

Der Einfluss von Umwelt- und Lagerbedingungen auf die Mykotoxinkontamination im Spargel

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

Doktorin der Gartenbauwissenschaften
(Dr. rer. hort.)

genehmigte Dissertation
von

M. Sc. Mareike Vorholt
geboren am 23.08.1981 in Peine

2017

Referent: Prof. Dr. Hans-Michael Poehling

Koreferent: Prof. Dr. Petr Karlovsky

Tag der Promotion: 11.8.2017

Zusammenfassung

Parasitäre Pilze der Gattung *Fusarium* spp., darunter *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, verursachen die weltweit im Spargelbau verbreitete Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule. Darüber hinaus gelten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* als Hauptbildner von Fumonisin (FB) sowie Beauvericin (BEA) und stellen somit eine potentielle Gefährdung für den Menschen dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss unterschiedlicher Umwelt- und insbesondere Lagerbedingungen in Spargel auf die Infektion mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die Kontamination mit FB und BEA während der Ernte, der Nachernteprozesskette bis zur Lagerung und Konsumierung beim Endverbraucher zu untersuchen. Ein Monitoring Versuch während der Erntezeit an unterschiedlichen Standorten, zeigte eine Befallszunahme mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* von Mai zu Juni als auch einen prozentualen Anstieg mit FB kontaminierter Proben. In Lagerversuchen innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Verfahrenskette konnten keine signifikanten Veränderungen sowohl in der Befallsstärke mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* als auch in der FB-Kontamination festgestellt werden. In einem weiteren Lagerversuch wurden neben herkömmlichen Spargelstangen der Klasse Extra auch Convenience-Produkte berücksichtigt. Die geschälten, unter MAP-Bedingungen verpackten Varianten wiesen nach einer Lagerung von 7 Tagen bei 15 °C sowie 22 °C eine signifikant hohe BEA-Konzentration auf. In mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* inokulierten Spargelproben der Klasse Extra in Bleich-, Grün- und Purpurspargel konnten während der Lagerung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Spargelvarianten hinsichtlich der BEA-Kontamination beobachtet werden. In den mit *F. oxysporum* inokulierten Spargelstangen wurde in allen Spargelvarianten eine signifikant höhere BEA-Konzentration ermittelt, im Vergleich zu den mit *F. proliferatum* inokulierten Proben. Die BEA-Konzentration erwies sich in allen sowohl mit *F. oxysporum* als auch in mit *F. proliferatum* inokulierten Spargelvarianten signifikant höher als die FB-Konzentration. Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein erstes Auftreten von BEA in Spargel als auch eine Kokontamination mit FB nachgewiesen werden. Die in allen Versuchen detektierten Konzentrationen an FB als auch BEA (1-2300 ppb) sind einzeln betrachtet als unbedenklich einzustufen. Additive Effekte durch die Koexistenz mit weiteren Mykotoxinen bergen allerdings eine potentielle Gefahr. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war es, die potentiell fungitoxischen Eigenschaften von den in Spargel vorkommenden phenolischen Säuren p-Cumarsäure und Ferulasäure sowie dem Flavonoid Rutin zu analysieren. In einem in vitro Versuch erwies sich Ferulasäure als am stärksten toxisch und konnte sowohl das Wachstum von *F. oxysporum* als auch von *F. proliferatum* signifikant hemmen. Rutin zeigte keine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum*. Eine signifikante Inhibierung der BEA-Synthese konnte nicht ermittelt werden.

Kennwörter: *Fusarium*, *Asparagus officinalis*, Beauvericin

Abstract

Parasitic fungi of the genus *Fusarium* spp., including *F. oxysporum* and *F. proliferatum*, cause the root, crown and stalk rot in asparagus spread worldwide. In addition, *F. oxysporum* and *F. proliferatum* are considered to be the main producers of fumonisin (FB) and beauvericin (BEA), thus leading to a potential risk to humans. The aim of this study was to investigate the effects of different environmental and in particular storage conditions in asparagus to the infection with *F. oxysporum* and *F. proliferatum* as well as the contamination with FB and BEA during the harvest and the post-harvest process. A monitoring experiment showed an increase in the infestation with *F. oxysporum* and *F. proliferatum* from May to June as well as a percentage increase in FB contaminated samples. Symptomatic rods exhibited the highest infestation with *F. oxysporum* and *F. proliferatum* compared to randomized derived rods as well as rods of the Extra class. At the same time, an FB contamination could only be detected in these asparagus variants. No significant changes were observed in storage tests with *F. oxysporum* and *F. proliferatum* infestation as well as in FB contamination. In further storage experiments convenience products were also taken into account. The peeled variants packed under MAP conditions showed a significantly high BEA concentration after storage for 7 days at 15 ° C and 22 ° C. In the asparagus samples of the Extra class in white, green and purple asparagus, which were inoculated with *F. oxysporum* and *F. proliferatum*, no significant differences between the variants could be observed during storage with regard to BEA contamination. In the asparagus rods inoculated with *F. oxysporum*, a significantly higher concentration of BEA was determined in all asparagus variants as compared to the samples inoculated with *F. proliferatum*. The BEA concentration was significantly higher than the FB concentration in all of the asparagus varieties inoculated with both *F. oxysporum* and *F. proliferatum*. Overall, this study showed a first occurrence of BEA in asparagus as well as cocontamination with FB. The concentrations of FB as well as BEA (1-2300ppb) detected in all experiments are individually considered to be harmless. However, the effects of coexistence with other mycotoxins present a potential risk.

Asparagus is rich in naturally occurring phenolic compounds. These have potentially fungitoxic properties and can inhibit the growth of certain fungal species as well as the synthesis of mycotoxins. A further aim of the present study was to analyze the potential fungitoxic properties of the asparagus phenolic compounds rutin, p-coumaric acid and ferulic acid. In an in vitro experiment, ferulic acid proved to be the most toxic one and could significantly inhibit the growth of *F. oxysporum* as well as *F. proliferatum*. Rutin showed no inhibitory effect on the growth of *F. oxysporum* and *F. proliferatum*. A significant inhibition of the BEA synthesis could not be determined.

Keywords: *Fusarium*, *Asparagus officinalis*, beauvericin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
Literaturübersicht.....	1
Spargel (<i>Asparagus officinales L.</i>).....	1
<i>Fusarium</i> spp.....	4
Mykotoxine.....	6
Spargel als Quelle ernährungsphysiologisch relevanter phenolischer Verbindungen	11
Zielsetzung.....	13
1. Einfluss von Umwelt- und Lagerbedingungen auf den Befall mit <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> sowie die Mykotoxinproduktion im Spargel	15
1.1 Zusammenfassung	15
1.2 Einleitung	16
1.3 Material und Methoden	18
1.3.1 Versuchsaufbau Spargelsaison 2010 – Monitoring	18
1.3.2. Versuchsaufbau Spargelsaison 2010 – Lagerung innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Nachernteverfahrenskette.....	21
1.3.3 Versuchsaufbau Spargelsaison 2011 – Lagerversuche mit natürlich infizierten sowie mit <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> inokulierten Varianten sowohl in Bleichspargel als auch in Grün- und Purpurspargel	23
1.3.4 Verwendete Spargelklassen.....	28
1.3.5 Probeentnahme an unterschiedlichen Standorten	29
1.3.6 Verwendete Folien für die Verpackung.....	31
1.3.7 Verwendete Pilzstämmen.....	30
1.3.8 Sporensuspension und Inokulation.....	30
1.3.9 Mikroskopische Untersuchung auf endophytische Pilzbesiedlung	30
1.3.10 Aufbereitung der Spargelstangen für die molekularbiologischen Analysen.....	31
1.3.11 Multiplex-PCR und Gelelektrophorese.....	31
1.3.12 Für Multiplex-PCR verwendete Primer	31
1.3.13 PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....	31

1.3.14 Quantifizierung der Pilz DNA.....	32
1.3.15 Mykotoxinanalyse.....	32
1.3.16 Statistik.....	33
1.4 Ergebnisse.....	34
1.4.1 Spargelsaison 2010 – Monitoring	34
1.4.2 Spargelsaison 2010 – Lagerung innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Verfahrenskette	40
1.4.3 Spargelsaison 2011 – Verschiedene Lagerversuche	43
1.5 Diskussion.....	50
2. Untersuchungen zu phenolischen Verbindungen im Spargel und deren Potential zur Hemmung des Wachstums von <i>F. proliferatum</i> und <i>F. oxysporum</i> sowie der Mykotoxinproduktion	59
2.1 Zusammenfassung	59
2.2 Einleitung	60
2.3 Material und Methoden	61
2.3.1 Versuchsaufbau Erntejahr 2012	61
2.3.2 Extraktion für die Gesamtphenolanalyse und für die Analyse spezifischer phenolischer Säuren sowie Rutin	61
2.3.4 Messung des Gesamtphenolgehalts nach Folin Ciocalteu	62
2.3.5 Bestimmung des Rutingehalts und spezifischer phenolischer Säuren	62
2.3.6 PDA-Wachstumsversuch.....	62
2.3.7 Flüssigmedium	63
2.3.8 Statistik.....	63
2.4 Ergebnisse.....	64
2.4.1 Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf den Gesamtphenolgehalt sowie den Gehalt von Ferulasäure, p-Cumarsäure und Rutin in Bleich, Grün- und Purpurspargel.....	64
2.4.2 Einfluss von Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure auf das Wachstum von <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> sowie der BEA-Produktion in vitro.....	67
2.5 Diskussion.....	72
Fazit.....	75
Anhang.....	77
Literaturverzeichnis.....	83
Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Chemische Struktur FB1.....	8
Abb.2: Chemische Struktur BEA.....	9
Abb.3: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur mikroskopischen Untersuchung auf Infektion mit <i>F. proliferatum</i> und <i>F. oxysporum</i> von randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen, an jeweils 2 unterschiedlichen Standorten, auf zwei verschiedenen Feldern (jeweils n=50).....	18
Abb.4: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 von randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen an jeweils 2 unterschiedlichen Standorten mit jeweils zwei verschiedenen Feldern, zur Mykotoxinanalyse (Fumonisin) sowie zur Detektion der DNA-Konzentration von <i>F. proliferatum</i> (jeweils n=20).....	19
Abb.5: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur Mykotoxinanalyse sowie zur Detektion der DNA-Konzentration von <i>F. proliferatum</i> . Herangezogen wurden Proben von einem Standort (T), von jeweils zwei verschiedenen Feldern (T1 und T2). Es wurde unterschieden zwischen Spargelstangen mit Symptomen (S), Spargelstangen der Klasse Extra (H) sowie randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) (jeweils n=20).....	20
Abb.6: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur Untersuchung auf Infektion mit <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> . Herangezogen wurden Proben von einem Standort (T), von jeweils zwei verschiedenen Feldern (T1 und T2). Es wurde unterschieden zwischen Spargelstangen mit Symptomen (S), Spargelstangen der Klasse Extra (H) sowie randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) (jeweils n=20). Direkt nach der Probeentnahme wurden diese im Betrieb für 7 Tage bei 2 °C gelagert (Betriebslagerung).....	21
Abb.7: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur Untersuchung auf Infektion mit <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> . Herangezogen wurden Proben von einem Standort (T), von jeweils zwei verschiedenen Feldern (T1 und T2). Es wurde unterschieden zwischen Spargelstangen mit Symptomen (S), Spargelstangen der Klasse Extra (H) sowie randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) (jeweils n=20). Direkt nach der Probeentnahme wurden diese zunächst im Betrieb für 7 Tage bei 2 °C gelagert, im Anschluss erfolgte die Haushaltslagerung für 24h bei 22 °C bzw. 4 °C.....	22
Abb.8: Lagerversuch im Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse von Spargelstangen der Klasse Extra (H) von einem Feld vom Standort T. Unterschieden wurden normale, geschälte, normal und verpackte sowie geschält und verpackte Varianten, die jeweils bei 4°C, 15°C und 22°C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert wurden.....	23
Abb.9: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse sowie zur Bestimmung der DNA-Konzentration von <i>F. proliferatum</i> in Spargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Es wurden natürlich mit <i>F. proliferatum</i> sowie mit <i>F. proliferatum</i> inokulierte Spargelstangen jeweils bei 4°C, 15°C und 22°C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert.....	24

Abb.10: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse in Spargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Es wurden mit <i>F. proliferatum</i> inokulierte Spargelstangen jeweils bei 15°C und 22°C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert.....	25
Abb.11: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse bei Bleichspargel-, Grünspargel- und Purpurspargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Unterschieden wurden natürlich infizierte sowie mit <i>F. proliferatum</i> inokulierte Varianten, die jeweils bei 22°C für 2 Tage eingelagert wurden.	26
Abb.12: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse bei Bleichspargel-, Grünspargel- und Purpurspargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Unterschieden wurden natürlich infizierte sowie mit <i>F. proliferatum</i> und <i>F. oxysporum</i> inokulierte Varianten, die jeweils bei 22°C für 2 Tage eingelagert wurden.	27
Abb.13: <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> Befall (%) an Spargelstangen im Erntejahr 2010 an unterschiedlichen Standorten (M/S) auf je zwei unterschiedlichen Feldern (M1/M2) im Mai/Juni 2010. Dargestellt ist die mittlere Befallshäufigkeit von jeweils 50 randomisiert entnommenen Proben. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des <i>Fusarium</i> spp.-Befalls zwischen den einzelnen Standorten und Ernteterminen nach ANOVA, HSD, $p > 0,05$	36
Abb.14: Agarose-Gelelektrophorese Dokumentation der PCR-Amplifikate der Primerkombination Fus_OxiPol_s/Fus_Oxi_As (450 bp)/ Fus_Pol_As (550 bp). Laufbahn M: DNA-Größenmarker Lamda/PstI; Laufbahn 1 und 2: Positivkontrollen; Laufbahn 3: Negativkontrolle; Laufbahn 4-16: amplifizierte DNA von 13 exemplarischen Spargelproben aus dem Jahr 2011	37
Abb.15: Anteil an mit <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> befallenen Spargelstangen und Spargelstangen mit Fumonisin-Produktion (%) im Mai/Juni 2010 an unterschiedlichen Standorten (M/S) auf je zwei unterschiedlichen Feldern. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 20 randomisiert entnommenen Proben. Gleiche Großbuchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fumonisin-Kontamination zwischen den einzelnen Standorten und Ernteterminen nach ANOVA, HSD, $p < 0,05$. Gleiche Kleinbuchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des <i>Fusarium</i> spp.-Befalls zwischen den einzelnen Standorten und Ernteterminen nach ANOVA, HSD, $p > 0,05$	37
Abb. 16: Befallshäufigkeit in % von <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> in nicht gelagerten Spargelstangen und in Spargelstangen nach der Betriebslagerung sowie zusätzlicher Haushaltslagerung. Differenziert wurde zwischen Spargelstangen der Klasse Extra (H), randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) und Stangen mit Symptomen (S) vom Standort T von zwei Feldern T1 (A) und T2 (B). Diese wurden im Anschluss an die Betriebslagerung jeweils bei 24h bei Raumtemperatur (R) oder bei 4 °C im Kühlraum (K) gelagert. Dargestellt ist die mittlere Befallshäufigkeit von jeweils 20 Proben. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Spargelvarianten zwischen den einzelnen Lagervarianten nach ANOVA, $p < 0,05$. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.	41

Abb.17: Beauvericin-Gehalt (ppb) in Spargelstangen im Erntejahr 2011 in Abhängigkeit unterschiedlicher Verpackungen und Lagerbedingungen. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. * signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	45
Abb.18A: Fumonisin-Gehalt (ppb) in mit <i>F. proliferatum</i> inokulierten (A) und natürlich infizierten (B) Spargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagervarianten im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	46
Abb.18B: <i>F. proliferatum</i> -Gehalt (ng DNA/ 100mg TG) in mit <i>F. proliferatum</i> inokulierten (A) und natürlich infizierten (B) Spargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagervarianten im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	46
Abb.19: Beauvericin und Fumonisin-Gehalt (ppb) in mit <i>F. proliferatum</i> inokulierten Spargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	47
Abb.20: Beauvericin und Fumonisin-Gehalt (ppb) in natürlich infizierten und mit <i>F. proliferatum</i> inokulierten Weiß-, Grün- und Purpurspargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	48
Abb.21: Beauvericin-Gehalt (ppb) in mit <i>F. oxysporum</i> bzw. <i>F. proliferatum</i> inokuliertem Weiß-, Grün- und Purpurspargel, gelagert 2 Tage bei 22°C im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb desselben Inokulums zwischen den einzelnen Spargelvarianten signalisieren signifikante Unterschiede nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$. * innerhalb derselben Spargelvarianten signalisieren signifikante Unterschiede zwischen der Inokula nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	49
Abb.22: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2012 zur Gesamtphenolanalyse sowie zur Bestimmung der Konzentration von Rutin, Chlorogensäure, Ferulasäure und p-Cumarsäure bei Bleichspargel-, Grünspargel- und Purpurspargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Die unterschiedlichen Varianten wurden bei 22°C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert.....	61
Abb.23: Gesamtphenolgehalt (mg/g TG) in Weiß-, Grün- und Purpurspargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2012. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Großbuchstaben innerhalb derselben Spargelvariante signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$. Unterschiedliche Kleinbuchstaben zwischen den einzelnen Spargelvarianten signalisieren signifikante Unterschiede nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$	65

Abb.24: Der Gehalt von Chlorogensäure, Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure (mg/g TG) in Weiß-, Grün- und Purpurspargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2012. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.* innerhalb derselben Spargelvariante signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer phenolischen Verbindung signalisieren signifikante Unterschiede nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$	66
Abb.25a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Rutin (A), p-Cumarsäure (B) und Ferulasäure (C) auf das Wachstum von <i>F. proliferatum</i> (medialer Koloniedurchmesser in cm). Dargestellt ist der Mittelwert von jeweils 3 Wiederholungen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.....	68
Abb.25b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Rutin (A), p-Cumarsäure (B) und Ferulasäure (C) auf das Wachstum von <i>F. oxysporum</i> (medialer Koloniedurchmesser in cm). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von jeweils 3 Wiederholungen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.....	69
Abb.26: Die Abbildung zeigt exemplarisch das Wachstum von <i>F. oxysporum</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher phenolischer Substanzen und Konzentrationen (A) Rutin, Kontrolle, p-Cumarsäure, Ferulasäure (2mmol). (B) Rutin, Kontrolle, p-Cumarsäure, Ferulasäure (6mmol).....	70
Abb.27: Einfluss von Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure (1mmol) auf das Myzelwachstum von <i>F. oxysporum</i> in Flüssigkultur. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 5 Wiederholungen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.....	71
Abb.28: Einfluss von p-Cumarsäure, Ferulasäure und Rutin (1mmol) auf die Beauvericin-Produktion durch <i>F. proliferatum</i> in Flüssigkultur. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.....	71
Abb.29: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen Erntesaison 2010 am Standort M.	79
Abb.30: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen Erntesaison 2010 am Standort S.	79
Abb.32: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen Erntesaison 2010 am Standort T.	80
Abb.33: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen Erntesaison 2011 am Standort T.	80
Abb.34: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Rutin, p-Cumarsäure und Ferulasäure (0, 1, 2, 5, 6 mmol) auf das Wachstum von <i>F. proliferatum</i> und <i>F. oxysporum</i> (medialer Kolonialradius in cm) <i>in vitro</i> . Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des medialen Kolonialradius von jeweils 3 Wiederholungen bei unterschiedlichen Konzentrationen.	81

Tabellenverzeichnis

Tab.1 Standorte der Probeentnahmen.....	28
Tab.2: Spargelklassen gemäß der UNECE-Norm FFV04	28
Tab.3: Verwendete Pilzkulturen für die Inokulation.....	30
Tab.4: Für die Multiplex PCR verwendete Oligonukleotid Primer.....	31
Tab.6: Mittlere Monatstemperatur (°C) im April, Mai und Juni 2010 im Vergleich zum langjährigen Mittelwert (Abweichung in °C) auf den Standorten des <i>Fusarium</i> spp. Monitorings	36
Tab.7: Mittlere Niederschlagsmenge (mm) im April, Mai und Juni 2010 im Vergleich zum langjährigen Mittelwert (Abweichung in %) auf den Standorten des <i>Fusarium</i> spp. Monitorings.....	36
Tab.8: Mit Fumonisin kontaminierte Spargelproben an unterschiedlichen Standorten (M/S) auf je zwei unterschiedlichen Feldern (M1, M2, S1, S2) im Mai (M1/1, M2/1, S1/1, S2/1) und Juni (M1/2, M2/2, S1/2, S2/2). Fumonisin B1, B2, B3 und Total (ppb), Befall mit <i>F. oxysporum</i> / <i>F. proliferatum</i> und <i>F. proliferatum</i> Konzentration (ng DNA/100mg TG) in den einzelnen Spargelstangen. ND=nicht detektierbar, da unterhalb LOD; LOD = 0,003 µg/g.....	38
Tab.9: Mit Fumonisin kontaminierte Proben der Varianten Spargelstangen mit Symptomen (S), randomisiert vom Feld entnommene Stangen (F) im Erntejahr 2010 am Standort T. Fumonisin B1, B2, B3 und Total (ppb), Befall mit <i>F. oxysporum</i> / <i>F. proliferatum</i> und <i>F. proliferatum</i> Konzentration (ng DNA/100 mg TG) in den einzelnen Spargelproben. ND=nicht detektierbar, da unterhalb LOD; LOD = 0,003 µg/g... ..	39
Tab.10: Fumonisin B1, B2, B3 und Total (ppb), Befall mit <i>F. oxysporum</i> / <i>F. proliferatum</i> und <i>F. proliferatum</i> Konzentration (ng DNA/100 mg TG) in den Varianten Spargelstangen mit Symptomen (S), randomisiert vom Feld entnommene Stangen (F) . Diese wurden nach der Betriebslagerung jeweils entweder 24h bei Raumtemperatur (R) oder bei 4°C im Kühlraum gelagert (K). ND=nicht detektierbar, da unterhalb LOD; LOD=0,003 µg/g.....	42
Tab.11: Beauvericin-Gehalt (ppb) in Spargelstangen im Erntejahr 2012 in Abhängigkeit unterschiedlicher Verpackungen und Lagerbedingungen. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. * signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$	45
Tab.12: Gesamtphenol-, Rutin-, p-Cumarsäure-, Ferula- und Chlorogensäuregehalt (mg/g TG) und in Weiß-, Grün- und Purpurspargel im Erntejahr 2012. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche und Standardabweichungen von jeweils 20 Wiederholungen	66
Tab.13: Mittlere inhibitorische Konzentration von Rutin, p-Cumarsäure und Ferulasäure (mmol), die 50 % des Wachstums von <i>F. proliferatum</i> bzw. <i>F. oxysporum</i> in vitro hemmt.....	70
Tab.14: Prozentuale Wachstumshemmung auf <i>F. oxysporum</i> und <i>F. proliferatum</i> durch unterschiedliche Konzentrationen (mmol) phenolischer Verbindungen.....	82

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
BEA	Beauvericin
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FB	Fumonisin
h	Stunde
ha	Hektar
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
ppb	Parts per Billion
spp	Spezies
TG	Trockengewicht
UV	ULtraviolettstrahlung
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
xg	-fache Beschleunigung 9,81 m/s ²
z.B.	Zum Beispiel

Literaturübersicht

Spargel (Asparagus officinales L.)

Spargel (*Asparagus officinalis*) ist eine mehrjährige Pflanze und eine Pflanzengattung in der Familie der Spargelgewächse (*Asparagaceae*). Die Wortherkunft leitet sich vom griechischen Wort „asparagos“ (junger Trieb) und dem neulateinischen Wort „officinales“ (als Arzneimittel verwendet) ab. Es wird berichtet, dass in Deutschland Spargel zunächst vornehmlich als Arzneimittel und weniger als Gemüse angebaut wurde. Erst um die Mitte des 16. Jahrhunderts wurden in Deutschland die ersten Spargelbeete im „Stuttgarter Lustgarten“ angepflanzt (Hartmann, 1989; Peirce, 1987). Im 19. Jahrhundert gewann mit Organisation des ersten Vertragsanbaus in Braunschweig der Spargelanbau zunehmend an Bedeutung. In Deutschland gehört Spargel heute zu der bedeutendsten Kulturart mit einer Anbaufläche von 27000 Hektar (ha, im Jahr 2016), von der ca 95 % auf die Kultivierung von Bleichspargel entfällt. Weltweit liegt die Fläche der Ertragsanlagen bei ca 957000 ha mit einem Schwerpunkt in China, gefolgt von Europa, USA, Japan und Peru. Bei der Gesamtmenge des geernteten Spargels weltweit entfallen ca. 55 % auf Bleich- und 45 % auf Grünspargel (Hartmann, 1989).

Die Spargelpflanze zählt morphologisch zu den Wurzelsukkulente und besteht aus unterirdischen Pflanzenteilen, die in ihrer Gesamtheit als Krone bezeichnet werden und aus oberirdischen Pflanzenteilen, die als Triebe, Aufwuchs oder Kraut benannt sind. Die Krone setzt sich zusammen aus 2–6 mm dicken, bis zu 5 m langen, unverzweigten Speicherwurzeln, den verzweigten oder unverzweigten zumeist nur einjährigen Faserwurzeln und dem Rhizom. Das Rhizom besteht aus Knospenbündeln, den sogenannten Clustern, aus denen sich neben den Trieben auch die Speicherwurzeln entwickeln. Diese sind nur bedingt in der Lage Wasser und Nährstoffe aufzunehmen und dienen hauptsächlich als Speicherort von Reservestoffen. Die einjährigen Faserwurzeln hingegen, die aus dem Zentralzylinder der Speicherwurzeln wachsen und Bodentiefen bis zu 5 m erreichen können, sind in der Lage tiefere Bodenschichten zu erschließen und so eine ausreichende Nährstoff- und Wasserversorgung zu gewährleisten. Die Krone insgesamt stellt folglich ein großes Speicherpotential für Kohlenhydrate und andere Reservestoffe dar, welches von Bedeutung für eine adäquate Triebbildung in der Stechperiode ist. Die oberen Pflanzenteile werden als Triebe oder Kraut bezeichnet oder, wenn sie geerntet werden, als Stange. An den Trieben zweiter oder dritter Ordnung befinden sich die büschelartigen Kurztriebe, auch Phyllokladien genannt. Diese sind nadelförmig, stielrund, mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einer Länge von bis zu 2 cm und stellen die eigentlichen Assimilationsorgane dar. An den Blütenstielen, die axillar am Grund einzelner Phyllokladien entspringen, wachsen kleine Blüten. Die männliche Variante besitzt einen unfruchtbaren Fruchtknoten und sechs Staubblätter, während die weiblichen einen dreifächrigen Fruchtknoten mit maximal 6 Samenanlagen und sechs verkümmerten Staubblättern aufweisen. Aus den weiblichen Blüten entwickeln sich erbsengroße, kugelige Beeren. Die für die Samenreife verbrauchte Energie führt zu einem niedrigeren Ertrag, weshalb männliche Pflanzen für die Spargelproduktion bevorzugt werden. Sie bilden

insgesamt größere Kronen und somit ein größeres Speicherpotential, treiben früher aus, bilden mehr Triebe und garantieren so einen höheren Ertrag (Hartmann, 1989).

Für optimale Erträge während der Vegetationsperiode benötigt man allgemein leichte, lehmige oder humose Sandböden mit guter Wasserspeicherkapazität, einem pH-Wert zwischen 5,8-6,2, Lufttemperaturen zwischen 25 °C - 28 °C, sowie einer Bodentemperatur von über 12 °C.

Die gängigste Methode des Erstellens einer Spargelanlage ist das Setzen von Jungpflanzen mithilfe einer Spargelpflanzmaschine im Frühjahr. Diese werden in Reihen mit Abständen zwischen 1,6 - 2 m und Pflanzabständen von 0,3 - 0,45 m in Gräben mit einer Tiefe von 30 - 40 cm eingepflanzt. Erst ab dem vierten Standjahr, also drei Jahre nach dem Pflanzen, kann die Anlage bis zum 24. Juni voll beerntet werden. Das typische Anhäufeln der Spargeldämme auf 40 cm Höhe erfolgt ausschließlich maschinell, bevor die Dämme gewöhnlich mit Folien abgedeckt werden. Als am effektivsten hat sich die Schwarz-Weiß-Folie herauskristallisiert. Diese verhindert zum einen, dass sich die bereits durch den Damm gewachsenen Spargelspitzen aufgrund des Lichteinflusses violett färben, zum anderen vermeidet sie eine Austrocknung des Bodens. Durch den Einsatz von Schwarz-Weiß Folien kann weiterhin kurzfristig auf die vorherrschenden Temperaturverhältnisse reagiert werden. Durch die weiße Seite (kühlende Funktion) können Erntespitzen gedrosselt werden und durch die schwarze Seite kann durch die Erhöhung der Temperatur die Ernte bei kühleren Witterungsverhältnissen um bis zu einer Woche vorverlegt werden. Zusätzlich kommt zum Zweck der Ernteverfrüherung auch häufiger das System der Minitunnel zum Einsatz. Hier wird zusätzlich zur Schwarz-Weiß Folie eine transparente Folie über Stahlbügel über die Dämme gespannt und so ein Mikroklima, ähnlich wie in einem Gewächshaus, kreiert.

Die Erntezeit endet mit dem 21. Juni (südliches Deutschland 24. Juni), um einer Erschöpfung des Rhizoms vorzubeugen. Für die Ertragsleistung spielen verschiedene Faktoren wie z.B. das Alter der Anlage eine wichtige Rolle. Von größter Bedeutung sind allerdings die Menge der im Vorjahr in den Speicherorganen gesammelten Reservestoffe sowie deren Mobilisierung während der Stechperiode. Spargel nimmt diesbezüglich unter den Gemüsearten eine Sonderstellung ein. Im Spargel werden die notwendigen Reservekohlenhydrate im Aufwuchs gebildet, in die Speicherwurzeln verlagert und schließlich in Form von wasserlöslichen Zuckern, Fruktanen, gespeichert. In den Wintermonaten erfolgt dann eine zunehmende Mobilisierung der Fruktane zu Glukose und Fruktose, wodurch der Aufwuchs der Triebe im Frühjahr und somit der Ertrag entscheidend beeinflusst wird (Ernst und Krug, 1998). Wirtschaftlich ist eine Spargelanlage in der Regel 6 -10 Jahre. Grund für den Rückgang des Ertrags ist u.a. die Bodenmüdigkeit, die auch durch eine Anhäufung von bodenbürtigen Pilzen (z. B. *Fusarium* spp.) hervorgerufen wird. Dies ist vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass Brachland für Neuanlagen aufgrund der Expansion des Spargelanbaus in den letzten Jahren selten zur Verfügung steht, Spargel aber aufgrund seiner Selbstunverträglichkeit frühestens nach 20 Jahren auf demselben Feld angebaut werden sollte.

Um die Frische und Qualität des Spargels erhalten zu können, muss die Zeitspanne zwischen dem Stechen und dem Verzehr möglichst geringgehalten werden; dies kann in erster Linie über den Weg der

Direktvermarktung erreicht werden. In Regionen, in denen traditionell kein Spargel angebaut wird, sind Kunden auf Supermärkte und Discounter angewiesen. In diesem Fall müssen bestimmte Bedingungen berücksichtigt werden, um die Qualität des Spargels während der verschiedenen Vermarktungsprozessstufen, wie z.B. der Lagerung, aufrechtzuerhalten.

Die hauptsächliche Ursache für den Nachernteverlust bei Spargel, stellt die hohe Transpirationsrate nach der Ernte dar. Die Frischmasseverluste ist bei Spargel nicht nur auf den unterschiedlichen Wasserdampfdruck von Interzellularräumen zur Umgebungsatmosphäre zurückzuführen, sondern vor allem durch dissimilatorische Vorgänge während des Atmungsprozesses (Heß,1999). Die Intensität des Energiestoffwechsels beeinflusst die Höhe der Respirationsrate. Diese ist hoch im juvenilen und niedrig im seneszenten Stadium. Da Spargel während des Wachstums geerntet wird, weist dieser im Vergleich zu anderen Gemüsearten eine hohe Atmungsrate auf (Cantwell,1992). Verglichen mit anderen Kulturen, wie z.B. Zwiebeln oder Kartoffeln, ist die Respirationsrate 6-fach höher. Spargel ist daher ein vergleichsweise anspruchsvolles Gemüse und stellt aufgrund seiner relativ hohen Respirationsrate folglich eine Herausforderung in der Nachernteprozesskette dar.

Die Atmungsaktivität kann durch Stress, z.B. hervorgerufen durch Verwundung während des Ernteprozesses, zusätzlich verstärkt werden. Die Qualitätsminderung während des Nachernteprozesses ist vor allem von der Temperatur, der Luftfeuchtigkeit sowie der Lagerdauer abhängig; so hemmen niedrige Temperaturen das Schlüsselenzym der Ligninbiosynthese und somit die Verholzung (Chen et al., 1980). Temperaturen über 6 °C führen zu deutlichen Verlusten an Kohlenhydraten und steigern signifikant das Längenwachstum (Hurst et al., 1997). Die Wirkung der Lagerdauer ist stark mit der Lagertemperatur assoziiert. So sinkt die Haltbarkeit von Spargel linear mit steigender Temperatursumme (Brash et al., 1995). Eine niedrige Luftfeuchtigkeit während der Lagerung führt zu einem Öffnen der Spargelköpfe und ferner zu einem Frischmasseverlust (Villanueva-Suarez et al., 1999). Niedrige Temperaturen und eine Luftfeuchtigkeit von 95 % sind folglich im Nachernteprozess anzustreben.

Der Befall von Spargel mit *Fusarium* spp., die damit assoziierten potentiellen Schadbilder sowie eine damit einhergehende Minderung von äußeren und inneren Qualitätsparametern, sowie eine Mykotoxinkontamination können während des Nachernteprozesses potentiell verstärkt werden. Convenience-Produkte unterliegen einem höheren Risiko des Verderbs verglichen zu unbehandelter Ware. Die Stoffwechselaktivität kann bis zum zwanzigfachen erhöht sein (Cantwell 1992). Unterschiedliche Folienverpackungen schützen das Produkt während der Lagerung vor äußeren Umwelteinflüssen und üben gleichzeitig Einfluss auf Qualität und Haltbarkeit des Produktes aus.

Umfassende Untersuchungen hierzu hat Kadau (2005) durchgeführt und so zahlreiche Einflussfaktoren auf den Pilzbefall von geerntetem Spargel unter verschiedenen Lagerbedingungen definiert, sowie handelsübliche Polypropylen- und biologisch abbaubare Verpackungsfolien auf ihre Eignung zur Qualitätssicherung von Convenience Spargel untersucht. Dabei waren die entscheidenden Veränderungen der Qualitätsparameter auf die unterschiedliche Permeabilität der Verpackungsfolien für Sauerstoff und

Kohlendioxid zurückzuführen. Die Veränderung des sogenannten Respirationsquotienten übte signifikanten Einfluss auf die Spargelqualität aus, des Weiteren führte sie zur Inhibierung des endophytischen Pilzwachstums.

Angesichts einer gesteigerten Nachfrage nach frischen hochwertigen Lebensmitteln durch den Verbraucher wurden viele Verfahren entwickelt, die Qualität von Spargel nach der Ernte aufrecht zu erhalten. Neben verschiedenartigen Verpackungsfolien, haben vor allem das Mikroklima und die atmosphärische Zusammensetzung der Luft während der Lagerung einen Effekt auf die Qualität von Spargel. Zu der gängigsten und effektivsten Technik gehört die Lagerung von Spargel unter Modified Atmosphere Packaging - Bedingungen (MAP). Durch das MAP wird beim Abpacken durch eine Schutzbegasung eine bestimmte Gasatmosphäre innerhalb der Verpackung erzeugt. Von besonderer Bedeutung für den Spargel ist ein speziell abgestimmtes Sauerstoff-Stickstoff Verhältnis, sowie insgesamt ein niedriger Sauerstoffgehalt und ein konstanter Kohlendioxidgehalt. Für die Auswahl der geeigneten Schutzbegasung muss nicht nur die gewünschte Gaszusammensetzung berücksichtigt werden, sondern auch die Atmungsrate des Spargels sowie die Durchlässigkeit der Verpackung, da diese Faktoren erheblichen Einfluss auf die Gaszusammensetzung in der Verpackung während der Lagerung haben (Sandhya, 2010). Die Lagerung von Spargel unter kontrollierten Bedingungen führt zu einer verminderten Respirationsrate, einem verminderten Infektionsdruck von Mikroorganismen sowie lediglich zu marginalen Veränderungen bezüglich Textur und Inhaltsstoffen (Mckenzie et al., 2004).

Fusarium spp.

Die Gattung *Fusarium* gehört zu den Schimmelpilzen und beinhaltet imperfekte, zumeist bodenbürtige Erreger. Im Jahr 1809 führte Heinrich Friedrich Link die Gattung *Fusarium* ein. Die Angaben über die genaue Anzahl der zugehörigen Pilze sind schwankend, aufgrund der Koexistenz unterschiedlicher Spezieskonzepte (Leslie und Summerell, 2006).

Das relevanteste und populärste ist das morphologische Spezieskonzept, welches die Unterscheidung verschiedener Spezies anhand morphologischer Merkmale wie Größe, Form, Mikrokonidien, Makrokonidien und deren Septierung vorsieht (Leslie und Summerell, 2006).

Das erste einheitliche Spezieskonzept für *Fusarium spp.* wurde von Wollenweber und Reinking etabliert. In ihrer 1935 erschienenen Monografie teilten sie, basierend auf der Grundlage morphologischer Merkmale gemäß internationalem Code der botanischen Nomenklatur, die 1000 unterschiedlichen Artbezeichnungen in 16 Sektionen ein, welche wiederum 65 Arten, 55 Varietäten und 22 Formen enthalten.

Mit der von Gerlach und Nirenberg überarbeiteten Monografie aus dem Jahr 1982, wurde ein auf Wollenweber und Reinking basierendes überarbeitetes System mit 78 Arten und 34 Varietäten erstellt, in dem die Gestalt der Mikrokonidien als primäres taxonomisches Kriterium zur Unterscheidung herangezogen wird.

Fusarium spp. sind kosmopolitisch in Böden aller Kontinente vertreten, die Antarktis ausgenommen. Aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit sind sie in der Lage auch in lebensfeindlichen Umgebungen zu persistieren (Mandeel, 2006). In Abhängigkeit von Umweltbedingungen und Art bilden *Fusarium* spp. Makrokonidien, Mikrokonidien sowie Chlamydosporen zur Überdauerung aus.

Die Lebensweisen von *Fusarium* spp. sind mannigfaltig; neben phytopathogenen Isolaten existieren auch Human- und Tierpathogene sowie Endophyten und Saprophyten.

Eine große Anzahl von bodenbürtigen *Fusarium* spp. ernähren sich saprotroph; allerdings sind diese Saprobionten auch in der Lage über Verletzungen oder vorangegangene Primärfektionen in Kulturpflanzen einzudringen und sie nachhaltig zu schädigen. Tatsächlich sind zahlreiche Vertreter dieser Gattung Hauptverursacher von Ertrags- und Qualitätseinbußen agrarwirtschaftlich wichtiger Kulturpflanzen und führen zu Fäulen an Wurzel, Stängelbasis und Früchten sowie echten Welken und Umfallkrankheiten bei Keimlingen (Blok und Bollen, 1995). Bei der Getreideernte in den USA zwischen 1990 und 1999 kam es aufgrund von Ährenfusariosen zu hohen volkswirtschaftlichen Schäden von ca. drei Milliarden US\$ (Windels, 2000). In Deutschland wurde z.B. in den Jahren 2002 und 2007 über ein außergewöhnlich starkes Auftreten von *Fusarium* spp. und damit verbundene Ertragseinbußen berichtet (Herold 2008).

