

Pilzliche Verderbsflora von Möhren aus ökologischer und konventioneller Erzeugung

Fungal spoilage flora of carrots from organic and conventional horticulture

D. Steinhauer¹ und F.-K. Lücke¹

Keywords: food quality, vegetable production, shelf life, fungi

Schlagwörter: Lebensmittelqualität, Gemüsebau, Haltbarkeit, Pilze

Abstract:

We investigated the fungal spoilage of carrots grown by different cultivation methods and stored at 5 °C at high humidity for up to 7 months. For this purpose, we used both microscopic analysis of pure cultures and DNA-based, culture-independent methods, namely, Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) and Terminal Restriction Length Polymorphism (T-RFLP). Moreover, fungi were identified on the basis of the sequences of 18S rDNA fragments from SSCP gels and from pure cultures. Additional analytical parameters included firmness and growth of two fungal strains on experimentally inoculated carrots. Both microscopic and DNA-based methods revealed that spoiled carrots cultivated at different sites carried different fungal species. The observed spectrum of species depended on the identification method. Using culture-independent methods, we detected fungi (e.g. species of basidiomycetes) not found on carrots up to now. No significant effect of the method of carrot cultivation (organic vs. conventional) on fungal spoilage patterns was observed. Likewise, no clear relation between sites and methods of carrot cultivation and firmness or growth of experimentally inoculated fungi was found.

Einleitung und Zielsetzung:

Die Kenntnis der Zusammensetzung der pilzlichen Verderbsflora pflanzlicher Produkte ist eine wichtige Voraussetzung für die bessere Vorhersage der durch mikrobielle Aktivität begrenzten Haltbarkeit und für die Optimierung der Lagerbedingungen. Ziel der hier vorgestellten Studie war es festzustellen, ob Möhren aus ökologischer und konventioneller Erzeugung durch unterschiedliche Pilzarten verderben werden. Da klassische Methoden der Mikrobiologie (Kultur auf Selektivnährmedien; Mikroskopie) bei der Identifikation einer komplexen Mikroflora und schwer kultivierbarer Mikroorganismen ihre Begrenzung haben, wurden DNA-basierte (PCR-gestützte) Methoden eingesetzt, die ohne Kultivierung von Mikroorganismen auskommen. Parallel dazu wurde die Anfälligkeit der Möhren gegenüber experimentell inokulierten Pilzen sowie die Festigkeit erfasst, um mögliche Zusammenhänge mit dem pilzlichen Verderb zu erkennen. Diese Daten wurden zur zentralen Verarbeitung und Korrelation dem Projekt 02OE170/F (KAHL & BUSSCHER 2007) des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL) zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden:

Die untersuchten Möhren wurden in den Jahren 2004 und 2005 angebaut und stammten aus Feldversuchen der Universität Kassel mit den Sorten Rodelika und Rothild (vgl. FLECK et al. 2005) sowie aus Betriebsvergleichen (angebaute Sorten Narbonne und Nerac; je ein konventionell und ökologisch wirtschaftender Anbaubetrieb pro Vergleichs paar, an 6 unterschiedlichen Standorten). Die Proben waren identisch mit

¹Fachbereich Oecotrophologie, Hochschule Fulda, Marquardstr. 35, 36039 Fulda, Deutschland, Diana.Steinhauer@he.h-fulda.de, Friedrich-Karl.Luecke@he.hs-fulda.de

denjenigen, die im Rahmen des Projekts Nr. 02OE170/F genommen, codiert und verteilt wurden (vgl. KAHL & BUSSCHER 2007). Nicht marktfähige Ware wurde vor der Einlagerung aussortiert. Zur Feststellung der Haltbarkeit und zur Analyse der Verderbsflora wurden die Möhren bis zu 7 Monate lang bei 5°C und hoher Luftfeuchtigkeit (ca. 99%, unter Vermeidung von Kondenswasserbildung) gelagert. Zur Analyse der pilzlichen Verderbsflora wurden konventionelle (auf Kulturverfahren basierende) Methoden (vgl. SAMSON 2000) und folgende kulturunabhängige Methoden eingesetzt, die auf der Amplifizierung spezi-fischer Abschnitte der rDNA basieren:

- SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) nach TEBBE et al. (2001)
- T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism) nach LIU et al. (1997)
- (nach Methodik und im Labor von nadicom GmbH, Marburg) Identifizierung der Pilze durch Direkt-Sequenzierung von DNA-Banden aus SSCP-Gelen und DNA aus Pilzreinkulturen; Charakterisierung von Pilzgemeinschaften durch Klonierung und Sequenzierung der ITS-(Internal Transcribed Spacer)-Regionen der 18S rDNA

Parallel dazu wurden Proben, die sich nur in der Anbauform (ökologisch vs. konventionell; mit oder ohne zusätzliche Stickstoffgabe) unterschieden, paarweise mittels ANOVA und t-Test verglichen hinsichtlich der Anfälligkeit gegenüber inokulierten Pilzen (*Botrytis cinerea*, *Fusarium spec.*) (Wund-Inokulation nach PESCHKE 1994) sowie der Änderungen der Festigkeit während der Lagerung („Texture Analyser“ der Fa. Stable Micro Systems). Details finden sich bei STEINHAUER & LÜCKE (2005).

