

Erarbeitung eines Testverfahrens zur Bestimmung der Protektiv- und Kurativleistung von Fungiziden bei der Bekämpfung des Erregers der *Stemphylium*-Laubkrankheit *Stemphylium botryosum* in der Spargelkultur (*Asparagus officinalis* L.)

Stephanie Zapf · Kristin Klappach · Judit Pfenning · Michael K. Ernst

Eingegangen: 15. Juli 2011 / Angenommen: 7. August 2011 / Online publiziert: 2. September 2011
© Springer-Verlag 2011

Zusammenfassung Das Laub des Gemüsespargels *Asparagus officinalis* L. hat eine große Angriffsfläche für Laubkrankheiten, wodurch Ertragseinbußen, vor allem durch den Erreger der *Stemphylium*-Laubkrankheit, *Stemphylium botryosum*, verursacht werden können. Die Gesundheit des Laubes stellt eine wichtige Voraussetzung für die Ertragsbildung im Folgejahr dar. Daher besteht die Notwendigkeit, die Wirkung derzeit zugelassener Pflanzenschutzmittel auf *S. botryosum* zu beschreiben, um Fungizidbehandlungen optimieren zu können.

Im Rahmen von Gewächshausversuchen mit Spargelsämlingen, sollte eine Methode entwickelt werden, um die Protektiv- und Kurativleistung von Fungiziden zu bewerten.

Zu Beginn mussten stabile, wiederholbare und homogene *S. botryosum*-Infektionen im Gewächshaus erzielt werden. Hierzu wurden die Faktoren Pflanzenalter (Wochen nach Aussattermin), Inokulum (Konidiendichte/ml und Malzkonzentration), Infektionsbedingung (Dauer hoher relativer Luftfeuchtigkeit) und Boniturzeitpunkt (Tage nach Infektion) sowie der Einfluss auf die Infektionsausprägung untersucht. Mit Ausnahme des Faktors Pflanzenalter, zeig-

ten die getesteten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Infektion. Für die Versuche zur Bewertung von Fungiziden wurden die zuvor untersuchten Faktoren vorab festgelegt. Das Pflanzenalter betrug sechs Wochen nach Aussattermin, das Inokulum wies $1,00 \times 10^5$ Konidien/ml und eine Malzkonzentration von 0,5 % Malz auf, als Infektionsbedingung wurde das „Tunnelsystem“ mit periodisch hoher rLF gewählt. Als Boniturtage wurde der Zeitpunkt 13 Tage nach Infektion festgelegt. Die Fungizide wurden mit 1/5 der registrierten Aufwandmenge appliziert. Die Versuche zur Bewertung von Fungiziden wurden mit den Pflanzenschutzmitteln Signum® und Rovral® WG sowie zwei Versuchsmitteln durchgeführt. Die Pflanzen wurden an vier aufeinanderfolgenden Applikationsterminen protektiv und kurativ behandelt und im weiteren Verlauf die prozentuale Befallsstärke am Stängel bonitiert. Zusätzlich wurden die verwendeten *S. botryosum*-Isolate molekularbiologisch auf Mutationen bezüglich QoI- und SDHI-Resistenz untersucht.

Schlüsselwörter Spargel · *Asparagus officinalis* L. · *Stemphylium botryosum* · Fungizide · Protektive Wirkung · Kurative Wirkung · *Stemphylium*-Laubkrankheit

S. Zapf (✉) · J. Pfenning
Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Fachgebiet
Gemüsebau, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Straße 25,
70599 Stuttgart, Deutschland
E-Mail: steffi.zapf@web.de

K. Klappach
Agrarzentrum BASF SE, Unternehmensbereich Pflanzenschutz
Globale Forschung, Global Development/LCM Management,
BASF SE, Abteilung APR/FA-LI470, 67117 Limburgerhof,
Deutschland

M. K. Ernst
Staatsschule für Gartenbau und Landwirtschaft,
Emil-Wolff-Straße, 70593 Stuttgart-Hohenheim, Deutschland

Development of a Method to Evaluate the Preventive and Curative Efficacy of Fungicides Against *Stemphylium Botryosum*, Causal Pathogen of *Stemphylium* Leaf Spot on Asparagus (*Asparagus Officinalis* L.)

Abstract The foliage of *Asparagus officinalis* L. has a large contact surface for different leaf diseases, which can lead to profits cuts, especially by the causal pathogen of *Stemphylium* leaf spot, *Stemphylium botryosum*. The

maintaining healthy of the foliage is an important precondition to achieve an optimal harvest in the following year. Therefore, it is necessary to describe the efficacy of currently approved plant protection products against *S. botryosum* in order to optimize the fungicide applications. In the context of greenhouse trials with asparagus seedlings a method should be developed to evaluate the preventive and curative efficacy of fungicides. At the beginning, stable, repeatable and homogeneous infections of *S. botryosum* needed to be achieved. Ad hoc the factors plant age (weeks after sowing date), inoculum (density of conidia per ml and concentration of malt), infection conditions (period of high relative humidity) and day of rating, as well as their influence on the occurrence of the symptoms, were investigated. With the exception of the factor plant age, the other factors had a significant effect on the infection. For the trials to evaluate the efficacy of fungicides, the analysed factors were defined. The age of the seedlings was six weeks after sowing, the inoculum was composed of $1,00 \times 10^5$ conidia per ml combined with an 0,5% malt concentration, as infection condition the “tunnel system” with periodically high relative humidity was chosen. 13 days past infection was the optimal day of rating. To apply the seedlings with the fungicides, the registered application rate was reduced to 1/5. The trials to evaluate fungicides were conducted with the fungicides Signum[®], Rovral[®] WG and two different testing agencies. At four consecutive application days, the plants were covered with fungicides. In the following, the infestation degree of stems in percent was evaluated. Additionally, the used *S. botryosum*-isolates were biomolecularly investigated and the QoI- and SDHI resistance state determined.