Wirtschaftlich bedeutende Krankheiten, die durch *Fusarium* spp. hervorgerufen werden sind z.B. die partielle Weißährigkeit in Weizen durch *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans* und *F. proliferatum* (Munkvold, 2003) oder die Fusariumwelke in Baumwolle, hervorgerufen durch *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Fusariosen, wie z.B. die Wurzel- und Stängelfäule, sind weltweit für erhebliche Ernteverluste im Spargelbau verantwortlich. Neben den beiden Haupterregertypen *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, sind auch *F. redolens*, *F. verticillioides* und *F. moniliformine* maßgeblich für das Auftreten der Wurzelfäuleerkrankung verantwortlich (Blok und Bollen, 1995; Elmer, 2000; Baayen et al., 2000; Knaflewski, 1990; Gossmann et al., 2001).

Die Infektion der Spargelpflanze mit *Fusarium* spp. wird hauptsächlich durch die vorherrschende Witterung beeinflusst. Umweltfaktoren wie Temperatur, Niederschlag und Luftfeuchte beeinflussen das Auftreten von *Fusarium* spp.-Infektionen maßgeblich (Elmer, 2000). Weiterhin können mechanische Verletzungen oder der Befall mit Insekten, Eintrittspforten für bodenbürtige Pathogene bieten (Goßmann et al., 2008; Weidenbörner, 1999). In wärmeren Regionen wird oft *F. proliferatum* als dominierende Spezies beschrieben (Elmer et al., 1997; Logrieco et al., 2003), während in den gemäßigt kühleren Regionen eher *F. oxysporum* dominant ist (Elmer et al., 1996). In einer umfassenden Studie von Koch (2010) konnte das pilzliche Erregerspektrum auf niedersächsischen Spargelanlagen festgestellt werden. So wurden hier entsprechend als dominante *Fusarium* spp.-Arten an infizierten Spargelstangen *F. oxysporum* (81%) sowie *F. proliferatum* (32 %) beobachtet. Zusätzlich zu ihrer phytopathologischen Bedeutung, kann durch die begleitende Kontamination mit Mykotoxinen auch ein Gesundheitsrisiko bei Mensch und Tier nicht ausgeschlossen werden.

Mykotoxine

Mykotoxine sind natürliche Sekundärmetabolite, die unter geeigneten Umweltbedingungen von filamentösen Pilzen, hauptsächlich *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. und *Fusarium* spp., produziert werden. Sie können während des Wachstums und der Lagerung von pflanzlichen Lebensmitteln als auch nach deren Verarbeitung zu Lebens- und Futtermitteln gebildet werden (Smith et al., 1994).

Die Produkte des Sekundärmetabolismus sind im Gegensatz zu denen des Primärstoffwechsels spezifisch für ihre Produzenten und nicht bei allen Organismen zu finden. Die Gene, die im Sekundärmetabolismus involviert sind, werden auf der Transkriptomebene in sogenannten Clustern organisiert (Keller et al., 1997; Yu und Keller, 2005). Diese Gencluster werden über zwei Klassen von Transkriptionsfaktoren koreguliert. Man unterscheidet diejenigen, die spezifisch für einen metabolischen Stoffwechselweg sind von denjenigen, die global die Vermittlung von Umweltreizen regulieren (Zhang et al., 2004). Der Velvet-Komplex und insbesondere die putative Methyltransferase LaeA, stellt beispielsweise einen wichtigen globalen Regulator des pilzlichen Sekundärmetabolismus dar (Lind et al., 2016).

Der Sekundärstoffwechsel reagiert sensibel auf Umgebungsbedingungen; so werden bestimmte sekundäre Stoffwechselprodukte nur unter spezifischen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen, bei bestimmtem Nährstoffangebot oder in bestimmten Entwicklungsphasen gebildet. Schlüsselfaktoren, wie Temperatur, Feuchtigkeit, Nährboden, Nährstoffangebot, pH-Wert und Atmosphäre beeinflussen die Produktion von Mykotoxinen maßgeblich. Die biologische Funktion von Mykotoxinen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden u.a. eine metabolische Kontrollfunktion sowie eine ökologische Rolle bei Interaktionen mit anderen Organismen (Keller et al., 2005; Fox und Howlett, 2008).

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Schimmelpilzwachstum eine Voraussetzung für das Auftreten von Mykotoxinen ist, umgekehrt konnte bis jetzt allerdings nicht mit allen Schimmelpilzen eine Mykotoxinproduktion assoziiert werden. Darüberhinaus kann das gleiche Toxin von verschiedenen Pilzarten synthetisiert werden, jedoch müssen nicht alle produzierenden Stämme derselben Art angehören. Ferner besteht die Möglichkeit, dass die gleiche Pilzart mehrere, verschiedene Mykotoxine bildet (Waskiewicz et al., 2010; Magan et al., 2002).

Aufgrund ihrer außerordentlich heterogenen chemischen Struktur weisen die meisten der bekannten Mykotoxine eine spezifische Wirkung *in vivo* auf. Das Spektrum an toxischen Eigenschaften reicht von Karzinogenität, Neurotoxizität, Immunsuppressivität, Mutagenität, Teratogenität, Hepatotoxizität bis zu Nephrototoxizität und stellt so ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar (Espada et al., 1994; Kuiper-Goodman et al., 1996; Gross et al., 1994; Gelderblom et al., 1992; Howard et al., 2001; Chu und Li, 1994; Rheeder et al., 1992). Jedoch kann diese Klassifizierung nicht umfassend angewendet werden, da aufgrund der chemischen Vielfalt der sekundären Metabolite, mehrere Regionen des Körpers gleichzeitig betroffen sein können. Das natürliche gleichzeitige Auftreten verschiedener Mykotoxine kann zu synergistischen,

additiven und antagonistischen Wechselwirkungen führen, die die Klassifizierung von Mykotoxinen erschweren (Bennett et al., 2003).

Hinweise auf durch Mykotoxine verursachte toxikologische Krankheitsbilder bei Mensch und Tier, sogenannte Mykotoxikosen, lassen sich bis ins Mittelalter zurückverfolgen. Die älteste übermittelte Mykotoxikose ist unter dem Namen „St. Antonius Feuer“ oder Ergotismus bekannt. Hervorgerufen wurde diese durch die Verunreinigung des zu dieser Zeit wichtigsten Getreides in Mitteleuropa, des Roggens, mit Sekundärmetaboliten des Pilzes *Claviceps purpurea* (Mielke, 2000).

Die Intensivierung der modernen Mykotoxinforschung begann in den 1960er Jahren mit der Entdeckung der Aflatoxine als Ursprung für das Auftreten des Massensterbens von Truthühnern in England. Aufgrund der „Turkey X disease“ verendeten ca. 100000 Truthühner innerhalb weniger Monate. Als Ursache konnte kontaminiertes Erdnusschrot aus Brasilien identifiziert werden (Blount, 1961). Seitdem wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um das Auftreten, die Toxizität, Prävention und Detoxifizierungsstrategien von Mykotoxinen zu analysieren.

Zu den bedeutendsten Mykotoxinbildnern gehören Pilze der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* (Gareis, 1999). Während die Arten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* vor allem als Lagerpilze betrachtet werden, da diese ihre Wirte erst nach der Ernte infizieren und so vor allem für Nachernte- und Lagerschäden verantwortlich sind, gelten Arten der Gattung *Fusarium* als Feldpilze. Hier können die Besiedlung sowie die Mykotoxinbildung folglich schon vor der Ernte beginnen und während des Lagerungs- sowie Verarbeitungsprozesses weiter expandieren. Die Arten der Gattung *Fusarium* produzieren die drei wichtigsten Klassen von Mykotoxinen sowohl in Bezug auf den Schädigungsgrad in der Pflanzenproduktion als auch für die tierische und menschliche Gesundheit: A-Trichothecene (T2-Toxin, HT2-Toxin) und B-Trichothecene (Deoxynivalenol, Acetyldeoxynivalenol, Nivalenol, Fusarenon X), Zearalenon und FB (Chelkowski et al., 1998; Desjardins, 2006). Ebenso gelten *Fusarium* spp. als Produzenten sogenannter „neuerer“ Mykotoxine: Moniliformin sowie die Cyclohexadepsipeptide BEA, Enniatin und Fusaproliferin (Bottalico et al., 1995; Jestoi et al., 2004; Moretti et al., 2007).

Unter den pilzlichen Sekundärmetaboliten stellen FB diejenigen mit dem höchsten Toxizitätspotential dar. Aufgrund der relativ hohen Gehalte, der ubiquitären Verteilung, des relativ häufigen Vorkommens in agrarwirtschaftlich bedeutenden Pflanzen sind folgende *Fusarium* spp. bezüglich der FB-Synthese von besonderer Bedeutung: *F. verticillioides* (Branham et al., 1993; Musser et al., 1997); *F. sacchari* (Leslie et al., 1992); *F. proliferatum* (Castell et al., 1999; Jimenez et al., 1997; Thiel et al., 1991); *F. subglutinans* (Leslie et al., 1992) *F. globosum* (Sydenham et al., 1997), *F. oxysporum* (Seo et al., 1996; Rheeder et al., 2002; Waskiewicz et al., 2010). Der einzige FB-produzierende Pilz, der nicht der Gattung *Fusarium* angehört, ist *Alternaria alternata* (Abbas et al., 1996).

FB sind langkettige, methylverzweigte Aminoalkohole, deren Kohlenwasserstoffgrundgerüst in der Regel 20 C-Atome umfasst und die aufgrund ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit zu Sphingosin und Sphingalin, zu den Sphingalin-analogen Mykotoxinen gezählt werden (Caldas et al., 1995). Insgesamt

sind mittlerweile 15 verschiedene Isomere beschrieben worden, die sich vor allem durch ihr Hydroxylierungsmuster voneinander unterscheiden (Domijan, 2012). FB-Analoga werden in Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur in die Hauptklassen Typ FB A, B, C, D und P klassifiziert. Die FB-Analoga, bestehend aus den toxikologisch wichtigen FB1, FB2 und FB3, sind die am häufigsten natürlich vorkommenden Fumonisine, wobei FB1 deutlich abundant ist und in der Regel die höchsten Konzentrationen aufweist (Marasas, 1996).

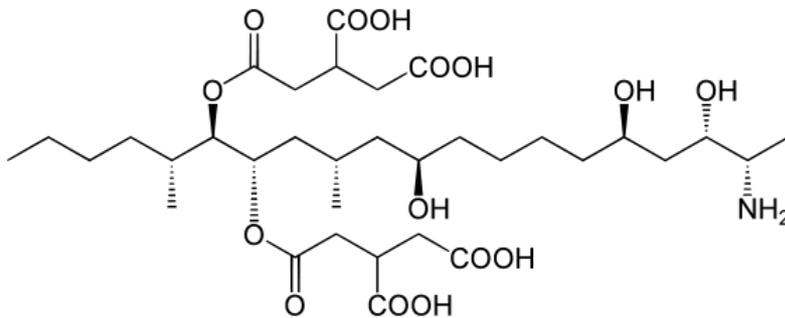


Abb.1: Chemische Struktur FB1.

Neben Mais werden FB hauptsächlich in Reis (Abbas et al., 1998), Weizen, Gerste und Sojabohne (Castella et al., 1999; Garcia et al., 2012) sowie Hirse (Gamanya und Sibanda, 2001) nachgewiesen. Aber auch in Spargel und Zwiebeln konnten FB-Kontaminationen nachgewiesen werden (Seefelder et al., 2002; Liu et al., 2007; Weber et al., 2006; Goßmann et al., 2001; Waskiewicz et al., 2010).

Erstmals charakterisiert wurden FB von Gelderblom et al. im Jahr 1988. Ihnen gelang es FB aus *F. verticillioides* von Mais zu isolieren, und eine Verbindung zu der damals in Südafrika flächendeckend auftretenden Pferdekrankheit Leukoencephalomalacia herzustellen, die sich als Nekrose der weißen Hirnmasse äußerte. Weiterhin wurde ihnen eine Beteiligung an dem Auftreten von Speiseröhrenkarzinomen nachgewiesen.

FB1 ist das am häufigsten vorkommende FB und weist gleichzeitig den höchsten Toxizitätsgrad auf. Die Wirkungsmechanismen sind komplex. Die Inhibierung der Ceramidsynthase, einem Schlüsselenzym des Sphingolipidmetabolismus, das für die Acylierung von Sphingosin und Sphinganin verantwortlich ist (Wang et al., 1991; Merrill et al., 2001), stellt den gravierendsten biochemischen Effekt dar. Ceramide stellen wichtige Bestandteile tierischer Biomembranen dar, folglich ist das Schadbild entsprechend vielfältig: Fumonisine weisen neurotoxische, nephrotoxische, hepatotoxische, zytotoxische sowie karzinogene Eigenschaften auf (Espada et al., 1994; Kuiper-Goodman et al., 1996; Gross et al., 1994; Gelderblom et al., 1992). Die Rolle der FB als Tumorpromotoren und –initiatoren konnte in verschiedenen wissenschaftlichen Studien nachgewiesen werden. Nach einer täglichen Dosis von 50 mg/kg FB1 nach 20 Monaten wurde beispielsweise in 100 % aller Versuchstiere Leberzirrhose und in 66 % Leberkrebs induziert (Gelderblom et

al., 1992). Ferner konnte mit FB1 eine eindeutige kanzerogene Aktivität in männlichen Ratten und weiblichen Mäusen assoziiert werden (Howard et al., 2001).

Bisher existieren keine Daten, die eine akute Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch die Exposition mit FB verifizieren. Jedoch wird eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Speiseröhren- sowie Leberkarzinomen (Chu und Li, 1994; Rheeder et al., 1992) postuliert.

Auf nationaler Ebene liegt ein Höchstmengen-Entwurf vor, in dem für Mais sowie Maiserzeugnisse FB1 und FB2 Konzentrationen von insgesamt max 500 µg/kg vorgeschlagen werden. Für Cornflakes sowie für Mais- und Maiserzeugnisse, die zur Herstellung diätetischer Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder eingesetzt werden, werden Grenzwerte von 100 µg/kg empfohlen. Die tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) ist als 2 µg/kg definiert, und wurde von dem Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss der Europäischen Union (Scientific Committee on Food, SCF) sowohl für FB1 einzeln als auch für die Summe aus FB1, FB2 und FB3 festgelegt.

Neben human- und tiertoxikologischen Wirkungen, konnten für FB auch eine Beteiligung an der Phytopathogenese nachgewiesen werden. So können FB u.a. Nekrosen, eine Inhibierung des Wachstums, eine Herabsetzung der Samenkeimfähigkeit in Mais und anderen Getreidepflanzen, sowie Stechapfel hervorrufen (Abbas und Boyette, 1992; Lamprecht et al., 1994).

BEA wird als neueres Mykotoxin bezeichnet. Das chemische Grundgerüst stellt ein zyklisches Hexadepsipeptid dar, welches abwechselnd aus D-Alpha-Hydroxy-Isovaleryl- (Alpha-Hydroxy-3-Methylbutansäure) und Aminosäure-Einheiten aufgebaut ist. Hamill et al. (1969) konnten BEA erstmals im Jahr 1969 aus *Beauveria bassiana* isolieren.

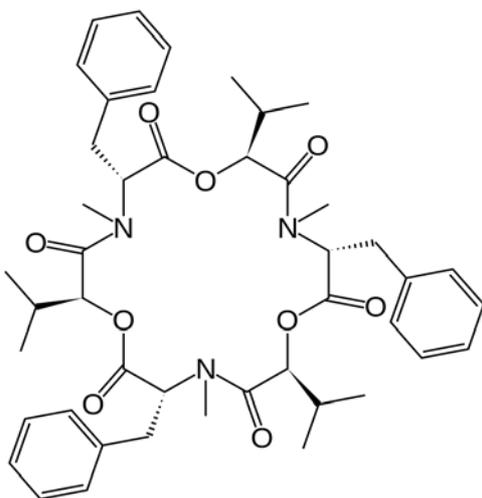


Abb.2: Chemische Struktur BEA

Es gibt zahlreiche *Fusarium* spp., für die eine BEA-Produktion dokumentiert werden konnte, u.a. *F. oxysporum* (Logrieco et al., 1998), *F. proliferatum* (Abbas et al., 1999; Waskiewicz et al. 2010), *F. subglutinans* (Torres et al., 2001). Weiterhin konnten regionale Unterschiede hinsichtlich der Mykotoxin-Produktion innerhalb der verschiedenen Fusarien gefunden werden, welche wahrscheinlich durch genetische Variation und verschiedene klimatische Faktoren begründet sind (Moretti et al., 1995).

Für BEA wurden in gegenwärtigen Studien immer wieder höhere Konzentrationen in verschiedenen agrarwirtschaftlich wichtigen Produkten gefunden. Da das von ihnen ausgehende Gesundheitspotenzial noch nicht ausreichend abgeschätzt werden kann, wird ihnen immer mehr Bedeutung zugemessen. Logrieco et al.(1993) konnten in natürlich mit *F. subglutinans* infiziertem Mais aus Polen bis 60 mg/kg BEA nachweisen. Auch in Mais aus Italien wurden BEA-Gehalte bis 500 mg/kg detektiert. Oft trat eine Co-Kontamination mit anderen Fusarientoxinen wie FB, Fusaproliferin oder/ und Moniliformin auf (Bottalico et al., 1995; Ritieni et al., 1997). Fredlund et al. (2013) liefern den Beweis, dass BEA, Enniatine und MON häufig auftretende Kontaminanten in schwedischem Hafer sind. Auch andere Studien belegen die Existenz von BEA in unterschiedlichen Nahrungsmitteln wie Mais (Sulyok et al. 2010), Weizen (Logrieco et al., 2002; Zinedine et al., 2011) und Reis (Sifou et al., 2011; Nazari et al., 2015) und die Tatsache, dass in den meisten Proben eine Koexistenz mehrerer verschiedener Mykotoxine vorliegt (Botalico et al., 1995; Ritieni et al., 1997; de Souza et al., 2013;).

BEA weist insektizide, zytotoxische, antibakterielle und antivirale Wirkungen auf (Dombrink-Kurtzman, 2003; Hamill et al., 1969; Kouri et al., 2003; Prosperini et al., 2013). Die molekulare Struktur ermöglicht Komplexbildungen mit ein- und zweiwertigen Kationen, die so durch die Zellmembran geschleust werden können. Die primäre toxische Wirkung wird auf diese ionophoren Eigenschaften des Moleküls zurückgeführt. Durch Kanalbildung und Carriermechanismen wird die Ionenpermeabilität der Membran verändert, wodurch es in tierischen Zellen u.a. zur Hemmung der Acyl-CoA- Cholesterol-Acyltransferase kommt, ein membrangebundenes Enzym, das die Umwandlung von Cholesterin und zellulären langkettigen Fettacyl-CoA zu Cholesterylester katalysiert (Tomoda et al., 1992). Die Zytotoxizität von BEA gegenüber menschlichen Leukämiezellen basiert wahrscheinlich auf der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche letztendlich zur Apoptose führt (Dombrink-Kurtzman, 2003). BEA hat außerdem eine starke antibiotische Wirkung gegen human-, zoo- und phytopathogene Bakterien (Castlebury et al., 1999). Viele in vitro Studien bestätigen die biologische Aktivität von BEA und verdeutlichen dessen mögliche Toxizität. Es besteht jedoch ein deutlicher Mangel an in vivo Toxizitätsstudien, die sich auf die chronischen Wirkungen fokussieren sowie auf mögliche Wechselwirkungen mit anderen Mykotoxinen.

Das Potential der Phytotoxizität von BEA ist ebenfalls nicht abschließend geklärt, da diesbezüglich nur wenige Studien existieren. Aufgrund der ionophoren Eigenschaften und der somit potentiellen vielfältigen Wirkungsweise, liegt es nahe, dass es insbesondere im Zusammenhang mit Synergieeffekten mit anderen Mykotoxinen zu toxischen Wirkungen kommen kann. So konnten Paciolla et al. (2004) zeigen, dass BEA die Aktivität der Ascorbatperoxidase in Tomatenzellen herabsetzt und möglicherweise eine Rolle beim

Zelltod von Tomaten-Protoplasten spielt. Desweiteren zeigt BEA eine rasche Depolarisation des Membranpotentials in *Fusarium* spp.-toleranten Mais-Wurzeln sowie in jungen Blattparenchymzellen, darüber hinaus eine erhöhte Membranleitfähigkeit in Mais-Wurzeln, als auch eine Hemmung der Atmung in jungen Blattparenchymzellen von Mais (Pavlovkin et al., 2006; Pavlovkin et al., 2012).

Spargel als Quelle ernährungsphysiologisch relevanter phenolischer Verbindungen

Phenolische Verbindungen sind als Sekundärmetabolite des pflanzlichen Stoffwechsels allgegenwärtig und Bestandteil der menschlichen Ernährung. So findet man phenolische Verbindungen in fast allen gesundheitlich relevanten Nahrungsmitteln wie Obst, Gemüse, Hülsenfrüchte, Schokolade, Tee, Kaffee und Wein (Mattila et al., 2007).

Chemisch betrachtet handelt es sich bei phenolischen Verbindungen oder Polyphenolen um sekundäre Stoffwechselprodukte, die in ihrer chemischen Struktur auf das Phenol zurückzuführen sind. Allen gemeinsam ist ein aromatisches Grundgerüst, an das Hydroxylgruppen kondensiert sind. Ihre Mannigfaltigkeit liegt darin begründet, dass die Anzahl der Ringe und die Position der OH-Gruppen variieren können. Die Synthese der phenolischen Verbindungen kann in der Regel über zwei Wege erfolgen: den Shikimatweg, in dem Phenylalanin als Synthesequelle dient, oder den Polyketidweg. Gemäß ihren strukturellen Eigenschaften werden Polyphenole in drei Substanzklassen unterteilt: Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Chalkone (Hemmingway and Laks, 1992). Zu den allgemein wichtigsten Pflanzenpolyphenolen gehören die Flavonoide. Sie bestehen aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen sowie einem O-heterozyklischen Ring. In vivo liegen die meisten Flavonoide nicht frei in Form ihres Aglykons vor, sondern glykosidisch gebunden (Stahl et al., 2002). Dies trägt zu einer erhöhten Löslichkeit im Pflanzensaft bei und stabilisiert gegenüber einem UV-bedingten enzymatischen Abbau (Aherne und O'Brien, 2002). Durch die strukturelle Vielfalt, die sich hauptsächlich durch die unterschiedliche Anzahl an Hydroxy- und Methoxysubstituenten als auch in Art, Anzahl und Anordnung der nicht-acylierten und acylierten Zuckerreste zeigt, sind über 8000 verschiedene Flavonoide beschrieben (Harborne und Williams, 2000). Der Gehalt an Flavonoiden schwankt je nach Pflanzenart und Klima. Die meisten Flavonoide sind in den Randschichten von Pflanzen sowie in den äußeren Blättern zu finden. Ihre Bedeutung für den pflanzlichen Organismus liegt vor allem im Schutz vor UV-Licht und Starklicht, in der Farbgebung von spezifischen Pflanzenteilen, sowie dem Schutz vor Fressfeinden und dem Befall durch Pathogene. Die Produktion kann z.B. durch eine Infektion oder extreme Witterungsverhältnisse gesteigert werden (Watzl und Rechkemmer, 2001).

Die Phenolcarbonsäuren werden in Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren eingeteilt und sind oft mit organischen Säuren oder Zuckern verestert. Zu den wichtigsten Hydroxyzimtsäuren in verschiedenen Obst und Gemüsesorten gehören u.a. Chlorogensäure, p-Cumarsäure und Kaffeesäure (Tiveron et al., 2012).

Spargel ist eine der wichtigsten Quellen der ernährungsphysiologischen relevanten Polyphenole. Untersuchungen haben gezeigt, dass Spargel einen hohen Anteil an natürlich vorkommenden phenolischen Verbindungen enthält, wie z.B. Flavonoide (Makris und Rossiler, 2001) und Carotenoide (Deli et al., 2000). Zu den wichtigsten phenolischen Verbindungen im Spargel zählt das Flavonoid Rutin, welches aufgrund seiner UV-Schutz Eigenschaften vor allem in Grünspargel und Purpurspargel gebildet wird (Tsushida et al., 1994; Wang et al., 2003) sowie die Phenolsäuren Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulasäure (Sakakibara, 2003; Fuentes-Alventosa et al., 2008). Phenolsäuren machen ca. ein Drittel der Gesamtphenolzufuhr der menschlichen Ernährung aus (DGE, 2004).

Es existieren sowohl innerhalb der verschiedenen Bleichspargelsorten als auch zwischen Bleich-, Grün- und Purpurspargelsorten Disparitäten in der Höhe des Gesamtphenolgehalts sowie des Gesamtphenolspektrums. So nehmen der Rutingehalt und der Gesamtphenolgehalt von Purpurspargel über Grünspargel zu Bleichspargel ab (Maeda, 2005). Für die unterschiedlichen Phenolgehalte im Bleichspargel scheinen hauptsächlich vor allem genetische Unterschiede verantwortlich zu sein, nicht aber der Erntezeitpunkt oder der Stangendurchmesser (Papoulias et al., 2009). Eine Abnahme des Flavonoidgehaltes konnte bei geschältem und gelagertem Spargel beobachtet werden, ebenso wie eine Zunahme des Gesamtphenolgehaltes durch Kochen (Papoulias et al. 2009; Fanasca et al., 2009). Während Lagerungsprozessen konnten Rodriguez-Arcos et al. (2004), im Gegensatz zu anderen phenolischen Säuren wie Kaffeesäure und p-Cumarsäure, bei Ferulasäure einen Konzentrationsanstieg verzeichnen. Diese ist Bestandteil der Zellwand und maßgeblich durch die Bildung sogenannter Crosslinks zwischen Zellwandpolymeren an der Texturveränderung des Spargels während der Reife und der Lagerung beteiligt. Weiterhin werden Phenolsäuren häufig mit der Resistenz einiger agrarwirtschaftlich bedeutsamer Produkte, wie z.B. Weizen, gegenüber der Infektion bestimmter Pilzspezies in Zusammenhang gebracht. Durch eine direkte Interferenz mit dem Pilz oder durch die Verstärkung von pflanzlichen Strukturkomponenten, die als mechanische Barriere wirken, können phenolische Verbindungen sowohl das Wachstum einiger Pilzspezies als auch die Produktion von Mykotoxinen, wie z.B. FB, hemmen (Samapundo et al., 2007; Siranidou et al., 2002; Santos et al., 2010, Gauthier et al., 2016)

Zielsetzung

Ausgehend von den dargelegten Grundlagen ist das Ziel dieser Arbeit die Analyse des Einflusses von Umwelt- und Lagerbedingungen auf den Befall mit *F. oxysporum* sowie *F. proliferatum* als auch die Mykotoxinkontamination, insbesondere FB (FB1, FB2, FB3) und BEA, in Spargel. In Kapitel I wird diesbezüglich der gesamte Zeitraum über die Ernte, die Nachernteprozesskette bis einschließlich zur Lagerung beim Endverbraucher verfolgt. Die Widerstandsfähigkeit einiger agrarwirtschaftlich bedeutsamer Produkte, wie z.B. Weizen oder Mais, gegenüber Infektionen mit *Fusarium* spp. korreliert mit einem hohen Anteil phenolischer Substanzen. Daher werden in Kapitel II die Gehalte phenolischer Verbindungen in Spargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen untersucht und deren Potential zur Hemmung des Wachstums von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie der BEA-Produktion ermittelt.

Die Analysen wurden unter Berücksichtigung folgender Arbeitsschwerpunkte durchgeführt:

- **Monitoring.** Die Befallshäufigkeit von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* auf Spargelfeldern unterschiedlicher Standorte soll untersucht werden. Insbesondere das Vorkommen von FB in geernteten Spargelstangen in Abhängigkeit verschiedener Umweltbedingungen soll betrachtet werden. Eine Unterteilung in randomisiert vom Feld entnommenen sowie symptomhaften Spargelstangen als auch Spargelstangen der Klasse Extra soll einen differenzierteren Überblick verschaffen.
- **Lagerung innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Verfahrenskette.** Die Befallshäufigkeit in gelagertem Spargel von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die FB-Produktion soll innerhalb der Verfahrenskette in der Betriebslagerung und bei der anschließenden Lagerung beim Endkunden untersucht werden, um eine potentielle Zunahme der FB-Kontamination im Nachernteprozess aufzuzeigen. Zusätzlich sollen die für den Verbraucher relevanten Convenience Produkte (geschälte und verpackte Varianten) berücksichtigt werden.
- **Lagerversuche mit inokulierten Bleich-, Grün- und Purpurspargelvarianten.** Unterschiede hinsichtlich des FB- und BEA-Bildungspotentials in Bleich-, Grün- und Purpurspargel sowie zwischen den verwendeten Pilzspezies, *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen sollen geprüft werden.
- **Überblick über die Gehalte der wichtigsten phenolischen Verbindungen in Bleich-, Grün- und Purpurspargel sowie Veränderungen während des Lagerungsprozesses.** Analysen zum Gesamtphenolgehalt sowie zum Gehalt an Ferulasäure, p-Cumarsäure, Chlorogensäure sowie dem Flavonoid Rutin in Bleich-, Grün- und Purpurspargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen sollen potentielle Unterschiede zwischen den Spargelvarianten aufzeigen.

- **In vitro Versuch zum Inhibierungspotential phenolischer Verbindungen auf das Pilzwachstum sowie die BEA-Produktion.** Untersuchungen sollen das Potential der einzelnen phenolischen Verbindungen Ferulasäure, p-Cumarsäure, Chlorogensäure sowie dem Flavonoid Rutin ermitteln, das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die BEA-Produktion in vitro zu hemmen. Etwaige Unterschiede zwischen den einzelnen phenolischen Verbindungen sowie den verwendeten Pilzspezies sollen aufgezeigt werden.

1. Einfluss unterschiedlicher Umwelt- und Lagerbedingungen auf den Befall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die Mykotoxinproduktion im Spargel

1.1 Zusammenfassung

Während der Erntezeit im Mai und Juni wurden im Monitoringversuch an den Standorten M, S und T Spargelstangen auf endophytische Besiedlung mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* untersucht. Die Befallshäufigkeit war abhängig vom Zeitpunkt der Entnahme sowie den Witterungsverhältnissen. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der unterschiedlichen Standorte konnten nicht identifiziert werden. Von Mai zu Juni stieg auf allen Feldern die *Fusarium*-Infektion durchschnittlich bis auf 45 %. Darüber hinaus konnte ein verstärktes Auftreten von *F. proliferatum* beobachtet werden. Der Anteil der mit FB1 infizierten Spargelstangen war allgemein im Juni höher als im Mai. Signifikante Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten bestanden nicht. Die FB-Konzentration in den einzelnen Spargelstangen reichte von 1–100 ppb. Am Standort T wurde zusätzlich zwischen randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen, Stangen der Klasse Extra sowie Spargelstangen mit Symptomen unterschieden. In den Stangen der Klasse Extra konnte kein Befall mit *Fusarium* spp. beobachtet werden, eine FB-Kontamination wurde in diesen Spargelproben ebenfalls nicht nachgewiesen. Die Spargelstangen mit Symptomen wiesen die höchste Befallsstärke mit 35 % auf, der Anteil an *F. proliferatum* war mit 5 % gering. Die FB-Gehalte in den Spargelstangen mit Symptomen und Feldstangen beliefen sich im einstelligen ppb-Bereich und sind isoliert betrachtet als unbedenklich einzustufen. Im zweiten Versuchsansatz lag der Fokus auf der Lagerung innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Verfahrenskette. Hier wurde die Befallshäufigkeit von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die FB-Kontamination ermittelt. Die Analysen wurden nach der Betriebslagerung und nach der Betriebslagerung mit zusätzlicher Haushaltslagerung durchgeführt. Hinsichtlich der unterschiedlichen Analysezeitpunkte konnten in Bezug auf den Befall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie der FB-Kontamination keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Es zeigte sich jeweils die höchste Befallshäufigkeit bei den Feldstangen und Spargelstangen mit Symptomen mit nur einem geringen Anteil einer *F. proliferatum* Infektion (5 %). In den Spargelstangen der Klasse Extra konnte kein Befall beobachtet werden. Eine FB-Kontamination konnte jeweils nur vereinzelt in den Spargelstangen mit Symptomen sowie in den Feldvarianten im einstelligen ppb-Bereich beobachtet werden. Eine direkte Korrelation zwischen den Gehalten an DNA (*F. proliferatum*) und der FB-Konzentration konnte nicht festgestellt werden.

Zusätzlich wurde ein Lagerversuch mit Convenience-Produkten unter MAP-Bedingungen durchgeführt. Die geschälten Spargelproben, die zusätzlich verpackt waren, wiesen die höchste BEA-Konzentration in der Variante, die für 7 Tage bei 22 °C gelagert wurden, mit einer Konzentration von 1380 ppb auf.

Im dritten Versuchsansatz sollten in mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* inokulierten Varianten Lagerversuche, in denen Lagerdauer und –temperatur variiert wurden, Aufschluss über das FB- und BEA-Bildungspotential geben. Es wurde unterschieden zwischen mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* natürlich infizierten sowie inokulierten Spargelvarianten. Zusätzlich wurde zwischen Bleich, Grün- und Purpurspargel differenziert. In den natürlich mit *F. proliferatum* infizierten als auch in den mit *F. proliferatum* inokulierten Varianten, die 7 Tage, 22 °C gelagert wurden, konnten die höchsten FB- und BEA-Gehalte detektiert werden. Die BEA-Gehalte wiesen in allen Varianten signifikant höhere Werte auf als die FB-Konzentrationen. Innerhalb der mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* inokulierten Varianten in den Bleich, Grün- und Purpurspargelstangen konnte hinsichtlich der FB- sowie BEA-Konzentrationen zwischen den einzelnen Spargelvarianten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. In allen Spargelvarianten konnten signifikant höhere BEA-Konzentrationen als FB-Konzentrationen nachgewiesen werden. Außerdem konnten signifikant höhere BEA-Gehalte in den mit *F. oxysporum* inokulierten Varianten im Vergleich zu den mit *F. proliferatum* inokulierten Varianten ermittelt werden, unabhängig von der Spargelvariante. Die Untersuchungen liefern einen ersten Beweis für das Vorkommen von BEA in Spargel sowie eine Kokontamination mit FB. Alle in den hier durchgeführten Untersuchungen detektierten Mykotoxinmengen (1-2300 ppb) sind isoliert betrachtet als unbedenklich einzustufen. Das Auftreten von Synergieeffekten und das damit verbundene Gesundheitsrisiko für den Menschen kann jedoch schwer abgeschätzt werden.

1.2 Einleitung

Die weltweit im Spargelbau verbreitete Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule wird durch parasitäre Pilze der Gattung *Fusarium* spp. verursacht, darunter *F. oxysporum* und *F. proliferatum*. *Fusarium* spp. Infektionen verursachen u.a. ein Welken an Wurzel und Stangen bis zur Fäule an Wurzeln, Rhizom und Stängeln. Eine weitere Qualitätseinschränkung sowie potentielle Gesundheitsgefährdung für den Menschen wird durch die mögliche Mykotoxin-Produktion, insbesondere FB, hervorgerufen. Neben Mais, Reis (Abbas et al., 1998) und verschiedenen Getreidearten (Castella et al., 1999; Garcia et al., 2012; Gamanya und Sibanda, 2001) konnten FB auch in Spargel nachgewiesen werden. Dabei konnten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* als am häufigsten aus Spargel isolierten *Fusarium* spp. ermittelt werden. (Seefelder et al., 2002; Liu et al., 2007; Weber et al., 2006; Goßmann et al., 2001; Waskiewicz et al., 2010). Beide gelten als Hauptbildner von FB. Folglich geht von ihnen ein gewisses Gesundheitsrisiko aus. In verschiedenen Untersuchungen konnten neurotoxische, nephrotoxische, hepatotoxische, zytotoxische sowie karzinogene Eigenschaften von FB nachgewiesen werden (Espada et al., 1994; Kuiper-Goodman et al., 1996; Norred et al., 1996; Gross et al., 1994; Gelderblom et al., 1992b). *F. oxysporum* und *F. proliferatum* wurden ferner als Produzenten von sogenannten „neuen“ Mykotoxinen, wie z.B. BEA, identifiziert (Logrieco et al., 1998; Abbas et al., 1999; Waskiewicz und Golinski, 2010). Viele Studien belegen die Existenz von BEA in verschiedenen

Nahrungsmitteln wie Mais (Sulyok et al. 2010), Weizen (Logrieco et al., 2002; Zinedine et al., 2011) und Reis (Sifou et al., 2011; Nazari et al., 2015), sowie die Koexistenz von BEA mit anderen Mykotoxinen (Botalico et al., 1995; Ritieni et al., 1997; de Souza et al., 2013;). Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Daten, die das Auftreten von BEA in Spargel belegen.

Allgemein sind die Nachernteverluste bei Spargel vor allem auf Mikroorganismenbefall zurückzuführen. Eine Gruppe der Mikroorganismen, die bodenbürtigen Pilze, verursachen u.U. endogenes Pilzwachstum in den Spargelstangen, da sie zu Beginn der Pflanzenentwicklung durch infizierte Samen vorhanden sind oder über die Wurzelhaare in die Spargeljungpflanzen hineingelangen können. Des Weiteren stellen die Schnittstellen der Spargelstangen während der Stechsaison offene Eintrittspforten für Mikroorganismen dar (Weidenböcker, 1999). Während des Nachernteprozesses kann der Befall von Spargel mit *Fusarium* spp. sowie eine Mykotoxin-Kontamination möglicherweise verstärkt werden.

Zunächst sollte ein Monitoring-Versuch einen Überblick über die Befallshäufigkeit mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* verschaffen und insbesondere die potentielle FB-Kontamination in den für den Verbraucher relevanten Klasse Extra Stangen beleuchtet werden. Des Weiteren sollten Lagerversuche innerhalb bzw. direkt im Anschluss an die Verfahrenskette Aufschluss über eine mögliche Verstärkung der FB-Kontamination während der Lagerung geben. Schließlich sollten in weiteren Lagerversuchen mit inokulierten Spargelproben mögliche Unterschiede hinsichtlich des FB- und BEA-Bildungspotentials der zur Inokulation verwendeten Pilzspezies sowie zwischen Bleich-, Grün – und Purpurspargel geprüft werden.

1.3 Material und Methoden

Es wurden unterschiedliche Schwerpunkte gesetzt, so dass sich für die einzelnen Jahre sowie innerhalb eines Jahres unterschiedliche Versuchsansätze ergeben. Die verschiedenen Versuchsansätze sind im Folgenden dargestellt.

