

Charakterisierung der Mikroflora und Beurteilung der Haltbarkeit verderblicher pflanzlicher Produkte aus ökologischer und konventioneller Erzeugung mit Hilfe neuer Methoden

Use of new methods to characterise the microflora and to assess the shelf life of perishable vegetables from organic and conventional agriculture

FKZ: 03OE191

Projektnehmer:

Fachhochschule Fulda
Fachbereich Oecotrophologie
Marquardstraße 35, 36039 Fulda
Tel.: +49 661 9640-0
Fax: +49 661 9640-399
E-Mail: info@verw.hs-fulda.de
Internet: <http://www.fh-fulda.de>

Autoren:

Steinhauer, Diana; Lücke, Friedrich-Karl

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)



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, und 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).

Für die Unterstützung bei den Laborarbeiten an der Hochschule Fulda bedanken wir uns bei Dipl. oec. troph. Silvia Zimmerer, Dipl. oec. troph. Ulrike Mörle-Heynisch, Dipl. oec. troph. Margit Ochs und cand. oec. troph. Sandra Ferkau.



Inhaltsverzeichnis

1	HINTERGRUND	4
2	ZIEL DES PROJEKTS UND BEZUG ZUM BUNDESPROGRAMM ÖKOLOGISCHER LANDBAU	5
2.1	ZIELSETZUNG DES PROJEKTS	5
2.1.1	<i>Gesamtziel</i>	5
2.1.2	<i>Wissenschaftliches Ziel</i>	5
2.2	BEZUG DES PROJEKTS ZUM BUNDESPROGRAMM ÖKOLOGISCHER LANDBAU	5
3	WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND, AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE	7
4	PLANUNG UND ABLAUF DES PROJEKTS	9
4.1	PROJEKTPARTNER	9
4.2	PLANUNG UND VORGEHENSWEISE	11
4.3	PROJEKTABLAUF	15
5	MATERIAL	17
5.1	KODIERTES PROBENMATERIAL	17
5.1.1	<i>Feldversuchproben (Erntejahre 2004, 2005, 2006)</i>	17
5.1.2	<i>Erzeugerproben (Erntejahre 2004, 2005)</i>	17
5.2	UNKODIERTES PROBENMATERIAL	18
5.2.1	<i>Feldversuch Universität Kassel (Erntejahr 2004)</i>	18
5.2.2	<i>Praxisversuche Öko-Netzwerk I (Erntejahre 2005, 2006)</i>	19
5.2.3	<i>Praxisversuche Öko-Netzwerk II (Erntejahre 2006)</i>	20
5.2.4	<i>Betriebsproben LLH (Erntejahr 2006)</i>	20
5.2.5	<i>Probenmaterial ATB (Erntejahr 2006)</i>	21
6	METHODEN	22
6.1	DURCHFÜHRUNG DER LAGERVERSUCHE	22
6.2	CHARAKTERISIERUNG DER MIKROFLORA MIT MOLEKULARBIOLOGISCHEN DNA-BASIERTEN METHODEN	22
6.2.1	<i>PCR-SSCP-Methode</i>	23
6.2.2	<i>ARDRA-Methode</i>	25
6.2.3	<i>T-RFLP-Methode</i>	27
6.3	CHARAKTERISIERUNG DER MIKROFLORA MIT KULTIVIERUNGSABHÄNGIGEN METHODEN (SELEKTIVNÄHRMEDIEN)	28
6.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR ANFÄLLIGKEIT GEGENÜBER PHYTOPATHOGENEN PILZEN (WUND-INOKULATION)	29
6.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR ÄNDERUNG IN DER FESTIGKEIT WÄHREND DER LAGERUNG	31
6.6	PH-WERT-MESSUNG	32
6.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	32



7	WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE ERGEBNISSE.....	35
7.1	LAGERVERHALTEN	35
7.2	ERGEBNISSE ZUR CHARAKTERISIERUNG DER MIKROFLORA	35
7.2.1	<i>DNA-basierte Analyse</i>	35
7.2.2	<i>Mikrobiologische Analyse</i>	56
7.2.3	<i>Gesamtergebnis der DNA-basierten und mikrobiologischen Analyse der Pilzflora</i>	66
7.3	ERGEBNISSE DER WUND-INOKULATION.....	68
7.3.1	<i>Kodierte Proben</i>	68
7.3.2	<i>Unkodierte Proben</i>	71
7.4	ERGEBNISSE DER FESTIGKEITSMESSUNG.....	74
7.4.1	<i>Kodierte Proben</i>	74
7.4.2	<i>Unkodierte Proben</i>	77
7.5	ERGEBNISSE DER PH-WERT-BESTIMMUNG	79
8	DISKUSSION	82
8.1	HALTBARKEIT UND VERDERBSFLORA VON MÖHREN	82
8.2	HALTBARKEIT UND VERDERBSFLORA ANDERER VERDERBLICHER ROHSTOFFE	85
8.3	UNTERSCHIEDUNG VON MÖHRENPROBEN ANHAND DER MIKROBIELLEN BESIEDELUNG	86
9	NUTZEN UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE	89
10	ZUSAMMENFASSUNG	92
11	GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN	95
12	AUSBLICK UND WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN.....	96
13	VERZEICHNISSE	98
13.1	LITERATURVERZEICHNIS	98
13.2	TABELLENVERZEICHNIS	100
13.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101
14	ERFOLGTE UND GEPLANTE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	104
15	ANHANG.....	105

1 Hintergrund

Eine Ausweitung naturnaher Landbewirtschaftungsformen wird sowohl in der nationalen als auch in der EU-Agrarpolitik angestrebt. Dieses Ziel kann jedoch nur erreicht werden, wenn die in diesen Wirtschaftsformen erzeugten Produkte einen wahrnehmbaren Zusatznutzen bieten und eindeutig von konventionellen Produkten unterscheidbar sind. Die Erfassung von Unterschieden in der substantiellen Qualität (Genusswert, ernährungsphysiologischer Wert, gesundheitliche Unbedenklichkeit, Gebrauchswert einschließlich Haltbarkeit) von ökologischen und konventionellen Produkten ist somit wichtig, will man die speziellen Vorteile der Öko-Rohstoffe hervorheben und die Verarbeitungstechniken entsprechend anpassen. Hier gibt es noch erhebliche Lücken im Kenntnisstand (vgl. Senat der Bundesforschungsanstalten, 2003).

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass durch Düngemaßnahmen, wie sie im ökologischen Landbau üblich sind – insbesondere bei einer sparsamen N-Versorgung –, die mechanischen Barrieren (Struktur der Zellwand und der Cuticula) sowie die chemischen Abwehrmechanismen (z. B. Bildung von Phytonciden) pflanzlicher Gewebe gegen eine mikrobielle Besiedelung gestärkt werden (Übersicht bei MEIER-PLOEGER, 2001). Auch Änderungen in den niedermolekularen Bestandteilen sind zu erwarten (SCHALLER, 1999). Weiterhin ist zu erwarten, dass der Verzicht auf chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel und der Einsatz alternativer Pflanzenbehandlungsmittel zu Unterschieden in der mikrobiellen Besiedelung der Pflanzen, insbesondere hinsichtlich der Pilzflora auf frischem Erntegut führt. Somit können unterschiedliche Anbaumethoden zu erfassbaren Verschiebungen in der Zusammensetzung der Mikroflora und zu unterschiedlicher Haltbarkeit der Rohstoffe führen.

Neben ihrer Rolle im Verderb von Gemüse kann die Zusammensetzung der Mikroflora auf Erntegut auch Indikator für Art und Ausprägung von Resistenzmechanismen sein. Solche Unterschiede sind jedoch mit konventionellen mikrobiologischen Methoden nur schwer und nur mit großem Aufwand zu erfassen. Hier bieten neue molekularbiologische Methoden einen Ausweg; sie wurden z.B. zur Charakterisierung der Mikroflora im Boden und in der Rhizosphäre eingesetzt (vgl. SCHWIEGER und TEBBE, 1998; SMALLA et al., 2001).

2 Ziel des Projekts und Bezug zum Bundesprogramm Ökologischer Landbau

2.1 Zielsetzung des Projekts

2.1.1 Gesamtziel

Ziel des Projektes ist es, die durch mikrobielle Aktivität begrenzte Haltbarkeit unverarbeiteter pflanzlicher Lebensmittel aus ökologischer und konventioneller Erzeugung besser vorherzusagen und dadurch zu einer Optimierung der Lagerbedingungen und der Frische der Öko-Erzeugnisse beizutragen. Hierzu wurde die spezifische Verderbs-Mikroflora von Erzeugnissen aus unterschiedlichen Anbauformen mittels molekularbiologischer (DNA-basierter) und mikrobiologischer Methoden analysiert und den Ursachen für Haltbarkeitsunterschiede nachgegangen. Der Schwerpunkt lag dabei auf Möhren. Es sollte eine Strategie aufgezeigt werden, um die spezifische Verderbsflora von pflanzlichen Lebensmitteln zu analysieren, und somit eine Basis für die entsprechende Untersuchung anderer Erntegüter und daraus hergestellter Lebensmittel geschaffen werden.

Weiterhin sollte geprüft werden, inwieweit DNA-basierte und mikrobiologische Techniken Teile eines Methodenspektrums zur Unterscheidung zwischen z.B. ökologisch und konventionell erzeugtem Erntegut werden können. Letzteres wurde in Kooperation mit anderen Projekten des Bundesprogramms Ökologischer Landbau durchgeführt (federführend: Universität Kassel, Projekt Nr. 02OE170/F).

2.1.2 Wissenschaftliches Ziel

Das Vorhaben soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Faktoren leisten, die die mikrobielle Besiedelung pflanzlicher Rohware beeinflussen. Die Haltbarkeit dieser Produkte soll besser vorhersagbar werden. Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes verschiedener molekularbiologischer Methoden zur Analyse der Verderbsflora unverarbeiteter Lebensmittel sollen aufgezeigt werden.

2.2 Bezug des Projekts zum Bundesprogramm Ökologischer Landbau

Für die Werbung und Bindung von Kunden für Öko-Lebensmittel ist es wichtig, verlässlich Öko-Lebensmittel von hoher sensorischer Qualität und hohem Gebrauchswert (d.h. lange Haltbarkeit, einfache Zubereitung) anzubieten (vgl. HAMM, 1999). Hierzu soll das Projekt einen Beitrag leisten, denn besonderer



Handlungsbedarf besteht bei Öko-Obst und -gemüse, bei denen hohe Nachernteverluste und Qualitätsmängel nicht selten sind (vgl. LINKE, 2003; DUMDEI et al., 2003; MÜLLER et al., 2003; vgl. ALPERS, 2004)



3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Durch Düngemaßnahmen, wie sie im ökologischen Landbau üblich sind – insbesondere bei einer sparsamen N-Versorgung –, werden die mechanischen Barrieren (Zell- und Gewebestruktur) und die chemischen Abwehrmechanismen (z.B. Bildung von Phytonciden) pflanzlicher Gewebe gegen eine mikrobielle Besiedelung tendenziell gestärkt (Übersicht bei AHRENS, 1988; MEIER-PLOEGER und WÖRNER, 1998). Weiterhin ist zu erwarten, dass der Verzicht auf chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel und der Einsatz alternativer Pflanzenbehandlungsmittel zu Unterschieden in der mikrobiellen Besiedelung der Pflanzen, insbesondere hinsichtlich der Pilzflora auf frischem Erntegut führt. Somit können unterschiedliche Anbaumethoden zu unterschiedlicher Haltbarkeit der Rohstoffe führen. Letzteres wurde in mehreren Untersuchungen gezeigt, z.B. an Möhren (vgl. AHRENS, 1988; MATTHIES, 1991; PESCHKE, 1994). Es fehlen jedoch weitgehend Daten über anbaubedingte Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikroflora auf den Produkten, insbesondere hinsichtlich der spezifischen Verderbsflora. Solche Daten werden jedoch benötigt, will man die Daten besser interpretieren und die Lagerfähigkeit der Erzeugnisse und die Möglichkeiten ihrer Verlängerung sicherer vorhersagen.

Konventionelle Schnellmethoden der Florenanalyse mittels Selektivnährmedien liefern erste Anhaltspunkte für Florenverschiebungen, haben jedoch unzureichende Trennschärfe. Eine detaillierte Analyse umfasst die Isolierung und Charakterisierung von Reinkulturen, was mit einem sehr hohen Aufwand verbunden ist. Hinzu kommt, dass nicht alle relevanten Mikroorganismen auf Nährböden kultivierbar sind. In den letzten Jahren wurden DNA-basierte Methoden entwickelt, die ohne die Isolierung und Charakterisierung von Reinkulturen auskommen und somit den Aufwand für eine Analyse einer komplexen Mikroflora senken. Diese Methoden wurden bisher insbesondere zur Charakterisierung der Diversität der Mikroflora und ihrer Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren eingesetzt, z.B. in der Rhizosphäre und im Boden, wo nur sehr wenige der vorhandenen Mikroorganismen im Labor anzüchtbar sind. Zu den sogenannten Fingerprint-Methoden (liefern Bandenmuster in Elektrophoresegelen, die mit Verfahren der Clusteranalyse verglichen werden können) gehören

- die Gradienten-Gelelektrophorese von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten (DGGE, TGGE; vgl. MUYZER und SMALLA, 1998), die u.a. bereits zur Erfassung von Veränderungen der Mikroflora im Boden und in der Rhizosphäre in Abhängigkeit von landwirtschaftlichen Parametern erfolgreich eingesetzt wurde, und zwar bei Bakterien (vgl. SMALLA et al., 2001) und Pilzen (GOMES et al., 2003).
- die Analyse von DNA-Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen mit der PCR-SSCP-Technik (SCHWIEGER und TEBBE, 1998).

Diese Methoden erfassen Unterschiede in der ribosomalen RNA bzw. in den für diese codierenden Bereichen des Genoms (rDNA) und eignen sich besonders zur Erfassung von Verschiebungen in der Zusammensetzung der Mikroflora, z.B. während der Lagerung oder Fermentation von Lebensmitteln. Eine höhere Reproduzierbarkeit der Fingerprint-Muster von Reinkulturen oder Mischkulturen mit wenigen Komponenten liefert die ARDRA-Methode (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Sie wurde weiterentwickelt zur Analyse der Terminalen Restriktionslängen-Polymorphismen (T-RFLP; LIU et al., 1997; LUKOW et al., 2000). Mit der T-RFLP können auch komplexe Mikroflora mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse analysiert werden.

Es war zu erwarten, dass die oben angeführten Methoden wertvolle Erkenntnisse über den mikrobiellen Verderb von Gemüse liefern, zumal sie auch nicht oder schwer kultivierbare Verderbserreger (z.B. Pilze auf Frischgemüse und Frischobst) erfassen. Sie wurden bisher zwar zur Analyse der Mikroflora in Umweltproben (z.B. Boden, Rhizosphäre, Biofilme in aquatischen Systemen), im Darm (vgl. WALTER et al., 2000), in Trinkwasser (vgl. HÖFLE und BRETTAR, 2007) und in fermentierten Lebensmitteln (vgl. MEROTH et al., 2003; RANTSIOU and COCOLIN, 2006) eingesetzt, nicht jedoch zur Charakterisierung der Verderbsflora von unverarbeiteter pflanzlicher Rohware.

4 Planung und Ablauf des Projekts

4.1 Projektpartner

Das Projekt 03OE191 arbeitete erfolgreich mit folgenden Projektpartnern zusammen:

1. **Universität Kassel**, Fachgebiet „Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur“, BÖL-Projekt „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden“ (Nr. 02OE170/F; Projektgruppe von Frau Prof. Dr. Angelika Ploeger): Gemeinsam mit den Partnern aus diesem Projekt, zu denen u.a. auch das **Institut Kwalis GmbH**, Dipperz, gehört, wurden Möhrenproben aus definierten Anbauversuchen und Betriebsvergleichen in zwei Vegetationsperioden untersucht und die verschiedenen Ergebnisse miteinander korreliert und Daten ausgetauscht (vgl. KAHL und BUSSCHER, 2007).
2. **Firma Nadicom**, Gesellschaft für angewandte Mikrobiologie mbH, Karlsruhe (Geschäftsführer: Dr. Bernhard Nüßlein): Molekularbiologische Untersuchungen, die unter das Gentechnikgesetz fallen und/oder die Nutzung von Spezialgeräten (z. B. für die DNA-Sequenzierung) erforderten, wurden an das Labor der Firma Nadicom als Unterauftrag vergeben bzw. wurden von der Projektmitarbeiterin in deren Labors durchgeführt.
3. Institut für Agrarökologie der **Forschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)**, Braunschweig: Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Christoph Tebbe unterstützte das Projekt 03OE191 durch Einweisung in die SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)-Fingerprintmethode.
4. **Forschungsinstitut für biologischen Landbau Deutschland e.V. (FiBL)**, BÖL-Projekt „Netzwerk `Forschung im Ökologischen Gemüsebau` (Nr. 03OE569; Projektgruppe von Frau Dipl.-Ing. agr. Bettina Billmann)“: Das Projekt stellte Möhren- und Zwiebelproben aus den Vegetationsperioden 2005 und 2006 aus einem Praxisversuch für unsere Untersuchungen zur Verfügung.

5. **Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.**, Abteilung Technik im Gartenbau (Leitung: Dr. Martin Geyer): Gemeinsam mit dem Institut wurden Tomaten der Ernte 2006 untersucht und Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen Transpirationseigenschaften und der pilzlichen Verderbsflora ausgetauscht.

6. **Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen** (LLH, Dipl.-Ing. agr. Günther Völkel): Der LLH unterstützte unser Projekt bei der Kontaktaufnahme mit ökologisch wirtschaftenden Feldgemüse-Erzeugerbetrieben und bei der Suche nach gewaschenen und ungewaschenen Möhrenproben für das Versuchsjahr 2006.

7. Weiterhin wurden Kontakte zur Arbeitsgruppe von PD Dr. Phillipp Franken (Abteilung Pflanzenernährung) am **Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ)** in Großbeeren aufgebaut, um deren umfangreiche Erfahrungen auf dem Gebiet der „Pflanzen-Mikroorganismen-Wechselwirkungen“ zur Interpretation der gewonnenen Daten nutzen zu können.

An dieser Stelle bedanken wir uns herzlich bei allen Projektpartnern für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

4.2 Planung und Vorgehensweise

Charakterisiert werden sollte die Mikroflora, die den Verderb von Erntegut aus ökologischer und konventioneller Erzeugung verursacht. Es wurden Erzeugnisse gewählt, bei denen mikrobielles Wachstum oft die Haltbarkeit begrenzt. Der Schwerpunkt lag dabei zunächst auf Möhren, und zwar aus folgenden Gründen:

- Ökologisch erzeugte Möhren haben erhebliche Marktbedeutung: Der Anbauumfang für Öko-Möhren lag 2000 bei 750 ha und hatte einen Anteil von 21% an der Gesamtanbaufläche für Frischgemüse (3500 ha) (KASBOHM, 2002).
- Es liegen bereits einige vergleichende Untersuchungen über das Nachernteverhalten von Möhren aus konventionellem und ökologischem Anbau vor (vgl. PESCHKE, 1994).
- Möhren sind einerseits bei sachgerechter Lagerung ausreichend haltbar, um auch außerhalb der Erntesaison Untersuchungen durchführen zu können, werden andererseits aber auch mikrobiell verdorben, wobei die Verderbsflora durchaus unterschiedlich sein kann (LEWIS und GARROD, 1983; SNOWDON, 1990; BÖTTCHER, 1996).
- Möhren aus statistisch geplanten Feldversuchen sowie aus gut dokumentierten Praxisbetrieben standen zur Verfügung (vgl. 5).

Im zweiten und dritten Versuchsjahr sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auch auf andere verderbliche pflanzliche Produkte aus ökologischer und konventioneller Erzeugung geprüft werden. Hierzu wurden Untersuchungen an verdorbenen Zwiebel- und Pastinakenproben sowie Tomaten durchgeführt (vgl. 5.2). Weiterhin sollten im dritten Versuchsjahr ausgewählte Möhrenproben parallel in ungewaschenen und in gewaschenen Zustand untersucht werden.

Zur Charakterisierung der Mikroflora sollten konventionelle (auf Kulturverfahren basierende) Methoden (vgl. 6.3) und sogenannte DNA-Fingerprintmethoden (vgl. 6.2) eingesetzt werden. Hierzu wurde nach unterschiedlicher Lagerzeit bzw. Verderbstadiums die Mikroflora mit kulturellen Verfahren untersucht und PCR-amplifizierbare mikrobielle DNA von der Oberfläche der pflanzlichen Produkte gewonnen. Für Bakterien wurden Abschnitte aus dem Gen für die 16S rDNA, für



Pilze Abschnitte aus dem Gen für die 18S rDNA mittels passender Primer amplifiziert. Anschließend wurde die DNA in die Fingerprintmethoden eingesetzt.

Parallel dazu wurden Einflussparameter auf die mikrobielle Besiedelung erfasst:

- Anfälligkeit bzw. das Abwehrverhalten intakter Möhren gegenüber inokulierter Pilze (Wund-Inokulation nach PESCHKE, 1994; vgl. 6.4)
- Änderungen in der Festigkeit (vgl. 6.5) und im pH-Wert während der Lagerung (vgl. 6.6)



Tab. 1: Übersicht der durchgeführten (X) Untersuchungen des Projekts Nr. 03OE191 an kodierten Möhrenproben

kodiertes Untersuchungsmaterial			Untersuchungsmethode																						
			Molekularbiologische Untersuchungen																						
			Isolierung mikrobieller DNA												SSCP		ARDRA		T-RFLP		Klonierung bzw. Sequenzierung zur Identifizierung einzelner Pilzarten	klassische Mikrobiologie	Wund-Inokulation*	Festigkeitsmessung*	pH-Wert-Bestimmung*
			Vegetationsjahr 2004				Vegetationsjahr 2005				Vegetationsjahr 2006				Pilzgemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	Pilzgemeinschaften	Bakteriengemeinschaften (des Jahres 2004)						
Probenmaterial	Erntejahr	Sorte und Anbauform	frisch nach Ernte	unverdorben nach 4 bzw. 6 Monaten Lagerung	leicht verdorben nach 4 bzw. 6 Monaten Lagerung	stark verdorben nach 4 bzw. 6 Monaten Lagerung	nach 7 Monaten Lagerung	frisch nach Ernte	stark verdorben nach 5 Monaten Lagerung	nach 7 Monaten Lagerung	frisch nach Ernte	nach 7 Monaten Lagerung	Pilzgemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	Pilzgemeinschaften	Bakteriengemeinschaften (des Jahres 2004)	Klonierung bzw. Sequenzierung zur Identifizierung einzelner Pilzarten	klassische Mikrobiologie	Wund-Inokulation*	Festigkeitsmessung*	pH-Wert-Bestimmung*			
Möhrenproben	Feldversuch UNIKA	Ernte 2004, 2005 und 2006	Rothild ohne N (ökologisch)	X				X	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
			Rothild mit N (ökologisch)	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
			Rodelika ohne N (ökologisch)	X				X	X			X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
			Rodelika mit N (ökologisch)	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	Erzeugerproben/ Betriebsvergleich	Ernte 2004 und 2005	Nerac1 ökologisch	X				X	X		X				X	X					X	X	X	X	
			Nerac1 konventionell	X				X	X		X		k.A.		X	X					X	X	X	X	
			Nerac2 ökologisch	X				X	X		X				X	X					X	X	X	X	
			Nerac2 konventionell	X				X	X		X		k.A.		X	X					X	X	X	X	
			Nerac3 ökologisch	X				X	X		X				X	X					X	X	X	X	
			Nerac3 konventionell	X				X	X		X		k.A.		X	X					X	X	X	X	
			Nerac4 ökologisch						X	X	X				X	X	X	X		X	X	X	X	X	
			Nerac4 konventionell						X		X		k.A.		X	X	X	X			X	X	X	X	
			Narbonne1 ökologisch	X				X	X		X				X	X					X	X	X	X	
			Narbonne1 konventionell	X				X	X		X		k.A.		X	X					X	X	X	X	
Narbonne2 ökologisch	X				X							X	X	X	X	X		X	X	X	X				
Narbonne2 konventionell	X	X	X	X	X							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				

k.A.= kein Vergleichs-Probenpaar des Erntejahres 2006 verfügbar; *durchgeführt mit Proben des Erntejahres 2004 und 2005



Tab. 2: Übersicht der durchgeführten (X) Untersuchungen des Projekts Nr. 03OE191 an unkodierten Möhrenproben

unkodiertes Untersuchungsmaterial			Untersuchungsmethode																
			Molekularbiologische Untersuchungen									klassische Mikrobiologie	Wund-Inokulation	Festigkeitsmessung	pH-Wert-Bestimmung				
			Isolierung mikrobieller DNA						SSCP	ARDRA	T-RFLP					Klonierung bzw. Sequenzierung zur Identifizierung einzelner Pilzarten			
			Vegetationsjahr 2005			Vegetationsjahr 2006						Pilzgemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	Pilzgemeinschaften				
Probenmaterial	Ernte-jahr	Sorte und Anbauform	frisch nach Ernte	nach 7 Monaten Lagerung	frisch nach Ernte	nach 7 Monaten Lagerung	verdorben												
Feldversuch Uni Kassel	Ernte 2004	Rodelika oNmPr, ökologisch															X	X	X
		Rodelika mNmPr, ökologisch																X	X
Praxisversuch Öko-Netzwerk I (LVG Hannover-Ahlem)	Ernte 2005 und 2006	Rodelika, ökologisch	X	X	X	X				X	X						X	X	X*
		Rothild, ökologisch	X	X	X	X				X	X						X	X	X*
		Canada, ökologisch	X	X	X	X				X	X						X	X	X*
		Fontana, ökologisch	X	X	X	X				X	X						X	X	X*
		Kamaran, ökologisch	X	X	X	X				X	X						X	X	X*
		Joba, ökologisch**	X	X							X	X					X	X	X*
Praxisversuch Öko-Netzwerk II (FH Osnabrück)	Ernte 2006	Karotan, ökologisch + konventionell															X		
		Kamaran, ökologisch + konventionell															X		
		Neptun, ökologisch + konventionell															X		
		Rodelika, ökologisch + konventionell															X		
LLH-Proben	Pappelhof/ Reichelsheim-Beienheim	Bolero, ökologisch					X	X				X	X	X					
		Nipomo, ökologisch					X	X				X	X	X					
		Maestro, ökologisch					X	X				X	X	X					
		Maestro, ökologisch, ungewaschen														X			
		Maestro, ökologisch, gewaschen (Frischwasser)														X			
		Maestro, ökologisch, gewaschen (wiederverwendetes Wasser)														X			
	Magerhof/ Karben	Bolero, ökologisch, ungewaschen														X			
		Bolero, ökologisch, gewaschen (Frischwasser)														X			
	Luisenhof/ Bad Vilbel	Milano, ökologisch, ungewaschen														X			
		Milano, ökologisch, gewaschen (Frischwasser)														X			

*durchgeführt mit Proben des Erntejahres 2005; **Probe nur im Jahr 2005 verfügbar

Tab. 3: Übersicht der durchgeführten (X) Untersuchungen des Projekts 03OE191 an anderen verderblichen Rohstoffen

unkodiertes Untersuchungsmaterial				Untersuchungsmethode						
				Molekularbiologische Untersuchungen						klassische Mikrobiologie
				Isolierung mikrobieller DNA			SSCP			
				Vegetationsjahr 2005		Vegetationsjahr 2006		Pilzgemeinschaften	Bakteriengemeinschaften	
verdorben nach 5 Monaten Lagerung	verdorben nach 5 Monaten Lagerung	bereits verdorben bei Probenabgabe								
Probenmaterial	Erntejahr	Sorte und Anbauform								
Zwiebelproben	Praxisversuch Öko-Netzwerk I (LVG Hannover-Ahlem)	Ernte 2005 und 2006	Hystar, ökologisch	X			X		X	
			Hyfort, ökologisch	X			X		X	
			Bajosta, ökologisch	X	X		X	X	X	
			Balaton, ökologisch	X	X		X	X	X	
Pastinakenproben	Pappelhof/Reichelsheim-Beienheim	Ernte 2006	Halblange Weiße, ökologisch			X	X		X	
Tomatenproben	Leipniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.	Ernte 2006	Liberto, ökologisch, Gewächshaus-anbau			X	X		X	

4.3 Projektlauf

Der Projektlauf war durch folgende Phasen und Meilensteine gegliedert (vgl. Anhang I):

Phase A (Mai – Oktober 2004):

Literaturrecherche, Vorversuche, Etablierung der molekularbiologischen Methoden SSCP und ARDRA

Meilenstein 1 (29.10.2004):

Wahl der Analysemethoden (u.a. Entscheidung, die DGGE-Methode nicht einzusetzen) und des detaillierten Versuchsplans

Phase B (November 2004 – Oktober 2005):

Lagerversuche mit Möhren aus Anbauversuchen und Praxisbetrieben der 1. Vegetationsperiode, DNA-Isolierung nach unterschiedlichen Lagerzeiten, Ermittlung der DNA-Fingerprints, Statistische Auswertung

Meilenstein 2 (18. April 2005):

Lagerversuchsdaten der 1. Vegetationsperiode zur Korrelation an BÖL-Projekt Nr. 02OE170/F

Meilenstein 3 (31. Oktober 2005):

Entscheidung über Einbeziehung eines weiteren Rohstoffes (Zwiebel)

Phase C (November 2005 – Mai 2006):

Lagerversuche mit Möhren aus Anbauversuchen und Praxisbetrieben der 2. Vegetationsperiode, DNA-Isolierung nach unterschiedlichen Lagerzeiten, Ermittlung der DNA-Fingerprints, Statistische Auswertung

Meilenstein 4 (27. Januar 2006):

Lagerversuchsdaten der 2. Vegetationsperiode zur Korrelation an BÖL-Projekt Nr. 02OE170/F

Phase D (Juni – Oktober 2006):

Analyse mit Klonierung und Sequenzierung, Auswertung der Ergebnisse (1. und 2. Vegetationsperiode)

Meilenstein 5 (01. November 2006):

Entscheidung über Einbeziehung von gewaschenen Möhren

Phase E (November 2006 – August 2007):

Lagerversuche mit Möhren aus Anbauversuchen (3. Vegetationsperiode) und mit gewaschenen und ungewaschenen Möhren sowie Zwiebeln aus Praxisbetrieben, DNA-Isolierung nach unterschiedlichen Lagerzeiten, Ermittlung der DNA-Fingerprints

Meilenstein 6 (07. Mai 2007):

Entscheidung über Einbeziehung eines weiteren Rohstoffes (Tomate)

Phase F (September – Oktober 2007):

Identifizierung von Pilzen mit Klonierung und Sequenzierung, Auswertung der Ergebnisse, Erstellung des Abschlussberichtes

5 Material

5.1 Kodiertes Probenmaterial

Damit die gewonnenen Daten auch für das Projekt 02OE170/F genutzt werden konnten, wurden vorwiegend kodierte Proben untersucht (vgl. KAHL und BUSSCHER, 2007), d.h. die Anbauform wurde uns erst nach der Untersuchung bei der Dekodierung mitgeteilt.

5.1.1 Feldversuchproben (Erntejahre 2004, 2005, 2006)

Das Probenmaterial stammte aus dem Feldanbauversuch auf dem Lehr- und Versuchsbetrieb der Universität Kassel (Hessische Staatsdomäne Frankenhäusen). Es handelte sich dabei um ökologisch angebaute Möhren (Sorte: Rodelika und Rothild) mit und ohne zusätzlicher Stickstoffquelle in Form von 150 kg Hornspäne/ha (vgl. FLECK et al., 2005; vgl. Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht der kodierten Möhrenproben aus dem Feldanbauversuch der Uni Kassel

Anbauform	Möhrensorte	Code 2004	Sondercode 2004	Code 2005	Sondercode 2005	Code 2006
ohne Stickstoff		H1	FF1	C1	L1	Proben standen uns im Jahr 2006
mit Stickstoff	Rothild	H2	FF2	C2	L2	
ohne Stickstoff		G1	F2	D1	M2	dekodiert zur Verfügung
mit Stickstoff	Rodelika	G2	F1	D2	M1	

5.1.2 Erzeugerproben (Erntejahre 2004, 2005)

Bei den kodierten Erzeugerproben handelte es sich um Möhren, die aus 5 Betrieben je Anbausystem (ökologisch bzw. konventionell) stammten, wobei jeweils zwei Sorten auf je drei Standorten verglichen wurden (vgl. Tab. 5). Alle Erzeugerproben stammten von Marschböden in Dithmarschen.

Tab. 5: Übersicht der Erzeugerproben bzw. Betriebsvergleiche

Anbauform	Möhrensorte	Herkunftsort	Code 2004	Sondercode 2004	Code 2005	Sondercode 2005
ökologisch		Hedwigenkoog	S2	Y2	E1	N1
konventionell	Narbonne1	Hedwigenkoog	S1	Y1	E2	N2
ökologisch		Hedwigenkoog	Q2	U1	F2	A1
konventionell	Nerac1	Hedwigenkoog	Q1	U2	F1	A2
ökologisch		Friedrichsgabekoog	R1	X2	G2	J2
konventionell	Nerac2 ²	Kronprinzenkoog	R2	X1	G1	J1
ökologisch		Westerdeichstrich	P2	V1	H2	B1
konventionell	Nerac3 ²	Kronprinzenkoog	P1	V2	H1	B2
ökologisch		Friedrichsgabekoog			Y1	K1
konventionell	Nerac4 ¹	Friedrichsgabekoog-Spitze	Sortenwechsel		Y2	K2
ökologisch		Friedrichsgabekoog	O1	W2		
konventionell	Narbonne2 ¹	Friedrichskoog-Spitze	O2	W1	Sortenwechsel	

¹ Kein Vergleich zwischen den Jahren möglich aufgrund eines Sortenwechsels im Vegetationsjahr 2005.

² Diese Proben konnten für das Jahr 2004 dem jeweiligen Betriebspartner nicht zweifelsfrei zugeordnet werden; es wurde daher für das Jahr 2005 möglicherweise eine andere Zuordnung innerhalb der betreffenden Proben getroffen.

5.2 Unkodierte Probenmaterial

5.2.1 Feldversuch Universität Kassel (Erntejahr 2004)

Die unkodierten Möhrenproben des Jahres 2004 (Sorte: Rodelika) wurden nach den Vorschriften des ökologischen Landbaus erzeugt (EU-Verordnung 2092/91). Es handelte sich um eine Weiterführung des unter 5.1.1 beschriebenen Feldversuchs der Universität Kassel. In diesem Versuch wurden unter anderem die Faktoren „Stickstoffversorgung“ und „biologisch-dynamische Spritzpräparate“ variiert, um Untersuchungsmaterial unterschiedlicher Qualitäten zu erhalten (vgl. FLECK et al., 2005; vgl. Tab. 6). Die Varianten „mN“ erhielten 150 kg Stickstoff/ha in Form von Hornspänen. Die Varianten „mPr“ erhielten zusätzlich die Präparate „Hornmist“ (5 g/ha) und „Hornkiesel“ (300 g/ha).

Tab. 6: Übersicht der unkodierten Möhrenproben aus dem Feldversuch 2004 der Universität Kassel

Anbauvariante	Parzellen-Nr.
ohne Stickstoff, mit Präparate (oNmPr)	P 8
	P 37
	P 82
	P 87
mit Stickstoff, mit Präparate (mNmPr)	P 28
	P 29
	P 74
	P 91

5.2.2 Praxisversuche Öko-Netzwerk I (Erntejahre 2005, 2006)

Das unkodierte Probenmaterial im Vegetationsjahr 2005 und 2006 (Möhren und Zwiebeln) stammte aus den Praxisversuchen des BÖL-Projekts „Netzwerk `Forschung im Ökologischen Gemüsebau` (03OE569) und wurde uns von der Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau (Hannover-Ahlem) abgegeben.

Bei den Möhren handelte es sich um Proben aus dem Praxisversuch „Möhrensor-ten für die Verarbeitung“. In diesem Feldversuch wurden sowohl ökologische als konventionelle Möhrensor-ten nach den Vorschriften des biologisch-dynamischen Landbaus erzeugt (EU-Verordnung 2092/91). Es handelte sich dabei ausschließlich um Spätmöhrensor-ten desselben Standorts (vgl. Tab. 7).

Die Zwiebelproben stammten ebenfalls aus einem Sortenvergleichsversuch. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um ökologisch angebaute Zwiebeln (vgl. Tab. 8).

Tab. 7: Übersicht der unkodierten Möhrenproben des Versuchsjahres 2005 und 2006 aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I

Möhrensorte	Ernte	Saatstärke (Mio. Körner/ha)
Rodelika	nach 160 Tagen	1,2
Rothild		1,2
Canada		0,8
Fontana		0,8
Kamaran		0,8
Joba*		0,8

*Probe stand nur im Erntejahr 2005 zur Verfügung

Tab. 8: Übersicht der unkodierten Zwiebelproben des Versuchsjahres 2005 und 2006 aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I

Zwiebelsorte	weitere Angaben
Hystar*	Biovermehrung
Hyford*	Biovermehrung
Balaton	Biosorte
Bajosta	Biosorte

*Proben standen nur im Erntejahr 2005 zur Verfügung

5.2.3 Praxisversuche Öko-Netzwerk II (Erntejahre 2006)

Im Jahr 2006 standen Möhrenproben aus einem weiteren Praxisversuch des BÖL-Projekts „Netzwerk `Forschung im Ökologischen Gemüsebau`(03OE569) zur Verfügung (vgl. 5.2.2) und wurden uns von der Fachhochschule Osnabrück zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um ökologische und konventionelle Möhren der Sorten Rodelika, Neptun, Kamarin und Karotan. Die ökologischen Möhren waren allesamt gewaschen, die konventionellen ungewaschen.

5.2.4 Betriebsproben LLH (Erntejahr 2006)

Durch Vermittlung des Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) standen uns im letzten Versuchsjahr **gewaschene und ungewaschene Möhren** der Ernte 2006 von drei ökologisch wirtschaftenden Feldgemüse-Erzeugerbetrieben zur Verfügung (vgl. Tab. 9). Außerdem wurden uns Möhren- und **Pastinakenproben** überlassen, die bereits im Lager der Erzeugerbetriebe verdorben waren (vgl. Tab. 10).

Tab. 9: Übersicht der gewaschenen und ungewaschenen Möhrenproben

Betrieb	Sorte, Anbau und Behandlung	Möhren-anbau-fläche	Vor-frucht	Dämme	Düngung	Ernte	Lagerung	Wäsche; Anmerkungen
Pappelhof/ Reichelsheim- Beienheim	Maestro, ökologisch, ungewaschen	k.A.	Weizen	ja	20 kg N, 25 kg K ₂ O über Vinasse	Ende September 2006	0-1°C, 99 % relative Feuchte	nein
	Maestro, ökologisch, gewaschen (Frischwasser)							kurz vor Auslieferung, mit INNOKAT- Gerät, Nachspülen mit Trinkwasser
	Maestro, ökologisch, gewaschen (wiederver- wendetes Wasser; 3 Tage alt)							
Magerhof/ Karben	Bolero, ökologisch, ungewaschen	0,25 ha; Bodenzu- stands- stufe C; Ertrag 60 t	Weizen, dann Luzerne	ja	keine; knappe Be- wässer- ung	Mitte Oktober 2006	0-4°C, 99 % relative Feuchte	nein
	Bolero, ökologisch, gewaschen							Schmutz von Hand eingeweicht und abgebraust; max. 5 Tage vor Verkauf
Luisenhof/ Bad Vilbel	Milano, ökologisch, ungewaschen	0,5 ha	Weizen, dann nach Stallmist- gabe Kartoffeln	ja	keine	Anfang Oktober 2006	0-4°C, 99 % relative Feuchte	nein
	Milano, ökologisch, gewaschen							einfache Wasch- maschine



Tab. 10: Übersicht der verdorbenen Möhren- und Pastinakenproben

Betrieb	verdorbene Probe	Sorte und Anbau	Vorfrucht	Dämme	Düngung	Ernte	Lagerung
Pappelhof/ Reichelsheim- Beienheim	Pastinaken	Halblange Weiße, ökologisch	Weizen	ja	k.A.	Ende August 2006	0-1°C, 99 % relative Feuchte
	Möhren	Maestro, ökologisch				Ende September 2006	
		Nipomo, ökologisch				k.A.	
		Bolero, ökologisch				k.A.	

5.2.5 Probenmaterial ATB (Erntejahr 2006)

Das Institut für Agrartechnik Bornim (ATB) in Potsdam (Abteilung Technik im Gartenbau) stellte uns ökologisch erzeugte **Tomaten** (Sorte: „Liberto“) aus einem Gewächshausanbau zur Verfügung. Die Tomaten wurden am Institut für Agrartechnik bei drei unterschiedlichen Temperaturen gelagert und bei sichtbarem pilzlichen Verderb zur Untersuchung an uns abgegeben. Die Vor- und Nacherntevarianten können aus der Tabelle 11 entnommen werden.

Tab. 11: Übersicht der Vor- und Nacherntevariationen der verdorbenen Tomatenproben

Belichtungsstufe	Reifegrad	Lagervariante	1.Paket Tomaten-Nr. (mit sichtbaren Verderb)	2.Paket Tomaten-Nr. (mit sichtbaren Verderb)	
0 (keine Schattierung)	grün (gerade Umschlag von grün nach orange)	12°C			
		20°C		48, 51, 54	
		Wechsler			
	rot (hellrot)	12°C			
		20°C			247, 267
		Wechsler			319, 325, 334
20 (Schattierung ab 20Lux)	grün	12°C			
		20°C	668		
		Wechsler	139		
	rot	12°C			416
		20°C			
		Wechsler			
40 (Schattierung ab 40 Lux)	grün	12°C			
		20°C	89, 79		
		Wechsler	616	168	
	rot	12°C	399		
		20°C	301, 298	300, 304, 305, 318	
		Wechsler	324		

6 Methoden

6.1 Durchführung der Lagerversuche

Zur Feststellung der Haltbarkeit und zur Analyse der Verderbsflora wurden die kodierte **Möhren** (vgl. 5.1), die Möhren vom Öko-Netzwerkes I (vgl. 5.2.2) sowie die Möhren vom LLH (vgl. Tab. 9) bis zu 7 Monate lang bei 5 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (ca. 99 %, unter Vermeidung von Kondenswasserbildung) gelagert. Als Lagerbehälter wurden Plastikboxen verwendet, die jeweils mit 150 ungewaschenen bzw. 40 gewaschenen Möhren einer Variante bestückt und mit PE-Folie abgedeckt wurden. Zur Probennahme, Aufbereitung und Lagerung der kodierte Möhren wird auf den Endbericht von Projekt 02OE170/F verwiesen (KAHL und BUSSCHER, 2007).

Die Lagerung der **Zwiebeln** erfolgte in handelsüblichen Netzen für 5 Monate bei 7 °C und ca. 60 % relativer Luftfeuchtigkeit.

6.2 Charakterisierung der Mikroflora mit molekularbiologischen DNA-basierten Methoden

Zur Charakterisierung der Mikroflora kamen folgende DNA-basierte Methoden zum Einsatz (vgl. Abb. 1):

- DNA-Isolierung von mikrobiellen Gemeinschaften in Anlehnung an SMALLA et al. (1998) und Reinigung durch den Ultra Clean Soil DNA Kit (Art. Nr. 12800, Fa. MoBio, Carlsbad, USA)¹
- DNA-Isolierung von Pilz-Reinkulturen mit dem Ultra Clean Soil DNA Kit (Art. Nr. 12800, Fa. MoBio, Carlsbad, USA)¹
- DNA-Isolierung von Bakterien-Reinkulturen nach SCHWIEGER u. TEBBE (2000)¹

- SSCP (Single-Strand-Conformation-Polymorphism)-Methode nach TEBBE et al. (2001)¹

- ARDRA (Amplified-Ribosomal-DNA-Restriction-Analysis)-Methode in Anlehnung an LAGACÉ et al. (2004)¹

¹ Siehe Anleitungen im Anhang II bis V



- In Kooperation mit unserem Projektpartner Fa. Nadicom GmbH, Karlsruhe: Analysen der Terminalen Restriktionslängen-Polymorphismen (T-RFLP) nach LIU et al. (1997), Klonierung (pGEM-T® Vector System, Art. Nr. A3600, Fa. Promega) und Sequenzierung (durch Fa. AGOWA, Gesellschaft für molekularbiologische Technologien, Berlin; Partner der Fa. Nadicom GmbH)

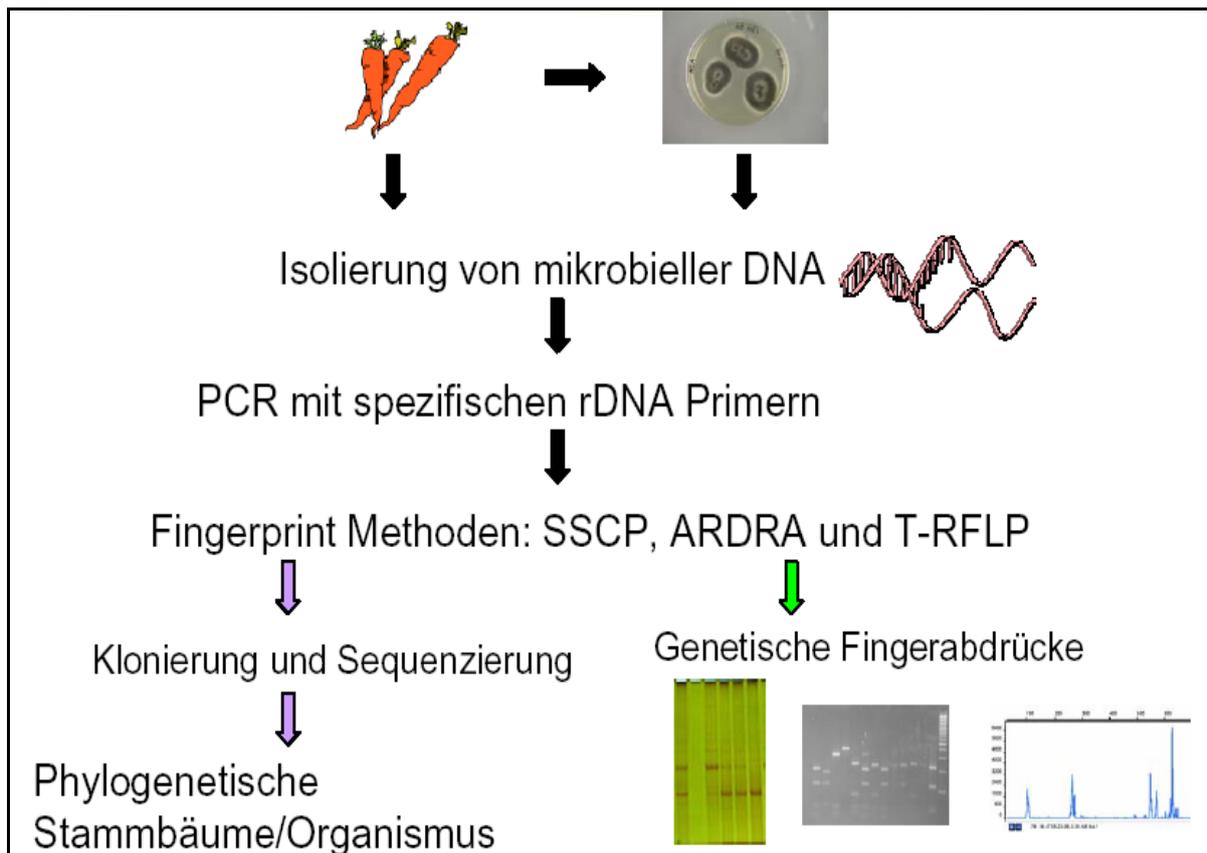


Abb. 1: Übersicht zur Vorgehensweise der molekularbiologischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Verderbsmikroflora

6.2.1 PCR-SSCP-Methode

Die PCR-SSCP ist eine relativ neue Methode, mit der die Diversität mikrobieller Gemeinschaften untersucht werden kann. Weiterentwickelt nach SCHWIEGER und TEBBE (1998) bietet sie gegenüber der sehr ähnlichen Methode der DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese) den Vorteil, dass durch direktes Auftragen einzelsträngiger DNA die Heteroduplexbildung, die durch die Bindung („Reannealing“) von komplementären Einzelsträngen unterschiedlicher Organismen entsteht, ausgeschlossen werden kann.

Bei der SSCP-Methode werden DNA-Moleküle gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz, die in der PCR gewonnen wurden, mit Hilfe des Enzyms Lambda-Exonuklease in einzelsträngige DNA-Moleküle überführt. Nach einer Reinigung der einzelsträngigen DNA werden diese denaturiert und bilden sequenzspezifische Sekundärstrukturen aus, die auf einem Polyacrylamidgel getrennt werden können (vgl. Abb. 2). Laut SCHWIEGER und TEBBE (1998) geht man davon aus, dass grundsätzlich eine Korrelation zwischen der Anzahl der Banden und der Anzahl der Organismenarten bzw. Kopien des Ziel-Gens auf einem SSCP-Gel besteht. Zur Identifizierung von einzelnen Organismen können ausgewählte Banden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert, reamplifiziert und schließlich sequenziert werden.

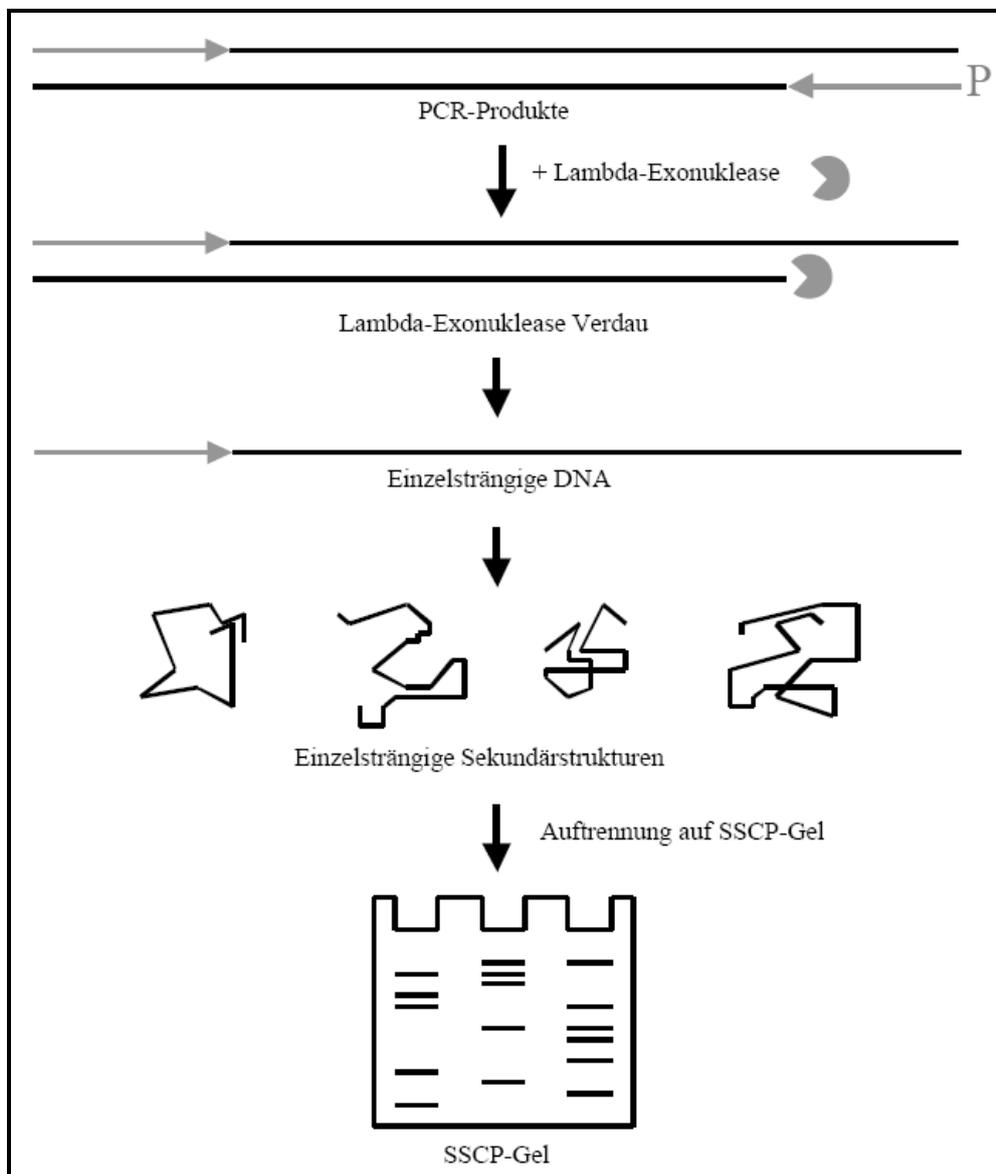


Abb. 2: Schema des Single Strand Conformation Polymorphismus (aus: Seibold, 2002)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen durchgeführt, eine eubakterienspezifische 16S rDNA-PCR sowie eine pilzspezifische 18S rDNA-PCR (vgl. Tab. 12). Die Primer COM1 und COM2-Ph sind spezifisch für Eubakterien. Sie binden an der 16S rRNA der kleinen Untereinheit in den variablen Regionen V4 und V5 und rahmen ein 407 bp großes Fragment ein. Die pilzspezifischen Primer NS7 und NS8-Ph binden an der 18S rRNA der kleinen Untereinheit in den variablen Regionen V8 und V9 und rahmen ein 342 bp großes Fragment ein. Der Phosphatrest (Ph) am 5'-Ende der Reverseprimer ist für die spätere Überführung der Fragmente in Einzelstrangmoleküle wichtig. Er dient als Angriffspunkt für die Lambda-Exonuklease.

Tab. 12: Verwendete PCR-Primer bei der SSCP-Methode (aus: Tebbe, 2001)

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Primer target (positions)	Targeted variable region(s) of the small-subunit rRNA genes	Primer annealing temp. during PCR (°C)
COM1	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	Bacteria (519-536)	V4 and V5	50
COM2	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	Bacteria (907-926)		
NS7	GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC	Fungi (1185-1207)	V8 and V9	50
NS8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	Fungi (1508-1527)		

6.2.2 ARDRA-Methode

Die ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)-Methode ist ein Verfahren, das sich insbesondere für die Analyse von Reinkulturen oder Mischkulturen mit wenigen Komponenten eignet. Bei dieser Technik wird die ribosomale DNA (rDNA) mit universellen Primern amplifiziert und das Produkt wird mit Restriktionsenzymen (4 Basenpaar-Erkennungssequenz) geschnitten. Zur Bestimmung und zum Vergleich der Fragmentlängen-Polymorphismen der unterschiedlichen rDNAs, werden die nach Restriktion erhaltenen Fragmente auf einem Elektrophoresegel getrennt (vgl. Abb. 3).

Um eine bessere Aussage über die Restriktionsmuster bzw. über die Anwesenheit spezifischer phylogenetischer Gruppen und deren Verhältnisse zueinander machen zu können, empfiehlt es sich mehrere Restriktionsenzyme zu verwenden. Folgende regelmäßig in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Restriktionsenzyme kamen bei unseren Untersuchungen zur Analyse der Mikroflora zum Einsatz:



- Restriktionsenzym Hae III (Art. Nr.: R5628, Fa. Sigma-Aldrich): erkennt 5`GCG/C 3`-Sequenzen
- Restriktionsenzym Cfo I (Isoschizomer Hha I; Art. Nr.: R1761; Fa. Sigma-Aldrich): erkennt 5`GG/CC 3`-Sequenzen
- Restriktionsenzym Mbi I (Art. Nr.: ER1271, Fa. Fermentas): erkennt 5`AG/CG 3`-Sequenzen (wurden nur bei Pilzreinkulturen eingesetzt)

Zur Amplifikation der 16S rDNA wurde das Primerpaar F27 (5`-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3`) und R1492 (5`TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3`) eingesetzt. Zur Amplifizierung der 18S rDNA das Primerpaar NS7 (5`-GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC-3`) und NS8 (5`-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3`).