Keywords Asparagus · *Asparagus officinalis* L. · *Stemphylium botryosum* · Fungicides · Preventive efficacy · Curative efficacy · Stemphylium leaf spot

Einleitung

Spargelpflanzen sind der Menschheit seit dem Altertum als Delikatess- und Heilpflanze bekannt (Hartmann 1989; Wonneberger und Keller 2004; Krug et al. 2002) und gelten heute als ein begehrtes, saisonales Stängelgemüse.

Im Verlauf ihrer Anbauzeit werden Spargelpflanzen von verschiedenen biotischen und abiotischen Faktoren beeinflusst und geschädigt. *Stemphylium botryosum* zählt neben *Puccinia asparagi* (Spargelrost), *Fusarium culmorum* (Fußkrankheit) und *Botrytis cinerea* (Grauschimmel) zu den wichtigsten Lauberkrankungen des Spargels (Crüger et al. 2002). Diese Krankheiten bedingen einen frühzeitigen Phyllokladienfall, ein Absterben des Laubes und folglich

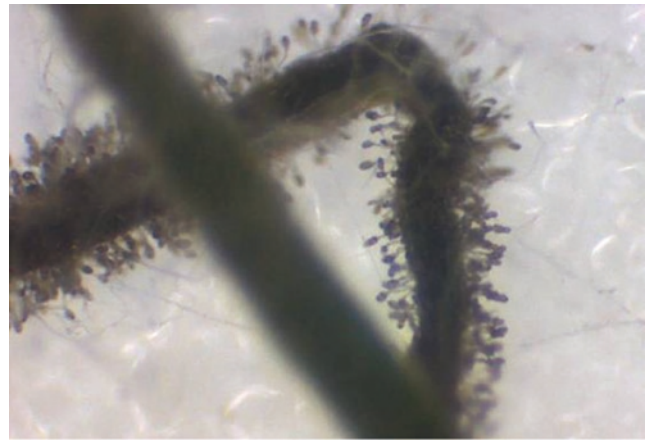


Abb. 1 *S. botryosum*-Konidien an Spargellaub, mikroskopische Aufnahme im Durchlicht

eine Reduktion der Assimilationsleistung, sowie der Speicherung von Reservestoffen (Leuprecht 2000).

S. botryosum bezeichnet die anamorphe Form des Ascomyceten *Pleospora herbarum* (Pers. ex Fr.) Rabenh. (Meredith 1965; Falloon et al. 1987). Neben Spargel befällt *S. botryosum* Kulturen wie Luzerne, Klee, Zwiebel oder Tomate (Leuprecht 1990; Webster und Weber 2007). Der Befall zeigt sich an vielen Kulturen in Form von Blattflecken (Neubauer 1998).

Mit der Hauptfruchtform überwintert *S. botryosum* an den in der Anlage verbleibenden, abgestorbenen Resten des Spargellaubs (Krug et al. 2002) in Form von Pseudothecien (schwarze, rundliche Fruchtkörper) (Webster und Weber 2007). Aus den Pseudothecien werden im Frühjahr Ascosporen ausgeschleudert, die als Primärinokulum das neu austreibende Spargellaub infizieren (Neubauer 1997). Die asexuelle Verbreitung über Konidien (Abb. 1) dient der Massenausbreitung und der Epidemieentwicklung innerhalb eines Bestandes und einer Vegetationsperiode (Neubauer 1997). Ab Juli erscheinen an den Spargeltrieben durch Konidieninfektionen entstandene erste, kleine, elliptische Flecken (Größe: 2 bis 5 mm) mit braunem zum gesunden Gewebe hin scharf abgegrenzten Geweberand und auffallend hellem Zentrum (Vogel 1996) (Abb. 2).

Voraussetzungen für einen hohen Befallsdruck und eine erfolgreiche *S. botryosum*-Konidieninfektion des Spargellaubes sind mittlere Temperaturen von 15 °C und eine Blattnässedauer von 24 h (Leuprecht 1990, 1991; Neubauer 1997). Bei mittleren Tagestemperaturen höher 20 °C reicht eine Blattnässedauer von 12 h für Infektionen aus.

Die Ertragsrelevanz von *S. botryosum* unterliegt der Stärke und dem zeitlichen Auftreten des Befalls (Neubauer 2000). Erste Fungizidbehandlungen zur Bekämpfung von pilzlichen Krankheiten sollten je nach Witterung meist drei bis vier Wochen nach dem Austrieb der Spargelpflanze (Rose 2010) oder ab einem Befallsniveau von mehr als

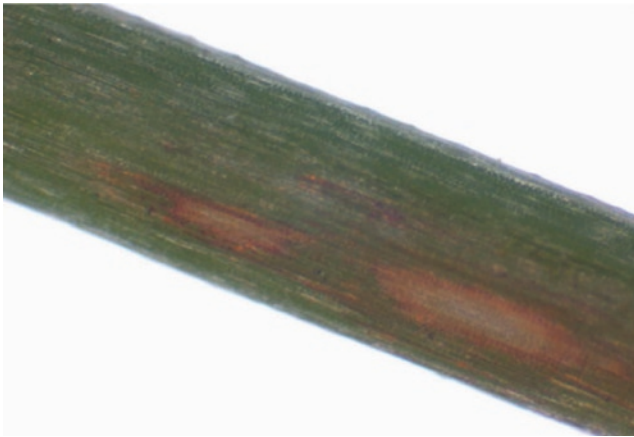


Abb. 2 Typisches Befallssymptom von *S. botryosum* am Spargelstängel, mikroskopische Aufnahme im Durchlicht

50 % durchgeführt werden, da hier mit Laubverlusten zu rechnen ist (Crüger et al. 2002; Neubauer 1997; Ziegler in Brückner et al. 2008).