1.3.1 Versuchsaufbau Spargelsaison 2010 – Monitoring

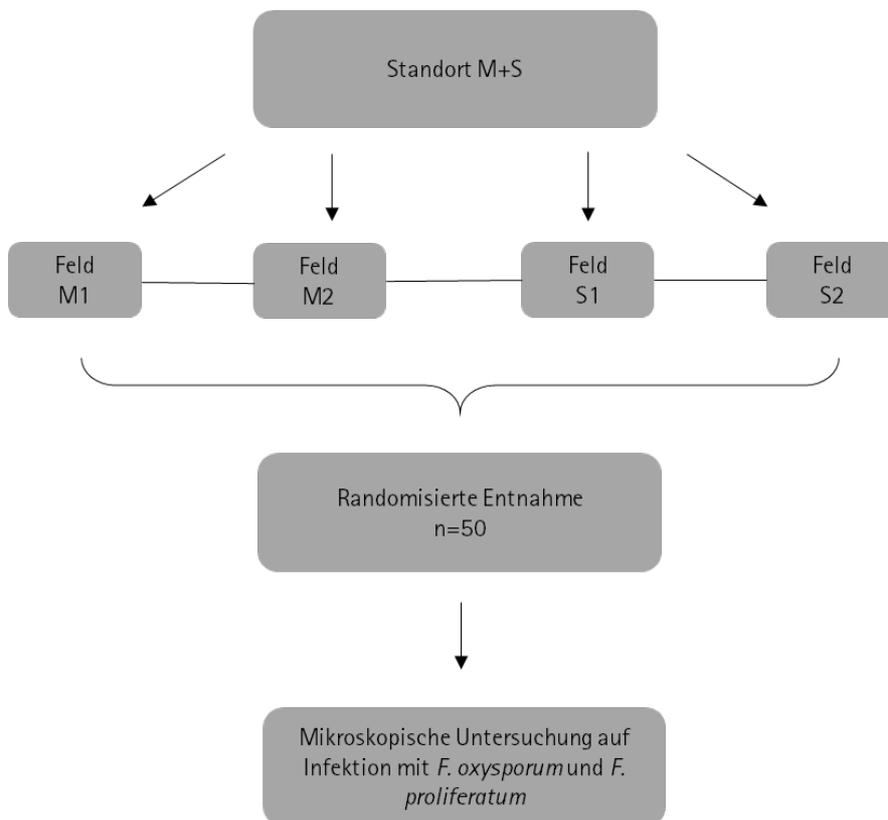


Abb.3: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur mikroskopischen Untersuchung auf Infektion mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* von randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen, an jeweils 2 unterschiedlichen Standorten, auf zwei verschiedenen Feldern (jeweils n=50).

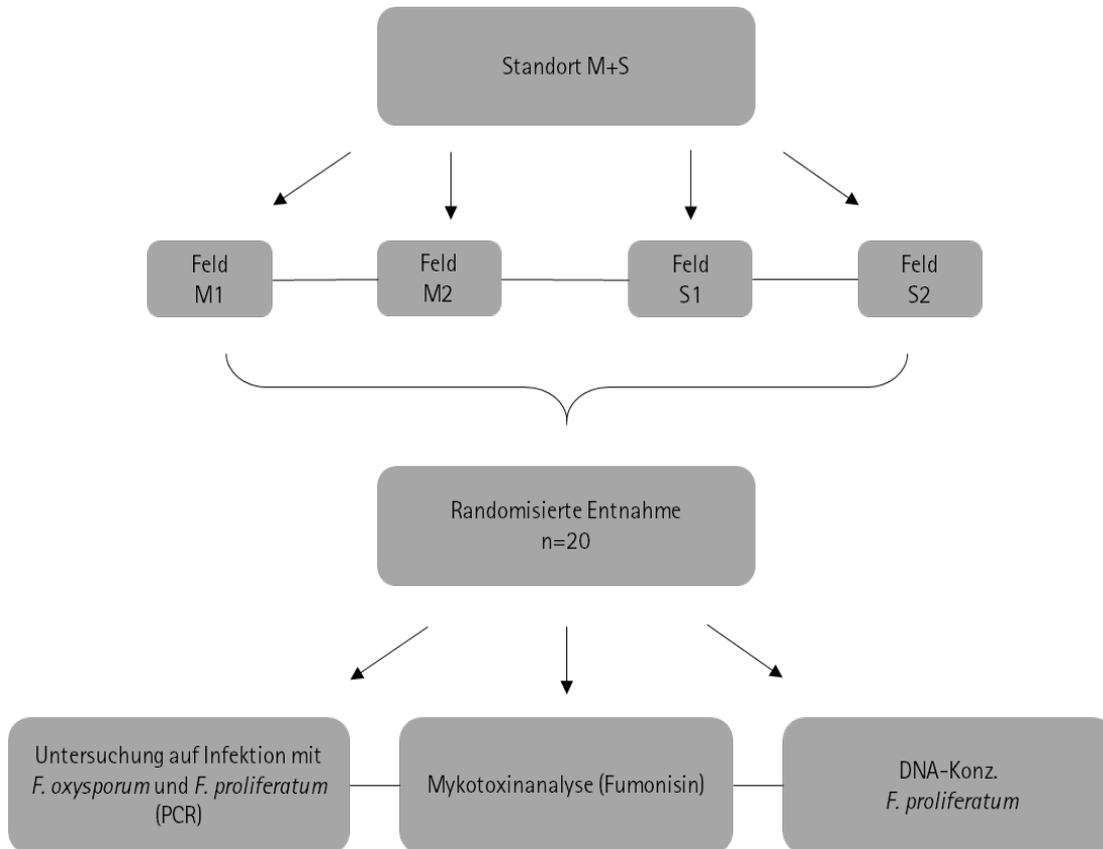


Abb.4: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 von randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen an jeweils 2 unterschiedlichen Standorten, auf zwei verschiedenen Feldern, zur Mykotoxinanalyse (Fumonisin) sowie zur Detektion der DNA-Konzentration von *F. proliferatum* (jeweils n=20).

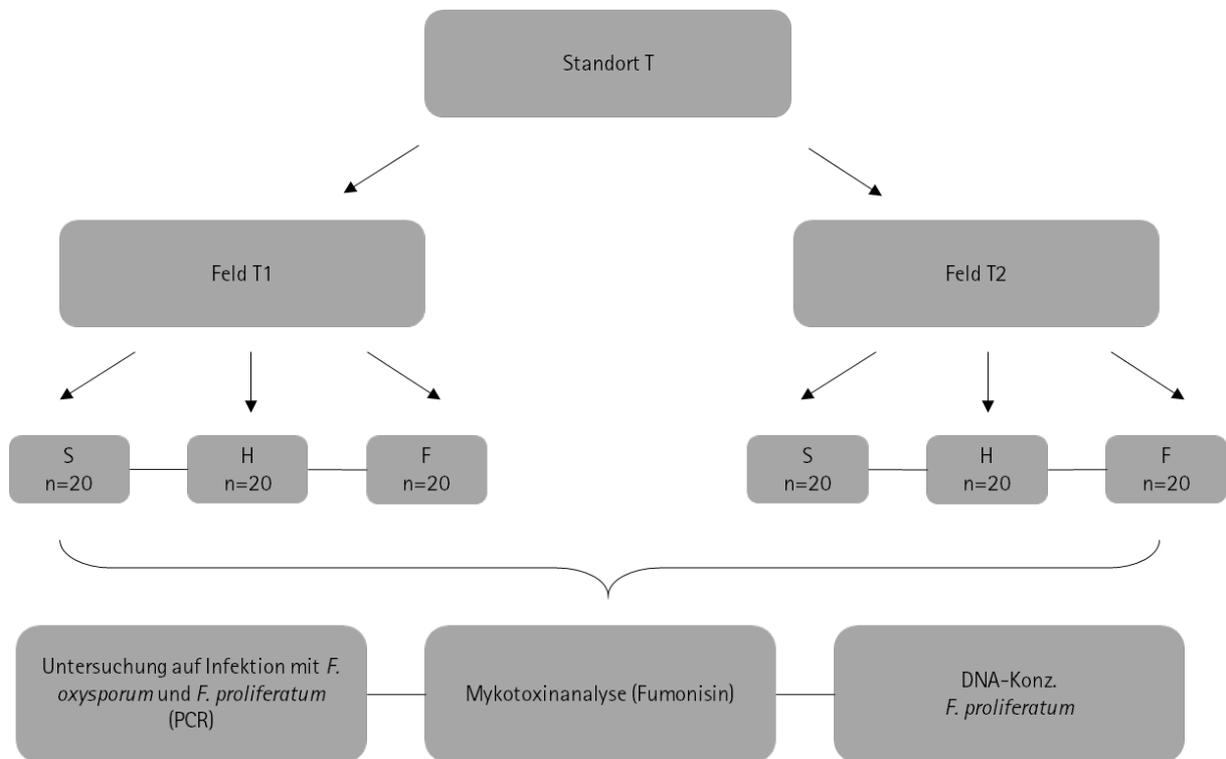


Abb.5: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur Mykotoxinanalyse sowie zur Detektion der DNA-Konzentration von *F. proliferatum*. Herangezogen wurden Proben von einem Standort (T), von jeweils zwei verschiedenen Feldern (T1 und T2). Es wurde unterschieden zwischen Spargelstangen mit Symptomen (S), Spargelstangen der Klasse Extra (H) sowie randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) (jeweils n=20).

1.3.2. Versuchsaufbau Spargelsaison 2010 – Lagerung innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Nachernteverfahrenskette

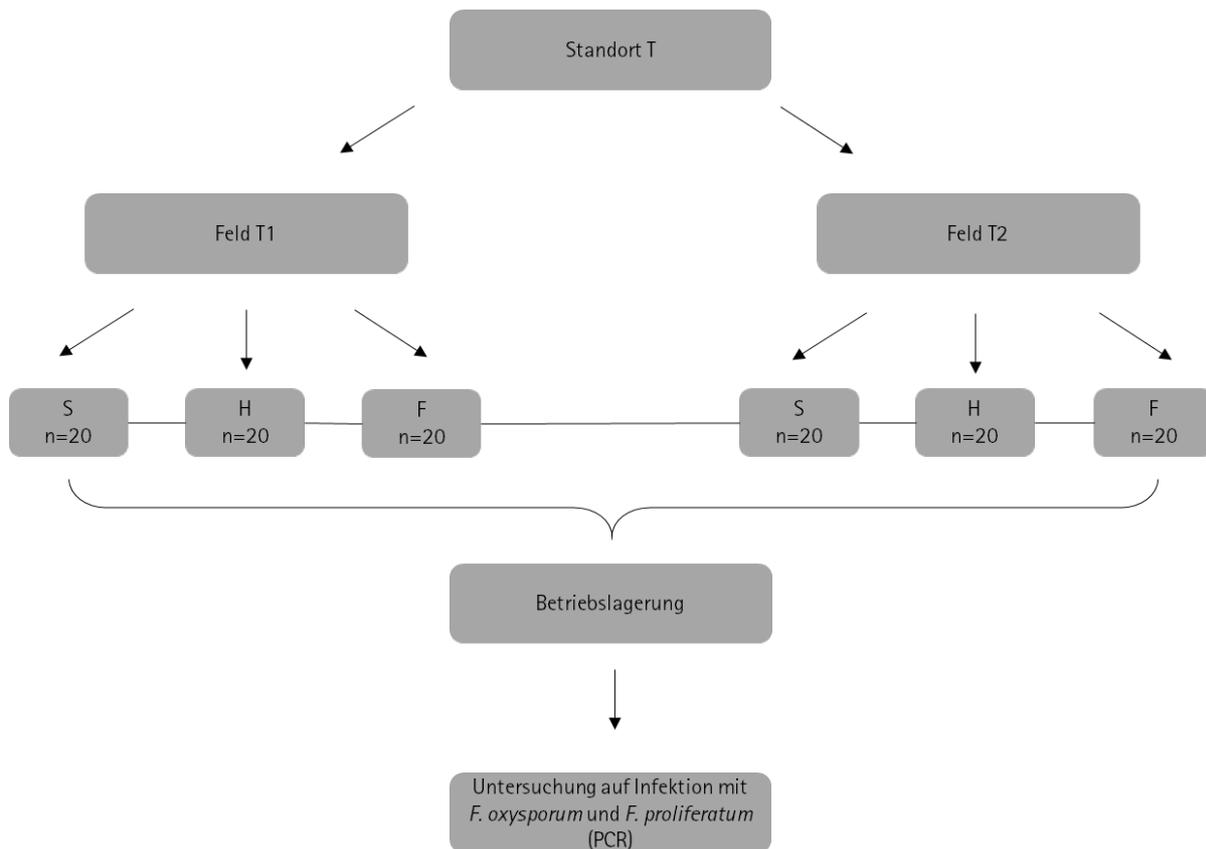


Abb.6: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur Untersuchung auf Infektion mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum*. Herangezogen wurden Proben von einem Standort (T), von jeweils zwei verschiedenen Feldern (T1 und T2). Es wurde unterschieden zwischen Spargelstangen mit Symptomen (S), Spargelstangen der Klasse Extra (H) sowie randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) (jeweils n=20). Direkt nach der Probeentnahme wurden diese im Betrieb für 7 Tage bei 2 °C gelagert (Betriebslagerung).

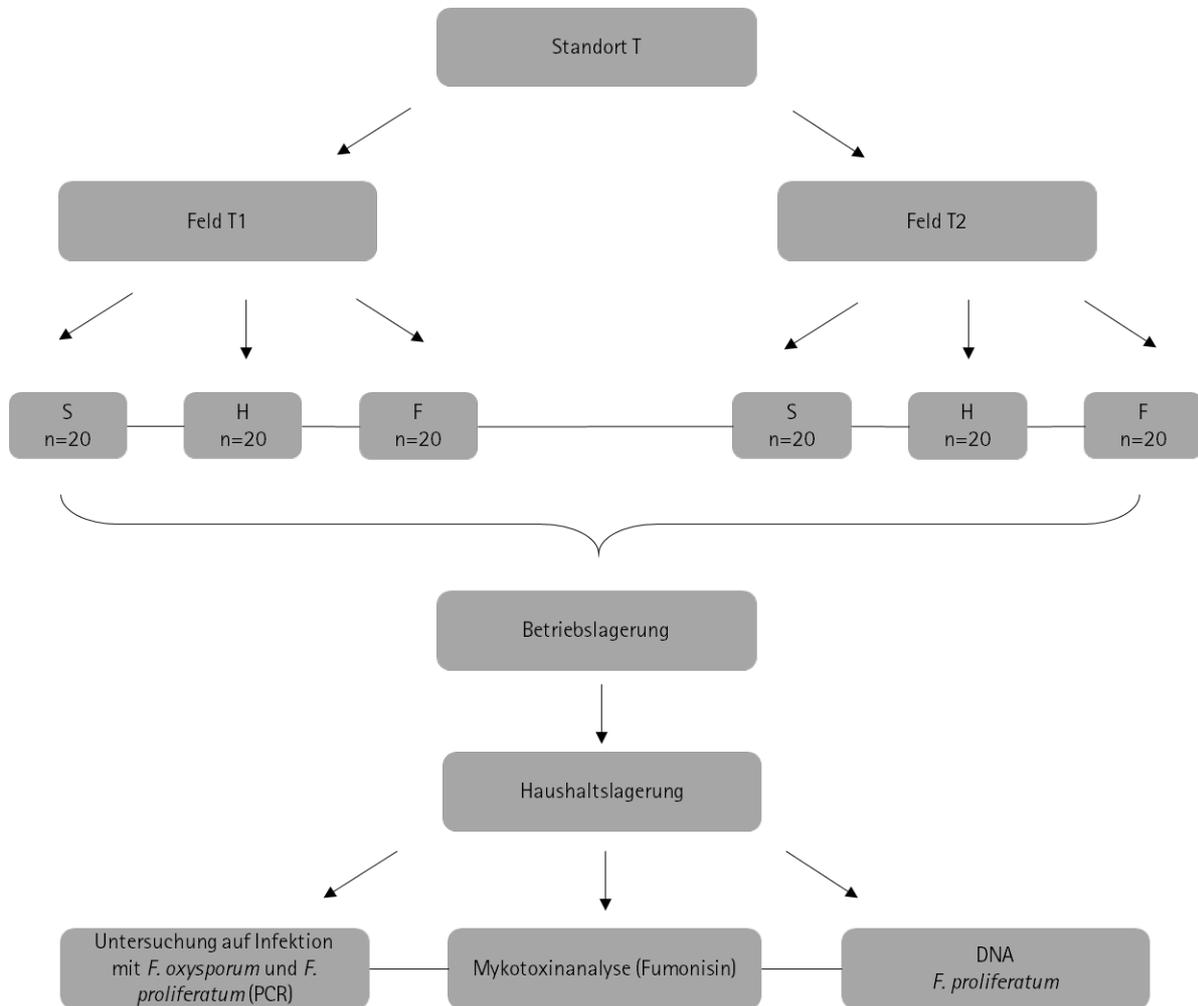


Abb.7: Versuchsaufbau im Erntejahr 2010 zur Untersuchung auf Infektion mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum*. Herangezogen wurden Proben von einem Standort (T), von jeweils zwei verschiedenen Feldern (T1 und T2). Es wurde unterschieden zwischen Spargelstangen mit Symptomen (S), Spargelstangen der Klasse Extra (H) sowie randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) (jeweils n=20). Direkt nach der Probeentnahme wurden diese zunächst im Betrieb für 7 Tage bei 2 °C gelagert, im Anschluss erfolgte die Haushaltslagerung für 24h bei 22 °C bzw. 4 °C.

1.3.3 Versuchsaufbau Spargelsaison 2011 – Verschiedene Lagerversuche

Im Versuchsjahr 2011 wurden für die Standorte T und D verschiedene Versuchsvarianten festgelegt. Für alle Versuchsvarianten wurden Stangen der Klasse Extra bezogen. Ein Lagerversuch berücksichtigte Convenience-Produkte. In weiteren Versuchsansätzen wurde zwischen potentiell natürlich infizierten Spargelstangen und mit *F. proliferatum* bzw. *F. oxysporum* inokulierten Spargelstangen differenziert. Des Weiteren wurde nicht nur Bleichspargel, sondern auch Grün- und Purpurspargel für die Mykotoxin-Analysen in das Analysespektrum integriert. Die einzelnen Versuchsvarianten sind im Folgenden dargestellt.

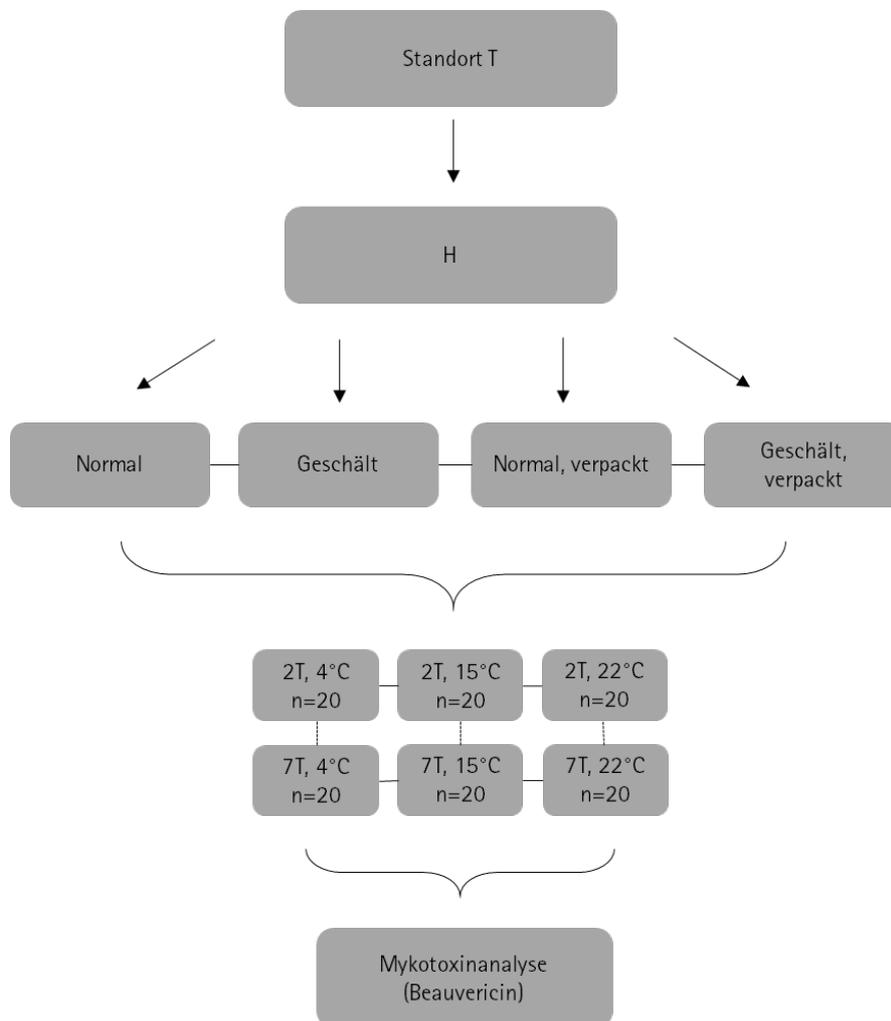


Abb.8: Lagerversuch im Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse von Spargelstangen der Klasse Extra (H) von einem Feld vom Standort T. Unterschieden wurden normale, geschälte, normal und verpackte sowie geschält und verpackte Varianten, die jeweils bei 4°C, 15°C und 22°C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert wurden.

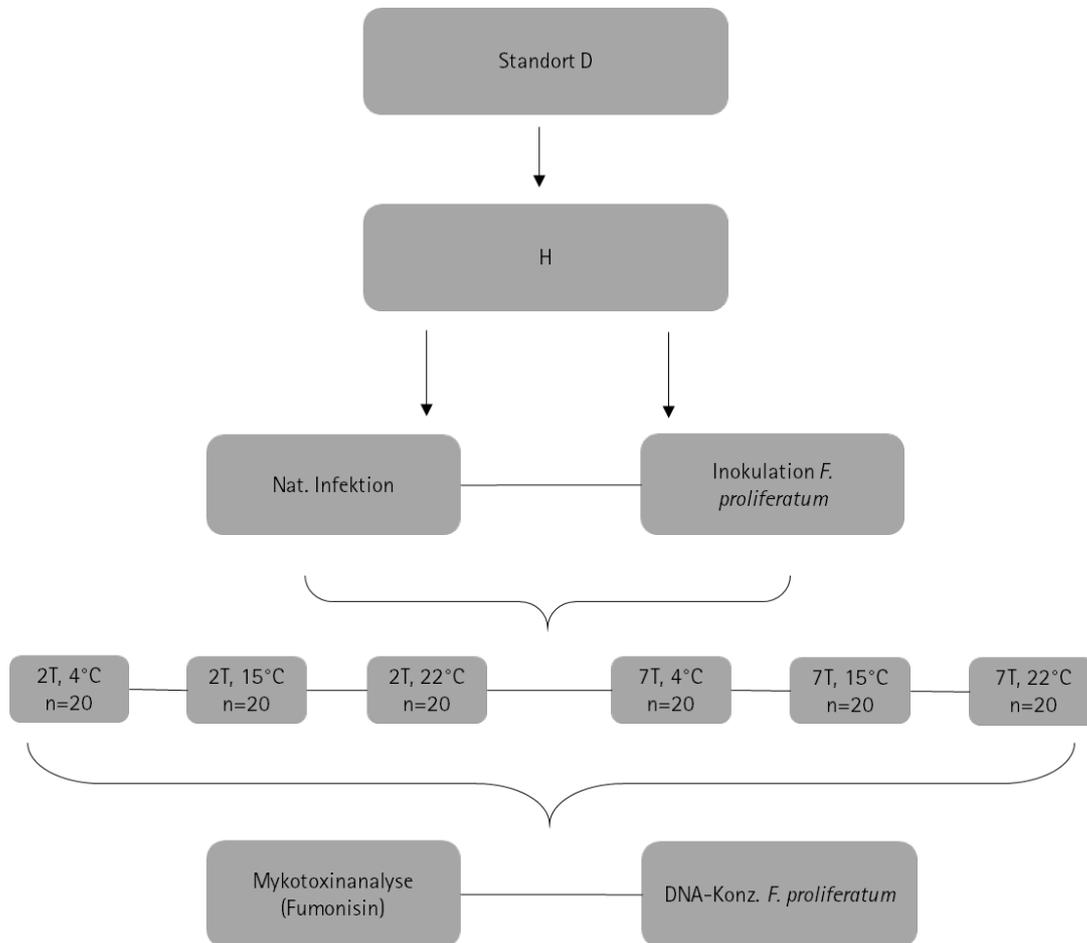


Abb.9: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse sowie zur Bestimmung der DNA-Konzentration von *F. proliferatum* in Spargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Es wurden natürlich mit *F. proliferatum* sowie mit *F. proliferatum* inokulierte Spargelstangen jeweils bei 4 °C, 15 °C und 22 °C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert.

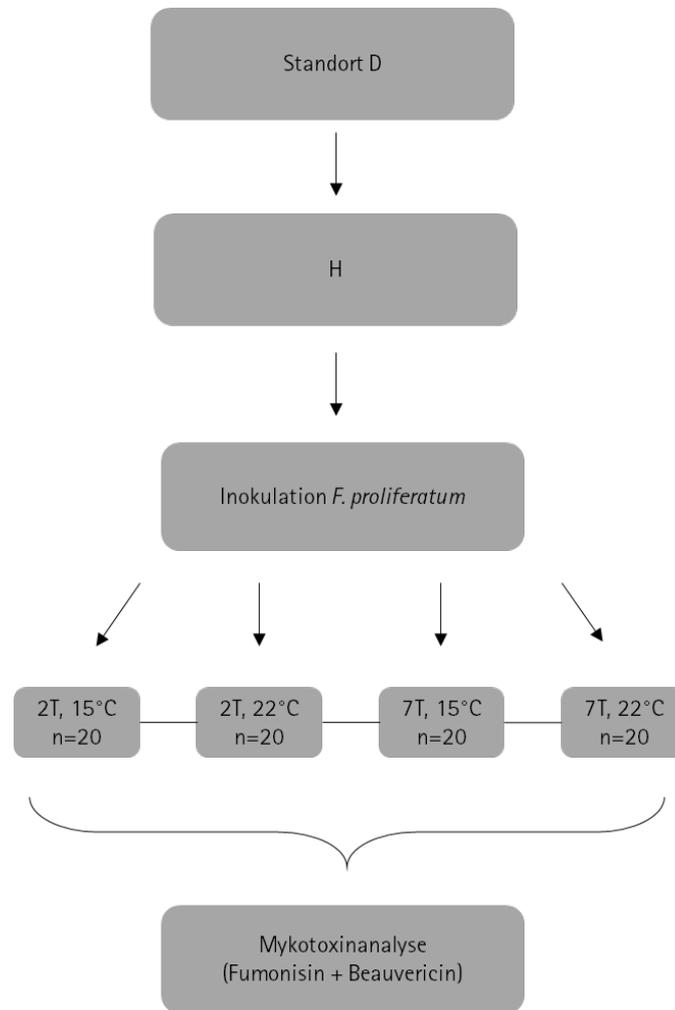


Abb.10: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse in Spargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Es wurden mit *F. proliferatum* inokulierte Spargelstangen jeweils bei 15 °C und 22 °C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert.

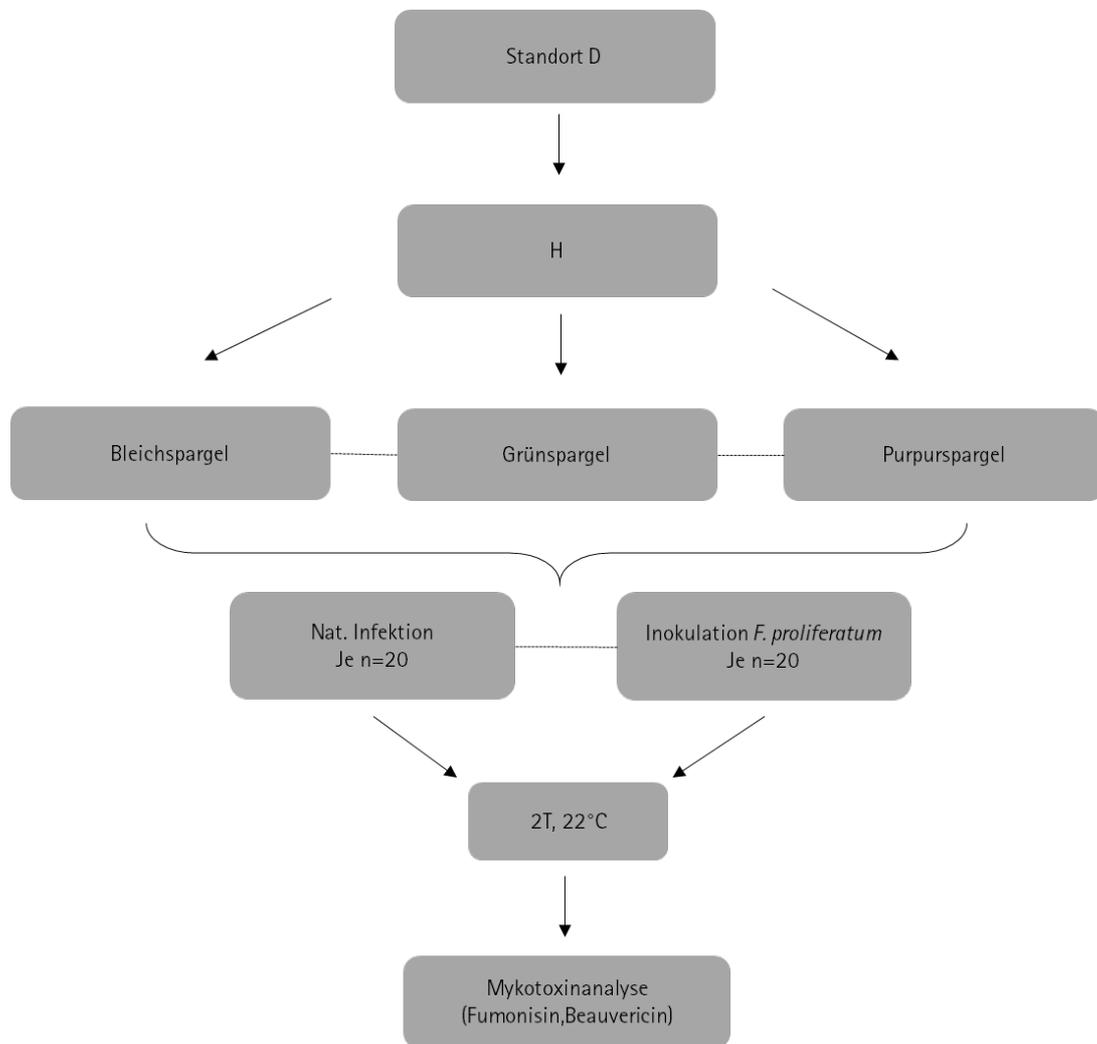


Abb.11: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse bei Bleichspargel-, Grünspargel- und Purpurspargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Unterschieden wurden natürlich infizierte sowie mit *F. proliferatum* inokulierte Varianten, die jeweils bei 22°C für 2 Tage eingelagert wurden.

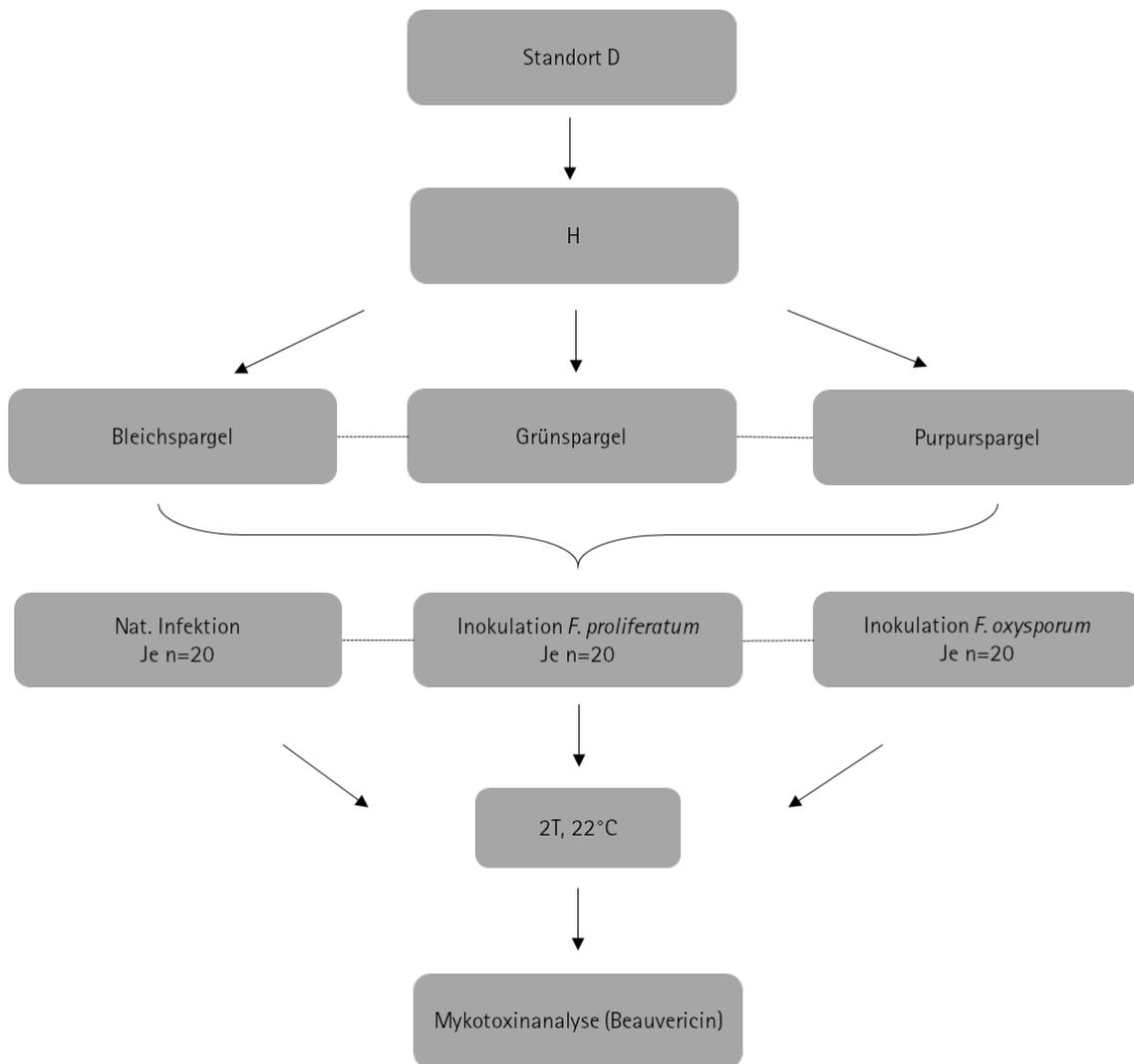


Abb.12: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2011 zur Mykotoxinanalyse bei Bleichspargel-, Grünspargel- und Purpurspargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Unterschieden wurden natürlich infizierte sowie mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* inokulierte Varianten, die jeweils bei 22 °C für 2 Tage eingelagert wurden.

Tab.1 Standorte der Probeentnahmen

Standort/Bezeichnung	Feld	Pflanzung	Spargelsorte
Martfeld (M)	M1	2005	Rapsody
	M2	2006	
Buchholz (S)	S1	2005	Rapsody
	S2		
Nienburg (T)	T1	2005	Gijnlim
	T2	2001	
Soltau (D)	D	2006	Gijnlim
			Ariane (Grünspargel)
			Burgundine (Purpurspargel)

1.3.4 Verwendete Spargelklassen

Sofern nicht anders angegeben wurden für alle Untersuchungen Spargelstangen der Klasse Extra verwendet. Am Standort T erfolgte eine Differenzierung der Spargelstangen in Klasse Extra (H), direkt vom Feld entnommenen Stangen (vor der Sortierung, F) sowie Spargelstangen mit Symptomen (S), welche maschinell aussortiert wurden und keiner der drei nach UNECE-Norm FFV 04 definierten Klassen zugeordnet werden konnten. Hier erfolgte zusätzlich eine subjektive visuelle Auswahl nach dem Grad möglichst hoher Verbräunung (> 50% der Spargelstange).

Tab.2: Spargelklassen gemäß der UNECE-Norm FFV04N

Bezeichnung	Eigenschaften
Klasse Extra	Höchste Qualität, sehr gut geformt, praktisch gerade Stangen, Köpfe sehr fest geschlossen, nur wenige sehr leichte Spuren von Rost, Köpfe und Stangen müssen weiß sein, nur leichte Rosafärbung zulässig, keinerlei Spuren von Verholzung, keine Mängel, mit Ausnahme sehr leichter, oberflächlicher Fehler
Klasse I	Gute Qualität, Köpfe fest geschlossen, Stangen können leicht gebogen sein, leichte Rosafärbung zulässig, leichte Spuren von Rost zulässig
Klasse II	Stangen können stärker gebogen sein als in Klasse I, Köpfe dürfen leicht geöffnet sein, grünliche Verfärbung der Köpfe zulässig, Spuren von Rost/Verbräunung zulässig

1.3.5 Probeentnahme an unterschiedlichen Standorten

Im Erntejahr 2010 wurde zunächst ein Monitoring auf *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Infektionen durchgeführt. Dieses erfolgte auf sechs Spargelfeldern an drei unterschiedlichen Standorten in niedersächsischen Spargelregionen (Tab.1), im Folgenden als Standort M, S, und T bezeichnet. Bei allen Versuchsfeldern (M1, M2, S1, S2, T1, T2) handelte es sich um konventionell bewirtschaftete Spargelfelder. Der Einsatz von Schwarz-Weiß-Folie wurde während des gesamten Erntezeitraumes vollzogen, um kontrollierten Einfluss auf das Spargelwachstum zu nehmen.

Es erfolgte jeweils eine Probeentnahme zu Beginn der Haupterntezeit am 28.4 sowie zum Ende der Stechperiode am 20.6. in den Jahren 2010 bzw. 2011. Die Versuchsansätze unterschieden sich grundlegend und sind im Folgenden dargestellt.

Für den Versuchsansatz an den Standorten M und S erfolgte eine randomisierte Probenahme vom Feld. Die Anzahl der Versuchsstangen belief sich auf 50. Um eine Vergleichbarkeit zu den Vorjahren gewährleisten zu können (Vgl. Koch, 2010), erfolgte die Probeentnahme in denselben festgelegten Pflanzreihen wie 2007-2009, aus denen jeweils 10 Stangen entnommen wurden. Im Anschluss wurden die Spargelstangen in gekühlten Behältern ins Labor transportiert und für die mikroskopischen Analysen aufbereitet. Für einen weiteren Versuchsansatz wurden jeweils 20 Proben unter denselben Bedingungen randomisiert entnommen. Hier erfolgte die Untersuchung auf endophytischen Befall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* auf molekularbiologischer Basis via PCR, zusätzlich wurden die Proben zur Mykotoxinanalyse sowie zur Bestimmung der DNA-Konzentration von *F. proliferatum* weiter aufbereitet.

Am Standort T erfolgte jeweils eine randomisierte Entnahme von je 20 Spargelstangen. Im Gegensatz zu den Probeentnahmen an den Standorten M und S erfolgte am Standort T eine maschinelle Reinigung (Hermeler Maschinenbau, Früchtorf) sowie eine maschinelle Aussortierung von Spargelstangen der Klasse Extra (Neubauer Automation OHG, Scheidingen). Im Versuchsansatz 1 wurden die Proben ohne Lagerung direkt nach der Schockkühlung für 15 min. für die molekularbiologischen Untersuchungen aufbereitet (Abb. 3-5) Beim Versuchsansatz 2 wurden die Proben bei 2°C für 7 bzw. 14 Tage im Betrieb gelagert. Für die Kontrollvariante erfolgte keine Einlagerung (Abb.6). Im Versuchsansatz 3 erfolgte nach der Betriebslagerung die Haushaltslagerung für 24 h bei jeweils 22 °C und 4 °C (Abb.7). Die Haushaltslagerung fand in den Klimakammern des Institutes für Gartenbauliche Produktionssysteme statt und simuliert die Bedingungen beim Endverbraucher.