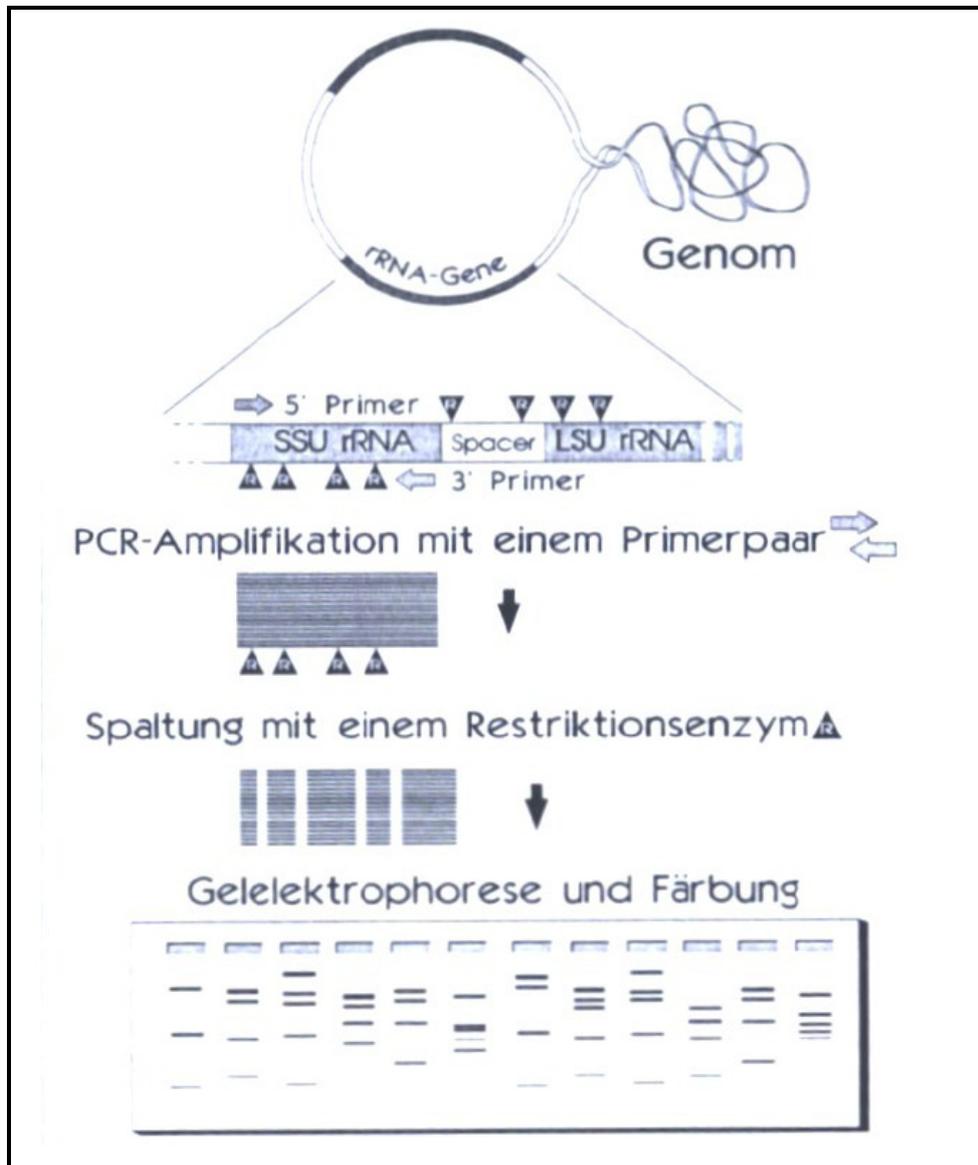


Abb. 3: Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (aus: TICHY et al., 1999)

6.2.3 T-RFLP-Methode

Die T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) ist eine Methode, die aus vorhandenen molekularbiologischen Techniken für die schnelle Analyse komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften entwickelt wurde. Sie basiert bei der PCR Amplifikation und der Restriktion auf die ARDRA (vgl. 6.2.2). Im Unterschied dazu wird jedoch einer der Primer fluoreszenzmarkiert und die Fragmente werden mit einem automatischen DNA-Sequenzierer analysiert (vgl. Abb. 4). Dieser detektiert nur die fluoreszierenden Fragmente (also die terminalen).

Für die 16S rDNA wurden die Primer F27 (GAG TTT GAT C(AC)T GGC TCA G) und R1492 (ACG G(CT)T ACC TTG TTA CGA CCT) sowie das Restriktionsenzym MspI (Art. Nr. ER0541, Fa. Fermentas) verwendet. Für die 18S rDNA die Primer ITS 1 (TCC GTA GGT GCT GCG G) und ITS 4 (TCC TCC GCT TAT ATG C) sowie das Restriktionsenzym TaqI (Art. Nr. R6151, Fa. Promega).

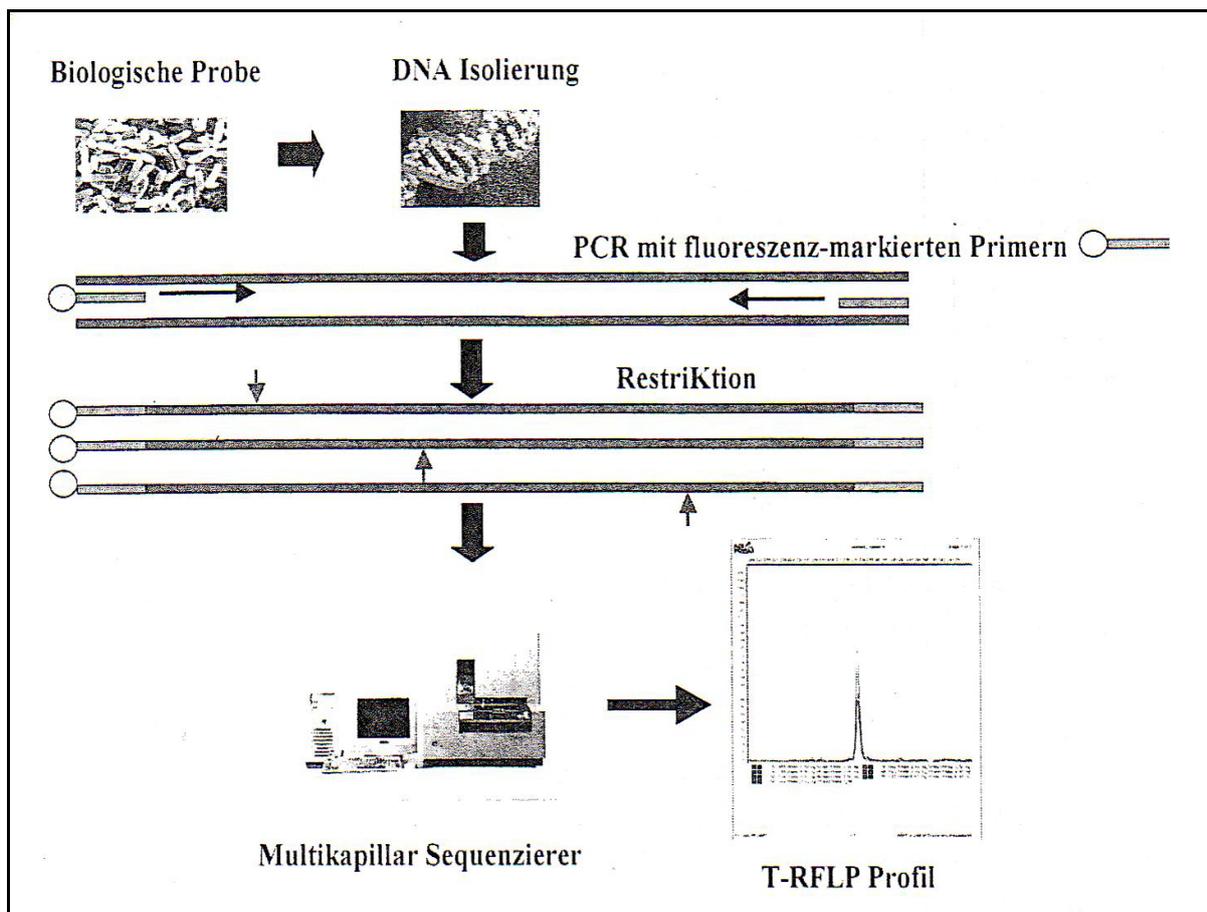


Abb. 4: Schematische Abfolge bei der Bestimmung der Terminalen Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (aus: König, 2002)

6.3 Charakterisierung der Mikroflora mit kultivierungsabhängigen Methoden (Selektivnährmedien)

Die mikrobiologische Untersuchung der **unverdorbenen Möhren** (frisch nach Ernte und nach 7 Monaten Lagerung) wurde parallel zur DNA-Isolierung (in Anlehnung an SMALLA et al., 1998) durchgeführt. Nach der Behandlung von 5 g Möhrenschaalen (in Phosphate-Buffered-Saline und Natrium-Deoxycholat-Polyethylenglycol-Lösung) im Stomacher und der Zentrifuge wurde 1 ml des Überstandes für die Verdünnungsreihe in 0,85 % NaCl eingesetzt. Von jeder Möhrenprobe wurden parallel 3 Untersuchungen in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Anzucht der Enterobakterien erfolgte auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose (VRBG, Fa. MERCK, Art. Nr.: 10275) -Agar (Tropfplattenverfahren) bei 30°C im Brutschrank. Zur Anzucht der Pilze wurde Malzextrakt-Agar (MEA, Fa. MERCK, Art. Nr.: 5398) und Dichloran-Glycerol (DG 18, Fa. OXOID, Art. Nr.: CM729) - Selektivnährböden eingesetzt (Spatelverfahren). Im zweiten und dritten Versuchsjahr wurden zur besseren Floren-Erfassung noch Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (Fa. MERCK, Art. Nr.: 3750), Potato-Carrot-Agar (PCA; vgl. SAMSON 2000), Potato-Dextrose-Agar (PDA; vgl. SAMSON, 2000), Möhrensaft-Agar (vgl. KRÖBER 1985), Möhrenschnitzel-Agar (vgl. KRÖBER 1985) und Wasser-Agar (Fa. OXOID, Art. Nr.: LP0013) verwendet sowie zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora MEA zusätzlich mit Chloramphenicol (Fa. OXOID, Art. Nr.: SR78) versetzt.

Bei den **gewaschenen und ungewaschenen Möhren** (vgl. 5.2.3, vgl. 5.2.4) wurde für 24 Stunden eine Möhrenscheibe auf das Nährmedium ausgelegt. Von **verdorbenen Proben** wurde mazeriertes Gewebe direkt aufgebracht. Die Inkubation der Nährböden erfolgte bei Zimmertemperatur für 7 Tage. Danach erfolgte eine Isolierung der Pilzgattungen bzw. -arten auf MEA-Platten. Die Identifizierung erfolgte so weit möglich durch mikroskopische Bestimmung (vgl. Abb. 5).

Bei Pilzreinkulturen, bei denen sich eine mikroskopische Bestimmung als sehr schwierig erwies, wurde eine Direkt-Sequenzierung von PCR-amplifizierten Fragmenten der ITS (Internal-Transcribed-Spacer) und eine Identifizierung mit Hilfe einer Sequenz-Datenbank (NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt.

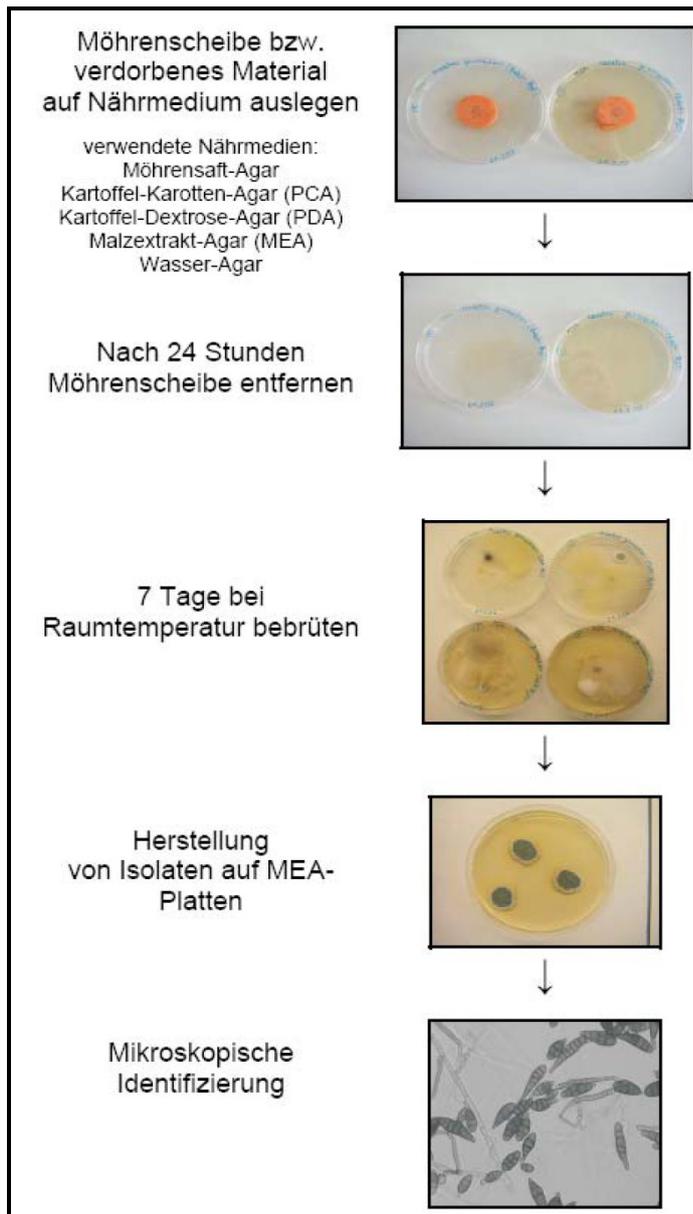


Abb. 5: Vorgehensweise zur mikrobiologischen Untersuchung

6.4 Untersuchungen zur Anfälligkeit gegenüber phytopathogenen Pilzen (Wund-Inokulation)

Bei der Wund-Inokulation wurde gezielt die Anfälligkeit bzw. das Abwehrverhalten intakter Möhren anhand der Ausbreitung eines inokulierten Pilzes geprüft (vgl. Abb. 6). Dabei wurde die Ausbreitung des mazerierten Gewebes laufend gemessen. Als Impfmateriale dienten mit Pilzmycel bewachsene Agarstücke. Zur Beimpfung der Möhrenvarianten wurden die von Möhren isolierten und vorkultivierten phytopathogenen Pilze *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* verwendet. Im letzten Versuchsjahr wurden zusätzlich Pilzstämme eingesetzt, die von verdorbenen Möhren durch DNA-basierte Methoden (vgl. 6.2) als mutmaßliche Verderbniserreger

identifiziert worden waren (vgl. Tab. 29 in 7.2.3, *Cystofilobasidium bisporidii*, CBS 6346; *Tetracladium marchalianum*, CBS 120215; vgl. 7.3.2.2).

Von jeder Pilzkolonie wurde mit einem Korkbohrer (\varnothing 5 mm) kreisrunde Stücke ausgestochen und diese in die vorgestanzten Löcher der Möhre eingesetzt. Um eine Sekundärinfektion zu unterdrücken, wurde vor der Beimpfung die Möhrenoberfläche gewaschen und leicht mit Spiritus desinfiziert.



Abb. 6: Wund-Inokulation von Möhren mit phytopathogenen Pilzen

Jeder Pilzstamm wurde jeweils in 5 Möhren pro Variante eingesetzt. Dazu wurde mit einem Korkbohrer (\varnothing 5 mm) bei den Möhren jeweils der Länge nach verteilt 3 Löcher ausgestanzt, und in diese das mycelbewachsene Agarstück eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 21 Tage im Klimaschrank (*Botrytis cinerea*: 5°C, 90 % relative Luftfeuchte; *Fusarium spec.*: 8°C, 70 % relative Luftfeuchte) in handelsüblichen Plastik-Kleingefäßen und einer Abdeckung durch PE-Folie. Im Gefäß wurde eine relative Feuchte von 80 % gemessen, zur Bildung von Kondenswasser kam es nicht. Die Messung des mazerierten Gewebes erfolgte alle 7 Tage. Die Größe des Mazerationshofes wurde durch Messung des vertikalen und des horizontalen Durchmessers ermittelt. Aus dem Mittelwert aller gemessener Durchmesser

(abzüglich 5 mm Bohrloch) pro Variante wurde die Fläche des Mazerationshofes berechnet ($F = \pi \cdot r^2$).

Die gewonnenen Daten der Wund-Inokulation wurden dem Projekt 02OE170/F zur Verfügung gestellt und mit Ergebnissen anderer Messmethoden in einer zentralen Datenverarbeitung korreliert (vgl. KAHL und BUSSCHER, 2007; vgl. Anhang XI: Teilbericht zum Datenaustausch von Projekt 03OE191).

6.5 Untersuchungen zur Änderung in der Festigkeit während der Lagerung

Die Änderungen in der Festigkeit der Möhrenproben wurden mit dem Texture Analyser (TA.XT2 der Firma Stable Micro Systems) unter Verwendung einer Kugelsonde ermittelt (vgl. Abb. 7). Gemessen wurde die Kraft, die bei einer Geschwindigkeit von 1 mm/Sekunde für eine Eindringtiefe der Sonde auf 2 mm aufgewendet werden musste. Die Festigkeitsmessung erfolgte an drei definierten Querschnitten (1 cm) pro Möhre, jeweils quer zur Wurzelachse, und zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (1 Woche nach Möhrenernte bzw. direkt nach Probenanlieferung, nach 4 und nach 8 Wochen Lagerung bei 5 °C und 99 % relative Luftfeuchte).

Die Daten aus der Festigkeitsmessung wurden dem Projekt 02OE170/F zur Verfügung gestellt und mit Ergebnissen anderer Messmethoden in einer zentralen Datenverarbeitung korreliert (vgl. KAHL und BUSSCHER, 2007; vgl. Anhang XI: Teilbericht zum Datenaustausch von Projekt 03OE191).



Abb. 7: Texture Analyser mit Kugelsonde (TA.XT2, Fa. Stable Micro Systems)

6.6 pH-Wert-Messung

Für die Bestimmung des pH-Wertes wurden die Möhrenproben mit einer Küchenmaschine entsaftet. Eingesetzt wurden 40 g Möhrensaft. Die pH-Wert-Messung erfolgte mit dem Digital-pH-Meter Typ 647 der Firma Knick an zwei Zeitpunkten (frisch und nach 6 Monaten Lagerung).

6.7 Statistische Auswertung

Die Streubreite der Ergebnisse und die Messunsicherheit der **DNA-basierten Methoden** wurden durch statistische Auswertung der Ergebnisse von mindestens 3 Parallelen pro Probe (d.h. 3 Präparate aus einem Homogenat) und Methode ermittelt (ausgenommen T-RFLP). Zusätzlich wurde die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster von Bakteriengemeinschaften auf SSCP- und ARDRA-Gelen mit der Computersoftware GelScan 5.1 Professional (Fa. BioSciTec, Frankfurt/Main) ausgewertet. Hierbei wurden die Bandenmuster mittels Clusteranalyse verglichen

und mit Hilfe eines UPGMA-Dendrogramms (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) dargestellt (vgl. Abb. 8). Dabei ergaben sich folgende Schwierigkeiten:

- Bei Gelen, bei denen die Banden im Hintergrund verschwinden, ist es unmöglich, alle Banden mit GelScan zu erfassen. In diesem Fall erfolgte die Konzentration auf die dominantesten Banden.
- Das Programm erfasst nur Banden, die eine gewisse Intensität besitzen. Sind Parallelproben unterschiedlich stark konzentriert, ist es möglich, dass Banden mit der gleichen Position nicht von den Programmen erfasst werden. In diesem Fall wurden die entsprechenden Banden manuell ergänzt.

Wegen ihrer komplexen Struktur war es weder im Rahmen dieses Projekts noch im Rahmen des Projekt 02OE170/F (KAHL und BUSSCHER, 2007) möglich, die Daten aus den Dendrogrammen so aufzuarbeiten, dass sie in der zentralen Datenbank des Projekt 02OE170/F eingebracht und in die statistischen Berechnungen zur Diskriminanz „ökologisch versus konventionell“ einbezogen werden konnten.

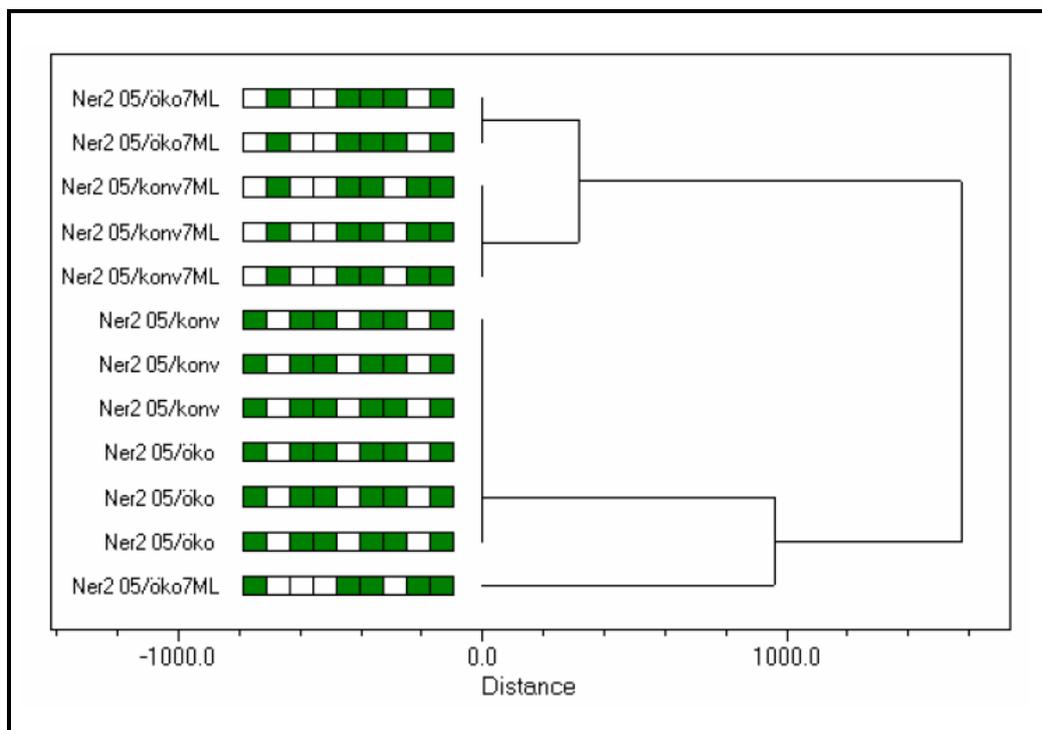


Abb. 8: Beispiel eines UPGMA-Dendrogramms (erstellt mit GelScan 5.1 Professional, Fa. BioSciTec, Frankfurt/Main) zur Unterscheidung von genetischen Fingerprints der SSCP- und ARDRA-Methode

Die Bestimmung der Verwandtschaft zu anderen Organismen erfolgte durch einen Gen-Datenbankvergleich mit der NCBI-Datenbank (National Center for

Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unter BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der Organismen untereinander zu bestimmen, wurden die entsprechenden Sequenzen in einem „Multiple Alignment“ (d.h. mehrere Sequenzen werden gleichzeitig analysiert) mit Hilfe der MegAline-Software (DNASar Inc., Madison, USA) verglichen und in einem Dendrogramm (neighbour joining distance tree) dargestellt.

Die statistische Auswertung der **Wund-Inokulation** und der **Festigkeitsmessung** erfolgte durch das Statistikprogramm SPSS (Statistical Package of Social Sciences, Version 11). Zur Beurteilung der Frage, ob sich die Infektionsanfälligkeit und die Festigkeit aller Probenpaare statistisch signifikant voneinander unterscheidet, wurden die Mittelwerte mit dem t-Test und ANOVA verglichen, auf der Basis einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Die Pearson-Korrelation wurde eingesetzt, um (a) die Festigkeitsänderung während der Lagerung einer Möhrenvariante zu beurteilen sowie (b) bei Varianten gleicher Sorte, Herkunft und Anbauform erntejahrbedingte Unterschiede zu erfassen. Die statistischen Methoden und Tests beruhen auf der Annahme einer normalverteilten Grundgesamtheit des untersuchten Merkmals. Zur Kennzeichnung des Signifikanzniveaus kommen folgende Zeichen zur Anwendung:

- *** \leq 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit
- ** \leq 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit
- * \leq 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit

7 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

7.1 Lagerverhalten

Während der Lagerung von 7 Monaten bei 5 °C verdarben bei den **kodierten Proben** vier von 34 Möhrenvarianten durch pilzlichen Befall nach 4 und 6 (Vegetationsjahr 2004) bzw. 5 Monaten (Vegetationsjahr 2005). Zweimal handelte es sich dabei um ökologische Feldversuchsproben des Vegetationsjahrs 2004, die zusätzlich mit organischem Stickstoff (150 kg N/ha, als Hornspäne) gedüngt worden waren (vgl. 5.1.1). Bei den anderen verdorbenen Möhrenvarianten handelte es sich um eine ökologisch (Nerac4, 2005) und eine konventionell erzeugte Probe (Narbonne2, 2004) aus zwei verschiedenen Erzeugerbetrieben (vgl. 5.1.2). Die **unkodierten Möhrenproben** (vgl. 5.2) zeigten bei Abbruch der Lagerung keinen sichtbaren Verderb.

Der Vergleich der Lagerung von **gewaschenen und ungewaschenen Möhren** vom LLH (vgl. Tab. 9) zeigte keinen sichtbaren pilzlichen Verderb bei den ungewaschenen Möhren. Von den gewaschenen Möhren verdarben nach 3 Monaten zuerst die Möhren, die mit wiederverwendetem Wasser gewaschen wurden. Bei Abbruch der Lagerung nach 6 Monaten waren die mit wiederverwendetem Wasser gewaschenen Möhren zu 100 % und die mit frischem Wasser gewaschenen Möhren zu 80 % durch Pilze verdorben.

Die **Zwiebelproben** (vgl. 5.2.2) waren nach 5 Monaten Lagerung vollständig verdorben.

7.2 Ergebnisse zur Charakterisierung der Mikroflora

7.2.1 DNA-basierte Analyse

7.2.1.1 SSCP- Methode

7.2.1.1.1 SSCP von 16S rDNA

SSCP-Fingerprints von Bakteriengemeinschaften wurden von den kodierten Möhrenproben (vgl. 5.1) und den Möhren- und Zwiebel-Proben vom Öko-Netzwerk I erstellt (vgl. 5.2.2). Obwohl die Möhrenproben zum größten Teil keinen sichtbaren Verderb aufwiesen (vgl. 7.1), konnte genug bakterielle DNA isoliert werden, um eine

Amplifizierung mit den spezifischen Primern (vgl. Tab. 12) vorzunehmen und eine anschließende SSCP durchzuführen (vgl. Abb. 9).

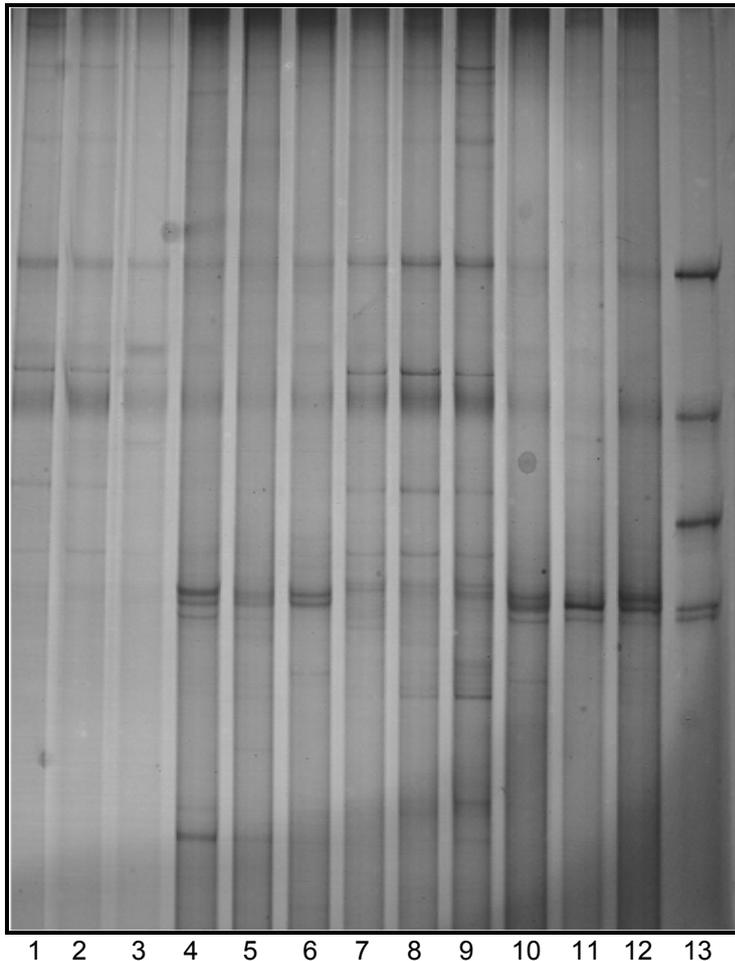


Abb. 9: Beispiel eines SSCP-Gels mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (407 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus und Lagerzeit

[1-3: Nerac3 konventionell frisch, 4-6: Nerac3 konventionell nach 7 Monaten Lagerung, 7-9: Nerac3 ökologisch frisch, 10-12: Nerac3 ökologisch nach 7 Monaten Lagerung, 13: Bakterien-Standard der FAL Braunschweig (*Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Rhizobium radiobacter*)]

Um lager- und anbaubedingte Verschiebungen in der Bakterienflora nachzuweisen wurde die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster mit Hilfe eines UPGMA Dendrogramms dargestellt und mittels Clusteranalyse verglichen (vgl. 6.7; vgl. Anhang VI: Clusteranalyse der SSCP-Fingerprints von Bakteriengemeinschaften der kodierten Feldversuch- und Erzeugerproben).

Bei den **Feldversuchproben** ergaben sich in 4 von 12 paarweisen Vergleichen identische Fingerprints der Bakteriengemeinschaften. Drei dieser Fälle traten bei der Möhrensorte „Rodelika“ auf (vgl. Tab. 13). Die **Erzeugerproben** zeigten in 2 von 20 paarweisen Vergleichen identische Fingerprints von Bakteriengemeinschaften. Diese traten nur im zweiten Vegetationsjahr auf und verteilten sich auf zwei verschiedene

Betriebspaare (vgl. Tab. 14). Insgesamt war beim paarweisen Vergleich der Einfluss der Anbauform auf die Zusammensetzung der Bakterienflora (Basis: SSCP-Methode) im ersten Versuchsjahr etwas höher als im zweiten bzw. dritten (bei Feldversuchproben) Versuchsjahr, und zwar sowohl vor und nach Lagerung der Möhren.

Tab. 13: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster auf SSCP-Gelen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Feldversuchproben)

Probenvergleichs-paar und Anbauform		SSCP-Cluster-Distanzen (Einheiten) von Bakteriengemeinschaften					
		Vegetationsjahr 2004		Vegetationsjahr 2005		Vegetationsjahr 2006	
		frisch	nach 7 Monaten Lagerung	frisch	nach 7 Monaten Lagerung	frisch	nach 7 Monaten Lagerung
Feldversuch-proben	Rodelika mit N/ Rodelika ohne N	750	850	0	3	28	28
	Rothild mit N/ Rothild ohne N	0	45	45	5	0	0

Tab. 14: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster auf SSCP-Gelen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Erzeugerproben)

Probenvergleichs-paar und Anbauform		SSCP-Cluster-Distanzen (Einheiten) von Bakteriengemeinschaften			
		Vegetationsjahr 2004		Vegetationsjahr 2005	
		frisch	nach 7 Monaten Lagerung	frisch	nach 7 Monaten Lagerung
Erzeuger-proben bzw. Betriebs-vergleiche	Narbonne1 ökologisch/ Narbonne1 konventionell	1450	1450	900	900
	Nerac1 ökologisch/ Nerac1 konventionell	1650	1650	0	750
	Nerac2 ökologisch/ Nerac2 konventionell	1600	1450	400	0
	Nerac3 ökologisch/ Nerac3 konventionell	1850	1100	700	350
	Nerac4 ökologisch/ Nerac4 konventionell	Sortenwechsel		370	300
	Narbonne2 ökologisch/ Narbonne2 konventionell	1500	1500	Sortenwechsel	

Die **Möhrensorten vom Öko-Netzwerk I** unterschieden sich bezüglich des SSCP-Fingerprints ihrer Bakterienflora im frischen Zustand nicht, weder im Versuchsjahr 2005 noch im Versuchsjahr 2006. Nach der Lagerung von 7 Monaten hingegen zeigten die Möhren – bis auf die Sorten „Canada“ und „Rodelika“ – in beiden Jahren sehr heterogene Bandenmuster im SSCP-Gel (vgl. Abb. 10 und 11).

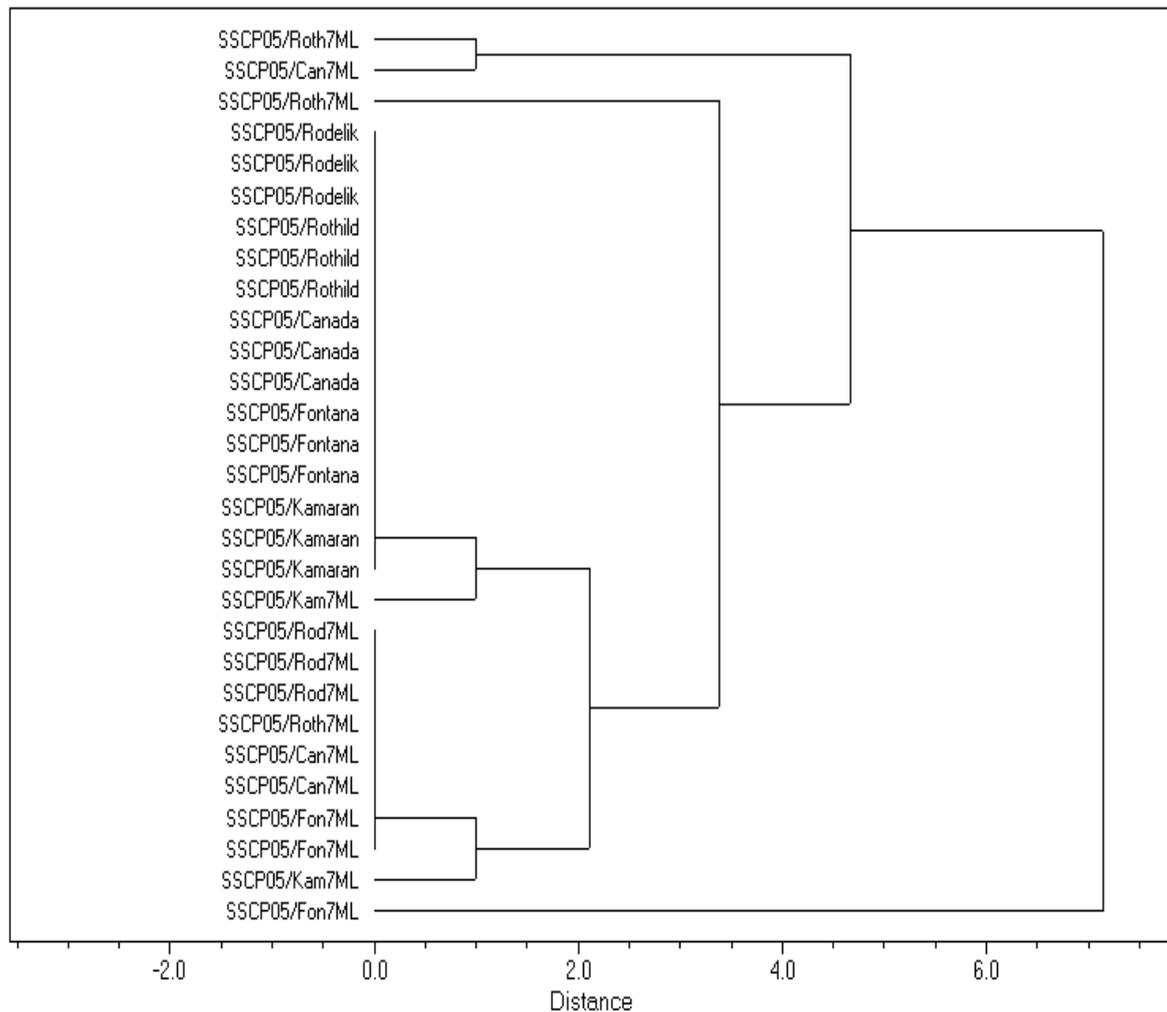


Abb. 10: UPGMA-Dendrogramm der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung; Erntejahr 2005)

[Roth = Rothild, Kam = Kamaran, Rod + Rodelik = Rodelika, Can = Canada, Fon = Fontana, 7ML = nach 7 Monaten Lagerung]

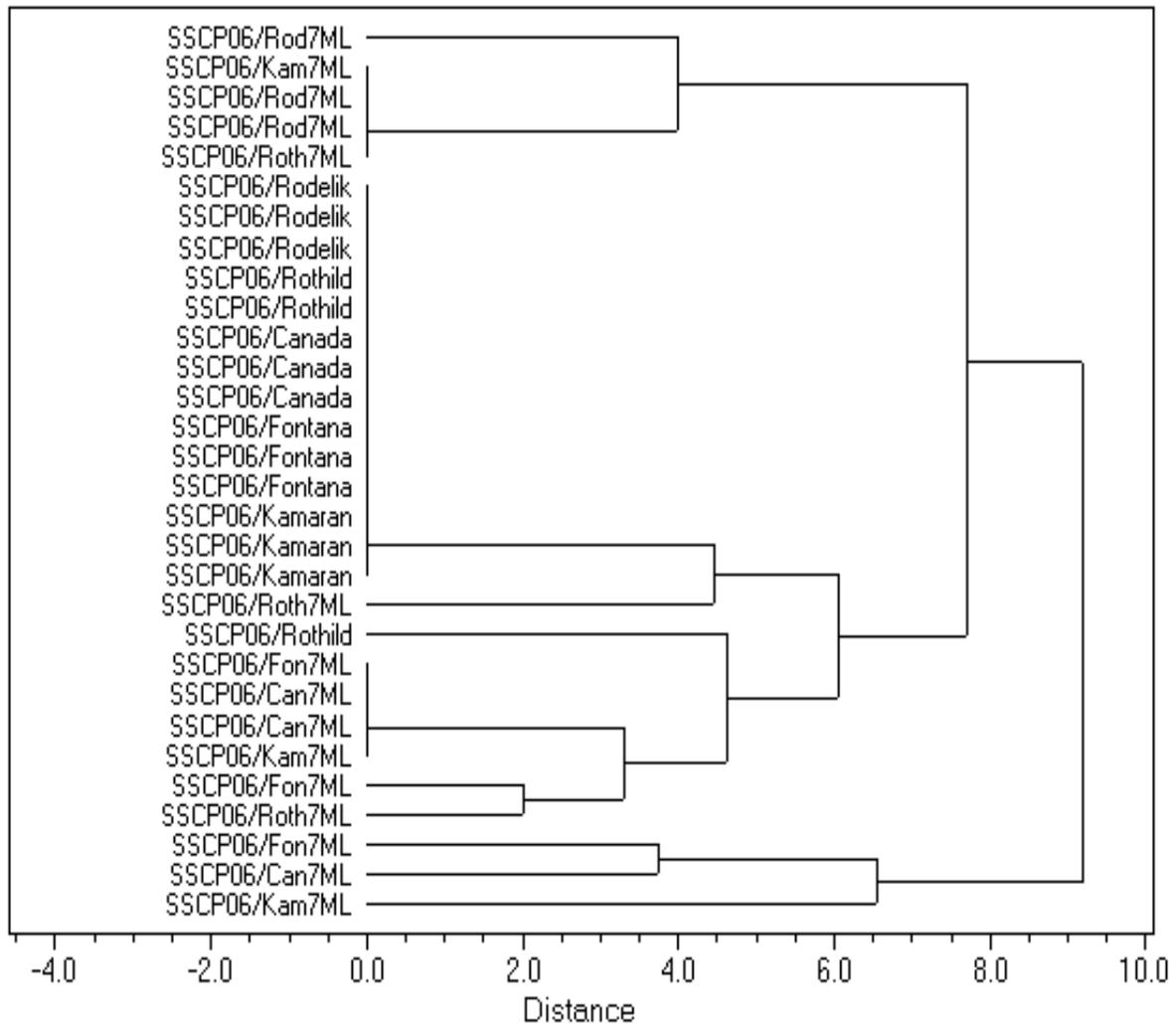


Abb. 11: UPGMA-Dendrogramm der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung, Erntejahr 2006)

[Roth = Rothild, Kam = Kamaran, Rod + Rodelik = Rodelika, Can = Canada, Fon = Fontana, 7ML = nach 7 Monaten Lagerung]

Die Analyse der Bakteriengemeinschaften der verdorbenen **Zwiebelproben** ergab relativ viele schwache und unscharfe Banden auf dem SSCP-Gel. In beiden Versuchsjahren zeigte die Sorte „Bajosta“ eine größere Vielfalt an Banden als die Sorte „Balaton“ (vgl. Abb. 12).

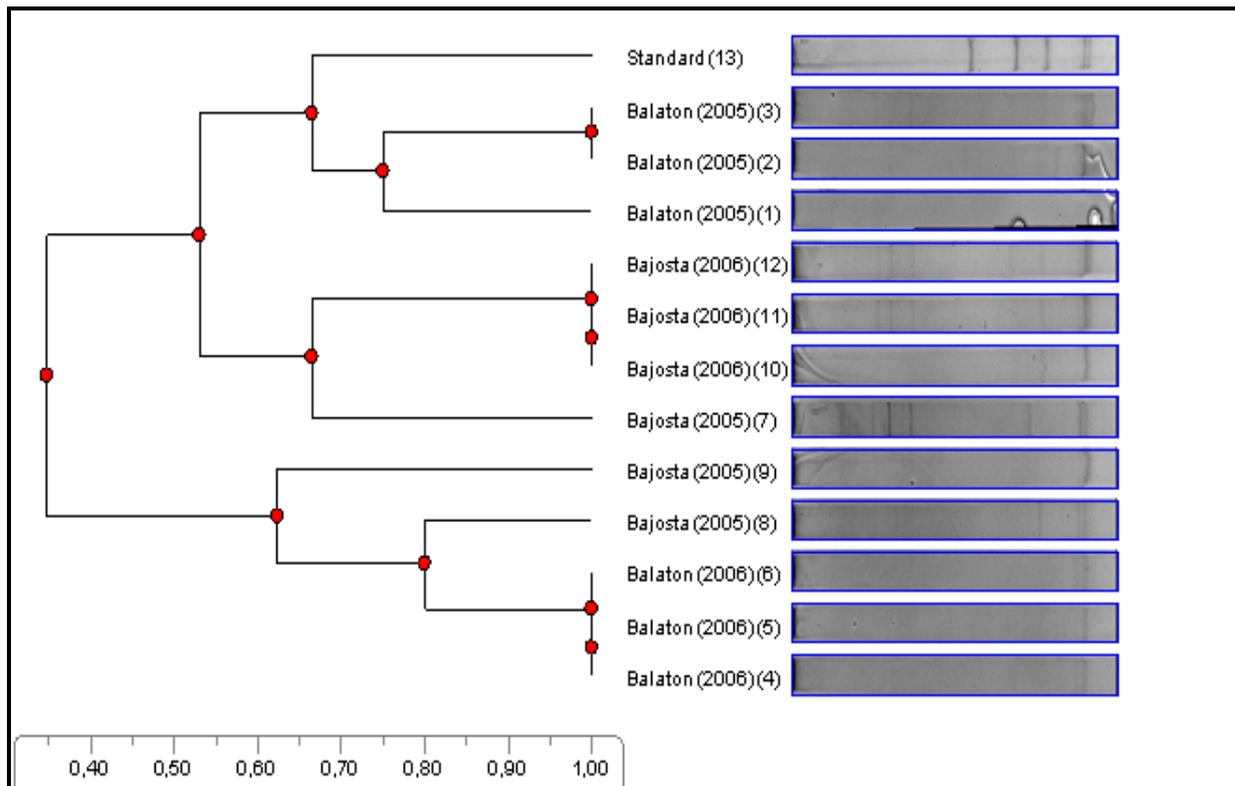


Abb. 12: SSCP-Gel und UPGMA-Dendrogramm (Ähnlichkeit in %; erstellt mit TotalLab 120, Fa. Biostep/ Jahnsdorf) der einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (407 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von verdorbenen Zwiebeln nach 5 Monaten Lagerung (2005/2006)

[Standard: Bakterien-Standard der FAL Braunschweig (*Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Rhizobium radiobacter*)]

Neben den genetischen Fingerabdrücken von bakteriellen Gemeinschaften wurde zusätzlich auch ein SSCP-Gel von Bakterienreinkulturen angefertigt, die mittels kultivierungsabhängiger, mikrobiologischer Methoden gewonnen wurden (vgl. 6.3). Bei den Bakterienreinkulturen handelte es sich ausschließlich um Enterobakterien, die von den frischen und von den mit sichtbarem mikrobiellem Verderb betroffenen Möhrenvarianten isoliert wurden. Wie aus der Abbildung 13 ersichtlich, sind die Bandenmuster der Enterobakterien von den frischen Möhren unterschiedlich zu denen der gelagerten Möhren. Es scheint, dass bei den gelagerten Möhren andere Enterobakterienarten vorhanden sind. Dies könnte ein Hinweis auf eine Verschiebung der Mikroflora während der Lagerung sein. Bei den Lanes 1 bis 4 sowie bei den Lanes 9 und 10 scheint es sich jeweils um gleiche Enterobakterienarten zu handeln.

Auf Grundlage dieser Musterunterschiede führten wir mit ausgewählten Proben einen Test zur Ermittlung des Phänotyps von Enterobakterien auf Basis ihrer

biochemischen Reaktionen durch (API 20E, Fa. BioMérieux, Frankreich). Ausgewertet wurde der Test mit der Computersoftware APILAB (Fa. BioMerieux, Frankreich). Der Test ergab:

- Phänotyp 1: *Chryseomonas luteola* (96,7%)
- Phänotyp 2: ähnlich *Brucella* spp. (70%)

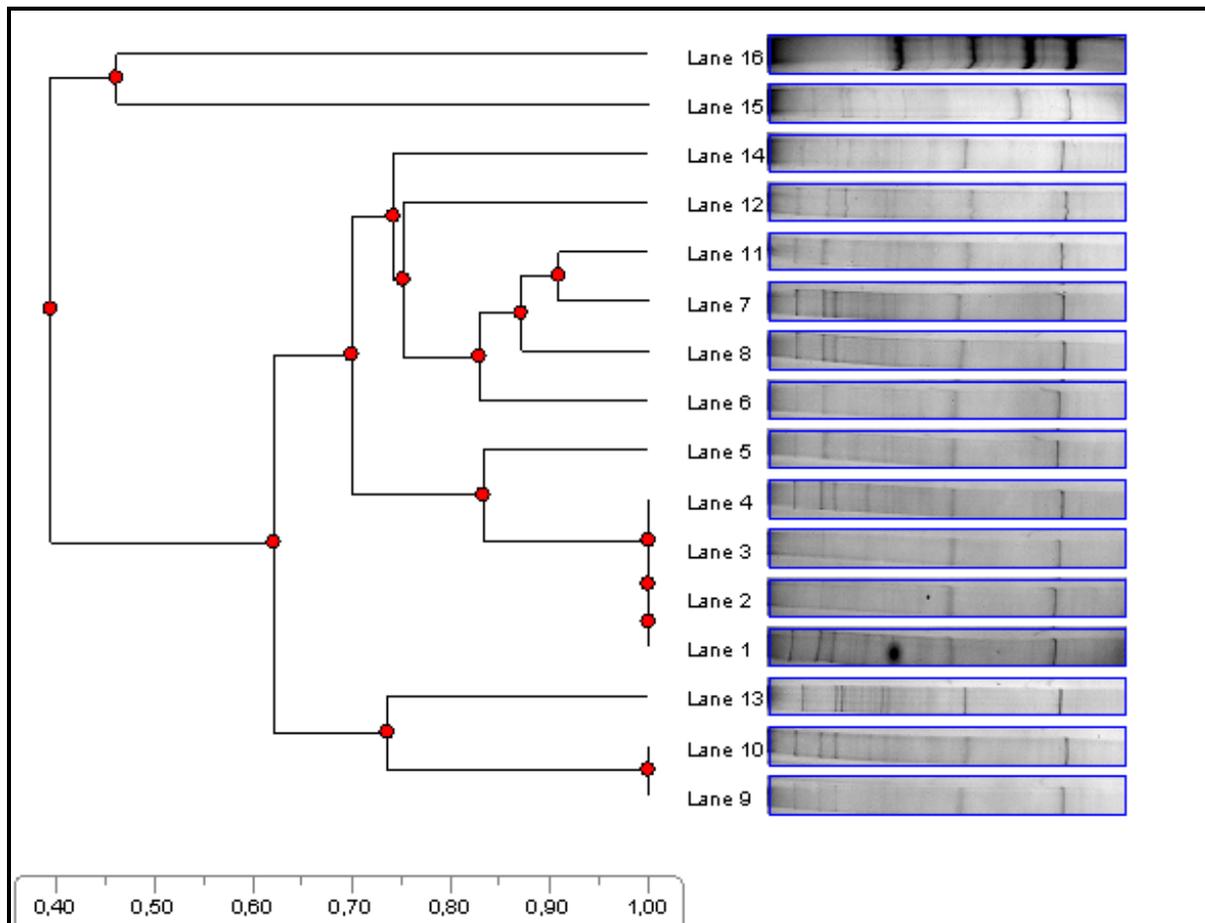


Abb. 13: SSCP-Gel und UPGMA-Dendrogramm (Ähnlichkeit in %; erstellt mit TotalLab 120, Fa. Biostep/ Jahnsdorf) der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen von Enterobakterien, isoliert von der Oberfläche von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums (Anzucht auf VRBG-Platten; DNA-Isolierung nach SCHWIEGER u. TEBBE, 2000)

[1-8: frisch, 9-15: nach 4 bzw. 6 Monaten Lagerung, 16: Bakterien-Standard der FAL Braunschweig (*Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Rhizobium radiobacter*); 12 = Phänotyp 1, 1 = Phänotyp 2, 13+15 = Phänotyp 3 + 4]

7.2.1.1.2 SSCP von 18S rDNA

Im Gegensatz zu den genetischen Fingerprints der Bakteriengemeinschaften bestanden die Muster auf den SSCP-Gelen der Pilzgemeinschaften aus einer geringeren Anzahl an Banden (vgl. 7.2.1.1.1). Bei den unverdorbenen Möhren traten meist dominante Banden in der Mitte und in der oberen Hälfte des Gels auf. Abweichende Bandenmuster gab es bei diesen Proben nur selten. Wie sich nach der Sequenzierung dieser Banden herausstellte, handelte es sich dabei ausschließlich

um pflanzliche (Möhren-) DNA. Die Erstellung der pilzlichen Fingerprints von drei der vier verdorbenen Möhrenvarianten sowie der verdorbenen Zwiebeln (vgl. 7.1) war hingegen erfolgreich. Das gleiche gilt für die Fingerprints der bereits verdorbenen Möhren- und Pastinakenproben des LLH (Tab. 10) und die der verdorbenen Tomaten (vgl. 5.2.5). Ausgewählte DNA-Banden aus diesen SSCP-Gelen wurden anschließend sequenziert und über eine Gendatenbank (NCBI - National Center for Biotechnology Information) einer Pilzart zugeordnet.

Bei der **Feldversuchprobe** „Rothild mit N“ wurden die Pilze *Penicillium chrysogenum*, *Sistrotrema semanderi* sowie eine neue Pilzart mittels der SSCP-Methode nachgewiesen (vgl. Abb. 14). Auf den zwei verdorbenen **Erzeugerproben** fanden sich *Leucosporium spec.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cystofilobasidium bisporidii*, *Chalara hyalina*, *Tetracladium spec.*, *Candida austromariana*, *Dictyostelium mucoroides* sowie eine neue Pilzart (vgl. Abb. 15, vgl. Abb. 16), insgesamt alle Pilze, die durch die klassische mikrobiologische Bestimmung nicht kultiviert werden konnten (vgl. 7.2.2.1).

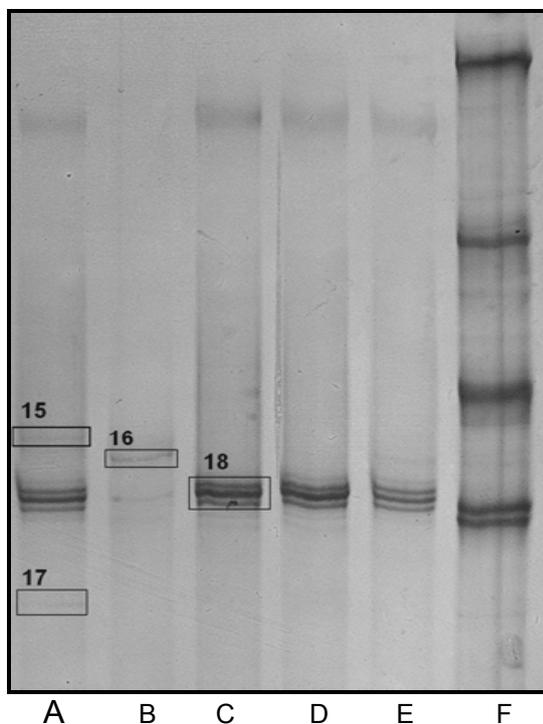


Abb. 14: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von der verdorbenen Feldversuchprobe „Rothild mit N (2004)“

[A+B: Rothild stark verdorben, C-E: Rothild leicht verdorben, F: Bakterien-Standard der FAL Braunschweig (*Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Rhizobium radiobacter*) /15: neue Art, 16: *Penicillium chrysogenum*, 17: *Sistrotrema semanderi*, 18: Möhren-DNA]

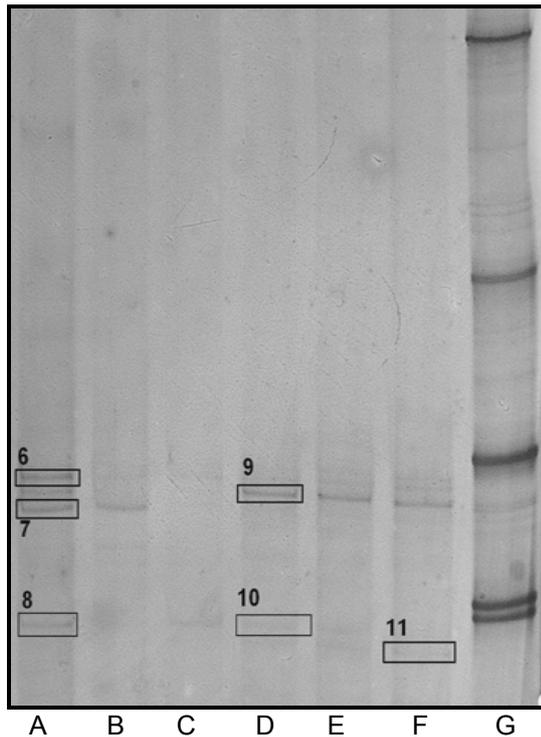


Abb. 15: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von der verdorbenen Erzeugerprobe „Narbonne2 konventionell (2004)“

[A-C: Narbonne2 stark verdorben, D-F: Narbonne2 leicht verdorben, G: Bakterien-Standard der FAL Braunschweig (*Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Rhizobium radiobacter*)/6: *Leucosporium spec.*, 7: *Sclerotinia sclerotiorum*, 8: Sequenz nicht auswertbar, 9: Möhren-DNA, 10: *Cystofilobasidium bisporidii*, 11: neue Art)

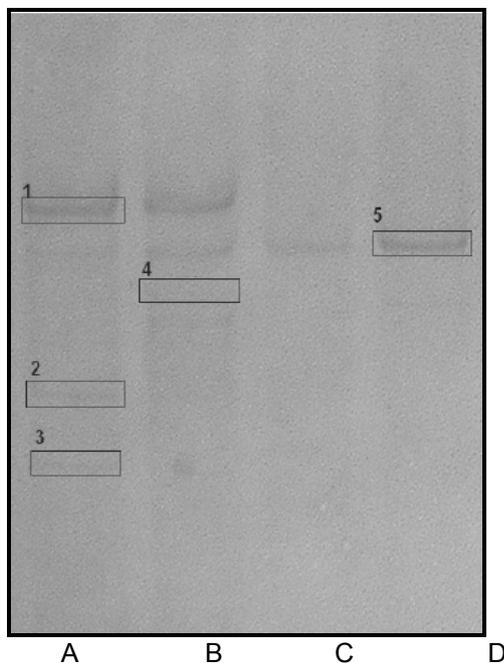


Abb. 16: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von der verdorbenen Erzeugerprobe „Nerac4 ökologisch (2005)“

[A-C: Nerac4 stark verdorben, D: Nerac4 unverdorben/1: *Chalara hyalina*, 2: *Tetracladium spec.*, 3: *Dictyostelium mucoroides*, 4: *Candida austromariana*, 5: *Sclerotinia sclerotiorum*]

Auf den verdorbenen **Möhrenproben des LLH** (vgl. Tab. 10) wurden auf der Basis von SSCP-Banden die Pilzarten *Nectria lugdunensis*, *Tetracladium furcatum* und *Sclerotinia sclerotiorum* nachgewiesen. Bei den verdorbenen **Pastinakenproben** wurden zwei neue *Pezizomycotina* –Arten identifiziert (vgl. Abb.17).

