Wurzelmasse durch die Infektion bis zu 86 % verringert wurde (Kapitel 1.4.2.1). Im Wurzelgewebe (Speicherwurzeln) werden die Reservekohlenhydrate (RKH) gespeichert, deren Gehalt die Knospenentwicklung und folglich auch direkt den Ertrag beeinflusst (Paschold et al., 2002), wobei neben der Anzahl auch die Dicke der Knospen von Bedeutung ist, da Spargel als monokotyle Pflanze nicht zu sekundärem Dickenwachstum fähig ist. In welchem Ausmaß die Ernte beeinträchtigt wird, hängt unter anderem vom Infektionsdruck ab und dieser von den vorherrschenden äußeren Umständen.

Die Befallshäufigkeit und die Zusammensetzung der *Fusarium*-Arten können neben den Ernteaufällen noch zu weiteren Beeinträchtigungen des Ernteguts führen. Mittels der auf Reis kultivierten Einsporenkulturen der beiden Hauptverursacher *F. oxysporum* und *F. proliferatum* konnte nachgewiesen werden, dass alle von Spargel stammenden Isolate in der Lage waren, Fumonisine (FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub>) zu produzieren (Kapitel 1.4.2.3), wobei *F. proliferatum* nach 28 Tagen Inkubationszeit bei 22 °C mit bis zu 65 ppm die höheren Werte aufwies. Im Vergleich dazu produzierten die *F. oxysporum* Isolate geringere Mengen FB, die zwischen 0,89 ppm und 17,69 ppm stark variierten. Untersuchungen von Marin et al. (1999) und Waskiewicz et al. (2010) zeigten, dass *F. proliferatum* und *F. oxysporum* bei niedrigen Temperaturen (15 °C, 18 °C) die höchsten FB-Werte produzierten. Der Temperatureffekt auf die Biosynthese der FB-Produktion von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* erscheint ausschlaggebend für die Höhe der Werte zu sein, wobei das Myzelwachstum und die Bildung von Konidien der Fusarien durch ansteigende Temperaturen gesteigert (Kapitel 1.4.2.2) und dagegen die FB-Produktion eher bei niedrigen Temperaturen angeregt wird. Die Analysen der Spargelstangen der niedersächsischen Spargelanlagen weisen daraufhin, dass die Menge der Pilzbiomasse einen weiteren Einflussfaktor auf die FB-Menge darstellen könnte (Kapitel 1.3.2). Auf dem nicht beernteten Versuchsfeld I wiesen die Spargelstangen hohe Werte von bis zu 281,7 ppm auf. Auf diesem Feld wurde im Gegensatz zu den anderen acht Anlagen keine Ernte durchgeführt und folglich konnte sich *Fusarium* spp. ungehindert ab Vegetationsbeginn in den Stangen vaskulär ausbreiten. Ferner können *Fusarium*-Sporen über oberirdische Triebverletzungen eingedrungen sein. Die Befallshäufigkeiten in den Spargelstangen auf Feld I lagen in den beiden Untersuchungsjahren, im Vergleich zu den konventionell beernteten Feldern, um ein Vielfaches höher. Ein mittlerer Zusammenhang zwischen Pilzbiomasse und FB-Werten konnte anhand der Spargelstangen aus den Ernten 2008 und 2009 berechnet werden ( $R^2 = 0,60$ ).

Während der Felduntersuchungen wiesen zu allen Probeentnahmen auch symptomfreie Gewebestücke *Fusarium* spp. auf (Kapitel 1.3.2). Um die Diversität verschiedener *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate von Spargelgewebe näher zu betrachten, wurden die Myzelwachstumsrate auf PDA und die Pathogenität sowie die Virulenz an Spargeljungpflanzen bewertet. Die Wachstumsrate auf PDA zeigte erste Unterscheidungen zwischen und innerhalb den *Fusarium*-Arten. Das Myzel der *F. oxysporum* Isolate wuchs bei Temperaturen von 15 °C, 20 °C und 25 °C signifikant schneller als bei den *F. proliferatum* Isolaten (Kapitel 1.4.2.2). Allerdings nahm das Myzelwachstum der *F. proliferatum* Isolate bei 20 °C deutlich zu. Innerhalb der *Fusarium*-Arten konnten nur vereinzelt Unterschiede ermittelt werden. Im Topfversuch erwiesen sich



nach einer siebenwöchigen Inkubationszeit alle Isolate im Vergleich zur Kontrolle anhand der Wurzelrockenmasse und des Befallsgrads der Wurzeln als pathogen und teilweise hoch virulent (Kapitel 1.4.2.1). Kein Einfluss auf die Virulenz der jeweils sechs *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Isolate zeigten die Unterscheidungsmerkmale wie Herkunft (Feld) und Zeitpunkt der Entnahme. Auch bei der Symptomausprägung des Spargelgewebes, von dem die Isolate entnommen wurden, konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Virulenz nachgewiesen werden.

Mit den Versuchen in Kapitel 3 konnte nachgewiesen werden, dass bereits kleine Verletzungen am Trieb den *Fusarium*-Sporen zum Eindringen in die Spargelpflanze dienen. Nach dem Eindringen erfolgt eine schnelle Verbreitung im gesamten Trieb. Um die biotischen Einflussfaktoren, in diesem Fall die Spargelfliege, auszuschalten, wurden in Freilandversuchen Insektizide und eine UV-reflektierende Folie getestet (Kapitel 1.3.2). Von den geprüften Insektiziden erzielte nur Coragen, mit einer Zulassung gegen Maiszünsler, Apfelwickler und Kartoffelkäfer, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen signifikant reduzierten Befall. Das gegen *P. poeciloptera* zugelassene Insektizid Perfekthion bewirkte lediglich eine geringfügige Reduzierung des Befalls mit *P. poeciloptera*, der sich nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Um den Befall und somit auch die Wundübertragung von *Fusarium* spp. Konidien effektiv zu verringern, ist es notwendig, wirksame Insektizide während der Ruhephase (Kältestarre) anzuwenden, die bei Temperaturen unter 15 °C stattfindet. Als eine Alternative zur chemischen Bekämpfung wird im Gemüsebau gegen Weiße Fliege, Blattläuse und Thripse seit einiger Zeit eine UV-reflektierende Folie eingesetzt. Die Wirkung dieser Folie beruht auf einer hohen Reflektion von UV-Licht in den Pflanzenbestand, wodurch die Orientierung der Insekten so stark beeinträchtigt wird, dass es nicht zum Kontakt mit der Wirtspflanze kommt. Der Einsatz dieser UV-reflektierenden Folie zeigte im Freilandversuch auch gegen *P. poeciloptera* gute Bekämpfungserfolge (Kapitel 2.4.2). Im Vergleich zu den Insektiziden reduzierte die Folie den Befall am wirkungsvollsten. Allerdings ist die Folie für den Einsatz im Feld noch nicht geeignet, da die Ausbringung nach der Ernte durch das Herauswachsen der Sprosse erschwert wird.

Abschließend kann festgestellt werden, dass Infektionen mit *Fusarium* spp. auf niedersächsischen Spargelanlagen regelmäßig auftreten, wobei die Intensität stark von exogenen Faktoren abiotischer und biotischer Art abhängig ist. Die Zusammensetzung der *Fusarium*-Arten erwies sich dagegen als unabhängig von äußeren Einflüssen. Auf allen Flächen dominierte *F. oxysporum*, gefolgt von *F. proliferatum*. Die erhobenen Daten zur Beurteilung der Virulenz beider *Fusarium*-Arten wiesen nur geringe Abstufungen

hinsichtlich der Auswirkung auf. Allerdings konnten gezeigt werden, dass eine Infektion mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* unter optimierten Wachstumsbedingungen im Gewächshaus zu einer starken Wurzelreduktion führt, wodurch die Vitalität und damit auch der Ertrag der Pflanze stark beeinträchtigt werden. Eine weitere Gefährdung geht vom Mykotoxin-Bildungspotenzial der beiden Hauptverursacher, *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, aus. Unter *in vitro* Bedingungen konnte bei *F. oxysporum* Isolaten ein heterogenes FB-Bildungspotenzial nachgewiesen werden, mit teilweise hohen FB-Werten. *F. proliferatum* erwies sich dagegen als Produzent homogener und tendenziell hoher Gehalte von Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Kontaminationen in den Spargelstangen während der Erntezeit eher im Bereich der Unbedenklichkeit. Die Spargelfliege stellte sich als wichtiger biotischer Faktor zur Verbreitung von *Fusarium*-Sporen dar. Die durch den Ovipositor des Weibchens hervorgerufenen Verletzungen am Trieb bildeten Eintrittspforten für Fusarien. Die *Fusarium*-Infektion verbreitete sich über die Wunde am Trieb schneller als über die Wurzelinfektionen. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Maßnahmen zur Reduzierung des Fliegenbesatzes zu einer Verringerung der Befallshäufigkeit der Fusarien führen können und insbesondere Junganlagen besser vor Infektionen geschützt werden.