Zur Bekämpfung von Laubschäden steht dem Anbauer eine Auswahl an Fungiziden zur Verfügung. Um deren erfolgreichen Einsatz zu gewährleisten, ist die Charakterisierung des biologischen Profils Grundvoraussetzung.

Es wurden Versuche zur Methodikentwicklung für eine Infektion (nachfolgend: Methodikversuche) und zur Bewertung der Wirkung von ausgewählten Fungiziden (nachfolgend: Fungizidversuche) unter Gewächshausbedingungen durchgeführt.

Material und Methoden

Sämlingsanzucht

Alle Gewächshausversuche wurden mit der Spargelsorte Ravel durchgeführt. Die Spargelsamen waren mit Thiram gebeizt. Es wurden zehn Spargelsamen pro Topf (Firma Pöppelmann, Serie TERRA TO13D, Durchmesser 13,0 cm, Höhe 10,4 cm, Fassungsvermögen 0,88 l, Substrat: kompostierter, stark lehmiger Sand und Spezialsubstrat der Firma Floragard, mit einem homogenen Mischungsverhältnis von 1:1) ausgesät.

Nach der Aussaat wurden die Töpfe in eine Klimakammer mit einer mittleren Temperatur von 19 °C gestellt und bis Beginn der Keimung mit Doppelstegplatten abgedeckt. Die Pflanzen wurden nach Bedarf gegossen; während der Jungpflanzenanzucht mit Leitungswasser, ab Versuchsbeginn mit einer 0,3 %-ige Dünger-Leitungswasserlösung (Mehrnährstoffdünger Kamasol® brillant Blau 8+8+6).

S. botryosum-Isolierung und Anzucht

Zur Isolierung und Anzucht von *S. botryosum* wurde Pseudothecien-tragendes Spargellaub (2009) und frisch infiziertes Spargellaub (2010) verwendet. Sowohl befallene Stängel als auch Phyllokladien wurden zur Isolierung von Konidienmaterial genutzt.

Befallenes Pflanzenmaterial (2 cm lange Stücke) wurde nach vollständiger Trocknung mit Natriumhypochlorid (14 % Aktivchlor), 1:4 Verdünnung mit Reinstwasser (versetzt mit Tween® 80 (Polysorbat 80), 10 Tropfen/l) oberflächendesinfiziert (30 s). In zwei Wachsgängen wurde das Pflanzenmaterial mit Reinstwasser gespült. Danach wurde das Pflanzenmaterial in eine feuchte Kammer gelegt, mit Parafilm verschlossen und in einem vollständig klimatisierten Pilzanzuchtraum auf ein Klimaregal gestellt (mittlere Temperatur: 24 °C, 12 h direkte Beleuchtung mit Weißlicht und Nah-UV-Licht (UV-A) sowie indirekt durch Tageslicht).

Nach eintretender Sporulation (maximal: 48 h) wurden Einzelkonidienisolate hergestellt und für zwei Wochen und auf 2 %-ige Malzagarplatten angezogen (Abb. 3).

Zwei Wochen vor den jeweiligen Inokulationsterminen wurden 2 %-ige Malzagarplatten (ohne Streptomycin-Zusatz) mit *S. botryosum*-Konidien angeimpft und zur Anzucht auf die Klimaregale im Pilzanzuchtraum gestellt.

Inokulum

Für die Methodikversuche wurden fünf Konidien suspensionen mit folgender Konidiendichte [K/ml] und Malzkonzentration [%] getestet: $0,25 \times 10^5$ K/ml, 0,5 % Malz; $0,25 \times 10^5$ K/ml, 1,0 % Malz; $0,50 \times 10^5$ K/ml, 0,5 % Malz; $0,50 \times 10^5$ K/ml, 1,0 % Malz; $1,00 \times 10^5$ K/ml, 0,5 % Malz.

Für die Fungizidversuche wurde die Konidien suspension $1,00 \times 10^5$ K/ml, 0,5 % Malz gewählt.

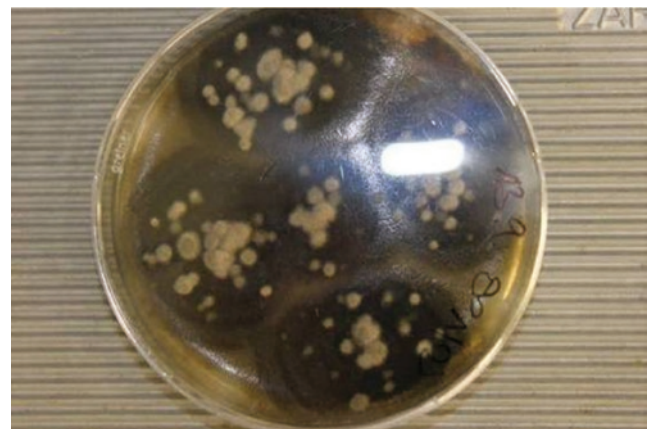


Abb. 3 Zehn Tage alte *S. botryosum*-Anzuchtplatte

Zur Inokulation wurden die Spargelsämlinge mit einem Glassprüher bis zum Run-off (5 ml/Topf) besprüht.