1.3.6 Verwendete Folien für die Verpackung

Für die Lagerung der Convenience-Produkte wurden Foodtainer (Polypropylen) mit 20 Stangen befüllt und in einer mikroperforierte PP-Folie (<400 Mikrometer) unter Schutzbegasung verpackt. Durch die kleinen Perforationen kann gewährleistet werden, dass ausreichend Sauerstoff von außen in die Verpackung gelangt. Aufgrund der geringen Perforationsgröße findet jedoch kein vollständiger Austausch von Außenluft und Verpackungsatmosphäre statt. Folglich entsteht in der Verpackung eine modifizierte Atmosphäre (MAP-Verpackung), die vor allem durch einen niedrigen Sauerstoffgehalt und einen konstanten Kohlendioxidgehalt charakterisiert ist. Nach dem anschließenden Transport wurden die Spargelproben wie unter Abb.8 aufgeführt, eingelagert.

1.3.7 Pilzstämmen

Tab.3: Verwendete Pilzkulturen für die Inokulation

Pilzspezies	Isolatbezeichnung	Herkunft	Sammlung
<i>F. oxysporum</i>	FU 155	Spargel, Stängelbasis, Österreich	Humboldt Universität Berlin
<i>F. proliferatum</i>	FU 165	Spargel, Stängelbasis, Deutschland	IPP, Leibniz Universität Hannover

1.3.8 Sporensuspension und Inokulation

Für die Inokulation mit *F. proliferatum* bzw. *F. oxysporum* wurden jeweils Sporen mit einer Fuchs-Rosenthal Kammer ausgezählt und auf 10^6 Sporen/ml eingestellt. Die Inokulation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zuvor wurden die Spargelstangen mit sterilen Rasierklingen verletzt, um eine Erleichterung der Infektion und Ausbreitung zu erreichen.

1.3.9 Mikroskopische Untersuchung auf endophytische Pilzbesiedlung

Für die mikroskopische Untersuchung auf endophytische Pilzbesiedlung erfolgte eine Gewebeentnahme aus dem mittleren Stangenbereich. Die Gewebeproben wurden im Anschluss einer zweiminütigen Oberflächensterilisation mit 2 %igem Natriumhypochlorid (NaClO, Diagonal GmbH & Co KG) unterzogen und anschließend zweimal in autoklaviertem, deionisiertem Wasser gewaschen. Aus den sterilisierten Stangenstücken wurden unter sterilen Bedingungen ca. 2 mm große Dreiecke herausgeschnitten und auf einen speziellen Nährstoffarmen Agar (SNA, siehe Anhang), welcher mit Antibiotika versetzt wurde,

ausgelegt. Die Probenstücke wurden bei 20 °C unter UV-Licht (Philips TLD 18w/08, 250–350 nm) für zehn Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Proben auf morphologischer Basis nach Gerlach und Nirenberg (1982) lichtmikroskopisch determiniert. Das restliche Stangenmaterial wurde für weitere Analysen kurzfristig bei -20 °C eingefroren.

1.3.10 Aufbereitung der Spargelstangen für die molekularbiologischen Analysen

Die Spargelstangen wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und der Gefriertrocknungsanlage zugeführt (Christ Gefriertrocknung, Beta 1-6, LDC-2M). Im Anschluss wurden die Proben mit einer Schwingmühle (Retsch MM2) homogenisiert. 4 g des Materials wurden jeweils für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendet.

1.3.11 Multiplex-PCR und Gelelektrophorese

Die morphologische Determinierung der Spargelstangen auf SNA berücksichtigte nur einen kleinen Teil des Stangengewebes, unterstützend wurden Spargelstangen mittels spezifischer Primer auf die zwei Hauptverursacher *F. oxysporum* und *F. proliferatum* per PCR getestet. Um der enormen Probenanzahl gerecht werden zu können, wurde hier das Verfahren der Multiplex PCR angewandt. Hierfür wurden spezifische Primer auf der Basis variabler ITS-Regionen synthetisiert (Eurofins MWG Operon).

1.3.12 Für Multiplex-PCR verwendete Primer

Tab.4: Für die Multiplex PCR verwendete Oligonukleotid Primer

Primer Name	Sequenz	bp	<i>Fusarium</i> spp.
Fus_OxiPol_s	GGGCAACTACCACTCAGGGCCGGAA		universal
Fus_Oxi_As	AATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGT	450	Spez. <i>F. oxysporum</i>
Fus_Pol_As	GCCGCGCCGCGTACCAGTTG	550	Spez. <i>F. proliferatum</i>

1.3.13 PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Für die PCR wurde das Phire Plant Direct Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) verwendet und mit einem TPersonal Thermocycler 8, Biometra GmbH, Göttingen durchgeführt. Für die Probenahme wurden 25 µl des im Kit enthaltenen Verdünnungspuffers einer 5 mM Tris-Lösung in eine 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen ein Stück Spargelprobe am unteren Drittel der Spargelstange ausgestanzt, zu dem Gemisch hinzugefügt und mit Hilfe eines Vortexers homogenisiert. Für

die Analyse der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die verschiedenen Komponenten sind im Anhang aufgeführt. Je nach Größenordnung wurde eine Spannung von 80-120 V angelegt.

Tab.5: Multiplex PCR-Ansatz und Programm

Multiplex PCR Ansatz		PCR-Programm		
Reagenz	Vol (μ l)	Bezeichnung	Temp. ($^{\circ}$ C)	Zeit (s)
2x Phire Plant PCR Buffer	10	1. Initiale Denaturierung	98	300
Bidest. Wasser	7,3	2. Denaturierung	98	5
Primer 1	0,5	3. Primer-Hybridisierung	57	5
Primer 2	0,5	4. Elongation	72	40
Probe	1	5. Abschließende Elongation	72	60
Polymerase	$\frac{0,7}{20}$	6. Pause	10	-

1.3.14 Quantifizierung der Pilz DNA

Die Real Time PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung von *F. proliferatum* wurde am Institut für Agrarwissenschaften der Georg August Universität Göttingen von Prof. Dr. Karlovsky durchgeführt. Hierfür wurden 100 mg vom gefriergetrockneten Probenmaterial nach der CTAB Methode extrahiert (Brandfass und Karlovsky, 2008).

Im Anschluss wurde die qRT-PCR am Thermocycle iCycler (Bio-Rad) mit der Sybr® Green-Methode ausgeführt (Nutz et al., 2011). Die Berechnung der DNA-Menge der unbekanntenen Proben erfolgte über eine Standardkurve, mit einer 10-fachen Verdünnung von 0,5 pg bis 0,5 ng. Hierfür wurde reine *F. proliferatum* DNA verwendet, die im Vorfeld aus einem flüssigen Medium gewonnen wurde.

1.3.15 Mykotoxinanalyse

a) FB

4 g der positiv auf *F. oxysporum* und/oder *F. proliferatum* getesteten Spargelstangen wurden mit 20 ml Methanol (MeOH/Wasser 75:25, v/v) über Nacht extrahiert, für 10 min bei 4500 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml Falcon überführt.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels SAX Säulen (Varian, Inc), welche mit 8 ml MeOH 100 % und 8 ml MeOH/Wasser (75:25, v/v) konditioniert wurden. 10 ml der Probe wurde aufgetragen; die Durchflussgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Im Anschluss erfolgte die Waschung der Säule mit 8 ml MeOH/Wasser (75:25, v/v) und 4 ml MeOH 100 %. Die Elution der Probe wurde mit 10 ml MeOH/Essigsäure

(95:5, v/v) durchgeführt. Nach dem Eindampfen über Nacht bei 30 °C wurde die Proben in 500 µl MeOH/Wasser (50:50, v/v) aufgenommen und filtriert. Die Toxine wurden mittels einer polar modifizierten C18-Säule (Polaris Ether, Varian GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Hierbei wurde mit einem binären Methanol-Wasser-Gradienten gearbeitet, bei dem der Methanolanteil von 20 % auf 70 % erhöht wurde. Die Toxine wurden nach der Methode in Adejuno et al. (2007) mit einem Tandem-Massenspektrometer detektiert. Als Standard wurde FB-freies Material, welches mit einer definierten Menge FB (Certified Analytical Standards, BioPure, Tulln, Austria) versetzt wurde, herangezogen. Die HPLC-MS/MS wurde im Labor von Prof. Dr. Karlovsky, Institut für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

b) BEA

4 g der positiv auf *F. oxysporum* und/oder *F. proliferatum* getesteten Spargelstangen wurden mit 50 ml MeOH/Wasser (75:25, v/v) über Nacht extrahiert, für 3 min bei 13500 xg zentrifugiert und durch Whatman No.4 Papier filtriert. Die Extrakte wurden in 3 ml Methanol (75:25, v/v) resuspendiert. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels SAX-Säulen (Varian, Inc.). Die BEA-Analysen wurden analog zu Monti et al. (2000), durchgeführt. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 1,5 ml/min mit Acetonitril/Wasser (65:35, v/v) als Elutionsmittel. Das Toxin wurde mittels einer polar modifizierten C18-Säule (Polaris-Ether, Varian GmbH, Darmstadt) detektiert. Das Ausgangsverhältnis wurde für 5 min. konstant gehalten und nach 10 min. auf 70 % Acetonitril linear modifiziert. Nach einer Minute bei 70 % Acetonitril wurde die mobile Phase in die Ausgangsbedingungen zurückgeführt. Die Toxine wurden mittels Tandem-Massenspektrometer detektiert. Die HPLC-MS/MS wurde im Labor von Prof. Dr. Karlovsky, Institut für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

1.3.16 Statistik

Die Klimadaten wurden vom Deutschen Wetterdienst bezogen. Dabei handelt es sich um die Temperatur- und Niederschlagswerte 2010 – 2012 sowie die langjährigen Mittelwerte der jeweiligen niedersächsischen Spargelregionen, von denen die Spargelproben bezogen wurden. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS (SAS Institute, 2001). Nach signifikanten Unterschieden in der Varianzanalyse (ANOVA, $p < 0,05$) wurden die Mittelwerte mit dem Tukey-Test. (HSD, $p < 0,05$) verglichen. Die lineare Regressionsanalyse PROC REG wurde für den Zusammenhang zweier Variablen verwendet.

1.4 Ergebnisse

1.4.1 Spargelsaison 2010 - Monitoring

Im Versuchsjahr 2010 wurden zur Haupterntezeit im Mai und Juni an unterschiedlichen Standorten in Niedersachsen randomisiert Spargelstangen entnommen und auf endophytischen Pilzbefall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* untersucht. Der Monitoring Versuch sollte Aufschluss über die Befallshäufigkeit insbesondere von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* geben sowie das Vorkommen einer möglichen FB-Kontamination überprüfen. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Befallsextenstität zwischen den einzelnen Ernteterminen und Standorten, ein höherer Infektionsdruck am zweiten Erntetermin im Juni konnte für alle Felder der unterschiedlichen Standorte beobachtet werden. Während sich die Befallshäufigkeit im Mai 2010 am Standort M1 und M2 jeweils auf 32 % bzw. 18 % belief und sich auf *F. oxysporum* beschränkte, war im Juni ein Anstieg des Befalls insgesamt mit 43 % bzw. 39 % zu verzeichnen. Des Weiteren konnte ein verstärktes Auftreten von *F. proliferatum* beobachtet werden. Am zweiten Standort S1 und S2 wurde an beiden Ernteterminen ein geringerer Befall beobachtet: 15 % bzw. 10 % im Mai, sowie 37 % bzw. 17 % im Juni. Während des ersten Erntetermins im Mai 2010 wiesen von den mit *F. oxysporum* bzw. *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen, am Standort M1/M2 jeweils nur 12 % bzw. 5 % eine FB-Produktion auf; am Standort S1/S2 belief sich der Anteil an Spargelstangen mit FB-Kontamination auf 7 % bzw. 2 %. Im Juni konnte für S1/S2 mit 22 % bzw. 6 % und für M1/M2 mit 10 % bzw. 17 % ein gleichbleibender bzw. leicht erhöhter Anteil an mit FB-kontaminierten Spargelstangen beobachtet werden (Abb.15).

Die FB-Konzentrationen lagen insgesamt zwischen 1-100 ppb und wiesen weder zwischen den einzelnen Standorten noch zu den unterschiedlichen Erntezeiten einen signifikanten Unterschied auf (Abb.15). In allen Proben konnte überwiegend FB1 und FB2 nachgewiesen werden, FB3 wurde nur in vier Proben detektiert. Bei allen mit FB kontaminierten Spargelstangen konnte gleichzeitig auch eine Kontamination mit *F. oxysporum*, teilweise auch mit *F. proliferatum* nachgewiesen werden. Eine direkte Korrelation zwischen den Gehalten an DNA (*F. proliferatum*) und der FB-Konzentration konnte nicht festgestellt werden (Tab.8).

Am Standort T erfolgte im Erntejahr 2010 eine Untersuchung im Erntemonat Mai hinsichtlich des Befalls mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie eine Analyse der FB-Kontamination. Es erfolgte eine Differenzierung zwischen randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen, Spargelstangen mit Symptomen, die in der Nachernteprozesskette maschinell aussortiert wurden, sowie den für den Verbraucher relevanten Spargelstangen der Klasse Extra. Hierdurch sollte ein etwaiger Zusammenhang zwischen Symptomen (speziell Verbräunung) und Pilzbefall sowie FB-Kontamination ermittelt werden. Darüber hinaus sollte ein Überblick bezüglich des Kontaminationspotentials in den für den Endverbraucher relevanten Spargelstangen der Extra Klasse gewonnen werden. Auf den Feldern T1 und T2 am Standort T

konnte bei den Proben der Klasse Extra kein Befall mit *Fusarium* spp. festgestellt werden. Die Ergebnisse der randomisiert vom Feld entnommenen Stangen zeigten nur eine Infektion mit *F. oxysporum* am Standort T2, die Befallshäufigkeit lag bei 33 %. Bei den symptomatischen Stangen wurde ein *F. oxysporum* Befall von 33 % beobachtet, zusätzlich konnte hier auch ein Befall mit *F. proliferatum* (10 %) beobachtet werden (Abb.16). Die Unterschiede hinsichtlich der Befallshäufigkeit zwischen den einzelnen Varianten waren nicht signifikant. Eine FB-Kontamination konnte nur vereinzelt und in sehr geringen Konzentrationen in den Varianten der Feldstangen sowie der symptomatischen Stangen detektiert werden (2-13 ppb). Die Proben der Spargelstangen der Klasse Extra, welche auch keinen *Fusarium* spp. Befall zeigten, waren frei von einer FB-Kontamination (Tab.9). Eine Quantifizierung der DNA von *F. proliferatum* konnte nicht erreicht werden, obwohl in vereinzelt Proben DNA von *F. proliferatum* qualitativ nachgewiesen werden konnte (Tab.9). Um die Befallshäufigkeit von *Fusarium* spp. zu den Umweltbedingungen in Relation setzen zu können, wurden Temperatur- und Niederschlagsdaten in den jeweiligen Regionen ermittelt. Es ist festzustellen, dass sich die Witterungsbedingungen zur Erntezeit zwischen den Jahren erheblich unterscheiden. So konnte im ersten Erntejahr 2010 an allen Standorten ein relativ kalter Mai mit Durchschnittswerten zwischen 9,9-10,4 °C verzeichnet werden, die sich enorm vom langjährigen Mittelwert unterscheiden (Tab.6,7). Am Standort T war der Juni im Jahr 2010, mit 144 % Abweichung im Vergleich zum langjährigen Mittelwert, ein sehr niederschlagsreicher Monat.

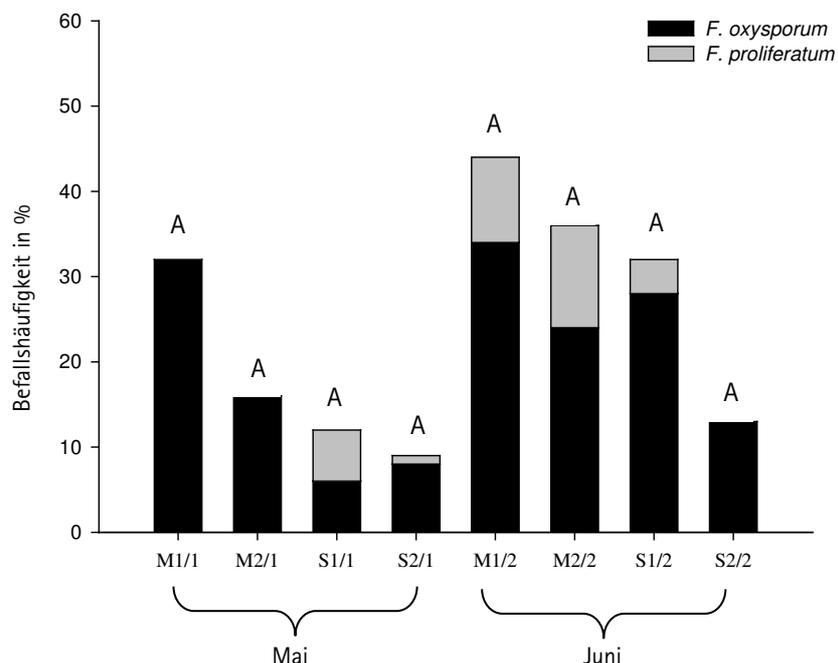


Abb.13: *F. oxysporum* und *F. proliferatum* Befall (%) an Spargelstangen im Erntejahr 2010 an unterschiedlichen Standorten (M/S) auf je zwei unterschiedlichen Feldern (M1/M2) im Mai/Juni 2010. Dargestellt ist die mittlere Befallshäufigkeit von jeweils 50 randomisiert entnommenen Proben. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des *Fusarium* spp.-Befalls zwischen den einzelnen Standorten und Ernteterminen nach ANOVA, HSD, $p > 0,05$.

Tab.6: Mittlere Monatstemperatur (°C) im April, Mai und Juni 2010 im Vergleich zum langjährigen Mittelwert (Abweichung in °C) auf den Standorten des *Fusarium* spp. Monitorings

Standort	2010 mittlere Temperatur (°C)		
	April	Mai	Juni
M	9,4 (+0,4)	10,4 (-3,0)	16,7 (+0,8)
S	9,2 (+0,4)	10,2 (-2,9)	16,2 (+0,6)
T	8,9 (+0,3)	9,9 (-3,3)	15,7 (+0,1)

Tab.7: Mittlere Niederschlagsmenge (mm) im April, Mai und Juni 2010 im Vergleich zum langjährigen Mittelwert (Abweichung in %) auf den Standorten des *Fusarium* spp. Monitorings

Standort	2010 mittlerer Niederschlag (mm)		
	April	Mai	Juni
M	13,0 (32 %)	47,7 (84 %)	15,4 (24,3 %)
S	19,2 (48 %)	52,5 (97 %)	12,9 (19 %)
T	14,7 (34 %)	82,8 (144 %)	37,7 (47 %)

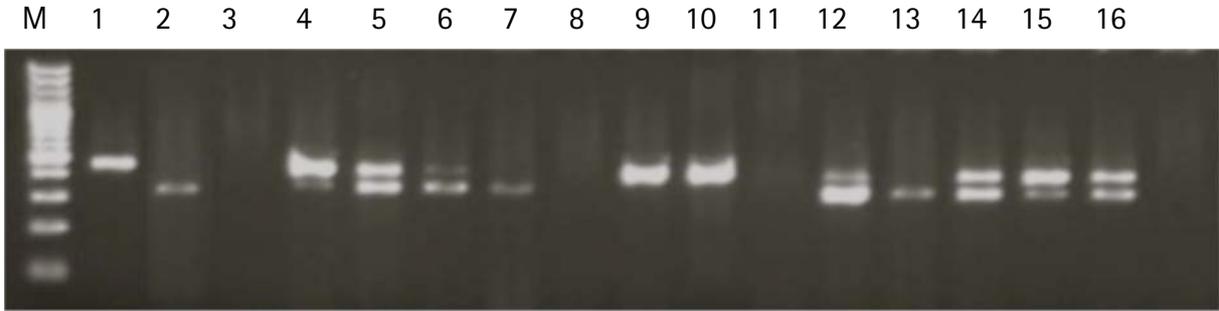


Abb.14: Agarose-Gelelektrophorese Dokumentation der PCR-Amplifikate der Primerkombination Fus_OxiPol_s/Fus_Oxi_As (450 bp)/ Fus_Pol_As (550 bp). Laufbahn M: DNA-Größenmarker Lamda/PstI; Laufbahn 1 und 2: Positivkontrollen; Laufbahn 3: Negativkontrolle; Laufbahn 4–16: amplifizierte DNA von 13 exemplarischen Spargelproben aus dem Jahr 2011

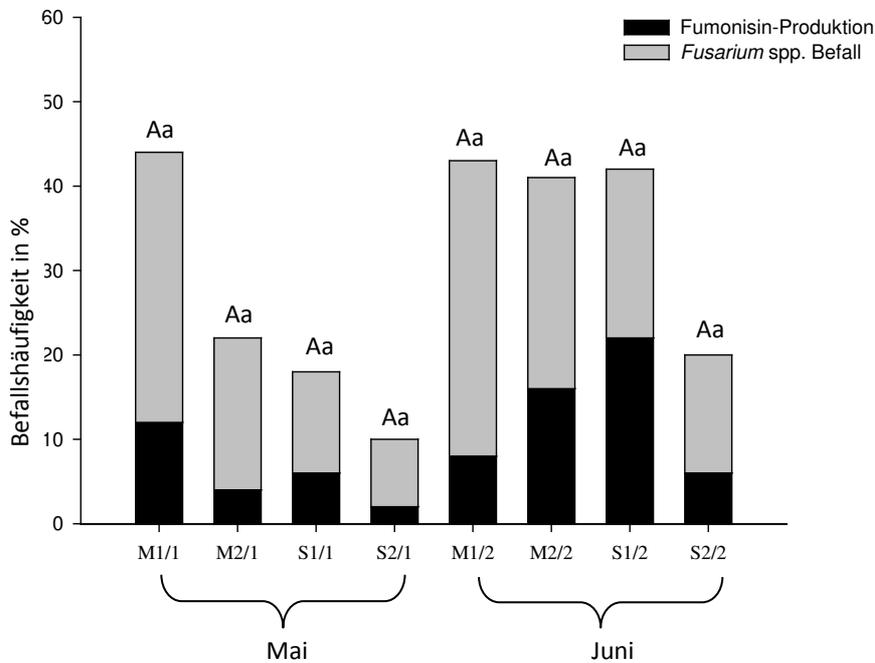


Abb.15: Anteil an mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* befallenen Spargelstangen und Spargelstangen mit Fumonisin-Produktion (%) im Mai/Juni 2010 an unterschiedlichen Standorten (M/S) auf je zwei unterschiedlichen Feldern. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 20 randomisiert entnommenen Proben. Gleiche Großbuchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fumonisin-Kontamination zwischen den einzelnen Standorten und Ernteterminen nach ANOVA, HSD, $p < 0,05$. Gleiche Kleinbuchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des *Fusarium* spp.-Befalls zwischen den einzelnen Standorten und Ernteterminen nach ANOVA, HSD, $p > 0,05$.

Tab.8: Mit Fumonisin kontaminierte Spargelproben an unterschiedlichen Standorten (M/S) auf je zwei unterschiedlichen Feldern (M1, M2, S1, S2) im Mai (M1/1, M2/1, S1/1, S2/1) und Juni des Erntejahres 2010 (M1/2, M2/2, S1/2, S2/2). Fumonisin B1, B2, B3 und Total (ppb), Befall mit *F. oxysporum*/ *F. proliferatum* und *F. proliferatum* Konzentration (ng DNA/100mg TG) in den einzelnen Spargelstangen. ND=nicht detektierbar, da unterhalb LOD; LOD = 0,003 µg/g

Variante	Fumonisin B1 ppb	Fumonisin B2 ppb	Fumonisin B3 ppb	Fumonisin Total ppb	<i>F.</i> <i>oxysporum</i> / <i>F.</i> <i>proliferatum</i>	Ng DNA <i>F.</i> <i>proliferatum</i>
M1/1-1	ND	2	ND	2	+/-	-
M1/1-2	14	5	ND	19	+/-	-
M1/1-3	7	5	ND	12	+/-	-
M1/1-4	5	3	ND	8	+/-	-
M1/1-5	7	12	ND	19	+/-	-
M1/1-6	9	2	ND	11	+/-	-
M2/1-1	17	12	ND	29	+/-	-
M2/1-2	2	1	2	5	+/-	-
S1/1-1	5	3	ND	8	+/-	-
S1/1-2	7	3	ND	10	+/+	-
S1/1-3	ND	1	ND	1	+/-	-
S2/1-1	7	3	ND	10	+/+	-
M1/2-1	7	ND	ND	7	+/+	1,51
M1/2-2	7	2	ND	9	+/-	-
M1/2-3	2	ND	ND	2	+/+	9,13
M1/2-4	1	ND	ND	1	+/+	-
M2/2-1	3	ND	ND	3	+/+	3,93
M2/2-2	2	ND	ND	2	+/+	3,34
M2/2-3	1	ND	ND	1	+/+	4,26
M2/2-4	1	ND	ND	1	+/+	16,96
M2/2-5	1	1	1	3	+/+	-
M2/2-6	7	2	ND	9	+/+	-
M2/2-7	9	2	ND	11	+/-	-
M2/2-8	1	ND	ND	1	+/-	-
S1/2-1	2	1	ND	3	+/-	-
S1/2-2	18	10	ND	28	+/-	-
S1/2-3	61	39	ND	100	+/-	-
S1/2-4	1	1	ND	2	+/-	-
S1/2-5	8	7	ND	15	+/-	-
S1/2-6	11	9	ND	20	+/-	-
S1/2-7	14	7	ND	21	+/-	-
S1/2-8	2	ND	ND	2	+/-	-
S1/2-9	1	1	1	3	+/-	-
S1/2-10	11	7	1	19	+/-	-
S1/2-11	ND	1	ND	1	+/-	-
S2/2-1	5	2	ND	7	+/-	-
S2/2-2	5	2	ND	7	+/-	-
S2/2-3	1	1	ND	2	+/-	-

Tab.9: Mit Fumonisin kontaminierte Proben der Varianten Spargelstangen mit Symptomen (S), randomisiert vom Feld entnommene Stangen (F) des Erntejahres 2010 am Standort T. Fumonisin B1, B2, B3 und Total (ppb), Befall mit *F. oxysporum*/*F. proliferatum* und *F. proliferatum* Konzentration (ng DNA/100 mg TG) in den einzelnen Spargelproben. ND=nicht detektierbar, da unterhalb LOD; LOD = 0,003 µg/g.

Variante	Fumonisin B1 ppb	Fumonisin B2 ppb	Fumonisin B3 ppb	Fumonisin Total ppb	<i>F. oxysporum</i> / <i>F. proliferatum</i>	Ng DNA <i>F. proliferatum</i>
Feldstangen						
T2/F-1	1	1	ND	2	+/-	-
T2/F-2	6	1	ND	7	+/-	-
T2/F-3	4	8	ND	12	+/-	-
T2/F-4	8	2	ND	10	+/-	-
Spargelstangen mit Symptomen						
T1/S-1	2	ND	ND	2	+/-	-
T1/S-2	9	3	ND	12	+/+	-
T2/S1-1	9	4	ND	13	+/+	-
T2/S2-2	3	ND	ND	3	+/-	-
T2/S2-3	6	7	ND	13	+/-	-
T2/S2-4	5	1	ND	6	+/-	-

1.4.2 Spargelsaison 2010 – Lagerung innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Verfahrenskette

Um eine potentielle Zunahme des Befalls mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* sowie der FB-Kontamination in der Nachernteprozesskette zu untersuchen, wurden diese Parameter für die drei Spargelvarianten (Klasse Extra, Feldstangen, Stangen mit Symptomen) in Lagerversuchen am Standort T analysiert.

Nach 14 Tagen Betriebslagerung ergaben sich für die Spargelstangen mit Symptomen der Felder T1 und T2 eine Befallshäufigkeit von 30 %, 5 % der Proben waren mit *F. proliferatum* kontaminiert. Bei den Feldvarianten von T1 waren knapp ein Viertel der Proben mit *Fusarium* spp. infiziert, mit einem *F. proliferatum* Anteil von 5 %. Die Spargelstangen der Klasse Extra beider Felder wiesen keine Kontamination mit *Fusarium* spp. auf (Abb.16).

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte im Anschluss an die Betriebslagerung eine Haushaltslagerung für 24h bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur um die Lagerungssituation beim Endkunden zu simulieren. Insgesamt wiesen die symptomatischen Spargelstangen die höchste Befallshäufigkeit mit jeweils 35 % (T2/S/R) bzw. 25 % (T2/S/K) auf, mit einem geringen Anteil an *F. proliferatum* (6 %), verglichen mit den Proben der anderen Varianten, diese wiesen keine Kontamination mit *F. proliferatum* auf. Bei den Stangen der Klasse Extra, die nach der Haushaltslagerung zusätzlich bei 4 °C eingelagert wurden, konnte kein Befall mit *Fusarium* spp. beobachtet werden (Abb.16). Eine FB-Produktion konnte nur vereinzelt bei den symptomhaften Spargelstangen sowie bei den Feldvarianten im einstelligen ppb-Bereich beobachtet werden (Tab.10).

Signifikante Unterschiede konnten weder zwischen den einzelnen Feldern am Standort T noch den unterschiedlichen Lagerbedingungen festgestellt werden. Bei allen mit FB kontaminierten Spargelstangen konnte simultan auch eine Infektion mit *F. oxysporum*, teilweise auch mit *F. proliferatum* nachgewiesen werden. Jedoch wies nicht jede Spargelstange, an der eine Infektion mit *F. proliferatum* bzw. *F. oxysporum* nachgewiesen wurde, eine FB-Kontamination auf. Eine direkte Korrelation zwischen den einzelnen Gehalten an DNA (*F. proliferatum*) und FB konnte nicht aufgezeigt werden. In allen Proben wurde ausschließlich FB1 und FB2 detektiert. Ein Auftreten von FB3 konnte nicht nachgewiesen werden (Tab.10).

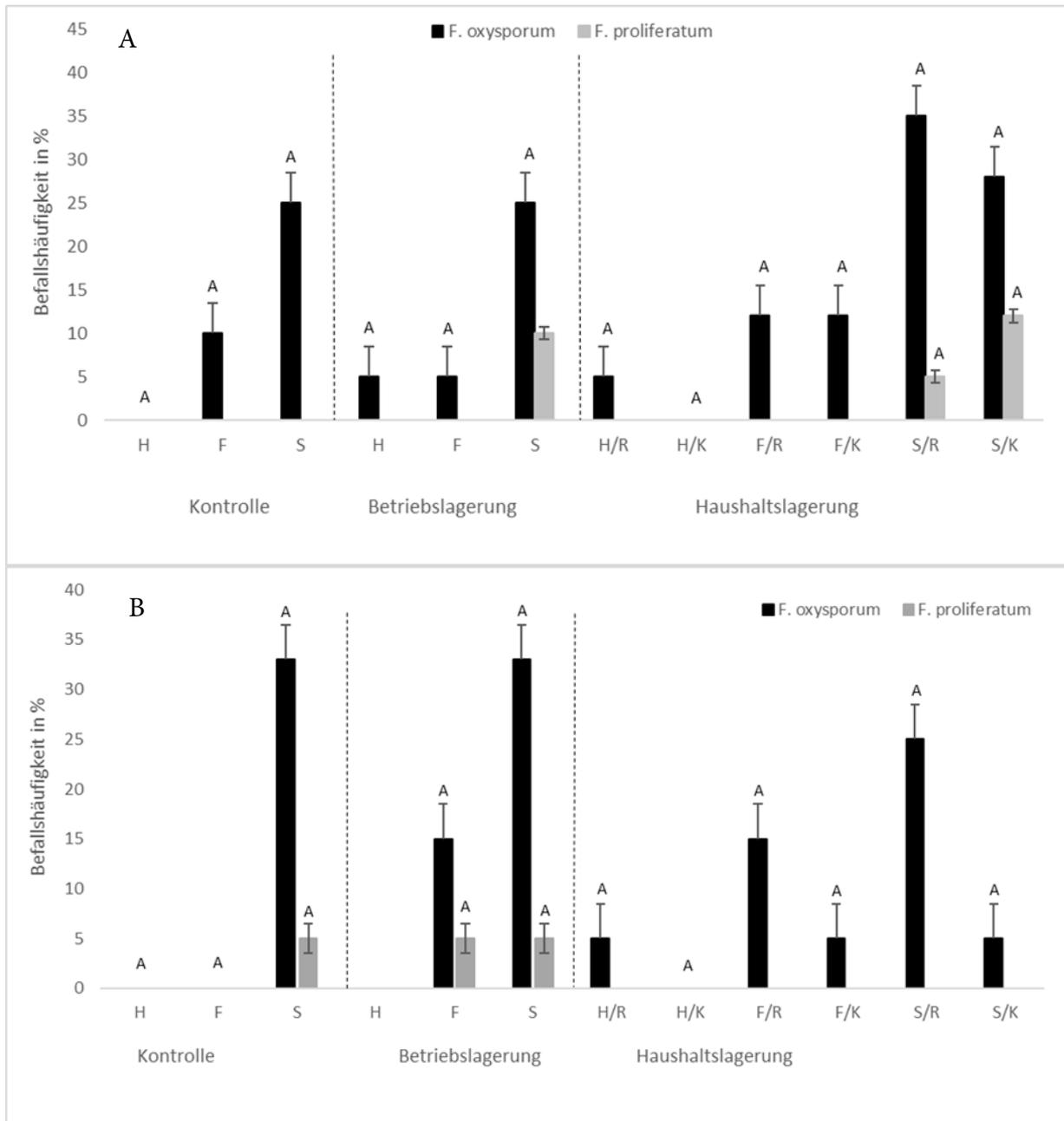


Abb. 16: Befallshäufigkeit in % von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* in nicht gelagerten Spargelstangen und in Spargelstangen nach der Betriebslagerung sowie zusätzlicher Haushaltslagerung. Differenziert wurde zwischen Spargelstangen der Klasse Extra (H), randomisiert vom Feld entnommenen Stangen (F) und Stangen mit Symptomen (S) vom Standort T von zwei Feldern T1 (A) und T2 (B). Diese wurden im Anschluss an die Betriebslagerung jeweils bei 24h bei Raumtemperatur (R) oder bei 4 °C im Kühlraum (K) gelagert. Dargestellt ist die mittlere Befallshäufigkeit von jeweils 20 Proben. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Spargelvarianten zwischen den einzelnen Lagervarianten nach ANOVA, $p < 0,05$. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Tab.10: Fumonisin B1, B2, B3 und Total (ppb), Befall mit *F. oxysporum*/ *F. proliferatum* und *F. proliferatum* Konzentration (ng DNA/100 mg TG) in den Varianten Spargelstangen mit Symptomen (S), randomisiert vom Feld entnommene Stangen (F) . Diese wurden nach der Betriebslagerung jeweils entweder 24h bei Raumtemperatur (R) oder bei 4°C im Kühlraum gelagert (K). ND=nicht detektierbar, da unterhalb LOD; LOD=0,003 µg/g.

Variante	Fumonisin B1 ppb	Fumonisin B2 ppb	Fumonisin B3 ppb	Fumonisin Total ppb	<i>F. oxysporum</i> / <i>F. proliferatum</i>	Ng DNA <i>F.</i> <i>proliferatum</i>
Feld						
T1/F/R-1	1	ND	ND	1	+/-	-
T1/F/R-2	5	2	ND	7	+/-	-
T1/F/K-1	7	3	ND	10	+/-	-
T1/F/K-2	5	2	ND	7	+/-	-
T2/F-1	1	ND	ND	1	+/-	-
T2/F-2	7	1	ND	8	+/-	-
T2/F/R-1	1	ND	ND	1	+/-	-
T2/F/R-2	4	1	ND	5	+/-	-
T2/F/K-1	4	1	ND	5	+/-	-
T2/F/K-2	4	1	ND	5	+/-	-
Spargelstangen mit Symptomen						
T1/S-1	4	1	ND	5	+/-	-
T1/S-2	4	2	ND	6	+/+	0,35
T1/S-3	4	1	ND	5	+/-	-
T2/S-1	8	1	ND	9	+/-	-
T2/S-2	8	1	ND	9	+/-	-
T2/S-3	4	ND	ND	4	+/-	-

1.4.3 Spargelsaison 2011 – Verschiedene Lagerversuche

Im Erntejahr 2011 wurden, zusätzlich zu potentiell natürlich infizierten Spargelstangen, mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* inokulierte Spargelstangen in das Untersuchungsspektrum mitaufgenommen, um einen theoretisch hohen Befall mit FB- bzw. BEA-produzierenden Stämmen zu simulieren und die Entwicklung während der Lagerung zu beobachten.

Im Erntejahr 2011 wurden in einem Lagerversuch ausschließlich Spargelstangen der Klasse Extra vom Standort T jeweils 2 und 7 Tage bei 4 °C (simuliert Kühlschrank bzw. Lagerung im Betrieb), 15 °C (mittlere Temperatur Kühlkette-Supermarktlagerung) sowie 22 °C (Raumtemperatur) eingelagert. Zusätzlich wurden Convenience-Produkte berücksichtigt. So wurden ebenfalls geschälte und unter MAP-Bedingungen verpackte Spargelstangen eingelagert, um diese auf Unterschiede im Befall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie der Mykotoxinkontamination zu überprüfen. Hier wurde aufgrund der geringen und vernachlässigbaren FB-Konzentrationen der natürlich mit *Fusarium* spp. infizierten Stangen des Vorjahres, zusätzlich die Bestimmung des BEA-Gehalts in das Untersuchungsspektrum integriert.

Bei den Kontrollstangen sowie bei den Varianten, die bei 4 °C eingelagert wurden, zeigten sich durchgängig relativ geringe BEA-Werte von 30–70 ppb bzw. 30–100 ppb in den für 7 Tage gelagerten Varianten. Die höchsten BEA-Werte konnten bei den geschälten/verpackten Varianten, die bei 7 Tagen und 15 °C (543 ppb) sowie bei 7 Tagen und 22 °C (1380 ppb) gelagert wurden, ermittelt werden. Diese unterschieden sich signifikant von den BEA-Werten der Spargelstangen innerhalb derselben Lagervariante. Die verpackten Spargelstangen zeigten relativ erhöhte BEA-Werte bei 2 Tagen, 22 °C (156 ppb) sowie bei 7 Tagen, 22 °C (355 ppb) (Abb. 17; Tab.11).

In den inokulierten Spargelstangen zeigten die Varianten, die bei 22 °C für 2 Tage gelagert waren mit 1500 ppb den signifikant höchsten FB-Gehalt (Abb.18A). Hier konnte auch der höchste Gehalt an *F. proliferatum* DNA detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte bei den Kontrollvarianten sowie bei den Varianten, die bei 4 °C gelagert wurden, nur ein vergleichsweise geringer Befall mit *F. proliferatum* als auch keine FB-Kontamination festgestellt werden; ein relativ erhöhter *F. proliferatum* DNA Gehalt konnte in den Varianten, die bei 15 °C gelagert wurden, festgestellt werden (280 und 300 ppb). Eine Korrelation zwischen den FB-Gehalten sowie den Gehalten an *F. proliferatum*-DNA konnte aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht aufgezeigt werden.