## Anhang

### Spezieller nährstoffarmer Agar

Spezieller nährstoffarmer Agar (SNA) wurde von Nirenberg (1976) nach Rezepten von BILAI entwickelt, um die Bildung von Makrokonidien zu fördern, Des Weiteren werden Kettenformierungen, Polyphialiden- und Chlamydosporenbildung angeregt. SNA besitzt eine schwache Substratfärbung und eignet sich deshalb gut zur morphologischen Artenbestimmung mittels Lichtmikroskop. Die hohe Transparenz macht es möglich, die Petrischalen direkt zu untersuchen und somit bei einer Vergrößerung 250 : 1 die Strukturen des Luftmyzels, wie z. B. Kettenbildung der Mikrokonidien zu erfassen, die bei einer Anfertigung eines Wasserpräparats auf einem Objektträger zerstört würden (Nirenberg, 1976).

Slight Nutrient Agar (SNA) nach Nirenberg (1976):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KNO <sub>3</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucose	0,2 g
Saccharose	0,2 g
Agar-Agar	20 g
Aqua dest.	1,0 l

pH-Wert vor dem Autoklavieren auf 5,5 eingestellt

Nach dem Abkühlen wurden folgende Antibiotika in 5 mL destilliertem Wasser gelöst und über Sterilfilter in den Agar gegeben:

Penicillin	100 mg
Chloretetracyclin	10 mg
Streptomycinsulfat	50 mg

### *Fusarium* spp. Dauerkulturen

Für die Erhaltung von *Fusarium*kulturen wurde ein Gemisch aus zwei Teilen Lehm, 1,5 Teilen Kompost und 1,5 Teilen Sand verwendet. Das Gemisch wird luftgetrocknete gesiebt und mit Leitungswasser leicht befeuchtet. In Reagenzröhrchen gefüllt wird die Erde leicht zusammengeschüttelt, 1,5 mL Leitungswasser zugegeben und 24 h stehen

gelassen, so dass kein Wasserüberstand vorhanden war. Danach erfolgte eine zweifache Sterilisation im Autoklaven. Die Erde muss gut feucht, aber nicht verschlemmt sein. Nach der Abkühlung der autoklavierten Reagenzröhrchen wurden diese unter sterilen Bedingungen je einem 5 mm großem bewachsenem Agarstück der jeweiligen Fusariumkultur, die für 14 Tage auf SNA angezogen wurde, beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei Zimmertemperatur bis der Pilz durch die Erde zum Röhrchenboden gewachsen war (Kontrolle mit dem Stereomikroskop). Anschließend wurden die Dauerkulturen bei 4 °C aufbewahrt (Nirenberg, 1987).

## Wetterdaten

### Standort Martfeld

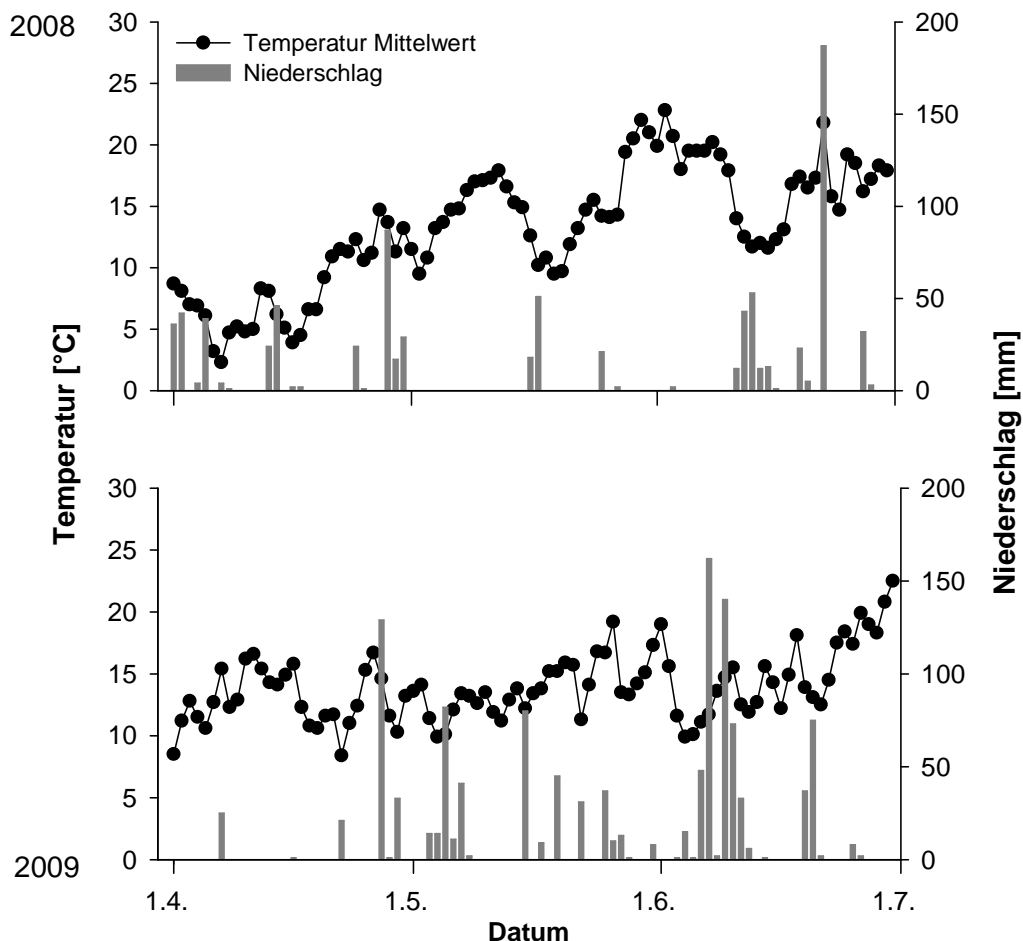


Abb. 19: Mittlere Tagestemperatur [°C] und mittlere Tagesniederschläge [mm] am Standort Martfeld (Spargelfelder A und B) vom 01.04. bis zum 01.07. 2008 (oben) und 2009 (unten).

## Standort Gifhorn

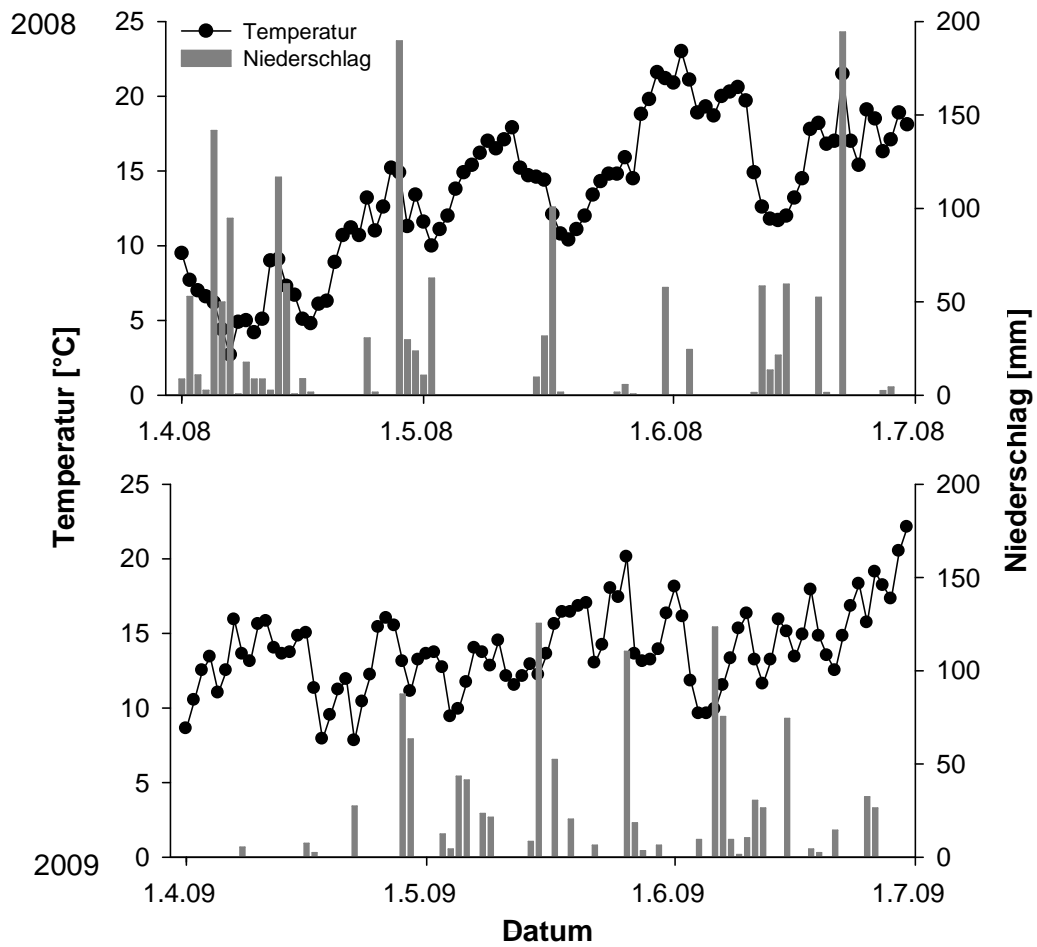


Abb. 20: Mittlere Tagestemperatur [°C] und mittlere Tagesniederschläge [mm] am Standort Gifhorn (Spargelfelder C, D, E und F) vom 01.04. bis zum 01.07. 2008 (oben) und 2009 (unten).