Pflanzenalter und Triebauswahl

In den Methodikversuchen wurden drei Laubalterstufen miteinander verglichen: fünf (jung), sechs (mittel) und sieben (alt) Wochen nach Aussaattermin. Die Pflanzen aller drei Laubalterstufen wurden zur selben Zeit inokuliert und bonitiert. Zur Versuchsdurchführung wurden lediglich die Primärtriebe, die zuerst aus dem Saatkorn aufgelaufenen Triebe, bewertet und die Befallsstärke am Stängel in [%] geschätzt. Die Phyllokladien wurden bei der Bonitur nicht berücksichtigt.

Für die Fungizidversuche wurden Pflanzen sechs Wochen nach Aussaattermin verwendet und ebenfalls nur die Primärtriebe bonitiert.

Infektionsbedingungen

Im Rahmen der Methodikversuche wurden zwei Infektionsbedingungen mit unterschiedlicher Dauer hoher relativer Luftfeuchte (rLF) getestet:

Permanente Infektionsbedingungen: „Nebelkammer“

In der Nebelkammer (Abb. 4) herrschte eine mittlere Temperatur von 21 °C und eine fortlaufend rLF von 85 %.

Periodische Infektionsbedingungen: „Tunnelsystem“

Auf einer mit Folie bespannten Tischkonstruktion wurde ein zeitgesteuertes Nebelgerät, bestehend aus einem Defensor und einem darauf angebrachten T-förmigen Plastikrohr (Abb. 5), platziert. Der Tunnel wurde morgens einseitig geöffnet und abends geschlossen. Die Pflanzen konnten



Abb. 4 Nebelkammer kurz nach dem Sprühen der Nebeldüsen

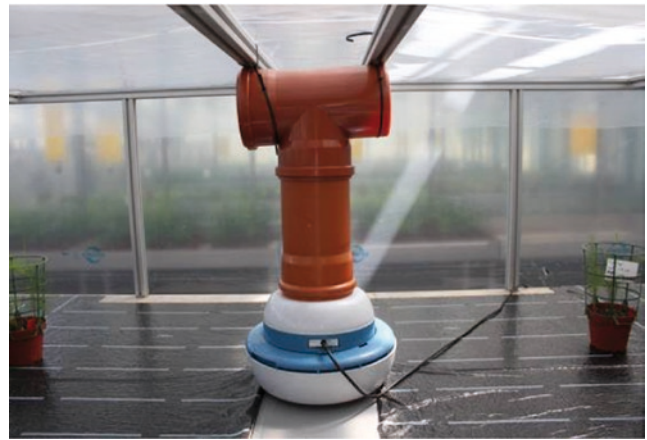


Abb. 5 Tunnelsystem: Nebelgerät bestehend aus Defensor und T-förmigen Abwasserrohr

über Tag abtrocknen. Die mittlere Temperatur im Tunnel betrug 20 °C, die rLF lag im Mittel bei 65 % (Abb. 6).

Für die Durchführung der Fungizidversuche wurde eine Klimakammer auf die periodischen Infektionsbedingungen des Tunnelsystems eingestellt.

Fungizide

In den Fungizidversuchen wurden vier Fungizide auf ihre protektive und kurative Wirkung untersucht. Getestet wurden die Fungizide Signum® (Wirkstoffe: Boscalid und Pyraclostrobin), Versuchsmittel 1 (Wirkstoffe: Epoxiconazol und Prochloraz), Rovral® WG (Wirkstoff: Iprodion) und Versuchsmittel 2 (Wirkstoff: Dithianon). Zur besseren Differenzierung zwischen den Testprodukten wurde die verwendete Aufwandmenge auf 1/5 der registrierten Fungizid- aufwandmenge eingestellt.