In der natürlich infizierten Variante, die 7 Tage bei 22 °C gelagert wurden, konnte mit 25 ppb der höchste FB-Gehalt detektiert werden und liegt damit um das 60-fache niedriger als das Maximum der mit *F. proliferatum* inokulierten Spargelstangen derselben Lagervariante (Abb.18A). Hier konnte äquivalent der höchste Gehalt an *F. proliferatum* DNA bei der 7 Tage 22 °C Variante gemessen werden und lag bei 26 µg DNA/100 µg TG und somit um ein 15-faches niedriger als bei den inokulierten Varianten. Geringe Gehalte von 2–4 µg DNA an *F. proliferatum* konnten jeweils bei den Varianten, die 2 bzw. 7 Tage bei 15 °C bzw. 22 °C gelagert wurden, festgestellt werden (Abb.18B). Eine direkte Korrelation zwischen DNA-Gehalt und FB-

Gehalt wurde nicht festgestellt. Die Analysen der BEA-Konzentrationen zeigten ein deutliches Maximum in den Varianten, die 7 Tage bei 22 °C gelagert wurden. Hier unterschied sich der BEA-Gehalt mit 2300 ppb signifikant von den Varianten, die 7 Tage bei 15 °C (500 ppb) und 2 Tage bei 22 °C (600 ppb) gelagert wurden. Die BEA-Gehalte der jeweiligen Lagervarianten waren alle signifikant höher als die jeweiligen FB-Gehalte (Abb.19).

Im Erntejahr 2011 wurden zusätzlich Bleich-, Grün- und Purpurspargelstangen vom Standort D bei 22 °C für 2 Tage eingelagert, da sich diese in den vorherigen Versuchen als die kritischste Bedingung erwies. Es erfolgte eine Inokulation sowohl mit *F. oxysporum* als auch mit *F. proliferatum* im Vergleich zu natürlich infizierten Spargelstangen. Die höchsten FB-Konzentrationen konnten in den natürlich infizierten und mit *F. proliferatum* inokulierten Purpurspargelstangen, die 2 Tage bei 22 °C gelagert wurden detektiert werden (150 ppb bzw. 160 ppb). Die BEA-Gehalte in der Bleichspargel Variante, die 2 Tage bei 22 °C gelagert wurde (sowohl natürlich mit *F. proliferatum* infiziert als auch mit *F. proliferatum* inokuliert), sowie die mit *F. proliferatum* inokulierten Purpurspargelvariante, die 7 Tage bei 22 °C gelagert wurde, wiesen die höchsten BEA-Konzentrationen auf (500 ppb, 810 ppb, 700 ppb) und unterschieden sich signifikant zu den restlichen Lagervarianten als auch im Vergleich zu den FB-Gehalten (Abb.20).

Innerhalb der mit *F. oxysporum* inokulierten Variante zeigte sich in den Purpurspargelstangen eine signifikant hohe Konzentration (2200 ppb) verglichen mit der Grün- sowie Bleichspargelvariante. Die BEA-Konzentrationen der mit *F. oxysporum* inokulierten Spargelstangen waren in allen Spargelvarianten signifikant höher als in den mit *F. proliferatum* inokulierten Varianten (Abb.21).

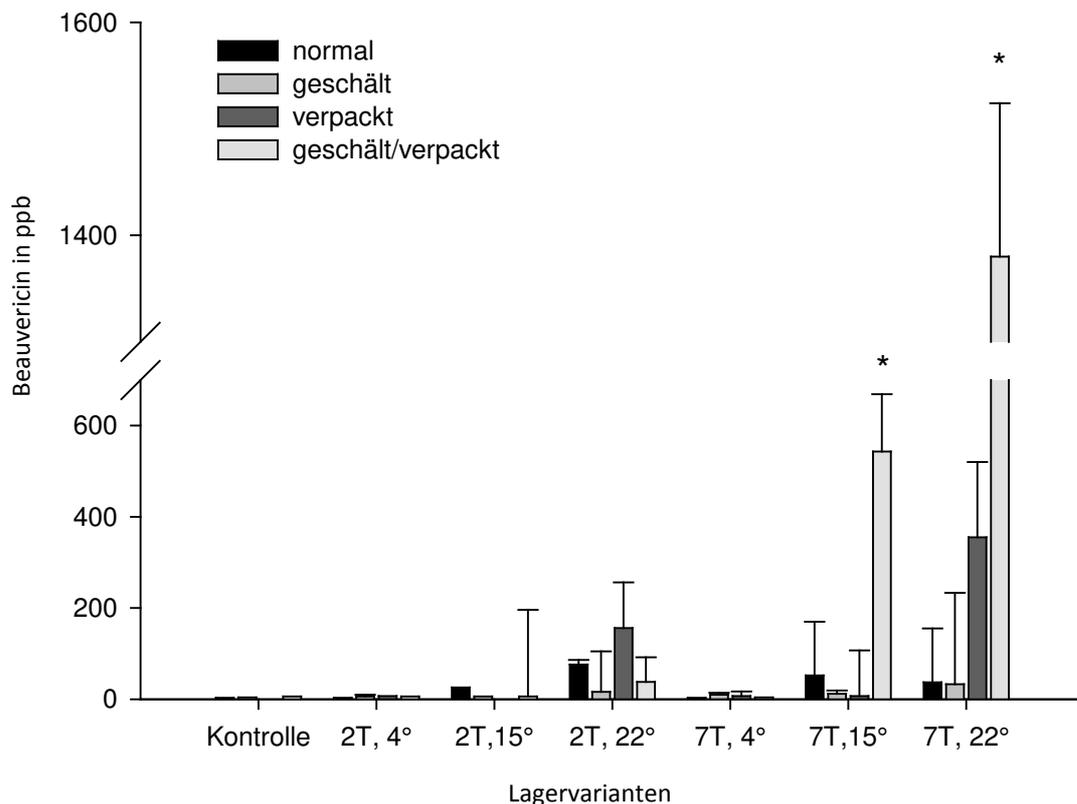


Abb.17: Beauvericin-Gehalt (ppb) in Spargelstangen im Erntejahr 2011 in Abhängigkeit unterschiedlicher Verpackungen und Lagerbedingungen. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. * signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$

Tab.11: Beauvericin-Gehalt (ppb) in Spargelstangen im Erntejahr 2012 in Abhängigkeit unterschiedlicher Verpackungen und Lagerbedingungen. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. * signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$

Variante	Lagerdauer (d) /Lagertemperatur (°C)					
	2 (d)			7 (d)		
	4°C	15°C	22°C	4°C	15°C	22°C
normal	MW±SE	MW±SE	MW±SE	MW±SE	MW±SE	MW±SE
normal	3±0	25±4	76±10	3±0	52±118	37±110
geschält	6±4	6±0	16±89	10±4	12±7	33±92
verpackt	7±0	0±0	156±100	7±10	7±5	355±165
verpackt/geschält	6±0	6±190	38±54	4±0	543±126*	1380±144*

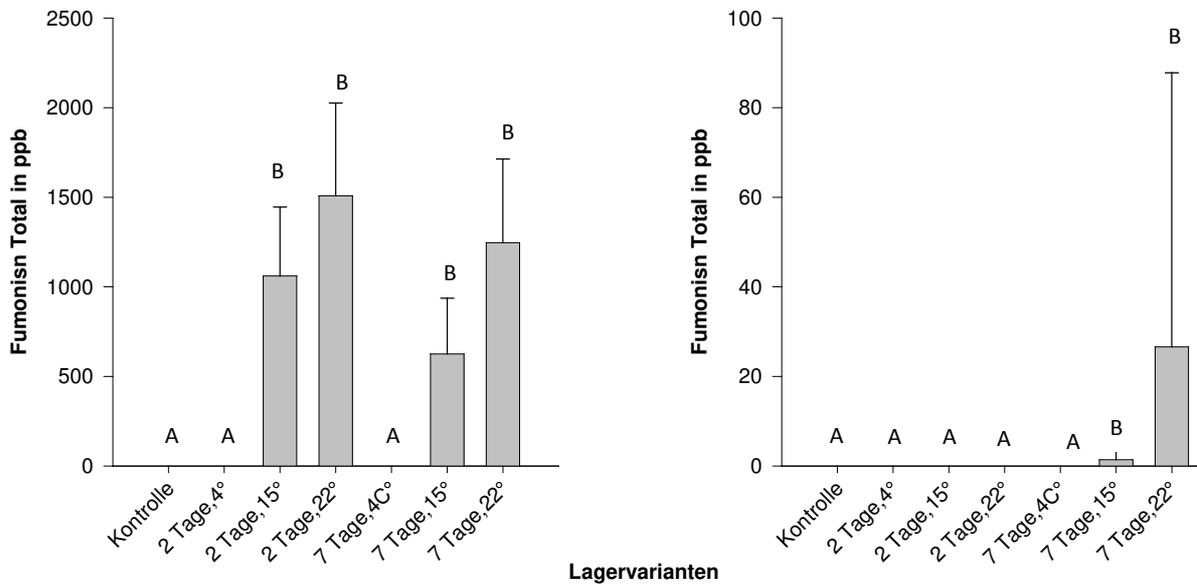


Abb.18A: Fumonisin-Gehalt (ppb) in mit *F. proliferatum* inokulierten (A) und natürlich infizierten (B) Spargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagervarianten im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$.

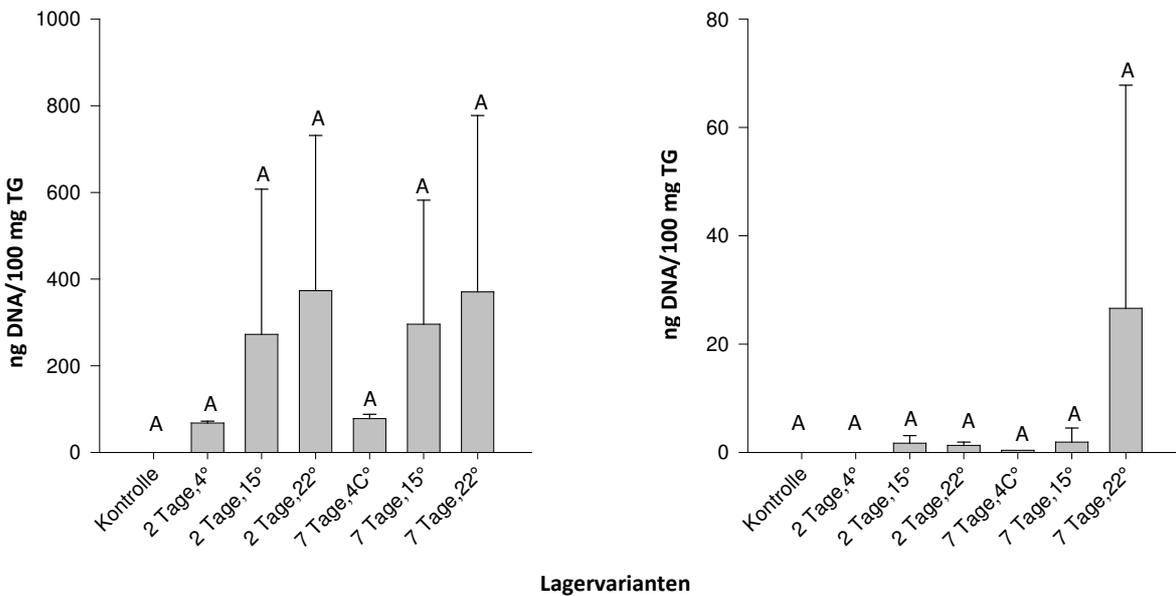


Abb.18B: *F. proliferatum*-Gehalt (ng DNA/ 100mg TG) in mit *F. proliferatum* inokulierten (A) und natürlich infizierten (B) Spargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagervarianten im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Gleiche Buchstaben signalisieren keine signifikanten Unterschiede nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$.

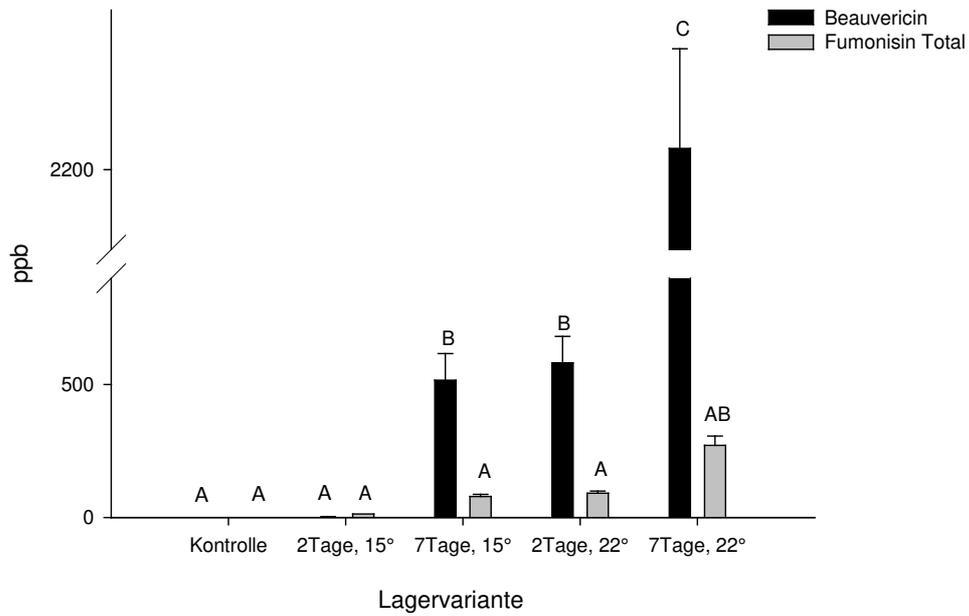


Abb.19: Beauvericin und Fumonisin-Gehalt (ppb) in mit *F. proliferatum* inokulierten Spargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$

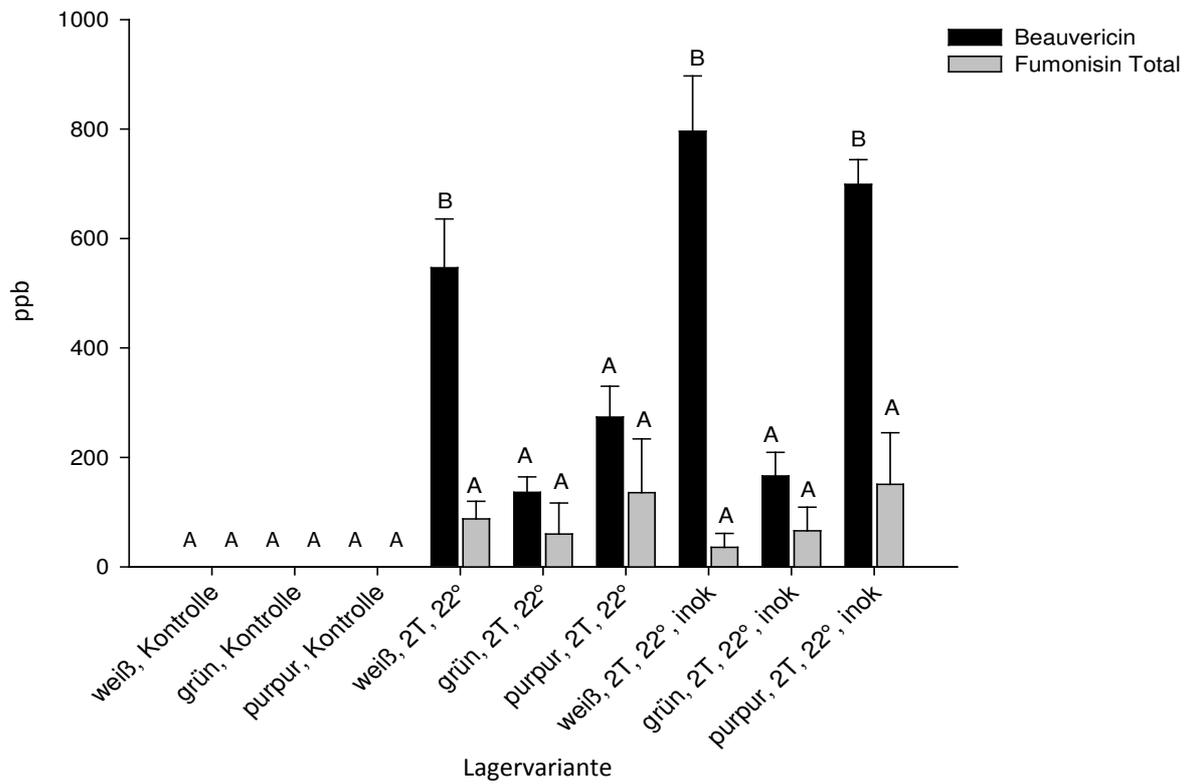


Abb.20: Beauvericin und Fumonisin-Gehalt (ppb) in natürlich infizierten und mit *F. proliferatum* inokulierten Weiß-, Grün- und Purpurspargelstangen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$.

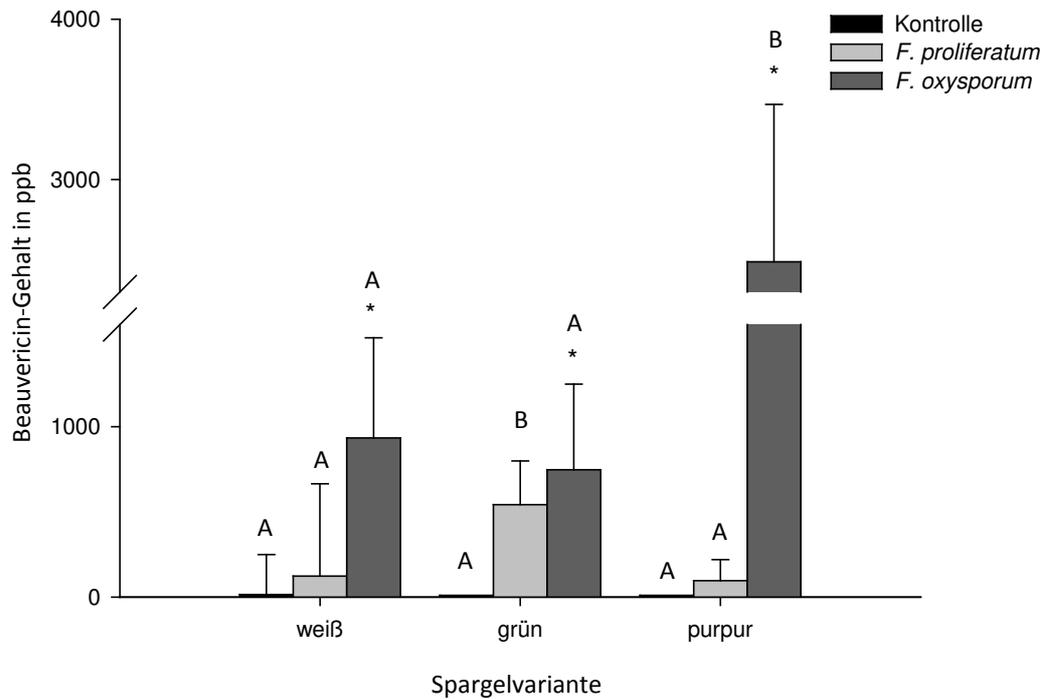


Abb.21: Beauvericin-Gehalt (ppb) in mit *F. oxysporum* bzw. *F. proliferatum* inokuliertem Weiß-, Grün- und Purpurspargel, gelagert 2 Tage bei 22°C im Erntejahr 2011. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb desselben Inokulums zwischen den einzelnen Spargelvarianten signalisieren signifikante Unterschiede nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$. * innerhalb derselben Spargelvarianten signalisieren signifikante Unterschiede zwischen der Inokula nach ANOVA, $p < 0,05$, $n=20$.

1.5 Diskussion

Im Versuchsjahr 2010 sollte ein Monitoring Versuch auf verschiedenen Feldern an unterschiedlichen Standorten (M, S und T) Aufschluss über die Befallshäufigkeit von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* geben sowie die potentielle FB-Kontamination untersuchen. Die Ergebnisse zeigten Variationen in der Befallsstärke zwischen dem ersten Erntetermin im Mai und dem zweiten Erntetermin im Juni, diese waren jedoch nicht signifikant. Im Mai zeigte sich insgesamt eine geringere Befallshäufigkeit, *F. oxysporum* stellte die dominante Pilzspezies dar. Im Juni war insgesamt ein höherer Pilzbefall zu verzeichnen und der Befall mit *F. proliferatum* nahm zu. Die Infektion der Spargelpflanze mit *Fusarium* spp. wird hauptsächlich durch abiotische Faktoren beeinflusst. Hierbei werden Umweltfaktoren wie Temperatur, Niederschlag und Luftfeuchte eine wesentliche Rolle zuteil (Elmer, 2000). Speziell in den tropischen Anbaugebieten wird oft *F. proliferatum* als dominierende *Fusarium* Spezies beschrieben (Elmer et al., 1997; Logrieco et al., 2003), während in den gemäßigt kühleren Regionen *F. oxysporum* vorherrscht (Elmer et al., 1996; Goßmann et al., 2001). Ein in vitro Versuch an Reiskulturen konnte belegen, dass die Myzelwachstumsrate von *F. oxysporum* bereits bei 15 °C signifikant zunimmt (Koch, 2011). Die höheren Durchschnittstemperaturen im Juni können folglich das Wachstum beider Fusarien begünstigt und einen höheren Infektionsdruck zur Folge gehabt haben. Ebenso kann sich der sehr niederschlagsreiche Juni wachstumsfördernd auf *F. proliferatum* und *F. oxysporum* ausgewirkt haben. Durch den Ernteprozess und das Entfernen der Triebe, wird die Pflanze außerdem in eine Stresssituation versetzt: die Kohlenhydratreserven werden stark reduziert, da Energie für die Regeneration bereitgestellt werden muss. Insgesamt kann dies zu einer reduzierten Widerstandskraft gegenüber Pathogenen geführt haben (Hartmann, 1989; Leslie und Summerell, 2006). Weidenbörner (1999) schlagen weiterhin vor, dass das Entfernen der Triebe und die damit einhergehende Verletzung, Eintrittspforten für bodenbürtige Pathogene wie *Fusarium* spp. darstellen können und somit eine Infektion und Weiterverbreitung begünstigt wird. Auch können Insekten, wie z. B. die Spargelfliege (*P. poeciloptera*), durch Verletzungen am Trieb durch den Legebohrer des Weibchens, eine Infektion und weitere Ausbreitung von *Fusarium* spp. fördern (Böning, 1929; Koch, 2011).

Am Standort T wurde zwischen Feldstangen, symptomatischen Stangen und Stangen der Klasse Extra differenziert. Die symptomatischen Stangen zeigten den höchsten Befall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum*. *Fusarium* spp. gehören zu den Haupterregern der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule, es zeigen sich typische rötlich-braune Läsionen an den befallenen Pflanzenteilen (Endo und Burkholder, 1971; Wolterstoff, 1990). Auch Koch (2011) konnte einen positiven Zusammenhang zwischen *Fusarium* spp. Befall und dem Auftreten von rötlich-braunen Läsionen an den Spargelstangen aufzeigen. Auch an den hier untersuchten symptomatischen Spargelstangen konnten die rötlich-braunen Läsionen mit einer Kontamination mit *F. oxysporum* in Verbindung gebracht werden.

Für die Stangen der Klasse Extra zeigte sich entweder kein Befall mit *Fusarium* spp. oder ein jeweils sehr geringer Befall (< 10 %), der via Multiplex-PCR detektiert werden konnte, aber nicht visuell an den

Spargelstangen in Erscheinung trat. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen Vojanovic et al. (2006), die *Fusarium* spp. von asymptomatischem Spargelgewebe isolieren konnten.

Die an Spargel vorrangig vorkommenden *Fusarium* Arten *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sind nicht nur von phytopathologischer Bedeutung. Da sie zu den Mykotoxinbildnern gehören, kann eine begleitende Kontamination mit Mykotoxinen auch ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier darstellen. Daher wurde zusätzlich in allen mit *Fusarium* spp. kontaminierten Proben die FB-Konzentration detektiert. Der Anteil der mit FB infizierten Spargelstangen an den Standorten M und S belief sich im Juni insgesamt höher als im Mai, ein signifikanter Unterschied zwischen den Ernteterminen bestand nicht. Auch hinsichtlich der unterschiedlichen Standorte konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Die Konzentration an Gesamt-FB in den einzelnen Spargelstangen reichte von relativ geringen 1 ppb bis 100 ppb. Bei den Versuchsansätzen am Standort T konnte jeweils nur bei den symptomatischen Spargelstangen und bei den randomisiert vom Feld entnommenen Spargelstangen eine FB-Produktion nachgewiesen werden. Die Werte lagen insgesamt mit 1-13 ppb am Rand der Nachweisgrenze. Um eine potentielle Zunahme des Befalls mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* sowie der FB-Kontamination während der Betriebslagerung in der Nachernteprozesskette zu analysieren, wurden diese Parameter für alle drei Spargelstangenvarianten (Spargelstangen mit Symptomen, Feldstangen sowie Stangen der Klasse Extra) am Standort T untersucht, weiterhin wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Spargelstangen im Anschluss an die Betriebslagerung einer Haushaltslagerung unterzogen, um die Lagerung beim Endkunden zu simulieren. Äquivalent zu den nicht eingelagerten Varianten, wiesen auch hier die Spargelstangen mit Symptomen den höchsten Befall mit *F. oxysporum* bzw. *F. proliferatum* auf, auch konnte nur in diesen Varianten vereinzelt eine FB-Produktion zwischen 1 ppb -100 ppb detektiert werden. Weder durch die Betriebslagerung noch durch die zusätzliche Haushaltslagerung konnte eine Veränderung bezüglich der Befallshäufigkeit oder der FB-Produktion beobachtet werden.

Die Witterungsbedingungen beeinflussen nicht nur die Ausbreitung von *Fusarium* spp., sondern auch die Produktion von Mykotoxinen, hier speziell FB. In vitro Versuche von Koch (2010) zeigten, dass die FB-Produktion stark von der Temperatur abhängig ist. So zeigte die FB-Produktion bei 18 °C ein Optimum und verminderte sich mit steigender Temperatur. Andere Arbeitsgruppen konnten optimale Temperaturen für eine FB-Produktion von 25 °C – 30 °C ausmachen (Lebars et al., 1994; Marin et al., 1999; Samapundo et al., 2005). Demnach wiesen die im Mittel zu kalten Temperaturen im Mai 2010 (10,1 °C , - 3,1 °C Abweichung zum langjährigen Mittelwert) sowie die in den Lagerversuchen vorherrschende Kombination aus Temperatur und Lagerdauer weder optimale Bedingungen für das Pilzwachstum von *Fusarium* spp. noch für die Produktion von FB auf. Im Juni erhöhte sich die mittlere Durchschnittstemperatur auf 16 °C, was zu einem vermehrten Befall mit *Fusarium* spp. sowie zu einer erhöhten FB-Produktion geführt haben kann.

Bei allen mit FB kontaminierten Spargelstangen konnte gleichzeitig auch eine Infektion mit *F. oxysporum*, teilweise auch mit *F. proliferatum* nachgewiesen werden. Calvo et al. (2002) konnten beobachten, dass der

Sekundärmetabolismus mit dem Entwicklungsprozess von Mikroorganismen assoziiert ist, bei Pilzen im Speziellen mit der Sporulation. Hier werden die Mykotoxine während des Wachstumsvorgangs (etwa beim Zeitpunkt der Sporulation) gebildet und ausgeschieden. Shim et al. (2001) konnten speziell in *Fusarium* spp. einen genetischen Zusammenhang zwischen Sporulation und Mykotoxinproduktion feststellen: eine Mutation im FCC1 Gen in *Fusarium verticillioides* resultierte in einer reduzierten Sporulation sowie einer reduzierten FB-Biosynthese.

Nicht an jeder in dieser Arbeit untersuchten Spargelstange, an der eine Infektion mit *F. proliferatum* bzw. *F. oxysporum* nachgewiesen wurde, konnte auch eine FB-Kontamination ermittelt werden. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass sich die Regulation des Sekundärmetabolismus bei Pilzen als sehr komplex darstellt und dass es vielfältige Faktoren gibt, die die Anwesenheit und die Produktion von Mykotoxinen beeinflussen. Die Produkte des Sekundärmetabolismus sind charakteristisch für ihre Produzenten. Des Weiteren reagiert der Sekundärstoffwechsel sensibel auf die äußeren Umgebungsbedingungen. Bestimmte sekundäre Stoffwechselprodukte werden nur unter spezifischen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen, bei bestimmtem Nährstoffangebot oder in bestimmten Entwicklungsphasen synthetisiert. Bezüglich der Schlüsselfaktoren, die die Mykotoxinproduktion nachhaltig beeinflussen, unterscheiden D'Mello und Macdonalds (1997) zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Faktoren. Zu den physikalischen Faktoren, gehören Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Insektenbefall. Zu den chemischen Faktoren zählt der Gebrauch von Fungiziden und Düngern. Die Interaktion zwischen dem Pilz und dem Substrat stellt einen wichtigen biologischen Faktor dar. Weiterhin lassen sich die biologischen Aspekte in die folgenden Subkategorien einteilen: in intrinsische Faktoren wie Spezies, Stamm-Spezifität, Stamm Variation. So können verschiedene Spezies dasselbe Toxin produzieren, unterschiedliche Stämme einer Spezies können dasselbe Toxin mit großer Variabilität produzieren und verschiedene Stämme einer Spezies können unterschiedliche Toxine produzieren. Auf der Transkriptomebene werden Gene, die im Sekundärmetabolismus involviert sind, in sogenannten Clustern organisiert (Keller et al., 1997; Yu und Keller, 2005). Die Koregulierung der Gencluster kann auf transkriptioneller Ebene, durch die Präsenz von 2 Klassen von Transkriptionsfaktoren, erklärt werden: diejenigen, die spezifisch für einen metabolischen Stoffwechselweg sind und diejenigen, die global an der Vermittlung von Umweltreizen beteiligt sind (Zhang et al., 2004). Ein Beispiel für einen globalen Regulator stellt die Methyltransferase LaeA des Velvet-Komplexes dar. Lopez-Berges et al. (2013) liefern den Beweis dafür, dass der Velvet Komplex maßgeblich an der Steuerung der BEA- Biosynthese in *Fusarium oxysporum* beteiligt ist, und die BEA-Produktion gleichzeitig einen Virulenzfaktor darstellt.

Eine direkte Korrelation zwischen dem FB-Gehalt und der pilzlichen Biomasse von *F. proliferatum* konnte nicht hergestellt werden. In der Literatur sind diesbezüglich widersprüchliche Aussagen zu finden. So konnten Waalwijk et al. (2008) eine positive Korrelation in Mais zwischen der Konzentration an *F. verticillioides* sowie *F. proliferatum* und dem Gehalt an FB herstellen. Im Gegensatz hierzu berichten Ramirez et al. (1996) von einer negativen Korrelation zwischen dem Gehalt an *F. proliferatum* und *F.*

moniliforme DNA und der FB-Konzentration. Auch wenn *F. proliferatum* als bekannter FB-Produzent gilt, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass hier *F. oxysporum* maßgeblich an der FB-Produktion beteiligt ist. Auch andere Studien zeigen, dass *F. oxysporum* in der Lage ist, FB in großer Variabilität zu produzieren (Waskiewicz et al., 2010; Stepien et al., 2011; Martinez-Lopez et al., 2007; Seo und Lee, 1996; Rheeder et al., 2002). In früheren Studien wurden außerdem viele unterschiedliche *Fusarium* spp. an Spargel nachgewiesen (Blok et al., 2010; Elmer et al., 1997; Martinez-Lopez, 2007; Knaflewski et al., 2008; Weber et al., 2006), so dass eine Toxinproduktion auch durch andere *Fusarium* spp., die in den vorliegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden, möglich ist.

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten FB-Mengen in den geernteten Spargelstangen decken sich mit denen anderer Studien und sind mit bis 100 ppb vergleichsweise gering. Waskiewicz et al. (2013) fanden FB-Konzentrationen in Spargel in Höhe von 31,94–234,35 ng/g und Seefelder et al. (2002) konnten Konzentrationen von 36,4 – 4515,7 ng/g detektieren. Verschiedene Studien zeigen, dass das pilzliche Wachstum und die Zunahme der Biomasse mit der Produktion von Mykotoxinen assoziiert sind, so dass aufgrund des eher geringen Befalls mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, auch die geringen Toxinwerte zu erklären sind (Calvo et al., 2002; Adams et al., 1998). Die geringen FB-Konzentrationen könnten auch auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die nachwachsenden Triebe zur Haupterntezeit von April-Juni kontinuierlich abgeschnitten werden und so eine vaskuläre Ausbreitung der toxischen Sekundärstoffwechselprodukte unterbunden wird. Koch (2011) konnte in einzelnen Spargelstangen von einem nicht konventionell beernteten Feld hohe FB-Konzentrationen bis 281 ppm nachweisen; hier konnte ein vaskuläres Wachstum der Fusarien bis in die Triebspitzen schon von Beginn der Triebwachstumsphase erfolgen. Darüber hinaus existieren einige Hinweise für die Kompartimentierung von FB in Pflanzen (Dall'Asta et al., 2012). Demnach könnte die relativ geringe Konzentration von FB auf die Probennahme zurückzuführen sein. Da die gesamte Spargelstange als Probe diente, wird eine mögliche Kompartimentierung der FB nicht berücksichtigt. Die Verwendung der gesamten Spargelstange als Probenmaterial könnte zu einer Verdünnung der Gesamtkonzentration geführt haben. Es ist möglich, dass Mykotoxine in bestimmten Reaktionsräumen der Zelle lokal akkumuliert vorliegen und in anderen Kompartimenten wiederum nur in sehr geringen Konzentrationen. Die Kompartimentierung von Mykotoxinen stellt neben der chemischen Modifikation einen effektiven Abwehrmechanismus der Pflanze dar. Durch die chemische Modifizierung werden die Bioaktivität sowie die Toxizität für die Pflanze geschwächt, außerdem können die Toxine innerhalb des Transportsystems der Pflanze besser verlagert werden. Diese Reaktionen werden durch Transferasen vermittelt (Berthiller et al., 2013). Gründe für das geringe Auftreten von FB in den Spargelproben könnte ferner auch eine erhöhte Wasserlöslichkeit von FB, hervorgerufen durch diese chemische Modifikation, sein.

Bisher existieren keine validen Daten, die eine akute Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch die Exposition mit FB belegen. In verschiedenen Studien konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Karzinomen bei langfristiger, chronischer Exposition beobachtet werden (Gelderblom et al.

1992; Howard et al., 2001). Für FB1 allein sowie für die Summe aus FB1, FB2 und FB3 wurde durch den wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss der Europäischen Union eine tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) von 2 ppb (0,002 mg/kg) Körpergewicht festgelegt. Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Mengen an FB sind isoliert betrachtet folglich als unbedenklich einzustufen. Jedoch kann FB mit anderen Mykotoxinen, wie z. B. den „neueren“ Mykotoxinen koexistieren. Dies kann wiederum zu additiven Effekten führen und ein potentielles Gesundheitsrisiko darstellen. Zu diesen Toxinen gehören z. B. die von *Fusarium* spp. produzierten Fusaproliferine, BEA und Enniatine. Da einige Studien die Co-Kontamination mit akut toxischen Toxinen nachweisen konnten, wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Koexistenz verschiedener Mykotoxine vermutet und BEA für die Lagerversuche exemplarisch in das Untersuchungsspektrum integriert.

Im Erntejahr 2011 wurden in einem weiteren Lagerversuch neben herkömmlichen Spargelstangen der Klasse Extra auch Convenience-Produkte berücksichtigt und jeweils 2 und 7 Tage bei 4 °C (simuliert Kühlschranklagerung bzw. Lagerung im Betrieb), 15 °C (mittlere Temperatur Kühlkette-Supermarktlagerung) sowie 22 °C (Raumtemperatur) eingelagert. Hier sollten Unterschiede im Befall mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie der Mykotoxinkontamination in Abhängigkeit des Schälvorgangs sowie der Verpackung überprüft werden. In den unter MAP-Bedingungen verpackten und geschälten Spargelproben, ergaben sich signifikant erhöhte BEA-Konzentrationen bei den für 15 °C bzw. 22 °C für sieben Tage gelagerten Varianten. Pilzliche DNA von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* konnte qualitativ nachgewiesen werden. Da Spargel eine erhöhte Atmungsaktivität aufweist, kommt es nach der Ernte zu einer schnellen Qualitätsminderung (King et al., 1986, 1979; Hartmann, 1989). Die Atmungsaktivität kann durch Stress, hervorgerufen durch z. B. Verwundung während des Ernteprozesses, zusätzlich verstärkt werden. Demnach unterliegt besonders geschälter Spargel einem hohen Risiko der Qualitätsminderung. Die Stoffwechselaktivität kann im Vergleich zu ungeschälter Ware auf das Zwanzigfache ansteigen (Cantwell, 1992). Weiterhin bieten geschälte Spargelstangen eine relativ große ungeschützte Angriffsfläche für Mikroorganismen. Durch das MAP wird beim Abpacken durch eine Schutzbegasung ein spezielles Mikroklima erzeugt, welches sich durch ein speziell abgestimmtes Sauerstoff-Stickstoff Verhältnis, sowie insgesamt durch einen niedrigen Sauerstoffgehalt und einen konstanten Kohlendioxidgehalt bei hoher Luftfeuchtigkeit (95 %) auszeichnet. Diese Faktoren führen zu einer verminderten Respirationsrate und einem verminderten Infektionsdruck von Mikroorganismen (Mckenzie et al., 2004). Wahrscheinlich hat neben der Lagertemperatur und Lagerdauer auch die Gaskonzentration innerhalb der Verpackungseinheiten einen direkten Einfluss auf die Mykotoxinproduktion. Bisher gibt es wenig Studien, die den Einfluss von CO₂ und O₂ auf die Bildung von BEA untersucht haben. Giorni et al. (2008) beobachteten, dass ein CO₂-Gehalt von min. 50 % nötig war, um die Aflatoxinsynthese signifikant zu hemmen, während eine Konzentration von 25 % ausreichend war, um das Wachstum von *Aspergillus flavus* zu hemmen. Die hier vorliegenden Ergebnisse der signifikant erhöhten BEA-Gehalte innerhalb der geschälten, verpackten Variante lassen vermuten, dass sich hier ein atmosphärisches Ungleichgewicht

zugunsten von Sauerstoff eingestellt hat, möglicherweise durch einen fehlerhaften Verpackungsmechanismus.

Neben der Gaskonzentration könnte auch die Wasseraktivität, das Maß für verfügbares Wasser, bzw. eine Kombination aus beiden Faktoren einen Einfluss auf die Mykotoxinproduktion in gelagertem Spargel haben. Samapundo et al. (2005) konnten bezüglich der Produktion von FB durch *F. proliferatum* einen Synergismus zwischen CO₂-Gehalt und Wasseraktivität nachweisen: je niedriger die Wasseraktivität, desto niedriger muss die für die Inhibierung erforderliche CO₂-Konzentration sein. In einer weiteren Studie wurde die Expression von für die FB-Synthese relevanten Gene in Abhängigkeit von Temperatur und Wasseraktivität untersucht. So war die Expression von *FB1* durch eine geringe Wasseraktivität (0,95) signifikant erhöht, was eine erhöhte FB-Produktion von *F. verticillioides* zur Folge hatte (Medina et al., 2013). Marin et al. (1999a,b) weisen darauf hin, dass das Minimum der Wasseraktivität für die FB-Produktion und das Wachstum für *F. proliferatum* unterschiedlich sein können. Weiterhin konnten sie beobachten, dass der Spielraum der Wasseraktivität sowie der Temperatur, der sich förderlich auf das Wachstum von *F. proliferatum* auswirkt, breiter ist als für die FB-Produktion. Die Wasseraktivität wurde im folgenden Experiment nicht berücksichtigt. Es liegt nahe, dass es aufgrund des Lagerungsprozesses und der damit zusammenhängenden atmosphärischen Veränderungen, auch zu einer Veränderung der Luftfeuchtigkeit innerhalb der Verpackung sowie einer Veränderung der Wasseraktivität kam und somit auch die Mykotoxinproduktion beeinflusst hat. Die Überprüfung der Wasseraktivität sowie der atmosphärischen Gaskonzentration müsste in weiterführenden Experimenten sichergestellt werden.