## Standort Buchholz

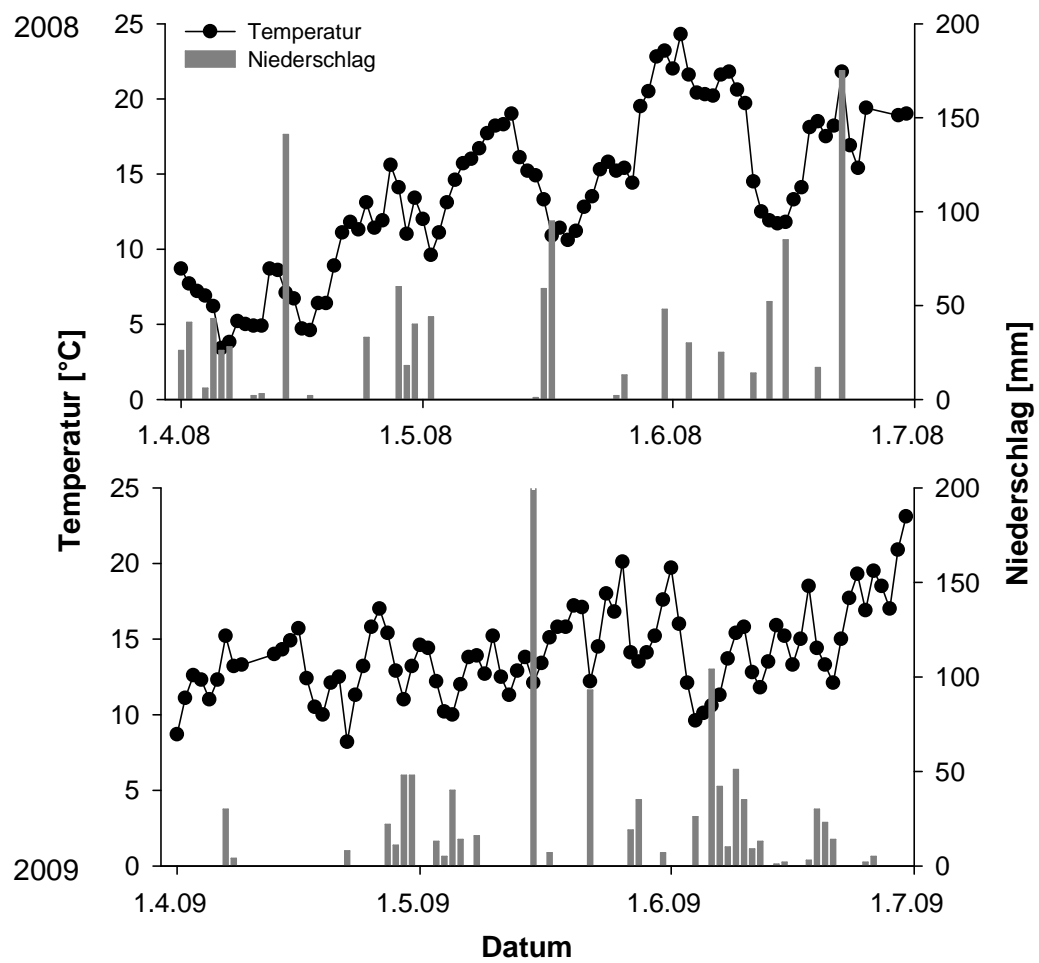


Abb. 21: Mittlere Tagestemperatur [°C] und mittlere Tagesniederschläge [mm] am Standort Buchholz (Spargelfelder G und H) vom 01.04. bis zum 01.07. 2008 (oben) und 2009 (unten).

### Mykotoxin Kontamination an den Spargelstangen von 2008 und 2009

Tab. 24: Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Werte in Spargelstangen aus der Ernte 2009 die mit *Fusarium proliferatum* und/oder *F. oxysporum* infiziert waren sowie die *F. proliferatum* DNA-Menge.

Felder	PN <sup>1</sup>	SB <sup>2</sup>	<i>Fusarium</i> spp.	Fumonisin ppm* (µg/g Trockengewicht)			<i>F. proliferatum</i> DNA µg/g Trockengewicht
				FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Total	
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. equiseti</i>	0.10	ND	0.10	-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.07	0.05	0.13	-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	0.18	0.17	0.35	-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.02	ND	0.02	0.000
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	128.00	44.20	172.20	5400.000
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.03	ND	0.03	278.000
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	-
I	2	3	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. equiseti</i>	0.32	0.30	0.62	-
I	2	3	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	3.14	0.98	4.12	-
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	0.09	0.05	0.14	59029.900
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	2.16	0.64	2.80	8100.000
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	15.31	3.10	18.41	29550.000
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	19.83	4.58	24.41	105500.000
I	2	1	<i>F. proliferatum</i>	0.16	0.07	0.23	5250.000
I	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
I	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.29	0.07	0.37	-
I	2	3	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.92	0.42	0.56	-
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	39.25	9.74	49.00	-
A	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	-
A	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	-
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.04	ND	0.04	-
A	2	3	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.41	0.64	0.33	-
A	2	2	<i>F. proliferatum</i>	0.00	0.26	0.00	-
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.08	0.04	0.12	7400.000
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.10	0.04	0.14	-
B	1	2	<i>F. proliferatum</i>	0.04	ND	0.04	565.000
B	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.05	ND	0.05	1555.000
B	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	0.000
B	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
B	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	-
B	2	1	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
B	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.29	0.29	-
B	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
B	2	1	<i>F. oxysporum</i>	0.09	ND	0.09	358.500
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.04	ND	0.04	<
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.05	ND	0.05	0.000
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.04	ND	0.04	0.000
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.07	ND	0.07	0.000
D	1	1	<i>F. oxysporum</i>	0.07	ND	0.07	-
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-

Felder	PN <sup>1</sup>	SB <sup>2</sup>	<i>Fusarium</i> spp.	Fumonisin ppm* (µg/g Trockengewicht)			<i>F. proliferatum</i> DNA µg/g Trockengewicht
				FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Total	
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.28	0.11	0.39	-
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
D	1	1	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
D	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
D	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.05	ND	0.05	0.000
D	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
D	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.16	<LOQ	0.16	-
D	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
E	1	3	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	0.000
E	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	<LOQ	0.06	0.000
E	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.11	ND	0.11	0.000
E	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.03	<LOQ	0.03	0.000
E	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	0.000
E	2	3	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.25	0.29	0.09	-
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.07	ND	0.07	0.000
F	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.10	ND	0.10	0.000
F	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	479.000
F	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.09	ND	0.09	-
F	1	1	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
F	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
F	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.04	ND	0.04	259.500
F	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.15	ND	0.15	-
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.03	ND	0.03	<
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.20	ND	0.20	342.000
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	2650.000
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	3665.000
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
G	2	1	<i>F. oxysporum</i>	0.06	ND	0.06	985.000
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	0.06	<LOQ	0.06	910.000
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	-

\* ND; nicht detektierbar, weil weniger als LOD; LOD = 0,003 µg/g

<sup>1</sup> PN = Probenahme, 1 = Mai und 2 = Juni

<sup>2</sup> SB = Symptombonitur, 1 = keine Läsionen, weiße Spargelstange, 2 = leichte Läsionen, bis zu 50 %, 3 = mittlere Läsionen, zwischen 50 – 75 %, 4 = starke Läsionen, zwischen 75 – 100 %



Tab. 25: Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Werte in Spargelstangen aus der Ernte 2009 die mit *Fusarium proliferatum* und/oder *F. oxysporum* infiziert waren sowie die *F. proliferatum* DNA-Menge.