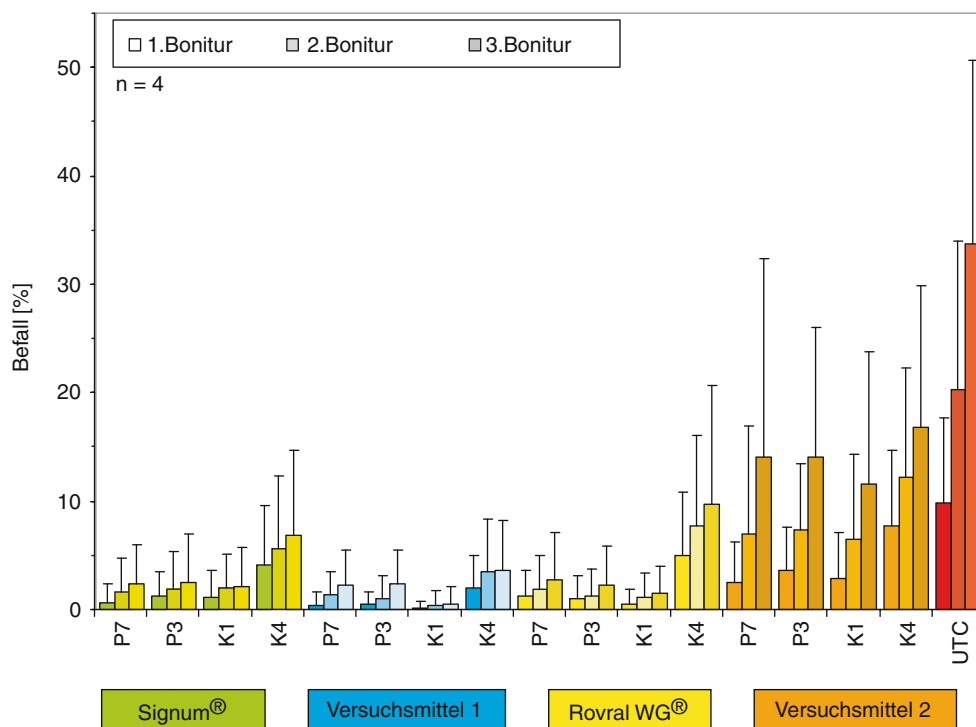
Versuchsdesign

Die Versuche wurden als randomisierte vollständige Blockanlage angelegt. Pro Block trat jede Behandlung einmal auf. Jeder Block stellt eine echte Wiederholung dar. Die Randomisierung wurde für jeden Block getrennt durchgeführt.

Molekularbiologische Untersuchung

Mittels DNA-Extraktion, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Pyrosequenzierung wurde der Status der im Gewächshaus verwendeten *S. botryosum*-Isolate bezüglich QoI-Resistenz (Mutation: G143A) und SDHI-Resistenz (Mutation: H272R und P225L) molekularbiologisch auf Punktmutationen untersucht.

Abb. 6 Mittlerer *S. botryosum*-Befall [%] in Abhängigkeit des Fungizides und des Behandlungstermins (7 d vor künstlicher Inokulation (P7), 3 d vor künstlicher Inokulation (P3), 1 d nach künstlicher Inokulation (K1), 4 d nach künstlicher Inokulation (K4)) an drei Boniturtagen. UTC=unbehandelte Kontrolle. n=4: Anzahl der Versuchsdurchführungen. Die Standardabweichung ist in das Balkendiagramm eingetragen



Ergebnisse

Ergebnisse zur Methodikentwicklung für eine Infektion unter Gewächshausbedingungen

Die Untersuchungen ergaben, dass zwischen den drei getesteten **Laubalterstufen**: jung, mittel und alt keine Unterschiede bestanden. Bei der Bonitur 13 Tage nach Infektion [dpi] wurde an jungem Laub eine Befallsstärke von 70 % bonitiert, an mittel altem Laub von 78 % und an altem Laub von 80 %.

Bei den verschiedenen **Konidiensuspensionen** konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Bei der höchsten getesteten Konidiendichte ($1,00 \times 10^5$ K/ml), kombiniert mit einer Malzkonzentration von 0,5 % war bei der Bonitur 13 dpi eine Befallsstärke von 78 % zu verzeichnen. Bei Kombination der niedrigsten getesteten Konidiendichte ($0,25 \times 10^5$ K/ml) mit gleicher Malzkonzentration (0,5 %) wurde lediglich eine Befallsstärke von 42 % erreicht. Stieg die Malzkonzentration der geringsten Konidiendichte von 0,5 % auf 1,0 %, stieg die Befallsstärke auf 53 %. Hier zeigt sich ein deutlicher Einfluss der ansteigenden Konidiendichte und Malzkonzentration auf die Befallsstärke.

Die getesteten **Infektionsbedingungen** hatten einen deutlichen Einfluss auf die Befallsstärke. Im Tunnelsystem trat ein höherer Befall auf als bei permanent hoher rLF in der Nebelkammer. Bei den Spargelsämlingen im Tunnelsystem wurde 13 dpi eine mittlere Befallsstärke von 78 % erreicht, in der Nebelkammer stieg die Befallshöhe dagegen im Mittel lediglich auf 58 %. In der Nebelkammer traten

an den Spargelsämlingen zusätzlich Schadsymptome durch Nässestress auf.

Es lässt sich in allen Methodikversuchen ein deutlicher Anstieg der Befallshöhen von *S. botryosum* über den **Boniturzeitraum** von acht Tagen (Boniturtage: 6, 8, 10 und 13 dpi) erkennen. Erste Befallssymptome traten ab dem fünften Tag nach der Inokulation auf. Die Versuche zeigten, dass frühestens zu diesem Zeitpunkt erste Boniturerhebungen möglich waren. Bis zur dritten Bonitur, 10 dpi, war ein deutlicher Anstieg des Befalls zu verzeichnen. Der Infektionsverlauf flachte zwischen den Bonituren 10 dpi und 13 dpi ab. Als optimaler Zeitpunkt für die Bonitur wurde 13 dpi festgelegt.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Methodikversuchen wurden für die Durchführung der Fungizidversuche die Testbedingungen wie folgt festgelegt:

- Pflanzenalter: 6 Wochen nach Aussattermin
- Inokulum: 1×10^5 K/ml, 0,5 % Malz
- Infektionsbedingungen: Tunnelsystem
- Bonitur: 13 dpi

Ergebnisse zur Bewertung der Wirkung von ausgewählten Fungiziden unter Gewächshausbedingungen

Zur Bewertung der Protektiv- und Kurativleistung wurden die vier getesteten Fungizide zu folgenden vier Terminen appliziert:

- Applikation 7 d protektiv vor künstlicher Inokulation (P7)

- Applikation 3 d protektiv vor künstlicher Inokulation (P3)
- Applikation 1 d kurativ nach künstlicher Inokulation (K1)
- Applikation 4 d kurativ nach künstlicher Inokulation (K4)