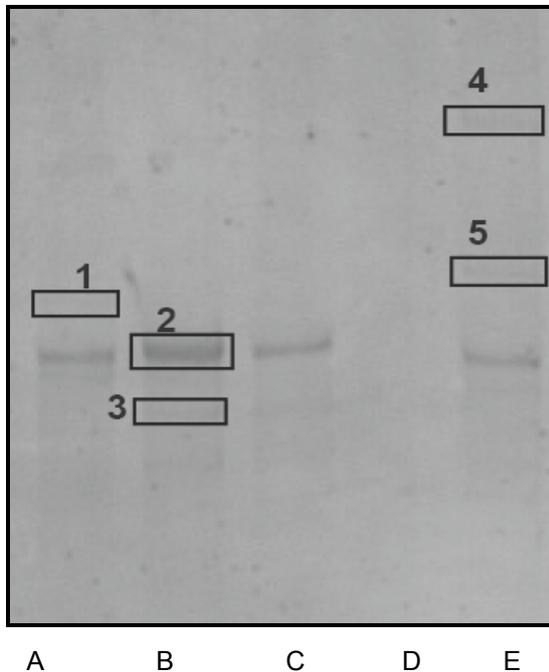


Abb. 17: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von verdorbenen Möhren- und Pastinakenproben des LLH (Ernte 2006)

[A: verdorbene Möhrensorte „Maestro“, B+C: verdorbene Möhrensorte „Bolero“, D+E: verdorbene Pastinake/ 1: *Nectria lugdunensis*, 2: *Sclerotinia sclerotiorum*, 3: *Tetracladium furcatum*, 4+5: uncultured *Pezizomycotina*]

Die Banden aus dem SSCP-Gel der verdorbenen **Zwiebeln** wurden den Pilzen *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium glabrum*, *Galactomyces geotrichum*, einer neuen *Aspergillus*-Art sowie der Zwiebelart *Allium thunbergii* zugeordnet (vgl. Abb. 18). Die *Penicillien* waren auch mit kultivierungsabhängiger Methode nachweisbar gewesen (vgl. 7.2.2.2.1). Wie in der Abbildung 18 zu erkennen, traten mehrere Banden eines Organismus auf (siehe *Penicillien*: Banden 1 + 2). Das Auftreten von mehreren Banden eines Organismus kann nach SEIBOLD (2002) unterschiedliche Ursachen haben: Entweder besitzt der Organismus unterschiedliche Varianten eines Gens, dessen einzelsträngige DNA aufgrund der verschiedenen Sequenzen ein unterschiedliches Laufverhalten aufweist, oder das einzelsträngige DNA-Molekül bildet mehrere Sekundärstrukturen mit jeweils unterschiedlichem Laufverhalten auf dem SSCP-Gel.

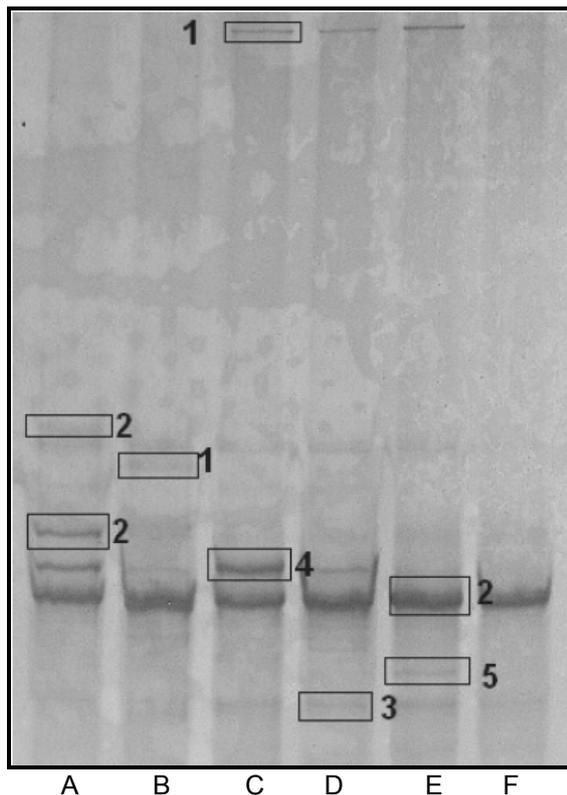


Abb. 18: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von verdorbenen Zwiebeln (Erntejahr 2005)

[A+B: Sorte Bajosta, C+D: Sorte Balaton, E+F: Sorte Hyfort/1: *Penicillium purpurogenum*, 2: *Penicillium glabrum*, 3: neue Aspergillus-Art, 4: *Galactomyces geotrichum*, 5: *Allium thunbergii*]

Die Banden aus den SSCP-Gelen von pilzlicher DNA aus verdorbenen **Tomaten** wurden durch Sequenzierung den Pilzarten *Monoblepharella spec.* und *Penicillium chrysogenum* zugeordnet (vgl. Abb. 19).

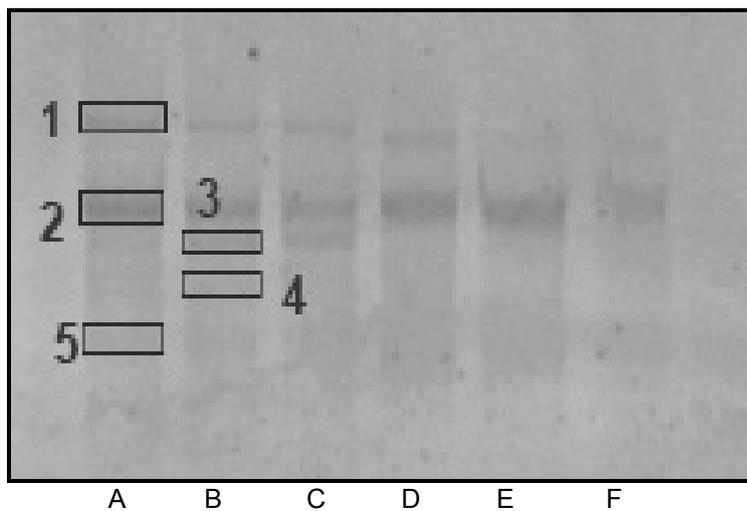


Abb. 19: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von verdorbenen Tomaten (Erntejahr 2006)

[A-C: verdorbene Tomaten von Paket 1, D-F: verdorbene Tomaten von Paket 2 (vgl. Tab. 11); 1: *Monoblepharella spec.*; 2,3,4: *Penicillium chrysogenum*; 5: nicht sequenziert]

7.2.1.2 ARDRA-Methode

7.2.1.2.1 ARDRA von 16S rDNA

Die Restriktionsanalyse von amplifizierter 16S rDNA (1650 bp) erwies sich als geeignet, um Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung von ökologisch und konventionell erzeugten Möhren zu erfassen. Am besten konnten Unterschiede im Bandenmuster und somit in der Anwesenheit spezifischer phylogenetischer Gruppen mit dem Restriktionsenzym Hae III aufgezeigt werden (vgl. Abb. 20).

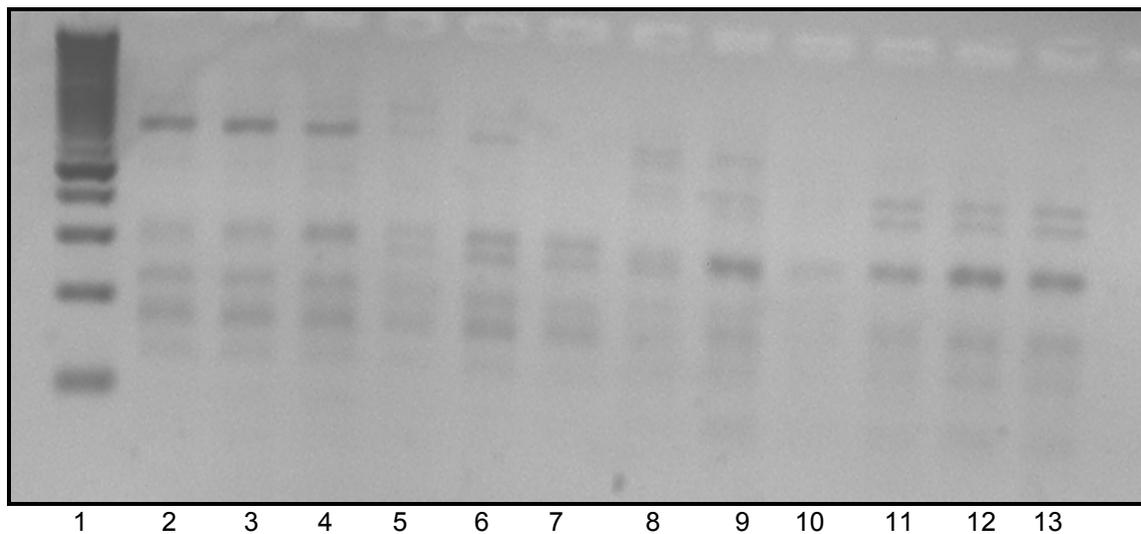


Abb. 20: Beispiel eines Restriktionsverdau (ARDRA) mit Hae III von Amplifikaten der 16S rDNA (1650 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus und Lagerzeit

[1: DNA Marker (Gene Ruler 100 bp DNA ladder, Fa. Fermentas, Art. Nr.: SM323), 2-4: „Rothild mit N“ nach 7 Monaten Lagerung, 5-7: „Rothild mit N“ frisch, 8-10: „Rothild ohne N“ nach 7 Monaten Lagerung, 11-13: „Rothild ohne N“ frisch]

Wie schon bei der SSCP-Methode, ergab die Clusteranalyse der Banden auf den ARDRA-Gelen bei den kodierten Feld- und Erzeugerproben insgesamt in 4 von 32 Fällen identische Fingerprints von Bakteriengemeinschaften. Bis auf das Probenvergleichspaar „Rothild mit und ohne N, frisch“ verteilten sich diese aber entweder auf andere Probenvergleichspaare oder auf andere Zeitpunkte. Im Gegensatz zur SSCP-Methode zeigte die ARDRA-Methode in allen Versuchsjahren einen deutlichen Effekt der Anbauform auf die Bakterienflora von Möhren eines Vergleichspaares (vgl. Tab. 13, vgl. Tab. 14).

Im paarweisen Vergleich der **Feldversuchproben** trat insgesamt nur ein einziges Mal ein identischer ARDRA-Fingerprint von Bakteriengemeinschaften auf (Vegetationsjahr 2004: „Rothild mit und ohne N, frisch“). Bei den **Erzeugerproben** hingegen ergaben sich in 3 von 20 Fällen gleiche Bandenmuster im ARDRA-

Fingerprint. Diese traten nur im zweiten Vegetationsjahr auf und verteilten sich auf drei verschiedene Betriebsvergleichspaare (vgl. Tab. 15 und Tab. 16, vgl. Anhang VII: Clusteranalyse der ARDRA-Fingerprints von Bakteriengemeinschaften).

Tab. 15: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster des Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Feldversuchproben)

Probenvergleichs-paar und Anbauform		ARDRA-Cluster-Distanz (Einheiten) von Bakteriengemeinschaften					
		Vegetationsjahr 2004		Vegetationsjahr 2005		Vegetationsjahr 2006	
		frisch nach Anlieferung	nach 7 Monaten Lagerung	frisch nach Anlieferung	nach 7 Monaten Lagerung	frisch nach Anlieferung	nach 7 Monaten Lagerung
Feld-versuch-proben	Rodelika mit N/ Rodelika ohne N	800	1700	1400	200	1000	400
	Rothild mit N/ Rothild ohne N	0	1150	700	1250	700	400

Tab. 16: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster des Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Erzeugerproben)

Probenvergleichs-paar und Anbauform		ARDRA-Cluster-Distanz (Einheiten) von Bakteriengemeinschaften			
		Vegetationsjahr 2004		Vegetationsjahr 2005	
		frisch nach Anlieferung	nach 7 Monaten Lagerung	frisch nach Anlieferung	nach 7 Monaten Lagerung
Erzeuger-proben bzw. Betriebs-vergleiche	Narbonne1 ökologisch/ Narbonne1 konventionell	600	1200	1000	300
	Nerac1 ökologisch/ Nerac1 konventionell	400	1150	1300	0
	Nerac2 ökologisch/ Nerac2 konventionell	900	1300	0	300
	Nerac3 ökologisch/ Nerac3 konventionell	250	1600	0	550
	Nerac4 ökologisch/ Nerac4 konventionell	Sortenwechsel		1650	1650
	Narbonne2 ökologisch/ Narbonne2 konventionell	450	650	Sortenwechsel	

Bei den Proben aus den **Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I** im Jahr 2005 ließen sich im frischen Zustand 3 und nach Lagerung 4 Sorten auf der Basis der ARDRA-Bandenmuster ihrer Bakterienflora voneinander und von anderen Sorten trennen. Die Sorten „Joba“ und „Kamaran“ unterschieden sich sowohl frisch als auch nach 7 Monaten Lagerung hinsichtlich ihrer bakteriellen Besiedelung am deutlichsten von den anderen Proben (Distanz von 1300 Einheiten). Die Probe „Fontana“ wies ein besonders heterogenes Bandenmuster innerhalb der DNA-Parallelproben auf (vgl. 6.7) und war deshalb nicht von den anderen Proben unterscheidbar (vgl. Abb. 21). Im Jahr 2006 unterschieden sich bei den Sorten „Kamaran“, „Rodelika“ und „Rothild“ die Bandenmuster bakterieller DNA aus frischen Möhren deutlich von denjenigen der gelagerten Möhren (Distanz von 1500 Einheiten; vgl. Abb. 22).

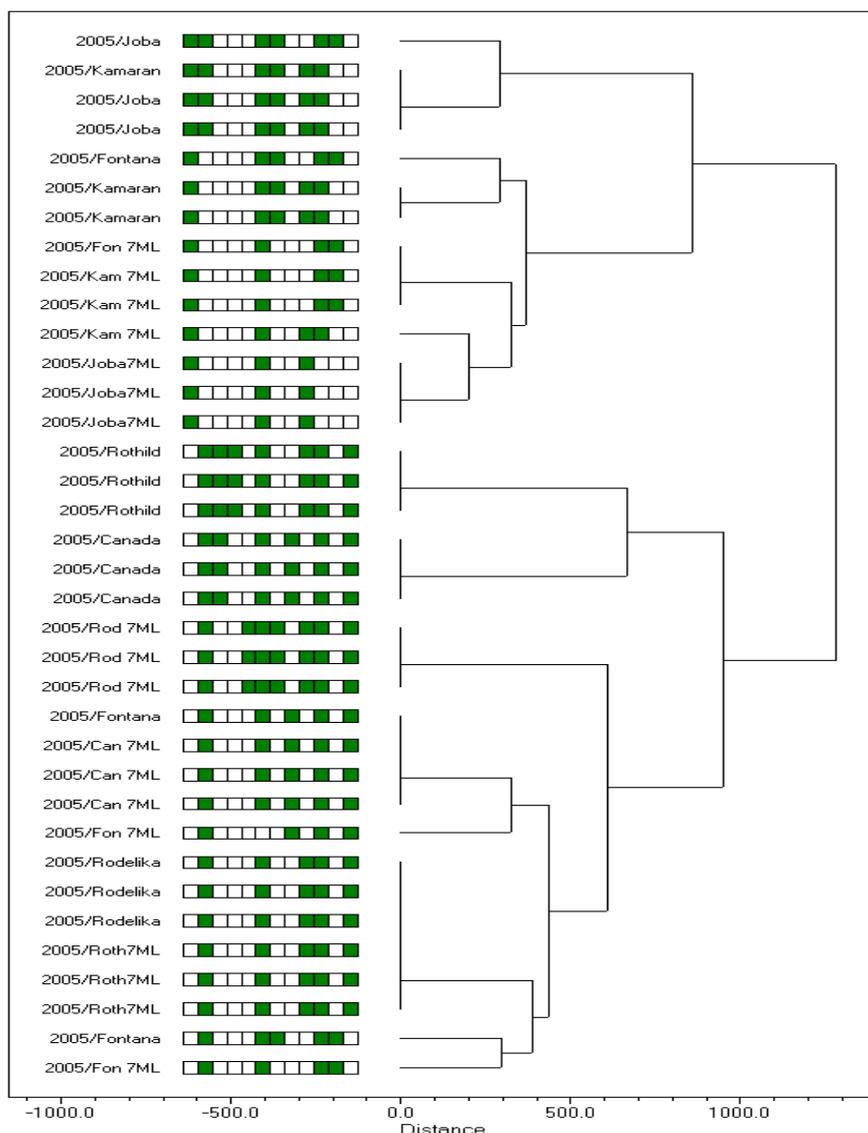


Abb. 21: UPGMA-Dendrogramm des Hae III-Restriktionsverdaus (ARDRA) von Amplifikaten der 16S rRNA (1650 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung, Erntejahr 2005)

[Roth = Rothild, Kam = Kamaran, Rod + Rodelik = Rodelika, Can = Canada, Fon = Fontana, 7ML = nach 7 Monaten Lagerung]

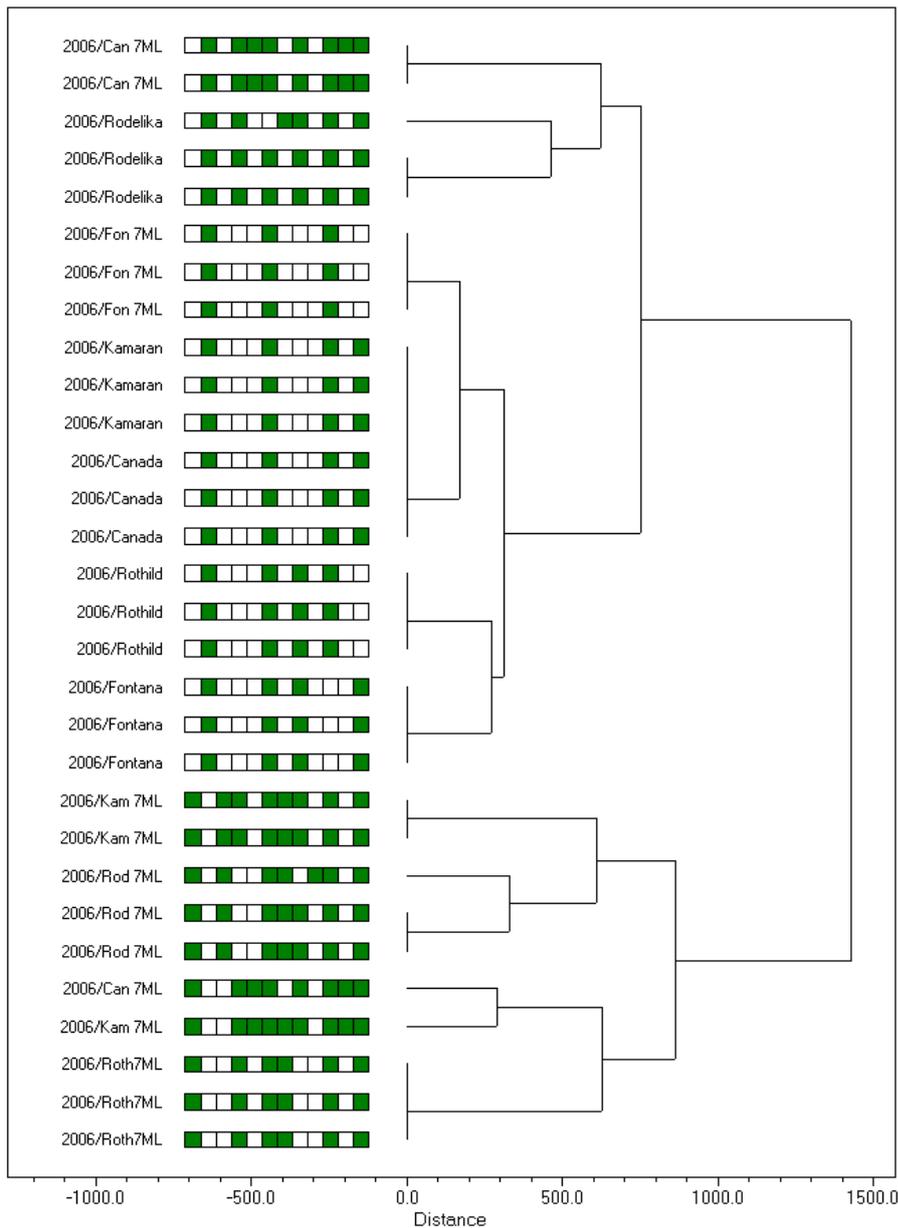


Abb. 22: UPGMA-Dendrogramm des Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Amplifikaten der 16S rRNA (1650 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung, Erntejahr 2006)

[Roth = Rothild, Kam = Kamaran, Rod = Rodelika, Can = Canada, Fon = Fontana, 7ML = nach 7 Monaten Lagerung]

7.2.1.2.2 ARDRA von 18S rDNA

Auf der Ebene der 18S rDNA ergab sich keinen Unterschied hinsichtlich des Fragmentenspektrums pilzlicher Gemeinschaften. Aus diesem Grund konzentrierten wir uns auf die Restriktionsanalyse von Pilzreinkulturen, die wir mittels kulturellen Verfahren (Selektivnährmedien, siehe Abschnitt 6.3 und Anhang XII) von der Oberfläche von Möhren gewonnen hatten (vgl. 7.2.2). Wie auch schon bei den ARDRA-Mustern der Bakterien (vgl. 7.2.1.2.1) zeigten sich die deutlichsten Unterschiede erst durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Hae III (vgl. Abb. 24 und 25). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass für den

Restriktionsverdau von komplexen DNA-Proben der Pilzgemeinschaften noch nicht das richtige Restriktionsenzym gefunden wurde.

Die Pilzreinkulturen, die für eine Untersuchung mit der ARDRA-Methode herangezogen wurden, sollten die Pilzarten repräsentieren, die am häufigsten von den Möhren mit sichtbaren mikrobiellen Verderb isoliert werden konnten oder deren mikroskopische Identifizierung sich als sehr schwierig erwies. Aus diesem Grund wurden zunächst von einer Auswahl der durch kulturellen Verfahren gewonnenen Pilze sowohl ein genetischer Fingerabdruck (vgl. Abb. 23) als auch eine Direkt-Sequenzierung auf Basis der ITS(Internal Transcribed Spacer)-PCR und einer Identifizierung durch eine Gen-Datenbank (NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Insgesamt wurde eine mikroskopische Identifizierung der Pilzreinkulturen in 18 von 42 Fällen durch die Direkt-Sequenzierung bestätigt (vgl. 7.2.2, vgl. 7.2.3).

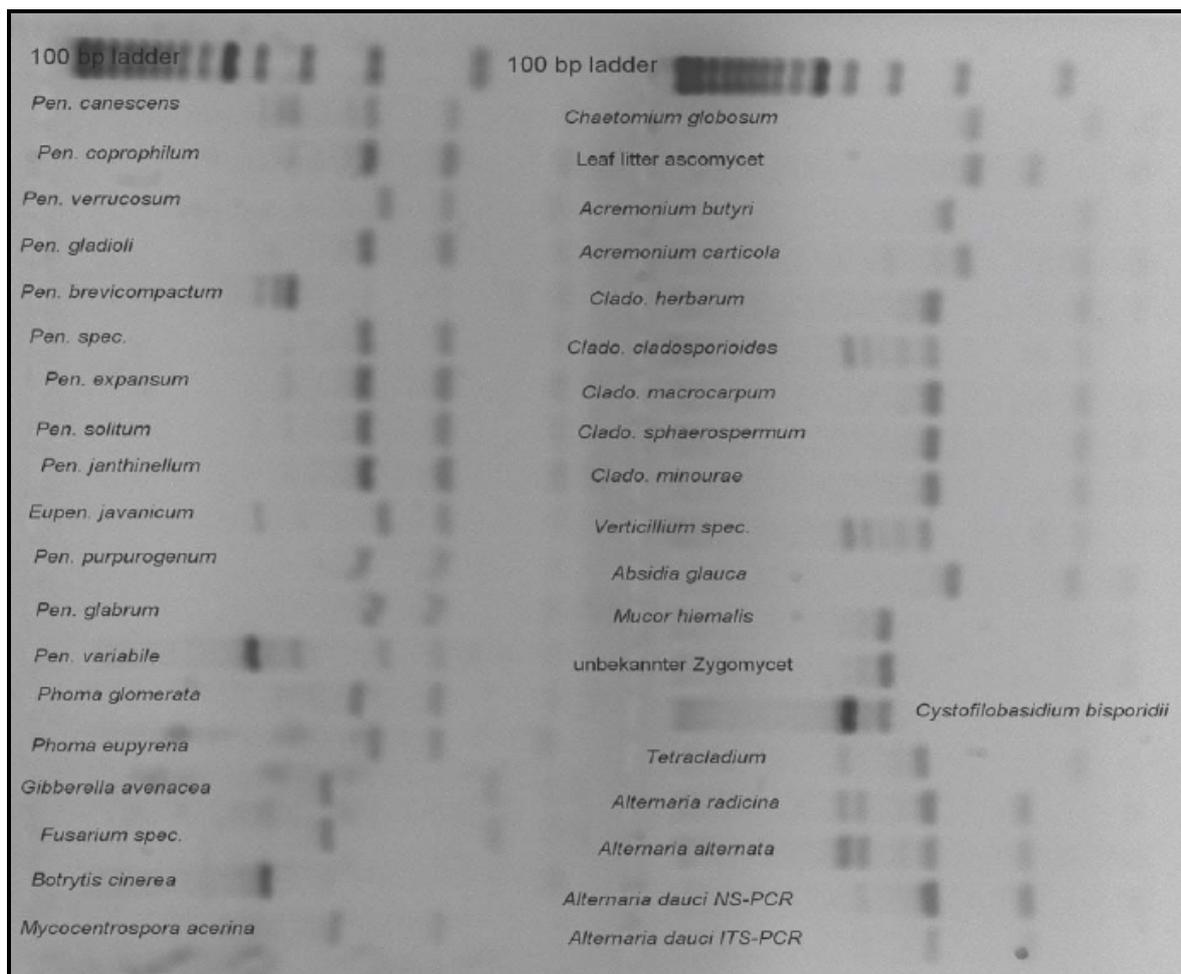
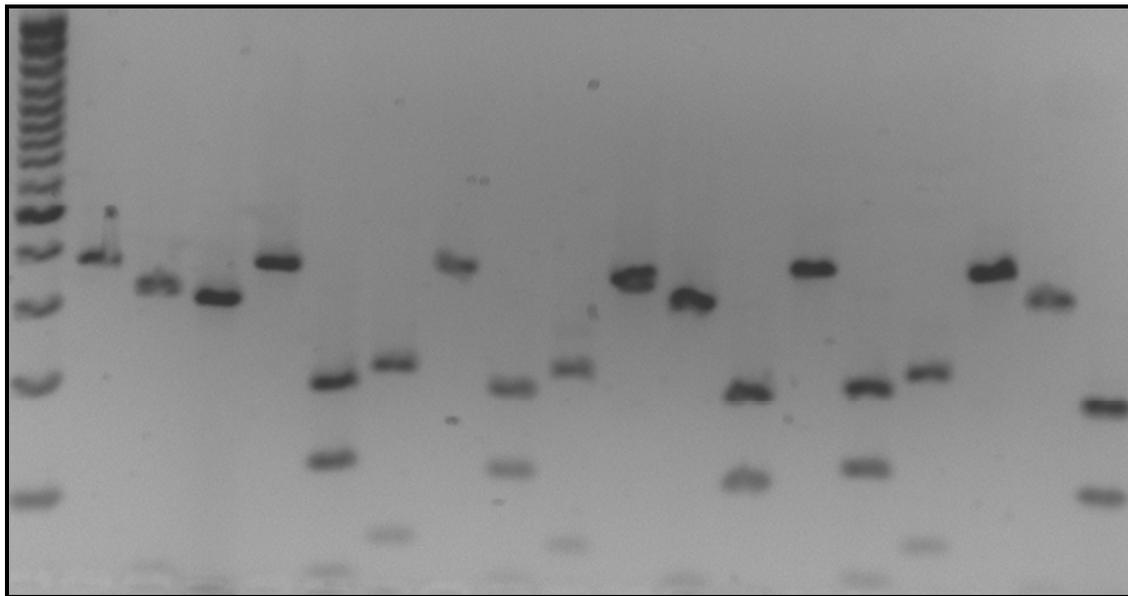


Abb. 23: Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Pilzreinkulturen, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums (100 bp = Gene Ruler 100 bp DNA ladder, Fa. Fermentas, Art. Nr.: SM323)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Abb. 24: Restriktionsverdau (ARDRA) von Pilzreinkulturen (jeweils mit Restriktionsenzym Mbi I, Cfo I sowie Hae III), isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums

[1: DNA Marker (Gene Ruler 100 bp DNA ladder, Fa. Fermentas, Art. Nr.: SM323), 2-4: *Pen. brevicompactum*, 5-7: *Cladosporium spec.*, 8-10: *Acremonium spec.*, 11-13: *Penicillium verrucosum*, 14-16: *Cladosporium spec.*, 17-19: *Penicillium solitum*

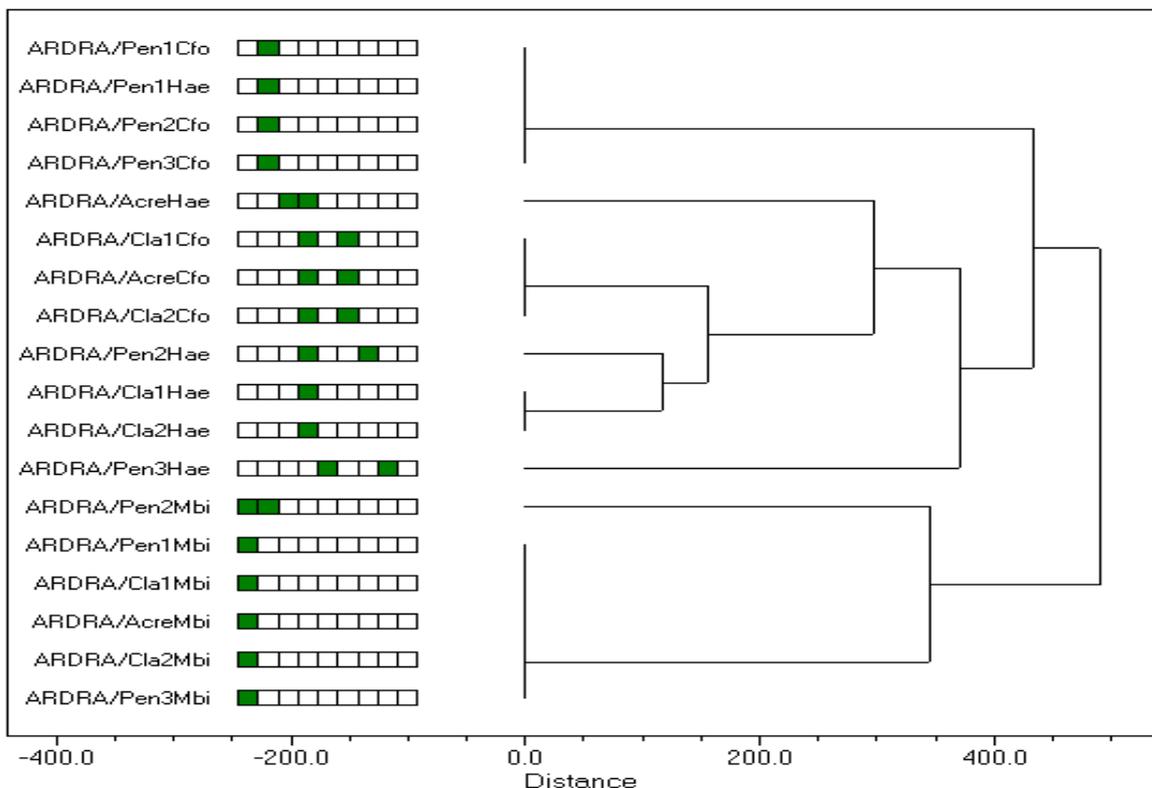


Abb. 25: UPGMA-Dendrogramm eines Restriktionsverdau (ARDRA) von Pilzreinkulturen jeweils mit Restriktionsenzym Mbi I, Cfo I sowie Hae III (Pilze isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums; identifiziert durch Direkt-Sequenzierung auf Basis der ITS-Region)

[Pen1 = *Penicillium brevicompactum*, Cla1 + Cla2 = *Cladosporium spec.*, Acre = *Acremonium spec.*, Pen2 = *Penicillium verrucosum*, Pen3 = *Penicillium solitum*]

7.2.1.3 T-RFLP-Methode und Klonierung

Bei der Erstellung von genetischen Fingerabdrücken mit der T-RFLP-Methode beschränkten wir uns in den ersten zwei Versuchsjahren auf die Probenvergleichspaare, bei denen sichtbarer Verderb auftrat (vgl. 7.1). Im letzten Versuchsjahr wurden T-RFLP-Profile der Pilzflora der bereits verdorbenen Möhrenproben des LLH angefertigt (vgl. Tab. 10). Da Möhren – außer bei sehr feuchter Lagerung – normalerweise durch Pilze verderben, wurden T-RFLP-Profile von Bakteriengemeinschaften nur im ersten Versuchsjahr angefertigt.

Wie schon bei der SSCP-Methode, waren auch die Fingerprints der Bakteriengemeinschaften bei der T-RFLP-Methode vielfältiger als die der Pilzgemeinschaften. Von 46 Analysen lieferten 34 auswertbare Peakmuster (vgl. Anhang VIII und IX: T-RFLP-Profile von Bakterien- und Pilzgemeinschaften). In 12 Fällen ergab die T-RFLP-Methode überhaupt kein Peakprofil. Dies könnte daran liegen, dass evtl. das Restriktionsenzym nicht spezifisch genug war (vgl. ARDRA-Methode, 7.2.1.2). Dass überhaupt keine pilzliche bzw. bakterielle DNA in der Probe vorhanden war, kann ausgeschlossen werden, da sich vorher ein spezifisches Signal in der PCR zeigte. Insgesamt waren 25 verschiedene Peakmuster zu unterscheiden. In allen 3 Fällen, in denen beide Proben eines Vergleichspaares ein T-RFLP-Profil lieferten, zeigten sich Unterschiede in der Bakterienflora. Auf 5 von 8 auswertbaren Vergleichspaaren waren die Pilzgemeinschaften unterschiedlich. Diese Ergebnisse sind aber nicht statistisch abgesichert und wurden ausschließlich visuell bonitiert.

Die T-RFLP-Profile der Pilzgemeinschaften wurden zur Auswahl geeigneter Proben von amplifizierter 18S rDNA für weitere Untersuchungen verwendet (im Anhang IX umrandete T-RFLP-Profile von Pilzgemeinschaften). Auf dieser Basis wurde ein phylogenetischer Stammbaum von Pilzgemeinschaften der verdorbenen Möhren der ersten zwei Versuchsjahre erstellt, der auf der Klonierung und Sequenzierung von ITS (Internal Transcribed Spacer)-Regionen der 18S rDNA beruht (vgl. Abb. 27). Mit pilzlicher DNA aus den verdorbenen Proben des LLH wurde auch eine Klonierung durchgeführt. Diese Proben zeigten aber in der M13 / T7-PCR untypische Klonierungsprodukte und wurden deshalb nicht ansequenziert.

Insgesamt waren die gewonnenen Pilz-Klone der verdorbenen Möhrenproben eng miteinander verwandt (vgl. Abb. 27, vgl. Tab. 17). Eine Zuordnung ist dennoch eingeschränkt möglich: Der Klon Nr. 29 ist eigenständig und ist mit *Sistotrema coronilla* verwandt. Ebenso sind die Klone 25, 26 und 40 eindeutig der *Acremonium*-Gruppe zuzuordnen. Bei den übrigen Klonen wird es schwieriger. Sie sind teilweise identisch, aber dennoch sieht es danach aus, dass es sich um eine neue Pilzgruppe handelt, zu der auch *Sistotrema sernanderi* gehört. Zusätzlich fällt bei der Gattung *Sistotrema* auf, dass die ITS-Sequenzen der Referenzorganismen nicht miteinander clustern und sehr unterschiedlich sind. Es kann demnach als sehr wahrscheinlich angenommen werden, dass es sich bei den Klonen 1, 50, 21, 9, 16, 47, 2, 43, 19-28 (in Abb. 27 rot umrandet) um neue Arten handelt.

Um einzelne Peaks in den komplexen T-RFLP-Profilen (vgl. Anhang IX: T-RFLP-Profile von Pilzgemeinschaften) einer Pilzart zuordnen zu können, wurden zusätzlich von den identifizierten Pilz-Klonen (vgl. Tab. 17) T-RFLP-Profile erstellt (vgl. Abb. 26). Die Klone Nr. 19, 25, 26, 43, 50 lieferten auswertbare Profile. Wie aus der Abbildung 26 ersichtlich, wiesen die Pilz-Klone Nr. 19 und Nr. 43 ähnliche Profile auf, die anderen Klone hatten hingegen alle ein anderes Muster. Eine eindeutige Zuordnung der Klon-Peaks zu den komplexen T-RFLP-Profilen der Pilzgemeinschaften war nicht möglich. Dies könnte daran liegen, dass die T-RFLP nicht die DNA von allen Pilzen komplexer Pilzgemeinschaften erfasst, weil das Restriktionsenzym nicht die DNA jedes Pilzes schneidet. Mit der Klon-Bibliothek wird ein größeres Pilzspektrum erfasst.

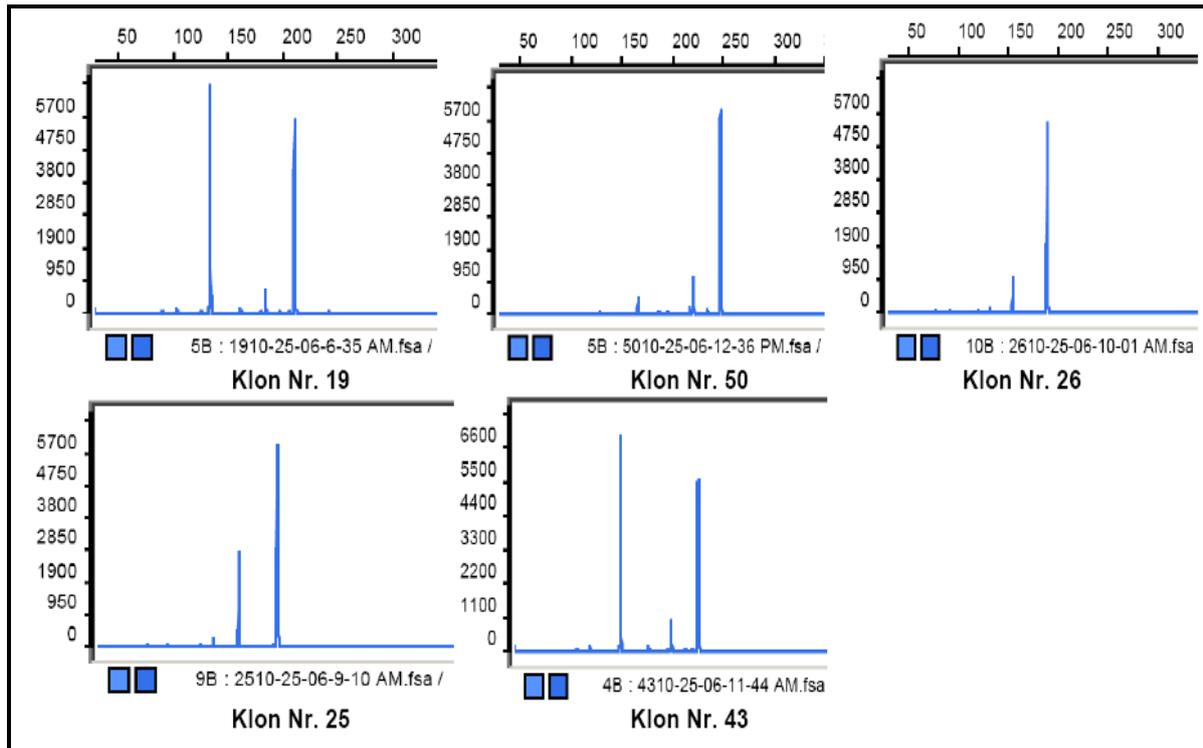


Abb. 26: T-RFLP-Profile der Klone von Pilzen (isoliert von verdorbenen Möhren der Erntejahre 2004 und 2005)

Tab. 17: Übersicht der Klonbibliotheken von Pilzen (isoliert von verdorbenen Möhren der Erntejahre 2004 und 2005)

Klon-Nr.	Identifizierung	Herkunft (verdorbene Möhrenprobe)
29	verwandt mit <i>Sistotrema coronilla</i>	Rothild mit N (Jahr 2004)
9	neue Art (verwandt mit <i>Sistotrema seranderi</i>)	
16		
19-28	zugehörig zur <i>Acremonium</i> -Gruppe	Narbonne 2 konventionell (Jahr 2004)
21		
25		
26		
40		
43	neue Art (verwandt mit <i>Sistotrema seranderi</i>)	Nerac 4 ökologisch (Jahr 2005)
47		
50		
1	zugehörig zur <i>Acremonium</i> -Gruppe	
2		
40		
43	neue Art (verwandt mit <i>Sistotrema seranderi</i>)	
47		
50		

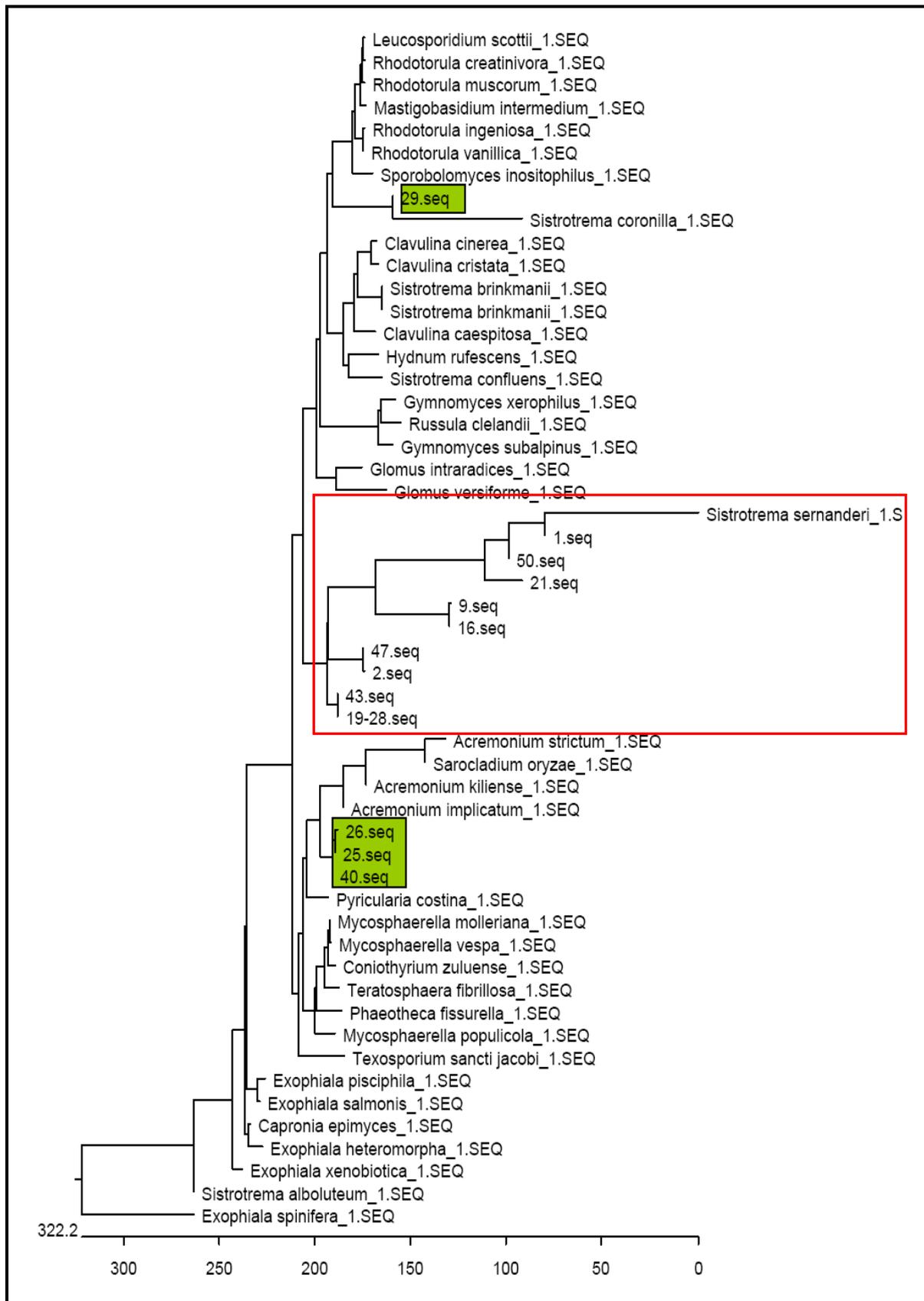


Abb. 27: Phylogenetischer Stammbaum zu den Klonbibliotheken der Pilzgemeinschaften, isoliert von den verdorbenen Möhrenvarianten „Rothild mit N“, „Narbonne2 konventionell“ und „Nerac4 ökologisch“ [erstellt mit MegAline-Software (DNASar Inc., Madison, USA); als Referenzisolate wurden BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)-Daten herangezogen]

7.2.2 Mikrobiologische Analyse

7.2.2.1 Kodierte Proben

7.2.2.1.1 Bestimmung der „Pilzkeimzahl“

Insgesamt zeichnete sich bei den **Feldversuchproben** in den ersten beiden Versuchsjahren ein leichter Anstieg der Pilzkeimzahl während der Lagerung der Möhrenproben ab (vgl. Tab. 18). Ein Anstieg von mehr als einer Zehnerpotenz wurde jedoch nur bei der Probe „Rothild mit N“ der Erntejahre 2004 und 2005 sowie den Proben „Rodelika ohne N“, „Rothild ohne N“ und „Rodelika ohne N“ des Erntejahrs 2004 gefunden, und zwar insbesondere bei den Schwärzepilzen und den Penicillien. Im dritten Untersuchungsjahr lag die Pilzkeimzahl der frischen Möhren im Vergleich zu den Möhren der vorherigen Versuchsjahre etwas höher.

Tab. 18: Kodierte Feldversuchproben 2004/2005/2006 – Bestimmung der Pilzzahl auf unverdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus, Sorte und Lagerung (KbE/g)

Probe	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2004, frisch					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2004, nach 7 Monaten Lagerung				
	Pilze (ohne Hefen)	Schwärzepilze	Penicillien	Fusarien	Andere	Pilze (ohne Hefen)	Schwärzepilze	Penicillien	Fusarien	Andere
Rodelika mN	3.4	3.3	2.4	<2.0	2.5	3.7	3.7	2.7	<2.0	2.2
Rodelika oN	2.7	<2.0	2.7	<2.0	<2.0	4.6	4.2	3.9	2.2	4.2
Rothild oN	3.4	3.1	2.5	<2.0	2.9	4.5	4.4	3.3	3.0	3.5
Rothild mN	3.3	3.1	2.3	<2.0	2.8	4.7	3.9	4.5	<2.0	3.5
	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2005, frisch					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2005, nach 7 Monaten Lagerung				
Rodelika mN	3.3	3.0	<2.0	<2.0	3.0	3.7	3.5	2.9	<2.0	2.7
Rodelika oN	3.4	2.7	<2.0	<2.0	3.3	3.4	3.0	<2.0	2.2	3.2
Rothild oN	3.7	3.5	<2.0	<2.0	3.4	4.2	3.8	3.9	<2.0	3.1
Rothild mN	3.4	2.5	2.5	<2.0	2.9	4.5	2.9	4.0	<2.0	2.2
	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2006, frisch					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2006, nach 7 Monaten Lagerung				
Rodelika mN	4.2	3.8	<2.0	<2.0	3.9	3.6	3.5	3.0	<2.0	2.6
Rodelika oN	4.0	3.8	<2.0	<2.0	3.7	4.1	3.9	2.7	<2.0	2.7
Rothild oN	4.0	3.7	<2.0	<2.0	2.4	3.9	3.6	3.4	<2.0	1.0
Rothild mN	4.3	4.2	<2.0	<2.0	3.5	3.5	3.2	3.0	<2.0	2.1

Bei den **Erzeugerproben** in frischem Zustand lagen die Pilzkeimzahlen im Jahr 2004 etwas niedriger als im Jahr 2005, stiegen aber bei 6 von 10 Proben im Verlauf der Lagerung um mehr als eine Zehnerpotenz an (vgl. Tab. 19). Eine Zunahme war vor allem bei der Keimzahl der Schwärzepilze und der Penicillien zu verzeichnen. Hingegen stiegen die Pilzkeimzahlen während der Lagerung des Ernteguts aus 2005 nur bei einer Probe um etwas mehr als eine Zehnerpotenz an. Insgesamt ließ sich kein Zusammenhang mit der Anbauform erkennen.

Tab. 19: Kodierte Erzeugerproben 2004/2005 – Bestimmung der Pilzzahl auf unverdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus, Sorte und Lagerung (KbE/g)

Sorte und Anbauform	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2004, frisch					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2005, frisch				
	Pilze (ohne Hefen)	Schwärzepilze	Penicillien	Fusarien	Andere	Pilze (ohne Hefen)	Schwärzepilze	Penicillien	Fusarien	Andere
Narbonne 1, ökologisch	3.0	2.2	2.9	<2.0	2.2	4.2	2.7	<2.0	<2.0	4.2
Narbonne 1, konventionell	2.6	2.2	<2.0	<2.0	2.5	3.4	3.0	<2.0	<2.0	3.2
Nerac 1, konventionell	2.8	2.2	2.2	<2.0	2.6	3.0	2.6	<2.0	<2.0	2.8
Nerac 1, ökologisch	3.1	<2.0	2.2	<2.0	3.1	3.9	3.6	<2.0	<2.0	3.6
Nerac 2, konventionell	2.2	2.2	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
Nerac 2, ökologisch	2.2	2.2	<2.0	<2.0	<2.0	3.3	2.8	2.4	<2.0	3.0
Nerac 3, konventionell	2.6	<2.0	2.6	<2.0	<2.0	2.9	2.5	<2.0	<2.0	2.8
Nerac 3, ökologisch	2.9	2.4	2.2	<2.0	2.7	3.2	2.8	<2.0	<2.0	3.0
Nerac 4, konventionell	Sortenwechsel					4.3	4.3	<2.0	<2.0	3.7
Nerac 4, ökologisch						3.4	3.0	<2.0	<2.0	3.4
Narbonne 2, konventionell	2.8	3.0	3.2	<2.0	3.4	Sortenwechsel				
Narbonne 2, ökologisch	2.4	4.4	3.2	<2.0	2.6					
	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2004, nach 7 Monaten Lagerung					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2005, nach 7 Monaten Lagerung				
Narbonne 1, ökologisch	3.8	3.7	2.7	<2.0	3.0	4.5	3.8	2.2	<2.0	4.4
Narbonne 1, konventionell	4.4	4.0	3.4	<2.0	4.1	4.3	3.4	2.2	2.5	4.2
Nerac 1, konventionell	4.7	3.8	4.6	<2.0	2.8	2.4	3.4	<2.0	<2.0	<2.0
Nerac 1, ökologisch	3.9	3.8	3.2	<2.0	3.0	4.2	4.1	<2.0	<2.0	3.2
Nerac 2, konventionell	2.9	2.2	2.4	<2.0	2.8	3.4	2.7	2.2	2.8	3.1
Nerac 2, ökologisch	3.7	3.2	3.0	<2.0	3.2	4.1	3.9	<2.0	<2.0	3.8
Nerac 3, konventionell	3.8	3.5	3.2	<2.0	3.2	3.5	2.8	2.2	<2.0	3.3
Nerac 3, ökologisch	4.1	3.6	3.9	<2.0	2.8	3.5	3.5	<2.0	<2.0	<2.0
Nerac 4, konventionell	Sortenwechsel					4.1	3.7	2.6	<2.0	3.8
Nerac 4, ökologisch						2.5	3.2	<2.0	3.0	2.7
Narbonne 2, konventionell	3.7	3.0	3.2	<2.0	3.4	Sortenwechsel				
Narbonne 2, ökologisch	4.5	4.4	3.2	<2.0	2.6					

7.2.2.1.2 Identifizierung der Pilzflora

Insgesamt wiesen die unverdorbenen **Feldversuchproben** im frischen Zustand ähnliche Pilzarten auf als im gelagerten Zustand. Auffällig war die größere Vielfalt der Penicillien-Arten nach der Lagerung der Möhren des Erntejahrs 2005. Im ersten Versuchsjahr wurden keine wesentlichen mit der Anbauform und Sorte korrelierenden Unterschiede in der Pilzflora festgestellt. Im Erntejahr 2005 wurden bei der Variante „Rothild mit N“ mehr Penicillien-Arten gefunden als bei der Variante „Rothild ohne N“. Weiterhin kamen *Mucor hiemalis* und Schwärzepilze nur auf der Variante „Rothild ohne N“ vor, und die Möhren der Probe „Rodelika ohne N“ wiesen im Gegensatz zu der Probe „Rodelika mit N“ Fusarien auf, aber keine Penicillien (vgl. Tab. 20).

Tab. 20: Kodierte Feldversuchproben 2004/2005/2006 - Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von unverdorbenen Möhren

Pilze auf frischen Möhren		
Vegetationsperiode 2004	Vegetationsperiode 2005	Vegetationsperiode 2006
<i>Alternaria dauci</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Clad. cladosporioides</i> , <i>Clad. herbarum*</i> , <i>Clad. minourae*</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium canescens</i> , <i>Pen. coprophilum*</i> , <i>Pen. brevicompactum*</i> , <i>Pen. verrucosum</i> , <i>Phoma glomerata</i>	<i>Alternaria spec.</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Penicillium canescens</i>	<i>Epicoccum nigrum*</i> , <i>Absidia glauca</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Clad. cladosporioides</i> , <i>Pen. brevicompactum</i> , <i>Pen. glabrum</i> , <i>Pen. gladioli</i> , <i>Pen. purpurogenum</i> , <i>Pen. expansum</i> , <i>Pen. spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Alternaria dauci</i>
Pilze auf gelagerten Möhren (nach 7 Monaten)		
Vegetationsperiode 2004	Vegetationsperiode 2005	Vegetationsperiode 2006
<i>Alternaria radicina</i> , <i>Penicillium spec.*</i> , <i>Penicillium canescens*</i> , <i>Pen. coprophilum</i> , <i>Pen. verrucosum</i>	<i>Alternaria radicina*</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Clad. cladosporioides</i> , <i>Clad. macrocarpum</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium expansum*</i> , <i>Pen. brevicompactum*</i> , <i>Penicillium canescens</i> , <i>Penicillium gladioli</i> , <i>Pen. purpurogenum</i> , <i>Penicillium solitum</i> , <i>Pen. verrucosum</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>Pen. janthinellum*</i>	<i>Mycocentrospora acerina</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Mucor spec.</i> , <i>Penicillium (wahrsch. commune)</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> -Gruppe, Pilz ähnlich <i>Tetracladium spec.</i> , Pilz ähnlich <i>Verticillium</i>

*zusätzlich durch Direkt-Sequenzierung bzw. Gen-Datenbank identifiziert

Bei den unverdorbenen **Erzeugerproben** konnte insgesamt für das Versuchsjahr 2005 eine größere Artenvielfalt nachgewiesen werden als für 2004. So traten

Acremonium- und *Mortierella*-Arten nur bei frischen Möhren des Erntejahres 2005 auf. *Chaetomium globosum* und *Phoma glomerata* waren nur auf gelagerten Möhren aus ökologischer Erzeugung im Erntejahr 2005 nachzuweisen (vgl. Tab. 21). Diese Möhren wiesen außerdem die größte Vielfalt an Penicillien-Arten auf. Sonst gab es keine Beziehungen zwischen der Anbauform und dem Artenspektrum der Pilze.

Tab. 21: Kodierte Erzeugerproben 2004/2005 – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von unverdorbenen Möhren

Pilze auf frischen Möhren		Pilze auf gelagerten Möhren (nach 7 Monaten)	
Vegetationsperiode 2004	Vegetationsperiode 2005	Vegetationsperiode 2004	Vegetationsperiode 2005
<i>Alternaria radicina</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium minourae</i> *, <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Penicillium canescens</i>	<i>Acremonium butyri</i> , <i>Acremonium carticola</i> , <i>Alternaria spec.</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Pen. purpurogenum</i> , <i>Pen. solitum</i> , <i>Pen. verrucosum</i> , <i>Pen. ochro-chloron</i> *, <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Mortierella alpina</i> *, <i>Mortierella spec.</i> *	<i>Alternaria radicina</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Pen. canescens</i> *, <i>Pen. coprophilum</i> *, <i>Pen. verrucosum</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Pen. brevicompactum</i> , <i>Penicillium canescens</i> , <i>Penicillium solitum</i> , <i>Pen. verrucosum</i> , <i>Phoma glomerata</i> *, <i>Phoma eupyrena</i> *, <i>Mycocentrospora acerina</i> *, <i>Eupenicillium javanicum</i> *, <i>Leaf litter ascomycete</i> *, unbekannter Zygomycet*, <i>Gibberella avenacea</i> *

*zusätzlich durch Direkt-Sequenzierung bzw. Gen-Datenbank identifiziert

Bei den vier Varianten, die während der Lagerung verderben (vgl. 7.1), wurden mit kulturabhängigen Methoden folgende Schimmelpilzarten nachgewiesen (vgl. auch Tab. 29 in 7.2.3):

„Rothild mit N“ und „Rodelika mit N“ (2004):

- Hefen
- *Fusarium spec.*
- *Penicillium canescens*
- *Penicillium brevicompactum*
- *Penicillium verrucosum*
- *Alternaria radicina*
- *Cladosporium cladosporioides*

„Narbonne2 konventionell“ (2004):

- Hefen
- *Fusarium spec.*

- *Mucor hiemalis*
- *Cladosporium spec.* (evtl. *Clad. herbarum* und *Clad. sphaerospermum*)
- *Penicillium gladioli*
- *Penicillium solitum*
- *Penicillium brevicompactum*
- *Gibberella avenacea* (Teleomorph von *Fusarium avenaceum*)

„Nerac4 ökologisch“ (2005):

- *Mucor hiemalis*.
- *Penicillium spec.*
- *Botrytis cinerea*
- *Verticillium spec.*

7.2.2.2 Unkodierte Proben

7.2.2.2.1 Praxisversuche Öko-Netzwerk I

Auf den **Möhrenproben** war in beiden Versuchsjahren nach 7 Monaten Lagerung keine wesentliche Erhöhung der Pilzkeimzahlen festzustellen. Insgesamt lag die Pilzkeimzahl im zweiten Versuchsjahr etwas höher (vgl. Tab. 22). Die 7 Monate gelagerten Proben zeigten ein breiteres Artenspektrum als die frischen Proben (vgl. Tab. 23).