Insgesamt liefern die vorliegenden Ergebnisse den ersten Beweis für das Auftreten von BEA sowie für die Koexistenz mit FB in Spargel in Deutschland. BEA gehört zu den Hexadepsipeptiden und wurde erstmals 1969 aus *Beauveria bassiana* isoliert (Hamill et al., 1996). Seitdem konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass BEA spezifisch von den Pilzspezies *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Polyporus*, *Isaria* und *Fusarium* gebildet wird (Luangsa-ard et al., 2009; Moretti et al., 2007; Logrieco et al., 1998). BEA tritt weltweit vor allem in verschiedenen Getreide-Arten und Mais auf (Jestoi et al., 2004; Uhlig et al., 2007; Uhlig et al., 2004; Goerz et al., 2010; Lindblad et al., 2013; Fredlund et al., 2013). Die höchsten Konzentrationen konnten im µg/kg-Bereich jeweils in Mais und Hafer ermittelt werden. BEA besitzt aufgrund seiner ionophoren Eigenschaften des Moleküls ein breites Wirkungsspektrum, darunter antimikrobielle, antibiotische, enzyminhibitorische und cytotoxische (Prosperini et al., 2013; Meca et al., 2011b; Jow et al., 2004). Die European Food Safety Authority (EFSA) stuften die bis dato weltweit detektierten BEA-Konzentrationen in unterschiedlichen Lebensmitteln als nicht akut toxisch für die menschliche Gesundheit ein. Gleichzeitig schließen sie aber eine chronische Schädigung durch eine langfristige Exposition nicht aus (EFSA Bericht, 2014).

Eine Koexistenz von BEA mit anderen Fusarien Toxinen wie Culmorin, Deoxynivalenol, Equisetin, FB, Fusaproliferin, Fusarinsäure, Moniliformin, Nivalenol, T-2/HAT-2 Toxine, Zearalenone in verschiedenen Lebensmitteln konnten in früheren Studien nachgewiesen werden (Bottalico et al., 1995; Jestoi et al.,

2004a; Malachova et al., 2011; Juan et al., 2013b; Lindblad et al., 2013; Mikoušová et al., 2013; Shimshoni et al., 2013; Streit et al., 2013). Aufgrund der Koexistenz verschiedener Toxine sind antagonistische, synergistische und additive Effekte und eine davon ausgehende Gefahr für die menschliche Gesundheit denkbar (Javed et al., 1993). So konnten in verschiedenen Studien Synergie-Effekte zwischen unterschiedlichen Toxinen nachgewiesen werden. Die intermittierende Exposition von OTA und FB1 in niedriger Konzentration über einen längeren Zeitraum, führte zu akuten Schädigungen der Nieren (Stoev und Denev, 2013). Weitere Synergie Effekte konnten zwischen Fusarinsäure und FB in Hühnerembryonen nachgewiesen werden (Bacon et al., 1995) sowie zwischen Fusarinsäure und Trichothecenen in Insekten (Dowd, 1988).

Im Erntejahr 2011 wurden zusätzlich zu potentiell natürlich infizierten Spargelstangen, mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* inokulierte Spargelstangen in das Untersuchungsspektrum integriert. Ein theoretisch hoher Befall mit FB- bzw. BEA-produzierenden Stämmen von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* und Veränderungen während des Lagerungsprozesses sollten simuliert und untersucht werden. Hier konnte bei den Varianten, die mit *F. proliferatum* inokuliert und bei 22 °C gelagert wurden, die höchste FB-Produktion detektiert werden. Diese lag um das 50-fache höher als bei den natürlich infizierten Spargelstangen. Bei den natürlich infizierten Spargelstangen wurde nur bei den für sieben Tagen bei 22 °C gelagerten Variante eine mittlere FB-Konzentration von 25 ppb gemessen werden. Die Werte wiesen allerdings eine sehr große Variabilität auf. *F. proliferatum* ist in der Lage verschiedenen Mykotoxine mit großer Variabilität zu bilden: FB, Moniliformin und BEA (Waskiewicz 2008; Waskiewicz and Irzykowska, 2010). Ebenso konnten Studien belegen, dass *F. proliferatum* mit das höchste Potenzial aufweist, FB zu synthetisieren (Bargen et al., 2009; Seefelder et al., 2002). Die BEA-Konzentration in den Spargelstangen, die mit *F. proliferatum* inokuliert wurden zeigte ein Maximum (2231 ppb) bei 22 °C und 7 Tagen und unterschied sich signifikant zur Kontrolle. Neben *F. oxysporum* wird auch *F. proliferatum* weltweit mit der BEA-Produktion assoziiert (Waskiewicz et al., 2010; Kostecki et al., 1999; Reyes-Velazquez et al., 2011; Meca et al., 2010). So ist *F. proliferatum* befähigt, verschiedene Mykotoxine unter variierenden Kulturbedingungen zu produzieren. Nicht nur das Wachstum von *F. proliferatum* ist von verschiedenen Umweltfaktoren wie Temperatur, Wasseraktivität, pH-Wert und Nährstoffangebot- und Verfügbarkeit abhängig, sondern auch die Produktion der Mykotoxine (Doohan et al., 2003; Shwab and Keller, 2008). Verschiedenen Studien zeigen, dass das pilzliche Wachstum und die Zunahme der Biomasse mit der Produktion von Mykotoxinen assoziiert sind (Calvo et al, 2002). So wird durch das Inokulum die pilzliche Biomasse erhöht, was zu einer generell höheren Toxinproduktion führen könnte als in den natürlich infizierten Spargelstangen. Verschiedene Studien belegen außerdem ein Temperatur-Optimum für die Produktion von BEA. So konnte *F. proliferatum* die höchsten Konzentrationen bei einer Temperatur von 20 °C - 25 °C produzieren (Waskiewicz et al., 2010). Die BEA-Konzentration bei den mit *F. proliferatum* inokulierten Proben lag um das 8-fache signifikant höher als die FB-Produktion in der gleichen Variante. Generell wiesen die BEA-Konzentrationen in allen Varianten höhere Werte auf als die FB-Konzentrationen (Abb.9). Die Mykotoxine BEA und FB

werden innerhalb zweier verschiedener Stoffwechselwege gebildet, so dass eine positive Korrelation der beiden Konzentrationen folglich nicht zwingend zu erwarten ist (Desjardins et al., 2007). Darüber hinaus werden die Gene, die für die einzelnen Schlüsselenzyme für die Synthese von BEA und FB codieren, in Abhängigkeit unterschiedlicher Faktoren reguliert.

Des Weiteren weisen BEA und FB unterschiedliche Temperatur-Optima auf, die eine unterschiedliche Konzentration erklären könnten. Während bei 15°C – 18 °C optimale Bedingungen für die FB-Produktion herrschen (Waskiewicz et al., 2010; Hinojo et al., 2006; Kostecki et al., 1999), wird BEA vorrangig bei höheren Temperaturen (20 °C – 25 °C) gebildet. Demnach liegt die Lagertemperatur von 22 °C in der vorliegenden Arbeit dem Temperaturoptimum von BEA näher.

Im Erntejahr 2011 wurden zusätzlich Bleich-, Grün- und Purpurspargelstangen bei 22 °C für 2 Tage eingelagert, da sich diese in den vorherigen Versuchen als die kritischste Bedingung erwies. Es erfolgte eine Inokulation sowohl mit *F. oxysporum* als auch mit *F. proliferatum* im Vergleich zu natürlich infizierten Spargelstangen. Zum einen stand ein unterschiedliches Kontaminationspotential bezüglich der BEA- sowie FB-Synthese in Bleich-, Grün- und Purpurspargel im Fokus, als auch diesbezüglich potentielle Unterschiede zwischen *F. oxysporum* und *F. proliferatum*. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der BEA-Kontamination zwischen den mit *F. proliferatum* und *F. oxysporum* inokulierten Weiß, Grün- und Purpurspargelstangen. Es konnte in allen mit *F. oxysporum* inokulierten Spargelstangen eine signifikant höhere BEA-Konzentration als in den mit *F. proliferatum* inokulierten Spargelstangen beobachtet werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass *F. oxysporum* maßgeblich an der BEA Produktion beteiligt ist. Die BEA-Produktion wurde weltweit mit *F. oxysporum* assoziiert (O'Donnell, 2009). Auch konnten durch *F. oxysporum* produzierte BEA-Gehalte in Bananenpflanzen (Li et al., 2013), Melone (Moretti et al., 2002) und Kartoffel (Song et al., 2008) nachgewiesen werden. Logrieco et al. (1998) untersuchten die BEA-Produktion in Mais von verschiedenen *Fusarium* Spezies und identifizierten *F. oxysporum* als den effektivsten Produzenten.

Zusätzlich muss an dieser Stelle auch noch mal auf die Schwierigkeit bei der Analyse von Mykotoxinen hingewiesen werden. Nicht nur die chemische Vielfalt der verschiedenen Mykotoxine, auch Nachweisgrenzen und neuerdings die sogenannten maskierten Mykotoxine, können zu nicht validen Ergebnissen führen und eine allgemeingültige Interpretation erschweren. Bei maskierten Mykotoxinen handelt es sich um Substanzen, die nicht nachzuweisen sind. Diese liegen nicht in ihrer natürlichen Form, sondern in einer chemisch modifizierten Form vor (Dall'Asta et al., 2015). Diese chemische Modifizierung wird von pflanzlichen Enzymen zu deren Schutz durchgeführt. Trotzdem kann die biologische Wirkung der maskierten Toxine weitgehend erhalten bleiben oder sogar verstärkt werden (Nishie et al., 1989; Gratz et al., 2016). Die chemisch modifizierten Verbindungen können je nach Art der Modifikation durch Verdauungsenzyme wieder freigesetzt werden und entsprechende toxische Effekte im Organismus verursachen. Gareis et al. (1990) postulieren, dass diese modifizierten Toxine bei der Lebensmittelverarbeitung im Nachernteprozess oder im Darmtrakt von Mensch und Tier wieder reversibel

in die Ausgangsform zurückverwandelt werden. Chemisch modifizierte Formen wurden bisher für DON, Nivalenol, Fusarenon-X, T-2-Toxin, HAT-2-Toxin, ZEN, OTA und Fusarinsäure identifiziert. Fettsäuren scheinen eine wichtige Rolle beim Maskierungsprozess in der Pflanze zu spielen (Berthiller et al., 2013). Insgesamt verdeutlichen die im Rahmen dieses Kapitels präsentierten Ergebnisse, dass keine akute Gefahr von den hier detektierten Mengen an FB und BEA auf den Verbraucher ausgeht. Auch nach verschiedenen Lagerversuchen bewegten sich die Konzentrationen im unbedenklichen Bereich. Darüber hinaus konnten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen Bleich-, Grün- und Purpurspargel beobachtet werden. Erstmals konnte eine Existenz von BEA in Spargel nachgewiesen werden. Aufgrund der ebenfalls belegten Koexistenz mit FB, kann eine Gefahr durch additive Effekte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Das Konstrukt des Sekundärstoffwechsels und insbesondere der Mykotoxinbiosynthese gestaltet sich äußerst komplex. Die Regulation auf unterschiedlichen Ebenen ist wahrscheinlich notwendig, um effizient auf schnell wechselnde Bedingungen reagieren zu können. Analysen auf der Transkriptomebene könnten zusätzlich zu einem besseren Verständnis hinsichtlich des Einflusses von äußeren Bedingungen auf die Mykotoxinproduktion beitragen und könnten in weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

2. Untersuchungen zu phenolischen Verbindungen im Spargel und deren Potential zur Hemmung des Wachstums von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* sowie der Mykotoxinproduktion

2.1 Zusammenfassung

Die Resistenz einiger agrarwissenschaftlich relevanter Lebensmittel gegenüber bestimmten Pilzinfektionen korreliert mit einem hohen Anteil phenolischer Substanzen. Daher wurden im Versuchsjahr 2012 zunächst die in Spargel häufig vorkommenden phenolischen Verbindungen (Chlorogensäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure und Rutin) und deren Gehalte sowie der Gesamtphenolgehalt in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen in einem Vorversuch bestimmt. Aufgrund der potentiell divergenten Phenolzusammensetzung wurde hier zwischen Bleich-, Grün- und Purpurspargel unterschieden. Es konnte ein signifikant höherer Gesamtphenolgehalt in den Grün- und Purpurspargelvarianten im Vergleich zum Bleichspargel ermittelt werden. In allen Spargelvarianten kam es während der Lagerung zu einer signifikanten Abnahme des Gesamtphenolgehaltes; dieser minimierte sich vergleichsweise stärker in den Grün- und Purpurspargelstangen. Die Grün- und Purpurspargelstangen wiesen insgesamt signifikant höhere Konzentrationen an Rutin und Chlorogensäure auf. Während der Lagerung reduzierten sich die Gehalte an Chlorogensäure, Ferulasäure und Rutin signifikant in den Grün- und Purpurspargelstangen. In der Bleichspargelvarianten konnten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Der p-Cumarsäuregehalt blieb bei allen Spargelvarianten sowie zwischen den Lagervarianten weitestgehend konstant.

Um den Qualitätsverlust bei Lebensmitteln durch pilzliche Kontamination und Produktion von Mykotoxinen zu minimieren, wurde der Fokus in jüngster Zeit vermehrt auf die in der Pflanze natürlich vorkommenden phenolischen Verbindungen gelegt. Ein *in vitro* Versuch sollte das Potential der häufig in Spargel vorkommenden phenolischen Verbindungen Ferulasäure, p-Cumarsäure und Rutin aufzeigen, sowohl das Wachstum von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* zu hemmen als auch die Produktion von BEA in Flüssigkultur zu reduzieren. Als Parameter für das Wachstum diente der IC50-Wert. Diesbezüglich erwies sich Ferulasäure sowohl bei *F. oxysporum* als auch bei *F. proliferatum* als signifikanter und relativ stärkster Wachstumshemmer. Rutin wies keinerlei Wachstumsinhibierungspotential auf. Die Konzentrationen von BEA waren analog zur Wachstumsrate von *F. oxysporum* in den Ferulasäure/p-Cumarsäure Varianten tendenziell reduziert, im Vergleich zur Kontrollvariante. Signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden.

2.2 Einleitung

Phenolische Verbindungen sind Sekundärmetabolite des pflanzlichen Stoffwechsels und werden gemäß ihrer strukturellen Eigenschaften in Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Chalkone differenziert. Die meisten Flavonoide sind in den Randschichten von Pflanzen sowie in den äußeren Blättern lokalisiert. Ihre Bedeutung für den pflanzlichen Organismus liegt vor allem im Schutz vor UV-Licht und Starklicht. Die Phenolsäuren und ihre Derivate sind ebenfalls überwiegend in den Randschichten von Pflanzen angesiedelt und stabilisieren die Zellwände in der Schale (Watzl und Rechkemmer, 2001). Die Phenolcarbonsäuren werden in Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren eingeteilt. Zu den wichtigsten Hydroxyzimtsäuren zählen Chlorogensäure, p-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure (Nardini et al., 1995). Spargel enthält einen hohen Anteil an natürlich vorkommenden phenolischen Verbindungen wie z.B. Flavonoide (Makris und Rossiler, 2001) und Carotenoide (Deli et al., 2000). Zu den wichtigsten phenolischen Verbindungen im Spargel zählt das Flavonoid Rutin, sowie die Phenolsäuren Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulasäure (Sakakibara, 2005; Fuentes-Alventosa et al., 2008). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass phenolische Substanzen Potential besitzen, den Befall mit *Fusarium* spp. sowie die Produktion von Mykotoxinen zu reduzieren (Samapundo et al., 2007; Siranidou et al., 2002; Santos et al., 2010).

In einem Versuchsansatz sollte der Gesamtphenolgehalt sowie die Konzentrationen der wichtigsten phenolischen Verbindungen in Spargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen bestimmt werden. Das Potential phenolischer Verbindungen die Produktion von Mykotoxinen zu reduzieren, wurde in unterschiedlichen früheren Untersuchungen bereits festgestellt. In diesem Versuchsansatz sollte geklärt werden, inwiefern die in Spargel häufig vorkommenden phenolischen Säuren Ferulasäure und p-Cumarsäure sowie das Flavonoid Rutin, das Potential aufweisen, das Wachstum von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* und die Produktion von BEA *in vitro* zu inhibieren.

2.3 Material und Methoden

2.3.1 Versuchsaufbau Erntejahr 2012

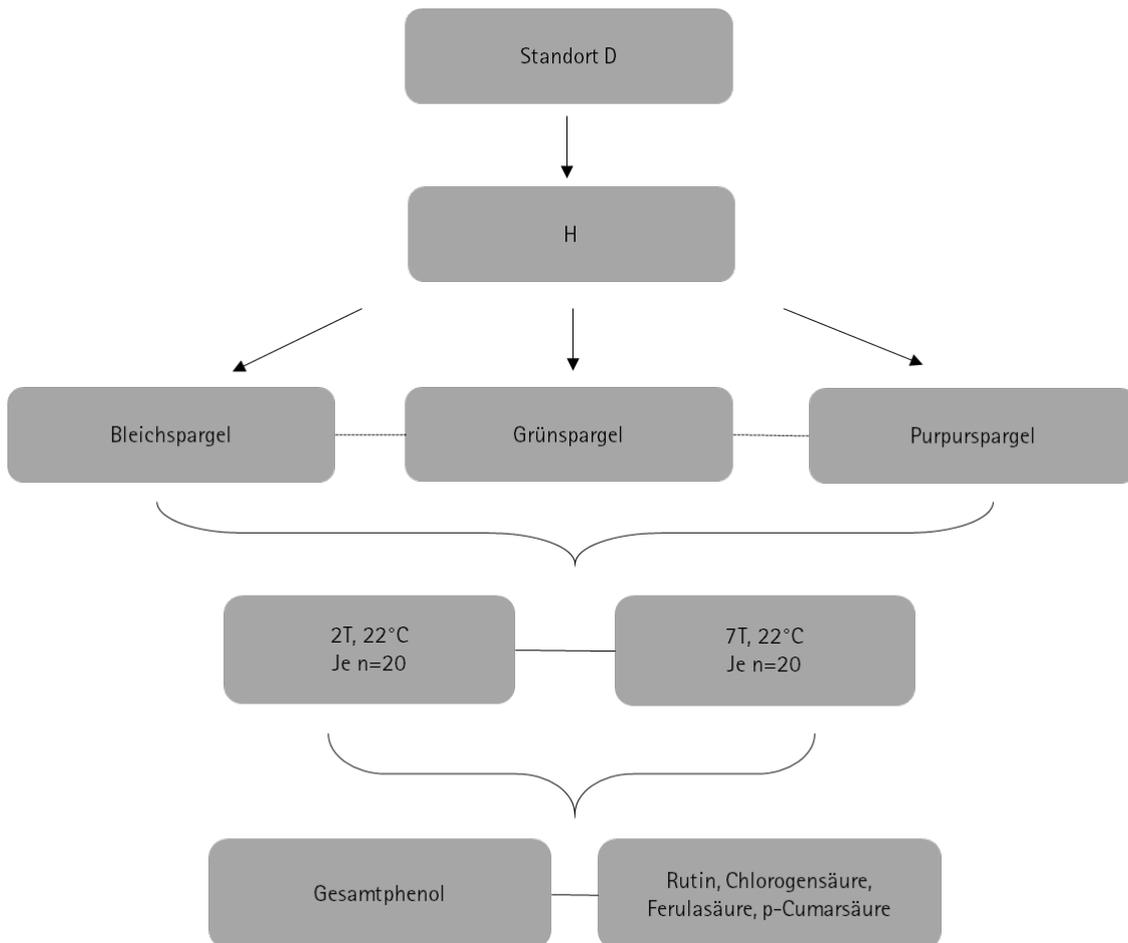


Abb.22: Versuchsaufbau aus dem Erntejahr 2012 zur Gesamtphenolanalyse sowie zur Bestimmung der Konzentration von Rutin, Chlorogensäure, Ferulasäure und p-Cumarsäure in Bleichspargel-, Grünspargel- und Purpurspargelstangen der Klasse Extra von einem Feld vom Standort D. Die unterschiedlichen Varianten wurden bei 22°C für 2 bzw. 7 Tage eingelagert.

2.3.2 Extraktion für die Gesamtphenolanalyse und für die Analyse spezifischer phenolischer Säuren sowie Rutin

2 g der gefriergetrockneten Proben wurden mit 20ml destilliertem Wasser aufgenommen und in einem Omni-Mix (Ultra Thurax T25, IKA Werke GmbH&Co) homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 23700xg für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde über ein Whatman No.1 Filterpapier filtriert und mit 100 ml Methanol über Nacht extrahiert.

2.3.4 Messung des Gesamtphenolgehalts nach Folin Ciocalteu

Bei dem Folin-Ciocalteu-Reagenz handelt es sich um ein Oxidationsgemisch aus Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdensäure. Dieses Gemisch bildet proportional zu den OH-Gruppen phenolischer Verbindungen im alkalischen Milieu blaue Komplexe.

0,3 ml Extrakt wurden mit 6ml destilliertem Wasser und 0,5 ml Folin-Ciocalteu Reagenz versehen und gevortext. Danach wurden 1,5 ml 20 % Natriumcarbonat-Lösung dazu gegeben und geschüttelt. Nach zwei Stunden Standzeit wurden die Proben bei 766 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt in mg Ferulasäure Äquivalent pro g Trockengewicht und anhand einer Ferulasäure-Kalibriergeraden ermittelt. Die Analysen wurden am Institut für Pflanzenernährung durchgeführt.

2.3.5 Bestimmung des Rutingehalts und spezifischer phenolischer Säuren

1g gefriergetrocknete Probe wurden in 50 ml Lösungsmittel aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Whatman Nr.1 Filterpapier gefiltert und die Extrakte (1,5 ml) zentrifugiert (6000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde erneut filtriert (Whatman, 0,45 µm Filter). Als Eluenten für das HPLC System wurden Wasser und ACN herangezogen, beide enthielten 0,5 % H₃PO₄. Der Durchfluss wurde folgendermaßen programmiert: Lösungsmittel ACN 15 %-45 % für 15min, 100 % ACN 3min, im Anschluss erfolgte die Reequilibrierung der Säule mit 15 % B für 5 min. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min. Rutin wurde bei 210 nm detektiert. 20 µl der Probe wurden in das HPLC System injiziert. Die relativen Quantifizierungen des Flavonoids Rutin und der phenolischen Säuren wurden durch Herstellung einer Standardkurve mit Konzentrationen von 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 mg / ml berechnet. Die Fläche unter den Peaks wurde gegen die Konzentration der Standards aufgetragen.

2.3.6 PDA-Wachstumsversuch

Die Wirkung von Ferulasäure, p-Cumarsäure, Cholorogensäure und Rutin auf das Wachstum von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* wurde auf PDA-Medium (siehe Anhang) in Petrischalen (92x16 mm) durchgeführt. Die Konzentrationen 0,1,2,5,6 mmol der jeweiligen phenolischen Verbindung wurden zum flüssigen Medium hinzugefügt. Jede Konzentrationsvariante wurde in dreifacher Ausführung überprüft. Die Mitte der Petrischale wurde mit 5 µl einer Sporensuspension von *F. proliferatum* bzw. *F. oxysporum* beimpft (Konzentration jeweils 10⁶ Sporen/ml). Die Petrischalen wurden bei 25 ° C für 5 Tage inkubiert; täglich wurde der koloniale Radius detektiert bis ca. 80 % des Bodens der Petrischale mit Myzel bedeckt war. Für jede Konzentration wurde der mediale Kolonieradius bestimmt sowie die prozentuale Inhibierung des Wachstums. Dieser Wert diente als Grundlage für die über lineare Regression ermittelte Konzentration, die 50 % des Wachstums hemmt (IC₅₀ Wert).

2.3.7 Flüssigmedium

Des Weiteren wurde in einem Versuch im Flüssigmedium die Wirkung der phenolischen Verbindungen auf das Myzelwachstum von *F. oxysporum* als auch auf die BEA-Produktion überprüft. Als Medium diente das Flüssigmedium GYEP (siehe Anhang). Vor der Inokulation wurde das Medium jeweils mit einer Endkonzentration von 1 mmol der phenolischen Verbindungen p-Cumarsäure, Ferulasäure sowie Rutin versetzt. Jede Variante wurde fünffach wiederholt. 100 ml des GYEP-Mediums wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 10^6 Sporen/ml *F. oxysporum* beimpft und bei 25 °C, 150 rpm, 15 Tage in der Dunkelheit geschüttelt. Die Kulturen wurden durch Whatman-Papier Nr. 4. filtriert. Die pilzliche Biomasse wurde nach dem Filtriervorgang der Gefriertrocknung zugeführt. Im Anschluss wurde das Trockengewicht des Myzels bestimmt und für die BEA-Analyse aufbereitet. Die Aufreinigung sowie die BEA-Analyse erfolgte gemäß Xu et al. (2008) und wurde am Institut für Nutzpflanzenwissenschaften der Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karlovsky durchgeführt.

2.3.8 Statistik

Die Analysen wurden als dreifache bzw. fünffache Wiederholungsproben durchgeführt und die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen ausgedrückt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistic analysis system (SAS). Die statistische Auswertung der Messergebnisse bezüglich der phenolischen Substanzen wurde über die einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf den Gesamtphenolgehalt sowie den Gehalt von Ferulasäure, p-Cumarsäure und Rutin in Bleich, Grün- und Purpurspargel

Untersuchungen haben gezeigt, dass die natürlich in der Pflanze vorkommenden phenolischen Substanzen sowohl vor Pilzbefall schützen als auch die Mykotoxinproduktion reduzieren können. In einem Versuch im Erntejahr 2012 sollte zunächst der Einfluss unterschiedlicher Lagerbedingungen auf den Gesamtphenolgehalt sowie auf den Gehalt ausgewählter phenolischer Säuren und dem Flavonoid Rutin in Bleich- Grün- und Purpurspargel untersucht werden.

In den Kontrollstangen konnte ein signifikant höherer Gesamtphenolgehalt in Grün- und Purpurspargelstangen im Vergleich zu Bleichspargel verzeichnet werden (82/83mg/g TG zu 60mg/g TG). Bei den Varianten, die jeweils 2 Tage bei 22 °C sowie 7 Tage bei 22 °C gelagert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Spargelvarianten festgestellt werden. In allen Spargelvarianten kam es während der Lagerung zu einer signifikanten Abnahme des Gesamtphenolgehalts im Vergleich zur Kontrolle; weiterhin minimierte sich dieser in den Grün- und Purpurspargelvarianten anteilig stärker als in der Bleichspargelvariante (Abb.23).

Die Abbildung 24 und Tabelle 12 zeigen den Gehalt von Chlorogensäure, Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure (mg/g TG) in Weiß-, Grün- und Purpurspargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen. In der Bleichspargelvariante fanden sich zwischen den einzelnen Lagervarianten im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt lag der Rutingehalt in den Kontrollstangen mit 1,2 mg/g TG deutlich unter den Konzentrationen der anderen gemessenen phenolischen Verbindungen. Eine tendenzielle Verminderung der Chlorogensäure während der Lagerung war zu beobachten. In den Grün- und Purpurspargelvariante waren signifikant höhere Werte von Chlorogensäure und Rutin zu verzeichnen. Während der Lagerung für 2 und 7 Tage bei 22 °C war eine signifikante Abnahme von Chlorogensäure, Ferulasäure und Rutin im Vergleich zu den Kontrollstangen zu beobachten. Der p-Cumarsäure Gehalt blieb in allen Spargelvarianten sowie zwischen den Lagervarianten weitestgehend konstant.

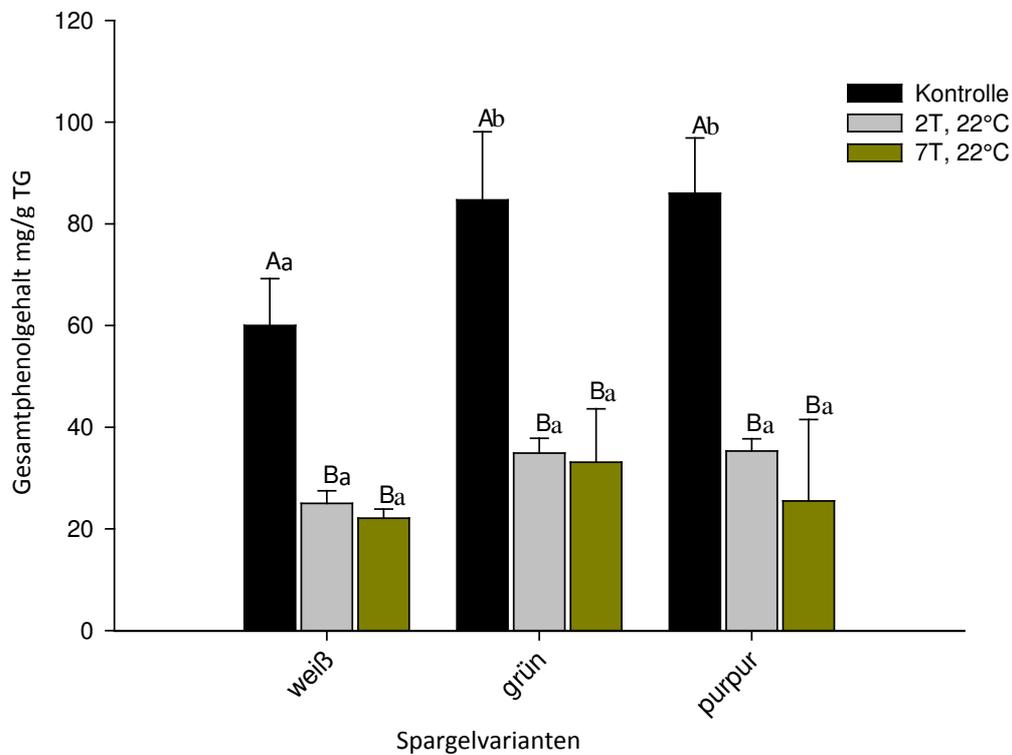


Abb.23: Gesamtphenolgehalt (mg/g TG) in Weiß-, Grün- und Purpurspargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2012. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Großbuchstaben innerhalb derselben Spargelvariante signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$. Unterschiedliche Kleinbuchstaben zwischen den einzelnen Spargelvarianten signalisieren signifikante Unterschiede nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$.

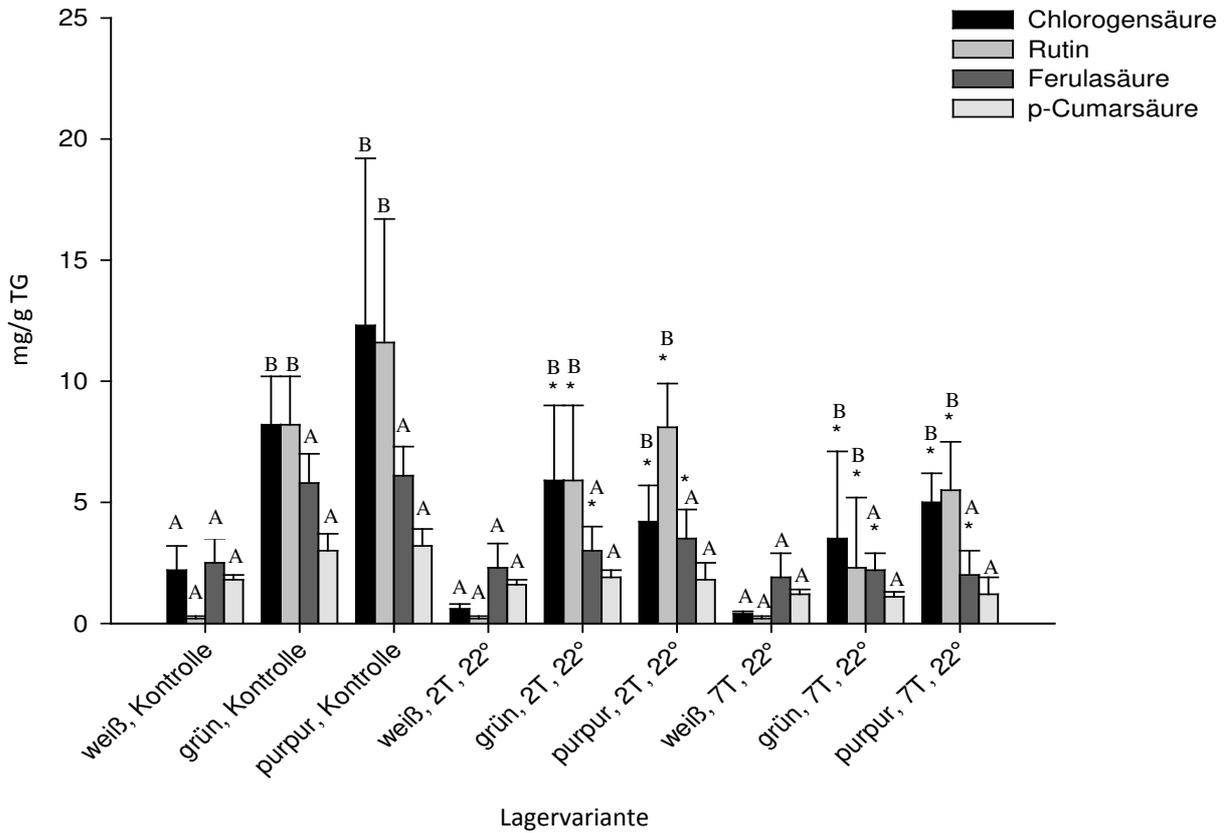


Abb.24: Der Gehalt von Chlorogensäure, Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure (mg/g TG) in Weiß-, Grün- und Purpurspargel in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerbedingungen im Erntejahr 2012. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.* innerhalb derselben Spargelvariante signalisieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer phenolischen Verbindung signalisieren signifikante Unterschiede nach Tukey, $p < 0,05$, $n=20$.

Tab.12: Gesamtphenol-, Rutin-, p-Cumarsäure-, Ferula- und Chlorogensäuregehalt (mg/g TG) und in Weiß-, Grün- und Purpurspargel im Erntejahr 2012. Dargestellt sind Mittelwertvergleiche und Standardabweichungen von jeweils 20 Wiederholungen

Spargelvariante	Phenol	Rutin	p-Cumarsäure	Ferulasäure	Chlorogensäure
Weiß	60±23	0,2±0,1	1,8±0,2	2,5±1	2,2±1
Grün	88±15	8,2±2	3,0±0,7	5,8±1,2	8,2±2
Purpur	89±8	11,6±5,1	3,2±0,7	6,1±1,2	12,3±6,9

2.4.2 Einfluss von Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure auf das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie der BEA-Produktion in vitro

Aufgrund von Erkenntnissen vorheriger Untersuchungen, dass einzelne phenolische Verbindungen das Pilzwachstum sowie die Mykotoxinproduktion hemmen können, wurden die phenolischen Säuren Ferulasäure, p-Cumarsäure, Chlorogensäure und das Flavonoid Rutin auf diese Hypothese hin untersucht. Als untersuchte Parameter dienten das Myzelwachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die BEA-Produktion in vitro.

Abbildung 26 zeigt das Wachstum von *F. oxysporum* (25b) und *F. proliferatum* (25a) in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen der phenolischen Verbindungen p-Cumarsäure, Ferulasäure sowie Rutin. Hier wurde jeweils der mediale Kolonieradius bei unterschiedlichen Konzentrationen in einem Zeitraum von 7 Tagen gemessen. Auf dieser Basis wurde für jede phenolische Säure die Konzentration per linearer Regression bestimmt, die 50% des Wachstums von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* hemmen (IC50). Zwischen den Pilzspezies variierte der IC50 Wert zwischen 2,4–25,9 mmol/l (Tab.13). Ferulasäure und p-Cumarsäure konnten das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* signifikant hemmen. Ferulasäure konnte das Wachstum von *F. oxysporum* als auch *F. proliferatum* ab einer Konzentration von 5 mmol zu 100 % hemmen (Tab.14, siehe Anhang). Ferulasäure konnte als der effektivste Wachstumshemmer ermittelt werden, mit einem IC50 Wert von 2,4 mmol/l bei *F. proliferatum* und 2,7 mmol/l bei *F. oxysporum*, gefolgt von p-Cumarsäure. Hier betrug der IC50 Wert bei *F. proliferatum* 3,2 mmol/l und bei *F. oxysporum* 3,5 mmol/l. Für Rutin konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle bezüglich des Wachstums festgestellt werden. Zwischen den verwendeten Pilzspezies *F. proliferatum* und *F. oxysporum* zeigte sich lediglich beim Rutin ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des IC50 Wertes. Dieser lag bei *F. oxysporum* mit 8,5 mmol/l signifikant niedriger als bei *F. proliferatum* mit 25,9 mmol/l (Tab.13). Die Abbildungen 27 und 28 zeigen den Einfluss von Rutin, p-Cumarsäure und Ferulasäure auf das Myzelwachstum von *F. oxysporum* und die BEA-Produktion in Flüssigkultur. Das mittlere Trockengewicht des Myzels in mg zeigte sich in der Rutin-Variante bei *F. oxysporum* erhöht, verglichen zu der Kontrollvariante. Ein signifikanter Unterschied konnten hier nicht aufgezeigt werden. In den Ferulasäure- und p-Cumarsäure-Varianten konnte im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant geringeres Wachstum von *F. oxysporum* nachgewiesen werden. Hinsichtlich der BEA-Konzentration zeigten die Ferulasäure- und p-Cumarsäure-Varianten nach 15 Tagen Inkubation analog zum Wachstum von *F. oxysporum* mit 180 µg/mg Myzel bzw. 200 µg/mg Myzel geringere Werte im Vergleich zur Kontrolle (250 µg/mg Myzel). Hier konnte nur ein Trend aufgezeigt werden, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten im Vergleich zur Kontrolle konnten nicht ermittelt werden ($p < 0,05$).