Versuchsmittel 1 zeigte sowohl bei protektiver als auch bei kurativer Behandlung die höchste Wirkung zur Bekämpfung von *S. botryosum*. Bei der dritten Bonitur wurde bei Applikation K1 lediglich eine Befallsstärke von 0,54 % erreicht. Signum® und Rovral® WG zeigten bei protektiver Behandlung sowohl eine hohe Wirkung als auch Stabilität im Wirkungsverhalten, lagen jedoch hinsichtlich der Gesamtwirkung niedriger als Versuchsmittel 1. In der dritten Bonitur bei Applikation K1 erreichte Signum® mit 2,14 % die niedrigste Befallsstärke und somit die höchste Wirkung. Die mit Rovral® WG behandelten Spargelsämlinge zeigten in der dritten Bonitur, ebenfalls bei Applikation K1, mit 1,50 % die niedrigste Befallsstärke. Signum® zeigt bei Applikation P7 eine stärkere Wirkung als Rovral® WG. Zeitnaher an der Inokulation appliziert, bei Behandlung P3 und K1, erwies sich Rovral® WG als effektiver. Versuchsmittel 2 hatte in den vorliegenden Versuchen sowohl im protektiven als auch kurativen Bereich die geringste Wirkung gegenüber *S. botryosum*. Bei Applikation P7 erreichte der Befall in der dritten Bonitur eine Höhe von 14,05 %, bei Applikation P3 eine Höhe von 14,09 %, bei Applikation K1 eine Befallsstärke von 11,42 %.

Im späten kurativen Bereich, 4 d nach künstlicher Inokulation (K4), wiesen übereinstimmend alle getesteten Fungizide eine geringe Gesamtwirkung auf.

Molekularbiologische Untersuchung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Isolate wurden auf das Vorhandensein der wichtigsten Punktmutationen, die zu Resistenzen gegenüber Qo- und SDH-Inhibitoren führen können, untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tab. 1 dargestellt.

Die getesteten Isolate waren hinsichtlich der SDHI-Resistenz sensitiv und entsprachen dem Wildtyp. Die Bekämpfung durch den Wirkstoff Boscalid ist nach wie vor gewährleistet.

Tab. 1 Auflistung der untersuchten Genabschnitte, der entsprechenden Codons, der Punktmutation und der daraus resultierenden Resistenz sowie dem Resistenzstatus der untersuchten Isolate

Ort der Mutation/ Gene	Codon	Punktmutation	Resistenz	Resistenzstatus der Isolate
Cytochrom <i>bc</i> ₁	143	G143A	QoI-Resistenz	Resistent
<i>sdhB</i>	272	H272R/Y	SDHI-Resistenz	Sensitiv
<i>sdhB</i>	225	P225L	SDHI-Resistenz	Sensitiv

Die nachgewiesene Mutation G143A wies bei allen getesteten Isolaten auf eine vorhandene Resistenz gegen QoI-Fungizide (Strobilurine) hin.

Diskussion

Ergebnisse zur Methodik für eine Infektion unter Gewächshausbedingungen

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass für zuverlässige und wiederholbare Infektionen der Pflanzen mit *S. botryosum* unter Gewächshausbedingungen wichtige Einflussfaktoren berücksichtigt werden müssen. Neben dem Inokulum selbst waren es vor allem die Klimabedingungen während der Infektions- und Inkubationszeit. Entgegen der Beobachtungen aus der Praxis, dass das **Laubalter** einen Einfluss auf die Infektionsausprägung hat, zeigt sich in den Gewächshausversuchen kein Einfluss. Jedoch muss beachtet werden, dass die verwendeten Spargelsämlinge in den Gewächshausversuchen nicht mit Spargelpflanzen einer etablierten Praxisanlage zu vergleichen sind und die Epidemiologie, die zu den Beobachtungen führt, nicht abbildet. Jüngst entwickeltes Laub einer Spargelpflanze etabliert sich vermehrt in den äußeren Bereichen der Laubzone (Leuprecht, mündl. Mitteilung Juni 2010). Physiologisch älteres Laub befindet sich deutlich im Inneren der Laubwand und ist somit einem feuchteren Mikroklima ausgesetzt. Es trocknet schlechter ab, bleibt länger feucht und bietet optimale Bedingungen für einen erfolgreichen Infektionsbeginn.

Versuche verschiedener **Konidiensuspensionen** zeigten, dass sich eine erhöhte Konidiendichte und eine hohe Malzkonzentration positiv auf die Befallsstärke und die Symptomausprägung auswirken. *S. botryosum* ist ein fakultativer Parasit, der Kohlenhydrate seines Wirtes als Nahrungsquelle erschließen muss. Unter Versuchsbedingungen dient die Zugabe von Malz der Unterstützung des Pilzes nach der Inokulation in zeitigen Phasen und verlängert die Lebensfähigkeit des Pilzes, unabhängig von eigenen natürlichen Reserven. Die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Infektionen kann somit gezielt erhöht werden. Aufgrund dieser Aspekte wurde eine Malzlösung mit einer Konzentration von 0,5 % ausgewählt. Bei Verwendung einer 1 %-igen Malzkonzentration besteht die Gefahr, dass die Befallsstärke unnatürlich stark zunimmt. Der Befall wäre zu artifiziell.

Analog zu Ergebnissen, die in der Literatur beschrieben sind, benötigt *S. botryosum* feucht-warme Bedingungen, wie sie beispielsweise nach Wärmegewittern gegeben sind (Aldenhoff 2007). Bezüglich dieser Thematik wurden zwei verschiedene **Infektionsbedingungen** zur Dauer der Feuchtigkeitsperiode nach der Inokulation miteinander verglichen. Es wurde die Hypothese geprüft, dass sich bei permanent hoher rLF der *S. botryosum*-Befall stärker etabliert.