Tab. 22: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk (2005/2006) - Bestimmung der Pilzzahl auf Möhren unterschiedlichen Anbaus, Sorte und Lagerung (KbE/g)

Sorte	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2005, frisch					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2005, 7 Monate gelagert				
	Pilze (ohne Hefen)	Schwärz-pilze	Peni-cillien	Fusarien	Andere	Pilze (ohne Hefen)	Schwärz-pilze	Peni-cillien	Fusarien	Andere
Rodelika	3.5	2.4	<2.0	<2.0	3.5	3.4	3.2	2.5	<2.0	2.8
Rothild	3.2	2.9	<2.0	<2.0	3.1	3.9	3.3	2.7	2.8	3.7
Canada	3.3	2.9	<2.0	<2.0	3.0	3.5	3.3	2.2	2.2	3.2
Fontana	3.5	2.9	<2.0	<2.0	3.3	3.7	3.4	2.3	2.2	3.4
Kamaran	4.0	3.7	<2.0	<2.0	3.8	3.9	3.4	3.2	<2.0	3.5
Joba	4.2	4.0	<2.0	<2.0	3.8	4.5	4.2	3.8	2.8	3.9
Sorte	log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2006, frisch					log (Pilzkeimzahl/g), Erntejahr 2006, 7 Monate gelagert				
	Pilze (ohne Hefen)	Schwärz-pilze	Peni-cillien	Fusarien	Andere	Pilze (ohne Hefen)	Schwärz-pilze	Peni-cillien	Fusarien	Andere
Rodelika	4.7	4.5	0.8	<2.0	3.9	4.3	4.1	3.1	<2.0	3.1
Rothild	4.7	4.6	1.8	<2.0	3.8	4.0	3.8	2.8	<2.0	3.2
Canada	4.5	4.4	3.2	<2.0	3.9	4.5	4.5	3.2	<2.0	3.4
Fontana	4.8	4.7	2.9	<2.0	4.0	4.2	4.1	3.2	<2.0	3.3
Kamaran	4.8	4.8	2.2	<2.0	3.5	4.2	4.2	3.1	<2.0	2.2
Joba	Proben nicht verfügbar					Proben nicht verfügbar				

Tab. 23: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk (2005/2006) – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von unverdorbenen Möhren

Pilze auf frischen Möhren		Pilze auf gelagerten Möhren (nach 7 Monaten)	
Vegetationsperiode 2005	Vegetationsperiode 2006	Vegetationsperiode 2005	Vegetationsperiode 2006
<i>Alternaria spec.</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Penicillium canescens</i>	<i>Cladosporium spec.</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i> , <i>Pen. janthinellum</i> , <i>Pen. canescens</i> , <i>Pen. commune</i> , <i>Pen. solitum</i> , <i>Pen. glabrum</i> , <i>Absidia glauca</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Fusarium spec.</i> ,	<i>Alternaria spec.</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Clad. cladosporioides</i> , <i>Clad. macrocarpum</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Pen. brevicompactum</i> , <i>Penicillium canescens</i> , <i>Penicillium gladioli</i> , <i>Pen. purpurogenum</i> , <i>Penicillium solitum</i> , <i>Pen. verrucosum</i> , <i>Phoma glomerata</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Clad. sphaerospermum</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Mucor spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mycocentrospora acerina</i> , <i>Penicillium (commune ?)</i> , <i>Pen. spec.</i> , <i>Pen. janthinellum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Verticillium spec.</i> , Pilz ähnlich <i>Verticillium spec.</i>

Aus den verdorbenen **Zwiebelproben** des Jahres 2005 konnten *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium purpurogenum* und *Penicillium glabrum* auf Nährmedien angezüchtet werden. Die Sorten „Hystar“ und „Bajosta“ zeigten dieselben Pilzarten. *Cladosporium cladosporioides* wurde nur auf der Sorte „Balaton“ gefunden, *Penicillium glabrum* kam auf allen Zwiebelsorten vor. Im Jahr 2006 wurden von der Sorte „Balaton“ *Penicillium canescens*, *Penicillium expansum* und eine *Alternaria*-Art isoliert. *Penicillium glabrum* wurde sowohl auf der Sorte „Balaton“ als auch auf der Sorte „Bajosta“ gefunden (vgl. Tab. 24).

Tab. 24: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk (2005 und 2006) – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Zwiebeln nach 5 Monaten Lagerung

verdorbene Zwiebelprobe	identifizierte Pilze, Erntejahr 2005	identifizierte Pilze, Erntejahr 2006
Hystar	<i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i>	keine Vergleichsproben vorhanden
Hyfort	<i>Penicillium glabrum</i>	
Balaton	<i>Penicillium glabrum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium canescens</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Alternaria spec.</i>
Bajosta	<i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i>	<i>Penicillium glabrum</i>

7.2.2.2 Praxisversuch Öko-Netzwerk II

Von allen Möhrenproben des Praxisversuches wurden *Alternaria*-Arten und Hefen isoliert. *Mucor racemosus* trat nur bei ökologisch angebauten Proben auf; *Fusarium spec.* und *Mucor hiemalis* nur bei konventionell angebauten Möhren (vgl. Tab. 25).

Insgesamt gab es jedoch keine auffallenden Unterschiede zwischen der Pilzflora von konventionell und ökologisch erzeugten Möhren. Die Ergebnisse sind jedoch nur eingeschränkt vergleichbar, da die Öko-Möhren allesamt gewaschen waren und die konventionellen allesamt nicht.

Tab. 25: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk II (2006) – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von ökologischen und konventionellen Möhren

Möhrensorte	Anbauform und Behandlung	Mikroskopisch identifizierte Pilze
Karotan	ökologisch, gewaschen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Mucor racemosus</i> Hefen und Bakterien
	konventionell, ungewaschen	<i>Alternaria spec.</i> <i>Cladosporium spec.</i> <i>Penicillium spec.</i> Hefen und Bakterien
Kamaran	ökologisch, gewaschen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria spec.</i> <i>Mucor racemosus</i> Hefen und Bakterien
	konventionell, ungewaschen	nicht identifizierbarer Pilz <i>Alternaria spec.</i> <i>Fusarium spec.</i> Hefen und Bakterien
Neptun	ökologisch, gewaschen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria spec.</i> Hefen
	konventionell, ungewaschen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria spec.</i> Hefen
Rodelika	ökologisch, gewaschen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria spec.</i> <i>Penicillium spec.</i> Hefen und Bakterien
	konventionell, ungewaschen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria spec.</i> <i>Mucor hiemalis</i> <i>Penicillium spec.</i> Hefen und Bakterien

7.2.2.2.3 Betriebsproben LLH

Bei den Betriebsproben des LLH wiesen die Sorten „**Bolero**“ und „**Milano**“ im gewaschenen Zustand mehr Pilzarten auf als im ungewaschenen (vgl. Tab. 26). Die Möhren der Sorte „**Maestro**“ wiesen dann die größte Vielfalt an Pilzarten auf, wenn sie mit wiederverwendetem Wasser gewaschen worden waren. Der typische Lagerpilz *Mucor hiemalis* kam bei allen Proben vor (vgl. Tab. 27).

Auf den **verdorbenen Möhren** wurden im Wesentlichen diejenigen Pilzgattungen gefunden, die im Zusammenhang mit Lagerkrankheiten von Möhren beschrieben wurden. Die Sorten unterschieden sich etwas im Pilzartenspektrum. Die größte Artenvielfalt gab es bei der Sorte „Maestro“ (vgl. Tab. 27)

Tab. 26: Ökologische Möhrenproben LLH (Erntejahr 2006; Magerhof und Luisenhof) - Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von gewaschenen und ungewaschenen Möhren

Pilzart	Nachweis auf			
	ungewaschen Möhren		gewaschen Möhren	
	Sorte "Bolero"	Sorte "Milano"	Sorte "Bolero"	Sorte "Milano"
<i>Penicillium glabrum</i>	X	X		
<i>Mucor hiemalis</i>	X		X	
<i>Fusarium spec.</i>	X	X	X	X
Hefen	X	X	X	X
<i>Alternaria alternata</i>	X	X	X	X
<i>Phoma eupyrena</i>	X	X	X	X
<i>Aureobasidium</i> (ähnlich <i>Auxathron umbrinum</i>)	X		X	
<i>Trichoderma</i>			X	
<i>Botrytis cinerea</i>			X	
<i>Rhizopus stolonifer</i>		X		X
<i>Cladosporium shaerospermum</i>				X
<i>Alternaria spec.</i>				X
nicht identifizierbarer Pilz (steriles Myzel)				X
nicht identifizierbarer Actinomycet	X			
nicht identifizierbarer Zygomycet			X	

Tab. 27: Ökologische Möhrenproben LLH (Erntejahr 2006; Pappelhof) - Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von gewaschenen und ungewaschenen bzw. verdorbenen Möhren

Pilzart	Nachweis auf					
	verdorbenen Möhren der Sorte			unverdorbenen Möhren der Sorte Maestro		
	Maestro	Bolero	Nipomo	unge- waschen	gewaschen mit	
3 Tage genutztem Wasser					Frisch- wasser	
<i>Absidia glauca</i>					X	
<i>Alternaria spec.</i>	X	X	X		X	
<i>Alternaria alternata</i>		X	X	X		
<i>Botrytis cinerea</i>	X		X			
<i>Cladosporium spec.</i>	X	X	X			
<i>Fusarium spec.</i>	X	X	X		X	
<i>Mucor hiemalis</i>	X	X		X	X	X
<i>Mucor racemosus</i>	X					
<i>Penicillium spec.</i>			X			
<i>Penicillium brevicompactum</i>	X					
<i>Penicillium coprophilum</i>						X
<i>Penicillium expansum</i>					X	
<i>Penicillium glabrum</i>	X			X	X	
<i>Penicillium solitum</i>	X					
<i>Epicoccum nigrum*</i>					X	
<i>Rhizopus stolonifer</i>			X			
Hefen	X	X		X	X	X
Basidiomycet, nicht identifizierbar					X	
Zygomycet, nicht identifizierbar					X	

*zusätzlich durch Direkt-Sequenzierung bzw. Gen-Datenbank identifiziert

Auf den **verdorbenen Pastinaken** wurden mit kultivierungsabhängigen Methoden folgende Pilze gefunden:

- *Penicillium glabrum*
- *Penicillium janthinellum*-Gruppe
- *Nectria spec.*
- Pilz ähnlich *Nectria spec.*
- *Fusarium spec.*
- *Cladosporium minourae*

7.2.2.2.4 Probenmaterial ATB

Auf 20 von 23 verdorbenen Tomaten wurde der Pilz *Penicillium expansum* nachgewiesen. Ein zu der *Penicillium janthinellum*-Gruppe zugehörige Pilz konnte

nur von Proben des 2. Paketes isoliert werden. Insgesamt wiesen die Tomatenproben eine recht ähnliche Pilzflora auf (vgl. Tab. 28).

Tab. 28: Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Tomaten

Tomaten-Nr.		Schimmelpilzarten
Paket 1	79	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>
	89	<i>Cladosporium macrocarpum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i>
	139	<i>P. expansum</i>
	298	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.</i>
	301	<i>P. expansum</i>
	39	<i>P. expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>
	324	<i>P. expansum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Penicillium spec.</i>
	399	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium shaerospermum</i> , nicht identifizierbarer Pilz
	616	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium macrocarpum</i> , <i>Pen. spec.</i>
	668	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , nicht identifizierbarer Pilz
Paket 2	48	<i>P. expansum</i> , nicht identifizierbarer Pilz (steriles Myzel)
	51	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium spec.</i>
	54	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium spec.</i>
	168	<i>P. expansum</i> ,
	247	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.*</i> , unbekannter Zygomycet
	267	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.*</i>
	300	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.*</i> , <i>Pen. spec.</i> , unbekannter Zygomycet, <i>Alternaria alternata</i>
	304	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.*</i> , <i>Pen. spec.</i> , <i>Cladosporium spec.</i>
	305	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , unbekannter Zygomycet
	318	<i>P. expansum</i> , <i>Penicillium spec.*</i> , unbekannter Zygomycet
	319	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium spec.</i>
	325	<i>P. expansum</i>
	334	<i>P. expansum</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Penicillium spec.*</i> , <i>Pen. spec.</i>
416	<i>Penicillium spec.*</i> , <i>Pen. spec.</i>	

* zugehörig zur *Pen. janthinellum*-Gruppe

7.2.3 Gesamtergebnis der DNA-basierten und mikrobiologischen Analyse der Pilzflora

Die Ergebnisse der Identifizierung von Pilzen von verdorbenen Möhren mit verschiedenen Methoden ist in den Tabellen 29 und 30 zusammengefasst.

Tab. 29: Mit kultivierungsabhängigen und DNA-basierten Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Proben; Erntejahr 2004 und 2005)

	verdorbene Möhrenprobe	mit kultivierungsunabhängigen Methoden identifizierte Pilze		mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze	
		SSCP + Sequenzierung	Klonierung + Sequenzierung	Mikroskopie	Direktsequenzierung von Reinkulturen
Feldversuchsanbau	Rothild mit N (2004); Verderb nach 4 Monaten Lagerung	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Sistotrema sernanderi</i> , neue Art	neue Art (verwandt mit <i>Sistotrema coronilla</i>), 2 neue Arten (verwandt mit <i>Sistotrema sernanderi</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>
	Rodelika mit N (2004); Verderb nach 4 Monaten Lagerung	Ergab keine Banden im SSCP-Gel	Ergab keine Banden im SSCP-Gel	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	konventionell Narbonne2 (2004); Verderb nach 6 Monaten Lagerung	<i>Leucosporidium</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Cystofilobasidium bisporei</i> ** neue Art	3 neue Arten (zugehörig zur <i>Acremonium</i> -Gruppe), 5 neue Arten (verwandt mit <i>Sistotrema sernanderi</i>), <i>Mastigobasidium</i> (99%)*	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>
	ökologisch Nerac4 (2005); Verderb nach 5 Monaten Lagerung	<i>Chalara hyalina</i> , <i>Tetracladium spec.</i> ** <i>Candida austromaniana</i> , <i>Dictyostelium mucoroides</i>	5 neue Arten (verwandt mit <i>Sistotrema sernanderi</i>), neue Art (zugehörig zur <i>Acremonium</i> -Gruppe), 3 neue Arten (99% Mykorrhiza-Ascomycet)*	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium spec.</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Verticillium spec.</i>

*Wurde zu 99% durch Sequenzierung bzw. Gen-Datenbank identifiziert, deshalb nicht im phylogenetischen Stammbaum enthalten. **Kulturen dieser Arten bzw. Gattung wurden bei CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht) bestellt und dienten im letzten Versuchsjahr als Impfmateriale bei der Wund-Inokulation (vgl. 6.4; vgl. 7.3.2.2)



Tab. 30: Mit kultivierungsabhängigen und DNA-basierten Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Öko-Möhren (unkodierte Proben; Erntejahr 2006; Pappelhof)

verdorbene Möhrenprobe bzw. Sorte	mit kultivierungsunabhängigen Methoden identifizierte Pilze		mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze
	SSCP + Sequenzierung	Klonierung + Sequenzierung	Mikroskopie
Maestro	<i>Nectria lugdunensis</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	zeigte untypisches Klonierungsprodukt in der M13/T7-PCR	<i>Alternaria spec.</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Penicillium solitum</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Mucor racemosus</i> , Hefen
Bolero	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Tetracladium furcatum</i>	zeigte untypisches Klonierungsprodukt in der M13/T7-PCR	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria spec.</i> , Hefen
Nipomo	Ergab keine Banden im SSCP-Gel	zeigte untypisches Klonierungsprodukt in der M13/T7-PCR	<i>Penicillium spec.</i> , <i>Cladosporium spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria spec.</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Botrytis cinerea</i>

7.3 Ergebnisse der Wund-Inokulation

7.3.1 Kodierte Proben

In zwei Vegetationsperioden wurden insgesamt zehn Vergleichs-Probenpaare aus ökologischen und konventionellen Anbaubetrieben sowie vier ökologisch angebaute Vergleichsproben-Paare aus dem Feldversuch auf ihre Anfälligkeit gegenüber phytopathogenen Pilzen (*Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.*) getestet. Bei allen Proben wurde die durch die Testpilze mazerierte Fläche mit zunehmender Bebrütungsdauer größer. Erst am 21. Bebrütungstag waren bei einzelnen paarweisen Vergleichen Unterschiede festzustellen. Auf den Erzeugerproben entwickelte sich in beiden Vegetationsjahren der Testpilz *Botrytis cinerea* tendenziell besser als *Fusarium sp.*. Bei den Feldversuchproben variierte das Ausmaß des Pilzwuchses mit den einzelnen Anbaujahren (vgl. Tab. 31, vgl. Abb. 28 und 29, vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X).

Bei den **Feldversuchproben** war weder 2004 noch 2005 ein Zusammenhang zwischen Anbauform und Anfälligkeit gegenüber *Fusarium spec.* erkennbar. Ebenso wenig zeigten sich Unterschiede bei *Botrytis cinerea* im Vegetationsjahr 2004. Hingegen wuchs *Botrytis cinerea* auf den Varianten „Rothild mit N“ und „Rodelika ohne N“ des Erntejahres 2005 signifikant ($p = 0,05$) geringer. In der Tendenz wuchsen beide Pilze im ersten und im zweiten Vegetationsjahr auf der Variante „Rothild ohne N“ am stärksten (vgl. Tab. 31). Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des Pilzwachstums auf den 2004 und 2005 geernteten Möhren bestand nicht.

In insgesamt drei der 20 paarweisen **Betriebsvergleiche** zeigte sich ein signifikant stärkeres Wachstum von *Botrytis cinerea* auf den konventionell angebauten Möhren. In zwei Fällen wuchs *Fusarium spec.* auf der ökologisch, in einem Fall auf der konventionell angebauten Variante stärker (vgl. Tab. 31). Nur in einem Betriebsvergleich war die Anfälligkeit der Möhren sowohl gegenüber *Botrytis cinerea* als auch gegenüber *Fusarium spec.* signifikant verschieden. Eine signifikante Korrelation zwischen den Daten aus den beiden Vegetationsjahren bestand nur bezüglich des Wachstums von *Botrytis cinerea* bei der Probe „Narbonne1“ ($r = 0,402^*$).

Tab. 31: Kodierte Feld- und Erzeugerproben 2004/2005 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf Möhren unterschiedlichen Anbaus und Sorte nach Wund-Inokulation (Variationskoeffizient)

Signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichspaaren innerhalb eines Vegetationsjahres sind durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet (LSD $\alpha=0,05$), ns= nicht signifikant

Probenvergleichspaar und Anbauform		Vegetationsperiode	<i>Botrytis cinerea</i> : Fläche Mazerationshof/Möhre (cm ²)	<i>Fusarium spec.</i> : Fläche Mazerationshof/Möhre (cm ²)
Feldversuchproben	Rothild ohne N	2004	1,92 ns	1,14 ns
	Rothild mit N		1,27	1,1
	Rothild ohne N	2005	1,27 a	1,02 ns
	Rothild mit N		0,25 b	0,61
	Rodelika mit N	2004	1,36 ns	0,92 ns
	Rodelika ohne N		1,38	0,79
	Rodelika mit N	2005	0,84 a	0,96 ns
	Rodelika ohne N		0,19 b	0,59
	Versuchsmittel			1,06
Erzeugerproben	Narbonne1 ökologisch	2004	1,11 ns	0,11 ns
	Narbonne1 konventionell		0,73	0,29
	Narbonne1 ökologisch	2005	0,51 a	0,4 a
	Narbonne1 konventionell		1,26 b	0,05 b
	Nerac1 ökologisch	2004	0,2 a	0,44 ns
	Nerac1 konventionell		0,99 b	0,44
	Nerac1 ökologisch	2005	0,42 ns	0,27 ns
	Nerac1 konventionell		0,83	0,23
	Nerac2 ökologisch	2004	0,41 a	0,18 ns
	Nerac2 konventionell		1,34 b	0,05
	Nerac2 ökologisch	2005	0,24 ns	0,53 a
	Nerac2 konventionell		0,71	0,29 b
	Nerac3 ökologisch	2004	1,67 ns	0,08 a
	Nerac3 konventionell		1,12	0,31 b
	Nerac3 ökologisch	2005	1,13 ns	0,2 ns
	Nerac3 konventionell		0,79	0,2
	Narbonne2 ökologisch	2004	0,98 ns	0,28 ns
	Narbonne2 konventionell		0,27	0,2
	Nerac4 ökologisch	2005	0,49 ns	0,36 ns
	Nerac4 konventionell		0,2	0,49
Versuchsmittel			0,77	0,27

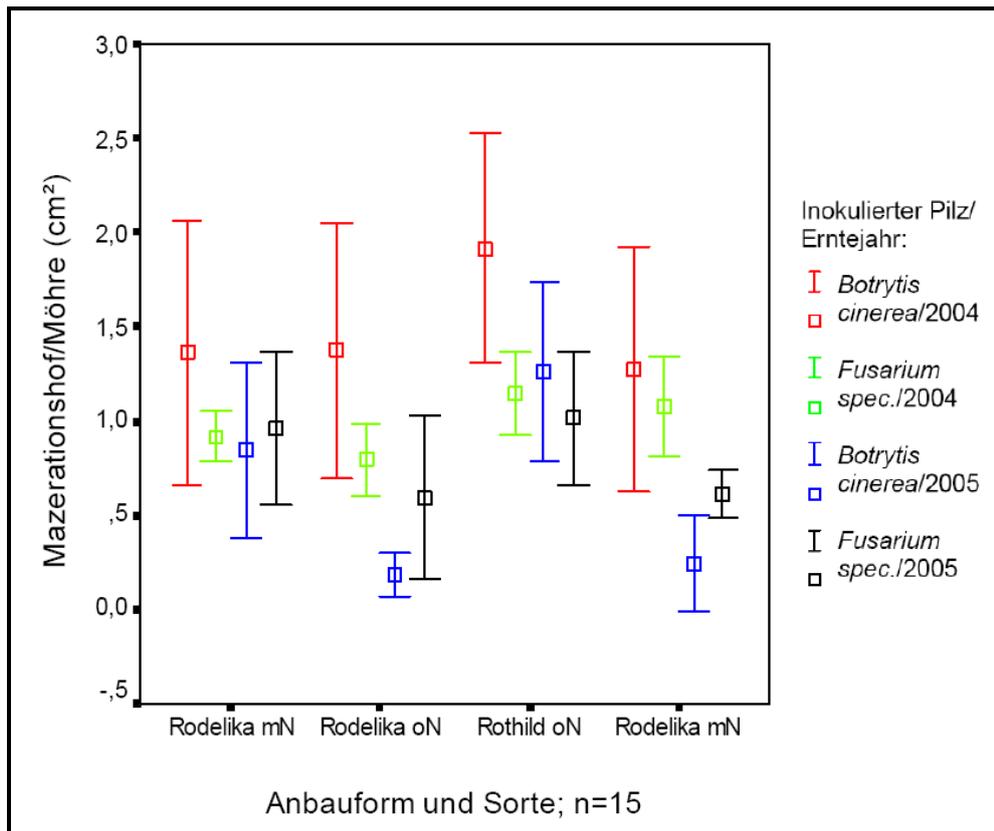


Abb. 28: Kodierte Feldversuchproben 2004 und 2005 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf Möhren unterschiedlichen Anbaus und Sorte nach Wund-Inokulation

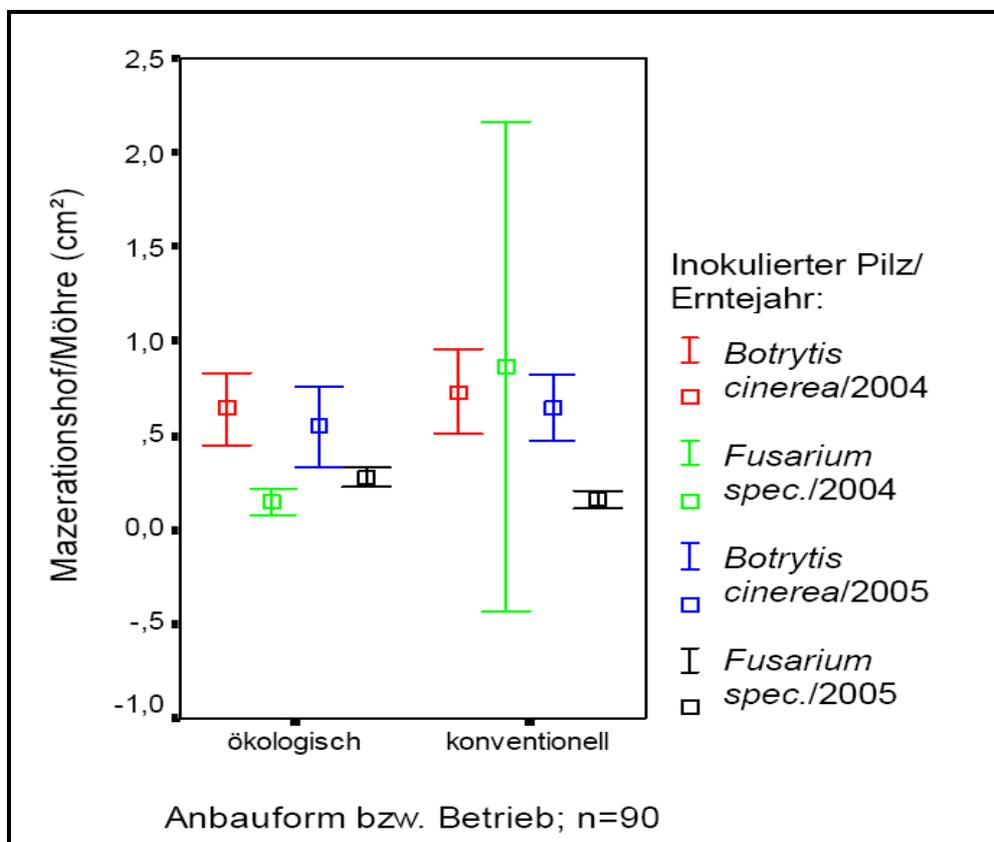


Abb. 29: Kodierte Erzeugerproben 2004 und 2005 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf Möhren unterschiedlichen Anbaus und Sorte nach Wund-Inokulation

7.3.2 Unkodierte Proben

7.3.2.1 Ergebnisse: Feldversuch Universität Kassel

Botrytis cinerea zeigte nach 21 Tagen insgesamt ein etwas stärkeres Wachstum auf der mit zusätzlichem organischen Stickstoff und mit biologisch-dynamischen Präparaten versorgten Variante (mNmPr). Die statistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der Variante ohne zusätzliche Stickstoffversorgung (oNmPr; $p = 0,652$). *Fusarium spec.* wuchs am stärksten auf der Variante oNmPr. Jedoch waren auch hier die Unterschiede zwischen den Anbauformen nicht signifikant ($p = 0,23$). Innerhalb einer Anbauvariante gab es vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen (vgl. Tab. 32, Abb. 30; vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X).

Tab. 32: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf der unterschiedlich angebauten Möhrensorte Rodelika nach Wund-Inokulation (Variationskoeffizient)

Ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen einer Anbauvariante (LSD $\alpha=0,05$); ns: nicht signifikante Anbauunterschiede im t-Test

Anbauvariante	Parzelle	<i>Botrytis cinerea:</i> Fläche Mazerations- hof/Möhre (cm ²)	<i>Fusarium spec.:</i> Fläche Mazerations- hof/Möhre (cm ²)
oNmPr	P8	1,77 a	1,14 b
	P37	0,98 b	0,76 a
	P82	0,97 b	0,94 ab
	P87	1,17 ab	1,15 b
mNmPr	P28	1,11 a	0,9 b
	P29	1,61 a	0,88 b
	P74	1,25 ab	0,79 ab
	P91	2,17 b	0,46 a
Mittelwert oNmPr		1,22 ns	0,99 ns
Mittelwert mNmPr		1,53	0,75
Versuchsmittel		1,4	0,87

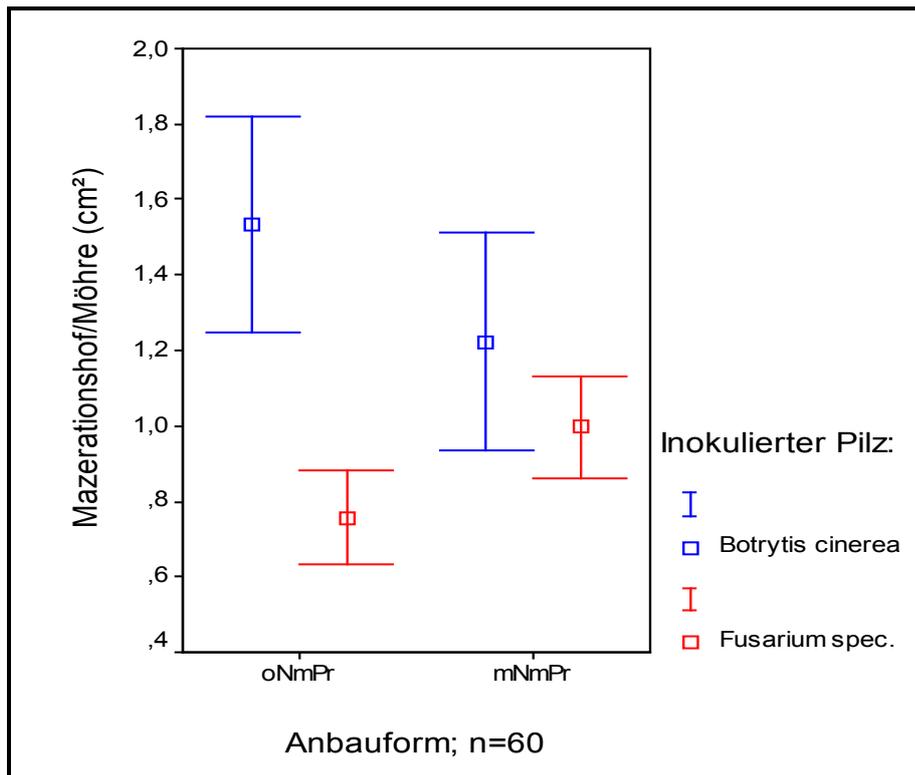


Abb. 30: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf der unterschiedlich angebauten Möhrensorte Rodelika nach Wund-Inokulation

7.3.2.2 Ergebnisse: Praxisversuch Öko-Netzwerk

Die Möhren der Ernte 2005 wurden mit den Pilzstämmen *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* beimpft. Die Möhren des darauffolgenden Erntejahres mit den Pilzen *Cystofilobasidium bisporeidii* (CBS 6346) und *Tetracladium marchalianum* (CBS 120215) beimpft (vgl. 7.2.3, Tab. 29). Diese Arten wurden auf verdorbenen Möhren mittels DNA-basierter Methoden nachgewiesen (vgl. 6.2) und als mutmaßliche Verderbserreger verdächtigt.

Botrytis cinerea zeigte nach 21 Tagen Bebrütung insgesamt ein stärkeres Wachstum auf der Möhrensorte Joba; *Fusarium spec.* hingegen auf der Möhrensorte Kamaran. Am geringsten wuchsen beide Pilze auf der Sorte Canada. Vereinzelt ließen sich die Unterschiede statistisch sichern (vgl. Tab. 33, Abb. 31; vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X).

Die Pilze *Cystofilobasidium bisporeidii* und *Tetracladium marchalianum* zeigten bei keiner Probe bis zum Abbruch der Bebrütung nach 4 Wochen Wachstum, weder in noch auf den Möhren.

Tab. 33: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf Möhren unterschiedlicher Sorte nach Wund-Inokulation (Variationskoeffizient)

Ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten bezüglich des Wachstums eines Pilzes (LSD $\alpha=0,05$)

Probe bzw. Sorte	<i>Botrytis cinerea</i> : Fläche Mazerationshof/ Möhre (cm ²)	<i>Fusarium spec.</i> : Fläche Mazerationshof/ Möhre (cm ²)
Rodelika	0,58 d	0,86 a d
Rothild	0,28 bcd	0,81 a cd
Canada	0,1 bc	0,27 b
Fontana	0,18 bcd	0,41 bc
Kamaran	0,15 c	1,17 d
Joba	1,55 a	0,85 a d
Versuchsmittel	0,47	0,73

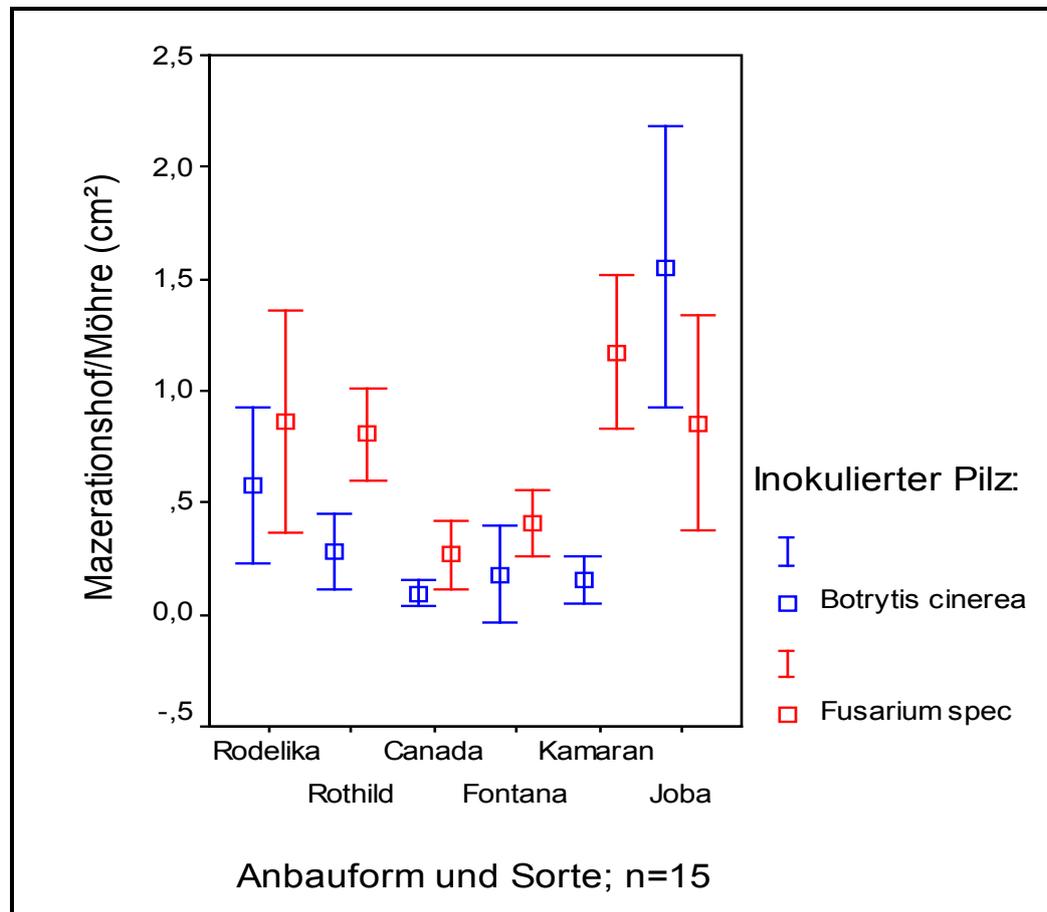


Abb. 31: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* auf Möhren unterschiedlicher Sorte nach Wund-Inokulation

7.4 Ergebnisse der Festigkeitsmessung

7.4.1 Kodierte Proben

Die Untersuchungen zur Festigkeitsmessung zeigten im paarweisen Vergleich zu verschiedenen Messzeitpunkten nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Möhren. Überraschenderweise war bei allen Proben – mit Ausnahme der Erzeugerproben im Vegetationsjahr 2004 – die aufgewendete Kraft tendenziell bei den frischen Möhren geringer als bei den gelagerten Möhren. Offenbar haben sich die in Folge der Transpiration stattfindenden Prozesse „Weicher“ und „Zäher“ hier überlagert. Auffallend war, dass die Möhren aus dem Feldanbauversuch in der Tendenz eine geringere Festigkeit aufwiesen als die Möhren aus den Betriebsvergleichen.

Bei den Möhren aus dem **Feldanbauversuch** konnte im paarweisen Vergleich nur in einem Fall ein signifikanter Unterschied bezüglich der Festigkeit festgestellt werden (vgl. Tab. 34, Abb. 32; vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X): Im Vegetationsjahr 2004 wies die Variante „Rothild ohne N“ im frischen Zustand eine signifikant größere Festigkeit auf als ihre zusätzlich gedüngte Variante ($p = 0,04^*$).

Im Vegetationsjahr 2004 waren in einem von 5 **Betriebsvergleichen** die ökologisch angebauten Möhren in frischem Zustand signifikant fester. Im Vegetationsjahr 2005 waren in zwei von 5 Betriebsvergleichen die konventionell angebauten Möhren nach vierwöchiger Lagerung signifikant fester (vgl. Tab. 34, Abb. 33; vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X). Nur bei der Sorte „Narbonne1“ korrelierten die Messwerte „nach 4 Wochen Lagerung“ miteinander, und zwar positiv ($r = 0,538^{**}$).

Tab. 34: Kodierte Feld- und Erzeugerproben 2004/2005 - Einfluss der Anbauform und der Sorte auf die Festigkeit von Möhren zu unterschiedlichen Lagerzeiten (Variationskoeffizient)
 Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren innerhalb eines Vegetationsjahres sind durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet (LSD $\alpha=0,05$), ns= nicht signifikant

Vergleichspaar und Anbauform		Vegetationsperiode 2004			Vegetationsperiode 2005			Versuchsmittel
		Mittelwert (n=15) der Kraft (N) für 2 mm Eindringtiefe mit Kugelsonde zum Zeitpunkt:			Mittelwert (n=15) der Kraft (N) für 2 mm Eindringtiefe mit Kugelsonde zum Zeitpunkt:			
		Zeitpunkt 1: frisch	Zeitpunkt 2: nach 4 Wochen Lagerung	Zeitpunkt 3: nach 8 Wochen Lagerung	Zeitpunkt 1: frisch	Zeitpunkt 2: nach 4 Wochen Lagerung	Zeitpunkt 3: nach 8 Wochen Lagerung	
Feldversuchsproben	Rothild ohne N	64,8 a	166,26 ns	91,59 ns	64,43 ns	72,56 ns	66,36 ns	87,6 ns
	Rothild mit N	55,6 b	161,19	101,41	64,75	69,64	69,49	87,01
	Rodelika mit N	65,85 ns	154,73 ns	107,72 ns	68,43 ns	67,44 ns	68,64 ns	88,8 ns
	Rodelika ohne N	60,24	147,37	97,78	68,43	66,51	70,21	85,09
Erzeugerproben	Nerac1 ökologisch	163,8 ns	140,19 ns	95,11 ns	55,68 ns	66,21 a	67,64 a	98,12 ns
	Nerac1 konventionell	149,74	129,67	100,01	61,31	73,16 b	74,27 b	98,03
	Nerac3 ökologisch	180,53 a	144,96 ns	107,76 ns	63,7 ns	73,21 ns	71,4 ns	106,93 ns
	Nerac3 konventionell	143,42 b	133	98,85	63,77	74,41	72,01	97,58
	Nerac2 ökologisch	175,43 ns	137,57 ns	102,7 ns	57,62 ns	76,68 ns	73,11 ns	103,85 ns
	Nerac2 konventionell	159,57	133,65	108,62	66,64	75,06	73,5	102,84
	Nerac4 ökologisch	Sortenwechsel			60,11 a	71,05 a	72,91 ns	68,02 ns
	Nerac4 konventionell				68,19 b	78,64 b	75,49	74,11
	Narbonne1 ökologisch	163,71 ns	131,72 ns	94,36 ns	59,34 ns	73,24 ns	73,23 ns	99,27 ns
	Narbonne1 konventionell	159,87	134,45	92,87	63,37	75,19	69,41	99,19
	Narbonne2 ökologisch	175,15 ns	124,14 ns	107,21 ns	Sortenwechsel			135,5 ns
	Narbonne2 konventionell	153,83	116,1	98,2				122,7

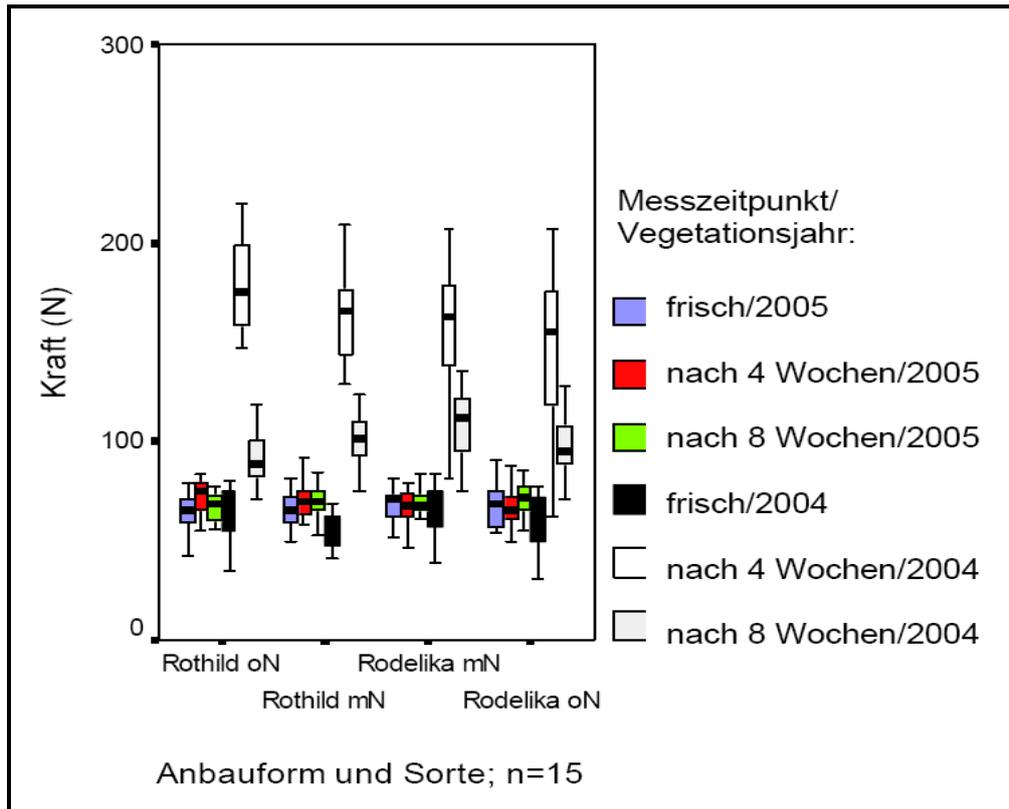


Abb. 32: Kodierte Feldversuchproben 2004 und 2005 - Einfluss der Anbauform und der Sorte auf die Festigkeit von Möhren zu unterschiedlichen Lagerzeiten

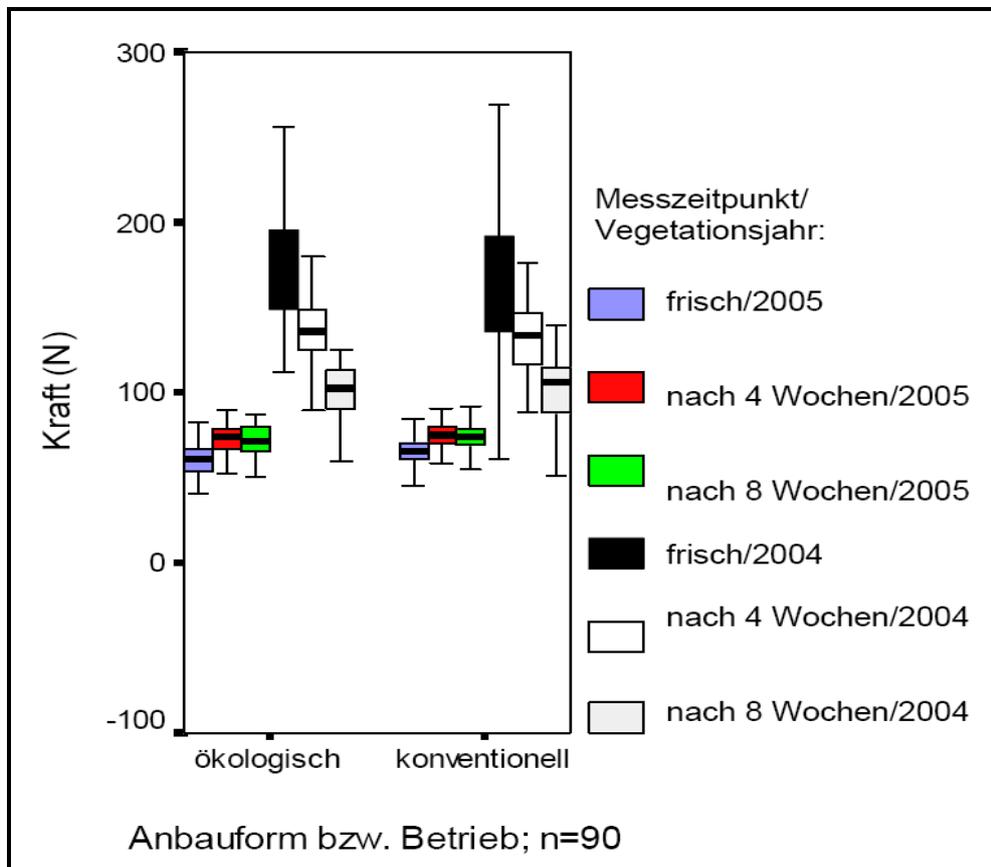


Abb. 33: Kodierte Erzeugerproben 2004 und 2005 - Einfluss der Anbauform und der Sorte auf die Festigkeit von Möhren zu unterschiedlichen Lagerzeiten

7.4.2 Unkodierte Proben

7.4.2.1 Ergebnisse: Feldversuch Universität Kassel

Bei den Möhren aus dem Anbauversuch der Universität Kassel wurden keine signifikanten anbaubedingten Unterschiede bezüglich der Festigkeit festgestellt. Innerhalb der Anbauvariante oNmPr traten vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Proben aus einzelnen Anbau-Parzellen auf (vgl. Tab. 35; Abb. 34; vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X). Signifikante Korrelationen zwischen den zu verschiedenen Messzeitpunkten ermittelten Werten bestanden bei den frischen und den nach 8 Wochen gelagerten Möhren ($r = 0,208^*$).

Tab. 35: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Einfluss der Anbauform auf die Festigkeit der Möhrensorte Rodelika (Variationskoeffizient)

Ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen einer Anbauvariante zum gleichen Messzeitpunkt (LSD $\alpha=0,05$); ns: nicht signifikante Anbauunterschiede im t-Test

Anbauvariante	Parzelle	Mittelwert (n=15) der Kraft (N) für 2 mm Eindringtiefe mit Kugelsonde zum Zeitpunkt:		
		Zeitpunkt 1: frisch	Zeitpunkt 2: nach 4 Wochen Lagerung	Zeitpunkt 3: nach 8 Wochen Lagerung
oNmPr	P8	65,59	192,06 a	117,42 a
	P37	76,54	185,93 b	113,74
	P82	69,7	185,79	104,44 b
	P87	68,46	157,49	106,44
mNmPr	P28	64,66	181,9	112,93
	P29	70,48	157,23	101,27
	P74	69,36	176	109,56
	P91	67,67	171,71	111,65
Mittelwert oNmPr		68,04 ns	171,71 ns	108,85 ns
Mittelwert mNmPr		70,07	180,32	110,51
Versuchsmittel		69,05	176,02	109,68

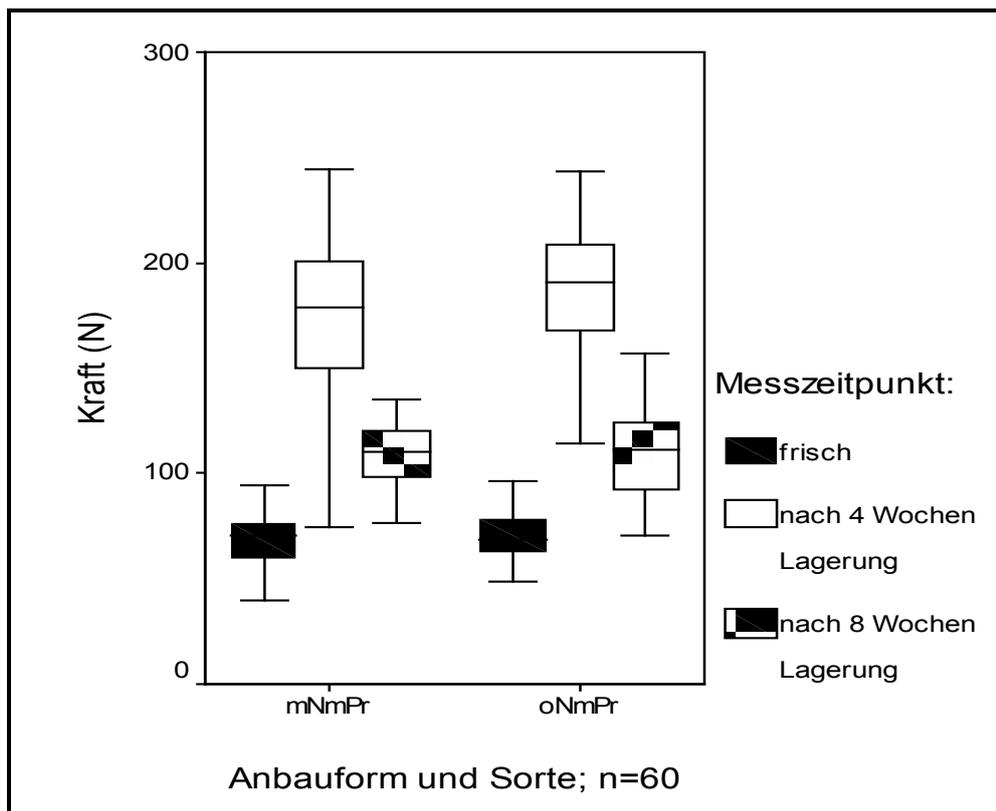


Abb. 34: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Einfluss der Anbauform auf die Festigkeit der Möhrensorte Rodelika

7.4.2.2 Ergebnisse: Praxisversuch Öko-Netzwerk

Es zeigten sich vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Sorten (vgl. Tab. 36, Abb. 35; vgl. SPSS-Statistikdaten im Anhang X). Signifikante Korrelationen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten bestanden nicht.

Tab. 36: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Einfluss der Sorte auf die Festigkeit von Möhren (Variationskoeffizient)

Ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten

Probe bzw. Sorte	Mittelwert (n=15) der Kraft (N) für 2 mm Eindringtiefe mit Kugelsonde zum Zeitpunkt:		
	Zeitpunkt 1: frisch	Zeitpunkt 2: nach 4 Wochen Lagerung	Zeitpunkt 3: nach 8 Wochen Lagerung
Rodelika	68,3 ab	80,85 a	74,04 ab
Rothild	61,69 a	71,86 ab	74,52 ab
Canada	67,33 a	70,2 bc	70,53 a
Fontana	65,1 a	68,19 b d	74,15 ab
Kamaran	65,02 a	78,91 a c	76,28 ab
Joba	74,86 b	74,94 abcd	79,22 b
Versuchsmittel	67,05	74,16	74,79

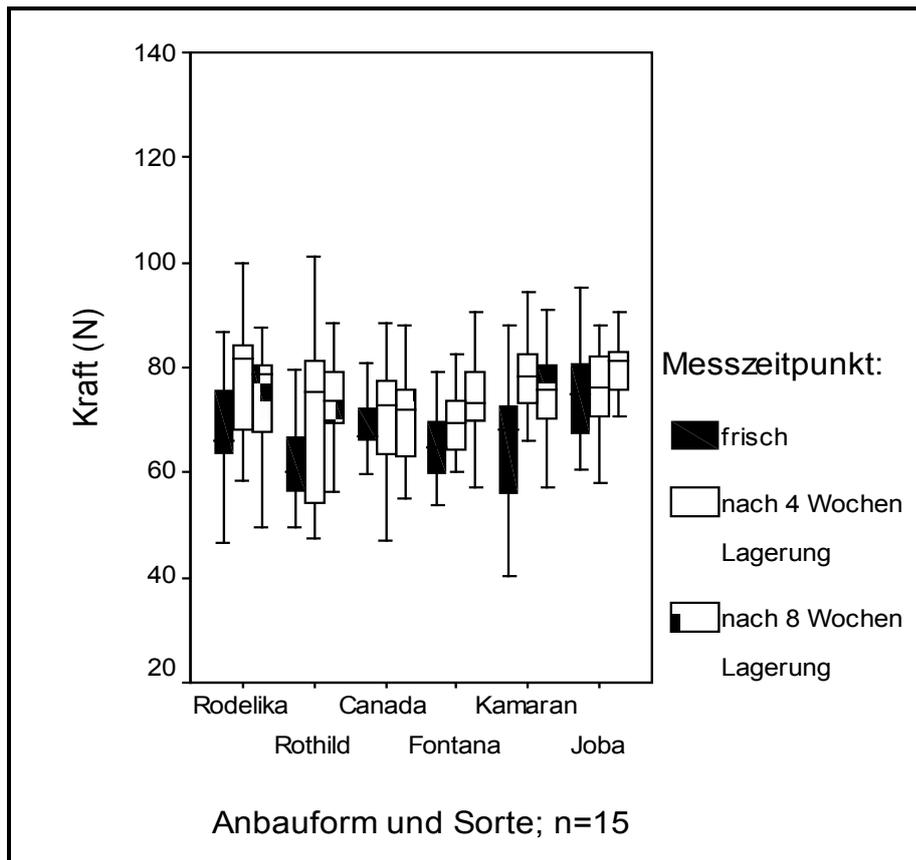


Abb. 35: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Einfluss der Sorte auf die Festigkeit von Möhren

7.5 Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmung

Insgesamt lag zu beiden Versuchsjahren tendenziell der pH-Wert bei allen frischen Möhren höher als bei den gelagerten Möhren. Die pH-Werte bewegten sich alle in einem Bereich zwischen 6.0 und 6.6 (vgl. Abb. 36-39). Klare Hinweise auf einen Effekt von Anbauform und Standort auf den pH-Wert gab es nicht.