Felder	PN <sup>1</sup>	SB <sup>2</sup>	<i>Fusarium</i> spp.	Fumonisin ppm* (µg/g Trockengewicht)			<i>F. proliferatum</i> DNA µg/g Trockengewicht
				FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Total	
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	< 0,01	< 0,01		0.004
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		-
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND		0.003
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		0.020
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		0.006
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		0.002
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		<
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		<
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		0.040
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.04	< 0,01	0.04	0.011
I	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. sambucinum</i>	ND	ND		0.072
I	1	4	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. sambucinum</i>	0.18	0.11	0.29	0.575
I	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND		<
I	2	2	<i>F. proliferatum</i>	0.09	0.02	0.11	0.017
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	199.38	82.32	281.70	0.685
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	7.78	1.70	9.48	0.467
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	7.64	2.82	10.46	0.141
I	2	4	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.88	0.19	1.07	0.038
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	26.69	8.86	35.55	2.195
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	0.08	0.03	0.11	0.004
I	2	3	<i>F. proliferatum</i>	12.86	2.74	15.60	0.387
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	0.40	0.15	0.55	0.088
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	0.51	0.18	0.69	0.056
I	2	4	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	43.94	13.51	57.45	1.305
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	0.40	0.19	0.59	0.322
I	2	3	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	1.48	0.29	1.77	0.340
I	2	3	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	1.35	ND	1.35	0.088
I	2	4	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. sambucinum</i>	7.69	1.15	8.84	0.510
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	1.68	0.39	2.07	0.070
I	2	4	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. sambucinum</i>	11.13	2.79	13.92	0.173
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	34.75	5.60	40.35	0.550
I	2	4	<i>F. proliferatum</i>	7.19	1.86	9.05	0.595
I	2	4	<i>F. sambucinum</i>	34.75	7.05	41.80	1.640
A	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	1	2	<i>F. equiseti</i>	ND	ND	ND	0.000
A	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.142
A	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.001
A	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.05	0.02	0.07	0.012
A	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.003
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.005
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<

Felder	PN <sup>1</sup>	SB <sup>2</sup>	<i>Fusarium</i> spp.	Fumonisin ppm <sup>*</sup> (µg/g Trockengewicht)			<i>F. proliferatum</i> DNA µg/g Trockengewicht
				FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Total	
A	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	<
A	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
A	2	1	<i>F. proliferatum</i>	0.02	0.01	0.03	0.001
A	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	<
B	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
D	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	< 0,01		<
D	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	< 0,01		0.000
D	1	2	<i>F. oxysporum</i> + <i>F. equiseti</i>	ND	ND	ND	0.000
D	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
D	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.07	ND	0.07	0.006
D	2	1	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<
E	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	19.34	11.30	30.64	0.005
E	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND		<
E	1	2	<i>F. oxysporum</i>	0.64	ND	0.64	0.000
E	1	2	<i>F. oxysporum</i>	4.21	1.41	5.62	<
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.008
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
E	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
F	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	0.003
F	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	0.12	0.10	0.22	0.000
F	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
F	1	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	0.010
F	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<
F	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	
F	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	0.10	0.10	<
F	2	1	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.003
F	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<
G	1	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.055
G	1	2	<i>F. oxysporum</i> + <i>F. equiseti</i>	ND	ND	ND	<
G	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.002
G	1	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	<
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.022
G	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. proliferatum</i>	ND	ND	ND	0.000
G	2	2	<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.010
C	2	2	<i>F. oxysporum</i> + <i>F. equiseti</i>	ND	ND	ND	<
C	2	2	<i>F. oxysporum</i>	ND	ND	ND	0.000

\* ND; nicht detektierbar, weil weniger als LOD; LOD = 0,003 µg/g

<sup>1</sup> PN = Probenahme, 1 = Mai und 2 = Juni

<sup>2</sup> SB = Symptombonitur, 1 = keine Läsionen, weiße Spargelstange, 2 = leichte Läsionen, bis zu 50 %, 3 = mittlere Läsionen, zwischen 50 – 75 %, 4 = starke Läsionen, zwischen 75 – 100 %

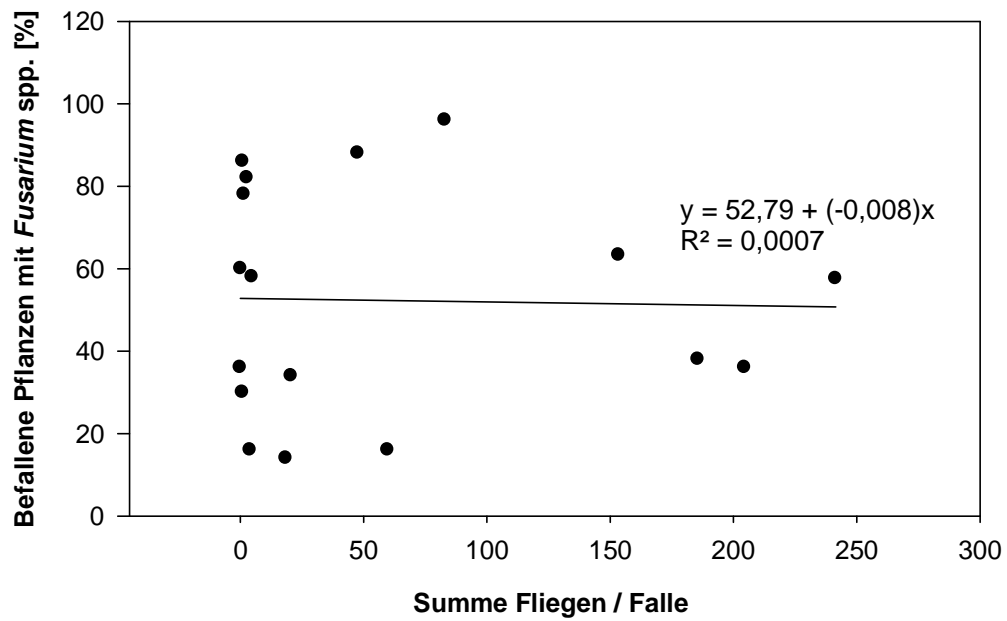
**Interaktion unter Feldbedingungen**

Abb. 22: Korrelation zwischen Adulte pro Falle und der *Fusarium* spp. Infektion während der Erntezeit 2008 und 2009.

## Interaktion unter kontrollierten Bedingungen

### Simulierter Fliegenbefall mit *Fusarium proliferatum* Infektion

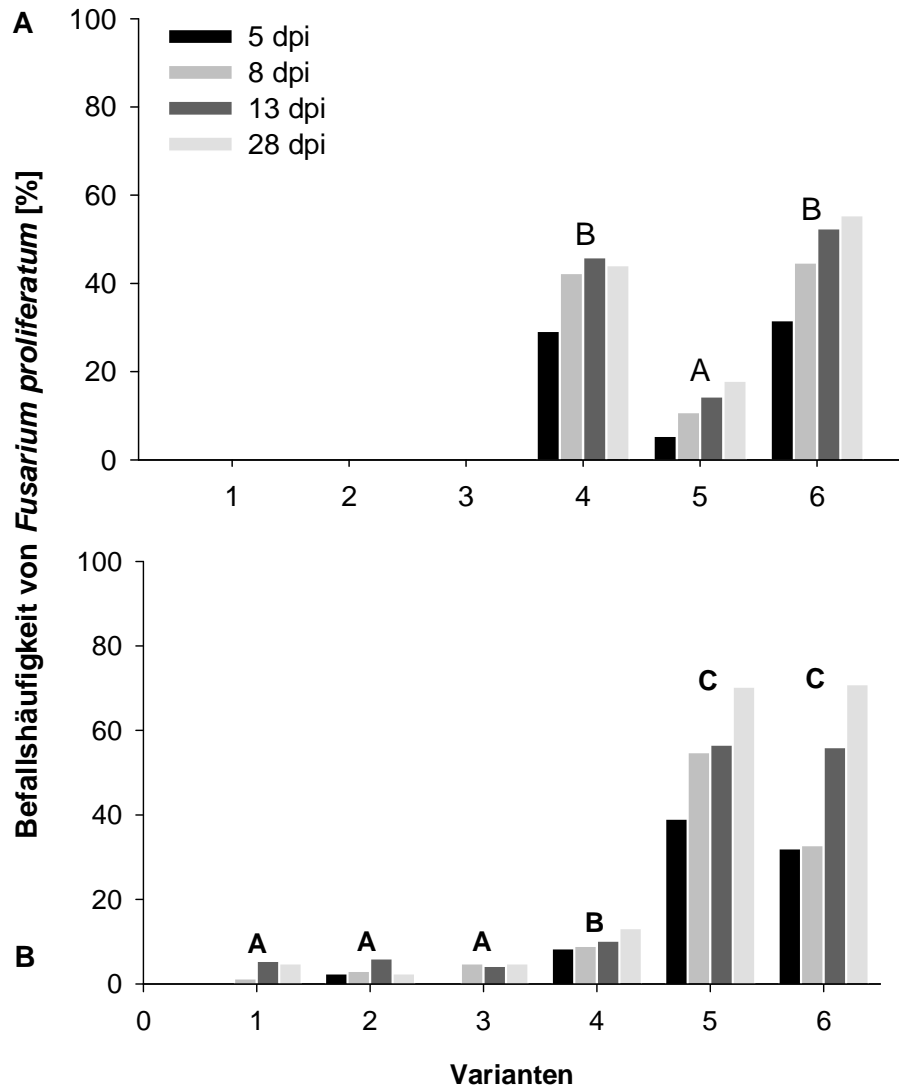


Abb. 23: Befallshäufigkeit von *Fusarium proliferatum* 5, 8, 13, 28 Tage nach der Inokulation (dpi) an *Asparagus officinalis* L. cv. Gijnlim an Trieb (A) und Wurzel (B). Es wurden sechs Varianten getestet: 1 = Kontrolle, angegossen mit Wasser, 2 = Trieb mit Verletzung, bestrichen mit destilliertem Wasser, 3 = Trieb mit *F. proliferatum* Suspension bestrichen, 4 = Trieb mit Verletzung, mit *F. proliferatum* Suspension inokuliert, 5 = Bodeninokulation mit *F. proliferatum* Suspension, 6 = Boden- und Triebinokulation. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet nach Tukey-Test,  $P < 0.5$  (Modell GLMM), dabei wurde die gesamte Befallshäufigkeit nach 28 dpi berücksichtigt.

