

Bearbeitet von:
Andy Hintenaus

Untersuchungen zur Bildung von Furocumarinen in Knollensellerie in Abhängigkeit von Pathogenbefall und Pflanzenschutz

Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz

Berichte aus dem Julius Kühn-Institut

168



Kontaktadresse

Dr. Frank M. Ellner
Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz
Königin Luise Str. 19
14195 Berlin

Telefon +49 (0)30/83042390

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Berichte aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher als OPEN ACCESS-Zeitschrift.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen – Berichte.

We advocate open access to scientific knowledge. Reports from the Julius Kühn Institute are therefore published as open access journal. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications – Reports).

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Braunschweig, Deutschland
Julius Kühn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Braunschweig, Germany

Vertrieb

Saphir Verlag, Gutsstraße 15, 38551 Ribbesbüttel
Telefon +49 (0)5374 6576
Telefax +49 (0)5374 6577

ISSN 1866-590X

DOI 10.5073/berjki.2013.168.000

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, 2013.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Naturwissenschaftliche Fakultät II
Institut für Chemie
Lebensmittelchemie und Umweltchemie



Untersuchungen zur Bildung von Furocumarinen in Knollensellerie in Abhängigkeit von Pathogenbefall und Pflanzenschutz

Diplomarbeit

vorgelegt von

Andy Hintenaus

geboren am 21. Februar 1987 in Magdeburg

Matrikel-Nr.: 207206797

Betreuer:

Dr. Frank Ellner

Dir. u. Prof. Dr. Hartwig Schulz

26. April 2012

Durchgeführt am: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für
Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und
Vorratsschutz

Gutachter: Dir. u. Prof. Dr. H. Schulz

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. A. Glomb

Danksagung

Herrn Professor M. A. Glomb möchte ich für die Ermöglichung der Durchführung einer außeruniversitären Diplomarbeit und der Übernahme der Aufgaben des Zweitgutachters und des staatlich geprüften Lebensmittelchemikers danken.

Desweiteren gilt mein Dank zum einen Herrn Professor H. Schulz und Herrn Dr. F. Ellner für die Betreuung und Bereitstellung des interessanten Themas, sowie zahlreicher wertvoller Diskussionen und Anregungen, und des weiteren Frau Karin Zinn für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre nützlichen Tipps und der stets angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor.

Von Herzen danke ich meiner Freundin für ihr unermessliches Verständnis, ihr Vertrauen und ihre moralische Unterstützung vom ersten bis zum letzten Tag meines Studiums.

Nicht zuletzt habe ich meiner Familie viel zu verdanken, die mich stets unterstützt und motiviert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i> (Mill) Gaud.	3
2.2	Sekundärstoffwechsel bei Pflanzen	4
2.3	Allelophysiologie	4
2.3.1	Phytopathologie	5
2.3.2	Pathogenabwehr	6
2.3.3	Furanocumarine/Furocumarine	7
2.4	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	10
2.5	<i>Rhizoctonia solani</i> (Kühn).....	11
3	METHODEN UND MATERIALIEN	12
3.1	Infektionsversuche	12
3.1.1	Versuchskonzept	12
3.1.2	Anzucht der Knollenselleriepflanzen	12
3.1.3	Vortest auf Pathogenität.....	13
3.1.4	Versuchsreihe <i>S. sclerotiorum</i>	14
3.1.5	Versuchsreihe <i>R. solani</i>	15
3.2	Furocumarinanalytik	16
3.2.1	Probenvorbereitung	16
3.2.2	HPLC Messmethode	17
3.2.3	LC-MS/MS Messmethode	19
3.3	Statistische Auswertung	20
3.4	Materialien, Chemikalien und Reagenzien	21
3.5	Geräte	22
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
4.1	Infektionsversuche	25
4.1.1	Versuchsreihe <i>S. sclerotiorum</i>	25
4.1.2	Versuchsreihe <i>R. solani</i>	25
4.2	Furocumarinanalytik	27
4.2.1	Entwicklung einer HPLC Messmethode	27
4.2.2	Probenvorbereitung	32
4.2.3	Versuchsreihe <i>S. sclerotiorum</i>	37
4.2.4	Versuchsreihe <i>R. solani</i>	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	51
6	SUMMARY	52

7	POSTER.....	53
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	54
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	57
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	58
11	ANHANG.....	I
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XXII