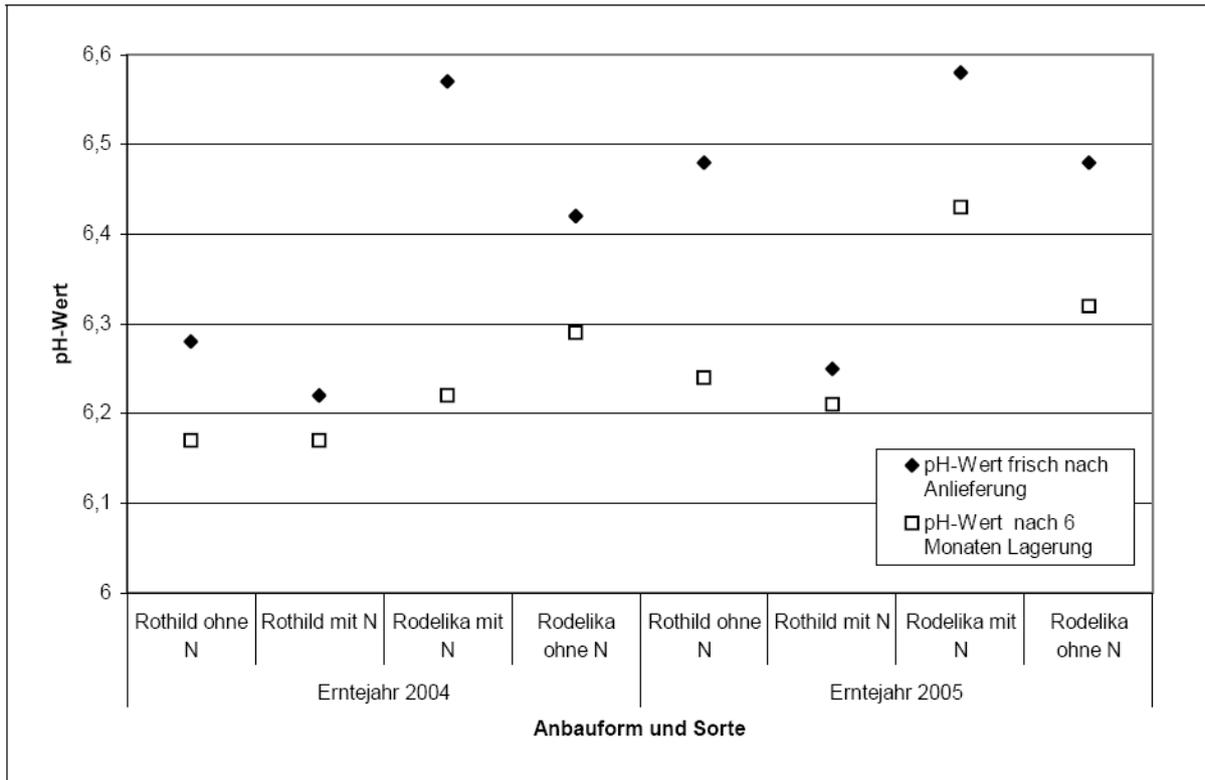


Abb. 36: Kodierte Feldversuchproben 2004/2005 – pH-Wert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)

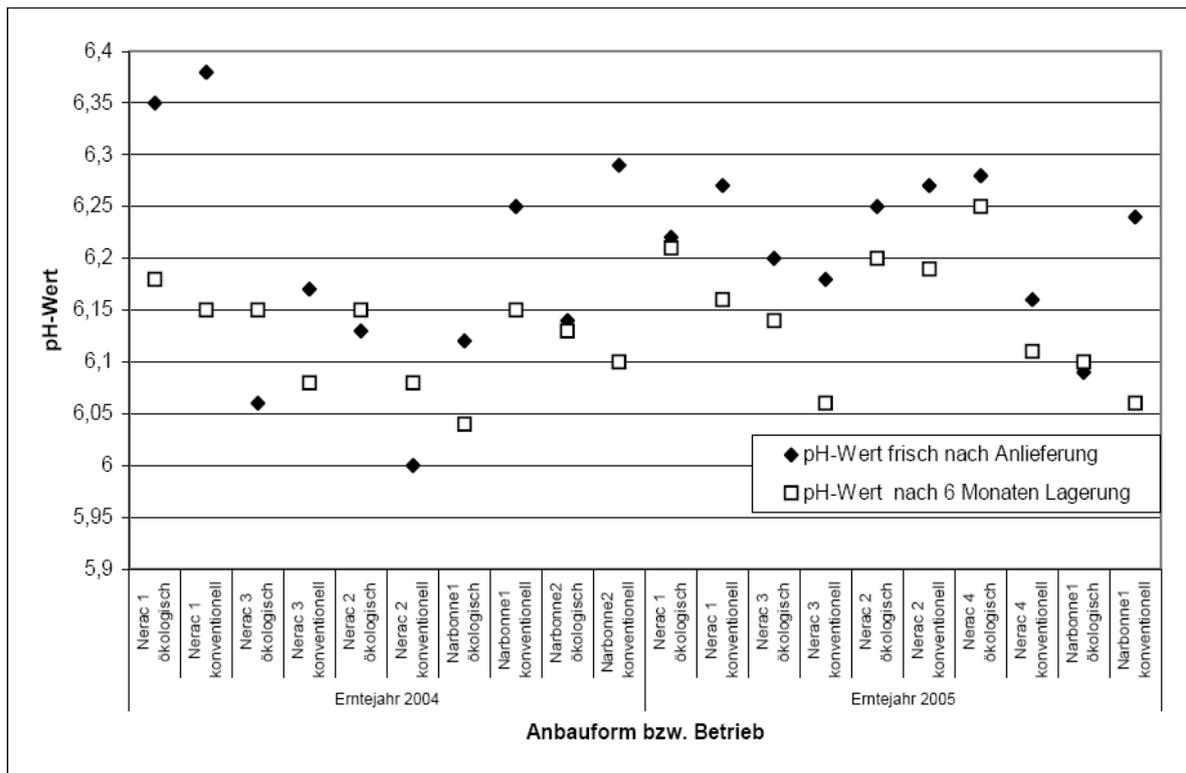


Abb. 37: Kodierte Erzeugerproben 2004/2005 – pH-Wert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)

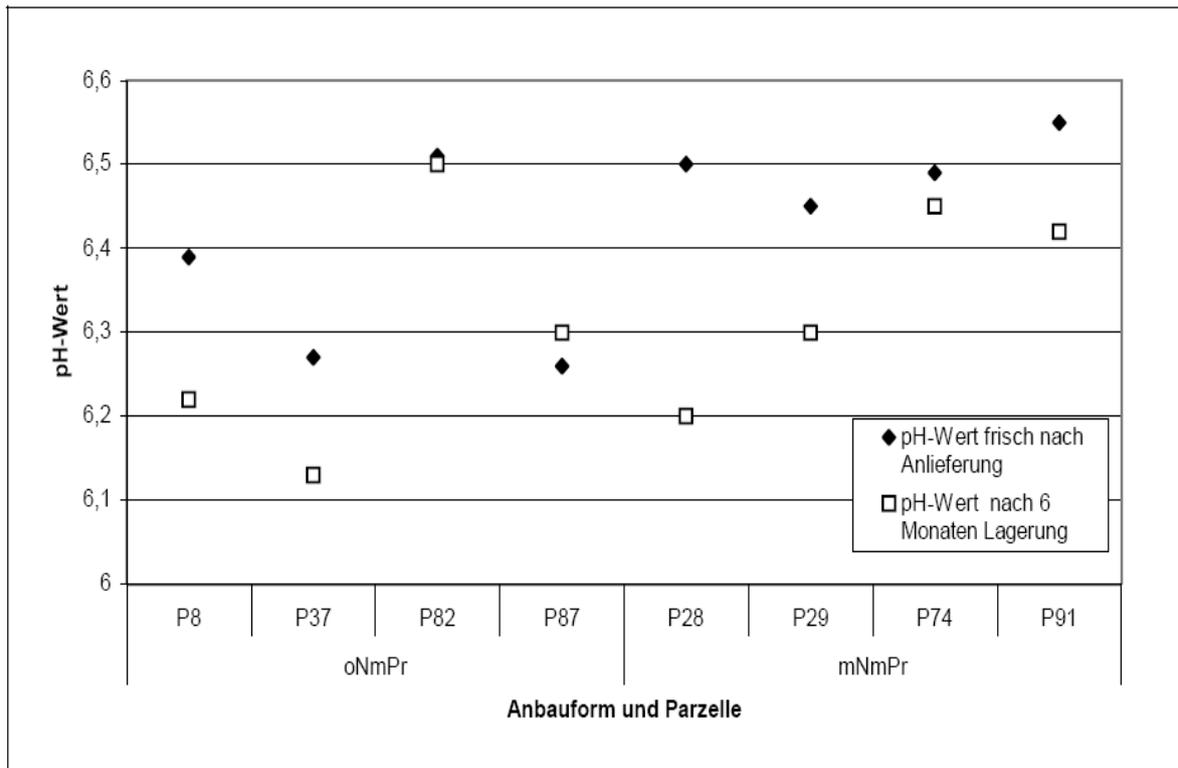


Abb. 38: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 – pH-Werte der Möhrensorte Rodelika (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)

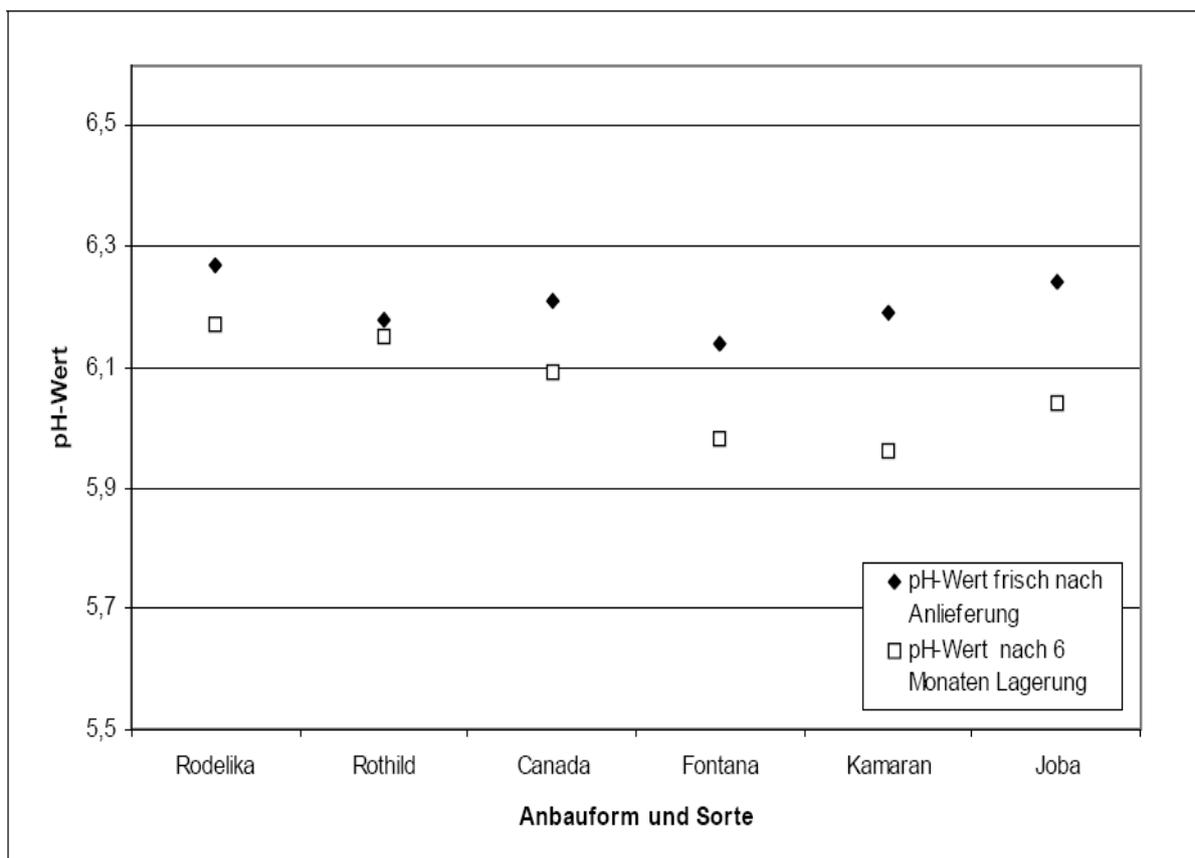


Abb. 39: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 – pH-Wert von Möhren unterschiedlicher Sorte (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)

8 Diskussion

8.1 Haltbarkeit und Verderbsflora von Möhren

Von den insgesamt 42 eingelagerten Möhren-Proben (vgl. 6.1; ohne Berücksichtigung der gewaschenen und ungewaschenen Möhren vom LLH, vgl. Tab. 9) erwiesen sich 38 während einer bis zu siebenmonatigen Lagerung bei 5°C und hoher Luftfeuchtigkeit als mikrobiologisch stabil, vier Proben verdarben durch Pilze. Da die Möhren zwar bei hoher Luftfeuchtigkeit (über 95%) gelagert wurden, Kondenswasserbildung aber nicht auftrat, wurde ebenso wie bei WELLINGER et al. (2006) bakterieller Verderb (z.B. durch *Erwinia spp.*) nicht beobachtet. Die Verkaufsfähigkeit der Möhren wird somit eher durch Transpirationsverluste und damit verbundene Texturveränderungen begrenzt (LINKE, 2003). In den Untersuchungen von ALPERS (2004) mussten nach einer viermonatigen Lagerung der Sorten Narbonne und Nerac (aus ökologischem Anbau, Ernte 2003, Dithmarschen) bei 0 - 0,5°C 5 bis 63% der Möhren wegen „Lagerkrankheiten“ aussortiert werden. Beim Vergleich mit unseren Daten ist jedoch zu berücksichtigen, dass die von uns eingelagerten Möhren vorab schon nach Europäischer Handelsklassennorm bonitiert, und nicht marktfähige Möhren aussortiert wurden.

Bei zweien der mikrobiell verdorbenen Proben handelte es sich um Möhren des Feldversuchs 2004, die mit zusätzlichem organischen Stickstoff gedüngt wurden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass eine Überversorgung mit Stickstoff die Widerstandsfähigkeit der Möhren gegenüber Pilzbefall tendenziell schwächt (PESCHKE, 1994; MEIER-PLOEGER, 2001; LINKE, 2003). Es gab keine Hinweise auf Effekte anderer Anbauparameter auf die Lagerfähigkeit, was aber auch durch die (überraschend) geringe Zahl der verdorbenen Proben bedingt ist.

Weitere Unterschiede in der Anfälligkeit von Möhren gegenüber pilzlichem Verderb können vielfältige Ursachen haben, insbesondere:

- Sorten- oder anbaubedingte Unterschiede in der Oberflächenstruktur, die z.B. auf Unterschiede in der Pektinstruktur zurückgehen (NGUYEN-THÉ und CARLIN, 2000)
- Erntezeitpunkt der Möhren (WELLINGER et al., 2006)
- Unterschiedlicher Gehalt an antimikrobiellen Inhaltsstoffen, z.B. Falcarindiol (GARROD et al., 1978) oder bestimmten phenolischen Verbindungen

- Unterschiedliche Reaktion auf Verletzung (Bildung von neuem Abschlussgewebe und von Phytoalexinen, z.B. 6-Methoxymellein; vgl. LEWIS und GARROD, 1983).

Für eine besondere Rolle mechanischer Barrieren spricht auch, dass wir nach oberflächiger Beimpfung von Möhren mit unseren Testpilzen *Fusarium sp.* und *Botrytis cinerea* keinen Verderb hervorrufen konnten, sondern nur durch Wundinokulation. Ein weiterer Hinweis darauf ist auch, dass ungewaschene Möhren sich als länger haltbar erwiesen als gewaschene Möhren (vgl. 7.1).

Die Möhrenproben, die in unseren Versuchen verdarben, waren hinsichtlich der anderen analytischen Daten, die in diesem Projekt sowie im Projekt 02OE170/F (KAHL und BUSSCHER, 2007) erhoben wurden, nicht auffällig. Sie zeigten gegenüber den anderen Proben weder eine verminderte Festigkeit noch ein stärkeres Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Fusarium spec.* nach Wundinokulation. Somit gibt es keine Hinweise darauf, dass die befallenen Möhren bei Verletzungen weniger Phytoalexine bildeten oder der pilzlichen Besiedelung weniger mechanische Hindernisse entgegensetzten. Auch WIEST (2004) beobachtete keine Unterschiede in der Festigkeit von Möhren, die unterschiedlich mit Stickstoff und biologisch-dynamischen Präparaten versorgt worden waren (Feldversuche der Universität Kassel im Jahr 2003, Varianten wie bei den unkodierten Möhrenproben des Feldversuchs 2004, vgl. Tab. 6). Für eine denkbare Wirkung der Polyphenolfractionen oder von Bitterstoffen auf das Pilzwachstum (vgl. PESCHKE, 1994) lieferten die im Projekt 02OE170/F erhobenen Daten der BFEL, Karlsruhe, bzw. des Sensoriklabors an der Universität Kassel keine Hinweise (siehe KAHL und BUSSCHER, 2007). Hingegen war der Gehalt an niedermolekularen Stickstoffverbindungen in denjenigen Möhren aus dem Feldversuch (2004) höher, die eine zusätzliche Stickstoffdüngung erhalten hatten und während der Lagerung durch Pilze verdarben (ermittelt im Labor KWALIS GmbH; siehe KAHL und BUSSCHER, 2007). Dies zeigte sich, wenn auch weniger ausgeprägt, auch bei den Vergleichen der verdorbenen Probe „Narbonne1 konv. 2004“ mit der stabilen Vergleichsprobe „Narbonne1 ökol. 2004“, sowie der Probe „Nerac4 ökol. 2005“ mit der stabilen Vergleichsprobe „Nerac4 konv. 2005“. Ein Zusammenhang mit einer üppigeren Versorgung der Pflanzen mit Stickstoff und deren negativen Konsequenzen auf die Resistenz liegt nahe (siehe oben).

Die Identifizierung von Pilz-Reinkulturen von verdorbenen Möhren zeigte im Wesentlichen die Pilzgattungen, die in Zusammenhang mit Lagerkrankheiten von Möhren beschrieben wurden. Im Gegensatz zu ALPERS (2004) fanden wir keine *Rhizoctonia*-, *Pythium*- und *Cylindrocarpon*-Stämme. Die Gattungen *Chalara* und *Sclerotinia*, die in Zusammenhang mit Lagerkrankheiten von Möhren erwähnt wurden (SNOWDON, 1991; NGUYEN-THÉ und CARLIN 2000; ALPERS, 2004; WELLINGER et al., 2006) konnten wir nur mit kultivierungsunabhängigen Methoden nachweisen. Diese Methoden basieren auf der Sequenzierung von PCR-amplifizierten Fragmenten von 18S-rDNA, die direkt aus verdorbenen Möhren präpariert worden war, und ergaben auch sonst ein anderes Artenspektrum als die kultivierungsabhängige Methodik. Vertreter der Ascomyceten-Gattung *Acremonium*, der Deuteromyceten-Gattungen *Tetracladium* und *Leucosporium*, der hefeartigen Basidiomyceten *Cystofilobasidium* und *Mastigobasidium* sowie der Porling-Gattung *Sistotrema* (*Agaricomycetidae*, *Basidiomycetes*) wurden nach unseren Recherchen bisher noch nicht als Bestandteile der Pilzflora auf Möhren beschrieben, weder als Verderbserreger noch als Mykorrhiza-Pilze. *Sistotrema* (*S. sernanderi* und andere) war in drei Proben nachzuweisen. Da die Banden der analysierten DNA-Fragmente in den SSCP-Gelen deutlich ausgeprägt waren, ist davon auszugehen, dass die nachgewiesenen Pilze substantielle Anteile an der pilzlichen Biomasse besaßen (NÜSSLEIN; persönliche Mitteilung). Ob es sich wirklich um die angegebenen Arten handelt, sollte jedoch mit einer unabhängigen Methodik bestätigt werden.

In einer Probe wurde auch DNA von Amöben (*Hartmannella cantabrigiensis*) und Schleimpilzen (*Dictyostelium mucoroides*) sowie der Hefeart *Candida austromaniana* nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass diese Organismen sich sekundär auf dem zerstörten Gewebe angesiedelt haben.

Das mit kultivierungsabhängigen Methoden ermittelte Pilz-Artenspektrum der beiden verdorbenen Möhrenproben aus dem Feldversuch stimmte überein. Es gibt somit keinen Hinweis auf einen Effekt der Möhrensorte auf die pilzliche Besiedelung. Hingegen war die Pilzflora auf den verdorbenen Möhren aus den Erzeugerproben deutlich verschieden. Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob diese Unterschiede vom Erntejahr (2004 oder 2005), vom Standort oder von der Anbauform (ökologisch oder konventionell) bedingt sind. Daten aus der Literatur

(Übersicht: NGUYEN-THÉ und CARLIN 2000) deuten jedoch auf einen wesentlichen Einfluss des Standorts hin. So war *Phytophthora megasperma* wesentlich am Verderb von Möhren aus der Normandie beteiligt (LE CAM et al., zitiert nach NGUYEN-THÉ und CARLIN 2000), eine Pilzart also, die weder in unserer Untersuchung noch von ALPERS (2004) gefunden wurde. In England, Dänemark und Skandinavien hat *Rhizoctonia carotae* besondere Bedeutung; auch diesen Pilz haben wir nicht nachgewiesen. KORA et al. (2005) schreiben den Pilzarten *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* und *Rhizoctonia carotae* ein besonders hohes Verderbspotential bei Möhren zu.

Die mittels kultureller Verfahren bestimmte „Pilzkeimzahl“ auf unverdorbenen Möhren erlaubte keine Vorhersage von deren Haltbarkeit und zeigte auch keine anbaubedingten Unterschiede. Insbesondere bei Proben des Erntejahrs 2004 war ein leichter Anstieg der Pilzkeimzahl während der Lagerung zu verzeichnen. Auch LINKE (2003) fand einen solchen Anstieg während der Lagerung von Möhren unter ungünstigen Bedingungen. Es ist zwar davon auszugehen, dass Pilze in senescentem pflanzlichen Gewebe besser wachsen können; andererseits korreliert die „Pilzkeimzahl“ nur lose mit der pilzlichen Biomasse, da sie vom physiologischen Zustand des Pilzes (Stabilität des Myzels, Sporenbildung) abhängt. Die mikroskopische Identifizierung der Pilz-Reinkulturen aus unverdorbenen Möhren ergab ein im Wesentlichen ähnliches Artenspektrum auf allen untersuchten Möhrenproben. Es überwogen erwartungsgemäß *Penicillium* (61 Isolate), *Cladosporium* (25 Isolate), *Mucor* (14 Isolate), *Alternaria* (11 Isolate, auch auf der Sorte Rodelika), *Fusarium* (8 Isolate), *Phoma* (5 Isolate), *Verticillium* (3 Isolate) und *Mycocentrospora* (3 Isolate). *Botrytis*, *Chaetomium* und *Absidia* kamen jeweils mit 2 Isolaten vor. *Acremonium*, *Mortierella* und *Epicoccum* waren jeweils nur in einem Vegetationsjahr nachzuweisen.

8.2 Haltbarkeit und Verderbsflora anderer verderblicher Rohstoffe

Alle untersuchten verschiedenen Sorten **Zwiebeln** verdarben während der Lagerung durch Befall durch die *Penicillium*-Arten *P. purpurogenum* und *P. glabrum*. Auf einer Sorte wurde auch *P. expansum* und *P. canescens* sowie *Cladosporium cladosporioides* und *Alternaria spec.* gefunden. In Banden aus SSCP-Gelen war außerdem DNA einer *Aspergillus*-Art sowie des hefeartigen Pilzes *Galactomyces*

geotrichum (perfekte Form des „Milchsimmels“ *Geotrichum candidum*) zu finden. *Botrytis*-, *Colletotrichum*-, *Fusarium*- und *Sclerotinia*-Arten, die ebenfalls Lagerkrankheiten von Zwiebeln verursachen (BÖTTCHER, 1996; NGUYEN-THÉ und CARLIN, 2000), wurden nicht gefunden.

Von den verdorbenen **Pastinaken** wurden zwei *Penicillium*- und zwei *Nectria*-Arten sowie *Fusarium spec.* und *Cladosporium minourae* isoliert. Mit DNA-basierter Methode wurden zusätzlich zwei neue *Pezizomycotina*-Arten entdeckt. Beschriebene Pastinaken-Verderber wie die Pilze *Phoma complanata*, *Rhizopus* und *Iternsonilia* (SNOWDON, 1991) wurden nicht nachgewiesen.

Von den verdorbenen **Tomaten** wurden hauptsächlich *Penicillium*- und *Cladosporium*-Arten auf Nährmedium angezüchtet. *Penicillium expansum* befand sich auf 20 von 23 Proben; *Alternaria alternata*, *Verticillium albo-atrum*, *Botrytis cinerea* und *Epicoccum nigrum* wurden jeweils nur einmal isoliert. Durch Sequenzierung von Banden aus SSCP-Gelen wurde *Penicillium chrysogenum* sowie der endophytische Phycomycet *Monoblepharella spec.* nachgewiesen. Pilze wie *Byssochlamys fulva* (REISS, 1998), *Myrothecium rodidum*, *Phomopsis spp.*, *Stemphylium herbarum*, *Trichothecium roseum*, *Geotrichum candidum* sowie *Rhizopus*-, *Phytophthora*- *Sclerotinia*- und *Colletotrichum*-Arten (NGUYEN-THÉ und CARLIN, 2000), die auch Verderb von Tomaten hervorrufen, wurden nicht gefunden.

8.3 Unterscheidung von Möhrenproben anhand der mikrobiellen Besiedelung

Weder mit der SSCP- noch mit der ARDRA-Methode konnten wir Unterschiede in der **Pilzflora** verschiedener nicht verdorbener Möhrenproben feststellen. Da Möhren-DNA nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass die Menge an pilzlicher Biomasse zu gering war. SSCP und ARDRA ließen sich hingegen zur Analyse der Pilzflora in Bodenproben (vgl. ANDERSON und CAIRNEY, 2004; HUNT et al. 2004) einsetzen und auch zur Charakterisierung der Diversität von Pilzen nutzen, die entweder direkt oder nach Kultivierung isoliert wurden.

Fingerprints von **Bakteriengemeinschaften** konnten sowohl mit der SSCP- als auch mit der ARDRA-Methode erzeugt werden. Bei 54 von 93 Möhrenproben (58%) waren

die SSCP-Fingerprints bei drei unabhängigen DNA-Präparationen identisch, während mit der ARDRA-Methode nur bei 35 von 93 Proben (37%) alle drei Wiederholungen identische Fingerprints lieferten. Bei der ARDRA könnte der Restriktionsverdau eine zusätzliche Unsicherheitsquelle sein (vgl. KIRK et al., 2004). Sie kommt daher vor allem als „Screening-Methode“ zur Auswahl repräsentativer Proben für die weitere Identifizierung mittels Klonierung und Sequenzierung in Betracht (vgl. LAGACÉ et al., 2004). Insgesamt waren die Fingerprints der Bakterienflora sehr heterogen, d. h. nur innerhalb weniger Vergleichspaare gleich (mit der SSCP-Methode jeweils bei 6 von 32 und mit der ARDRA-Methode jeweils bei 4 von 32, davon aber nur bei einem mit beiden Methoden). In wie weit sie einen Beitrag zur Unterscheidung von Proben nach der Anbauform leisten können, muss eine weitergehende Clusteranalyse in Verbindung mit einer entsprechenden Transformation der Ergebnisse zeigen, die im Rahmen der Zielsetzung dieses Vorhabens noch nicht möglich war.

Insgesamt erwiesen sich in unseren Untersuchungen Fingerprint-Methoden insbesondere zur Erfassung von Änderungen in der Bakterienflora während der Lagerung einer Probe geeignet. So konnten wir eine Verschiebung der Enterobakterienflora während der Lagerung einer Möhrenprobe eindeutig nachweisen (vgl. Abb. 13).

Die T-RFLP-Methode ist eine Weiterentwicklung der ARDRA-Methode. Sie erfordert zwar Spezialgeräte (Sequenziergerät mit Fluoreszenzdetektion), ist aber automatisierbar und liefert besser reproduzierbare Ergebnisse (vgl. KIRK et al., 2004). Wir können hierzu noch keine Aussagen machen, da wir im Rahmen unseres Projekts nur eine begrenzte Zahl von Proben ohne Versuchswiederholungen untersuchen konnten und außerdem öfter kein Peakprofil erhielten, offenbar weil das verwendete Restriktionsenzym gehemmt war oder seine spezifische Nucleotidsequenz nicht gefunden hat. Profile von Fragmenten aus pilzlicher rDNA erschienen nur, wenn diese DNA aus verdorbenen oder 7 Monate gelagerten Möhren stammte. Die Profile der Pilzflora auf den verdorbenen Proben „Rodelika mit N (2004)“ und „Rothild mit N (2004)“ unterschieden sich deutlich, obwohl die Identifizierung der Pilze keine großen Unterschiede ergab (Tab. 29). Das Profil der Bakterienflora auf den frisch untersuchten Möhren der Probe „Rothild mit N (2004)“ zeigte gegenüber demjenigen der Probe „Rothild ohne N (2004)“ einen Peak mehr,



war sonst aber gleich; diese Proben waren weder mit der SSCP noch mit der ARDRA zu unterscheiden (vgl. Tab. 13 und 14; vgl. Tab. 15 und 16).

Neben den eingesetzten Methoden eignet sich auch die DGGE zur kultivierungsunabhängigen Analyse mikrobieller Gemeinschaften (MUYZER und SMALLA, 1998; KIRK et al., 2004; siehe Abschnitt 3). Da der Zeitraum zwischen Projektbeginn und Ernte der Möhren des Vegetationsjahrs zu kurz für die Einarbeitung in die DGGE-Methode und für deren systematischen Vergleich mit der SSCP- und ARDRA-Methode war, wurde auf den Einsatz der DGGE verzichtet, zumal auch die Literatur und die Stellungnahme der Kooperationspartner hin (R. CONRAD, C. TEBBE, B. NÜSSLEIN, persönliche Mitteilung) wenig spezifische Vorteile der DGGE erkennen ließ.

9 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Projekt wurden neue Erkenntnisse über die Verderbsflora insbesondere von Möhren gewonnen. Die Ergebnisse zeigen eine Strategie auf, um die spezifische Verderbsflora von Lebensmitteln zu identifizieren, und schaffen eine mögliche Basis für die entsprechende Untersuchung anderer Lebensmittel, insbesondere pflanzlicher Rohstoffe, die häufig von schwer oder nicht kultivierbaren Pilzarten verdorben werden. Weiterhin sind wesentliche Erkenntnisse darüber erlangt worden, inwieweit mikrobiologische und molekularbiologische Techniken Teile eines Methodenspektrums zur Unterscheidung zwischen z.B. ökologisch und konventionell erzeugtem Erntegut werden können. Solche Methoden sind von erheblichem Interesse für Qualitätssicherung, Rückverfolgbarkeit und Vertrauensbildung beim Verbraucher (siehe BÖL-Projekt 02OE170/F der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ploeger). Schließlich können die methodischen Erfahrungen genutzt werden, um andere Fragestellungen im Bereich der Interaktionen von Mikroorganismen und Pflanzen zu untersuchen, z.B. die Florendynamik in der Rhizosphäre und ihre Beeinflussung durch Anbauverfahren und Pflanzenstärkungsmittel (einschließlich mikrobieller Antagonisten), die Mykorrhiza-Symbiose, oder die Verbreitung und Wirkung phytopathogener Pilze. Diese Fragen sind auch und gerade für den ökologischen Landbau von besonderem Interesse.

Teile der Ergebnisse wurden der wissenschaftlichen Öffentlichkeit bereits auf Fachkongressen dargestellt. Dabei wurden Kontakte geknüpft, einerseits zu Fachleuten auf dem Gebiet der Molekularbiologie von Pilzen und ihren Interaktionen mit Pflanzen, und andererseits zu Fachleuten für das Nachernteverhalten und die Qualitätsoptimierung von Gemüse und Obst.

Weiterhin wurde damit begonnen, die Ergebnisse so aufzubereiten, dass sie den Beteiligten in der Wertschöpfungskette und ihren Beratern unmittelbar nützlich sind. So wurden wesentliche Ergebnisse auf dem Workshop „Möhrenqualität erzeugen“ (organisiert am 13.09.2007 vom Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen in Reichelsheim-Beienheim) Praktikern des Gemüsebaus vorgestellt und mit ihnen diskutiert, und Gespräche mit dem zuständigen Qualitätsbeauftragten einer Handelskette geführt. Ferner gab es ein Radioauftritt bei hr-Info, bei dem Ergebnisse der breiteren Öffentlichkeit präsentiert wurden.

Auf der Basis der neuen Erkenntnisse könnten Schnellmethoden (DNA-basiert) zum Nachweis und zur Quantifizierung der Verderbserreger und der Charakterisierung komplexer Mikrofloren entwickelt werden. Dadurch könnten sich für Unternehmen, die derartige Nachweissysteme oder entsprechende Dienstleistungen anbieten, neue Marktchancen eröffnen, zumal konventionelle Verfahren gegenüber derartigen neuen Methoden deutliche Nachteile aufweisen.

Das übergeordnete Ziel des Projekts ist es, einen Beitrag dazu zu leisten, dass die Beteiligten in der Wertschöpfungskette und ihren Beratern die Lagerfähigkeit ihrer Produkte besser abschätzen können und die Produkte so behandeln, dass sie bis zum Ende der Haltbarkeit ihre Frische optimal behalten. Weiterhin soll den Multiplikatoren ermöglicht werden, die Verbraucher über die Produkte optimal zu informieren, insbesondere einen etwaigen erhöhten Gebrauchswert zu vermitteln. Dies alles könnte der Zufriedenheit der Käufer von Frischgemüse und Frischobst, insbesondere auch aus ökologischer Erzeugung, zu Gute kommen und somit zu mehr Verzehr dieser Produkte anregen. Die hierfür dienlichen Erkenntnisse aus dem Projekt sollen daher so aufbereitet werden, dass sie den Beteiligten in der Wertschöpfungskette und ihren Beratern nützlich sind. Zu diesem Zweck sollen die neu gewonnenen Erkenntnisse mit den Ergebnissen der Literaturrecherchen zu einer Gesamt-Übersicht über den Wissensstand über die spezifische Verderbsflora aufbereitet werden und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Agrartechnik Bornim e.V. der dort erstellte Leitfaden (DUMDEI et al., 2003) weiter optimiert werden.

Der Praxisnähe und dem Transfer der Projektergebnisse in die Praxis kommt zu Gute, dass schon ab Projektbeginn mit dem BÖL-Projekt 02OE170 zusammengearbeitet wurde, u.a. in Form gemeinsamer Sitzungen und Absprachen. Weiterhin haben wir mit dem „Netzwerk Forschung im ökologischen Gemüsebau (BÖL-Projekt 03OE569)“ zusammengearbeitet und Proben definierter Herkunft erhalten. Es bietet sich eine Einbindung des erstellten Informationsmaterials in Veröffentlichungen für die Praxis an, z.B. in den vom Institut für Agrartechnik Bornim e.V. erstellten Leitfaden, sowie in das Internetportal des Bundesprogramms Ökologischer Landbau, mit Links zum Portal „Oekolandbau.de“ und zu anderen im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau geförderten Forschungsvorhaben.

Die wirtschaftliche Umsetzung der Erkenntnisse am Markt (insbesondere die Einbindung in Systeme der Qualitäts- und Herkunftssicherung) wird begünstigt durch zahlreiche Praxiskontakte der Hochschule Fulda, insbesondere der Fachbereiche Oecotrophologie und Lebensmitteltechnologie.

10 Zusammenfassung

Das Projekt „Haltbarkeit verderblicher pflanzlicher Öko-Produkte (03OE191)“ hatte zum Ziel, Aussagen über die spezifische Verderbsflora und die Lagerfähigkeit pflanzlicher Erzeugnisse (insbesondere von Möhren) aus unterschiedlichen Anbauformen zu treffen. Es wurden in einem Zeitraum von 3,5 Jahren

- kodierte und unkodierte Proben (Möhren, Zwiebeln, Pastinaken und Tomaten) aus exakt definierter Erzeugung sowohl mit klassischen mikrobiologischen Verfahren (Selektivnährmedien) als auch mit molekularbiologischen Methoden (PCR-gestützte DNA-Fingerprintmethoden, die ohne Kultivierung von Mikroorganismen einsetzbar sind) erfolgreich auf ihre Zusammensetzung der Mikroflora untersucht.
- kodierte Möhrenproben aus ökologischer und konventioneller Erzeugung auf ihr Nachernteverhalten (Festigkeitsmessung) und ihre Anfälligkeit auf phytopathogene Pilze (Wund-Inokulation) getestet, und Messergebnisse zur zentralen Datenverarbeitung und Korrelation anderen Projekten des Bundesprogramms Ökologischer Landbau zur Verfügung gestellt (federführend: Universität Kassel, BÖL-Projekt 02OE170/F).
- Möhren von ökologisch bewirtschaftenden Betrieben parallel im gewaschenen und ungewaschenen Zustand auf ihre Pilzflora untersucht.

Während der Lagerung von 7 Monaten bei 5 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (ca. 99%, unter Vermeidung von Kondenswasserbildung) wiesen vier von 42 eingelagerten Möhrenvarianten sichtbaren pilzlichen Verderb auf. Zweimal handelte es sich dabei um ökologische Feldversuchproben, die zusätzlich mit organischem Stickstoff gedüngt worden waren. Weitere Hinweise auf einen Effekt der Anbauform auf die Lagerfähigkeit gab es nicht. Dies könnte allerdings auch durch die überraschend geringe Anzahl an mikrobiell instabilen Möhrenvarianten (4 von 42) bedingt sein.

Die Methoden SSCP (Analyse von DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismen) und ARDRA (Analyse von Restriktionsfragmenten amplifizierter rDNA) weisen Unterschiede in den Nucleotidsequenzen bestimmter Abschnitte der ribosomalen RNA (16S bei Bakterien, 18S bei Pilzen) nach und erwiesen sich als geeignet zur Erfassung von Unterschieden in der Zusammensetzung der **Bakterienflora** und deren Verschiebung während der Lagerung von Möhren. Die meisten



Probenvergleichspaare (unterschiedlich nur bezüglich eines der Merkmale „Sorte“, „Stickstoffdüngung“ und „Anbauform“) waren an Hand von unterschiedlichen Bandenmustern in Elektrophoresegelel unterscheidbar. Allerdings gab es nur ein Vergleichspaar, dessen Proben weder mit der SSCP- noch mit der ARDRA-Methode zu unterscheiden waren. Außerdem zeigte sich ein deutlicher Effekt des Vegetationsjahrs: So war die mit der SSCP-Methode ermittelte Distanz zwischen den Proben von Vergleichsparen im Vegetationsjahr 2004 erheblich größer als in den Vegetationsjahren 2005 und 2006.

Die SSCP-Methode erfasste Unterschiede in der **Pilzflora** nur bei Möhrenproben, die sichtbaren pilzlichen Verderb aufwiesen. Mit der ARDRA-Methode unter Verwendung der Restriktionsenzyme Hae III und Cfo I gelang dies nicht. Reinkulturen von Pilzen lieferten hingegen in der ARDRA-Analyse unterschiedliche Fragmentmuster. Somit könnte die ARDRA-Methode bei der Identifizierung von Pilzen nützlich sein. Mit der T-RFLP-Methode, einer Weiterentwicklung der ARDRA, erzielten wir Peakmuster sowohl von Pilzgemeinschaften als auch von Pilz-Reinkulturen, auf deren Basis eine Unterscheidung möglich ist.

Die Sequenzierung einzelner DNA-Fragmente aus SSCP-Gelen von Pilzgemeinschaften ergab Arten, die mit konventionellen mikrobiologischen Methoden (Kultivierung auf den üblichen Selektivnährmedien, Mikroskopie) nicht erfasst werden konnten und bisher noch nicht im Zusammenhang mit dem Verderb von Möhren beschrieben wurden. Mit der SSCP-Methode ließen sich auch Unterschiede in der Pilzflora verdorbener Zwiebeln, Pastinaken und Tomaten erfassen, und einzelne Banden in SSCP-Gelen konnten nach Sequenzierung typischen Pilzarten zugeordnet werden, die teilweise auch kulturell nachweisbar waren. Somit ist die für Möhren erarbeitete Methodik bei Zwiebeln, Pastinaken und Tomaten und wahrscheinlich anderen Erntegütern anwendbar.

Mit konventionellen mikrobiologischen Methoden ließen sich bei den nicht verdorbenen Möhren aus den Feldversuchen Beziehungen zwischen Anbaufaktoren (Sorte, Düngung) und der Pilzflora erfassen, die jedoch in den Vegetationsjahren unterschiedlich waren. Die Identifizierung von Pilz-Reinkulturen von verdorbenen Möhren ergab sowohl mit konventioneller als auch mit DNA-basierter Methodik

(Sequenzierung von rDNA-Fragmenten) im Wesentlichen diejenigen Pilzgattungen, die in Zusammenhang mit Lagerkrankheiten von Möhren beschrieben wurden.

Der Vergleich von gewaschenen und ungewaschenen Öko-Möhren erbrachte die größte Vielfalt an Pilzarten auf denjenigen Möhren, die mit wiederverwendetem Wasser gewaschen worden waren. Außerdem zeigte sich, dass die Haltbarkeit im Lager stark abhängig von der Qualität des Waschwassers war: Die ungewaschenen Möhren wiesen bei Abbruch der Lagerung nach sechs Monaten keinen pilzlichen Verderb auf; die gewaschenen Möhren verdarben vollständig, und zwar diejenigen am schnellsten, die mit wiederverwendetem Wasser gewaschen wurden.

Die Festigkeitsmessung sowie die Methode der Wund-Inokulation von Möhren mit *Botrytis cinerea* bzw. *Fusarium sp.* ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Proben einzelner Vergleichspaare, insgesamt jedoch keine klaren Hinweise auf einen Effekt von Anbauform und Standort.

11 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Geplantes Ziel	Ziel erreicht
Charakterisierung der Mikroflora verderblicher pflanzlicher Produkte aus ökologischer und konventioneller Erzeugung mit Hilfe neuer Methoden	ja
Aufzeigen einer Strategie, um die spezifische Verderbsflora von pflanzlichen Lebensmitteln zu analysieren und somit eine Basis für die entsprechende Untersuchung anderer Lebensmittel schaffen	ja
Prüfung, inwieweit molekularbiologische und mikrobiologische Techniken Teile eines Methodenspektrums zur Unterscheidung zwischen z.B. ökologisch und konventionell erzeugtem Erntegut werden können	ja
Aufzeigen von Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes verschiedener molekularbiologischer Methoden zur Analyse der Verderbsflora unverarbeiteter Lebensmittel	ja
Beitrag zum besseren Verständnis der Faktoren, die die mikrobielle Besiedelung pflanzlicher Rohware beeinflussen, und zur besseren Vorhersage der Haltbarkeit	teilweise

12 Ausblick und weiterführende Fragestellungen

Die Ergebnisse des Projektes 03OE191 zeigen eine Strategie auf, um die spezifische Verderbsflora von Gemüse und Obst zu identifizieren, und schaffen eine mögliche Basis für die Untersuchung insbesondere solcher pflanzlichen Rohstoffe, die häufig von schwer oder nicht kultivierbaren Pilzarten verdorben werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Florenanalyse mit konventionellen und molekularbiologischen Techniken nur wenig zur Unterscheidung zwischen z.B. ökologisch und konventionell erzeugtem Erntegut beitragen kann. Gleiches gilt für die Methodik der Wundinokulation und der Festigkeitsmessung.

Die methodischen Erfahrungen sollten daher vorrangig dazu genutzt werden, andere Fragestellungen im Bereich der Interaktionen von Mikroorganismen und Pflanzen zu untersuchen, insbesondere die Florendynamik in der Rhizosphäre von Kulturpflanzen, ihre Beeinflussung durch Anbauverfahren und Pflanzenstärkungsmittel (einschließlich mikrobieller Antagonisten) und ihr Einfluss auf die Pflanze. Dies ist auch und gerade für den ökologischen Landbau von besonderem Interesse (vgl. JOHANSSON et al., 2004). Antagonistische Wirkungen von Bakterien auf Schadpilze in der Rhizosphäre sind seit längerem bekannt (vgl. BROWN und BERINGER, 1983) und wurden in jüngerer Zeit genauer charakterisiert, so z.B. die Wirkung bestimmter Bakterien- und Pilzstämme gegen *Rhizoctonia solani* auf Kartoffeln und Salat (vgl. GROSCH et al., 2003, 2006). Auch die suppressive Wirkung bestimmter Komposte auf den Pilzbefall von Kartoffeln (SCHULTE-GELDERMANN et al., 2007) könnte damit in Zusammenhang stehen. Pflanzenstärkungsmittel, die vermehrungsfähige Mikroorganismen enthalten, sind im Handel (vgl. BBA, 2007; McSPADDEN GARDENER und FRAVEL 2002). Es fehlen jedoch Untersuchungen über die Wirkungen antagonistischer Mikroorganismen (Wurzel-Epiphyten und –endophyten) auf das Nachernteverhalten und die Haltbarkeit von Gemüsepflanzen. Dies sollte genauer untersucht werden, ebenso die Wirkungsmechanismen „antagonistischer“ Kompostpräparate.

Für die Praxis wichtig ist die Entwicklung von Methoden zum Schnellnachweis (DNA-basiert; Kooperation mit Anbietern von Reagenzien und Laborleistungen) der Verderbserreger, da auf diese Weise Haltbarkeitsprobleme früh erkannt werden können. Für die praktische Anwendung sind außerdem physiologische und



ökologische Studien an den Verderbserregern wichtig, und die Umsetzung der Erkenntnisse in angepasste Lagerbedingungen. Hierzu gehört auch die Erfassung der Zusammenhänge zwischen dem mikrobiellen Verderb und pflanzenphysiologischen Parametern, z.B. Transpirationswiderstände (LINKE, 2003), zwecks besserer Interpretation der unterschiedlichen Haltbarkeit verschiedener Gemüseproben.

Diese Projekte könnten in Zusammenarbeit mit den im Bericht erwähnten Partnern durchgeführt werden, wobei weitere Partner, insbesondere Fachleute auf dem Gebiet der Molekularbiologie von Pilzen, der Phytopathologie und der Qualität pflanzlicher Lebensmittel einbezogen werden sollten.

13 Verzeichnisse

13.1 Literaturverzeichnis

- AHRENS, E. (1988): Aspekte zum Nachernteverhalten und zur Lagerungseignung. In: Lebensmittelqualität – ganzheitliche Methoden und Konzepte (Hrsg. A. Meier-Ploeger, H. Vogtmann), S. 113-146. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe
- ALPERS, G. (2004): Qualitätssicherung bei der Langzeitlagerung ökologisch erzeugter Möhren – Abschätzung des Verderbs während der Lagerung. Bericht zum BÖL-Projekt 03OE151. Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein, Abteilung Gartenbau. <http://orgprints.org/5638/>
- ANDERSON, I. C., CAIRNEY, J. W. G. (2004): Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 769-779.
- BBA (Biologische Bundesanstalt) (2007): <http://pflanzenstaerkungsmittel.bba.de>
- BERG, G., OPELT, K., ZACHOW, C., LOTTMANN, J., GÖTZ, M., COSTA, R., SMALLA, K. (2006): The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 250-261.
- BÖTTCHER, H. (1996): Handbuch der Lebensmitteltechnologie. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart 174-181
- BROWN, M.E., BERINGER, J.E. (1983): The potential of antagonists for fungal control. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 10, 127-141.
- DOHRMANN, A. B., TEBBE, C. (2004): Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd Edition, 3.16. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 809-838
- DUMDEI, K.; LINKE, M., ILTE, K. (2003): Produktoptimales Handling von ökologisch erzeugten Tomaten, Möhren und Erdbeeren - Ein Leitfaden zur Qualitätserhaltung im Einzelhandel und bei der Direktvermarktung. Bericht zum BÖL-Projekt 02OE556. Institut für Agrartechnik Bornim e.V., D-Potsdam. <http://www.orgprints.org/5234/>
- 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, Kassel University Press, S. 89-92.
- GARROD, B., LEWIS, B.G., COXON, D.T. (1978): Cis-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 13, 241-246.
- GOMES, N.C.M., FAGBOLA, O., COSTA, R., RUMJANEK, N.G., BUCHNER, A., MENDONA-HAGLER, L., SMALLA, K. (2003): Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3758-3766.
- GROSCH, R., LOTTMANN, J., FALTIN, F., BERG, G. (2003) Biologische Bekämpfung von *Rhizoctonia solani* im ökologischen Anbau mit Hilfe von bakteriellen und pilzlichen Antagonisten. Bericht zum BÖL-Projekt Nr. 02OE298; <http://orgprints.org/3970/>
- GROSCH, R.; SCHERWINSKI, K.; LOTTMANN, J.; BERG, G. 2006. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research* 110 (12), 1464-1474.
- HAMM, U. (1999): Verbraucher – Bestimmungsgründe der Nachfrage nach Lebensmitteln aus ökologischem Anbau. In Handbuch Bio-Lebensmittel (Hrsg. M. Eschricht, C. Leitzmann), Teil V 2. Behr's Verlag, Hamburg
- HÖFLE, M. G., BRETTAR, I. (2007): Ein molekularbiologischer Blick in unser Trinkwasser – Mikrobielle Diagnostik für Umweltproben. *BIOforum* 3, 36-38
- HUNT, J., BODDY, L., RANDERSON, P.F., ROGERS, H.J. (2004): An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microb. Ecol.* 47, 385-395.
- JOHANSSON J.F., PAUL, L.R., FINLAY, R.D. (2004): Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 1-13
- KAHL, J., BUSSCHER, N. (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht Projekt 02OE170/F, Bundesprogramm Ökologischer Landbau
- KASBOHM, A. (2002): Kein schlechtes Jahr für den Gemüsebau. ZMP Marktkommentar, Öko-Markt Forum, Nr. 51/52 – 20.12.2002, S. 6-9.
- KIRK, J., BEAUDETTE, L.A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J.N., LEE, H., TREVORS, J.T. (2004): Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58, 169-188.

- KORA, C., McDONALD, M.R., BOLAND, G.J. (2005): Occurrence of fungal pathogens of carrots on wooden boxes used for storage. *Plant Pathology* 54, 665-670.
- KÖNIG, B. (2002): Die Methode der terminalen Restriktionslängen-Polymorphismen (T-RFLP). *Hygiene u. Mikrobiologie* 6, H4
- KRÖBER, H. (1985): Erfahrungen mit *Phytophthora* de Bary und *Pythium* Fringsheim. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft 225. Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- LAGACÉ, L., PITRE, M., JACQUES, M., ROY, D. (2004): Identification of The Bacterial Community of Maple Sap by Using Amplified Ribosomal DNA (rDNA) Restriction Analysis and rDNA Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2052-2060
- LEWIS, B.G., GARROD, B. (1983): Carrots. In: DENNIS, C.: Post-Harvest Pathology of Fruits and Vegetables. Academic Press, UK.
- LINKE, M. (2003): Qualitätserhaltendes Handling von Bioobst und Biogemüse im Einzelhandel und bei der Direktvermarktung. Abschlussbericht, BÖL-Projekt 02OE556. Institut für Agrartechnik Bornim e.V., D-Potsdam. <http://orgprints.org/5230/>
- 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.
- LUKOW, T., DUNFIELD, P.F., LIESACK, W. (2000): Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology* 32, 241-247.
- MATTHIES, K. (1991): Qualitätserfassung pflanzlicher Produkte aus unterschiedlichen Düngungs- und Anbauverfahren. Dissertation, FB Landwirtschaft, Universität-Gesamthochschule Kassel.
- McSPADDEN GARDENER, B.B., FRAVEL, D.R. (2002): Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. <http://www.apsnet.or/online/feature/biocontrol/top.html>
- MEIER-PLOEGER, A. (2001) Lebensmittelqualität, in Handbuch Bio-Lebensmittel (M. Eschricht und C. Leitzmann, Hrsg.), 7. Akt. Lfg., Behr's Verlag, Hamburg
- MEIER-PLOEGER, A., WÖRNER, F. (1998): Konservierung und Lagerung von Bio-Obst und Bio-Gemüse. In: Handbuch Bio-Lebensmittel (M. Eschricht, C. Leitzmann, Hrsg.), Kap. III-3.
- MEROTH, C., WALTER, J., HERTEL, C., BRANDT, M.J., HAMMES, W.P. (2003): Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 475-482.
- MÜLLER, K.; GEYER, M., BOKELMANN, W. (2003): Möglichkeiten zur Qualitätssicherung ökologisch erzeugter Gartenbauprodukte durch Koordinierung der Wertschöpfungsketten. Abschlussbericht, BÖL-Projekt 02OE482. Institut für Agrartechnik Bornim e.V.. <http://orgprints.org/5597/>
- MUYZER, G., SMALLA, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- NGUYEN-THÉ, C. CARLIN, F. (2000) : Fresh and processed vegetables. In: The microbiological safety and quality of food (eds. B.M. Lund, A. C. Baird-Parker, G.W. Gould). Aspen Publ., Gaithersburg, Md., pp. 620-684.
- PESCHKE, J. (1994): Inhaltsstoffe und Anfälligkeit von Möhren (*Daucus carota* L.) im Nacherntestadium unter dem Einfluss von Sorte, Herkunft und Anbaubedingung. Dissertation, FB Ernährungs- und Haushaltswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- RANTSIOU, K., COCOLIN, L. (2006) New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *Internat. J. Food Microbiol.* 108, 255-267
- REISS, J. (1998): Schimmelpilze – Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 2. Auflage, Springer-Verlag
- SAMSON, R.A. (Hrsg.) (2000): Introduction to Food- and Airborne Fungi. 6. Auflage, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
- SCHALLER, R.G. (1999) Untersuchungen zum Einfluss von mineralischer Stickstoffdüngung auf Aromastoffe von Möhren (*Daucus carota* L.), Dissertation, TU München.
- SCHULTE-GELDERMANN, E, SCHÜLER, C., HENSEL, O., HESS, J., FINCKH, M.R., BRUNS, C. (2007): Kontrolle von *Rhizoctonia solani* in Kartoffeln mit einer neu entwickelten Reihenapplikationstechnik von suppressiven Komposten. In: Zwischen Tradition und Globalisierung – Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Universität Hohenheim, 20.-23.03.2007 (S. Zikeli, W. Claupein, S. Dabbert, B. Kaufmann, T. Müller, A. Valle-Zárate, eds.), pp. 341-344. Verlag Dr. Köster, Berlin; <http://orgprints.org/9617/>

- SCHWIEGER, F., TEBBE, C. (1998): A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation-polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4870-4876.
- SCHWIEGER, F., TEBBE, C. (2000): Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*) – Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to the Diversity of Cultivated Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3556-3565.
- SEIBOLD, A. (2002): Strukturelle und funktionelle Analysen von Bakterienpopulationen mit Hilfe der PCR-SSCP in sechs unterschiedlichen Modellböden. Dissertation RWTH Aachen
- SENAT DER BUNDESFORSCHUNGSANSTALTEN (2003): Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren - Statusbericht 2003. Vorgelegt von der Senatsarbeitsgruppe „Qualitative Bewertung von Lebensmitteln aus alternativer und konventioneller Produktion“ (<http://www.bmvel-forschung.de>)
- SMALLA, K., WACHTENDORF, U., HEUER, H., LIU, W.-T., FORNEY, L. (1998): Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1220-1225
- SMALLA, K., WIELAND, G., BUCHNER, A., ZOCK, A., PARZY, J., KAISER, S., ROSKOT, N., HEUER, H., BERG, G. (2001): Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichments and seasonal shifts revealed. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4742-4751.
- SNOWDON, A. (1991): A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. 2. Vegetables. London: Wolfe Scientific.
- TEBBE, C., SCHMALENBERGER, A., PETERS, S., SCHWIEGER, F.. (2001): Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for Microbial Community Analysis. In: Environ. Molecular Microbiology: Protocols and Applications (ed. P.A. Rochelle), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp.161-175
- TICHY, H.-V., SIMON, R. (1999): Monitoring der Zusammensetzung endogener Populationen kultivierbarer Rhizosphärenbakterien unter dem Einfluss der freigesetzten, gentechnisch veränderten *Sinorhizobium meliloti* Stämme. BMBF-Workshop BioMonitor, Molekulare Mikrobiologie Neuherberg, 209-216.
- WALTER, J., TANNOCK, G.W., TILSALA-TIMISJÄRVI, S., RODTONG, S., LOACH, D.M., MUNRO, K., HAMMES, W.P. (2000): Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and species-specific PCR primers: Appl. Environ. Microbiol. 66, 297-303.
- WELLINGER, R., BUSER, H., KRAUSS, J. und THEILER, R. (2006): Karotten: Anbau, Erntezeitpunkt und Lagerung. AGRARForschung 13 (10), 412-417
- WIEST, A. (2004): Einfluss verschiedener Anbauverfahren auf die Qualität von Möhren: Untersuchungen zur Festigkeit und Gewebestruktur. Diplomarbeit, FB Oecotrophologie, Hochschule Fulda.