## Literaturverzeichnis

- Abbas, H. K., Ocamb, C. M., Xie, W., Mirocha, C. J., Shier, W. T. (1995). First report of fumonsin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> production by *Fusarium oxysporum* var. *redolens*. *Plant Disease*, 79, 968.
- Abbas, H. K., Cartwright, R. D., Xie, W., Mirocha, C. J., Richard, J. L., Dvorak, T. J., Sciombato, G. L., Shier, W. T. (1999). Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Mycopathologia*, 147, 97-104.
- Abe, T., Kameya, T. (1986). Promotion of flower formation by atrazine and diuron in seedlings of Asparagus. *Planta*, 169, 289-291.
- Adejumo, T. O., Hettwer, U., Karlovsky, P. (2007). Survey of maize from south-western Nigeria for zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols, fumonisin B<sub>1</sub> and enniatins produced by *Fusarium* species. *Food Additives and Contaminants*, 24 (9), 993-1000.
- Antignus, Y., Mor, N., Joseph, R. B., Lapidot, M., Cohen, S. (1996). Ultra-violet absorbing plastic sheets protects crops from insects pest and from virus disease vectored by insects. *Environmental Entomology*, 25, 919-924.
- Antignus, Y. (2007). The management of tomato yellow leaf curl virus in greenhouses and the open field, a strategy of manipulation. In *Tomato yellow leaf curl virus disease management, molecular biology, breeding for resistance*. Ed. Crosnek, H., Springer Netherlands, 263-278.
- Armstrong, G. M., Armstrong, J. K. (1966). Relationships of *Fusarium oxysporum* formae speciales *apii*, *asparagi*, *cassiae*, *melongenae* and *vasinectum* race 3 as revealed by pathogenicity for common hosts. *Phytopathology*, 56, 1256-1260.
- Baayen, R. P., van den Boogert, P. H. J. F., Bonants, P. J. M., Poll, J. T. K., Blok, W. J., Waalwijk, C. (2000). *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot crown rot and spear rot. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 970-912.
- Bacon, C. W., Williamson, J. W. (1992). Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologie*, 117, 65-71.
- Bacon, C., W., Yates, I. E. (2006). Endophytic Root Colonization by *Fusarium* Species: Histology, Plant Interactions, and Toxicity. In *Soil Biology*. Ed. Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. N.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 133-152.
- Becker, J. (1950). *Handbuch des gesamten Gemüsebaues*. Paul Parey, Berlin, 5. Auflage.
- Bennet, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicosis, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 100, 3-5.

- Beeskow, H. (1967). Untersuchungen über die Variabilität der Anromonözie/Diözie und ihre Korrelation mit verschiedenen Ertragsfaktoren bei Spargel unter besondere Berücksichtigung rein männlicher Sorten. *Z. Pflanzenz.* 58, 254-283.
- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allmann, D. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., Vleggaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 743-745.
- Blok, W. J., Bollen, G. J. (1995). Fungi on roots and stem bases of asparagus in the Netherlands: species and pathogenicity. *European Journal of Plant Pathology*, 101, 15-24.
- Booth, C. (1971). The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Böning, K. (1929). Insekten als Überträger von Pflanzenkrankheiten. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 15 (1), 181-206.
- Börner, H. (1997). Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Ulmer, Stuttgart, 7. Auflage.
- Brandfass, C., Karlovsky, P. (2008). Upscaled CTAB-based DNA extraction and real-time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in plant material with reduced sampling error. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 2306-2321.
- Brust, G. E. (2000). Reflective and black mulch increase yield in pumpkins under Virus disease pressure. *Journal of Economic Entomology*, 93, 828-833.
- Burnett, J. H. (1984). Aspects of *Fusarium* genetics. Seite 39-69 in *The Applied Mycology of Fusarium*. Moss, M. O., Smith, J. E. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cardé, R. T., Minks, A. K. (1995). Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annual Review of Entomology*, 40, 559-585.
- Cawood, M. E., Gelderblom, W. C. A., Vleggaar, R., Behrend, Y., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O. (1991). Isolation of the fumonisin mycotoxins - a quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1958-1962.
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20 (9), 2380.
- Chelkowski, J., Lew, H. (1992). *Fusarium* species of *Liseola* Section - occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 10, 49-53.
- Chlapoutakis, N. (1999). A new pest of asparagus the asparagus fly (*Platyparea poeciloptera*, Diptera: Trypetidae). *Georgia - Ktinotrofia*, 2, 54-56.
- Chiang, H. C., Wilcoxson, R. D. (1961). Interactions of the European corn borer and stalk rot of corn. *J. Econ. Entomol.*, 54, 850-852.

- Chu, F. S., Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 847-852.
- Cohen, S. I., Heald, F. D. (1941). A wilt and root rot of asparagus caused by *Fusarium oxysporum* (Schlecht.). *Plant Dis. Rep.*, 25, 502-509.
- Colvin, B. M., Cawood, M. E., Snyman, S. D., Vleggaar, R., Marasas, W. F. O. (1993). Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.*, 31, 407-414.
- Costa, H. S., Robb, K. L., Wilen, C. A. (2002). Field trials measuring the effects of ultraviolet-absorbing plastic films on insect population. *Journal of Economic Entomologie*, 95 (1), 113-120.
- Cotton, T. K., Munkvold, G. P. (1998). Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in Maize stalk residue. *Phytopathology*, 88, 550-555.
- Corpas-Hervias, C., Melero-Vara, J. M., Molinero-Ruiz, M. L., Zurera-Munoz, C., Basallote-Ureba, M. J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. *Plant Disease*, 90, 1441-1451.
- Crüger, G. (1991). Pflanzenschutz im Gemüsebau. Ulmer, Stuttgart, 3. Auflage.
- Damicone, J. P., Manning, W. J. (1985). Frequency and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from first-year asparagus grown from transplants. *Plant Disease*, 69, 413-416.
- Damicone, J. P., Manning, W. J., Ferro, D. N. (1987). Influence of management practices on severity of stem and crown rot, incidence of Asparagus miner, and yield of Asparagus grown from transplants. *Plant Disease*, 71, 81-84.
- Decraemer, S., Gillard, A. (1966). Contribution a l'etude de la distribution géographique, le cycle biologique et la lutte contre la mouche de l'asperge (*Platyparea poeciloptera* Schrank) en Belgique. *Rev. Agr. (Bruxelles)* 4, 453-460.
- Desjardins, A. E., Proctor, H. R., Bairoch, A., McCormick, S. P., Shaner, G., Buechley, G., Hohne, T. M. (1996). Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Giberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9 (9), 775-781.
- Dingler, M. (1934). Die Spargelfliege (*Platyparea poeciloptera*, Schrank) Arbeiten über Physiologie und angewandte Entomologie aus Berlin Dahlem. 1 (2+3), 131-162, 185-217.
- Doko, M. B., Visconti, A. (1994). Occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 11, 433-439.
- Domsch, K. H., Gams, W. (1970). Pilze aus Agrarböden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Doohan, F. M., Brennan, J., Cooke, B. M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 755-768.
- Douglas Bates and Martin Maechler (2009). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and Eigenfaces. R package version 0.999375-31. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Döring, T. F., Kirchner, S. M., Kühne, S., Saucke, H. (2004). Response of alate aphids to green targets on coloured backgrounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113, 53-61.
- Dowd, P. F. (1998). Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. In *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Ed. Sinha, K. K. & Bhatnagar, D., 307-350.
- Dowd, P. F. (2000). Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. *J. Econ. Entomol.*, 6 (93), 1669-1679.
- Eckstein, F. (1934). Untersuchungen zur Epidemiologie und Bekämpfung von *Pyrausta nubitalis* Hb. und *Platyparea poeciloptera* Schr. *Arbeiten über Physiologie und angewandte Entomologie Berlin-Dahlem*, 1 (2), 315-327.
- Elmer, W. H. (1989). Effects of Chloride and Nitrogen Form on Growth of Asparagus Infected by *Fusarium* spp. *Plant Disease*, 73, 736-740.
- Elmer, W. H., Johnson, D. A., Mink, G. I. (1996). Epidemiology and Management of the Disease Causal to Asparagus Decline. *Plant Disease*, 80 (2), 117-125.
- Elmer, W. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., Backhouse, D., Abubaker, A. A. (1997). *Fusarium* species associated with asparagus crowns and soil in Australia and New Zealand. *Aust. Plant Pathol.*, 28, 255-261.
- Elmer, W. H. (2000). Incidence of infection of asparagus spears marketed in Connecticut by *Fusarium* spp. *Plant Disease*, 84, 831-834.
- Endo, R. M., Burkholder, E. C. (1971). The association of *Fusarium moniliforme* with the crown complex of asparagus. *Phytopathology*, 61, 891.
- Eriksen, G. s., Alexander, J. (1998). *Fusarium* toxins in cereals - risk assessment TemaNord 1998, 502, Nordic Council of Ministers, Copenhagen.
- Ernst, M., Krug, H. (1998). Seasonal Growth and development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) III. The effect of temperature and water stress on the carbohydrate content in storage roots and rhizome buds. *Gartenbauwissenschaft.*, 63 (5), 202-208.
- European Community comments for the codex committee on contaminations in food (CCCF) (2009). Discussion paper on Fumonisin, Netherlands, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20080723:EN:PDF>