Ergebnisse und Diskussion:

Während der Lagerung bei 5°C verdarben vier von 34 Möhrenproben durch pilzlichen Befall nach 4 bis 6 Monaten. Zwei von ihnen waren ökologisch erzeugte Möhren aus dem Feldversuch, die zusätzlich mit organischem Stickstoff („+N“: 150 kg N/ha, als Hornspäne; vgl. FLECK et al. 2005) gedüngt worden waren. Dies ist plausibel angesichts der bekannten negativen Wirkung einer N-Übersversorgung auf die Pilzresistenz. Drei Penicillien-Arten sowie zwei Schwärzepilzarten (*Alternaria radicina*, *Cladosporium cladosporioides*) wurden von den verdorbenen Stellen isoliert. Mit kulturunabhängigen Methoden wurde *Penicillium chrysogenum* sowie die Basidiomyceten-Art *Sistotrema sernanderi* gefunden. Weiterhin verdarben Möhren von je einem ökologisch und konventionell arbeitenden Erzeugerbetrieb, wobei die Betriebe zu unterschiedlichen Betriebspaaren gehörten. Das Pilzartenspektrum dieser Proben war unterschiedlich und auch verschieden von demjenigen der Feldversuchsproben. Auffällig war das Auftreten hefeartiger Basidiomyceten in der konventionell angebauten Probe, sowie von Pilzarten, die bisher noch nicht beschrieben wurden (Tab. 1). Bei der Wund-Inokulation erwies sich eine Lagerzeit von 21 Tagen als optimal zur Erfassung von Unterschieden zwischen den Proben. Bei jeweils 14 paarweisen Vergleichen zeigten sich in fünf Fällen signifikante Unterschiede im Wachstum von *Botrytis cinerea*, in drei Fällen signifikante Unterschiede im Wachstum von *Fusarium sp.* Die Festigkeitsmessung ergab insgesamt bei sechs von 42 paarweisen Vergleichen signifikante Unterschiede. Zwei dieser Unterschiede zeigten sich kurz nach der Ernte (vgl. Tab. 2). Wie auch bei der Wund-Inokulation wurden keine Zusammenhänge mit der Anbauform deutlich. Weiterhin fielen die Proben, die während der Lagerung durch Pilze verdorben waren, gegenüber den anderen Proben nicht durch erhöhte Anfälligkeit im Wund-Inokulationstest oder durch eine veränderte Festigkeit auf.

Tab. 1: Identifizierte Pilze von verdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus.

verdorbene Möhrenprobe	mit kultivierungsunabhängigen Methoden identifizierte Pilze				mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze	
	SSCP + Sequenzierung	T-RFLP + Klonierung + Sequenzierung	Mikroskopia	Direktsequenzierung von Reinkulturen		
Feldversuchsanbau Rothild mit N (2004); Verderb nach 4 Monaten Lagerung	<i>Penicillium chrysogenum</i> ; <i>Sistotrema seranderi</i> ; neue Art	neue Art (verwandt mit <i>Sistotrema coronilla</i>); 2 neue Arten (verwandt mit <i>Sistotrema seranderi</i>)	Hefen; <i>Fusarium spec.</i>	<i>Penicillium canescens</i> ; <i>Pen. brevicompactum</i> ; <i>Pen. verrucosum</i> ; <i>Alternaria radicina</i> ; <i>Cladosporium cladosporioides</i>		
Feldversuchsanbau Rodelika mit N (2004); Verderb nach 4 Monaten Lagerung	nicht bestimmt	nicht bestimmt	Hefen; <i>Fusarium spec.</i>	<i>Pen. canescens</i> ; <i>Pen. brevicompactum</i> ; <i>Pen. verrucosum</i> ; <i>Alternaria radicina</i> ; <i>Cl. cladosporioides</i>		
Betriebsvergleichsproben ökologisch konventionell Narbonne2 (2004); Verderb nach 6 Monaten Lagerung	<i>Leucosporidium</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Cystoflabosidium bisporidii</i> ; neue Art	3 neue Arten (zugehörig zur <i>Acremonium</i> -Gruppe); 5 neue Arten (verwandt mit <i>Sistotrema seranderi</i>); <i>Mastigobasidium</i>	Hefen; <i>Fusarium spec.</i> ; <i>Mucor hiemalis</i> ; <i>Cladosporium spec.</i>	<i>Penicillium gladioli</i> ; <i>Penicillium solitum</i> ; <i>Pen. brevicompactum</i> ; <i>Gibberella avenacea</i>		
Betriebsvergleichsproben ökologisch Nerac4 (2005); Verderb nach 5 Monaten Lagerung	<i>Chalara hyalina</i> ; <i>Tetracladium</i> ; <i>Candida austromaniana</i> ; <i>Dictyostelium mucoroides</i>	5 neue Arten (verwandt mit <i>Sistotrema seranderi</i>); neue Art (zugehörig zur <i>Acremonium</i> -Gruppe); 3 neue Arten (wahrscheinlich Mykorrhiza-Ascomycet)	<i>Mucor hiemalis</i> ; <i>Penicillium spec.</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Verticillium spec.</i>		

Tab. 2: Ergebnisse der Wund-Inokulation und der Festigkeitsmessung.