Abkürzungsverzeichnis

FC	Furocumarine
u.a.	unter anderem
<i>avr</i>	Avirulenz
<i>R</i>	Resistenz
<i>S. sclerotiorum</i> , S.s.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
<i>R. solani</i> , R.s.	<i>Rhizoctonia solani</i> (Kühn)
PP	Polypropylen
z.B.	zum Beispiel
bzw.	beziehungsweise
SNA	synthetischer nährstoffarmer Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
MS	Massenselektiver Detektor
MeOH	Methanol
H ₂ O	Reinstwasser
PUVA	Psoralen + UVA-Strahlung

1 Einleitung und Zielstellung

Knollensellerie (*Apium graveolens* L.), eine Pflanze aus der Familie der Doldengewächse, ist aufgrund der enthaltenen ätherischen Öle in den ober- und unterirdischen Pflanzenteilen eine wertvolle Gewürzpflanze, die in Deutschland in bedeutendem landwirtschaftlichen Umfang angebaut wird (1, 2).

Zahlreiche Studien belegen, dass Pflanzen aus dieser Familie lineare Furocumarine (FC) als Folge von Stress durch mikrobiellen Befall, Verletzungen, UV-Licht oder andere Umweltfaktoren bilden können (3-6). Die Biosynthese dieser Substanzen ist ein Teil des Sekundärmetabolismus und wird durch Elicitoren induziert. Demnach sind sie den Phytoalexinen zugeordnet (4, 7). Die Arbeitsgruppe um Chaudhary konnte feststellen, dass eine Infektion von Selleriepflanzen mit dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* zu einem merklichen Anstieg der linearen FC Psoralen, Xanthotoxin und Bergapten führt (6). Die hierbei berücksichtigten linearen FC sollen auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Leitstrukturen für die pflanzliche Pathogenabwehr analysiert werden.

Es gilt als gesichert, dass lineare FC phototoxisch sind und im Verlaufe einer photodynamischen Reaktion, unter Einwirkung von UVA-Strahlung, irreversible DNA-addukte (Crosslinks) ausbilden können. Als Folge kann es nach direktem Hautkontakt oder oraler Aufnahme unter UV-Lichteinwirkung zur Ausbildung einer Photodermatitis kommen (5, 6, 8).

Erste Beobachtungen dieser Hautreaktion wurden im Rahmen therapeutischer Behandlungen (PUVA, Psoralen + UVA-Strahlung) von Psoriasis (Schuppenflechte) und Vitiligo (Pigmentstörungen) gemacht. Als Ursache gelten hohe Expositions Dosen von Xanthotoxin und Bergapten, da während einer Behandlung bis zu 40 mg aufgenommen werden können. Dies konnte anhand von Humanstudien und Tierversuchen verifiziert werden (2, 9).

Der Konsum von Lebensmitteln, die Sellerie oder andere Pflanzen aus der Familie der Doldengewächse (z.B. Pastinake) enthalten, bedingt einen Kontakt des Verbrauchers mit linearen Furocumarinen.

Aufgrund der von Chaudhary beschriebenen Koch- und Lichtstabilität dieser Verbindungen ist davon auszugehen, dass sich der Gehalt während der Verarbeitung kaum verringert (2, 6).

Ein bisher nicht beschriebener Zusammenhang soll Zielstellung dieser Arbeit sein und wird anhand nachstehender Hypothesen erläutert.

1. Ein Pilzbefall verursacht einen erhöhten Furocumaringehalt in Knollensellerie. Die Infektion wird zum einen mit dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* und zum anderen mit dem Pilz *Rhizoctonia solani* durchgeführt, wobei beiden gleichermaßen große wirtschaftliche Bedeutung, in Hinsicht auf verursachte Ertragsverluste, zugesprochen wird (10, 11).

2. Durch Anwendung einer Pflanzenschutzmaßnahme kann der Furocumaringehalt gesenkt werden.

Für diesen Zweck wird das Fungizid Rovral® WG, das explizit bei Befall von Knollensellerie mit *Sclerotinia sclerotiorum* und *Rhizoctonia solani* in Freiland- und Gewächshauskultur appliziert werden darf, verwendet (12).

In diesem Zusammenhang soll eine geeignete Probenaufarbeitung und eine robuste HPLC-Messmethode zur Quali- und Quantifizierung der linearen FC Psoralen, Xanthotoxin und Bergapten erarbeitet und optimiert werden. Hierzu sind bereits zahlreiche Publikationen vorhanden, die jedoch nicht direkt auf die vorliegende Problemstellung angewendet werden können (13-15).

Die generierten Messdaten werden nach statistischer Bearbeitung untereinander verglichen, wobei die Erwartung in einem erhöhten FC-Gehalt durch Infektion und einer Absenkung der FC-Konzentration durch die Pflanzenschutzmittelanwendung bestehen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Apium graveolens* L. var. *rapaceum* (Mill) Gaud.