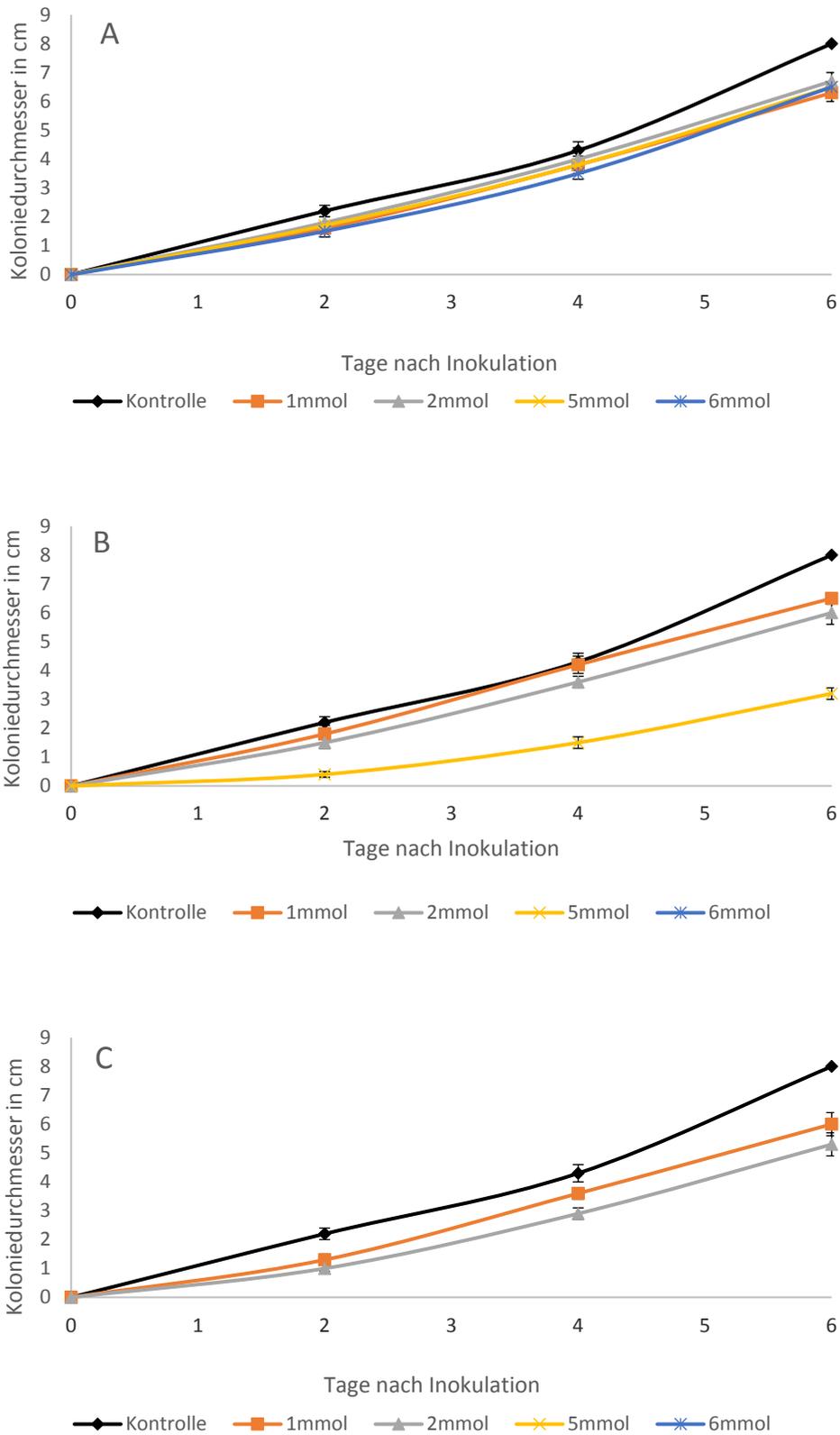


Abb.25a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Rutin (A), p-Cumarsäure (B) und Ferulasäure (C) auf das Wachstum von *F. proliferatum* (medialer Koloniedurchmesser in cm). Dargestellt ist der Mittelwert von jeweils 3 Wiederholungen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

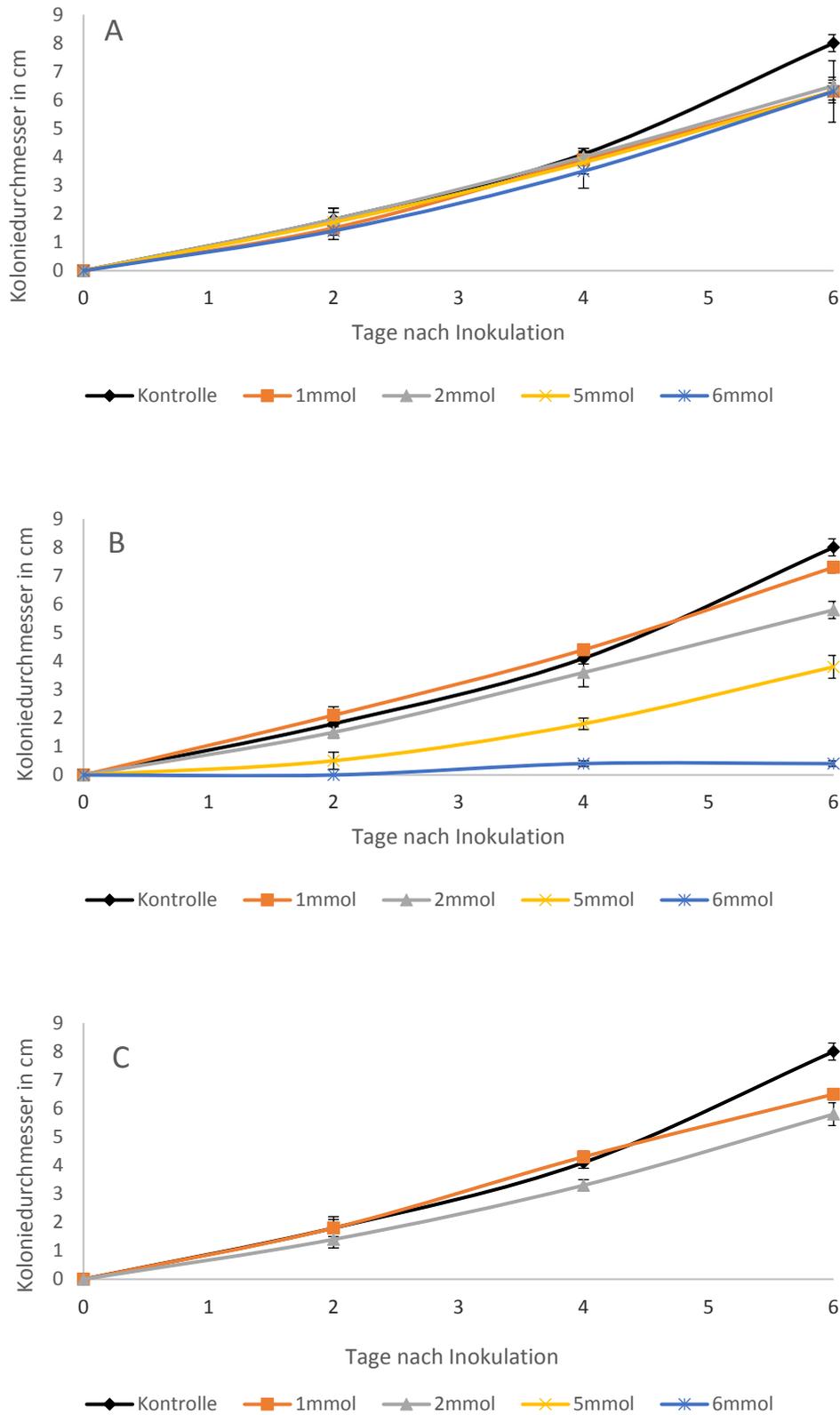


Abb.25b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Rutin (A), p-Cumarsäure (B) und Ferulasäure (C) auf das Wachstum von *F. oxysporum* (medialer Koloniedurchmesser in cm). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von jeweils 3 Wiederholungen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

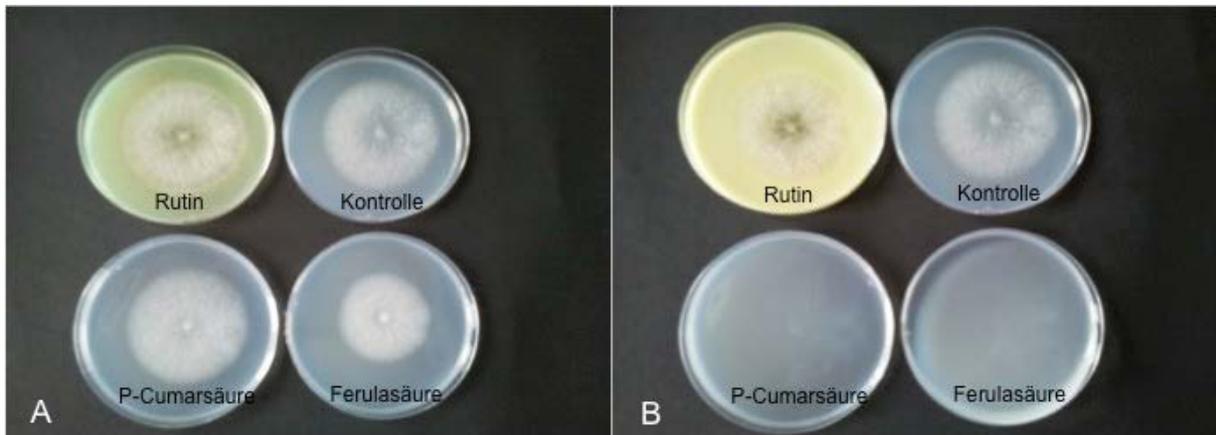


Abb.26: Die Abbildung zeigt exemplarisch das Wachstum von *F. oxysporum* in Abhängigkeit unterschiedlicher phenolischer Substanzen und Konzentrationen (A) Rutin, Kontrolle, p-Cumarsäure, Ferulasäure (2mmol). (B) Rutin, Kontrolle, p-Cumarsäure, Ferulasäure (6mmol)

Tab.13: Mittlere inhibitorische Konzentration von Rutin, p-Cumarsäure und Ferulasäure (mmol), die 50 % des Wachstums von *F. proliferatum* bzw. *F. oxysporum* in vitro hemmt.

Phenolische Verbindung	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>
Rutin	25,9	8,5
p-Cumarsäure	3,2	3,5
Ferulasäure	2,4	2,7

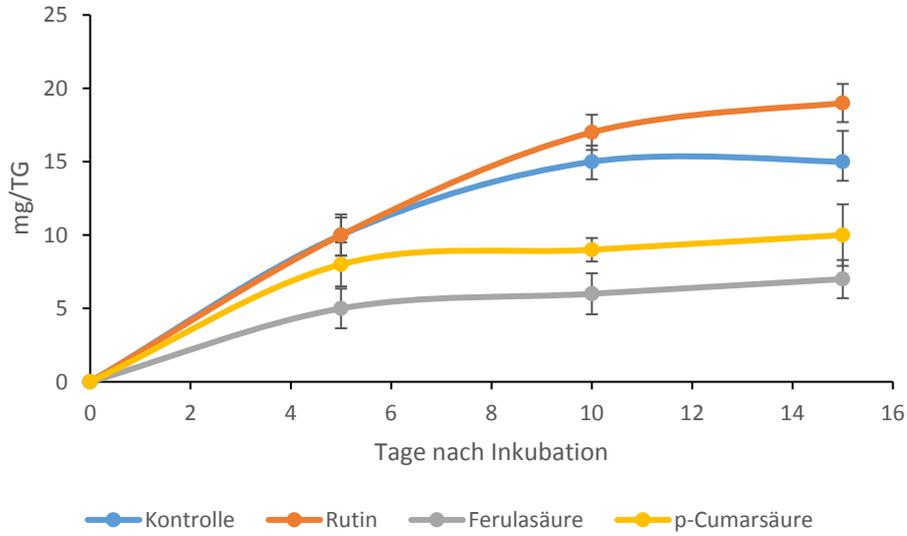


Abb.27: Einfluss von Rutin, Ferulasäure und p-Cumarsäure (1mmol) auf das Myzelwachstum von *F. oxysporum* in Flüssigkultur. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 5 Wiederholungen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

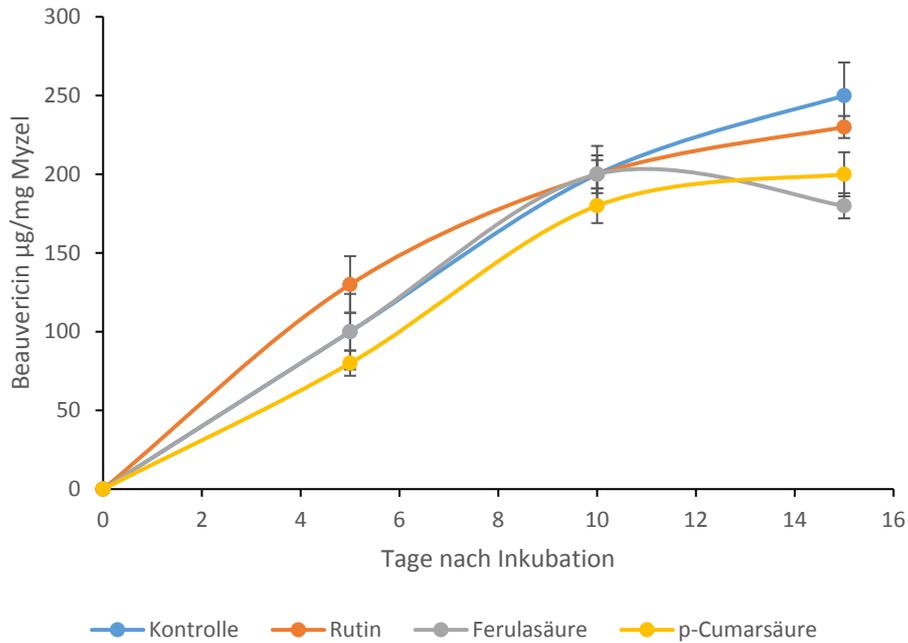


Abb.28: Einfluss von p-Cumarsäure, Ferulasäure und Rutin (1mmol) auf die Beauvericin-Produktion durch *F. oxysporum* in Flüssigkultur. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 5 Wiederholungen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

2.5 Diskussion

Es wurde der Gesamtphenolgehalt sowie der Gehalt an ausgewählten phenolischen Säuren und des Flavonoids Rutin in Bleich-, Grün- und Purpurspargel innerhalb des Lagerungsprozesses betrachtet. In den Kontrollstangen des Grün- und Purpurspargels waren signifikant höhere Gesamtphenolgehalte im Vergleich zu den Bleichspargelstangen zu beobachten. Gleiches gilt jeweils für die einzelnen Gehalte der Phenolsäure Chlorogensäure sowie dem Flavonoid Rutin. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Maeda et al. (2005); sie konnten einen höheren Gesamtphenolgehalt in Grünspargel und Purpurspargel im Vergleich zu Bleichspargel beobachten. Außerdem konnten sie eine starke Korrelation zwischen dem Gesamtphenolgehalt und dem Gehalt an Rutin in Grün- und Purpurspargel herstellen. Der hohe Rutingehalt in Grün- und Purpurspargel ist vor allem auf die unterschiedlichen Anbau- und Wuchsbedingungen im Vergleich zu Bleichspargel zurückzuführen. So wird Rutin hauptsächlich von den überirdisch geernteten Grün- und Purpurspargelstangen als UV-Schutz gebildet (Tsushida et al., 1994; Wang et al., 2003; Shou et al., 2007). Aber auch andere Faktoren scheinen den Phenolgehalt in Spargel zu beeinflussen. Dazu gehören genetische Unterschiede (Sortenwahl), Umwelteinflüsse, Erntetermine und Nacherntefaktoren wie Verarbeitung und Lagerung (Fuentes-Alventosa et al., 2008; Rodriguez-Arcos et al., 2002; Jaramillo et al., 2007; Shou et al., 2007; Maeda et al., 2005).

In allen Spargelvarianten verringerte sich der Gesamtphenolgehalt während des Lagerungsprozesses bei 2 Tagen und 22 °C um mehr als die Hälfte signifikant, bei den Grün- und Purpurspargelvarianten sank der Gesamtphenolgehalt tendenziell stärker als bei den Bleichspargelvarianten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Flavonoid Rutin den höchsten Anteil am Gesamtphenolgehalt in Grün- und Purpurspargel besitzt, im Gegensatz zu Bleichspargel. Die Gehalte an Chlorogensäure, Rutin und Ferulasäure reduzierten sich in den Grün- und Purpurspargelvarianten während der Lagerung signifikant. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen eine Abnahme des Gesamtphenolgehaltes und des Flavonidgehaltes in gelagertem Spargel beobachtet wurde (Papoulias et al., 2009).

In der Bleichspargelvariante sind hinsichtlich der einzelnen Phenolsäuregehalte im Vergleich zur Kontrolle während der Lagerung keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Insbesondere die Konzentration an Ferulasäure blieb in der Bleichspargelvariante vergleichsweise konstant. Rodriguez-Arcos et al. (2002, 2004) konnten bei Ferulasäure, im Gegensatz zu anderen phenolischen Säuren, während der Lagerung von Grün- und Bleichspargel sogar einen Konzentrationsanstieg beobachten. Ferulasäure ist wichtiger Bestandteil der Zellwand und während des Reifeprozesses und der Lagerung durch Ausbildung sogenannter Crosslinks zwischen Zellwandpolymeren maßgeblich in der Texturveränderung involviert.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Ausgangshypothese, dass ein signifikant höherer Gesamtphenolgehalt in Grün- und Purpurspargel im Vergleich zu Bleichspargel zu beobachten ist.

Ein *in vitro* Versuch sollte eruieren, inwiefern insbesondere die in Spargel häufig vorkommenden phenolischen Säuren Ferulasäure, p-Cumarsäure und Chlorogensäure sowie das Flavonoid Rutin in der Lage sind, das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* sowie die BEA-Synthese *in vitro* zu hemmen.

Die Phenolsäuren Ferulasäure und p-Cumarsäure konnten das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* signifikant hemmen. Ferulasäure inhibierte das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* bei einer Konzentration von 5 mmol und 6 mmol zu 100 %. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen früherer Untersuchungen, in denen die fungitoxischen Eigenschaften phenolischer Verbindungen bereits postuliert wurden (Siranidou et al., 2002; Beekrum et al., 2003; Zabka et al., 2013; Ponts et al., 2011; Guiraud et al., 1995). Die antimykotischen Eigenschaften phenolischer Verbindungen sind als ein multifaktorielles Geschehen anzusehen. So wird vermutet, dass phenolische Substanzen aufgrund der Fähigkeit ATP zu blocken und somit die Ergosterolsynthese zu hemmen, in der Lage sind, das Wachstum verschiedener Pilzspezies zu hemmen. Weitere Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Protonentransferstörung und eine daraus resultierende Destabilisierung des Zellmembranpotentials als Primärfaktor fungitoxischer Wirkung identifiziert werden kann (Zabka et al., 2013; Stojkovic et al., 2013; Ponts et al., 2011; Guiraud et al., 1995).

Als am stärksten fungitoxische Substanz erwies sich Ferulasäure, mit einem IC₅₀-Wert von 2,4 mmol/l bei *F. proliferatum* sowie 2,7 mmol/l bei *F. oxysporum*; p-Cumarsäure bewirkte eine geringere Hemmung mit 3,2 mmol/l bei *F. proliferatum* und 3,5 mmol/l bei *F. oxysporum*.

Ihrer unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften gemäß, werden Polyphenole in die drei Substanzklassen Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Chalkone eingeordnet. Während Rutin zu den Flavonoiden gehört, zählen Ferulasäure, p-Cumarsäure und Chlorogensäure jeweils zu den Phenolcarbonsäuren, genauer zu den Hydroxyzimtsäuren. Schon andere Untersuchungen konnten zeigen, dass Hydroxyzimtsäuren sich fungitoxischer erweisen als z.B. phenolische Säuren, die über die Benzoessäure abgeleitet werden (Guiraud et al., 1995; Ponts et al., 2011). Ein Grund für die Toxizität von p-Cumarsäure und Ferulasäure könnte ihre Bifunktionalität sein; durch die Existenz der beiden funktionellen Gruppen (Hydroxylgruppe und Carbonylgruppe) sind sie sehr reaktiv und können so Disbalancen des Zellmembranpotentials hervorrufen. Eine weitere Ursache für die pilzhemmende Wirkung könnte der Lipophilitätsgrad sein; frühere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine starke Korrelation zwischen der Toxizität von Phenolsäuren und deren lipophilen Eigenschaften besteht (Kim et al., 2007). Auch Ponts et al. (2011) konnten nachweisen, dass lipophilere phenolische Säuren das Wachstum von *F. graminearum* effektiver hemmen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen fettlösliche Eigenschaften von phenolischen Verbindungen als Primärfaktor für antimikrobielle Wirkung ausgemacht wurden (Kim et al., 2007). Ferulasäure besitzt weiterhin eine zusätzliche Methoxygruppe, die ihr zusätzlich eine erhöhte Polarität und Reaktivität verleiht. Auch in Studien von Ponts et al. (2011) konnte Ferulasäure vor p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Syringasäure das Wachstum von *F. graminearum* am effektivsten hemmen.

Das Flavonoid Rutin erwies sich am ineffizientesten bezüglich der Hemmung des Wachstums von *F. proliferatum* und *F. oxysporum*. Der IC₅₀ Wert für Rutin betrug 8,5 mmol/l für *F. oxysporum* und 25,9 mmol/l für *F. proliferatum*. Rutin ist ein Glykosid des Quercetin mit dem Disaccharid Rutinose, das sich aus Rhamnose und Glukose zusammensetzt. Die saccharidische Komponente im Rutin-Molekül ist wahrscheinlich der Schlüsselfaktor für die Ineffizienz bezüglich der Inhibierung des Pilzwachstums. Stojkovic et al. (2013) untersuchten in situ die antimykotischen Aktivitäten von p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Rutin in Hühnersuppe. Auch hier erwies sich Rutin im Vergleich zu p-Cumarsäure und Kaffeesäure am ineffizientesten. In anderen Studien wurden die Wirkung von Polyphenolen und ihrer Metabolite auf Darmbakterien untersucht. Hier hatte lediglich das Aglykon des Rutins eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *Bacteroides galacturonicus*, *Lactobacillus* sp. und *Escherichia coli*, während das Rutin entweder keinen Effekt oder sogar eine Wachstumsstimulation bei *Lactobacillus* sp. zeigte (Duda-Chodak et al., 2012).

Äquivalent zu den Wachstumsversuchen auf PDA-Medium, wurde ein Versuch in Flüssigkultur angesetzt, um den Einfluss phenolischer Substanzen auf das Myzelwachstum von *F. oxysporum* und die BEA-Produktion simultan detektieren zu können. Analog zu den Wachstumsversuchen auf PDA konnte hier eine signifikante Hemmung des Wachstums von *F. oxysporum* bei einer Konzentration von 1 mmol Ferulasäure und p-Cumarsäure im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Bezüglich der Wirkung phenolischer Säuren auf die Mykotoxinproduktion existieren widersprüchliche Ergebnisse. So zeigen die Ergebnisse von Boutigny et al. (2009), dass Ferulasäure ein effektiver Inhibitor der Typ B Trichothecenen ist, Beekrum et al. (2003) postulieren die hemmende Wirkung der FB₁-Produktion durch Ferulasäure; Ferrochio et al. (2013) differenzieren zwischen geringen Ferulasäure-Konzentrationen (1-10 mM), die jeweils die FB-Produktion von *F. verticillioides* und *F. proliferatum* stimulieren und relativ hohen Ferulasäure-Konzentrationen (> 20 mM), die die FB-Produktion hemmen. Torres et al. (2003) sowie Samapundo et al. (2007) schlagen vor, dass der Mechanismus der Inhibierung der FB-Produktion durch phenolische Komponenten mit der Inhibierung des Wachstums der jeweiligen Fusarien im Zusammenhang steht.

Die BEA-Gehalte betragen bei der Kontrolle 250 ppb, bei den Varianten, die mit p-Cumarsäure und Ferulasäure versetzt wurden, lag der BEA-Gehalt tendenziell niedriger (200 ppb und 180 ppb). Die detektierten Toxinmengen sind relativ niedrig und waren nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Möglich wäre ein Export von BEA in das extrazelluläre Medium. Lopez-Berger et al. (2013) untersuchten die BEA Produktion in Flüssigmedium und fanden dabei nur ca. 60 % des Toxins im Mycel von *F. oxysporum*, während 40 % der Gesamtkonzentration im Medium detektiert werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die in Spargel häufig vorkommenden phenolischen Säuren fungitoxische Eigenschaften aufweisen. Eine signifikante Hemmung der BEA-Synthese konnte nicht ermittelt werden.

Fazit

Die aufgezeigten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen aus Kapitel I tragen zu einem verbesserten Verständnis hinsichtlich des Einflusses von Umwelt – und insbesondere Lagerbedingungen auf den Befall mit *F. oxysporum* sowie *F. proliferatum* und der FB- sowie BEA-Synthese in Spargel bei. Nur in symptomhaften Stangen und in direkt vom Feld entnommenen Spargelstangen konnten FB nachgewiesen werden. Die für den Konsumenten relevanten Spargelstangen der Klasse Extra wiesen keine Kontamination mit FB auf. In Lagerversuchen innerhalb sowie direkt im Anschluss an die Verfahrenskette, konnten in der Betriebslagerung sowie in der anschließenden Haushaltslagerung keine signifikanten Veränderungen sowohl in der Befallsstärke mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* als auch in der FB-Kontamination festgestellt werden. In weiterführenden Analysen wurde das Untersuchungsspektrum durch das durch *Fusarium* spp. gebildete BEA erweitert. Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein erstes Auftreten von BEA in Spargel als auch eine Kokontamination mit FB nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch weitere von *Fusarium* spp gebildete Mykotoxine vorliegen. Für weiterführende Analysen wäre es folglich sinnvoll, das Untersuchungsspektrum um weitere durch *Fusarium* spp. gebildete neuere Mykotoxine, wie z. B. Enniatine, zu erweitern, um tiefere Erkenntnisse hinsichtlich der Koexistenz neuerer Mykotoxine in Spargel gewinnen zu können. Die Ergebnisse lassen weiterhin eine Assoziation zwischen pilzlicher Biomasse und FB- und BEA-Produktion vermuten. Eine direkte Korrelation zwischen *F. proliferatum* und FB konnte nicht nachgewiesen werden. Die Durchführung einer umfangreichen Korrelationsanalyse unter Berücksichtigung der an Spargel vorkommenden mykotoxinbildenden *Fusarium* spp sowie weiterer mykotoxinbildenden Pilzspezies war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen, empfiehlt sich jedoch für weiterführende Studien.

Durch den Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss der Europäischen Union (Scientific Committee on Food, SCF) wurde für FB1 allein sowie für die Summe aus FB1, FB2 und FB3 eine tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) von 2 µg/kg Körpergewicht festgelegt. Da in Deutschland kein Höchstwert von tolerierbaren Mengen in Gemüse existiert, wurde dieser für Mais und Maiserzeugnisse festgelegte Wert als Referenz herangezogen. Die aufgenommene Menge bei einem Verzehr von 0,5 kg Spargel/Tag läge für den in der vorliegenden Arbeit am höchsten detektierte FB1 Wert bei 0,07 mg. Zusammenfassend sind die in den vorliegenden Analysen detektierten FB-Mengen folglich als unbedenklich einzustufen. Für BEA wurde bisher kein Grenzwert für eine tolerierbare Tagesdosis festgelegt. Synergien und die Koexistenz mit anderen Mykotoxinen, bergen jedoch eine potentielle Gefahr. Darüberhinaus wurde im vorliegenden Untersuchungsansatz jeweils die gesamte Spargelstange verwendet. Folglich kann es aufgrund der Wasserlöslichkeit von FB und der möglichen Kompartimentierung von BEA und FB insgesamt zu einer relativ geringen Konzentration kommen, eine lokal hohe Akkumulation der Toxine lässt sich durch diese Methodik jedoch nicht ausschließen. In weiteren Untersuchungen wäre demzufolge eine Aufteilung des Mykotoxinscreenings auf die unterschiedlichen Segmente der Spargelstange anzuraten.

Lagerversuche in mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* inokulierten Varianten in Bleich-, Grün- und Purpurspargel lieferten Erkenntnisse hinsichtlich des Unterschiedes der FB- und BEA-Kontamination in den unterschiedlichen Spargelvarianten während der Lagerung sowie des FB- und BEA-Bildungspotentials zwischen den beiden unterschiedlichen Pilzspezies. Bezüglich der BEA-Kontamination in mit *F. oxysporum* und *F. proliferatum* inokulierten Spargelstangen konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Spargelvarianten beobachtet werden. Ein erwarteter Effekt, dass die Mykotoxinkontamination von Bleich- zu Grün- bis zu Purpurspargel aufgrund des höheren Gesamtphenolgehalts abnehmen, konnte nicht bestätigt werden. In den mit *F. oxysporum* inokulierten Spargelstangen konnte eine signifikant höhere BEA-Konzentration beobachtet werden im Vergleich zu denen, die mit *F. proliferatum* inokuliert waren. Die BEA-Konzentration erwies sich in allen sowohl mit *F. oxysporum* als auch in mit *F. proliferatum* inokulierten Varianten signifikant höher als die FB-Konzentration. In weiterführenden Experimenten wären Analysen auf der Transkriptomenebene interessant, um z.B. den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf der an der Synthese von BEA und FB beteiligten Schlüsselenzyme (z.B. Methyltransferasen) sowie potentielle Unterschiede in den toxigenen Pilzspezies *F. oxysporum* und *F. proliferatum* zu untersuchen.

Die Widerstandsfähigkeit einiger agrarwirtschaftlich bedeutsamer Produkte, wie z.B. Weizen oder Mais, gegenüber Infektionen mit *Fusarium* spp. korreliert mit einem hohen Anteil pflanzeigener phenolischer Substanzen. Die Ergebnisse eines Vorversuchs lieferten zunächst einen Überblick über den Gesamtphenolgehalt sowie die Konzentration einzelner phenolischer Säuren und dem Flavonoid Rutin in Bleich-, Grün und Purpurspargel sowie den Konzentrationsveränderungen während unterschiedlicher Lagerungsprozesse. Die Ergebnisse stützen die Hypothese eines signifikant höheren Gesamtphenolgehalts in Grün- und Purpurspargel im Vergleich zu Bleichspargel. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit einem signifikant höheren Auftreten des Flavonoids Rutin in Grün- und Purpurspargel. Ferulasäure erwies sich unter allen untersuchten phenolischen Verbindungen als am stärksten fungitoxisch und konnte sowohl das Wachstum von *F. oxysporum* als auch *F. proliferatum* in vitro signifikant hemmen. Die vorliegenden Ergebnisse aus Kapitel II stützen die Hypothese, dass die in Spargel vorkommenden phenolischen Verbindungen teilweise fungitoxische Eigenschaften aufweisen. Das Potential und die Nützlichkeit in vivo muss in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden.

Darüber hinaus ließ sich eine tendenzielle Hemmung der BEA-Produktion beobachten. Die Methodik zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen phenolischen Säuren auf die BEA-Produktion in vitro erwies sich jedoch als problematisch. Ein Export von BEA in das extrazelluläre Medium, welches in den Analysen nicht berücksichtigt wurde, konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Auch die generell relativ geringen BEA-Konzentrationen, die sich nahe an der Nachweisgrenze befanden und in hohen Variationen vorlagen, lassen eine allgemeine Schlussfolgerung hinsichtlich des Potentials von phenolischen Säuren die BEA-Produktion zu hemmen, nicht zu. Dies gilt es in weiteren Experimenten zu berücksichtigen.

Anhang

PDA Medium

Kartoffelstärke 4 g

Glucose 20 g

Agar 15 g

Destilliertes Wasser 1l

GYEP Medium

Dextrose 20 g

Hefeextrakt 5 g

Peptone 10 g

Destilliertes Wasser 1l

SNA (nach Nirenberg (1976))

KH_2PO_4 1,0 g

KNO_3 1,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g

KCl 0,5 g

Glucose 0,2 g

Saccharose 0,2 g

Agar-Agar 20 g

Destilliertes wasser 1l

pH-Wert 5,5

Zugabe folgender Antibiotika:

Penicillin 100 mg

Chloretetracyclin 10 mg

Streptomycinsulfat 50 mg

Komponenten und deren Zusammensetzung in der Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer (1l)

242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA

pH=8,4

Agarosegel

1% Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) in 1x TAE-Puffer + 0,28 g/l Guanosin (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe)

Laufpuffer

1x TAE-Puffer

Ladepuffer

60ml bidest. Wasser

36 ml Glycerin

Spatelspitze Bromphenolblau

¼ der Probenmenge an Ladepuffer je Probe

DNA-Größenmarker

Lamda/Pst I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Klimadaten am Standort M/S/T – Erntejahr 2010/2011

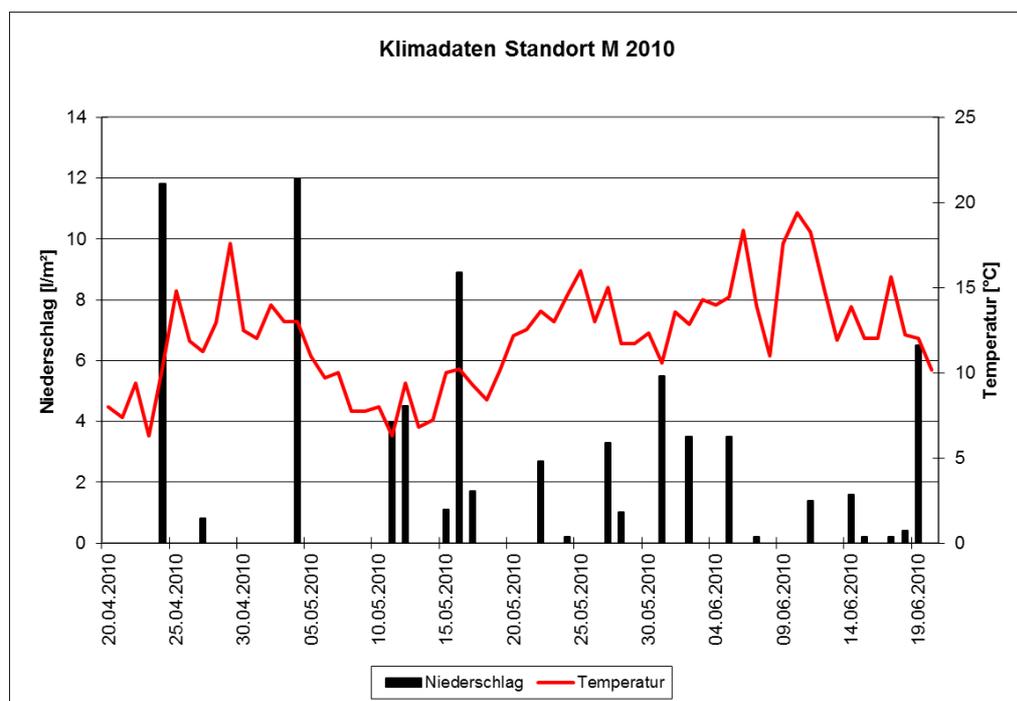


Abb.29: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen in der Erntesaison 2010 am Standort M.

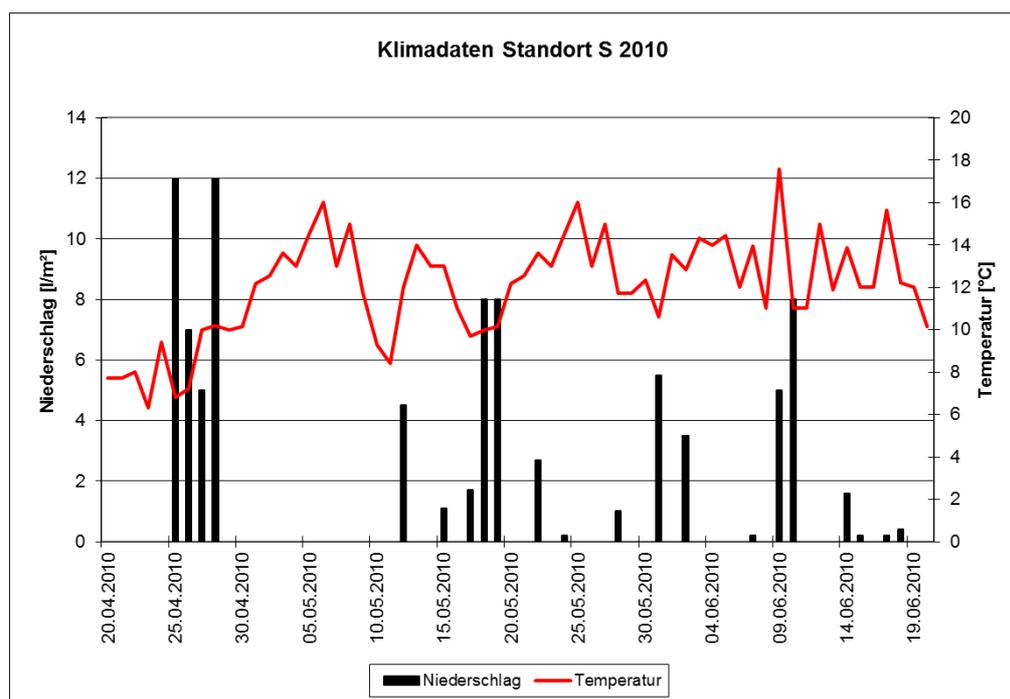


Abb.30: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen in der Erntesaison 2010 am Standort S.

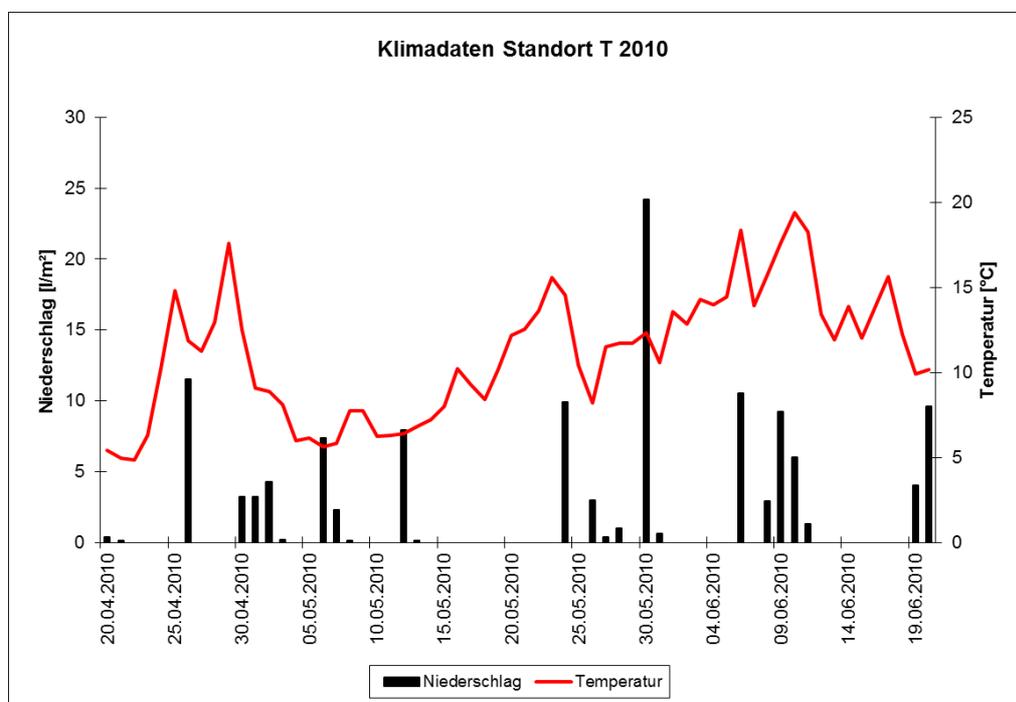


Abb.32: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen in der Erntesaison 2010 am Standort T.