Probenvergleichs-paar		Festigkeitsmessung (Kraft in Newton)								Inokulation (cm ² mazerierte Fläche nach 21 Tagen)			
		Ernte 2004				Ernte 2005				<i>Botrytis</i>		<i>Fusarium</i>	
Sorte/ Betrieb	Anbau-form	frisch	nach 4 Wochen	nach 8 Wochen	frisch	nach 4 Wochen	nach 8 Wochen	Ernte 2004	Ernte 2005	Ernte 2004	Ernte 2005		
Rothild	-N	65	166	101	64	73	66	1,9	1,3	1,1	1,0		
	+N	56	161	92	65	70	69	1,3	0,3	1,1	0,6		
Rodelika	-N	60	147	98	68	67	70	1,4	0,2	0,8	0,6		
	+N	66	155	108	68	67	69	1,4	0,8	0,9	1,0		
Narbonne1	öko	164	132	94	60	73	73	1,1	0,5	0,1	0,4		
	konv	160	134	92	63	75	69	0,7	1,3	0,3	0,1		
Narbonne2	öko	175	124	107	k. A.			1,0	k.	0,3	k.		
	konv	154	116	98	k. A.			0,3	A.	0,2	A.		
Nerac1	öko	164	140	95	56	66	68	0,2	0,4	0,4	0,3		
	konv	150	130	100	61	73	74	1,0	0,8	0,4	0,2		
Nerac2	öko	175	138	103	58	77	73	0,4	0,2	0,2	0,5		
	konv	160	134	109	67	75	74	1,3	0,7	0,1	0,3		
Nerac3	öko	181	145	108	64	73	71	1,7	1,1	0,1	0,2		
	konv	143	133	99	64	74	72	1,1	0,8	0,3	0,2		
Nerac4	öko	k. A.			60	71	73	k.	0,5	k.	0,4		
	konv	k. A.			68	79	76	A.	0,2	A.	0,5		

grau unterlegt = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$); davon doppelt eingerahmt: ökologisch bzw. ohne zusätzliche N-Gabe erzeugten Möhren fester bzw. weniger pilzanfällig;
fettgedruckt: Probe verdorbt während der Lagerung; k. A. = kein Probenpaar verfügbar.

Schlussfolgerung:

Sowohl mit herkömmlichen als auch mit verschiedenen DNA-basierten, kulturunabhängigen Methoden ließen sich Unterschiede in der pilzlichen Verderbsflora von Möhren aus unterschiedlichen Standorten erfassen, wobei das gefundene Artenspektrum auch methodenabhängig war. Es gab allerdings keinen erkennbaren Effekt der Anbauform. Hinsichtlich der Festigkeit der Möhren sowie ihrer Anfälligkeit gegenüber in Wunden inokulierter Pilze ergaben sich im paarweisen Vergleich vereinzelt signifikante Unterschiede, insgesamt jedoch auch hier keine Hinweise auf einen Effekt von Anbauform und Standort.

Danksagung:

Wir danken Dr. Christoph C. Tebbe (FAL, Braunschweig) und seiner Arbeitsgruppe für die Einarbeitung in die SSCP-Methode, Herrn Dr. Bernhard Nüsslein, nadicom GmbH, für seine Kooperation bei der T-RFLP-Methode, Klonierung und Sequenzierung, sowie den Kooperationspartnern am Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften der Universität Kassel für die Überlassung der Möhrenproben und den Datenaustausch. Gefördert wurde dieses Projekt vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (Projekt-Nr.: 03OE191).

Literatur:

Fleck M., von Fragstein P., Heß J. (2005): Ertrag und Zuckergehalt bei Möhren nach Applikation der biologisch-dynamischen Präparate Hornmist und Hornkiesel in verschiedenen Umwelten. In: J. Heß und G. Rahmann (Hrsg.): Ende der Nische - Beiträge zur 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Kassel, 1.-4. März 2005, S. 89-92.

Kahl J., Busscher N. (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht Projekt 02OE170/F, Bundesprogramm Ökologischer Landbau.

Liu W.-T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.

Peschke J. (1994): Inhaltsstoffe und Anfälligkeit von Möhren im Nacherntestadium unter dem Einfluss von Sorte, Herkunft und Anbaubedingungen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Samson R. A. (Hrsg.) (2000): Introduction to Food- and Airborne Fungi. 6. Auflage, Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

Steinhauer D., Lücke F.-K. (2005): Untersuchungen zur Erfassung von Unterschieden in der mikrobiellen Besiedelung und der Haltbarkeit von Möhren aus unterschiedlichen Anbauformen. In: J. Heß und G. Rahmann, Hrsg.: Ende der Nische - Beiträge zur 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Kassel, 1.-4. März 2005, S. 575-576.

Tebbe C., Schmalenberger A., Peters S., Schwieger F. (2001): Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In: P.A. Rochelle, ed.: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, S.161-175.