Deutlich wurde jedoch, dass das Pilz-Spargel-System bei periodischem Wechsel zwischen hoher und niedriger rLF ein höheres Befallsniveau erreicht und, neben stabileren Infektionen, auch deutlich ausgeprägtere Symptome zeigt. Unter Feldbedingungen ist der Erreger kaum über eine längere Dauer einer permanent feucht-warmen Witterung ausgesetzt. Eine Erklärung ist, dass die Infektionsbedingungen mit periodischem Wechsel der rLF mit den natürlichen Umweltbedingungen des Pilzes besser übereinstimmen.

Ergebnisse zur Bewertung der Wirkung von ausgewählten Fungiziden unter Gewächshausbedingungen

Die getesteten Fungizide gehörten den Wirkstoffgruppen der Demethylase-Inhibitoren (DMI; (Epoconazol und Prochloraz in Versuchsmittel 1), Quinone-oxid-Inhibitoren (QoI; Pyraclostrobin in Signum®), Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren (SDHI; Boscalid in Signum®), Dicarboxamiden (Iprodion in Rovral® WG) und den Multi-Site-Inhibitoren (Dithianon in Versuchsmittel 2) an.

Das **Versuchsmittel 1** enthält die kurativ systemisch und lokosystemisch wirkenden Wirkstoffe Epoconazol und Prochloraz. Bereits etablierte Pilzstrukturen können durch die Hemmung der Ergosterolbiosynthese in pilzlichen Erregern wirkungsvoll bekämpft und jegliche Wachstumsvorgänge, d. h. auch nach kurativer Applikation gestoppt werden.

Die in **Signum®** enthaltenen Wirkstoffe Boscalid und Pyraclostrobin (Rose 2010) können frühe Entwicklungsstadien sowie etablierte Stadien gezielt bekämpfen. Sporenkeimung, Keimschlauchausbildung, Myzelwachstum und Sporulation werden gestoppt. Die Wirkstoffe hemmen die pilzliche mitochondriale Atmungskette. Die Energieproduktion des Pilzes wird unterbunden. Bei protektivem und kurativem Einsatz führte Signum® in den Gewächshausversuchen zu einer erfolgreichen *S. botryosum*-Bekämpfung. Hierdurch bestätigten sich die Erfahrungen aus der Praxis, dass vor allem der protektive Einsatz von Signum® in den vergangenen Jahren einen hohen Wirkungsgrad erzielt (Rose 2010).

Die kurative Wirkung von Signum® fiel niedriger als erwartet aus. Dies kann durch die festgestellte QoI-Resistenz der verwendeten *S. botryosum*-Isolate gegenüber dem kurativ wirkenden Pyraclostrobin erklärt werden.

Der in **Rovral® WG** enthaltene Wirkstoff Iprodion erreicht durch seine protektiv-lokosystemische Wirkungsweise (Rose 2010) eine hohe Gesamtwirkung zur Bekämpfung von *S. botryosum*. Die fast marginale, aber dennoch vorhandene, leicht höhere Wirkung von Rovral® WG im Vergleich mit Signum® lässt sich mit der verminderten Leistung von Signum® gegenüber den QoI-resistenten Isolaten erklären.

Versuchsmittel 2 ist ein Kontaktfungizid mit ausschließlich protektiver Wirkung. Hierbei fällt die vergleichsweise gute Wirkung im Rahmen der K1-Applikation auf. Eine Erklärung ist, dass 24 h nicht ausreichen, um unter den getesteten Bedingungen im Gewächshausversuch Kurativbedingungen zu schaffen. Die 24 h nach der künstlichen Inokulation vorherrschenden pilzlichen Strukturen sind auch durch einen kurativ nicht wirksamen Wirkstoff noch vergleichsweise gut zu bekämpfen.

Molekularbiologische Untersuchung

Alle zur Isolation des Pilzes verwendeten Pflanzenteile stammten aus Spargelertragsanlagen. Die im Spargelanbau eingesetzten single-site-Inhibitoren der Klassen der QoIs und SDHIs tragen ein intrinsisches Resistenzrisiko. Für die Klasse der QoIs zeigten sich bereits weltweit Resistenzen in landwirtschaftlich bedeutsamen Krankheiten wie zum Beispiel *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Plasmopora viticola*, *Mycosphaerella graminicola* oder *Alternaria solani* (FRAC 2010).

Da es sich bei der Strobilurin-Resistenz um eine disruptive Resistenz handelt, kommt es zu einem totalen Wirkungsverlust aufgrund von Veränderungen des molekularen Targets durch das Auftreten von Punktmutationen (Hallmann et al. 2009). Aufgrund der nachgewiesenen hohen QoI-Resistenz muss davon ausgegangen werden, dass strobilurinhaltige Fungizide nur auf Standorten Wirkung zeigen, deren Populationen nicht vollständig resistent sind.

Bei dem Succinat-Dehydrogenase-Inhibitor Boscalid können Resistenzen ebenfalls über Punktmutation entstehen. Die Isolate, die in den Gewächshausversuchen verwendet wurden, zeigten keine SDHI-Resistenz. Der genaue Herkunftsort der verwendeten Isolate ist nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die Proben aus jüngeren Spargelanlagen stammen, die noch keinem, über Jahre andauernden Fungizideinsatz mit dieser Wirkstoffklasse ausgesetzt waren. Zudem gibt es regionale Unterschiede in der Schnelligkeit der Resistenzentwicklung.