13.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der durchgeführten (X) Untersuchungen des Projekts 03OE191 an kodierten Möhrenproben.....	13
Tab. 2: Übersicht der durchgeführten (X) Untersuchungen des Projekts 03OE191 an unkodierten Möhrenproben.....	14
Tab. 3: Übersicht der durchgeführten (X) Untersuchungen des Projekts 03OE191 an anderen verderblichen Rohstoffen.....	15
Tab. 4: Übersicht der kodierten Möhrenproben aus dem Feldanbauversuch der Uni Kassel	17
Tab. 5: Übersicht der Erzeugerproben bzw. Betriebsvergleiche.....	18
Tab. 6: Übersicht der unkodierten Möhrenproben aus dem Feldversuch 2004 der Uni Kassel	18
Tab. 7: Übersicht der unkodierten Möhrenproben des Versuchsjahres 2005 und 2006 aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I	19
Tab. 8: Übersicht der unkodierten Zwiebelproben des Versuchsjahres 2005 und 2006 aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I	19
Tab. 9: Übersicht der gewaschenen und ungewaschenen Möhrenproben.....	20
Tab. 10: Übersicht der verdorbenen Möhren- und Pastinakenproben.....	21
Tab. 11: Übersicht der Vor- und Nachernteveränderungen der verdorbenen Tomatenproben	21
Tab. 12: Verwendete PCR-Primer bei der SSCP-Methode (aus: Tebbe, 2001).....	25

Tab. 13: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster auf SSCP-Gelen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Feldversuchproben).....	37
Tab. 14: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster auf SSCP-Gelen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Erzeugerproben).....	37
Tab. 15: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster des Hae III-Restriktionsverdaus (ARDRA) von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Feldversuchproben).....	47
Tab. 16: Unterschiede der genetischen Ähnlichkeit der Bandenmuster des Hae III-Restriktionsverdaus (ARDRA) von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Erzeugerproben).....	47
Tab. 17: Übersicht der Klonbibliotheken von Pilzen (isoliert von verdorbenen Möhren der Erntejahre 2004 und 2005)	54
Tab. 18: Kodierte Feldversuchproben 2004/2005/2006 – Bestimmung der Pilzzahl auf unverdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus, Sorte und Lagerung (KbE/g).....	56
Tab. 19: Kodierte Erzeugerproben 2004/2005 – Bestimmung der Pilzzahl auf unverdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus, Sorte und Lagerung (KbE/g).....	57
Tab. 20: Kodierte Feldversuchproben 2004/2005/2006 - Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von unverdorbenen Möhren	58
Tab. 21: Kodierte Erzeugerproben 2004/2005 – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von unverdorbenen Möhren	59
Tab. 22: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk (2005 und 2006) - Bestimmung der Pilzzahl auf Möhren unterschiedlichen Anbaus, Sorte und Lagerung (KbE/g).....	60
Tab. 23: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk (2005 und 2006) – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von unverdorbenen Möhren	61
Tab. 24: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk (2005 und 2006) – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Zwiebeln nach 5 Monaten Lagerung.....	61
Tab. 25: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk II (2006) – Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von ökologischen und konventionellen Möhren	62
Tab. 26: Ökologische Möhrenproben LLH (Erntejahr 2006; Magerhof und Luisenhof) - Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von gewaschenen und ungewaschenen Möhren.....	63
Tab. 27: Ökologische Möhrenproben LLH (Erntejahr 2006; Pappelhof) - Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von gewaschenen und ungewaschenen bzw. verdorbenen Möhren.....	64
Tab. 28: Mit kultivierungsabhängigen Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Tomaten.....	65
Tab. 29: Mit kultivierungsabhängigen und DNA-basierten Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Möhren unterschiedlichen Anbaus (kodierte Proben; Erntejahr 2004 und 2005).....	66
Tab. 30: Mit kultivierungsabhängigen und DNA-basierten Methoden identifizierte Pilze von verdorbenen Öko-Möhren (unkodierte Proben; Erntejahr 2006; Pappelhof)	67
Tab. 31: Kodierte Feld- und Erzeugerproben 2004/2005 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> u. <i>Fusarium spec.</i> auf Möhren unterschiedlichen Anbaus und Sorte nach Wund-Inokulation.....	69
Tab. 32: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Fusarium spec.</i> auf der unterschiedlich angebauten Möhrensorte Rodelika nach Wund-Inokulation..	71
Tab. 33: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Fusarium spec.</i> auf Möhren unterschiedlicher Sorte nach Wund-Inokulation.....	73
Tab. 34: Kodierte Feld- und Erzeugerproben 2004/2005 - Einfluss der Anbauform und der Sorte auf die Festigkeit von Möhren zu unterschiedlichen Lagerzeiten	75
Tab. 35: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Einfluss der Anbauform auf die Festigkeit der Möhrensorte Rodelika	77
Tab. 36: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Einfluss der Sorte auf die Festigkeit von Möhren.....	78

13.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht zur Vorgehensweise der molekularbiologischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Verderbsmikroflora	23
Abb. 2: Schema des Single Strand Conformation Polymorphismus (aus: Seibold, 2002)	24
Abb. 3: Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (aus: TICHY et al., 1999).....	26
Abb. 4: Schematische Abfolge bei der Bestimmung der Terminalen Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (aus: König, 2002).....	27
Abb. 5: Vorgehensweise zur mikrobiologischen Untersuchung	29
Abb. 6: Wund-Inokulation von Möhren mit phytopathogenen Pilzen	30

Abb. 7: Texture Analyser mit Kugelsonde (TA.XT2, Fa. Stable Micro Systems)	32
Abb. 8: Beispiel eines UPGMA-Dendrogramms (erstellt mit GelScan 5.1 Professional, Fa. BioSciTec, Frankfurt/Main) zur Unterscheidung von genetischen Fingerprints der SSCP- und ARDRA-Methode	33
Abb. 9: Beispiel eines SSCP-Gels mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (407 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus und Lagerzeit	36
Abb. 10: UPGMA-Dendrogramm der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung; Erntejahr 2005)	38
Abb. 11: UPGMA-Dendrogramm der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen von Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung, Erntejahr 2006)	39
Abb. 12: SSCP-Gel und UPGMA-Dendrogramm der einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (407 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von verdorbenen Zwiebeln nach 5 Monaten Lagerung (2005/2006)	40
Abb. 13: SSCP-Gel und UPGMA-Dendrogramm der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen von Enterobakterien, isoliert von der Oberfläche von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums	41
Abb. 14: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von der verdorbenen Feldversuchprobe „Rothild mit N (2004)“	42
Abb. 15: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von der verdorbenen Erzeugerprobe „Narbonne2 konventionell (2004)“	43
Abb. 16: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von der verdorbenen Erzeugerprobe „Nerac4 ökologisch (2005)“	43
Abb. 17: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von verdorbenen Möhren- und Pastinakenproben des LLH (Ernte 2006)	44
Abb. 18: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von verdorbenen Zwiebeln (Erntejahr 2005)	45
Abb. 19: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 18S rRNA Gens (342 bp) von Pilzgemeinschaften, isoliert von verdorbenen Tomaten (Erntejahr 2006)	45
Abb. 20: Beispiel eines Restriktionsverdau (ARDRA) mit Hae III von Amplifikaten der 16S rDNA (1650 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus u. Lagerzeit	46
Abb. 21: UPGMA-Dendrogramm des Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Amplifikaten der 16S rRNA (1650 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung, Erntejahr 2005)	48
Abb. 22: UPGMA-Dendrogramm des Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Amplifikaten der 16S rRNA (1650 bp) der Bakteriengemeinschaften, isoliert von Möhren aus Praxisversuchen des Öko-Netzwerkes I (frisch und nach 7 Monaten Lagerung, Erntejahr 2006)	49
Abb. 23: Hae III-Restriktionsverdau (ARDRA) von Pilzreinkulturen, isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums	50
Abb. 24: Restriktionsverdau (ARDRA) von Pilzreinkulturen (jeweils mit Restriktionsenzym Mbi I, Cfo I sowie Hae III), isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums	51
Abb. 25: UPGMA-Dendrogramm eines Restriktionsverdau (ARDRA) von Pilzreinkulturen jeweils mit Restriktionsenzym Mbi I, Cfo I sowie Hae III (Pilze isoliert von Möhren unterschiedlichen Anbaus, Lagerzeit und Verderbstadiums; identifiziert durch Direkt-Sequenzierung auf Basis der ITS-Region)	51
Abb. 26: T-RFLP-Profile der Klone von Pilzen (isoliert von verdorbenen Möhren der Erntejahre 2004 und 2005)	54
Abb. 27: Phylogenetischer Stammbaum zu den Klonbibliotheken der Pilzgemeinschaften, isoliert von den verdorbenen Möhrenvarianten „Rothild mit N“, „Narbonne2 konventionell“ und „Nerac4 ökologisch“	55
Abb. 28: Kodierte Feldversuchproben 2004 und 2005 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Fusarium spec.</i> auf Möhren unterschiedlichen Anbaus und Sorte nach Wund-Inokulation	70
Abb. 29: Kodierte Erzeugerproben 2004 und 2005 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Fusarium spec.</i> auf Möhren unterschiedlichen Anbaus und Sorte nach Wund-Inokulation	70
Abb. 30: Unkodierte Feldversuchproben Uni Kassel 2004 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Fusarium spec.</i> auf der unterschiedlich angebauten Möhrensorte Rodelika nach Wund-Inokulation ..	72
Abb. 31: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Fusarium spec.</i> auf Möhren unterschiedlicher Sorte nach Wund-Inokulation	73
Abb. 32: Kodierte Feldversuchproben 2004 und 2005 - Einfluss der Anbauform und der Sorte auf die Festigkeit von Möhren zu unterschiedlichen Lagerzeiten	76
Abb. 33: Kodierte Erzeugerproben 2004 und 2005 - Einfluss der Anbauform und der Sorte auf die Festigkeit von Möhren zu unterschiedlichen Lagerzeiten	76



Abb. 34: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 - Einfluss der Anbauform auf die Festigkeit der Möhrensorte Rodelika	78
Abb. 35: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 - Einfluss der Sorte auf die Festigkeit von Möhren	79
Abb. 36: Kodierte Feldversuchsproben 2004/2005 – pH-Wert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)	80
Abb. 37: Kodierte Erzeugerproben 2004/2005 – pH-Wert von Möhren unterschiedlichen Anbaus (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)	80
Abb. 38: Unkodierte Feldversuchsproben Uni Kassel 2004 – pH-Werte der Möhrensorte Rodelika (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)	81
Abb. 39: Unkodierte Praxisversuchsproben Öko-Netzwerk 2005 – pH-Wert von Möhren unterschiedlicher Sorte (frisch und nach 6 Monaten Lagerung)	81

14 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Erfolgte Veröffentlichungen:

STEINHAUER, D., ZIMMERER, S., LÜCKE, F.-K. (2007): Pilzliche Besiedlung ökologisch erzeugter Möhren. Posterbeitrag zum Workshop „Möhrenqualität erzeugen“, organisiert vom Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) auf dem Pappelhof, Reichelsheim-Beienheim, 13.09.2007

STEINHAUER, D., LÜCKE, F.-K. (2007): Pilzliche Verderbsflora von Möhren aus ökologischer und konventioneller Erzeugung. In: Zwischen Tradition und Globalisierung – Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau (S. Zikeli, W. Claupein, S. Dabbert, B. Kaufmann, T. Müller, A. Valle-Zárate, eds.), Band 1, pp. 209-212. Verlag Dr. Köster, Berlin

STEINHAUER, D., LÜCKE, F.-K. (2006): Spoilage patterns of organic and conventional carrots. In: New approaches in food quality analysis. 2nd European Conference, Karlsruhe, 14-15.09.2006

STEINHAUER, D., LÜCKE, F.-K. (2006): DNA-based analysis of microbial colonisation of vegetables from organic and conventional horticulture. In: „Qualität, Frische und Sicherheit pflanzlicher Lebensmittel aus ökologischer und traditioneller Produktion“. 41. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Lebensmittel) e.V., Wädenswil, 20.-21.03.2006, 53

STEINHAUER, D., LÜCKE, F.-K. (2006): DNA-based analysis of microbial colonisation of vegetables from organic and conventional horticulture. In: „Aktuelle Trends und neue Herausforderungen in der Lebensmittelmikrobiologie“ – Beiträge zum 8. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene, Suhl 05.-07.04.2006 (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., Hrsg.), 69

STEINHAUER, D., LÜCKE, F.-K. (2005): Untersuchungen zur Erfassung von Unterschieden in der mikrobiellen Besiedelung und der Haltbarkeit von Möhren aus unterschiedlichen Anbauformen (Analysis of microbial colonization and shelf life of organic and conventional carrots). In: „Ende der Nische“ – Beiträge zur 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Kassel, 01.-04.03.2005 (J. HESS & G. RAHMANN, Hrsg.). 575-576. Kassel University Press.

Geplante Veröffentlichungen:

Teile aus diesem Bericht sollen zur Veröffentlichung in peer-reviewed Journals aufbereitet und eingereicht werden.

Besonders praxisrelevante Daten werden für eine Veröffentlichung in der Fachzeitschrift für ökologische Agrarkultur „Ökologie & Landbau“ aufbereitet.

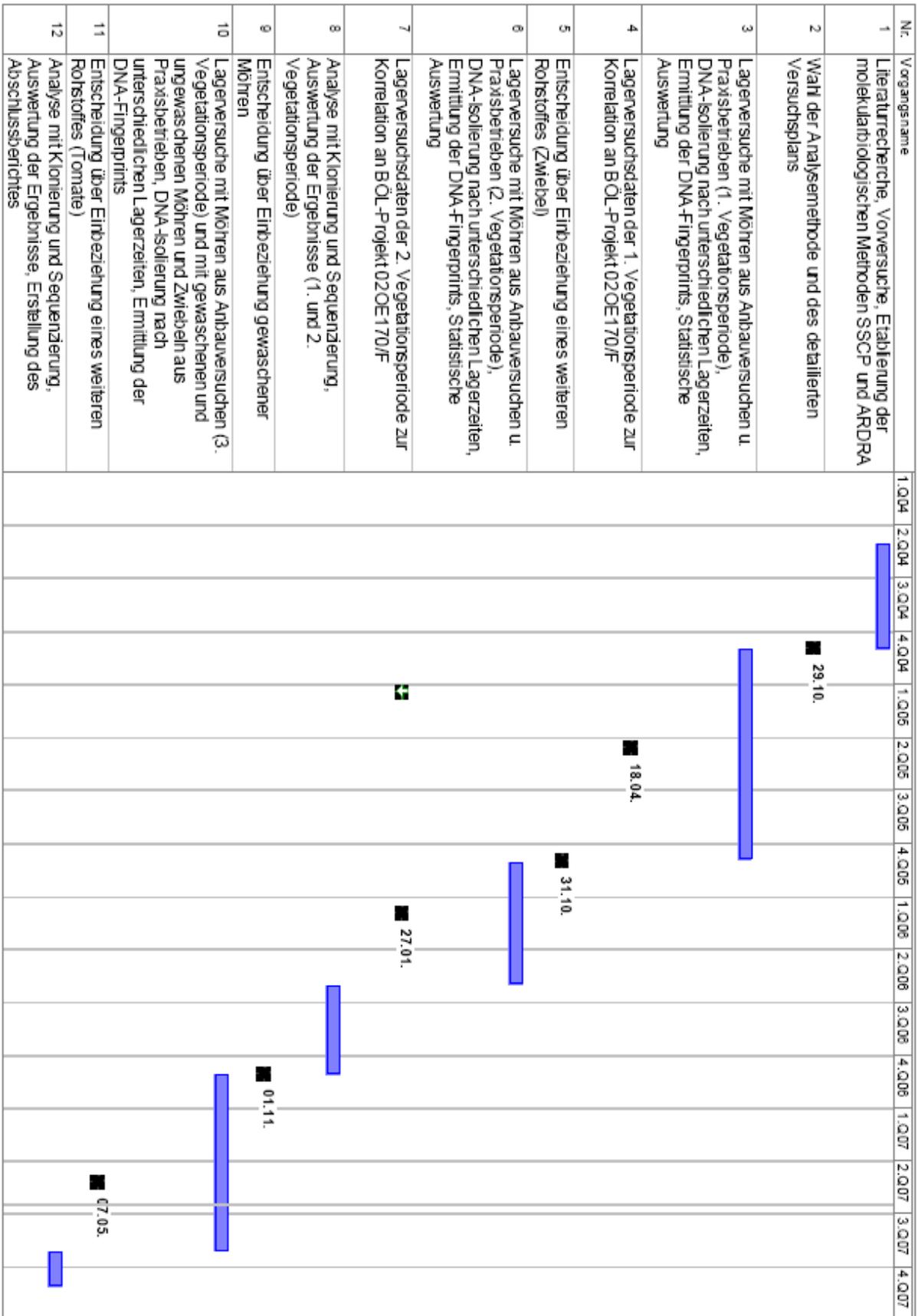


15 Anhang

Anhang I: Ablaufplan des Projekts Nr. 03OE191	106
Anhang II: DNA-Isolierung von mikrobiellen Gemeinschaften und Pilzreinkulturen	107
Anhang III: DNA-Extraktion von Bakterienreinkulturen	109
Anhang IV: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis.....	110
Anhang V: Single Strand Conformation Polymorphismen	111
Anhang VI: Clusteranalyse der SSCP-Fingerprints von Bakteriengemeinschaften	113
Anhang VII: Clusteranalyse d. ARDRA-Fingerprints v. Bakteriengemeinschaften.	120
Anhang VIII: T-RFLP-Profile von Bakteriengemeinschaften	126
Anhang IX: T-RFLP-Profile von Pilzgemeinschaften	129
Anhang X: SPSS-Statistikdaten der Wund-Inokulation und Festigkeitsmessung .	136
Anhang XI: Teilbericht zum Datenaustausch mit BÖL-Projekt Nr. 02OE170/F.....	159
Anhang XII: Abbildungen der von Möhren kultivierten Pilze	165



Anhang I: Ablaufplan des Projekts Nr. 03OE191



Anhang II: DNA-Isolierung von mikrobiellen Gemeinschaften und Pilzreinkulturen

Chemikalien und Reagenzien

PBS (Phosphate-buffered saline)

Einwaage für 500 ml:

4,367 g NaCl

0,11 g KCl

0,62 g Na₂HPO₄

0,11 g KH₂PO₄

Vor dem Auffüllen auf 500 ml pH-Wert auf 7,2 einstellen. 15 min bei 121 °C autoklavieren.

NDP

Einwaage für 100 ml:

0,02 g Natrium-Deoxycholat

0,5 g Polyethylen-Glycol

in sterilem Wasser

UltraClean™ Soil DNA Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, USA, Cat. No. 12800)

Geräte

Stomacher 400

Zentrifuge Rotanta RP (Rotor 5094, r = 154 mm)

Heräus Cryofuge 20-3

Probenaufbereitung

- 5 g Möhrenschen (grobe Erdpartikel entfernen) in einen Stomacher-Beutel einwiegen und mit 20 ml PBS + Chelex 100 (0,3 g) für 1 min bei höchster Geschwindigkeit im Stomacher 400 behandeln. Anschließend die in einem Falcon-Gefäß aufgefangene Flüssigkeit 2 min bei 500 x g (Rotanta RP: 1.700 rpm) zentrifugieren und den Überstand in einem frischen 50 ml Falcon-Gefäß sammeln (Glaspipette! Auf Pellet achten!).
- Die Möhrenschen mit 10 ml NDP erneut im Stomacher behandeln, zentrifugieren und den Überstand mit dem ersten Überstand vereinen.
- 8 g der Überstände von den zwei Zentrifugationen in ein Heräus-Röhrchen einwiegen und für 20 min bei 10.000 x g (Heräus-Cryofuge: 11.000 rpm) zentrifugieren.
- Den Überstand nach der Zentrifugation verwerfen und das entstandene Pellet in 8 g PBS lösen (Glasstab!) und erneut für 20 min bei 11.000 rpm zentrifugieren.
- Danach Überstand verwerfen und das Pellet durch stetiges Aufwühlen mit einer Eppendorf-Pipette in 400 µl PBS lösen. Diese Lösung in ein 1,5 ml Safe

Lock Tube überführen und anschließend bei 13.000 rpm 2 min zentrifugieren. Überstand mit einer Pasteurpipette sorgfältig entfernen.

- Das entstandene Pellet kann nun bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden oder direkt zur DNA-Isolierung mit dem MoBio UltraClean™ Soil DNA Kit eingesetzt werden.

DNA-Isolierung mit dem UltraClean™ Soil DNA Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, USA, Cat. No. 12800)

- 0,25 bis 1,0 g des Pellets in das 2 ml Bead Solution Gefäß einwiegen und leicht vortexen, um es zu vermischen
- 60 μl Lösung S1 hinzufügen (wenn Ausfällungen vorhanden sind, Lösung 1 bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum vollständigen Auflösen erhitzen)
- 200 μl Lösung IRS hinzufügen
- Bead Solution Gefäß mit Hilfe eines Adapters horizontal auf einem Vortexer befestigen und 10 min bei maximaler Geschwindigkeit vortexen
- Bead Solution Gefäß anschließend 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren und Überstand (ca. 400-450 μl) in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführen
- 250 μl Lösung S2 hinzufügen und 5 sec vortexen, anschließend für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (im Kühlschrank) inkubieren
- Eppendorfgefäß für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend unter Beobachtung des Pellets 450 μl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 900 μl Lösung S3 hinzufügen und 5 sec vortexen
- Ca. 600 μl auf den Spinfilter aufbringen und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, den Durchfluß verwerfen, den restlichen Überstand auf den Filter geben und erneut für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
- 300 μl Lösung S4 hinzufügen und 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Den Durchfluß verwerfen und erneut für 1 min zentrifugieren
- Den Spinfilter vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführen ohne mit der zurückbleibenden Lösung S4 in Berührung zu kommen
- 50 μl Lösung S5 auf das Zentrum der weißen Filtermembran geben und 30 sec zentrifugieren
- Den Spinfilter verwerfen und die DNA-Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ einfrieren

Anhang III: DNA-Extraktion von Bakterienreinkulturen

Chemikalien und Reagenzien

Herstellung einer 0,05 M NaOH-0,25 % (wt/vol) Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-Lösung (50 ml):

0,125 g SDS
25 ml dest. H₂O
25 ml 0,1M NaOH

Das SDS in ein Reagenzglas einwiegen und in 25 ml destilliertem H₂O auflösen. 25 ml 0,1 M NaOH mit einer Vollpipette entnehmen und zusammen mit der SDS-Lösung in einem Messzylinder vermischen.

Durchführung

SCHWIEGER und TEBBE (2000) verwenden zur DNA-Gewinnung von Bakterienreinkulturen eine **Koch-Lyse-Prozedur**:

- Zellen von auf Agarplatten gewachsenen Einzelkolonien werden mit einem sterilen Zahnstocher in ein Eppendorfgefäß überführt
- 50 µl 0,05 M NaOH-0,25 % (wt/vol) Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-Lösung hinzufügen und alles kräftig vermischen
- anschließend das Eppendorfgefäß bei 95°C im Wasserbad 15 min kochen lassen
- danach werden 450 µl ddH₂O hinzugeben und alles kräftig gevortext
- anschließend 3 min zentrifugieren (8.000 x g), damit sich die festen Bestandteile am Boden absetzen
- den Überstand – in dem sich die rohe DNA befindet – mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig (unter Beachtung des Pellets) abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- die DNA kann bis zur Analyse bei –20°C eingefroren und gelagert werden

Anhang IV: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

PCR von genomischer Bakterien-DNA :

Verwendete Primer:

F 27 5` - AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG - 3`

R 1492 5` - TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T- 3

PCR-Ansatz:

25 µl-Ansatz: 24,5 µl PCR-MIX + 0,5 µl DNA-Template (DNA wird vorher 1:30 mit dH₂O verdünnt)

10 x Puffer	2,5	µl
dNtPs	0,5	µl (10 mM each)
F 27	0,25	µl (50 pmol/l)
R1492	0,25	µl (50 pmol/l)
QIAGEN HotStarTaq-Polymerase	0,125	µl (5 U/µl)
ddH ₂ O	20,875	µl

PCR-Bedingungen:

15 min bei 95 °C, dann 30 Zyklen: 60 sec bei 94 °C , 60 sec bei 50 °C, 70 sec bei 72 °C, abschließend 5 min bei 72 °C. Überprüfung der Amplifikationsprodukte in 1% Agarose-Gel (~1650 bp).

ARDRA-Ansatz (nach Lagacé et al. , 2004):

Verwendete Restriktionsenzyme:

- Hha I (Cfo I): erkennt 5`GG/CC 3`-Sequenzen
- Hae III: erkennt 5`GCG/C 3`-Sequenzen

20 µl Reaktionsvolumen: 10 µl PCR-Produkt + 10 µl Enzym-Mix

PCR-Wasser	7,5	µl
Restriktionsenzym (5 U)	0,5	µl (5 U)
Puffer (10 x)	2,0	µl

ARDRA-Bedingungen:

Das Restriktionsenzym wird außerhalb der reinen Werkbank zupipettiert, um Kontaminationen zu vermeiden. Es werden jeweils 10 µl DNA herauspipettiert und dem Enzym-Mix zugegeben. Die Proben werden 2 Stunden bei 37 °C bebrütet. Eine DNA-Probe ohne Enzym läuft als Kontrolle des Enzymverdaus mit. Hierzu werden 5 µl der Probe mit 2 µl Puffer und 13 µl PCR-Wasser vermischt. Der Verdaus wird nach der Bebrütung mit Zugabe von 9 µl Gel-Loading-Puffer pro Reaktionsgefäß abgebrochen. Danach 10 µl des Verdaus für die 2,5 % Agarose-Gelelektrophorese einsetzen, um die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen der unterschiedlichen rDNAs zu bestimmen (4 h-Lauf).

Anhang V: Single Strand Conformation Polymorphismen (nach DOHRMANN und TEBBE, 2004)

Für Bakterien:

PCR von genomischer DNA:

Verwendete Primer:

F 27 5'- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG - 3'
R 1492 5'- TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T - 3

PCR-Ansatz:

25 µl-Ansatz: 24,5 µl PCR-MIX + 0,5 µl DNA-Template (DNA wird vorher 1:30 mit dH₂O verdünnt)

10 x Puffer	2,5 µl
dNtPs each)	0,5 µl (10 mM)
F 27 (50 pmol/l)	0,25 µl
R1492 (50 pmol/l)	0,25 µl
Quiagen HotStarTaq-Polymerase	0,125 µl (5 U/µl)
ddH ₂ O	20,875 µl

PCR-Bedingungen:

15 min bei 95 °C, dann 30 Zyklen: 60 sec bei 94 °C, 60 sec bei 50 °C, 70 sec bei 72 °C, abschließend 5 min bei 72 °C

Überprüfung der Amplifikationsprodukte in 1% Agarose-Gel (~1850 bp).

PCR von 16S rDNA-Fragmenten:

Verwendete Primer:

COM 1 5'- CAG CAG CCG CGG TAA TAC - 3'
COM 2 (phosphoryliert) 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT - 3

PCR-Ansatz:

50 µl-Ansatz: 49 µl PCR-MIX + 1 µl DNA-Template (genomische DNA wird vorher 1:30 mit dH₂O verdünnt)

10 x Puffer	5 µl
dNtPs	1 µl (10 mM each)
COM 1	0,5 µl (50 pmol/l)
COM 2 (phosphoryliert)	0,5 µl (50 pmol/l)
Quiagen HotStarTaq-Polymerase	0,25 µl (5 U/µl)
ddH ₂ O	41,75 µl

PCR-Bedingungen:

15 min bei 95 °C, dann 25 Zyklen: 60 sec bei 94 °C, 60 sec bei 50 °C, 70 sec bei 72 °C, abschließend 5 min bei 72 °C

Reinigung der amplifizierten DNA mit dem QIAGEN's QIAquick PCR Purification Kit (Cat.No. 28104) und Überprüfung der Amplifikationsprodukte in 1% Agarose-Gel. Fragmentlänge ca. 400 bp.

Für Pilze:

PCR von 18S rDNA-Fragmenten:

Verwendete Primer:

NS 7 5'- GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC - 3'
NS 8 (phosphoryliert) 5'- TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA - 3

PCR-Ansatz:

50 µl-Ansatz: 49 µl PCR-MIX + 1 µl DNA-Template (DNA wird vorher 1:30 mit dH₂O verdünnt)

10 x Puffer	
dNtPs	
NS 7	
NS 8 (phosphoryliert)	
Quiagen HotStarTaq-Polymerase	0,25 µl (5 U/µl)
ddH ₂ O	

PCR-Bedingungen:

15 min bei 95 °C, dann 25 Zyklen: 60 sec bei 94 °C, 60 sec bei 50 °C, 70 sec bei 72 °C, abschließend 5 min bei 72 °C

Reinigung der amplifizierten DNA mit dem QIAGEN's QIAquick PCR Purification Kit (Cat.No. 28104) und Überprüfung der Amplifikationsprodukte in 1% Agarose-Gel. Fragmentlänge ca. 342 bp.

Verdau des phosphorylierten Strangs:

30 µl Ansatz: 14 µl PCR-Produkt + 16 µl Mix (für Spec.-Standard und 600 ng DNA)

0,5 µl λ-Exonuclease (New England Biolabs, 5 U/µl)
3,0 µl 10 x λ-Exonuclease-Puffer (NEB)
12,5 µl bidest. H ₂ O

Mix vortexen und anzentrifugieren, jeweils 14 µl PCR-Produkt hinzupipettieren und bei 37 °C im Thermomixer für 45 min inkubieren.

Aufreinigung des Einzelstrangs mit QIAGEN's QIAquick Min Elute PCR Purification Kit (Cat.No. 28004). Eluiert wird mit 10 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) oder dH₂O (pH 8,5) oder TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8).

1 µl (10 mM each)
0,5 µl (50 pmol/l)
0,5 µl (50 pmol/l)

SSCP-Fingerprint:

41,75 µl

- Zum Eluat werden 9 µl denaturierender Ladepuffer (950 µl Formamid 95 %; 10 µl NaOH 1M; 10 µl Bromphenolblau-Stammlösung 2,5 %; 10 µl Xylene cyanol-Stammlösung 2,5 %) hinzupipettiert. Es folgt eine Inkubation von 2 min bei 95 °C, sowie ein sofortiges Abkühlen in Eis für 3 min.
- Anschließend werden 19 µl Lösung der einzelsträngigen DNA in das Gel eingesetzt (bei Pilz- bzw. Bakterienreinkulturen reichen 7-10 µl)

MDE-Gel (0,625 %)

für 1 Gel (40 ml):

12,5 ml MDE 2 x Lösung
4,0 ml 10 x TBE-Puffer



23,5 ml bidest. H₂O
400 µl APS
60 µl TEMED

Vorbereitung der Glasplatten

Spacer, Kamm und Glasplatten mit EtOH reinigen und polieren. Kamm (unterm Abzug !) mit TEMED überschichten.

Kleinere Glasplatte mit Repell Silane (1ml) beschichten, 5 min einwirken lassen und polieren (bei häufigem Gebrauch nur jedes zweite Mal mit Repell Silane behandeln), anschließend noch einmal kurz mit EtOH polieren.

Größere Glasplatte unter dem Abzug mit Bind Silane-Lösung (5 ml EtOH 98 %, 50 µl Essigsäure 98 %, 50 µl Bind Silane [Pharmacia]) beschichten, 5 min einwirken lassen und anschließend polieren. Vor dem Gel-Gießen Glasplatte mit Alkohol polieren.

BIO-RAD-Apparatur-Einstellung

8 Liter 1 x TBE-Puffer, 250 V, 200 mA, 30 Watt für 18 h bei max. 20 °C

Silbernitratfärbung:

Lösungen:

- 10 % Essigsäure
50 ml 100% Essigsäure
450 ml aqua bidest

- Färbelösung
1. 0,5 g Silbernitrat (AgNO₃)
750 µl Formaldehydlösung 37 %
500 ml Aqua bidest.

- Entwickler
33,75 g Natriumcarbonat-Decahydrat (Na₂CO₃-10hydrat)
600 ml Aqua bidest.
→ vorlösen und kaltstellen bei 4 °C

1,2 ml Formaldehydlösung 37 %
600 µl 0,2 % Natrium-Thiosulfat [2 ml 20% Na₂S₂O₃ ad 200 ml bidest.H₂O]

Färbeablauf:

Behandlungsschritte bis zur Entwicklung werden bei 20 rpm auf dem Schüttler vorgenommen; die Silbernitrat- und Essigsäurebehandlung werden abgedeckt (bei Silbernitrat abdunkeln!)

1. Gel abbauen und mit Glasplatte 30 min. in der Färbewanne in 10 % Essigsäure waschen
2. 33,75 g Na₂CO₃-10hydrat in 600 ml Aqua bidest. lösen und kalt stellen (4 °C)
3. Essigsäure für den Fixierungsschritt aufbewahren
4. Gel 3 x 15 min. in Aqua bidest. waschen
5. Färbelösung ansetzen (AgNO₃ ist lichtempfindlich!)
6. Gel 1 bis 1,5 Stunden mit der Färbelösung färben
7. 5 min. mit Aqua bidest. spülen
8. unmittelbar vorher Entwickler fertig stellen

Gelplatte in die Entwicklerwanne legen und in 2 Schritten entwickeln, d.h. mit 150-200 ml der Entwicklerlösung Silbernitratrückstände am Gel entfernen (30 sec.). Im zweiten Schritt mit der restlichen Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität färben (ab und zu schwenken). Das Gel sollte dabei nicht trockenfallen. Entwickler mit 10 % Essigsäure stoppen (gebrauchte, siehe 1. Schritt); 30 min in Aqua bidest legen; Gel unter dem Abzug trocknen lassen.

Fotografieren wird das Gel auf der UV-Konverterplatte mit dem Dokumentationssystem der Firma biostep.

Crush and Soak-Protokoll:

→ Elution einzelner DNA-Banden aus dem SSCP-Gel für Sequenzierung oder Klonierung

Crush-and-soak-Puffer:
0,5 M Ammoniumacetat

10 mM Magnesiumacetat
1 mM EDTA
0,1 % SDS

Ethanol 96 %

1 TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)

1. ausgewählte DNA-Banden mit dem Skalpell ausschneiden
2. Gel-Stückchen in ein 1,5 ml safe-lock-Gefäß geben und 50 µl crush-and-soak-Puffer daraufgeben
3. einige Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen bis das Gel-Stückchen eingeweicht ist
4. dann mit einer Pipettenspitze das Gelstück in kleine Teilchen zerstückeln, indem man es an der Wand des Gefäßes zerdrückt
5. Inkubation bei 37 °C für 3 h bei 800 rpm in einem Thermal Block
6. überführe 40 µl der Flüssigkeit in ein frisches 1,5 ml safe-lock Gefäß und gebe 80 µl Ethanol dazu
7. alles kurz vermischen und über Nacht bei -20°C einfrieren
8. bei 24.000 x g in einer pre-cooled Zentrifuge bei 4°C für 15 Minuten zentrifugieren
9. Überstand vorsichtig – unter Beachtung des Pellets – abnehmen
10. Pellet bei 37 °C für 10 bis 20 Minuten trocknen
11. Pellet in 12 µl TE-Puffer auflösen

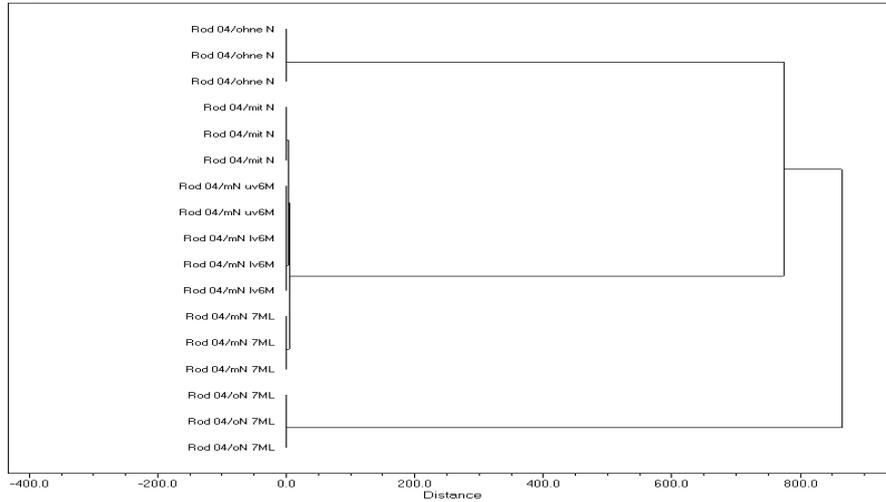
Um die DNA der ausgewählten Bande zu amplifizieren, werden 2 µl der DNA-Flüssigkeit in eine 50 µl PCR eingesetzt. Nehme die gleichen Primer und PCR-Bedingungen, die schon vorher für die jeweilige SSCP verwendet wurden. Das PCR-Produkt kann dann für weitere Untersuchungen, wie Klonierung und Sequenzierung eingesetzt werden.



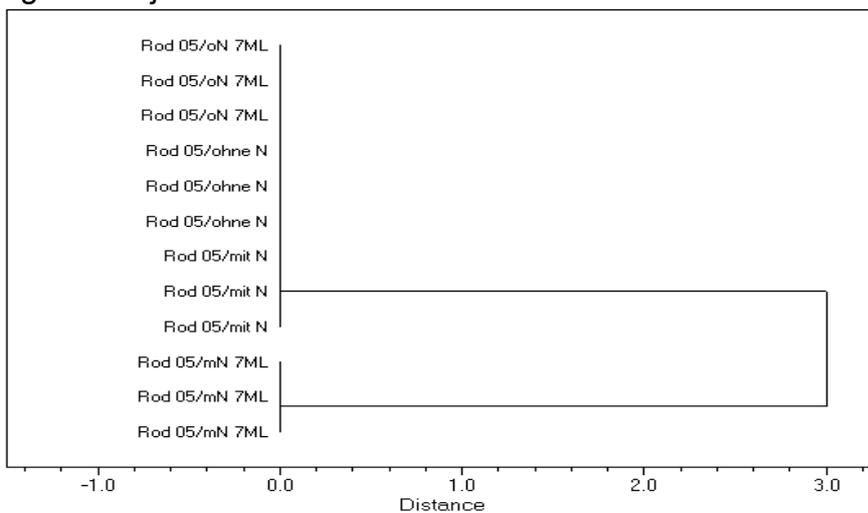
Anhang VI: Clusteranalyse der SSCP-Fingerprints von Bakteriengemeinschaften

Rodelika mit N/Rodelika ohne N:

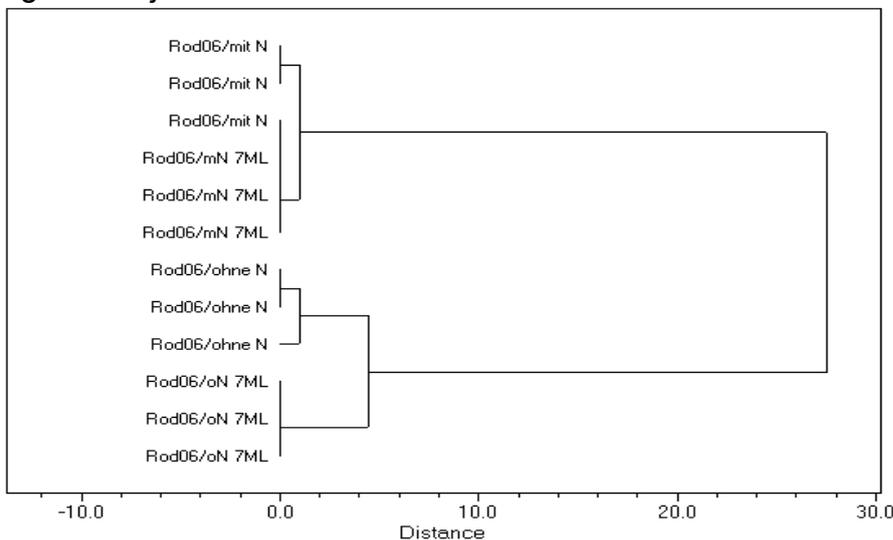
Vegetationsjahr 2004:



Vegetationsjahr 2005:



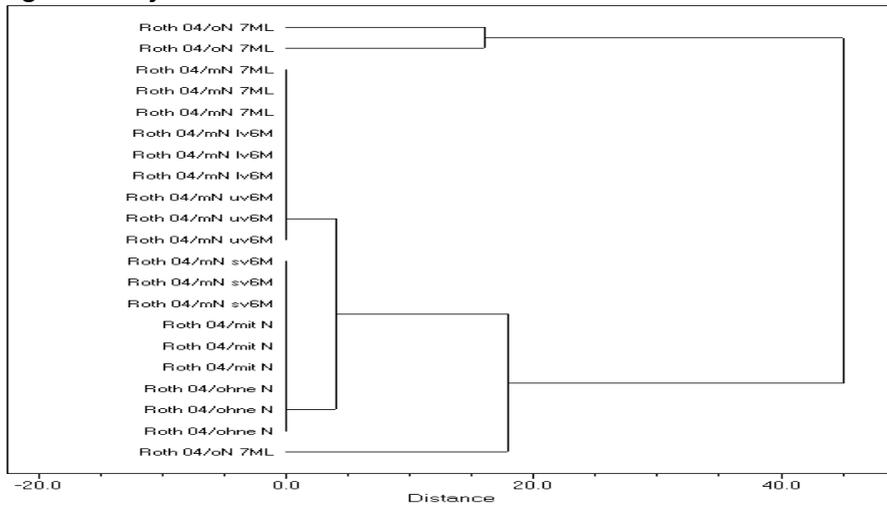
Vegetationsjahr 2006:



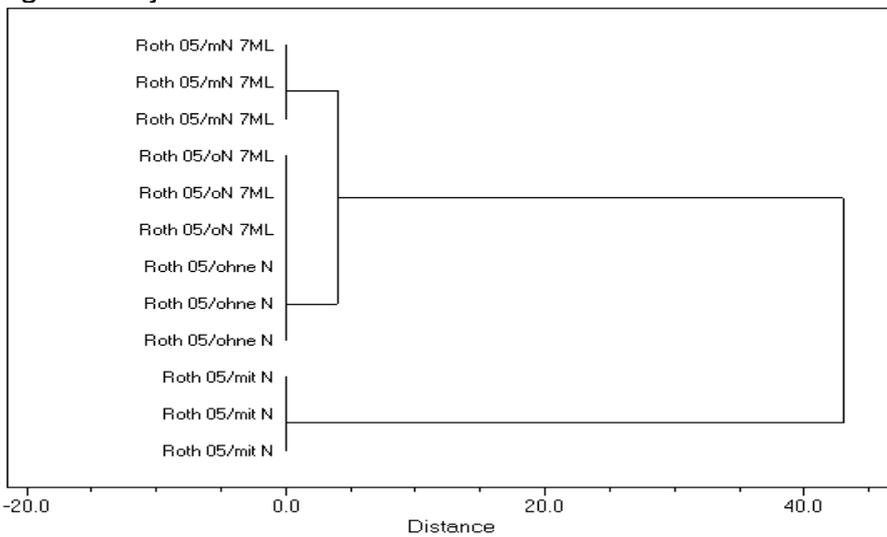


Rothild mit N/Rothild ohne N:

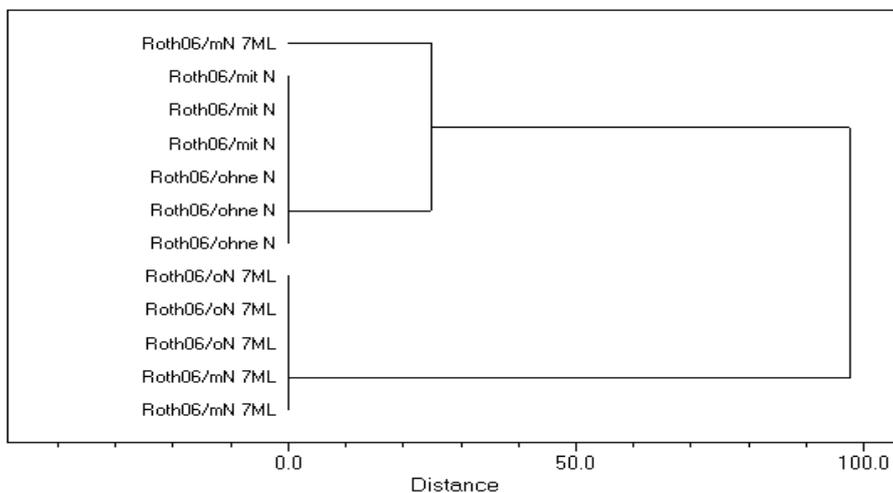
Vegetationsjahr 2004:



Vegetationsjahr 2005:



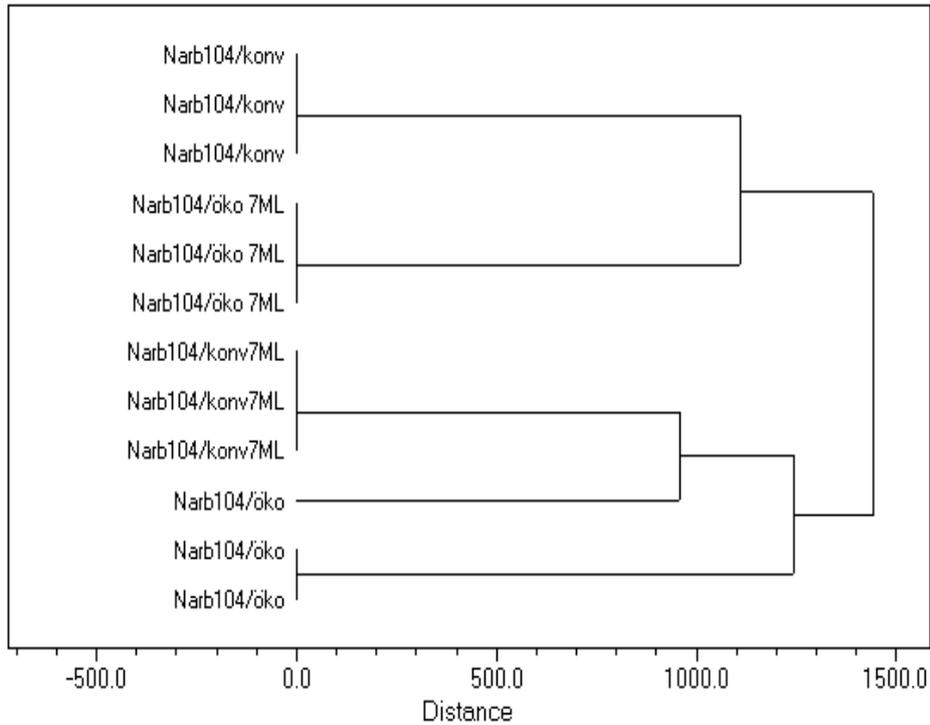
Vegetationsjahr 2006:



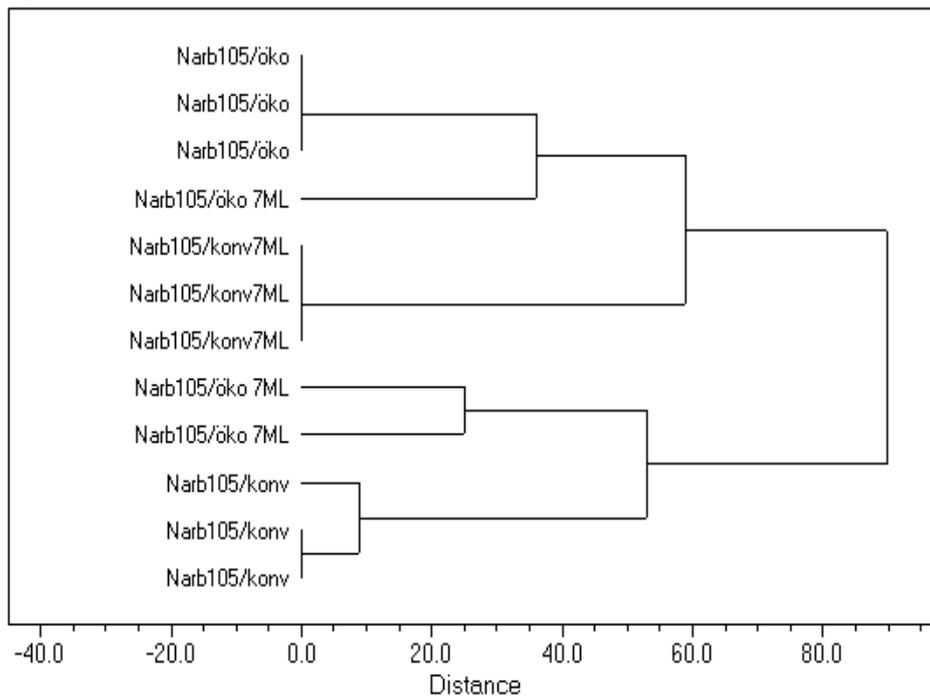


Narbonne1 (ökologisch und konventionell)

Vegetationsjahr 2004:



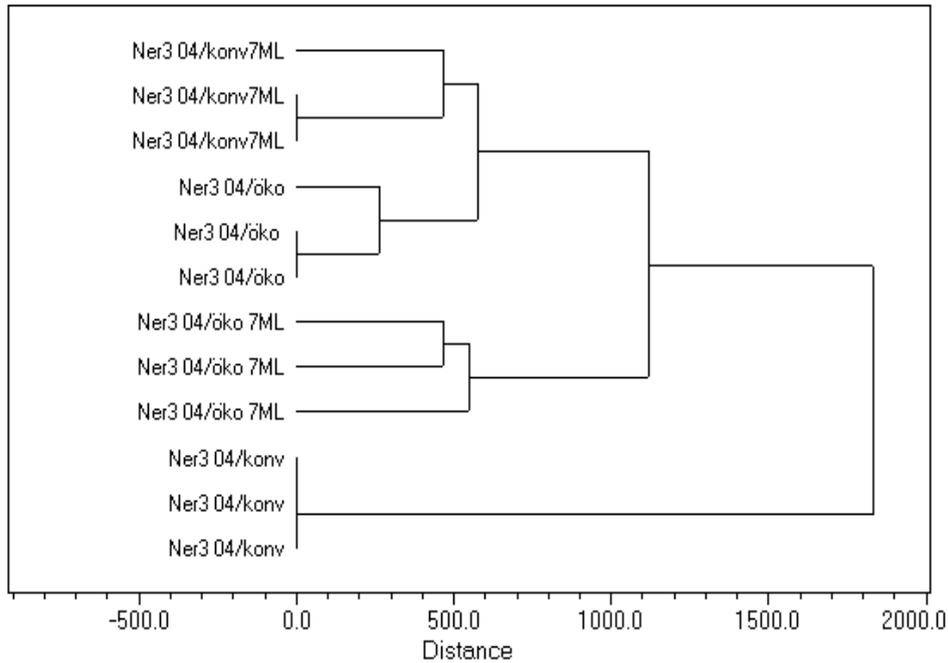
Vegetationsjahr 2005:



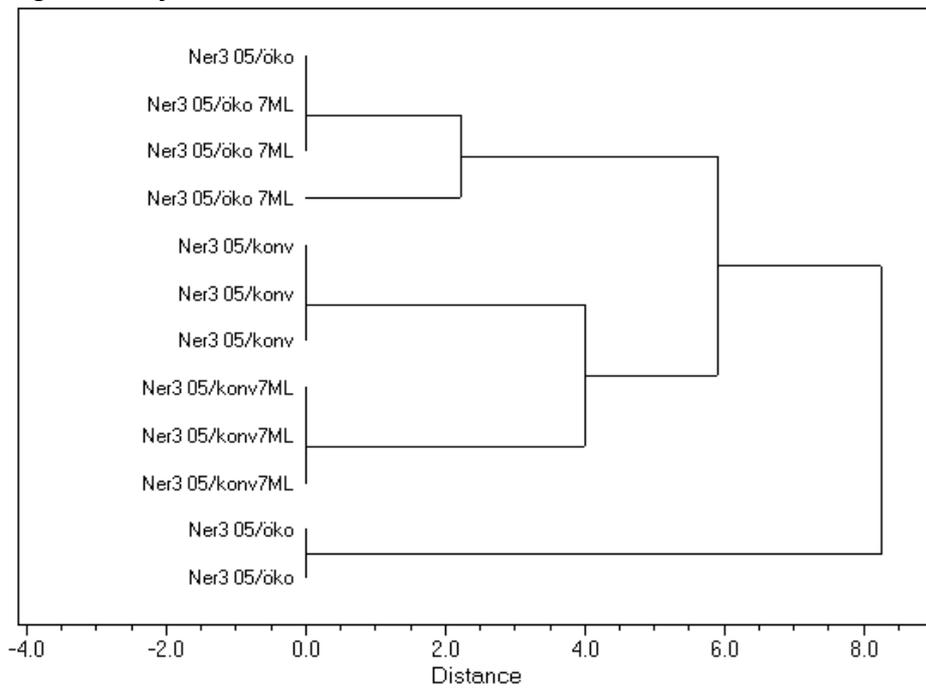


Nerac3 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



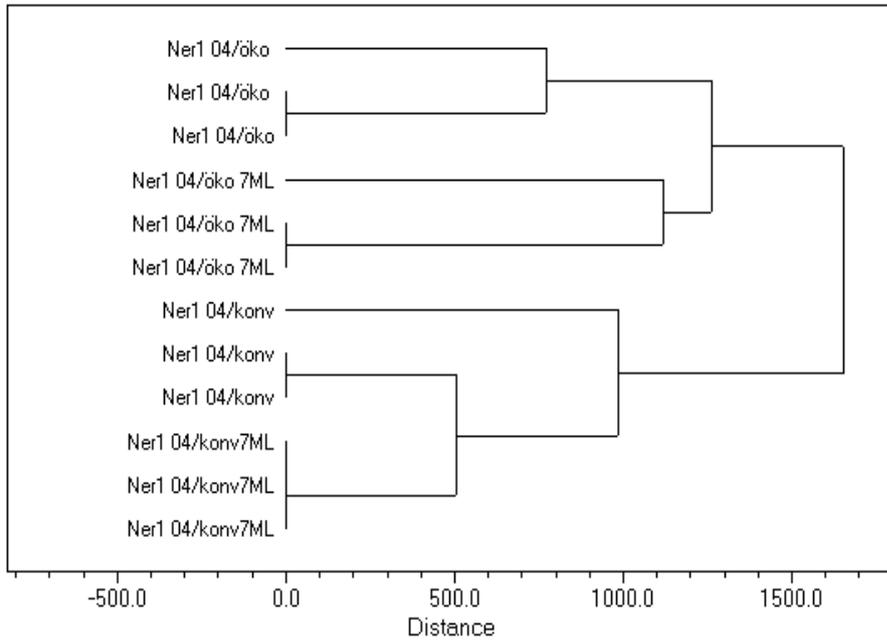
Vegetationsjahr 2005:



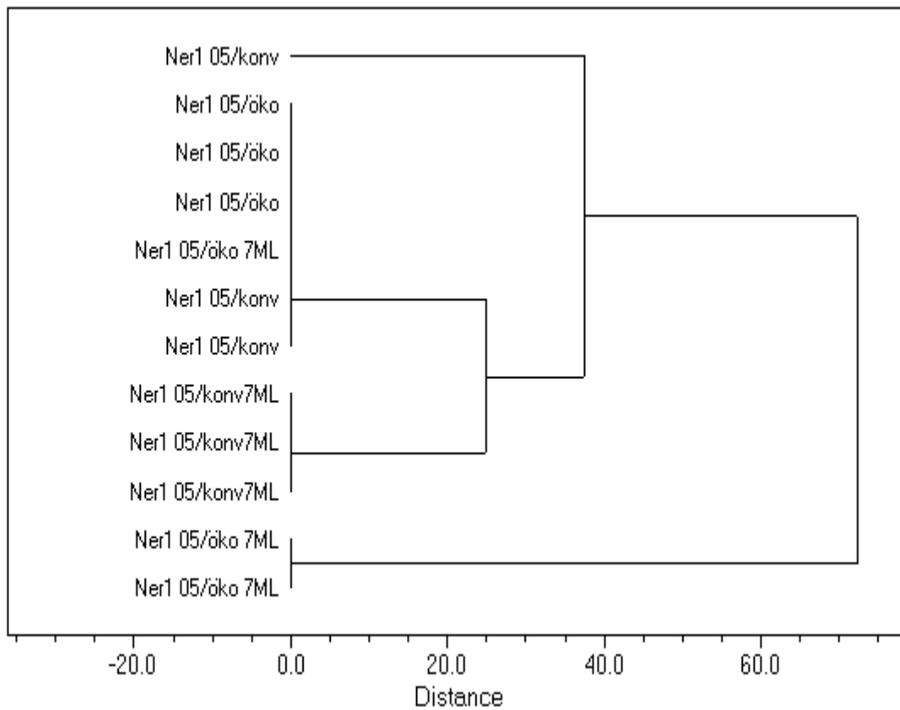


Nerac1 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



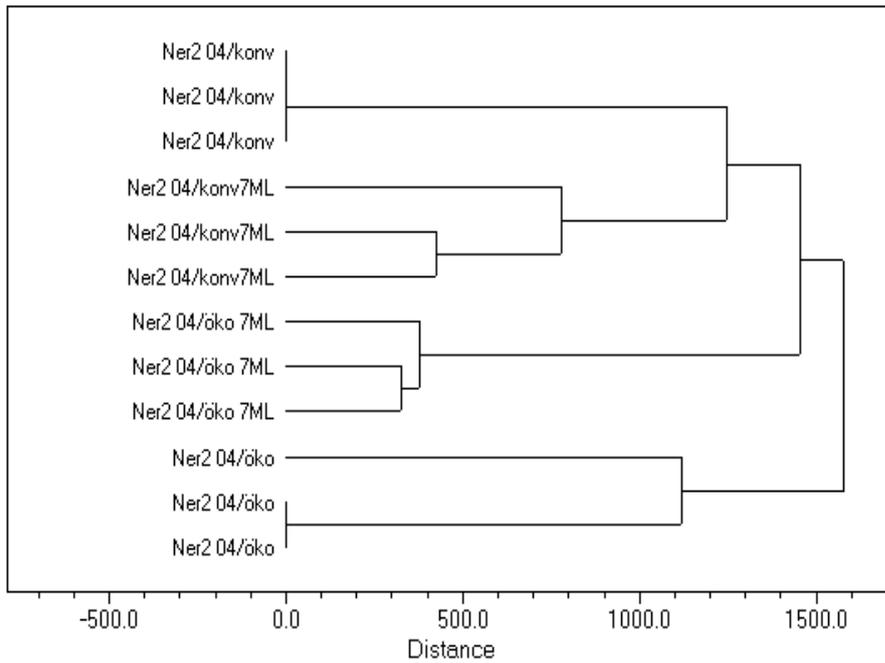
Vegetationsjahr 2005:



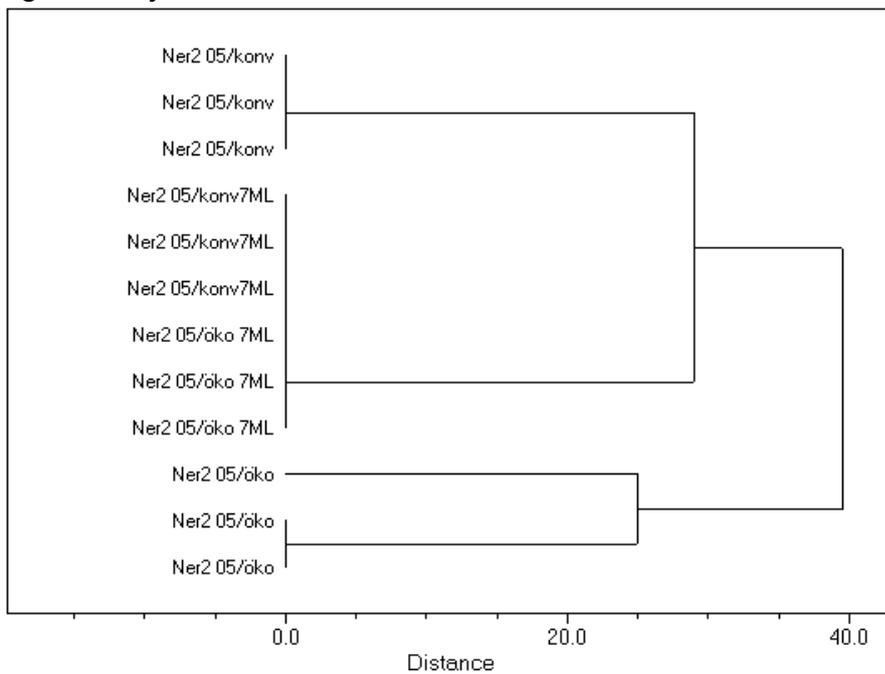


Nerac2 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



Vegetationsjahr 2005:

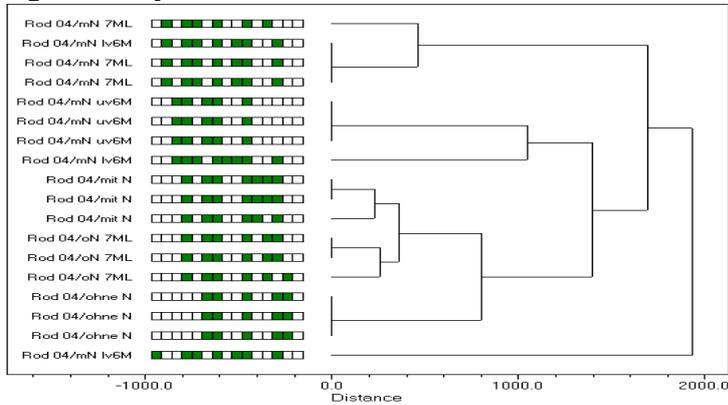




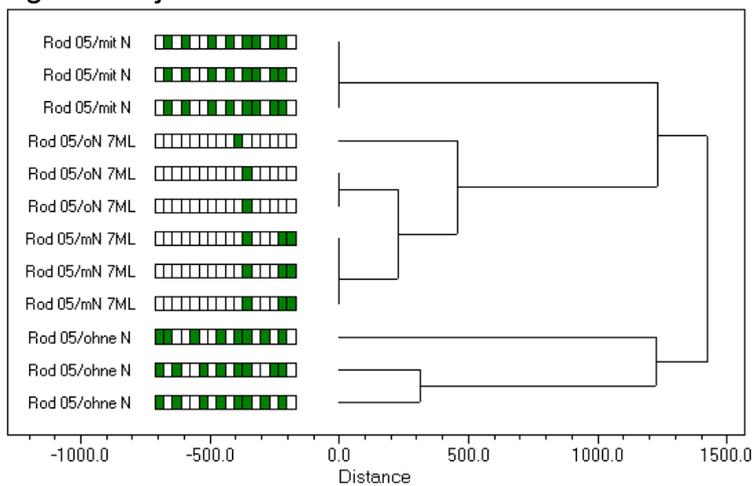
Anhang VII: Clusteranalyse der ARDRA-Fingerprints von Bakteriengemeinschaften

Rodelika mit N/ Rodelika ohne N:

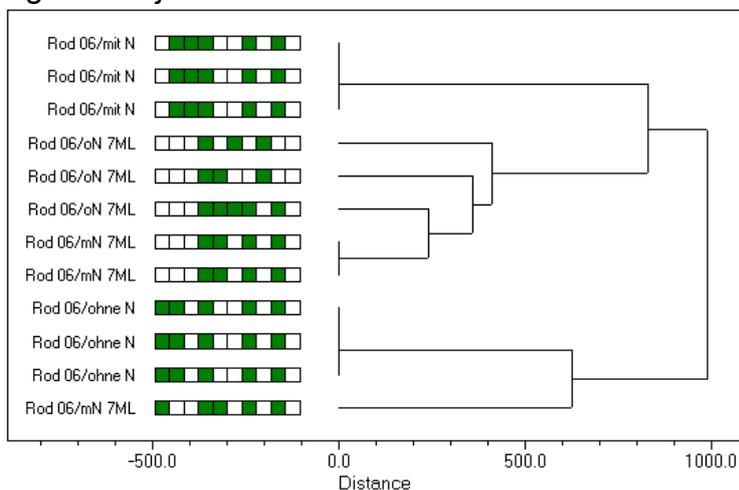
Vegetationsjahr 2004:



Vegetationsjahr 2005:



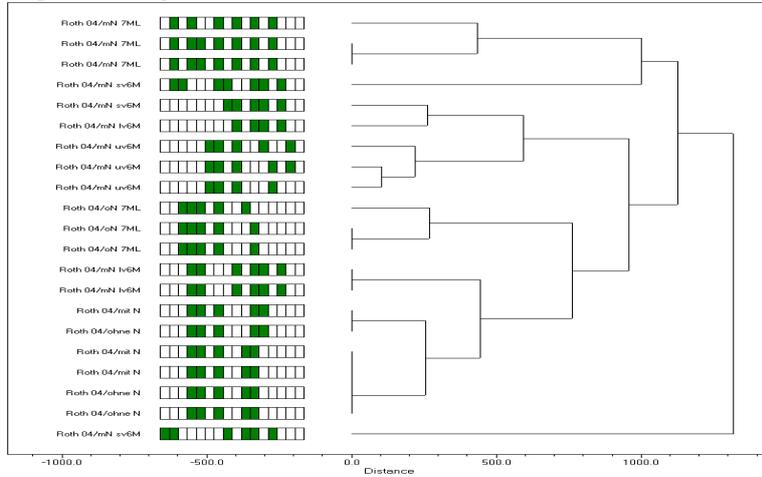
Vegetationsjahr 2006:



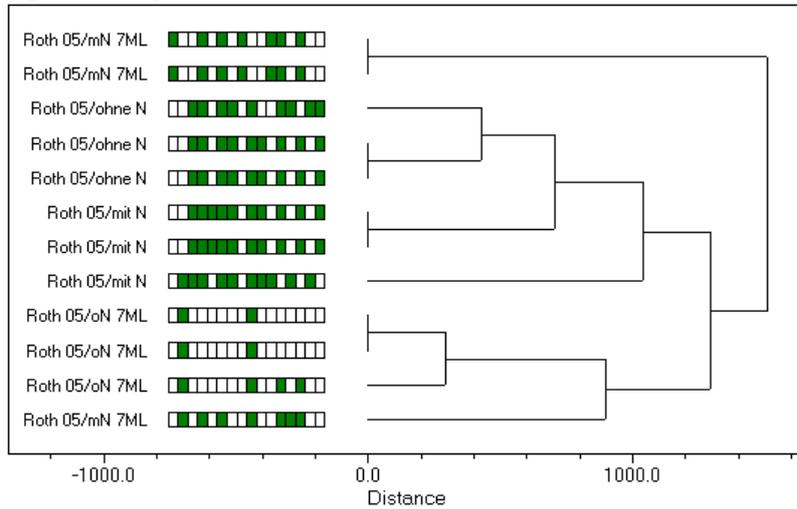


Rothild mit N/Rothild ohne N:

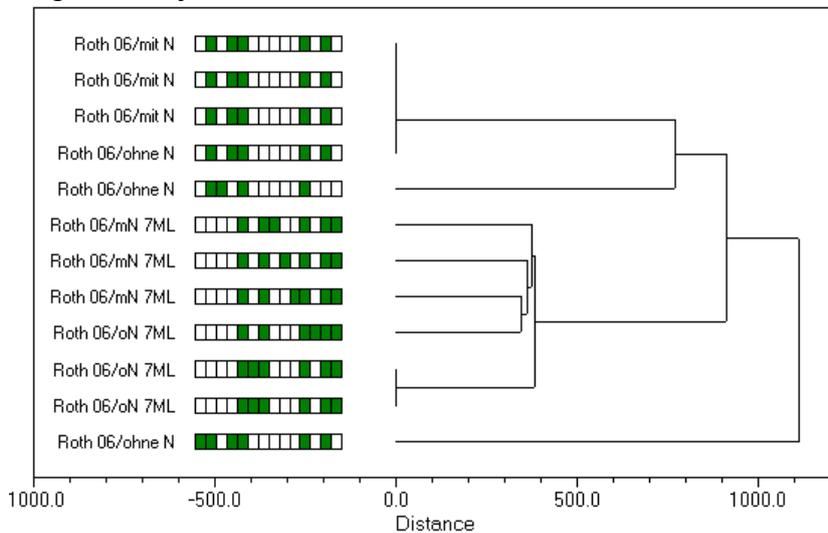
Vegetationsjahr 2004:



Vegetationsjahr 2005:



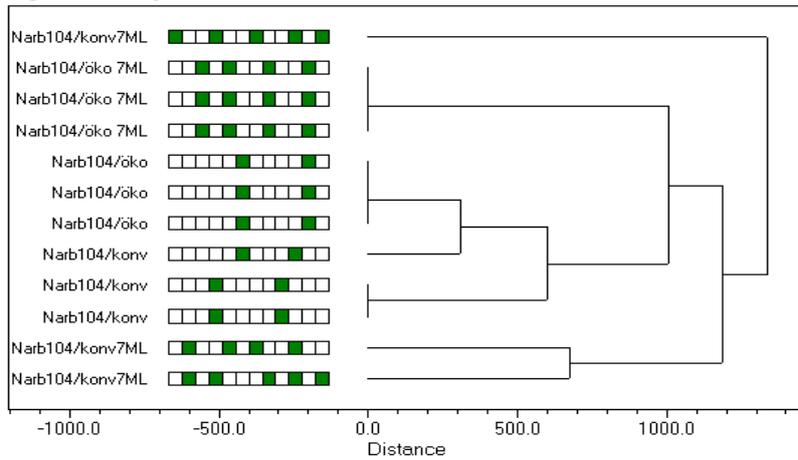
Vegetationsjahr 2006:



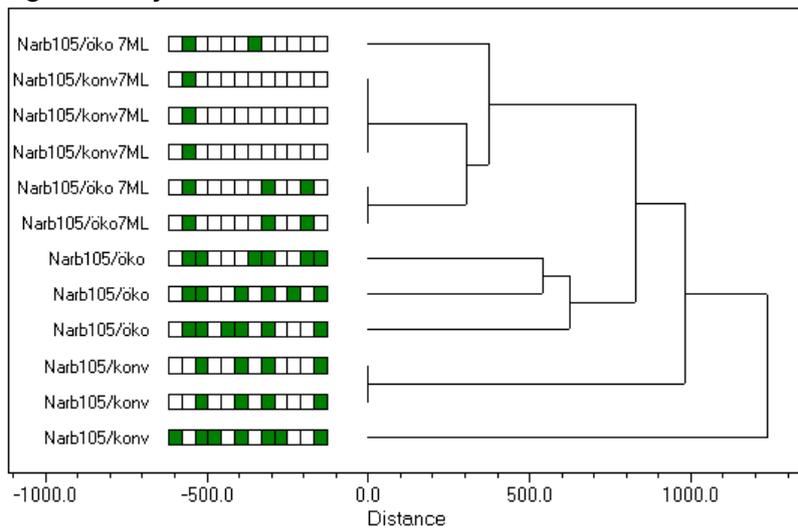


Narbonne1 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:

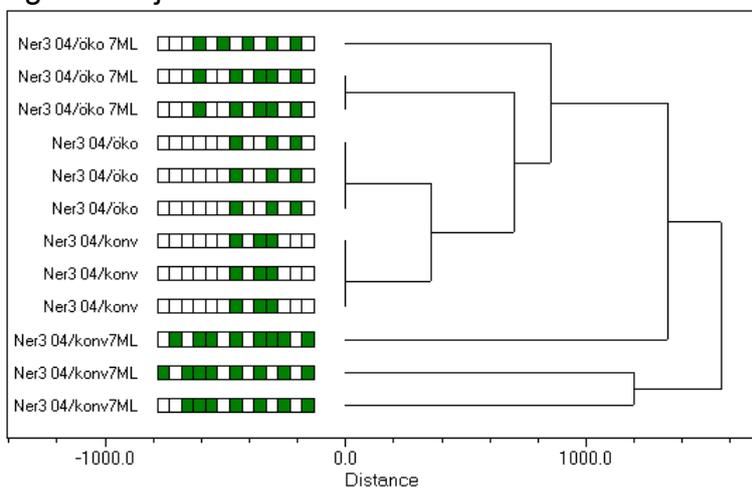


Vegetationsjahr 2005:



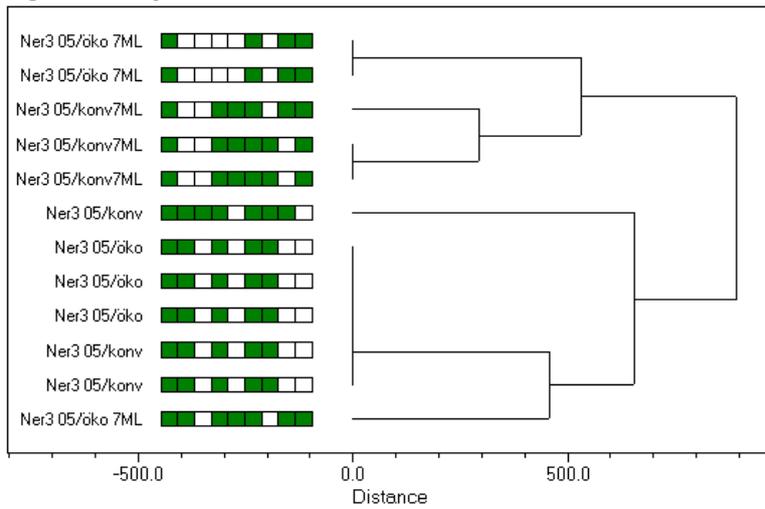
Nerac3 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



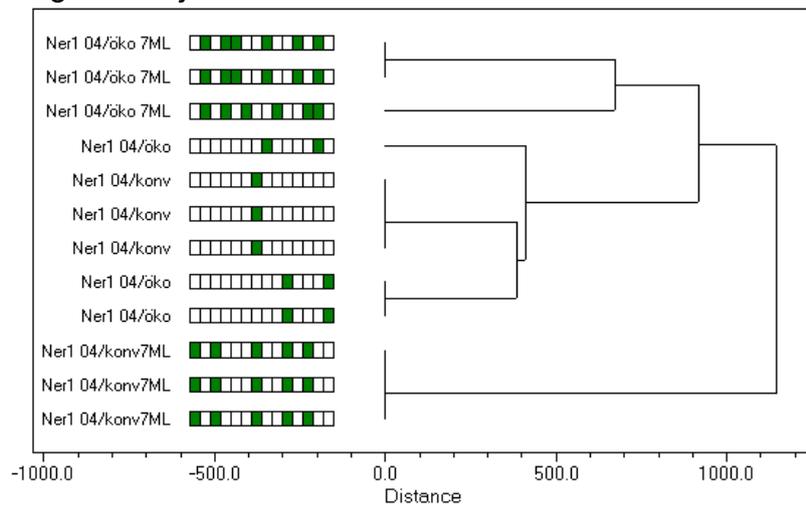


Vegetationsjahr 2005:

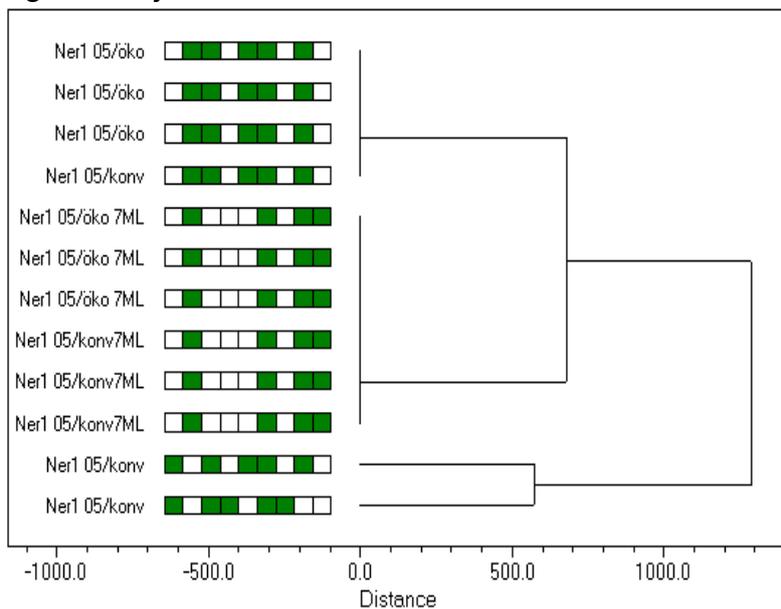


Nerac1 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



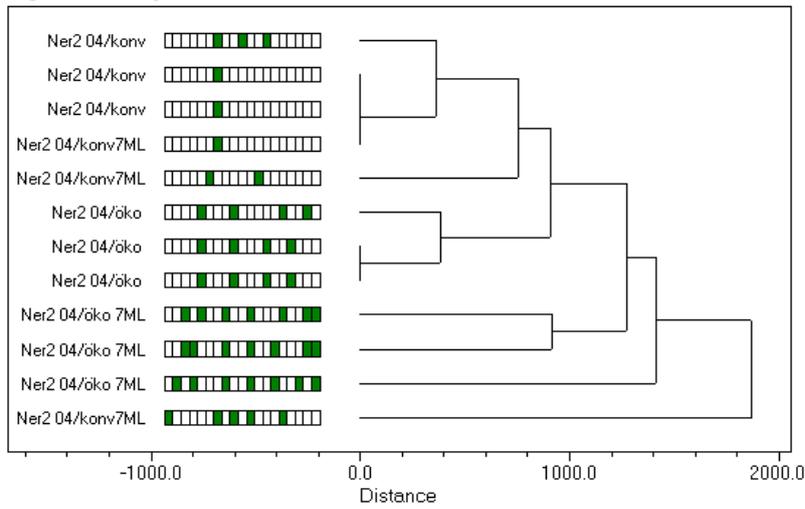
Vegetationsjahr 2005:



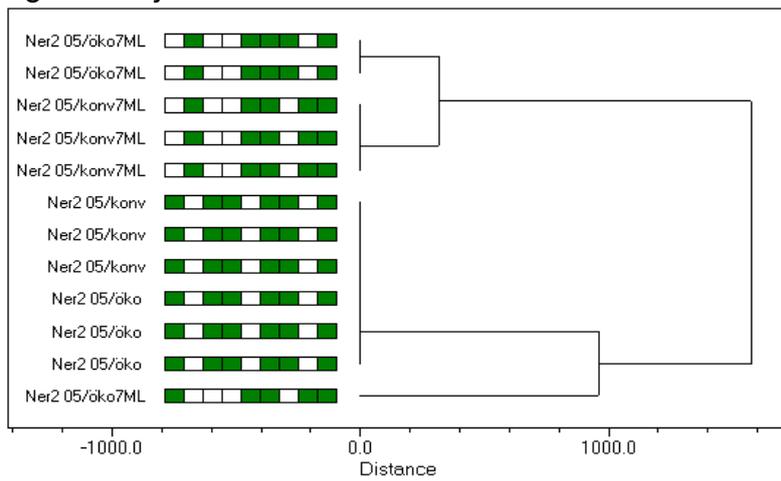


Nerac2 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



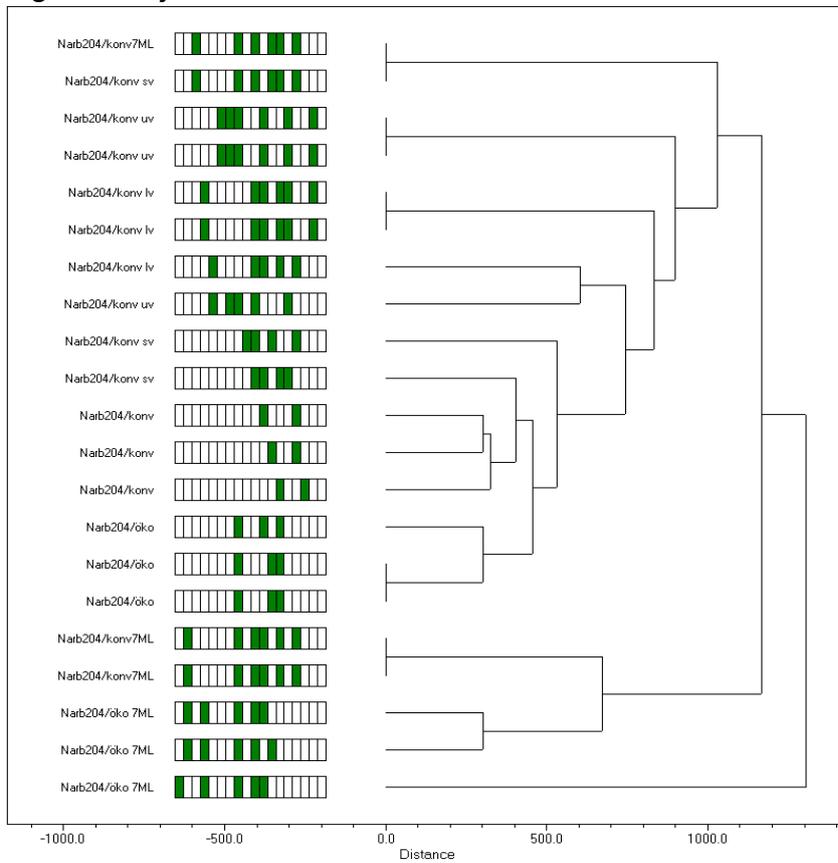
Vegetationsjahr 2005:





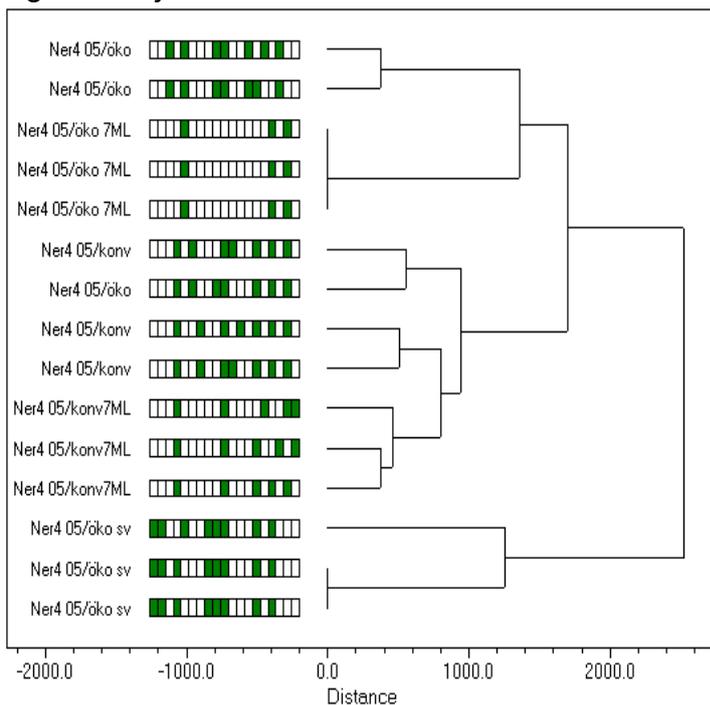
Narbonne2 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2004:



Nerac4 (ökologisch/konventionell):

Vegetationsjahr 2005:



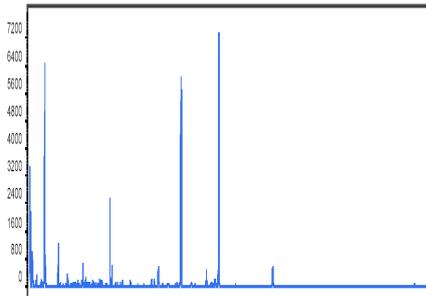


Anhang VIII: T-RFLP-Profile von Bakteriengemeinschaften

Rodelika ohne N/Rodelika mit N:

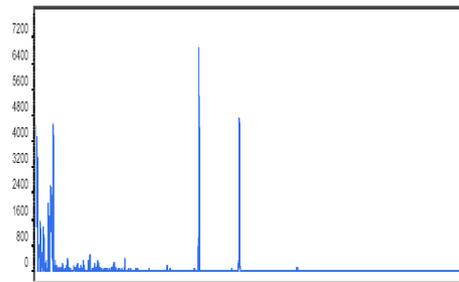
T-RFLP von Bakteriengemeinschaften auf Sorte „Rodelika ohne N“ :

- frisch

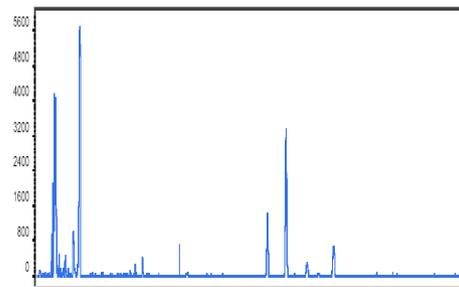


T-RFLP von Bakteriengemeinschaften auf Sorte „Rodelika mit N“ :

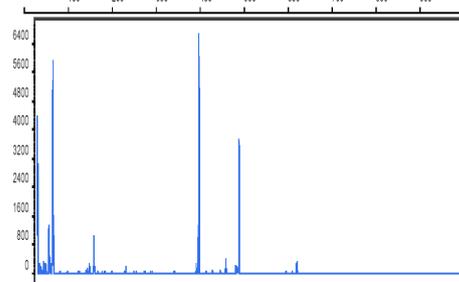
- frisch



- unverdorben nach 6 Monaten Lagerung



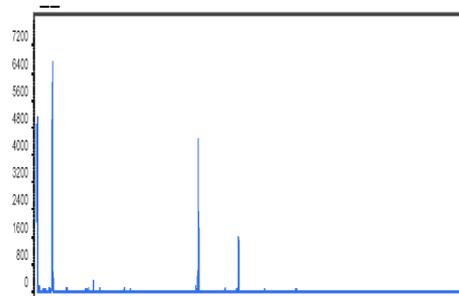
- leicht verdorben nach 6 Monaten Lagerung



- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

ergab kein Peakprofil

- nach 7 Monaten Lagerung

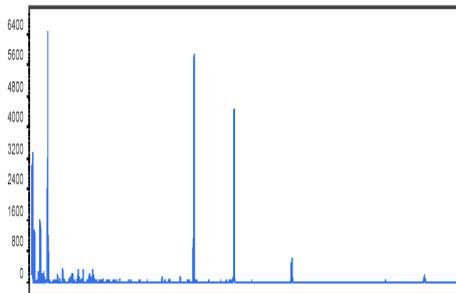




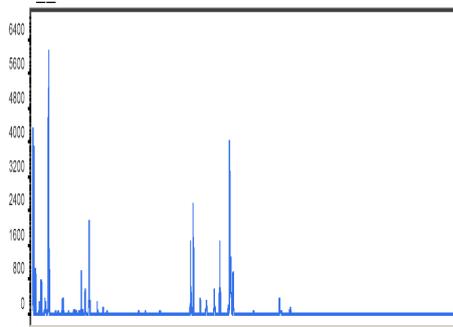
Rothild ohne N/Rothild mit N:

T-RFLP von Bakteriengemeinschaften auf Sorte „Rothild ohne N“:

- frisch

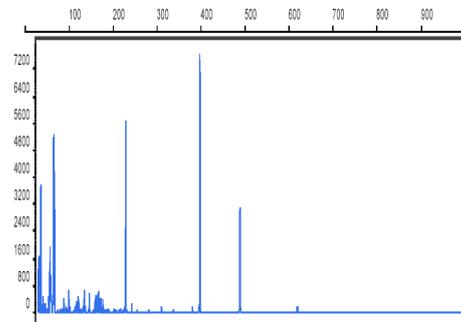


- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

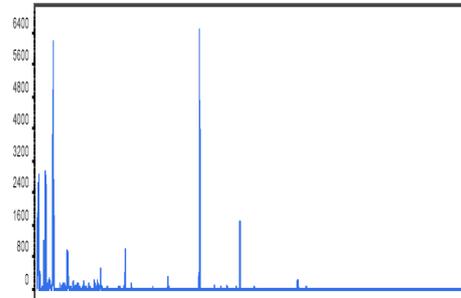


T-RFLP von Bakteriengemeinschaften auf Sorte „Rothild mit N“:

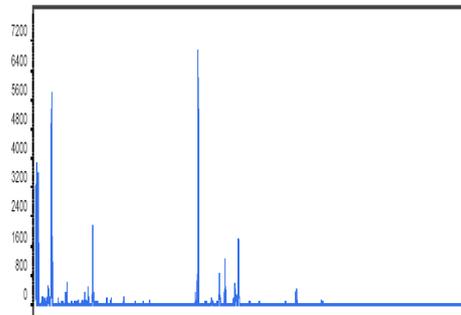
- frisch



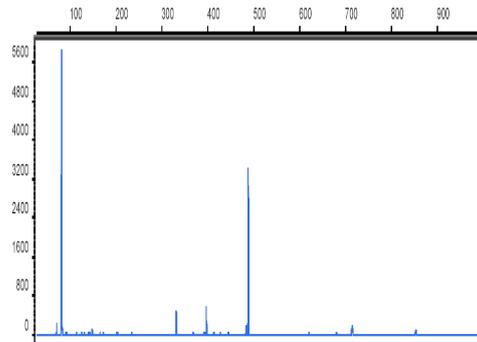
- unverdorben nach 6 Monaten Lagerung



- leicht verdorben nach 6 Monaten Lagerung



- stark verdorben nach 6 Monaten Lagerung



- nach 7 Monaten Lagerung

ergab kein Peakprofil



Narbonne2 (ökologisch/konventionell):

T-RFLP von Bakteriengemeinschaften auf Sorte Narbonne (ökologisch):

- frisch

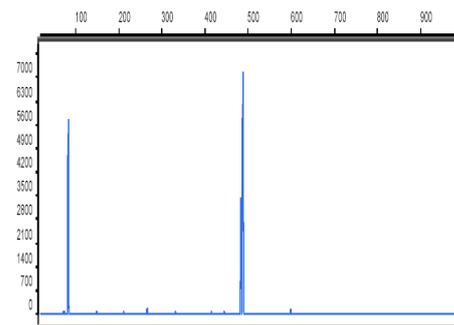
ergab kein Peakprofil

T-RFLP von Bakteriengemeinschaften auf Sorte Narbonne (konventionell):

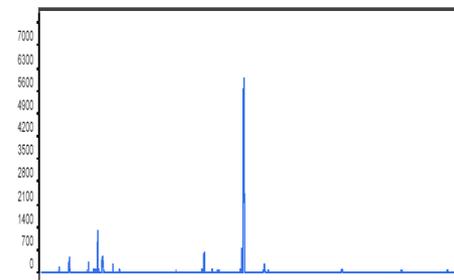
- frisch

ergab kein Peakprofil

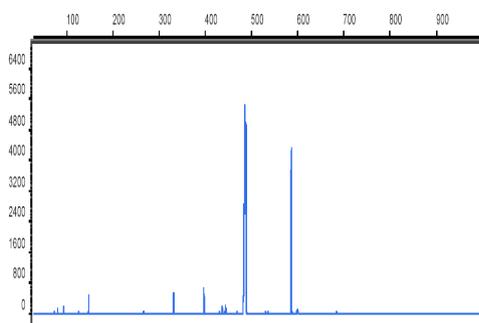
- leicht verdorben nach 4 Monaten Lagerung



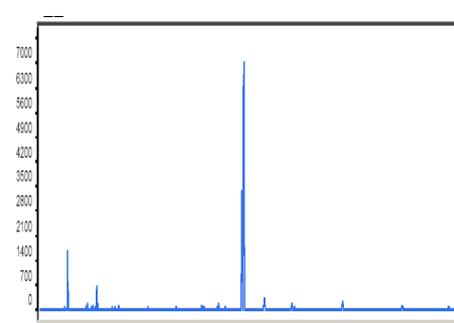
- stark verdorben nach 4 Monaten Lagerung



- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung



- nach 7 Monaten Lagerung

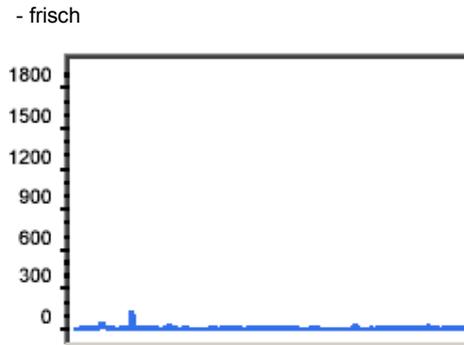




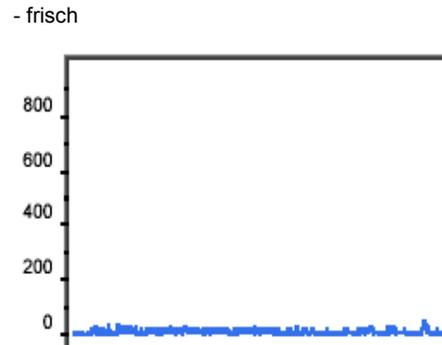
Anhang IX: T-RFLP-Profile von Pilzgemeinschaften

Rodelika ohne N/Rodelika mit N:

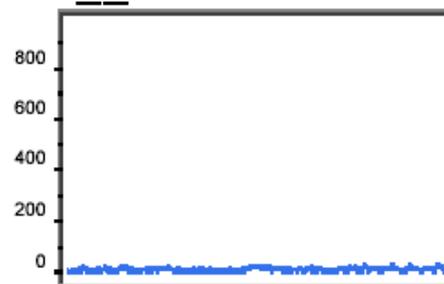
T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte „Rodelika ohne N“ (2004) :



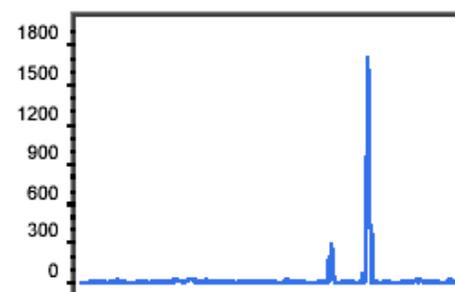
T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte „Rodelika mit N“ (2004):



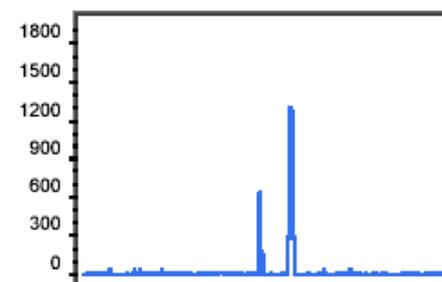
- unverdorben nach 6 Monaten Lagerung



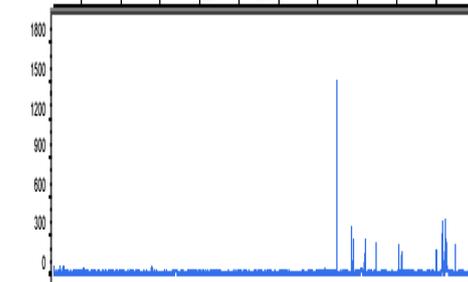
- leicht verdorben nach 6 Monaten Lagerung



- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung



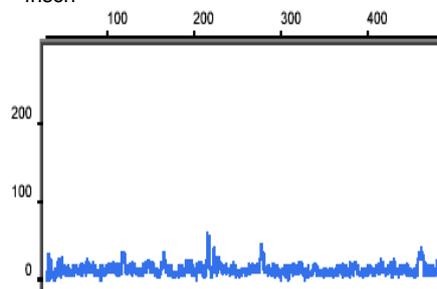
- nach 7 Monaten Lagerung



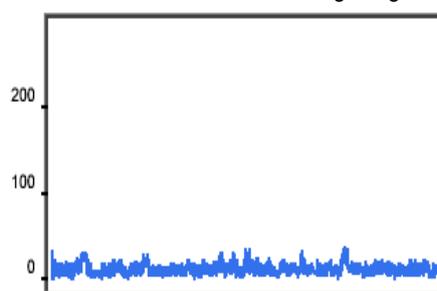


**T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte
„Rodelika ohne N“ (2005):**

- frisch

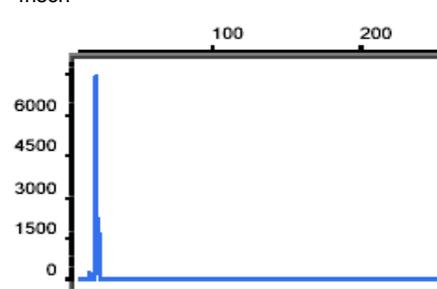


- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

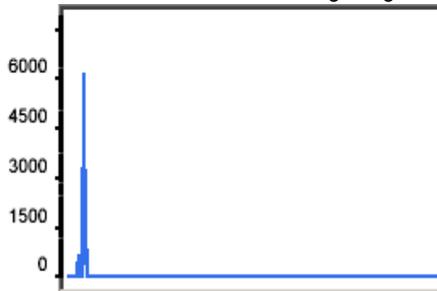


**T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte
„Rodelika mit N“ (2005):**

- frisch



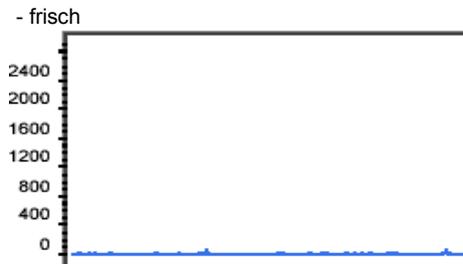
- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung



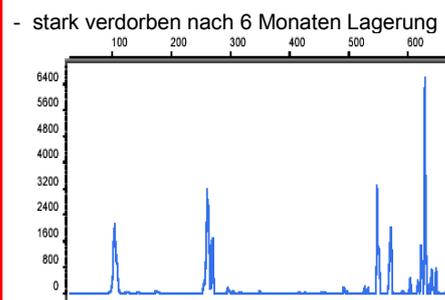
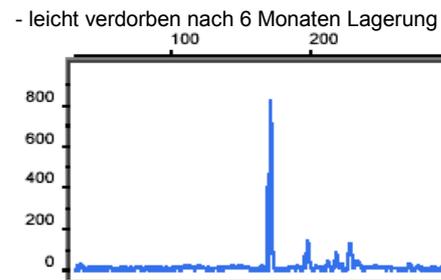
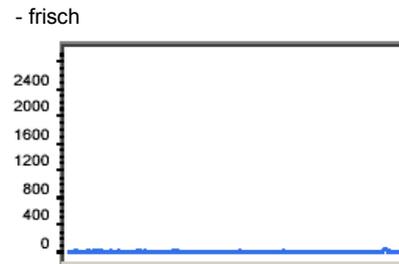


Rothild ohne N/Rothild mit N:

T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte „Rothild ohne N“ (2004):



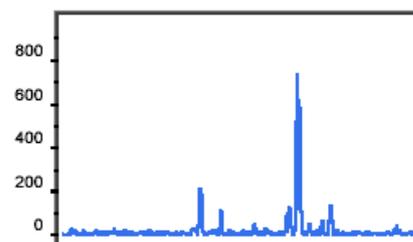
T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte „Rothild mit N“ (2004):



- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

ergab kein Peakprofil

- nach 7 Monaten Lagerung

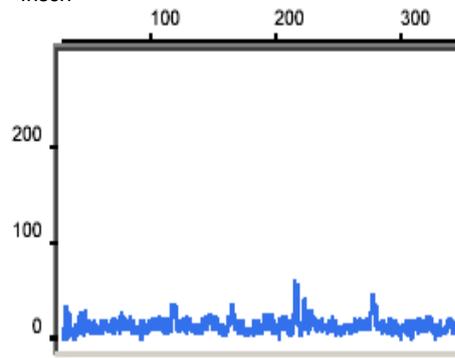


DNA-Probe wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt
(Klonierung bzw. Sequenzierung)

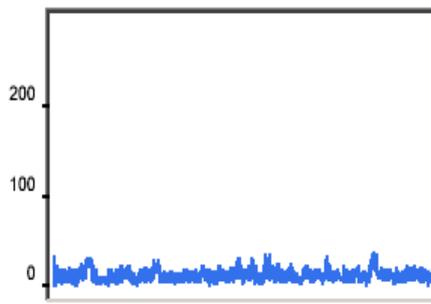


**T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte
„Rothild ohne N“ (2005):**

- frisch



- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung



**T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte
„Rothild mit N“ (2005):**

- frisch

ergab kein Peakprofil

- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

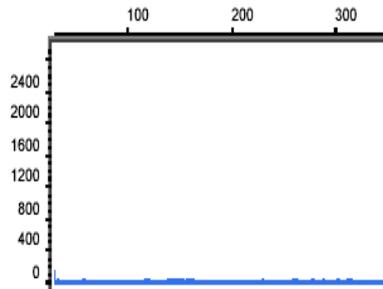
ergab kein Peakprofil



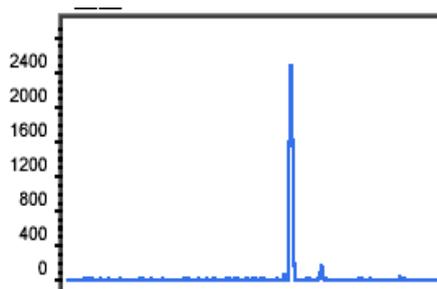
Narbonne2 (ökologisch/konventionell):

T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte Narbonne (ökologisch):

- frisch

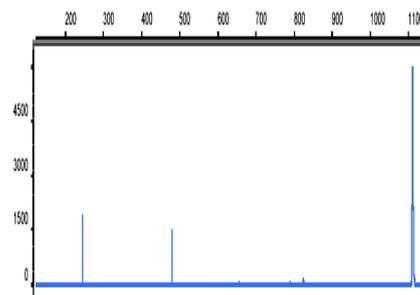


- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

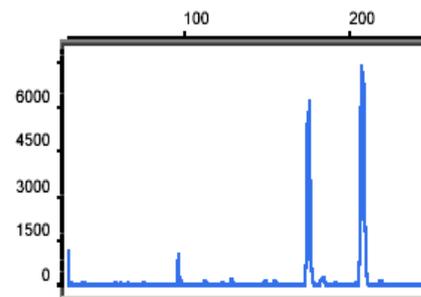


T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte Narbonne (konventionell):

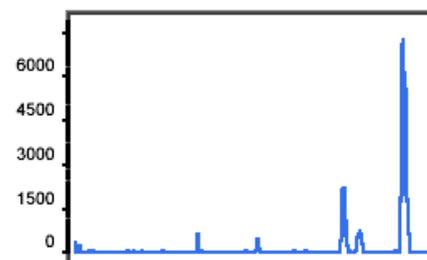
- frisch



- leicht verderben nach 4 Monaten Lagerung



- stark verderben nach 4 Monaten Lagerung



- nach 7 Monaten Lagerung

ergab kein Peakprofil



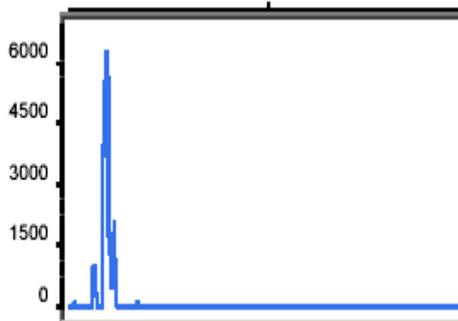
DNA-Probe wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt
(Klonierung bzw. Sequenzierung)



Nerac4 (ökologisch und konventionell):

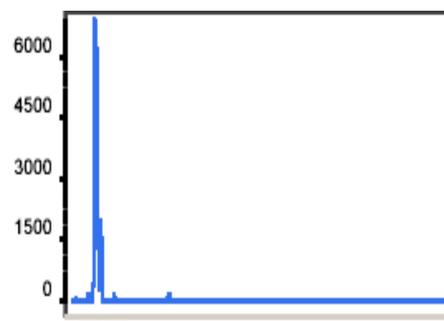
T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte Nerac (ökologisch):

- frisch

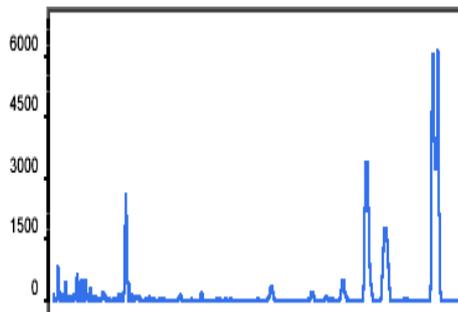


T-RFLP von Pilzgemeinschaften auf Sorte Nerac (konventionell):

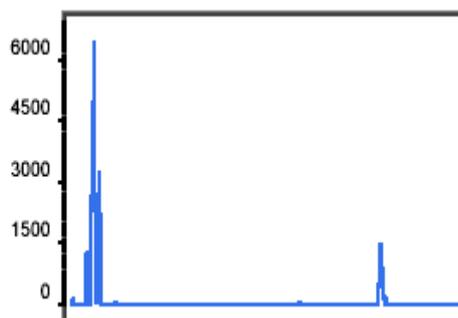
- frisch



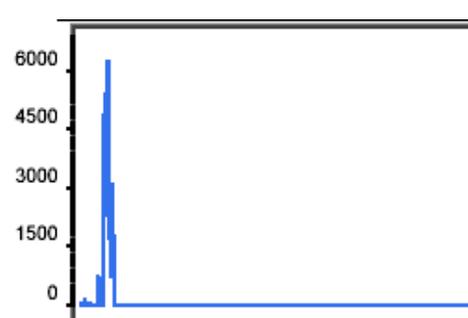
- stark verdorben nach 5 Monaten Lagerung



- nach 7 Monaten Lagerung



- unverdorben nach 7 Monaten Lagerung

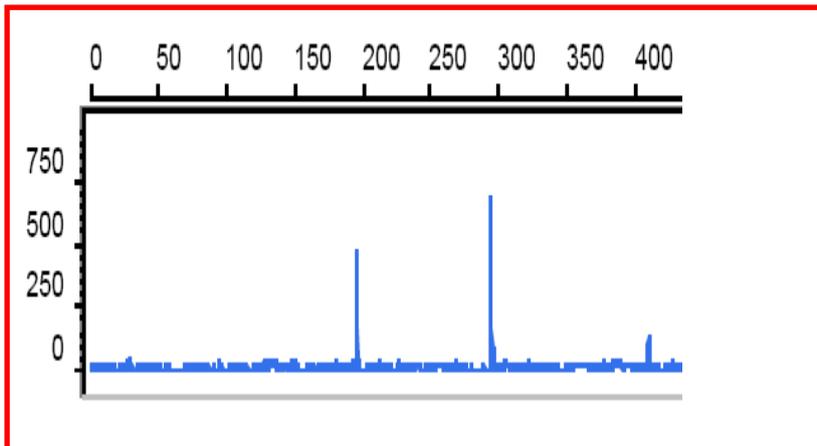


DNA-Probe wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt
(Klonierung bzw. Sequenzierung)



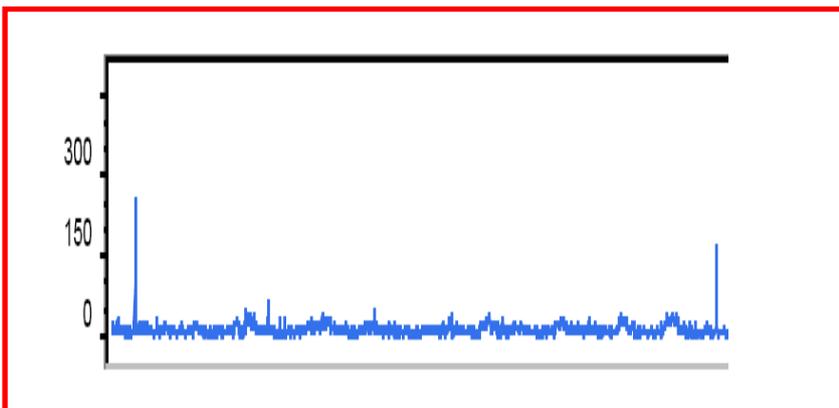
Maestro (ökologisch):

T-RFLP von Pilzgemeinschaften (Proben waren stark verdorben)



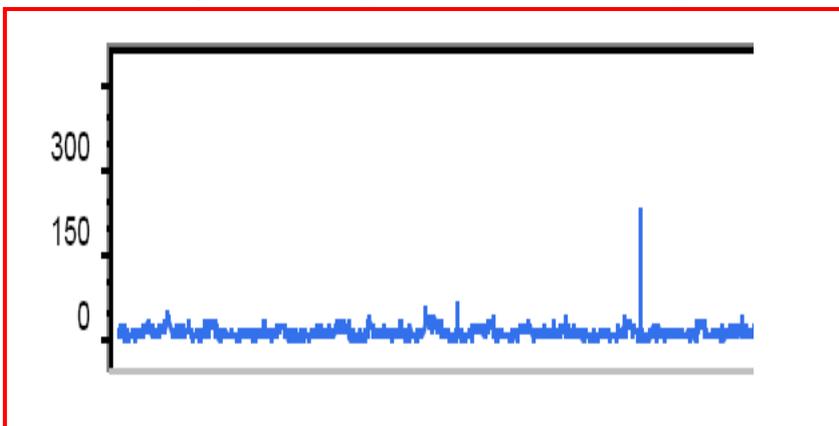
Bolero (ökologisch):

T-RFLP von Pilzgemeinschaften (Proben waren stark verdorben)



Nipomo (ökologisch):

T-RFLP von Pilzgemeinschaften (Proben waren stark verdorben)



DNA-Probe wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt
(Klonierung bzw. Sequenzierung)

Anhang X: SPSS-Statistikdaten der Wund-Inokulation und Festigkeitsmessung

Korrelationen (Festigkeitsmessung)

Feldversuchsproben

Rodelika oN/Rodelika mN (2004+2005)

Korrelationen

		Kraft frisch (2004)	Kraft frisch (2005)	Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2004)	Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2005)	Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2004)	Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2005)
Kraft frisch (2004)	Korrelation nach Pearson	1	,358	-,117	,052	-,304	,004
	Signifikanz (2-seitig)	,	,052	,539	,785	,103	,984
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft frisch (2005)	Korrelation nach Pearson	,358	1	-,151	,298	-,193	-,143
	Signifikanz (2-seitig)	,052	,	,425	,109	,306	,452
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2004)	Korrelation nach Pearson	-,117	-,151	1	-,021	,178	,177
	Signifikanz (2-seitig)	,539	,425	,	,912	,346	,348
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2005)	Korrelation nach Pearson	,052	,298	-,021	1	,009	-,121
	Signifikanz (2-seitig)	,785	,109	,912	,	,961	,524
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2004)	Korrelation nach Pearson	-,304	-,193	,178	,009	1	-,185
	Signifikanz (2-seitig)	,103	,306	,346	,961	,	,328
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2005)	Korrelation nach Pearson	,004	-,143	,177	-,121	-,185	1
	Signifikanz (2-seitig)	,984	,452	,348	,524	,328	,
	N	30	30	30	30	30	30

Rothild oN/ Rothild mN (2004+2005)

Korrelationen

		Kraft frisch (2004)	Kraft frisch (2005)	Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2004)	Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2005)	Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2004)	Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2005)
Kraft frisch (2004)	Korrelation nach Pearson	1	,346	,160	-,250	,179	,079
	Signifikanz (2-seitig)	,	,061	,400	,183	,344	,678
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft frisch (2005)	Korrelation nach Pearson	,346	1	-,020	-,482**	,066	,065
	Signifikanz (2-seitig)	,061	,	,917	,007	,730	,732
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2004)	Korrelation nach Pearson	,160	-,020	1	-,178	-,042	-,078
	Signifikanz (2-seitig)	,400	,917	,	,346	,825	,683
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 4 Wochen Lagerung (2005)	Korrelation nach Pearson	-,250	-,482**	-,178	1	-,150	-,320
	Signifikanz (2-seitig)	,183	,007	,346	,	,430	,085
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2004)	Korrelation nach Pearson	,179	,066	-,042	-,150	1	,130
	Signifikanz (2-seitig)	,344	,730	,825	,430	,	,495
	N	30	30	30	30	30	30
Kraft nach 8 Wochen Lagerung (2005)	Korrelation nach Pearson	,079	,065	-,078	-,320	,130	1
	Signifikanz (2-seitig)	,678	,732	,683	,085	,495	,
	N	30	30	30	30	30	30

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Erzeugerproben

Narbonne1(ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		frisch (Ernte 2004)	frisch (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)
frisch (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	1	-,113	,040	-,135	-,042	,280
	Signifikanz (2-seitig)	,	,551	,835	,476	,825	,134
	N	30	30	30	30	30	30
frisch (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,113	1	,129	,128	-,242	,001
	Signifikanz (2-seitig)	,551	,	,495	,499	,197	,995
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,040	,129	1	,538**	-,058	-,391*
	Signifikanz (2-seitig)	,835	,495	,	,002	,761	,033
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	-,135	,128	,538**	1	-,139	-,129
	Signifikanz (2-seitig)	,476	,499	,002	,	,463	,496
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,042	-,242	-,058	-,139	1	-,358
	Signifikanz (2-seitig)	,825	,197	,761	,463	,	,052
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	,280	,001	-,391*	-,129	-,358	1
	Signifikanz (2-seitig)	,134	,995	,033	,496	,052	,
	N	30	30	30	30	30	30

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Nerac1(ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		frisch (Ernte 2004)	frisch (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)
frisch (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	1	-,063	-,251	-,021	-,079	,005
	Signifikanz (2-seitig)	,	,742	,182	,911	,680	,977
	N	30	30	30	30	30	30
frisch (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,063	1	,380*	-,222	,220	,282
	Signifikanz (2-seitig)	,742	,	,038	,239	,242	,130
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,251	,380*	1	-,058	,385*	-,020
	Signifikanz (2-seitig)	,182	,038	,	,760	,035	,918
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	-,021	-,222	-,058	1	-,126	-,091
	Signifikanz (2-seitig)	,911	,239	,760	,	,508	,633
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,079	,220	,385*	-,126	1	-,069
	Signifikanz (2-seitig)	,680	,242	,035	,508	,	,716
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	,005	,282	-,020	-,091	-,069	1
	Signifikanz (2-seitig)	,977	,130	,918	,633	,716	,
	N	30	30	30	30	30	30

* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Nerac2 (ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		frisch (Ernte 2004)	frisch (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)
frisch (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	1	,320	,076	-,035	-,150	-,121
	Signifikanz (2-seitig)	,	,085	,691	,855	,430	,525
	N	30	30	30	30	30	30
frisch (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,320	1	-,126	,009	-,019	,273
	Signifikanz (2-seitig)	,085	,	,506	,964	,922	,145
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,076	-,126	1	,202	,053	-,067
	Signifikanz (2-seitig)	,691	,506	,	,285	,782	,726
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	-,035	,009	,202	1	,001	,095
	Signifikanz (2-seitig)	,855	,964	,285	,	,995	,616
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,150	-,019	,053	,001	1	,044
	Signifikanz (2-seitig)	,430	,922	,782	,995	,	,815
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	-,121	,273	-,067	,095	,044	1
	Signifikanz (2-seitig)	,525	,145	,726	,616	,815	,
	N	30	30	30	30	30	30

Nerac3 (ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		frisch (Ernte 2004)	frisch (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)
frisch (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	1	,164	-,227	-,045	,121	,089
	Signifikanz (2-seitig)	,	,386	,228	,814	,525	,641
	N	30	30	30	30	30	30
frisch (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,164	1	,008	,051	-,091	,478**
	Signifikanz (2-seitig)	,386	,	,969	,790	,631	,008
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,227	,008	1	,216	,040	-,144
	Signifikanz (2-seitig)	,228	,969	,	,252	,834	,448
	N	30	30	30	30	30	30
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	-,045	,051	,216	1	-,006	,187
	Signifikanz (2-seitig)	,814	,790	,252	,	,977	,322
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,121	-,091	,040	-,006	1	,010
	Signifikanz (2-seitig)	,525	,631	,834	,977	,	,959
	N	30	30	30	30	30	30
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	,089	,478**	-,144	,187	,010	1
	Signifikanz (2-seitig)	,641	,008	,448	,322	,959	,
	N	30	30	30	30	30	30

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.