- Fischer, S., Freuler, J., Mittaz, C., Terrettaz, C. (1989). La mouche de l'asperge *Playtparea poeciloptera* Schrnak (Diptera, Tephritidae) en Valais. *Revue Suisse de Viticulture, D'Arboriculture et d'Horticulture*, 21 (5), 295-306.
- Franke, W. (1997). *Nutzpflanzenkunde*. Thieme, Stuttgart. Germany.
- Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157, 493-502.
- Freuler, J. (1988). Efficacy and acceptance of the cabbage root fly egg trap. *IOBC/WPRS Bulletin*, 11 (1), 170-175.
- Freuler, J., Fischer, S. (1985). Méthodes de contole et utilisation des seuils de tolérance pour les ravageurs des cultures maraichères de pleine terre. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture*, 17 (4), 227-246.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, M. J., Vleggaar, R., Kriek, N. P. J. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1806-1811.
- Gelderblom, W. C. A., Marasas, W. F. O., Vleggaar, R., Thiel, P. G., Cawood, M. E. (1992). Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, 117, 11-16.
- Gerlach, W., Nirenberg, H. (1982). The Genus *Fusarium*-a Pictorial Atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*, Heft 209.
- Gilbertson, R. L., Manning, W. J. (1983). Contamination of Asparagus Flowers and Fruit by Airborne Spores of *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease*, 67 (9), 1003-1004.
- Gilbertson, R. L., Manning, W. J., Ferro, D. N. (1985). Association of the Asparagus Miner with Stem Rot Caused in Asparagus by *Fusarium* species. *Phytopathology*, 75, 1188-1191.
- Gilbertson, R. L., Brown, W. M., Ruppel, E. G., Capinera, J. L. (1986). Association of Corn Stalk Rot *Fusarium* spp. and Western Corn Rootworm Beetles in Colorado. *Phytopathology*, 76, 1309-1314.
- Goßmann, M., Büttner, C., Bedlan, G. (2001). Untersuchungen zum 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.-U., Büttner, C. (2005). Untersuchungen zum endophytischen Befall von *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg in geernteten Stangen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.). *Gesunde Pflanze*, 57, 53-58.
- Goßmann, M., Beran, F., Bedlan, G., Plenk, G., Hamedinger, S., Öhlinger, R., Humpf, H.-U., Büttner, C. (2008). Spargelstangenuntersuchungen zur Haupterntezeit auf Infektionen mit *Fusarium* spp. und Kontaminationen mit Fumonisin B<sub>1</sub>. *Mycotoxin Research*, 24 (2), 88-97.

- Greenough, D. R., Black, L. L., Bond, W. P. (1990). Aluminum-surfaced mulch: an approach to the control of tomato spotted wilt virus in solanaceous crops. *Plant Disease*, 74, 805-808.
- Guerrero, C., Nigh, E. L., Stanghellini, M. E., Elmer, W. (1997). Incidence of *Fusarium* spp. in asparagus spears. *Plant Disease*, 81, 957.
- Hammack, L. (2003). Volatile semiochemical impact on trapping and distribution in maize of northern and western corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Agric. Forest Entomol.*, 5, 113-122.
- Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E., Cole, J. R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Veterinary Diagnostic Investigation*, 2, 217-221.
- Hartmann, H.-D. (1989). Spargel - Grundlagen für den Anbau. Ulmer Verlag Stuttgart. Deutschland.
- Hartung, A. C., Nair, M. G., Putnam, A. R. (1990). Isolation and characterization of phytotoxic compounds from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) roots. *Journal of Chemical Ecology*, 16 (5), 1707-1718.
- Hassan, S. A. (1970). Untersuchungen über die Spargelfliege *Platyparea poeciloptera* Schrank (Trypetidae), die Spargelminierfliege *Melanagromyza simplex* Loew (Argomyzidae) und die Bohnenfliege *Delia (Hylemya) platura* Meigen (Anthomyiidae) an Spargel in Nordbaden. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 77 (2/3), 122-131.
- Heitefuss, R. (2000). Pflanzenschutz. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hendel, F. (1949). Trypetidae. In : E. Lindner (ED.). Die Fliegen der Palaearktischen Region. Vol. V; Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Hennequin, J., Coutin, R. (1961). Importance économique des ravages provoqués par la mouche de l'asperge (*Platyparea poeciloptera*) dans les jeunes plantations. *Adv Hort Sc and Appl* 1, 533-540.
- Hinojo, M. J., Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Gimeno-Adelantado, J. V., Jimenez, M., Mateo, R. (2006). Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiology*, 23, 119-127.
- Hoffmann, G. M., Nienhaus, F., Poehling, H. M., Schönbeck, F., Weltzien, H. C., Wilbert, H. (1994). Lehrbuch der Phytomedizin, Blackwell, Berlin, 3. Auflage.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50 (3), 346--363.
- Hughes, A. R., Nichols, A. A., Woolley, D. J. (1990). The effect of temperature on the growth of asparagus seedlings. *Acta Horticulturae*, 271, 451-456.
- Inglis, D. A. (1980). Contamination of asparagus seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* and *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease*, 64, 74-76.

- Johnston, S. A., Springer, J. K., Lewis, G. D. (1979). *Fusarium moniliforme* as cause of stem and crown rot of asparagus and its association with asparagus decline. *Phytopathology*, 69, 778-780.
- Kamula, S. A., Carol, A., Mayfield, P., Mayfield, C. (1994). Impact of the exodermis on infection of roots by *Fusarium culmorum*. *Plant and Soil*, 167, 121-126.
- Kang, Z., Buchenauer, H. (2002). Studies of the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 653-660.
- Kirk, P. M., Cannon, P.-F., David, J. C. (2001). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition., Great Britain.
- Knaflewski, M., Golinski, P., KostECKI, M., Waskiewicz, A., Weber, Z. . (2008). Mycotoxins and Mycotoxin-Producing Fungi Occurring in Asparagus Spears. *Acta Horticulturae*, 776 (ISHS 2008), 183-189.
- Kolata, R. (1980). Spargel schädigende Insekten im Braunschweigerischen Anbaugebiet. *Braunschweiger Naturkundliche Schriften*, 1 (1), 51-67.
- Kotte, W. (1960). Krankheiten und Schädlinge im Gemüsebau und ihre Bekämpfung. Paul Parey, Berlin, 3. Auflage.
- Kring, J. B., Schuster, D. J. (1992). Management of insects on pepper and tomato with UV-reflective mulches. *Florida Entomol.*, 75, 119-129.
- Kumar, P., Poehling H.-M., (2006). UV-blocking Plastic Films and Nets Influence Vectors and Virus Transmission on Greenhouse Tomatoes in the Humid Tropics. *Environmental Entomology*, 35 (4), 1069 – 1082
- Kurtz, B., Karlovsky, P., Vidal, S. (2010). Interaction between western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae and root-Infektion *Fusarium verticillioides*. *Environmental Entomology*, 39 (5), 1532-1538.
- LaMondia, J. A., Elmer, W. H. (1989). Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus. *Can. J. Bot.*, 67, 2420-2424.
- Lazarte, J., Garrison, S. A. (1980). Sex modification in *Asparagus officinalis* L. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 105, 351-356.
- Leach, J. G. (1940). Insect Transmission of Plant Diseases. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell.
- Lesne, P. (1913). La mouche de l'asperge aux environs de Paris. *Annales du Service des Epiphytyties.*, 1, 228-247.
- Lew, H., Adler, A., Edlinger, W. (1991). Moniliformin and the European corn borer (*Osterinia nubilalis*). *Mycotox Res.*, 7, 71-76.