Um Resistenzentwicklungen vorzubeugen oder ihr Auftreten zu verzögern, ist unter anderem eine genaue Bestimmung der Spritztermine wichtig. Behandlungstermine und Mittelwahl sollten sich nach infektionsfördernden Witterungsbedingungen richten. Da die Resistenzentwicklung durch häufige Anwendung bereits gefährdeter Pflanzenschutzmittel gefördert wird, ist ein Wirkstoffwechsel zur Resistenzvermeidung unabdingbar (Rose 2010). Generell sollten Produkte der gleichen Wirkstoffgruppe im Spargelanbau nicht öfter als zweimal pro Saison Anwendung finden (Neubauer 2000; Rose 2010) und exakt an Infektionsereignisse ausgerichtet sein. Es sollte protektiv appliziert werden. Je später kurativ wirkende Produkte eingesetzt werden, desto stärker wird der Selektionsdruck auf die Erregerpopu-

lation. Das Risiko für Resistenzentwicklungen gegenüber einzelnen Wirkstoffen steigt. Ist ein Befall in einer Spargelanlage bereits erkennbar, sollten Azol-Fungizide zum Einsatz kommen (Rose 2010). Resistenzen gegenüber Azolen beruhen auf quantitativen Mechanismen, dem sogenannten „shifting“ (FRAC 2010), einem graduellen und langsamen Wirkungsverlust. Durch gewissenhaften Einsatz von Pflanzenschutzmitteln kann Resistenzen vorgebeugt und entgegengewirkt werden.

Danksagung Mein Dank gilt Kristin Klappach für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit, Judit Pfenning und Michael Ernst für die außerordentliche Betreuung sowie allen weiteren helfenden und unterstützenden Personen.

Literatur

- Aldenhoff S (2007) Laubkrankheiten in Spargel. Spargel- Erdbeerprofi 9(2):26
- Brückner B, Geyer M, Ziegler J (2008) Spargelanbau. Grundlagen für eine erfolgreiche Produktion und Vermarktung. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Crüger G, Backhaus GF, Hommes M, Smolka S, Vetten H-J (2002) Pflanzenschutz im Gemüsebau, 4. Aufl. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Falloon P et al (1987) Etiology and epidemiology of *Stemphylium* leaf spot and purple spot of asparagus in California. *Phytopath* 77(3):407–413
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) (2010) <http://www.frac.info>. http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Code_List_2010.pdf. Zugegriffen: 15. Mar. 2011
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Tiedemann A von (2009) Phytomedizin, Grundwissen Bachelor, 2. Aufl. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Hartmann HD (1989) Spargel. Grundlagen für den Anbau. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Krug H, Liebig H-P, Stützel H (2002) Gemüseproduktion. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Leuprecht B (1990) *Stemphylium botryosum* Wall: an Spargel. *Ges Pfl* 42(6):187–191
- Leuprecht B (1991) Untersuchungen zu den Spritzterminen bei *Stemphylium botryosum* Wallroth. *Gemüse* 27(3):175–179
- Leuprecht B (2000) Die wichtigsten Spargellaubkrankheiten und ihre Bekämpfung. Spargel- Erdbeerprofi 2:14–16
- Leuprecht B (2010) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising. Institut für Pflanzenschutz. Verantwortlich für Pflanzenschutz und Gemüsebau. mündliche Mitteilung. Juni 2010 (verstorben im Dezember 2010)
- Meredith DS (1965) Violent spore release in *Stemphylium botryosum* Wallroth. *Plant Dis Rep* 49(12):1006–1007
- Neubauer C (1997) *Stemphylium* an Spargel. *Gemüse* 33(7):421–424
- Neubauer C (1998) Epidemiologie und Schadrelevanz von *Stemphylium botryosum* Wall. an Spargel. *Ges Pfl* 50(8):251–256
- Neubauer C (2000) Strobilurine- neue Fungizide für den Spargelanbau. *Gemüse* 36(8):23–24
- Rose H (2010) Fungizidstrategie in Junganlagen erschwert. *Bauernblatt/Landpost*. 64/160. 30–21. http://www.lwks.de/cms/fileadmin/user_upload/Presse/Archiv_2010/PDF_1910_15.05.2010/30-32_Rose.pdf. Zugegriffen: 21. Mar. 2011
- Vogel G (1996) Handbuch des speziellen Gemüsebaus. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Webster J, Weber R (2007) Introduction to Fungi, 3. Aufl. University Press, Cambridge
- Wonneberger C, Keller F (2004) Gemüsebau. Eugen Ulmer, Stuttgart



Stephanie Zapf, geboren 1987, studierte von 2006 bis 2011 Diplom-Agrarbiologie an der Universität Hohenheim. In der Vertiefungsrichtung „Nutzpflanzenbiologie“ belegte sie die Wahlfächer Grundlagen der Agrarökologie, Biologie der Sonderkulturen, Pflanzenschutz und Pflanzenernährung. Ihre Diplomarbeit verfasste sie im Agrarzentrum der BASF SE am Standort Limburgerhof im Unternehmensbereich Pflanzenschutz, Globale Forschung Fungizide. Der vorgestellte Artikel stellt eine Zusammenfassung

der Diplomarbeit dar. Seit Juli 2011 promoviert sie ebenfalls in der Fungizidforschung des Agrarzentrums der BASF.