Feldversuch Universität Kassel

Korrelationen

		Kraft frisch	Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Kraft nach 8 Wochen Lagerung
Kraft frisch	Korrelation nach Pearson	1	-,089	,208*
	Signifikanz (2-seitig)	,	,332	,023
	N	120	120	120
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Korrelation nach Pearson	-,089	1	-,072
	Signifikanz (2-seitig)	,332	,	,432
	N	120	120	120
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Korrelation nach Pearson	,208*	-,072	1
	Signifikanz (2-seitig)	,023	,432	,
	N	120	120	120

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Praxisversuch Öko-Netzwerk

Korrelationen

		Kraft frisch	Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Kraft nach 8 Wochen Lagerung
Kraft frisch	Korrelation nach Pearson	1	-,007	-,015
	Signifikanz (2-seitig)	,	,945	,888
	N	90	90	90
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Korrelation nach Pearson	-,007	1	,157
	Signifikanz (2-seitig)	,945	,	,138
	N	90	90	90
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Korrelation nach Pearson	-,015	,157	1
	Signifikanz (2-seitig)	,888	,138	,
	N	90	90	90

Korrelationen (Wund-Inokulation)

Feldversuchproben

Rodelika oN/mN (2004+2005)

Korrelationen

		Botrytis cinerea (Ernte 2004)	Botrytis cinerea (Ernte 2005)	Fusarium spec. (Ernte 2004)	Fusarium spec. (Ernte 2005)
Botrytis cinerea (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	1	-,110	,476**	,184
	Signifikanz (2-seitig)	,	,561	,008	,331
	N	30	30	30	30
Botrytis cinerea (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,110	1	-,001	-,355
	Signifikanz (2-seitig)	,561	,	,997	,054
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	,476**	-,001	1	,214
	Signifikanz (2-seitig)	,008	,997	,	,255
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,184	-,355	,214	1
	Signifikanz (2-seitig)	,331	,054	,255	,
	N	30	30	30	30

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Rothild oN/mN (2004+2005)

Korrelationen

		Botrytis cinerea (Ernte 2004)	Botrytis cinerea (Ernte 2005)	Fusarium spec. (Ernte 2004)	Fusarium spec. (Ernte 2005)
Botrytis cinerea (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	1	-,026	,139	,062
	Signifikanz (2-seitig)	,	,890	,463	,746
	N	30	30	30	30
Botrytis cinerea (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	-,026	1	-,182	,180
	Signifikanz (2-seitig)	,890	,	,337	,341
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (Ernte 2004)	Korrelation nach Pearson	,139	-,182	1	,139
	Signifikanz (2-seitig)	,463	,337	,	,465
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (Ernte 2005)	Korrelation nach Pearson	,062	,180	,139	1
	Signifikanz (2-seitig)	,746	,341	,465	,
	N	30	30	30	30



Erzeugerproben

Narbonne1 (ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		Botrytis cinerea (2004)	Botrytis cinerea (2005)	Fusarium spec. (2004)	Fusarium spec. (2005)
Botrytis cinerea (2004)	Korrelation nach Pearson	1	-,402*	,209	,243
	Signifikanz (2-seitig)	,	,028	,268	,196
	N	30	30	30	30
Botrytis cinerea (2005)	Korrelation nach Pearson	-,402*	1	-,319	-,223
	Signifikanz (2-seitig)	,028	,	,086	,235
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2004)	Korrelation nach Pearson	,209	-,319	1	-,332
	Signifikanz (2-seitig)	,268	,086	,	,073
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2005)	Korrelation nach Pearson	,243	-,223	-,332	1
	Signifikanz (2-seitig)	,196	,235	,073	,
	N	30	30	30	30

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Nerac1 (ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		Botrytis cinerea (2004)	Botrytis cinerea (2005)	Fusarium spec. (2004)	Fusarium spec. (2005)
Botrytis cinerea (2004)	Korrelation nach Pearson	1	,210	,086	,149
	Signifikanz (2-seitig)	,	,266	,650	,430
	N	30	30	30	30
Botrytis cinerea (2005)	Korrelation nach Pearson	,210	1	-,253	,396*
	Signifikanz (2-seitig)	,266	,	,177	,030
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2004)	Korrelation nach Pearson	,086	-,253	1	-,202
	Signifikanz (2-seitig)	,650	,177	,	,284
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2005)	Korrelation nach Pearson	,149	,396*	-,202	1
	Signifikanz (2-seitig)	,430	,030	,284	,
	N	30	30	30	30

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Nerac2 (ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		Botrytis cinerea (2004)	Botrytis cinerea (2005)	Fusarium spec. (2004)	Fusarium spec. (2005)
Botrytis cinerea (2004)	Korrelation nach Pearson	1	,359	-,263	-,404*
	Signifikanz (2-seitig)	,	,052	,160	,027
	N	30	30	30	30
Botrytis cinerea (2005)	Korrelation nach Pearson	,359	1	-,175	-,276
	Signifikanz (2-seitig)	,052	,	,356	,140
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2004)	Korrelation nach Pearson	-,263	-,175	1	,128
	Signifikanz (2-seitig)	,160	,356	,	,500
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2005)	Korrelation nach Pearson	-,404*	-,276	,128	1
	Signifikanz (2-seitig)	,027	,140	,500	,
	N	30	30	30	30

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Nerac3 (ökologisch/konventionell; 2004+2005)

Korrelationen

		Botrytis cinerea (2004)	Botrytis cinerea (2005)	Fusarium spec. (2004)	Fusarium spec. (2005)
Botrytis cinerea (2004)	Korrelation nach Pearson	1	,009	,046	-,337
	Signifikanz (2-seitig)	,	,962	,810	,068
	N	30	30	30	30
Botrytis cinerea (2005)	Korrelation nach Pearson	,009	1	,011	,260
	Signifikanz (2-seitig)	,962	,	,955	,166
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2004)	Korrelation nach Pearson	,046	,011	1	-,226
	Signifikanz (2-seitig)	,810	,955	,	,230
	N	30	30	30	30
Fusarium spec. (2005)	Korrelation nach Pearson	-,337	,260	-,226	1
	Signifikanz (2-seitig)	,068	,166	,230	,
	N	30	30	30	30

ANOVA (Festigkeitsmessung)

Feldversuchproben

Rodelika ohne N/Rodelika mit N (2004+2005)

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	236,209	1	236,209	1,359	,253
	Innerhalb der Gruppen	4865,673	28	173,774		
	Gesamt	5101,882	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	405,683	1	405,683	,229	,636
	Innerhalb der Gruppen	49578,296	28	1770,653		
	Gesamt	49983,980	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	740,629	1	740,629	2,403	,132
	Innerhalb der Gruppen	8629,621	28	308,201		
	Gesamt	9370,251	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	,000	1	,000	,000	1,000
	Innerhalb der Gruppen	2971,646	28	106,130		
	Gesamt	2971,646	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	6,477	1	6,477	,070	,794
	Innerhalb der Gruppen	2604,276	28	93,010		
	Gesamt	2610,753	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	18,676	1	18,676	,197	,660
	Innerhalb der Gruppen	2650,301	28	94,654		
	Gesamt	2668,976	29			

Rothild ohne N/Rothild mit N (2004+2005)

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	634,524	1	634,524	4,628	,040
	Innerhalb der Gruppen	3839,109	28	137,111		
	Gesamt	4473,633	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	193,751	1	193,751	,119	,733
	Innerhalb der Gruppen	45750,068	28	1633,931		
	Gesamt	45943,819	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	722,948	1	722,948	4,081	,053
	Innerhalb der Gruppen	4959,707	28	177,132		
	Gesamt	5682,656	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	,781	1	,781	,009	,923
	Innerhalb der Gruppen	2309,761	28	82,491		
	Gesamt	2310,542	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	63,831	1	63,831	,533	,472
	Innerhalb der Gruppen	3354,736	28	119,812		
	Gesamt	3418,567	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	73,759	1	73,759	1,237	,275
	Innerhalb der Gruppen	1669,207	28	59,615		
	Gesamt	1742,966	29			

Erzeugerproben

Narbonne1 (ökologisch/konventionell; 2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	110,630	1	110,630	,053	,820
	Innerhalb der Gruppen	58862,078	28	2102,217		
	Gesamt	58972,708	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	55,897	1	55,897	,159	,693
	Innerhalb der Gruppen	9822,577	28	350,806		
	Gesamt	9878,473	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	16,621	1	16,621	,020	,888
	Innerhalb der Gruppen	23083,709	28	824,418		
	Gesamt	23100,330	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	121,605	1	121,605	1,429	,242
	Innerhalb der Gruppen	2382,303	28	85,082		
	Gesamt	2503,909	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	28,538	1	28,538	,202	,656
	Innerhalb der Gruppen	3952,222	28	141,151		
	Gesamt	3980,761	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	109,176	1	109,176	1,546	,224
	Innerhalb der Gruppen	1976,758	28	70,599		
	Gesamt	2085,934	29			

Nerac1 (ökologisch/konventionell; 2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	1482,768	1	1482,768	,482	,493
	Innerhalb der Gruppen	86066,691	28	3073,810		
	Gesamt	87549,458	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	830,554	1	830,554	1,309	,262
	Innerhalb der Gruppen	17767,242	28	634,544		
	Gesamt	18597,796	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	180,614	1	180,614	,714	,405
	Innerhalb der Gruppen	7084,163	28	253,006		
	Gesamt	7264,778	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
frisch	Zwischen den Gruppen	1482,768	1	1482,768	,482	,493
	Innerhalb der Gruppen	86066,691	28	3073,810		
	Gesamt	87549,458	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	10337,549	1	10337,549	12,464	,001
	Innerhalb der Gruppen	23223,911	28	829,425		
	Gesamt	33561,460	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	542,725	1	542,725	8,390	,007
	Innerhalb der Gruppen	1811,261	28	64,688		
	Gesamt	2353,987	29			

Nerac2 (ökologisch/konventionell; 2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	1887,181	1	1887,181	,495	,488
	Innerhalb der Gruppen	106780,4	28	3813,586		
	Gesamt	108667,6	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	114,935	1	114,935	,369	,548
	Innerhalb der Gruppen	8711,046	28	311,109		
	Gesamt	8825,981	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	263,085	1	263,085	,700	,410
	Innerhalb der Gruppen	10520,245	28	375,723		
	Gesamt	10783,330	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
frisch	Zwischen den Gruppen	1887,181	1	1887,181	,495	,488
	Innerhalb der Gruppen	106780,4	28	3813,586		
	Gesamt	108667,6	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	114,935	1	114,935	,369	,548
	Innerhalb der Gruppen	8711,046	28	311,109		
	Gesamt	8825,981	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	263,085	1	263,085	,700	,410
	Innerhalb der Gruppen	10520,245	28	375,723		
	Gesamt	10783,330	29			

Nerac3 (ökologisch/konventionell; 2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	10325,672	1	10325,672	11,973	,002
	Innerhalb der Gruppen	24147,148	28	862,398		
	Gesamt	34472,820	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	1072,334	1	1072,334	2,539	,122
	Innerhalb der Gruppen	11826,215	28	422,365		
	Gesamt	12898,548	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	594,787	1	594,787	2,742	,109
	Innerhalb der Gruppen	6074,393	28	216,943		
	Gesamt	6669,180	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
frisch (Ernte 2005)	Zwischen den Gruppen	120,801	1	120,801	3,073	,091
	Innerhalb der Gruppen	1100,676	28	39,310		
	Gesamt	1221,478	29			
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Zwischen den Gruppen	25,539	1	25,539	,480	,494
	Innerhalb der Gruppen	1488,565	28	53,163		
	Gesamt	1514,105	29			
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Zwischen den Gruppen	3,274	1	3,274	,032	,859
	Innerhalb der Gruppen	2848,814	28	101,743		
	Gesamt	2852,087	29			

Narbonne2 (ökologisch/konventionell; 2004)

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Kraft frisch	Zwischen den Gruppen	3400,119	1	3400,119	2,632	,116
	Innerhalb der Gruppen	36175,882	28	1291,996		
	Gesamt	39576,002	29			
Kraft nach 4 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	485,214	1	485,214	1,004	,325
	Innerhalb der Gruppen	13538,556	28	483,520		
	Gesamt	14023,770	29			
Kraft nach 8 Wochen Lagerung	Zwischen den Gruppen	608,941	1	608,941	3,214	,084
	Innerhalb der Gruppen	5304,432	28	189,444		
	Gesamt	5913,372	29			

Nerac4 (ökologisch/konventionell; 2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
frisch	Zwischen den Gruppen	9318,866	1	9318,866	11,036	,002
	Innerhalb der Gruppen	23642,311	28	844,368		
	Gesamt	32961,178	29			
nach 4 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Zwischen den Gruppen	431,833	1	431,833	7,795	,009
	Innerhalb der Gruppen	1551,180	28	55,399		
	Gesamt	1983,013	29			
nach 8 Wochen Lagerung (Ernte 2005)	Zwischen den Gruppen	49,871	1	49,871	,684	,415
	Innerhalb der Gruppen	2041,751	28	72,920		
	Gesamt	2091,623	29			

Feldversuch Universität Kassel

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Kraft frisch

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
P28	P29	-5,8220	,152
	P74	-4,7047	,246
	P91	-3,0180	,456
	P8	-4,9340	,224
	P37	-11,8827*	,004
	P82	-5,0467	,214
	P87	-3,8047	,348
P29	P28	5,8220	,152
	P74	1,1173	,782
	P91	2,8040	,489
	P8	,8880	,826
	P37	-6,0607	,136
	P82	,7753	,848
	P87	2,0173	,618
P74	P28	4,7047	,246
	P29	-1,1173	,782
	P91	1,6867	,677
	P8	-,2293	,955
	P37	-7,1780	,078
	P82	-,3420	,933
	P87	,9000	,824
P91	P28	3,0180	,456
	P29	-2,8040	,489
	P74	-1,6867	,677
	P8	-1,9160	,636
	P37	-8,8647*	,030
	P82	-2,0287	,616
	P87	-,7867	,846
P8	P28	4,9340	,224
	P29	-,8880	,826
	P74	,2293	,955
	P91	1,9160	,636
	P37	-6,9487	,088
	P82	-,1127	,978
	P87	1,1293	,780
P37	P28	11,8827*	,004
	P29	6,0607	,136
	P74	7,1780	,078
	P91	8,8647*	,030
	P8	6,9487	,088
	P82	6,8360	,093
	P87	8,0780*	,048
P82	P28	5,0467	,214
	P29	-,7753	,848
	P74	,3420	,933
	P91	2,0287	,616
	P8	,1127	,978
	P37	-6,8360	,093
	P87	1,2420	,759
P87	P28	3,8047	,348
	P29	-2,0173	,618
	P74	-,9000	,824
	P91	,7867	,846
	P8	-1,1293	,780
	P37	-8,0780*	,048
	P82	-1,2420	,759

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Kraft nach 4 Wochen Lagerung

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
P28	P29	24,6760	,118
	P74	5,9060	,707
	P91	10,1973	,517
	P8	-10,1533	,518
	P37	-4,0213	,798
	P82	-3,8827	,805
	P87	24,4187	,122
P29	P28	-24,6760	,118
	P74	-18,7700	,234
	P91	-14,4787	,358
	P8	-34,8293*	,028
	P37	-28,6973	,070
	P82	-28,5587	,071
	P87	-,2573	,987
P74	P28	-5,9060	,707
	P29	18,7700	,234
	P91	4,2913	,785
	P8	-16,0593	,308
	P37	-9,9273	,528
	P82	-9,7887	,534
	P87	18,5127	,240
P91	P28	-10,1973	,517
	P29	14,4787	,358
	P74	-4,2913	,785
	P8	-20,3507	,197
	P37	-14,2187	,366
	P82	-14,0800	,371
	P87	14,2213	,366
P8	P28	10,1533	,518
	P29	34,8293*	,028
	P74	16,0593	,308
	P91	20,3507	,197
	P37	6,1320	,696
	P82	6,2707	,690
	P87	34,5720*	,029
P37	P28	4,0213	,798
	P29	28,6973	,070
	P74	9,9273	,528
	P91	14,2187	,366
	P8	-6,1320	,696
	P82	,1387	,993
	P87	28,4400	,072
P82	P28	3,8827	,805
	P29	28,5587	,071
	P74	9,7887	,534
	P91	14,0800	,371
	P8	-6,2707	,690
	P37	-,1387	,993
	P87	28,3013	,074
P87	P28	-24,4187	,122
	P29	,2573	,987
	P74	-18,5127	,240
	P91	-14,2213	,366
	P8	-34,5720*	,029
	P37	-28,4400	,072
	P82	-28,3013	,074

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Kraft nach 8 Wochen Lagerung

LSD

(I) Düngungsvariant	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
P28	P29	11,6687	,069
	P74	3,3727	,596
	P91	1,2880	,840
	P8	-4,4853	,481
	P37	-,8040	,899
	P82	8,4953	,184
	P87	6,4973	,308
P29	P28	-11,6687	,069
	P74	-8,2960	,194
	P91	-10,3807	,105
	P8	-16,1540*	,012
	P37	-12,4727	,052
	P82	-3,1733	,618
	P87	-5,1713	,417
P74	P28	-3,3727	,596
	P29	8,2960	,194
	P91	-2,0847	,743
	P8	-7,8580	,219
	P37	-4,1767	,512
	P82	5,1227	,422
	P87	3,1247	,624
P91	P28	-1,2880	,840
	P29	10,3807	,105
	P74	2,0847	,743
	P8	-5,7733	,365
	P37	-2,0920	,742
	P82	7,2073	,259
	P87	5,2093	,414
P8	P28	4,4853	,481
	P29	16,1540*	,012
	P74	7,8580	,219
	P91	5,7733	,365
	P37	3,6813	,563
	P82	12,9807*	,043
	P87	10,9827	,086
P37	P28	-,8040	,899
	P29	12,4727	,052
	P74	4,1767	,512
	P91	2,0920	,742
	P8	-3,6813	,563
	P82	9,2993	,146
	P87	7,3013	,253
P82	P28	-8,4953	,184
	P29	3,1733	,618
	P74	-5,1227	,422
	P91	-7,2073	,259
	P8	-12,9807*	,043
	P37	-9,2993	,146
	P87	-1,9980	,754
P87	P28	-6,4973	,308
	P29	5,1713	,417
	P74	-3,1247	,624
	P91	-5,2093	,414
	P8	-10,9827	,086
	P37	-7,3013	,253
	P82	1,9980	,754

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Gruppenstatistiken

	Düngung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kraft (N) zum Zeitpunkt 1	ohne Stickstoff	60	68,0428	11,20523	1,44659
	mit Stickstoff	60	71,0737	11,02817	1,42373

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
	F	Signifikanz	T	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz
Kraft (N) zum Zeitpunkt 1	,045	,832	-1,493	,138	-3,0308
			-1,493	,138	-3,0308

Gruppenstatistiken

	Düngung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kraft (N) zum Zeitpunkt 2	ohne Stickstoff	60	171,7092	44,44857	5,73829
	mit Stickstoff	60	180,3137	42,31294	5,46258

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
	F	Signifikanz	T	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz
Kraft (N) zum Zeitpunkt 2	,453	,502	-1,086	,280	-8,6045
			-1,086	,280	-8,6045

Gruppenstatistiken

	Düngung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kraft (N) zum Zeitpunkt 3	ohne Stickstoff	60	108,8537	15,84574	2,04568
	mit Stickstoff	60	110,5102	19,29950	2,49156

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
	F	Signifikanz	T	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz
Kraft (N) zum Zeitpunkt 3	2,173	,143	-,514	,608	-1,6565
			-,514	,608	-1,6565

Praxisversuch Öko-Netzwerk

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Kraft frisch

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngungsvariante	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
Rodelika	Rothild	6,6027	,067
	Canada	,9640	,787
	Fontana	3,1940	,372
	Kamaran	3,2727	,360
	Joba	-6,5647	,069
Rothild	Rodelika	-6,6027	,067
	Canada	-5,6387	,117
	Fontana	-3,4087	,341
	Kamaran	-3,3300	,352
	Joba	-13,1673*	,000
Canada	Rodelika	-,9640	,787
	Rothild	5,6387	,117
	Fontana	2,2300	,533
	Kamaran	2,3087	,518
	Joba	-7,5287*	,037
Fontana	Rodelika	-3,1940	,372
	Rothild	3,4087	,341
	Canada	-2,2300	,533
	Kamaran	,0787	,982
	Joba	-9,7587*	,007
Kamaran	Rodelika	-3,2727	,360
	Rothild	3,3300	,352
	Canada	-2,3087	,518
	Fontana	-,0787	,982
	Joba	-9,8373*	,007
Joba	Rodelika	6,5647	,069
	Rothild	13,1673*	,000
	Canada	7,5287*	,037
	Fontana	9,7587*	,007
	Kamaran	9,8373*	,007

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Kraft nach 4 Wochen Lagerung

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngungsvariante	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
Rodelika	Rothild	8,9960	,074
	Canada	10,6493*	,035
	Fontana	12,6593*	,013
	Kamaran	1,9447	,697
	Joba	5,9107	,239
Rothild	Rodelika	-8,9960	,074
	Canada	1,6533	,741
	Fontana	3,6633	,464
	Kamaran	-7,0513	,160
	Joba	-3,0853	,537
Canada	Rodelika	-10,6493*	,035
	Rothild	-1,6533	,741
	Fontana	2,0100	,687
	Kamaran	-8,7047	,084
	Joba	-4,7387	,344
Fontana	Rodelika	-12,6593*	,013
	Rothild	-3,6633	,464
	Canada	-2,0100	,687
	Kamaran	-10,7147*	,034
	Joba	-6,7487	,179
Kamaran	Rodelika	-1,9447	,697
	Rothild	7,0513	,160
	Canada	8,7047	,084
	Fontana	10,7147*	,034
	Joba	3,9660	,428
Joba	Rodelika	-5,9107	,239
	Rothild	3,0853	,537
	Canada	4,7387	,344
	Fontana	6,7487	,179
	Kamaran	-3,9660	,428

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Kraft nach 8 Wochen Lagerung

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
Rodelika	Rothild	-,4767	,893
	Canada	3,5100	,324
	Fontana	-,1093	,975
	Kamaran	-2,2407	,528
	Joba	-5,1767	,147
Rothild	Rodelika	,4767	,893
	Canada	3,9867	,263
	Fontana	,3673	,918
	Kamaran	-1,7640	,620
	Joba	-4,7000	,188
Canada	Rodelika	-3,5100	,324
	Rothild	-3,9867	,263
	Fontana	-3,6193	,309
	Kamaran	-5,7507	,108
	Joba	-8,6867*	,016
Fontana	Rodelika	,1093	,975
	Rothild	-,3673	,918
	Canada	3,6193	,309
	Kamaran	-2,1313	,549
	Joba	-5,0673	,156
Kamaran	Rodelika	2,2407	,528
	Rothild	1,7640	,620
	Canada	5,7507	,108
	Fontana	2,1313	,549
	Joba	-2,9360	,409
Joba	Rodelika	5,1767	,147
	Rothild	4,7000	,188
	Canada	8,6867*	,016
	Fontana	5,0673	,156
	Kamaran	2,9360	,409

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.



ANOVA (Wund-Inokulation)

Feldversuchproben

Rodelika ohne N/Rodelika mit N (2004+2005)

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	,001	1	,001	,001	,980
	Innerhalb der Gruppen	43,431	28	1,551		
	Gesamt	43,432	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	,113	1	,113	1,256	,272
	Innerhalb der Gruppen	2,515	28	,090		
	Gesamt	2,628	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	3,208	1	3,208	8,642	,007
	Innerhalb der Gruppen	10,394	28	,371		
	Gesamt	13,601	29			
Fusarium spec	Zwischen den Gruppen	1,038	1	1,038	1,806	,190
	Innerhalb der Gruppen	16,093	28	,575		
	Gesamt	17,131	29			

Rothild ohne N/Rothild mit N (2004+2005)

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	3,117	1	3,117	2,430	,130
	Innerhalb der Gruppen	35,915	28	1,283		
	Gesamt	39,032	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	,036	1	,036	,189	,667
	Innerhalb der Gruppen	5,338	28	,191		
	Gesamt	5,374	29			



ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	7,762	1	7,762	16,284	,000
	Innerhalb der Gruppen	13,347	28	,477		
	Gesamt	21,109	29			
Fusarium spec	Zwischen den Gruppen	1,204	1	1,204	5,189	,031
	Innerhalb der Gruppen	6,496	28	,232		
	Gesamt	7,700	29			

Erzeugerproben

Narbonne1 (ökologisch/konventionell;2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	1,072	1	1,072	,853	,364
	Innerhalb der Gruppen	35,190	28	1,257		
	Gesamt	36,261	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	,236	1	,236	3,961	,056
	Innerhalb der Gruppen	1,667	28	,060		
	Gesamt	1,903	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	4,189	1	4,189	4,160	,051
	Innerhalb der Gruppen	28,191	28	1,007		
	Gesamt	32,380	29			
Fusarium spec	Zwischen den Gruppen	,968	1	,968	23,959	,000
	Innerhalb der Gruppen	1,132	28	,040		
	Gesamt	2,100	29			

Nerac1 (ökologisch/konventionell;2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	4,768	1	4,768	5,459	,027
	Innerhalb der Gruppen	24,457	28	,873		
	Gesamt	29,225	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	,000	1	,000	,002	,964
	Innerhalb der Gruppen	,704	28	,025		
	Gesamt	,704	29			



ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	1,269	1	1,269	1,894	,180
	Innerhalb der Gruppen	18,759	28	,670		
	Gesamt	20,027	29			
Fusarium spec	Zwischen den Gruppen	,009	1	,009	,304	,585
	Innerhalb der Gruppen	,829	28	,030		
	Gesamt	,838	29			

Nerac2 (ökologisch/konventionell;2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	6,459	1	6,459	7,320	,011
	Innerhalb der Gruppen	24,707	28	,882		
	Gesamt	31,166	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	1,053	1	1,053	1,302	,264
	Innerhalb der Gruppen	22,648	28	,809		
	Gesamt	23,700	29			

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea (2005)	Zwischen den Gruppen	,002	1	,002	,002	,968
	Innerhalb der Gruppen	32,782	28	1,171		
	Gesamt	32,784	29			
Fusarium spec. (2005)	Zwischen den Gruppen	,456	1	,456	4,441	,044
	Innerhalb der Gruppen	2,877	28	,103		
	Gesamt	3,334	29			

Nerac3 (ökologisch/konventionell; 2004+2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	2,214	1	2,214	1,663	,208
	Innerhalb der Gruppen	37,274	28	1,331		
	Gesamt	39,488	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	1,829	1	1,829	5,150	,031
	Innerhalb der Gruppen	9,943	28	,355		
	Gesamt	11,772	29			



ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	,877	1	,877	,761	,390
	Innerhalb der Gruppen	32,270	28	1,153		
	Gesamt	33,147	29			
Fusarium spec	Zwischen den Gruppen	,000	1	,000	,001	,982
	Innerhalb der Gruppen	,683	28	,024		
	Gesamt	,683	29			

Narbonne2 (ökologisch/konventionell; 2004):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	3,717	1	3,717	2,713	,111
	Innerhalb der Gruppen	38,360	28	1,370		
	Gesamt	42,078	29			
Fusarium spec.	Zwischen den Gruppen	,048	1	,048	,762	,390
	Innerhalb der Gruppen	1,763	28	,063		
	Gesamt	1,811	29			

Nerac4 (ökologisch/konventionell; 2005):

ONEWAY ANOVA

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Botrytis cinerea	Zwischen den Gruppen	,628	1	,628	2,793	,106
	Innerhalb der Gruppen	6,294	28	,225		
	Gesamt	6,922	29			
Fusarium spec	Zwischen den Gruppen	,135	1	,135	,431	,517
	Innerhalb der Gruppen	8,754	28	,313		
	Gesamt	8,889	29			

Feldversuch Universität Kassel

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Botrytis

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
P28	P29	-,5027	,203
	P74	-,1473	,708
	P91	-1,0607*	,008
	P8	-,6607	,095
	P37	,1260	,749
	P82	,1353	,731
	P87	-,0667	,865
P29	P28	,5027	,203
	P74	,3553	,367
	P91	-,5580	,158
	P8	-,1580	,688
	P37	,6287	,112
	P82	,6380	,107
	P87	,4360	,269
P74	P28	,1473	,708
	P29	-,3553	,367
	P91	-,9133*	,022
	P8	-,5133	,193
	P37	,2733	,487
	P82	,2827	,473
	P87	,0807	,837
P91	P28	1,0607*	,008
	P29	,5580	,158
	P74	,9133*	,022
	P8	,4000	,310
	P37	1,1867*	,003
	P82	1,1960*	,003
	P87	,9940*	,013
P8	P28	,6607	,095
	P29	,1580	,688
	P74	,5133	,193
	P91	-,4000	,310
	P37	,7867*	,047
	P82	,7960*	,045
	P87	,5940	,133
P37	P28	-,1260	,749
	P29	-,6287	,112
	P74	-,2733	,487
	P91	-1,1867*	,003
	P8	-,7867*	,047
	P82	,0093	,981
	P87	-,1927	,624
P82	P28	-,1353	,731
	P29	-,6380	,107
	P74	-,2827	,473
	P91	-1,1960*	,003
	P8	-,7960*	,045
	P37	-,0093	,981
	P87	-,2020	,608
P87	P28	,0667	,865
	P29	-,4360	,269
	P74	-,0807	,837
	P91	-,9940*	,013
	P8	-,5940	,133
	P37	,1927	,624
	P82	,2020	,608

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Fusarium spec

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
P28	P29	,0240	,892
	P74	,1187	,504
	P91	,4413*	,014
	P8	-,2387	,180
	P37	,1427	,422
	P82	-,0347	,845
	P87	-,2473	,165
P29	P28	-,0240	,892
	P74	,0947	,594
	P91	,4173*	,020
	P8	-,2627	,141
	P37	,1187	,504
	P82	-,0587	,741
	P87	-,2713	,128
P74	P28	-,1187	,504
	P29	-,0947	,594
	P91	,3227	,071
	P8	-,3573*	,046
	P37	,0240	,892
	P82	-,1533	,388
	P87	-,3660*	,041
P91	P28	-,4413*	,014
	P29	-,4173*	,020
	P74	-,3227	,071
	P8	-,6800*	,000
	P37	-,2987	,094
	P82	-,4760*	,008
	P87	-,6887*	,000
P8	P28	,2387	,180
	P29	,2627	,141
	P74	,3573*	,046
	P91	,6800*	,000
	P37	,3813*	,033
	P82	,2040	,251
	P87	-,0087	,961
P37	P28	-,1427	,422
	P29	-,1187	,504
	P74	-,0240	,892
	P91	,2987	,094
	P8	-,3813*	,033
	P82	-,1773	,318
	P87	-,3900*	,030
P82	P28	,0347	,845
	P29	,0587	,741
	P74	,1533	,388
	P91	,4760*	,008
	P8	-,2040	,251
	P37	,1773	,318
	P87	-,2127	,232
P87	P28	,2473	,165
	P29	,2713	,128
	P74	,3660*	,041
	P91	,6887*	,000
	P8	,0087	,961
	P37	,3900*	,030
	P82	,2127	,232

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.



Gruppenstatistiken

	Düngung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Botrytis cinerea	mNmPr	60	1,5343	1,11018	,14332
	oNmPr	60	1,2232	1,11150	,14349

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz
Botrytis cinerea	Varianzen sind gleich	,204	,652	1,534	,128	,3112
	Varianzen sind nicht gleich			1,534	,128	,3112

Gruppenstatistiken

	Düngung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Fusarium spec.	mNmPr	60	,7573	,47789	,06170
	oNmPr	60	,9978	,52484	,06776

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz
Fusarium spec.	Varianzen sind gleich	1,459	,230	-2,624	,010	-,2405
	Varianzen sind nicht gleich			-2,624	,010	-,2405

Praxisversuche Öko-Netzwerk

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Botrytis cinerea

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
Rodelika	Rothild	,2947	,165
	Canada	,4800*	,025
	Fontana	,3967	,063
	Kamaran	,4240*	,047
	Joba	-,9780*	,000
Rothild	Rodelika	-,2947	,165
	Canada	,1853	,381
	Fontana	,1020	,629
	Kamaran	,1293	,540
	Joba	-1,2727*	,000
Canada	Rodelika	-,4800*	,025
	Rothild	-,1853	,381
	Fontana	-,0833	,693
	Kamaran	-,0560	,791
	Joba	-1,4580*	,000
Fontana	Rodelika	-,3967	,063
	Rothild	-,1020	,629
	Canada	,0833	,693
	Kamaran	,0273	,897
	Joba	-1,3747*	,000
Kamaran	Rodelika	-,4240*	,047
	Rothild	-,1293	,540
	Canada	,0560	,791
	Fontana	-,0273	,897
	Joba	-1,4020*	,000
Joba	Rodelika	,9780*	,000
	Rothild	1,2727*	,000
	Canada	1,4580*	,000
	Fontana	1,3747*	,000
	Kamaran	1,4020*	,000

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Fusarium spec

LSD

(I) Düngungsvariante	(J) Düngung	Mittlere Differenz (I-J)	Signifikanz
Rodelika	Rothild	,0573	,797
	Canada	,5953*	,009
	Fontana	,4573*	,042
	Kamaran	-,3107	,165
	Joba	,0087	,969
Rothild	Rodelika	-,0573	,797
	Canada	,5380*	,017
	Fontana	,4000	,075
	Kamaran	-,3680	,101
	Joba	-,0487	,827
Canada	Rodelika	-,5953*	,009
	Rothild	-,5380*	,017
	Fontana	-,1380	,536
	Kamaran	-,9060*	,000
	Joba	-,5867*	,010
Fontana	Rodelika	-,4573*	,042
	Rothild	-,4000	,075
	Canada	,1380	,536
	Kamaran	-,7680*	,001
	Joba	-,4487*	,046
Kamaran	Rodelika	,3107	,165
	Rothild	,3680	,101
	Canada	,9060*	,000
	Fontana	,7680*	,001
	Joba	,3193	,154
Joba	Rodelika	-,0087	,969
	Rothild	,0487	,827
	Canada	,5867*	,010
	Fontana	,4487*	,046
	Kamaran	-,3193	,154

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Anhang XI: Teilbericht zum Datenaustausch mit BÖL-Projekt Nr. 02OE170/F

Abgleich der Statistik von Projekt 03OE191 mit Projekt 02OE170/F

Die statistische Auswertung der Daten im Rahmen beider Projekte erfolgte mit unterschiedlichen Softwareprogrammen, lieferte aber im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse. Abweichungen in den p-Werten, die in der Varianzanalyse ermittelt wurden, gab es bei folgenden Untersuchungen und könnten in der Dateneingabe begründet sein (vgl. Tab. 1):

Tab. 1: Abweichungen in den p-Werten der Varianzanalyse

Probe	Methode	Versuchsjahr	p-Werte	
			Projekt 03OE191	Projekt 02OE170/F
Feldversuchsproben	Festigkeitsmessung bei frischen Möhren	2004	0,11	0,48
	Festigkeitsmessung nach 8 Wochen Lagerung	2004	0,047	0,25
	Wund-Inokulation mit <i>Fusarium spec.</i>	2005	0,14	0,49
Erzeugerproben	Festigkeit bei frischen Möhren	2005	0,101	0,41
	Wund-Inokulation mit <i>Fusarium spec.</i>	2004	0,061	0,38
	Wund-Inokulation mit <i>Botrytis cinerea</i>	2004	0,003	0,29

In die folgende Darstellung haben wir immer nur Werte einbezogen, die mindestens auf einem Niveau von $p < 0,05$ signifikant waren. Zusätzlich wurde ausschließlich die Streuung der Mittelwerte („mean“), nicht aber die Streuung der Standardabweichungen („sd“) betrachtet. Wenn nachstehend von Korrelationen gesprochen wird, handelt es sich mindestens um signifikante Korrelationen. Zur Kennzeichnung des Signifikanzniveaus kommen folgende Zeichen zur Anwendung:

- *** \leq 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit
- ** \leq 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit
- * \leq 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit

Korrelation innerhalb der Methoden

Signifikante Korrelationen zwischen den Festigkeitswerten, die zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt wurden, gab es nicht bei den Feldversuchsproben, aber bei den Erzeugerproben. Dort korrelierten im Jahr 2004 die Werte der frischen und der nach 8 Wochen gelagerten Möhren ($r = 0,709^{**}$). Im Jahr 2005 korrelierten die Werte der frischen und der nach 4 Wochen gelagerten Möhren ($r = 0,811^{**}$) sowie die Werte der nach 4 Wochen und nach 8 Wochen gelagerten Möhren ($r = 0,704^*$).

Das Wachstum der Pilze auf wund-inokulierten Möhren wurden nur zu einem Zeitpunkt analysiert. Deshalb wurden die Daten nur innerhalb der Tree-Methode ausgewertet (vgl. 3.4).



Korrelation mit Methoden anderer BÖL-assoziierter Projekte

Korrelation: Wund-Inokulation mit anderen Methoden

Feldversuchproben

Insgesamt bestanden in beiden Versuchsjahren mehr Korrelationen der Analysenwerte anderer Methoden mit dem Wachstum von *Fusarium spec.* als mit demjenigen von *Botrytis cinerea*.

Das Wachstum von *Botrytis cinerea* korrelierte in beiden Versuchsjahren mit jeweils sieben Analyseparametern. Insgesamt dominierten im Vegetationsjahr 2004 die Korrelationen mit den Messdaten der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (u.a. bei „Durchmesser“, $r = 0,997^{**}$); aber auch einzelne Korrelationen mit Inhaltsstoffen (Polyphenol Peak Nr. 11, $r = 0,968^*$; Prolin, $r = -0,987^*$) und der Sensorik („Gesamtgeruch“, $r = 0,979^*$) waren vorhanden. Im Vegetationsjahr 2005 traten Korrelationen mit Messdaten des Physiologischen Aminosäurestatus (Tyrosin, $r = 0,966^*$; Phenylalanin, $r = 0,998^{**}$) und den Monosacchariden (D-Glucose, $r = 0,99^{***}$; D-Fructose, $r = 0,99^{**}$) auf. Andere Korrelationen bestanden mit dem Wachstum von *Fusarium spec.* ($r = 0,98^*$), der Festigkeitsmessung (nach 8 Wochen Lagerung, $r = -0,971^*$) und der Kupferchloridkristallisation („100 x maximal. probability“, $r = 0,953^*$). Insgesamt hing es jedoch vom Vegetationsjahr ab, welche Messgrößen mit welchen korrelierten.

Das Wachstum von *Fusarium spec.* korrelierte im ersten Versuchsjahr hauptsächlich mit Messwerten der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie, der Kupferchloridkristallisation, dem Gehalt an einigen niedermolekularen Metaboliten (D-Fructose, D-Glucose, Carotin Peak Nr. 3 und Polyphenol Peak Nr. 12) sowie dem Trockengewicht. Zusätzlich traten auch Korrelationen mit sensorischen Parametern (u.a. „grüner Geruch“, $r = 0,995^{**}$) und der Festigkeit nach 4 Wochen Lagerung auf ($r = 0,995^{**}$). Hingegen korrelierte das Wachstum im Jahr 2004 überhaupt nicht mit Messwerten der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie. Es gab aber Korrelationen mit Parametern der Kupferchloridkristallisations-Methode – insbesondere mit der Größe „Kristallisationsbeginn“ unabhängig von dem analysierten Bildausschnitt. Weiterhin bestanden positive Wechselbeziehungen zu den Gehalten an Phenylalanin ($r = 0,995^{**}$) und Serin ($r = -0,958^*$). Eine Korrelation, die sich in beiden Versuchsjahren wiederholte, war die mit dem Gehalt an D-Glucose ($r = 0,974^*$).

Erzeugerproben

Während die Anzahl der Korrelationen zwischen dem Wachstum von *Botrytis cinerea* und anderen Parametern in beiden Jahren annähernd gleich war (2004: 55 Korrelationen; 2005: 46 Korrelationen), unterschied sich die Anzahl der Korrelationen bei *Fusarium spec.* zwischen den beiden Jahren deutlich (2004: 13 Korrelationen; 2005: 66 Korrelationen).

Das Wachstum von *Botrytis cinerea* korrelierte insgesamt in beiden Versuchsjahren am stärksten mit Daten der Kupferchloridkristallisation. Dabei waren die Parameter dieses Verfahrens zu beiden Jahren fast gleich. Weitere Korrelationen, die zu beiden Jahren auftraten, bestanden zu der Festigkeitsmessung nach 8 Wochen Lagerung (2004: $r = 0,712^*$; 2005: $r = -0,68^*$), dem sensorischen Parameter „citrusartiger Geruch“ (2004: $r = 0,656^*$; 2005: $0,769^{**}$) und dem Gehalt an Asparaginsäure (2004:

$r = 0,706^*$; 2005: $r = - 0,741^*$). Im Vegetationsjahr 2004 traten zusätzlich Korrelationen zu dem *Botrytis*-Wachstum, zu mehreren sensorische Eigenschaften (u.a. Fremdgeruch, $r = - 0,803^{**}$; seifiger Geruch, $r = - 0,836^{**}$; stechender Geruch, $r = - 0,843^{**}$; brennendes Nachgefühl, $r = - 0,766^{**}$), der Saftausbeute, den Gehalten an verschiedenen Polyphenolen (u.a. Peak Nr. 5, $r = - 0,802^{**}$) und Leucin ($r = 0,745^*$) sowie zu einem Messwert der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie („R80bIDw“, $r = 0,68^*$) auf. Im Jahr 2005 bestanden die wichtigsten Korrelationen zu den Analysewerten des Physiologischen Aminosäurestatus (u.a. Tyrosin, $r = - 0,975^{***}$; Valin, $r = - 0,776^{**}$), zum Wachstum von *Fusarium spec.* ($r = - 0,929^{***}$) und zu einigen sensorischen Parametern (u.a. Flavour: citrus, $r = 0,858^{**}$; Flavour erdig, $r = - 0,809^{**}$; Flavour nussig, $r = 0,812^{**}$; citrusartiger Geruch, $r = 0,769^{**}$; süßer Nachgeschmack, $r = 0,876^{***}$).

Die Daten aus der Wund-Inokulation mit *Fusarium spec.* korrelierten in beiden Versuchsjahren mit Daten aus der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie und der Bestimmung des Physiologischen Aminosäurestatus. Im ersten Versuchsjahr korrelierten ebenso noch die Messwerte zum „Anbau“, zu „Fremdgeruch“ und zu dem Gehalt an Polyphenol Peak Nr. 9 ($r = - 0,797^{**}$). Im zweiten Versuchsjahr gab es zusätzlich noch Korrelationen zum Wachstum von *Botrytis cinerea* ($r = - 0,929^{***}$), der Festigkeitsmessung nach 8 Wochen Lagerung ($r = 0,713^*$), der Kupferchloridkristallisation (u.a. „60x diagonal moment“, $r = - 0,766^{**}$; „90x diagonal moment“, $r = - 0,785^{**}$), dem Gehalt an D-Glucose ($r = 0,807^{**}$) und einigen sensorischen Eigenschaften (u.a. citrusartige Flavour, $r = - 0,94^{***}$). Zu den Korrelationen, die zu beiden Versuchsjahren gleich waren, gehörten der Gehalt an Asparaginsäure (2004: $r = - 0,634$, 2005: $0,821^{**}$), ein Messwert der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (u.a. „ChiEHuvDbI“, 2004: $r = - 0,82^{**}$, 2005: $r = - 0,668^*$) sowie die Gehalte an den Aminosäuren Isoleucin (2004: $r = - 0,637^*$, 2005: $r = 0,84^{**}$) und Valin (2004: $r = - 0,692^*$, 2005: $r = 0,77^{**}$).

Korrelation: Festigkeitsmessung mit anderen Methoden

Feldversuchproben

Bei den Festigkeitswerten der frischen Möhren bestanden im Versuchsjahr 2004 nur Beziehungen zu Werten der Kupferchloridkristallisation und der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (u.a. „ChiEH100hrDbI“, $r = - 0,99^{***}$). Im darauffolgenden Jahr kamen noch Korrelationen zu Parametern des Physiologischen Aminosäurestatus (u.a. Arginin, $r = 0,99^{**}$; Phenylalanin, $r = - 0,99^{**}$), Gehalten an Carotinoiden (Lutein, $r = 0,97^*$; Peak Nr. 3, $r = 0,99^{**}$) sowie Polyphenolen (Peak Nr. 2, $r = - 0,968^*$; Peak Nr. 9, $r = - 0,998^{**}$) hinzu. Weiterhin gab es Beziehungen zur Trockenmasse ($r = - 0,99^{**}$), dem Rübenenertrag ($r = - 0,996^{**}$) und einigen sensorischen Eigenschaften (u.a. saftige Textur; $r = 0,991^{**}$). Korrelationen von Messwerten, die sich in beiden Versuchsjahren wiederholten, gab es nicht.

Die Festigkeit der 4 Wochen gelagerten Möhren korrelierte mit Daten aus der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie. Dabei waren die Parameter dieses Verfahrens zu beiden Jahren fast gleich. Weiterhin existierten im Jahr 2004 Korrelationen zu Gehalten an vier niedermolekularen Substanzen (D-Fructose, D-Glucose, Antioxidantien, Polyphenole [Messwert bei 735 nm]), zur Anfälligkeit gegenüber *Fusarium spec.* ($r = 0,995^{**}$) und der Sensorik (u.a. Geruch erdig, $r = 0,993^{**}$; adstringierendes Nachgefühl, $r = 0,992^{**}$). Im Versuchsjahr 2005 gab es Korrelationen zu Parametern der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie, der

Kupferchloridkristallisation, zu Lutein, Polyphenolen (Peak Nr. 1, $r = 0,998^{**}$; Peak Nr. 2, $r = 0,988^*$), D-Saccharose, Rübenertrag und einigen sensorische Parametern (u.a. nussiger und süßer Nachgeschmack; $r = -0,993^{**}$).

Die Festigkeit der 8 Wochen gelagerten Möhren korrelierte mit zwei Messwerten der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie („ChiEH25r“, $r = 0,97^*$; „ChiEH50r“, $r = 0,951^*$) und der Kupferchloridkristallisation (100 x difference.entropy, 100 x entropy; $r = 0,98^*$). Ebenso korrelierten der pH-Wert und die Gehalte an Protein-N ($r = 0,996^{**}$), Total-N und Mangan. Im Vegetationsjahr 2005 korrelierten die meisten Messdaten mit der Methode der Kupferchloridkristallisation. Zusätzlich korrelierten das Wachstum von *Botrytis cinerea*, der Messwert „ChiEH100geDbI“ der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie sowie die Gehalte an Phenylalanin, Tyrosin, D-Glucose und D-Fructose. Bei der Sensorik bestanden Beziehungen zu den Eigenschaften „grünes Aroma“ und „bittere Flavour“. Insgesamt hing es jedoch vom Vegetationsjahr ab, welche Messgrößen mit welchen korrelierten.

Erzeugerproben

Insgesamt traten im zweiten Vegetationsjahr mehr Korrelationen auf als im ersten.

Die Werte der Festigkeitsmessung der frischen Möhren korrelierten im Jahr 2004 nur mit wenigen anderen Parametern. Es gab Korrelationen nur zu dem Gehalt an Carotinoiden (α - und β -Karotin, Gesamtkarotin in der Trockenmasse) und zu den drei sensorischen Parametern Farbe, Fremdgeschmack und Gesamtgeruch. Im Jahr 2005 existierten die auffälligsten Beziehungen zu den Monosacchariden (D-Glucose, D-Fructose; $r = -0,8^{**}$) und zu dem Parameter „Radius“ bei der Kupferchloridkristallisation. Es bestanden zusätzlich noch Korrelationen mit Daten der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie, der Saftausbeute ($r = 0,954^{***}$) und Lutein sowie Serin. Ein Parameter, der in beiden Versuchsjahren korrelierte war der „Gesamtgeruch“ (2004: $r = 0,669^*$; 2005: $-0,697^*$).

Die Festigkeit der 4 Wochen gelagerten Möhren des Jahres 2004 korrelierte mit den Gehalten an bestimmten Polyphenolen (Peak Nr. 6 und Nr. 9 [$r = 0,8^{**}$]) und den sensorischen Eigenschaften „süßlicher Geruch“ und „Gesamt-Nachgeschmack“. Im Jahr 2005 gab es die meisten Korrelationen mit der Methode der Kupferchloridkristallisation; insbesondere mit dem Parameter „Kupferchloridkristallisationsbeginn“. Zusätzlich korrelierte noch ein Messwert der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie („ChiEH50grDbI“), die Saftausbeute ($r = 0,846^{**}$) und die Sensorikparameter „süße Flavour“, „grüner und stechender Geruch“. Insgesamt hing es vom Vegetationsjahr ab, welche Messgrößen mit welchen korrelierten.

Die Festigkeit der 8 Wochen gelagerten Möhren korrelierte in beiden Jahren mit dem Wachstum von *Botrytis cinerea*. Weiterhin bestanden Korrelationen zu der Kupferchloridkristallisation (2004: zu fast allen 100 %-Parametern; 2005: Kristallisationsbeginn und -dauer). Im Versuchsjahr 2004 gab es ebenso noch Korrelationen zum „Fremdgeschmack“ und dem Polyphenol Peak Nr. 6. Im Versuchsjahr 2005 korrelierten acht Messwerte der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie und mehrere Werte des Physiologischen Aminosäurestatus (Asparagin bzw. Asparaginsäure, $r = 0,8^{**}$; Arginin, Glutamin, Stickstoff, Summe der

Aminosäuren) sowie einige sensorische Eigenschaften (u.a. süße und citrusartiger Flavour, $r = -0,7^{**}$).

TREES innerhalb der Methoden

Feldversuchproben

Bei der Wund-Inokulation mit *Botrytis cinerea* wurden mit der Tree-Methode die unterschiedlichen Proben „Rothild ohne N“ und „Rodelika mit N“ sowie „Rothild mit N“ und „Rodelika ohne N“ eindeutig voneinander getrennt und zwar in beiden Versuchsjahren. Hingegen gab es keine Trennung innerhalb der Sorten und der Anbauform.

Anhand des Wachstums von *Fusarium spec.* konnte man im ersten Versuchsjahr sowohl die Sorte als auch die Anbauform unterscheiden (mean = 0,99). Im darauffolgenden Jahr war nur noch eine Trennung der Anbauform bei der Sorte Rodelika unter Einbezug der Hälfte der Ausgangswerte (3. Split-Ebene; mean < 1,13) möglich. Die Probe „Rothild ohne N“ wurde bei der Variablen „Sd < 0,305“ zu allen anderen drei Proben komplett abgetrennt.

Anhand der Festigkeitsmessung ließen sich im Jahr 2004 die Proben nicht eindeutig nach Sorte und Anbauform unterscheiden. Am deutlichsten wurde die Probe „Rothild ohne N“ zu allen anderen Probe abgetrennt. Im Jahr 2005 konnten wir die beiden Sorten sowie die beiden Anbauformen schon auf der zweiten Tree-Ebene anhand der Variablen „frisch.mean < 70,91“ unterscheiden.

Erzeugerproben

Die Anwendung der Tree-Methode auf die Ergebnisse der Wund-Inokulation sowie auf diejenigen der Festigkeitsmessung ließ eine Unterscheidung nach der Anbauform zu. Die Datensätze konnten schon immer nach dem ersten Splitting in „öko“ und „konventionell“ getrennt werden. Es gab nur selten Werte, die sich nicht zu den „ökologischen“ oder „konventionellen“ Datensätzen zuordnen und somit eindeutig trennen ließen. Die Variablen innerhalb einer Methode, die am besten zu dieser Unterscheidung führten, waren bei der Wund-Inokulation mit *Botrytis cinerea* im ersten Jahr „sd = 0,84“ und im zweiten „mean = 0,09“; bei *Fusarium spec.* hingegen „mean=0,36“ und „sd = 0,06“.

Bei der Festigkeitsmessung führten die Variablen „frisch.mean < 162,47“ (Jahr 2004) und „4 Wochen.mean = 65,07“ (Jahr 2005) zur besten Trennung zwischen „ökologisch“ und „konventionell“.

Eine Datentrennung auf der Basis der einzelnen Erzeugerproben erbrachte innerhalb der Betriebsvergleichspaare vereinzelt eine Unterscheidung sowohl zu beiden Versuchsjahren als auch innerhalb der drei Methoden. Eine Einsortierung der einzelnen Proben untereinander in „ökologisch“ und „konventionell“ bzw. nach Betrieb und Sorte war nicht ersichtlich. In beiden Jahren wurden auf Basis der Wund-Inokulation mit *Botrytis cinerea* zwei Betriebspaare separiert und auf der Basis der Festigkeitsmessung zwei weitere Betriebspaare. Von den letztgenannten Betriebspaaren wurde eins auch auf Basis der Wund-Inokulation mit *Fusarium spec.* separiert.

TREES mit Methoden anderer BÖL-assoziierter Projekte

Feldversuchsproben

In beiden Jahren konnte durch die Kombination der Messgrößen *Botrytis cinerea* und zweier Parameter aus der Kupferchloridkristallisation eine weitgehende Trennung der vier Proben aus den Feldversuchen erreicht werden. Bei den Proben aus dem Versuchsjahr 2005 ließ sich auch durch die Kombination mit dem Parameter Trockengewicht oder dem pH-Wert eine Trennung erzielen.

Die Kombination von Daten aus der Wund-Inokulation mit *Fusarium spec.*, mit denjenigen aus der Leitfähigkeitsmessung und der Kupferchloridkristallisation führte im Jahr 2004 zu einer Trennung sowohl nach der Sorte als auch nach der Anbauform. Im Jahr 2005 bestand eine deutliche Trennung zwischen der Probe „Rothild mit N“ und der Sorte Rodelika mit den Werten des Trockengewichts. Erst mit einem weiteren Datensplitting und der Hinzunahme einer weiteren Methode (Leitfähigkeit = 3,36) konnte zusätzlich bei der Sorte Rodelika noch die Anbauform unterschieden werden. Die Werte der Probe „Rothild ohne N“ wurden in diesem Baum nicht aufgesplittet, da schon innerhalb der *Fusarium*-Methode eine eindeutige Abtrennung zu den anderen drei Proben bestand (vgl. 3.4.1.1).

Die eindeutige Trennung der Feldversuchsproben in Sorte und Anbauform erfolgte bei der Festigkeitsmessung im Versuchsjahr 2004 am besten in Kombination mit Messwerten der Leitfähigkeit ($< 3,36$ bzw. $< 3,24$). Im Jahr 2005 hingegen war solch eine klare Unterscheidung erst nach dem vierten Datensplitting und nur bei der Sorte Rodelika in Verbindung von Messwerten des Carotingehalts möglich.

Erzeugerproben

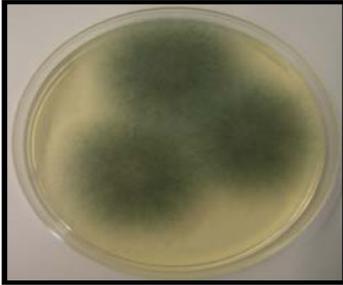
Das Tree-Verfahren nach „Anbau“ ergab, dass bei den Erzeugerproben eine klare Trennung der Datensätze nach „ökologisch“ und „konventionell“ mit Messwerten anderer Methoden möglich war. Optimale Bäume entstanden mit den Variablen „Saftgehalt in der Trockensubstanz“ (Jahr 2004) und „Seringehalt“ (Jahr 2005) interessanterweise in Kombination mit Daten aus der Wund-Inokulation beider Testpilze sowie aus der Festigkeitsmessung.

Die beste Datentrennung beider Jahre nach „Probe“ erfolgte bei allen drei Methoden mit Variablen der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie. Eine eindeutige Sortierung der einzelnen Proben untereinander nach Betrieb bzw. Anbauform gab es insgesamt durch das Tree-Verfahren aber nicht.



Anhang XII: Abbildungen der von Möhren kultivierten Pilze

Absidia glauca



Acremonium carticola



Acremonium butyri



Alternaria alternata



Alternaria dauci



Alternaria radicina



Botrytis cinerea



Chaetomium globosum



Cladosporium cladosporioides



Cladosporium herbarum



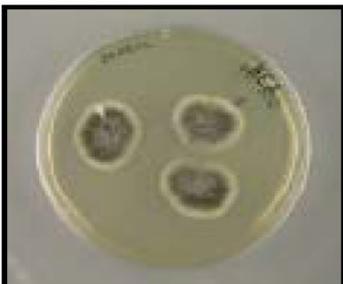
Cladosporium macrocarpum



Cladosporium sphaerospermum



Cladosporium minourae



Cystofilobasidium bisporidii



Epicoccum nigrum





Eupenicillium javanicum



Fusarium spec.



Gibberella avenacea



Mortierella alpina



Mortierella spec.



Mucor hiemalis



"leaf litter ascomycete"



Mycocentrospora acerina



Nectria spec.



Penicillium brevicompactum



Penicillium canescens



Penicillium commune



Penicillium coprophilum



Penicillium expansum



Penicillium glabrum

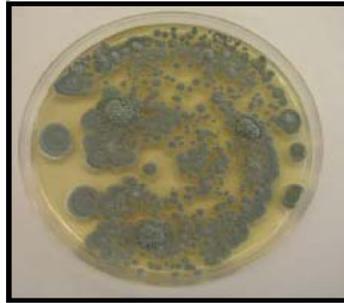




Penicillium gladioli



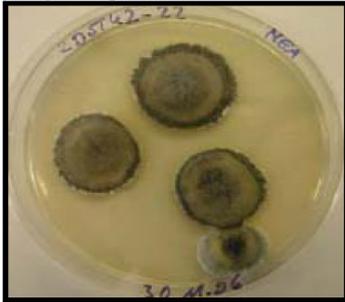
Penicillium janthinellum



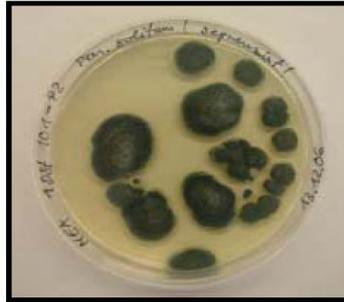
Penicillium ochro-chloron



Penicillium purpurogenum



Penicillium solitum



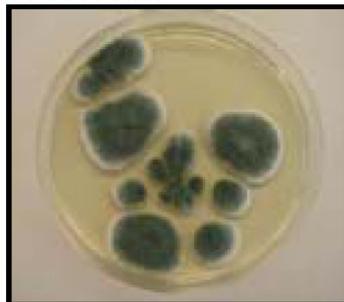
Penicillium spec.



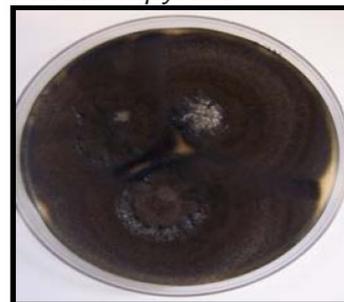
Penicillium variabile



Penicillium verrucosum



Phoma eupyrena



Phoma glomerata



Tetracladium marchalianum



Rhizopus stolonifer



Trichoderma spec.



Verticillium spec.



unbekannter Zygomycet