- Liu, C. L., Liu, F. M., Xu, W. N., Kofoet, A., Humpf, H. U., Jiang, S. R. (2005). Occurrence of fumonisins B-1 and B-2 in asparagus from Shandong province, P. R. China. *Food Additives and Contaminants*, 22, 673-676.
- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., corda, P. (1995). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot and associated mycotoxins in Italy. *Plant Disease*, 79, 727-731.
- Logrieco, A., Dako, B., Moretti, A., Frissullo, S., Visconti, A. (1998). Occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. *Journal Agric. Food Chem.*, 46, 5201-5204.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.
- Lösel, R. M., Penners, G., Potting, R. P. J., Ebbinghaus, D., Elbert, A., Scherckenbeck, J. (2000). Laboratory and Field experiments towards the development of an attract and kill strategy for the control of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95, 39-46.
- Magg, T., Melchinger, A. E., Klein, D., Bohn, M. (2002). Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic *Bt* maize hybrids, their isogenic counterparts and commercial varieties. *Plant Breeding*, 121, 146-154.
- Marasas, W. F. O., Wehner, F. C., Van Rensburg, S. J., Van Schalkwyk, D. J. (1981). Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. *Phytopathology*, 71, 792-796.
- Marasas, W. F. O., Miller, J. D., Visconti, A. (2000). Fumonisin B<sub>1</sub>. *Environmental Health Criteria*, 219, 1-50.
- Marin, D., Magan, N., Belli, N., Ramos, A. J., Canela, R., Danchis, V. (1999). Two-dimensional profiles of fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 159-167.
- Martin, S. (1989). Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) in Abhängigkeit von der jahreszeitlichen Entwicklung der Pflanze. Diss. Univ. Hohenheim.
- Martinez Lopez, O. D. (2007). Pathogenität und Toxizität von *Fusarium* spp. an *Asparagus officinalis* L. und Differenzierung zweier initialer Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges. Diplom-Arbeit, Humboldt-Universität zu Berlin Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät Berlin.
- McLellan, C. R. (1976). Suppression of codling moth (Lepidoptera: Olethreutida) by sex, pheromone trapping of mals. *Canadian Entomologist*, 108, 1037-1040.
- McLellan, G. f., Fraser, J. A. (2001). Alternative strategies to control New Zealand flower thrips on nectarines. *New Zealand Plant Protection*, 54, 10-14.

- Merrill, A. H., Wang, E., Vales, T. R., Smith, E. R., Schroeder, J. J., Menaldino, D. S., Alecander, C., Crane, H. M., Xia, J., Liotta, D. C., Meredith, F. L., Riley, R. T. (1996). Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. In *Fumonisin in food*. Jackson, L. S., DeVries, J. W., Bullerman, L. L., Plenum Press, New York, 297-306.
- Merz, B. (1994). *Insecta Helvetica*: 10. Diptera; Tephritidae.
- Möller, E. M., Gahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20 (22), 6115-6116.
- Moretti, A., Belisario, A., Tafuri, A., Ritieni, A., Corazza, L., Logrieco, A. (2002). Production of beauvericin by different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, the *Fusarium* wilt agent of muskmelon. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 661-666.
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. (2004). Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *Fusarium oxysporum* from asparagus plant using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 230 (2), 235-240.
- Munkvold, G. P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* disease and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 705-713.
- Munkvold, G. P., Desjardins, A. E. (1997). Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? *Plant Disease*, 81, 556-565.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., Showers, W. B. (1999). Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt corn hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Disease*, 83, 130-138.
- Musser, S. M., Eppley, R. M., Mazzola, E. P. (1995). Identification of an n-acetyl keto derivative of fumonisin B<sub>1</sub> in corn cultures of *Fusarium proliferatum*. *J. Natural Products*, 58, 1392-1397.
- Landwirtschaftskammer Niedersachsen (2009). Mündliche Information von Uwhis, F.
- Nelson, P. E., Tousson, T. A., Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium Species: An Illustrated Guide for Identification*, University Park and London.
- Nelson, P. E., Plattner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. (1992). Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 984-989.
- Nelson, P. E., Tousson, T. A., Cook, R. J. (1981). *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. University Park.
- Nigh, E. L., Guerrero, C., Stanghellini, M. E. (1999). Evaluation of *Fusarium* spp. infected asparagus spears for fumonisin mycotoxins. *Acta Horticulturae*, 479, 247-252.
- Nijvelt, W. C. (1957). Levenswijze en Bestrijding von de aspergevlieg (*Platyparea poeciloptera* Schrank). *Nederland Versl. Landbouwk Onderz*, 63 (4), 1-40.

- Nirenberg, H. I. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtsch. Berlin-Dahlem*, 169, 1-117.
- Nutz, S., Döll, K., Karlovsky, P. (unveröffentlicht). Real-time PCR assays for *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* in maize. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. Manuskript in Vorbereitung.
- O'Donnel, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematicx and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 465-493.
- Ooka, J. J., Kommedahl, T. (1977). Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology*, 67, 1023-1026.
- Olivain, C., Alabouette, C. (1997). Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 137, 481-494.
- Otto, M. (2002). *Populationsökologische Untersuchungen zur Spargelfliege (Platyparea poeciloptera) und Zwiebelfliege (Delia antiqua) unter besonderer Berücksichtigung des Einsatzes von Simulationsmodellen im Integrierten Pflanzenschutz*. Unpublished Dissertation, Universität Bayreuth.
- Palmer, L. T., Kommedahl, T. (1969). Root-infecting *Fusarium* species in relation to rootworm infestations in corn. *Phytopathology*, 59, 1613-1617.
- Paschold, P.-J., Artelt, B., Herrmann, G. (2002). Kohlenhydratgehalte von Spargel als Basis für Betriebsentscheidungen. *Gemüse*, 38 (12), 30-32.
- Piva, G., Pietri, A. (2002). *Fumonisin reduction in Bt corn and effect on animal performance*. Paper presented at the *Bt-mais forum*, Biarritz/Peyrehorade Sept. 2002, Dokumentation Vorträge.
- Raviv, M., Antignus, Y. (2004). UV radiation effects on pathogens and insect pests of greenhouse-grown crops. *Photochemistry and Photobiology*, 79, 219-226.
- Riley, D. G., Pappu, H. R. (2004). Tactics for management of thrips (Thysanoptera: Thripidae) and tomato Spotted Wilt Virus in tomato. *Journal of Economic Entomology*, 97, 1648-1658.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. f. O., Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogues by *Fusarium* species. *Appl. Environm. Microbiol.*, 68, 2101-2105.
- Robb, A. R. (1984). Physiology of asparagus (*Asparagus officinalis*) as related to the production of the crop. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 12, 251-260.
- Robinson, A. S., Hopper, G. (1989). Fruit Flies: Their Biology, natural Enemies and Control. World Crop Pest Vol. 3a + 3b. Elsevier.

- Ross, P. F., Nelson, P. E., Richard, J. I., Osweiler, G. D., Rice, L. G., Plattner, R. D., Wilson, T. M. (1990). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3225-3226.
- Rossi, V., Scandolara, A, Battilani, P. (2009). Effect of environmental conditions on spore production by *F. verticillioides*, the causal agent of maize ear rot. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 159-169.
- Ryker, T. C. (1935). Fusarium yellows of celery. *Phytopathology*, 25, 578-600.
- Sadowski, C., Knaflewski, M. (1990). Susceptibility of selected asparagus cultivars to *Fusarium* spp. under field conditions. *Acta Horticulturae*, 27, 343-352.
- Salmeron de Diego, L. (1973). Plagas del esparrago. *Hojay Divulg (Madrid)*, 8, 1-20.
- Saß, M., Schorling, M., Goßmann, M., Büttner, C. (2007). Artenspektrum und Befallshäufigkeit von *Fusarium* spp. in Bt- und konventionellen Mais im Maiszünsler-Befallsgebiet Oderbruch. *Gesunde Pflanze*, 59, 119-125.
- Schreuder, W., Lamprecht, S. C. (1995). Pathogenicity of Three *Fusarium* Species Associated with Asparagus Decline in South Africa. *Plant Disease*, 79, 177-181.
- Scott, P. M. (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Prot.*, 47 (6), 489.
- Seefelder, W., Gossmann, M., Humpf, H.-U. (2002). Analysis of fumonisin B<sub>1</sub> 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.
- Seo, J. A., Kim, J. C., Lee, Y. W. (1996). Isolation and characterization of two new type C Fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. *J. Nat. Prod.*, 59, 1003-1005.
- Shelton, D. R. L. (1980). Effect of harvest duration and yield depletion of storage carbohydrate in asparagus roots. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 105, 332-335.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O. (1990). Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescences detection. *J. Liquid Chromatogr.*, 13, 2077-2087.
- Sinton, S. M., Wilson, D. R. (1999). Comparative performance of male and female plants during the annual growth cycle of a dioecious asparagus cultivar. *Acta Horticulturae*, 479, 347-353.
- Smith, A. K., Peterson, R. I. (1985). Histochemical features of wall appositions in *Asparagus* root meristems infected by *Fusarium*. *Plant Pathology*, 7, 28-36.
- Smith, J. E., Lewis, C. W., Anderson, J. G., Solomons, G. L. (1994). Mycotoxins in human nutrition and health. Directorate-General for Science, Research and Development, Agro-Industrial Research, Brüssel.