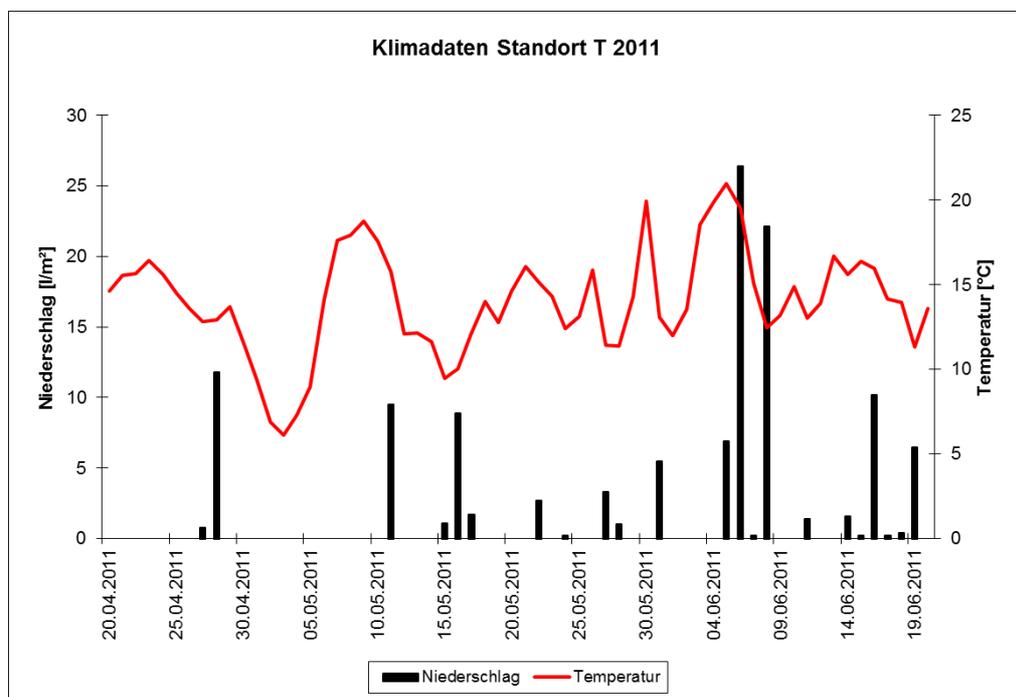


Abb.33: Mittlerer Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen in der Erntesaison 2011 am Standort T.

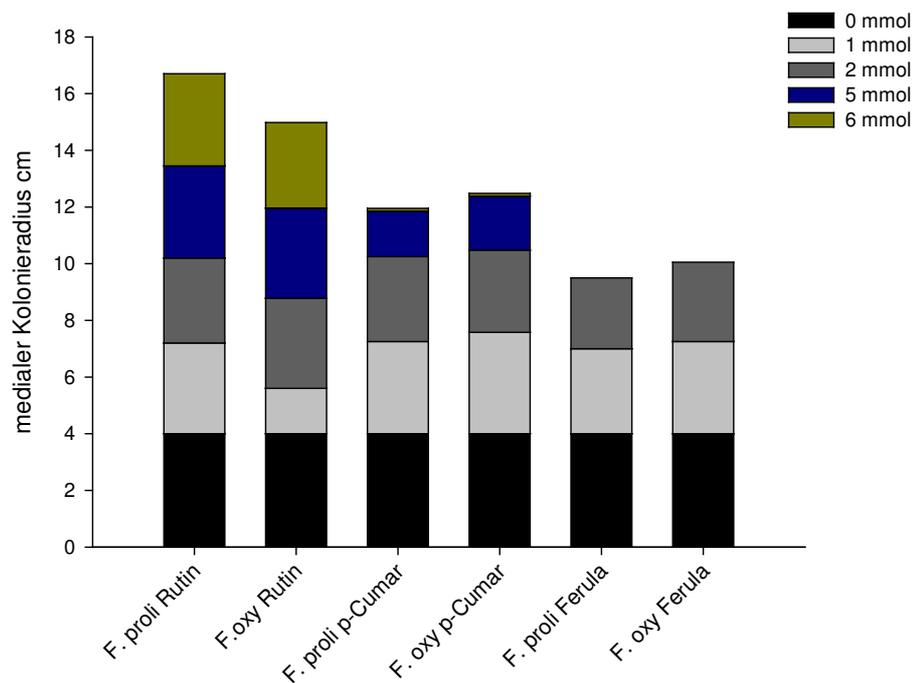
Einfluss phenolischer Verbindungen auf das Wachstum von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* in vitro

Abb.34: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Rutin, p-Cumarsäure und Ferulasäure (0, 1, 2, 5, 6 mmol) auf das Wachstum von *F. proliferatum* und *F. oxysporum* (medialer Kolonialradius in cm) *in vitro*. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des medialen Kolonialradius von jeweils 3 Wiederholungen bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Tab.14: Prozentuale Wachstumshemmung auf *F. oxysporum* und *F. proliferatum* durch unterschiedliche Konzentrationen (mmol) phenolischer Verbindungen. * signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Phenolische Verbindung	Hemmung in % <i>F. oxysporum</i>	Hemmung in % <i>F. proliferatum</i>
<i>Rutin</i>		
1 mmol	24,6	26,92
2 mmol	22,3	26,92
5 mmol	24,6	24,6
6 mmol	24,6	29,24
<i>p-Cumarsäure</i>		
1 mmol	24,6	17,64
2 mmol	30,4	30,4
5 mmol	61,7*	55,92*
6 mmol	98,8*	95,36*
<i>Ferulasäure</i>		
1 mmol	30,4	24,6
2 mmol	40,8*	33,8*
5 mmol	100*	100*
6 mmol	100*	100*

Literaturverzeichnis

- Abbas H.K., Ocamb C.M., Xie W., Mirocha C.J., Shier W.T. (1995). First report of fumonisin B₁, B₂, and B₃ production by *Fusarium oxysporum* var. *redolens*. *Plant Disease* 79: 968.
- Abbas H.K., Riley R.T. (1996a). The presence and phytotoxicity of fumonisins and AAL-toxin in *Alternaria alternata*. Erratum. *Toxicon* 34(4): 503.
- Abbas H.K., Duke S.O., Shier W.T., Riley R.T., Kraus G.A. (1996b). The chemistry and biological activities of the natural products AAL-toxin and the fumonisins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 391: 293-308.
- Abbas H.K., Cartwright R.D., Xie W., Mirocha C.J., Richard J.L., Dvorak T.J., Sciumbato G.L., Shier W.T. (1999). Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Mycopathologia* 147(2): 97-104.
- Abbas H.K., Shier W.T., Seo J.A., Lee Y.W., Musser S.M. (1998). Phytotoxicity and cytotoxicity of the fumonisin C and P series of mycotoxins from *Fusarium* spp. fungi. *Toxicon* 36(12): 2033.
- Abbas H.K., Boyette C.D., Vesonder R.F., Hoagland R.E., Krick T. (1992). Production of Fumonisins by *Fusarium moniliforme* Cultures Isolated from Jimsonweed in Mississippi. *Journal of Phytopathology* 136: 199-203.
- Adams T. H., Yu J.H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 674-677.
- Aherne S.A., O'Brien N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism, *Nutrition* 18(1): 75-81.
- Azor M., Cano J., Gené J., Guarro J. (2009). High genetic diversity and poor *in vitro* response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63 (6): 1152-1155.
- Baayen R.P., Boogert van den 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: 907-912.
- Bacon C.W., Porter J.K. and Norred W.P. (1995). Toxic interaction of fumonisin B₁ and fusaric acid measured by injection into fertile eggs. *Mycopathologica*. 129: 29 - 35.
- Bargen S., Martinez O., Schadock I., Eisolda M., Gossmann M., Büttner C., (2009). Genetic variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology* 157: 446-456.
- Beekrum S., Govinden, R., Padayachee, T., Odhav, B. (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification for fumonisin B₁. *Food Additives & Contaminants* 20: 490-493.
- Bennett J.W., Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.
- Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., De Saeger S., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J. (2013). Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research* 57(1): 165-186.
- Billau W. (1986). Untersuchungen über Lokalisation und Ausmaß der Lignifizierung in Pflanzen von *Asparagus officinalis* L. unter Berücksichtigung von Sorte, modifizierenden Umweltfaktoren und phenolischen Inhaltsstoffen. Dissertation, Universität Hohenheim.

- 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.
- Blount W.P. (1960). Disease of turkey poults. *Turkeys* 9: 52.
- Bok J.W., Keller N.P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*. 3: 527–535.
- Böning K. (1929). Die Brennfleckenkrankheit des Tabaks. *Praktische Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz* 7: 36–40.
- Bottalico A., Logrieco, A., Ritieni, A., Moretti, A. Randazzo, G., Corda, P. (1995). BEA and fumonisin B, in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Additives & Contaminants* 12: 599 – 607.
- Boutigny A.L., Richard F.F., Barreau C. (2009). Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121: 411–423.
- 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. *International Journal of Molecular Science* 9: 2306–2321.
- Branham B.E., Plattner R.D. (1993). Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Natural Products* 56: 1630–1633.
- Brash D. W., Charles, C.M, Wright, S., Bycroft B. L. (1995). Shelf-life of stored asparagus is strongly related to postharvest respiratory activity. *Postharvest Biology and Technology* 5: 77–81.
- Caldas E.D., Jones A.D., Winter, C.K., Ward B., Gilchrist D.G. (1995). Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Sphinganine Analog Mycotoxins. *Analytical Chemistry* 67: 196–207.
- Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W. and Keller N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447– 459.
- Cantwell M. (1992). Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables, In: A.A. Kader (ed.). *Postharvest technology of horticultural crops* 3311: 277–281.
- Castellá G., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4707–4710.
- Castlebury L.A., Sutherland J.B., Tanner L.A., Henderson L.A., Cerniglia C.E. (1999). Use of a bioassay to evaluate the toxicity of BEA to bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 119–121.
- Chen S.C., Lin S.C., Hsue J.C., (1980). On the study of postharvest lignification of white asparagus stalks (in Chinese, with English abstract). *Proceedings of the National Science Council* 8: 627–634.
- Chu F.S., Li G.Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 847–852.
- D’Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 69: 155–166.
- Dall’Asta C., Berthiller F. (2015). *Masked Mycotoxins in Food: Formation, Occurrence and Toxicological Relevance*. Royal Society of Chemistry.
- Dall’Asta C., Falavigna C., Galaverna G., Battilani P. (2012). Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin production. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60: 3800–3808.

- De Souza M., Sulyok M., Freitas-Silva O., Soares Costa S., Brabet C., Machinski Junior M., Leiko Sekiyama B., Azevedo Vargas E., Krska R., Schuhmacher R. (2013). Cooccurrence of Mycotoxins in Maize and Poultry Feeds from Brazil by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Scientific World Journal* 2013: 1-9.
- Deli J., Matus Z., Toth G. (2000). Carotenoid Composition in the Fruits of *Asparagus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2793-2796.
- Desjardins A. E., Proctor R. H., (2007a). Molecular biology of *Fusarium* Mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119: 47-50.
- Desjardins A. E. (2006). *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, MN.
- Dombrink-Kurtzman M.A. (2003). Fumonisin and BEA induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia* 156(4): 357-64.
- Domijan A.M. (2012) Fumonisin B(1): a neurotoxic mycotoxin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63(4): 531-44.
- 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.
- Dowd P. F. (1988). Toxicological And Biochemical Interactions of the Fungal Metabolites Fusaric Acid and Kojic Acid with Xenobiotics In *Heliothis zea* (F.) and *Spodoptera frugiperda*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 32: 123.
- Duran R.M., Cary J.W., Calvo A.M. (2007). Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 1158-1168.
- Duda-Chodak A. (2012). The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63: 497-503.
- 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. *Australasian Plant Pathology* 28: 255-261.
- Elmer W. H. (2000). Infidence 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.
- 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.
- Espada Y., Ruiz de Gopegui R., Cuadradas C., Cabanes F.J. (1994). Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. *Avian Diseases* 38: 454-460.
- Fanasca S., Roupael Y., Venneria E., Azzini E., Durazzo A., Maiani G. (2009). Antioxidant Properties of Raw and Cooked Spears of Green Asparagus Cultivars. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 1017-1023.

- Ferrochio L., Cendoya E., Farnochi M.C., Massad W., Ramirez M.L. (2013). Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology* 167(2): 215-20.
- Fox E. M., Howlett B. J. (2008). Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 481–487.
- Fredlund E., Gidlund A., Sulyok M., Börjesson T., Krska R., Olsen M., Lindblad M. (2013). Deoxynivalenol and Other Selected *Fusarium* Toxins in Swedish Oats – Occurrence and Correlation to Specific *Fusarium* Species. *International Journal of Food Microbiology* 167 (2): 276-283.
- Fuentes-Alventosa J., Jaramillo S., Rodriguez-Gutierrez G., Cermeno P., Espejo J.A., Jimenez-Araujo A., Guillen-Bejarano R., Fernandez-Bolanos J., Rodriguez-Arcos R. (2008). Flavonoid profile of green asparagus genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6977–84.
- Gamanya R., Sibanda L. (2001). Survey of *Fusarium moniliforme* (F. *verticillioides*) and production of fumonisin B1 in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 71(2-3): 145-9.
- Garcia D., Ramos A.J., Sanchis V., Marin S. (2012). Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *International Journal of Food Microbiology* 1532: 1–27.
- Gareis M., Bauer J., Thiem J., Plank G., Grabley S., Gedek B. (1990). Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*. 37(3): 236–240.
- Gareis M. (1999). Mykotoxine und Schimmelpilze. *Forschungsreport (Ernährung, Landwirtschaft, Forsten)* 2: 4–5.
- Gauthier L., Bonnin-Verdal M., Marchegay G., Pinson-Gadais L., Ducos C., Richard-Forget F., Atanasova-Penichon V. (2016). Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 221: 61-68.
- Gelderblom W. C. A., Marasas W. F. O., Vleggaar R., Thiel P. G., Cawood M. E. (1992). Fumonisins: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, 117: 11-16.
- Gelderblom W. C. A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak M.J., Vleggaar R., Kriek N.P.J. (1988). Fumonisins—novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806-1811.
- Gerlach W., Nirenberg H. (1982). The Genus *Fusarium*—a Pictorial Atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Heft 209*.
- Giorni P., Battilani P., Pietri A., Magan N. (2008). Effect of controlled atmospheres on growth and aflatoxin production in vitro and in stored maize. *International Journal of Food Microbiology* 122: 209-213.
- 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., 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 B1. *Mycotoxin Research* 24 (2): 88-97.
- Gratz S.W., Dinesh R., Yoshinari T., Holtrop G., Richardson A.J., Duncan G., MacDonald S., Lloyd A., Tarbin J. (2016). Masked trichothecene and zearalenone mycotoxins withstand digestion and absorption in the upper GI tract but are efficiently hydrolyzed by human gut microbiota in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research* 61 (4): 1-10.

- Gross S.M., Reddy R.V., Rottinghaus G.E., Johnson, G., Reddy C.S. (1994). Developmental effects of fumonisin B₁-containing *Fusarium moniliforme* culture extract in CD1 mice. *Mycopathologia* 128(1): 11–118.
- Guiraud P., Steiman R., Seigle-Murandi F., Benoitguyod J.L. (1995). Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic-compounds toward selected fungi Perfecti and fungi Imperfecti. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32: 29–33.
- Hamill R.L.; Higgins G.E.; Boaz H.E.; Gorman M. (1969). The structure of BEA, a new desipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Letters* 49: 4255–4258.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481–504.
- Hartmann H.D. (1989). Spargel - Grundlagen für den Anbau. Ulmer Verlag Stuttgart Deutschland.
- Heinl S., Hartinger D., Thamhesl M., Vekiru E., Krska R., Schatzmayr G., Moll W.D., Grabherr R. (2010). Degradation of fumonisin B₁ by the consecutive action of two bacterial enzymes. *Journal of Biotechnology* 145: 120–129.
- Hemingway R.W., Laks P.E. (1992). *Plant Polyphenols, Synthesis, Properties, Significance*. Springer, Berlin.
- Herold L. (2008): Risikoüberwachung auf *Fusarium*/Mykotoxine bei Winterweizen in Thüringen und Empfehlungen für die Vorernteuntersuchung. Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Naturschutz und Umwelt.
- Heß D. (1999). *Pflanzenphysiologie. Molekulare und biochemische Grundlagen von Stoffwechsel und Entwicklung der Pflanzen*. Eugen Ulmer Stuttgart. Deutschland.
- Hinojo M.J., Medina A., Valle-Algarra F.M., Gimeno-Adelantado J.V., Jiménez 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.
- Howard P.C., Eppley R.M., Stack M.E., Warbritton A., Voss K.A., Lorentzen R.J., Kovach R.M., Bucci T.J. (2001). Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environmental Health Perspectives* 109(2): 277–282.
- Hurst P. L.; Cheer V.; Sinclair B.K., Irving D.E. (1997). Biochemical Responses of *Aspergillus* to Controlled Atmosphere Storage at 20°C. *Journal of Food Biochemistry* 20: 463–472.
- Irzykowska L., Bocianowski J., Waśkiewicz A., Weber Z., Karolewski Z., Goliński P., Kostecki M., Witold, I. (2012). Genetic variation of *Fusarium oxysporum* isolates forming fumonisin B₁ and moniliformin. *Journal of Applied Genetics* 53(2): 237–247.
- Jaramillo S., Rodríguez R., Jimenez A., Guillen R., Fernandez-Bolanos J., Heredia A. (2007). Effects of storage conditions on the accumulation of ferulic acid derivatives in white asparagus cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 286–296.
- Jaramillo-Carmona S., Rodriguez-Arcos R., Jiménez-Araujo A., López S., Gil J., Moreno J., Guillén-Bejarano R. (2013). Saponin Profile of Wild Asparagus Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(46): 11098–11108.
- Javed T., Richard J.L., Bennett G.A., Dombink-Kurtzman M.A., Bunte R.M., Koelkebeck K.W., Cote L.M., Leeper R.W., Buck W.B., (1993a). Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B₁ or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos. *Mycopathologia* 123: 185–193.
- Jestoi M., Rokka M., Yli-Mattila T., Parikka P., Rizzo A., Peltonen K. (2004b). The presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins BEA, enniatins and moniliformin in Finnish grain samples. *Food Additives and Contaminants* 21: 794–802.

- Jørgensen L. N., Fomsgaard I. S. (2016). Correlation of Deoxynivalenol Accumulation in Fusarium-Infected Winter and Spring Wheat Cultivars with Secondary Metabolites at Different Growth Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 4545–4555.
- Juan C., Ritieni A., Mañes J. (2013b). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chemistry* 141: 747–1755.
- Kadau (2005). Untersuchungen zu qualitätsbeeinflussenden, nacherntephysiologischen und phytopathologischen Prozessen bei Convenience-Produkten während der Kurzzeitlagerung am Beispiel von Spargel (*Asparagus officinalis* L.). Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kamyar M., Rawnduzi P., Studenik C.R., Kouri K., Lemmens-Gruber R. (2004). Investigation of the electrophysiological properties of enniatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 429: 215–223.
- Keller S.E., Sullivan T.M., Chirtel S. (1997). Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 305–309.
- Keller N.P., Turner G. and Bennett J.W. (2005). Fungal secondary metabolism— from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3: 1– 11.
- Kim M.-J., Hyun J.N., Park J.C., Kim J.G., Lee S.J., Chun S.C., Chung I.M. (2007). Relation between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 4802–4809.
- King G.A., Henderson K.G., Lill R.E. (1986). Asparagus: Effect of controlled atmosphere storage on shelf-life of four cultivars. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 14(4): 421–424.
- Klarić M.S., Rumora L., Ljubanović D., Pepeljnjak S. (2008). Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B (1), BEA and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Archives of Toxicology* 82: 247–255.
- Knaflewski M., Sadowski C. (1990b). Influence of irrigation, fertilization and spacing on the healthiness of asparagus seedlings. *Acta Horticulturae* 271: 269–270.
- Koch T. (2011): Auftreten von *Fusarium* spp. und Mykotoxinen im niedersächsischen Spargelanbau – Ertragsrelevanz und determinierende Faktoren. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Kostecki M., Wisniewska H., Perrone G., Ritieni A., Golinski P., Chełkowski J., Logrieco A. (1999). The effects of cereal substrate and temperature on production of BEA, moniliformin and fusaproliferin by *Fusarium subglutinans*, *Food Additives and Contaminants* 16: 361–365.
- Kouri K., Lemmens M., Lemmens-Gruber R. (2003). BEA-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609: 203– 210.
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M., McEwen N.P., Lombaert G.A., Ng W. (1996). Approaches to the risk assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 392: 369–393.
- Lamprecht S.C., Marasas W.F.O., Alberts J.F., Cawood M.E., Gelderblom W.C.A., Shephard G.S., Thiel P.G., Calitz F.J. (1994). Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* 84: 383–391.
- Le Bars J., Le Bars P., Dupuy J., Boudra H., Cassini R. (1994). Biotic and abiotic factors in fumonizin B1 production and stability. *Journal of AOAC International* 77: 517–521.
- Leslie J. F., Plattner R. D., Desjardins A. E. and Klittich C. J. R. (1992). Fumonisin B1 production by strain from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Phytopathology* 82: 341 – 345.

- Leslie J. F. and Summerell B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Ltd, UK.
- Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kosteci M., Golinski P., Ritieni K., Chelkowski J. (1998). BEA Production by *Fusarium* Species. *Applied Environmental Microbiology* 64(8): 3084–3088.
- Lind A., Smith T., Saterlee T., Calvo A., Rokas A. (2016). Regulation of Secondary Metabolism by the Velvet Complex Is Temperature-Responsive in *Aspergillus*, G3 – Genes Genomes Genetics 6(12): 4023–4033.
- Lindblad M., Gidlund A., Sulyok M., Börjesson T., Krska R., Olsen M., Fredlund, E. (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat – occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 167: 284–291.
- Liu C., Xu W., Liu F., Jiang, S. (2007). Fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolates isolated from asparagus crown. *Mycopathologia* 164: 127–134.
- Logrieco A., Rizzo A., Ferracane R., Ritieni A. (2002). Occurrence of BEA and Enniatins in Wheat Affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. *Applied Environmental Microbiology* 68(1): 82–85.
- Logrieco A., Moretti A., Altomare C., Bottalico A., Carbonell Torres E. (1993). Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia* 22: 85–190.
- Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109 (7): 645–667.
- López-Berges M.S., Hera C., Sulyok M., Schäfer K., Capilla J., Guarro J., Di Pietro A. (2013). The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Microbiology* 87(1): 49–65.
- Luangsaard J., Berkaew P., Ridkaew R., Hywel-Jones N., Isaka M. (2009). A BEA hot spot in the genus *Isaria*. *Mycological Research* 113(12): 1389–1395.
- Maeda, T., Kakuta, H., Sonoda, T., Motoki, S., Ueno, R., Suzuki, T., Oosawa, K. (2005). Antioxidation capacities of extracts from green, purple, and white asparagus spears related to polyphenol concentration. *HortScience* 40: 1221–1224.
- Magan N., Hope R., Colleate A., Baxter E.S. (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108: 685–690.
- Magnoli C.E., Saenz M.A., Chiacchiera S.M., Dalcero A.M. (1999). Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 145 (1): 35–41.
- Makris D.P., Rossiter J.T. (2001). Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(7): 3216–22.
- Malachova A., Dzuman Z., Veprikova Z. (2011). Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, and enniatins: the major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59: 12990 – 12997.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L. (2004). Polyphenols - Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727–747.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 230–242.

- Mandeel Q. (2006). Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. *Journal of Basic Microbiology* 466: 480–494.
- Marasas W.F. (1996). Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 392: 1–17.
- Marin S., Homedes V., Sanchis V., Ramos A.J., Magan N. (1999). Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. *International Journal of Production Research* 35: 15–26.
- Martinez-Lopez O. (2007). Pathogenität und Toxizität von *Fusarium* spp. an *Asparagus officinalis* L. und Differenzierung zweier initialer Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges. Diplom-Arbeit, Institut für Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Mattila P., Hellström J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 152–160.
- McKenzie M.J., Greer, L.A., Heyes, J.A., Hurst, P.L. (2004). Sugar metabolism and compartmentation in asparagus and broccoli during controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* 32: 45–56.
- Meca G., Ruiz M.J., Fernandez-Franzón M., Ritieni A., Manes J. (2010). Isolation, purification, LC-MS/MS characterization and reactive oxygen species induced by fumonisin B₁ in VERO cells. *Food and Chemical Toxicology* 48(10): 2891–2897.
- Meca G., Zhou T., Li X.Z., Mañes J. (2013). BEA degradation during bread and beer making. *Food Control* 34: 1 – 8.
- Medina A., Schmidt-Heydt M., Cárdenas-Chávez L., Parra R., Geisen R., Magan N. (2013). Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B1 and B2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *Journal of the Royal Society Interface* 10: 1–12.
- Merrill A.H., Sullards M.C., Wang E., Voss K.A., Riley R.T. (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives* 109: 283–289.
- Mielke H. (2000). Studien über den Pilz *Claviceps purpurea* (Fries) Tulane unter Berücksichtigung der Anfälligkeit verschiedener Roggensorten und der Bekämpfungsmöglichkeiten des Erregers. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Berlin Dahlem.
- Mikušová P., Srobarova A., Sulyok M. and Santini A., (2013). *Fusarium* fungi and associated metabolites presence on grapes from Slovakia. *Mycotoxin Research* 29: 97–102.
- Mladenka P., Zatloukalova L., Filipsky T., Hrdina R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 963–975.
- Monti S. M., Fogliano V., Logrieco A., Ferracane R., Ritieni A. (2000). Simultaneous determination of BEA, enniatins and fusaproliferin by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3317–3320.
- Moretti A., Logrieco A., Bottalico A., Ritieni A., Randazzo G., Corda P. (1995). BEA production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Research* 99: 282–286.
- Moretti A., Belisario A, Tafuri A, Ritieni A, Corazza L, et al. (2002). Production of BEA by different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, the *Fusarium* wilt agent of muskmelon. *European Journal of Plant Pathology* 108: 661–666.

- Moretti A., Mule, G., Ritieni, A., Logrieco A. (2007). Further data on the production of BEA, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex International Journal of Food Microbiology 118(2): 158–163.
- Munkvold G.P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology 109: 705–713.
- Muñoz K., Schmidt-Heydt M., Stoll D., Diehl D., Ziegler J., Geisen R., Schaumann G.E. (2015). Effect of plastic mulching on mycotoxin occurrence and mycobiome abundance in soil samples from asparagus crops. Mycotoxin Research 31: 191–201.
- Musser S.M., Plattner R.D. (1997). Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygamai*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 1169–1173.
- Myung K., Li S., Butchko R.A., Busman M., Proctor R.H., Abbas H.K., Calvo A.M. (2009). *FvVE1* regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(11): 5089–94.
- Nardini M., Daquino M., Tomassi G., Gentili V., Difelice M., Scaccini C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. Free Radical Biology & Medicine 19: 541 – 552.
- Nazari F., Sulyok M., Kobarfard F., Yazdanpanah H., Krska R. (2015). Evaluation of emerging *Fusarium* mycotoxins BEA, enniatins, Fusaproliferin and moniliformin in domestic rice in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 14: 505–512.
- Nishie K., Cutler H.G., Cole R.J. (1989). Toxicity of trichothecenes, moniliformin, zearalenone/ol, griseofulvin, patulin, PR toxin and rubratoxin B on protozoan tetrahymena pyriformis. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 65(2): 197–210.
- Nutz S., Döll K., Karlovsky P. (2011). Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 401(2): 717–26.
- O'Donnell K., Gueidan C., Sink S., Johnston P.R., Crous P.W., Glenn A., Riley R.T., Zitomer N.C., Colyer P., Waalwijk C., Lee T., Moretti A., Kang S., Kim H.-S., Geiser D.M., Juba J.H., Baayen R.P., Cromey M.G., Bithell S., Sutton D.A., Skovgaard K., Ploetz R., Corby Kistler H., Elliott M., Davis M., Sarver B.A. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics and Biology 46: 936–948.
- Paciolla C., Dipierro N., Mule G., Logrieco A., Dipierro S. (2004). The mycotoxins BEA and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts. Physiological and Molecular Plant Physiology 65: 49–56.
- Papoulias E., Siomos A., Koukounaras A., Gerasopoulos D., Kazakis E. (2009). Effects of Genetic, Pre- and Post-Harvest Factors on Phenolic Content and Antioxidant Capacity of White Asparagus Spears. International Journal of Molecular Science 10(12): 5370–5380.
- Pavlovkin J., Mistríková I., Luxová M., Mistrík I. (2006). Effects of BEA on root cell transmembrane electric potential, electrolyte leakage and respiration of maize roots with different susceptibility to *Fusarium*. Plant, Soil and Environment, 52: 492–498.
- Pavlovkin J., Mistríková I., Jašková K., Tamás L. (2012). Impact of BEA on membrane properties of young initial leaves of maize with different susceptibility to *Fusarium*. Plant, Soil and Environment 58(5): 205–210.
- Ponts N., Pinson-Gadais L., Boutigny A. L., Barreau C., Richard-Forget, F. (2011). Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. Phytopathology 101: 929–934.

- Prosperini A., Juan-García A., Font G., Ruiz M.J. (2013). BEA-induced cytotoxicity *via* ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells, *Toxicology Letters* 222(2): 204–211.
- Ramirez M.L., Pascale M., Chulze S. (1996). Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids growth in Argentina, *Mycopathologia* 135: 29.
- Reyes-Velázquez W.P., Figueroa-Gómez R.M., Barberis M. (2011). *Fusarium* species (section *Liseola*) occurrence and natural incidence of BEA, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Research* 27: 187.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., van Schalkwyk D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82: 353–357.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2101–2105.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20(7): 933–938.
- Ritieni A., Moretti A., Logrieco A., Fogliano V. (1997). Occurrence of Fusaproliferin, Fumonisin B1 and BEA in Maize from Italy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(10): 4011–4016.
- Rodríguez-Arcos R.C., Smith A.C., Waldron K. (2004). Ferulic Acid Crosslinks in Asparagus Cell Walls in Relation to Texture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(15): 4740–4750.
- Rodríguez-Arcos R., Smith A., Waldron K. (2002). Effect of Storage on Wall-Bound Phenolics in Green Asparagus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11): 3197–3203.
- Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 571–581.
- Samapundo S., B. De Meulenaer, D. Osei-Nimoh, Y.B. Lamboni, J.M. Debevere and F. Devlieghere (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology* 24: 465–473.
- Samapundo S., F. Devlieghere, B. De Meulenaer, A.H. Geeraerd, J.F. Van Impe and J.M. Debevere (2005). Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology* 105: 35–52.
- Sandhya S. (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT – Food Science and Technology* 43: 381–392.
- Santos L., Kasper R., Gil-Serna J., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2010). Effect of Capsicum carotenoids on growth and ochratoxin A production by chilli and paprika *Aspergillus* spp. isolates. *International Journal of Food Microbiology* 142: 354–359.
- Scheer C. (2002). Spargelqualität im Produktions- und Aufbereitungsprozess. Dissertation, TU Berlin.
- Seefelder W., Gossmann M., Humpf H.U. (2002). Analysis of fumonisin B(1) in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2778–2781.
- Seo J.-A., Kim C.J., Lee Y.W. (1996). Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products* 59: 1003–1005.
- Shim W.B., Woloshuk C.P. (2001). Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1607–1612.

- Shimshoni J.A., Cuneah O., Sulyok M., Krska R., Galon N., Sharir B., Shlosberg, A., (2013). Mycotoxins in corn and wheat silage in Israel. *Food Additives and Contaminants* 30: 1614–1625.
- Shou S., Lu G., Huang X. (2007). Seasonal variation in nutritional components of green asparagus using the mother fern cultivation. *Scientia Horticulturae* 112(3): 251–257.
- Shwab E.K., Keller N.P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research* 112: 225–230.
- Sifou A., Meca G., Serrano A.B., Mahnine N., El Abidi A., Mañes J., El Azzouzi M., Zinedine A. (2011). First report on the presence of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), BEA and fusaproliferin in rice on the Moroccan retail markets. *Food Control* 22: 1826–1830.
- Siranidou E., Kang Z., Buchenauer H. (2002). Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* Head Blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200–208.
- Smith J.E., Lewis C.W., Anderson J.G., Solomons, G.L. (1994). *Mycotoxins in Human Nutrition and Health* Directorate – General XII Science, Research and Development.
- Song H.H., Lee H.S., Jeong J.H., Park H.S., Lee C. (2008). Diversity in BEA and Enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* isolated from potato. *International Journal of Food Microbiology* 122 (3): 296–301.
- Sosa-Coronel J., Vest G., Herner R.C. (1976). Distribution of fiber content in asparagus cultivars. *HortScience* 11: 149–151.
- Stahl W., van den Berg H., Arthur J. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 23: 39–100.
- Stepien Ł., Koczyk G., Waśkiewicz A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics* 52: 487–496.
- Stoev S.D., Denev S.A. (2013). Porcine/Chicken or Human Nephropathy as the Result of Joint Mycotoxins Interaction. *Toxins* 5(9): 1503–1530.
- Stojković D., Petrović J., Soković M., Glamočlija J., Kukić-Marković J., Petrović S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(13): 3205–3208.
- Streit E., Schwab C., Sulyok M., Naehrer K., Krska R., Schatzmayr G. (2013). Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins* 5: 504–523.
- Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry* 119: 408–416.
- Sydenham E.W., Shephard G.S., Stockenström S., van der Merwe M. (1997). Production of Fumonisin B Analogues and Related Compounds by *Fusarium globosum*, a Newly Described Species from Corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (10): 4004–4010.
- Thiel P.G., Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Shephard G.S., Gelderblom W.C.A. Nieuwenhuis J.J. (1991). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1089–1093.
- Tiveron A.P., Melo P.S., Bergamaschi K.B., Vieira T., Regitano-d'Arce M., Alencar S.M. (2012). Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. *International Journal of Molecular Science* 13(7): 8943–8957.

- Tomoda H., Huang X.-H., Cao J., Nishida H., Nagano R., Okuda S. (1992). Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *Journal of Antibiotics* 45: 1626–1632.
- Torres A.M., Ramirez M.L., Arroyo M., Chulze S.N., Magan N. (2003). Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 83(3): 319–324.
- Tsushida T., Suzuki M., Kurogi, M. (1994). Evaluation of antioxidant activity of vegetable extracts and determination of some active compounds. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 41(9): 611–618.
- Ueno Y., Nakajima M., Sakai K., Ishii K., Sato N., Shimada N. (1973). Comparative toxicology of trichothecene mycotoxins: Inhibition of protein synthesis in animal cells. *Journal of Biochemistry* 74: 285–296.
- Ueno Y., Nakayama K., Ishii K., Tashiro F., Minoda Y., Omori T., Komagata K. (1983). Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium* sp. strain 114–2. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 120–127.
- Uhlig S., Ivanova L. (2004). Determination of BEA and four other enniatins in grain by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1050(2): 173–178.
- Uhlig S., Jestoi M., Parikka P. (2007). *Fusarium avenaceum* – the North European situation. *International Journal of Food Microbiology* 119(1–2): 17–24.
- Villanueva-Suárez M., Redondo-Cuenca A., Rodriguez-Sevilla M., Heredia-Moreno A. (1999). Postharvest Storage of White Asparagus (*Asparagus officinalis* L.): Changes in Dietary Fiber (Nonstarch Polysaccharides) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(9): 3832–3836.
- 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: 242–255.
- Waalwijk C., Koch S.H., Ncube E. (2008). Quantitative detection of *Fusarium* spp. and its correlation with fumonisin content in maize from South African subsistence farmers. *World Mycotoxin Journal* 1: 39–47.
- Wang E., Norred W.P., Bacon C.W., Riley R.T., Merrill A.H. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 14486–14490.
- Wang M., Tadmor Y., Wu Q.L., Chin C.K., Garrison S.A., Simon J.E. (2003). Characterization and quantification of major steroidal saponins and flavonoids in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6132–6136.
- Waskiewicz A., Irzykowska L., Karolewski Z., Bocianowski J., Kostecki M., Golinski P., Knaflewski M., Weber Z. (2008). *Fusarium* spp. and mycotoxins present in asparagus spears. *Cereal Research Communications* 36: 405–407.
- Waśkiewicz A., Stępień Ł. (2012). Mycotoxins biosynthesized by plant-derived *Fusarium* isolates. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63: 479–488.
- Waśkiewicz A., Goliński 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 & Contaminants* 27: 608–615.
- Waśkiewicz A., Irzykowska L., Drzewiecka K., Bocianowski J., Dobosz B., Weber Z., Karolewski Z., Krzyminiewski R., Goliński P. (2013). Plant-pathogen interactions during infection process of asparagus with *Fusarium* spp. *Central European Journal of Biology* 8: 1065–1076.

- Wańkiewicz A., Stępień Ł., Wilman K., Kachlicki P. (2013). Diversity of pea-associated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* populations revealed by *FUM1* sequence analysis and fumonisin biosynthesis. *Toxins* 5: 488–503.
- Watzl und Rechkemmer (2001). Phenolsäuren, *Ernährungs-Umschau* 48 (2001) Heft 1.
- Weber Z., Kostecki M., von Bargen S., Gossmann M., Wańkiewicz A., Bocianowski J., Knaflewski M., Büttner C., Goliński P. (2006). *Fusarium* species colonizing spears and forming mycotoxins in field samples of asparagus from Germany and Poland. *Journal of Phytopathology* 154: 209–216.
- Weidenbörner, M. (1999). *Lebensmittel-Mykologie*. Hamburg: Behr's Verlag.
- Wiemann P., Brown D.W., Kleigrew K., Bok J.W., Keller N.P., Humpf H.U., Tudzynski B. (2010). FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular Microbiology* 77: 972–994.
- Windels, C.E. (2000). Economic and social impacts of fusarium head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. *Phytopathology* 90(1):17-21.
- 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.
- Xu Y., Orozco R., Kithsiri Wijeratne E.M., Gunatilaka A.L.L., Stock S.P., Molnár I. (2008). Biosynthesis of the Cyclooligomer Depsipeptide BEA, a Virulence Factor of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria Bassiana*, *Chemistry & Biology* 15(9): 898-907.
- Young J. C., Zhou T., Yu H., Zhu H., Gong J. (2007). Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology* 45: 136–143.
- Yu J.-H., Keller N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 43: 437–458.
- Zabka M., Pavela R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93(6): 1051–1056.
- Zhang W., Franco C., Curtin C., Conn S. (2004). To Stretch the Boundary of Secondary Metabolite Production in Plant Cell-Based Bioprocessing: Anthocyanin as a Case Study, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (5): 264–271.
- Zinedine A., Meca G., Mañes J., Font G. (2011). Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), fusaproliferin and BEA in raw cereals commercialized in Morocco. *Food Control* 22(1): 1–5.

Danksagung

- Vielen Dank -

Prof. Dr. Hans-Michael Poehling für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die Übernahme des Referats.

Prof. Dr. Petr Karlovsky für die Bereitschaft das Korreferat zu übernehmen und die vielfältige Unterstützung.

Dr. Henning von Alten für die Betreuung während der gesamten Projektlaufzeit.

Prof. Dr. Edgar Maiss für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Prof. Dr. Hartmut Stützel für die Bereitschaft als weiterer Prüfer zu fungieren.

Dr. Philip Kössler für die Unterstützung bei den Mykotoxinanalysen sowie die geduldige Klärung zahlreicher Fragen.

Andre Specht für die Unterstützung bei den Phenolanalysen am Institut für Pflanzenernährung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Phytomedizin für die angenehme gemeinsame Zeit. Insbesondere Natalie Röder und Yvonne Koleczek für die tatkräftige Unterstützung im Labor sowie Christopher Bradatsch für die zahlreichen Fach- und Privatgespräche.

Allen Spargelbauern, die mir das Probenmaterial zur Verfügung gestellt haben.

Diese Dissertation wurde im Rahmen des vom Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur geförderte Verbundprojekt „Qualitätsgerechte Pflanzenproduktion unter veränderten Rahmenbedingungen: Mykotoxine im Kontext von Produktion, Qualität und Verarbeitung“ angefertigt.