- Sobek, E. A., Munkvold, G. P. (1999). European corn borer Larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infektion of maize kernels. *Journal of Economic Entomology*, 92, 503-509.
- Stavisky, J., Funderburk, J. E., Brodbeck, B. V., Olson, S. M., Andersen, P. C. (2002). Population dynamics of *Frankliniella* spp. and tomato spotted wilt incidence as influenced by cultural management tactics in tomato. *Journal of Economic Entomology*, 95, 1216-1221.
- Straib, W. (1944). Beitrag zur Bekämpfung der Spargelfliege (*Platyparea poeciloptera* Schrk.). *Aus der Biologischen Reichsanstalt, Zeigstelle Braunschweig-Gliesmerode*, 34-38.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A. F. W., Ehrendorfer, F., Denffer v., D., Mägdefrau, K., Ziegler, H. (1987). Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Sugiura, Y., Barr, J. R., Barr, D. B., Brock, J. W., Elie, C. M., Ueno, Y., Patterson, D. G., Potter, M. E., Reiss, E. (1999). Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. *Mycology Research*, 103 (11), 1462-1468.
- Summer, C. G., Mitchell, J. P., Stapleton, J. J. (2004). Management of aphid-borne viruses and *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in zucchini squash by using UV reflective plastic and wheat straw mulches. *Environmental Entomology*, 33, 1447-1457.
- Summer, C. G., Stapleton, J. J. (2002a). Use of UV reflective mulch to delay the colonization and reduce the severity of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) infestations in cucurbits. *Crop Protection*, 21, 921-928.
- Sutton, J. C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.
- Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Thiel, P. G., Marasas, W. f. O., Stockenström, S. (1991). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2014-2018.
- Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Shephard, G. S., Koch, K. R., Hutton, T. (1995). Preparation and isolation of the partially hydrolysed moiety of fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2400-2405.
- Thiel, P. G., marasas, W. F. O., Sydenhans, E. W., Shepard, G. S., Gelderblom, W. C. A., Nieuwenhuis, J. J. (1991). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (4), 1089-1093.
- Thibout, E., Auger, J. (1999). Sexual attraction and male pheromone evidence in the asparagus fly, *Platyparea poeciloptera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92, 335-337.



- Thibout, E., Pierre, D., Mondy, N., Lecomte, C., Biéumont, J. C., Auger, J. (2005). Host-plant finding by the asparagus fly, *Plioreocepta poeciloptera* (Diptera: Tephritidae), a monophagous, monoviltine tephritid. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 393-399.
- Tuell, J. K. (2003). Fusarium and the asparagus miner (*Ophiomyia simplex* L.) in Michigan. Michigan State University, Michigan.
- Unterecker, H. (1972). Untersuchungen über den Befall von Fusarium-Wurzelfäule an Spargeljungpflanzen in nordbadischen Vermehrungsbetrieben. *Gesunde Pflanzen*, 24, 99-104.
- van Bakel, J. M. M., Kerstens, J. A. . (1970). Footrot in asparagus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Netherland Journal of Plant Pathology*, 76, 320-325.
- van Bakel, J. M. M., Krom-Kerstens, J. A. . (1974). Dead stem disease of asparagus caused by *Fusarium culmorum*. *Netherland Journal of Plant Pathology*, 80, 104-109.
- Visconti, A., Doko, M. B. (1994). Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC Int*, 77, 546-550.
- Vujanovic, V., Hamel, C., Yergeau, E., St-Arnaud, M. (2006). Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from Northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. *Microbial Ecology*, 51, 241-255.
- Wang, C.R., Norred, W. P., Bacon, C. W. Riley, R. T., Merrill, A. H. (1991). Implications for disease associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.*, 266,14486-14490.
- Waskiewicz, A., Golinski, P., Karolewski, Z., Irzykowska, L., Bocianowski, J., Kostecki, M., Weber, Z. (2010). Formation of fumonisins and other secondary metabolites by *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum* a comparative study. *Food Additives and Contaminants*, 27 (5), 608-615.
- 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. Phytopathology*, 154, 209-216.
- Weidenböcker, M. (1999). Lebensmittel-Mykologie. Behr Verlag, Hamburg, 1. Auflage.
- Wilson, T. M., Ross, P. F., Rice, L. G., Osweiler, G. D., Nelson, H. A., Owens, D. L., Plattner, R. D., Reggiardo, C., Noon, T. H., Prickrell, J. W. (1991). Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigations*, 2, 213-216.
- Wilson, C. R. (1999). The potential of reflective mulching in combination with insecticide sprays for control of aphid-borne viruses of iris and tulip in Tasmania. *Annals of Applied Biology*, 134, 293-297.
- Windels, C. E., Windels, M. B. (1974). Nididulid beetles as vectors of *Fusarium* species on corn. *Annu. Proc. Am. Phytopathol. Soc.*, 1, 131.

- Windels, C. E., Windels, M. B., Kommedahl, T. (1976). Association of *Fusarium* species with picnic beetles on corn ears. *Phytopathology*, 66, 328-331.
- Wollenweber, H. W., Reinking, O. A. (1935a), Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin.
- Wollenweber, H. W., Reinking, O. A. (1935b). Die Verbreitung der Fusarien in der Natur. Friedländer und Sohn, Berlin.
- Wolterstorff, B. (1990). Befall mit *Fusarium* gefährdet den Spargelanbau. *Gartenbau*, 37, 169-172.
- Wong, J. Y., Jeffries, P. (2006). Diversity of pathogenic *Fusarium* population associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathology*, 55, 331-342.
- Xu, W., Kofoet, A., Gossmann, M. . (2008). Diversity in Virulence and DNA Polymorphism of *Fusarium proliferatum* Isolated from Asparagus Plants. *Acta Horticulturae*, 776, ISHS 2008, 211-216.

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, den Leuten zu danken, die direkt oder indirekt am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Vielen Dank an **Prof. Dr. Kerstin Wydra** und **Prof. Dr. Hans-Michael Poehling** für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Unterstützung, die vielen hilfreichen Hinweise und Denkanstöße sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen in die Durchführung dieser Arbeit.

**Prof. Dr. H. Stützel** danke ich für die freundliche Übernahme des Drittprüfers.

Ein besonderer Dank gilt **Dr. M. Goßmann** und **Dr. H. Nirenberg** für die hervorragende Anleitung der *Fusarium* Taxonomie und für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

**Dr. G. Grunewaldt-Stöcker** danke ich für die offene Tür und die vielen Anregungen.

**Birgit Milde** danke ich für tatkräftige Unterstützung im Labor und Gewächshaus.

Für viele wertvolle Gespräche und eine schöne Arbeitsatmosphäre danke ich **Dr. Nasser Halaweh**, **Dr. Tanja Schacht**, **Dipl. Biol. Verona Kuchenbuch** und **MSc. Christopher Bradatsch**, ohne euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht.

**MSc. Nelli Rempe**, **BSc. Linda Kirchner**, **BSc. Sebastian Laurenz** und **BSc. Ole Rechner** danke ich für die hilfreiche Unterstützung in den lebhaften Zeiten der Spargelernte und für viele lustige Stunden im Labor und auf den Spargelfeldern.

**Willi Arndt** und **Joachim Seelbinder**, für die Hilfe bei der Regelung des Gewächshausbereiches und allen anderen **Mitarbeitern des IPPs** für die nette Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank geht an den **Forschungsverbund Agrar- und Ernährungswissenschaften Niedersachsen**, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Gefördert wurde das Verbundprojekt durch das Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner **Familie**, für den unermüdlichen Rückhalt bei all meinen Vorhaben und ihren Glauben an mich. **René** und **Nuria**, euch danke ich für eure unendliche Geduld, die tatkräftige Unterstützung und die vielen schönen Stunden zu Hause. **Vielen Dank!**

## Lebenslauf

Tanja Koch  
Gustav-Müller-Str. 17  
10829 Berlin  
E-Mail: ta-koch@web.de

Geb. 12.06.1972 in Salzgitter

### Promotion

seit 2007  
Doktorandin an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,  
Promotionsthema: „Auftreten von *Fusarium* spp. und Mykotoxine im niedersächsischen Spargelanbau – Ertragsrelevanz und determinierende Faktoren,„

### Studium

1998 – 2003  
Diplom-Ingenieurin Gartenbau (FH) an der Technischen Fachhochschule Berlin,  
Diplomarbeitsthema: „Bekämpfung von *Rhizoctonia solani*, dem Erreger der Salatfäule“

### Berufserfahrung

2003 – 2006  
Dipl. Ing. (FH) Gartenbau am Pflanzenschutzamt und Beuth Fachhochschule für Technik Berlin,  
Projekt: „Entwicklung und Erprobung von Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Kastanienminiermotte *Cameraria ohridella*“

### Ausbildung

1989 – 1992  
Fotografin bei Photo Klimesch GmbH in Braunschweig

## Curriculum Vitae

Tanja Koch  
Gustav-Müller-Str. 17  
10829 Berlin  
E-Mail: ta-koch@web.de

12.06.1972 in Salzgitter

### Education

since 2007                      PhD student at Leibniz University of Hannover, Institute of Plant Disease and Plant Protection,  
Dissertation: „Incidence of *Fusarium* spp. und Mycotoxin On asparagus fields in Lower Saxony – yield relevant and deciding factor,,

1998 – 2003                      Dipl.-Ing. (FH) Horticulturist (graduate) at the University of Applied Sciences (Technischen Fachhochschule Berlin),  
Dissertation: „Control of bottem rot on lettuce causes by *Rhizoctonia solani*“

### Working experience

2003 – 2006                      Dipl.-Ing. (FH) Horticulturist at the Official Bureau of Plant Protection Berlin and University of Applied Sciences  
Project: „Development and testing new strategies to control the horst chestnut leaf miner *Cameraria ohridella*“

### Professional training

1989 – 1992                      Professional training as photographer  
at Photo Klimesch GmbH in Braunschweig

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfestellung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeiten verwendet.

Hannover, Mai 2011

Tanja Koch