Apium graveolens L. var. *rapaceum* (Mill.) Gaud. (Knollensellerie) gehört der Familie der Doldengewächse (*Apiaceae* Lindl. oder *Umbelliferae* Juss.) an, die sich aus 3540 Arten zusammensetzt. Die Art *Apium* L. wiederum hat 20 Unterarten, von denen eine der Knollensellerie ist. Er ist aufgrund der verdickten Wurzel-Sprossknolle die wichtigste Sellerieform und wird seit dem 17. Jahrhundert als Gemüse und Gewürzpflanze verwendet (16).

Es ist bekannt, dass Pflanzen aus der Familie der Doldengewächse FC bilden können. Insbesondere die linearen FC Psoralen **1**, Xanthotoxin **2** und Bergapten **3** stehen aufgrund ihrer humantoxischen Wirkung im Blickpunkt (siehe Abbildung 1) (2, 6).

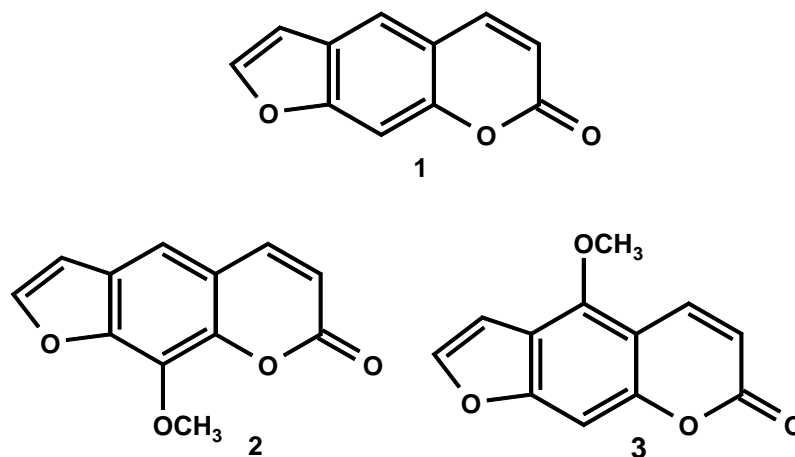


Abbildung 1: Lineare Furocoumarine Psoralen **1**, Xanthotoxin **2** und Bergapten **3**.

Diese Tatsache, die große wirtschaftliche Bedeutung und die Möglichkeit der Anwendung zugelassener Pflanzenschutzmittel gegen einen Pathogenbefall waren für die Wahl dieser Kulturpflanze im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ausschlaggebend.

2.2 Sekundärstoffwechsel bei Pflanzen

Dem Primärstoffwechsel abgeleitete Reaktionen werden als Sekundärstoffwechsel bezeichnet. Die niedermolekularen Produkte, zu den u.a. auch FC gehören, werden als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe bezeichnet. Ihnen wird eine Vielzahl ökochemischer Funktionen, wie z.B. die Wirkung als Lockstoff, Fraßhemmer oder Mikrobizid, zugeteilt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem die Funktion als chemisches Schutzschild von Bedeutung, mit denen sich die Pflanze gegen eine Vielzahl von Pflanzenfressern und mikrobiellen Pathogenen verteidigen kann. Dies beruht nicht zuletzt auf deren toxische Wirkungen sowohl auf Pathogene und Herbivore, als auch auf den Menschen (siehe Tabelle 1) (17).

Tabelle 1: Einige Hauptgruppen pflanzlicher Toxine (17).

Substanzklasse	Anzahl bekannter Verbindungen	Beispiel	Vorkommen
Alkaloide	10000	Senecionin	<i>Senecio jacobaea</i>
Furocumarine	400	Xanthotoxin	<i>Apium graveolens</i>
Glucosinolate	150	Sinigrin	<i>Brassica oleracea</i>
Cyanogene Glykoside	60	Amygdalin	<i>Prunus amygdalus</i>

2.3 Allelophysiologie

Der Begriff Allelophysiologie (griech. allélos, wechselseitig, gegenseitig) umschreibt die Interaktion von Pflanzen mit anderen Organismen und weist Bezüge zur Pflanzenökologie und Phytopathologie auf.

Je nach Intensität und Nutzen eines Partners oder beider Partner wird zwischen Symbiose, Kommensalismus und Parasitismus unterschieden. Die engsten Wechselwirkungen finden bei der Symbiose statt, wohingegen Kommensalismus und Parasitismus nur zum Nutzen eines Partners ohne/mit Beeinflussung des anderen vorliegt.

Mikrobielle Parasiten, die ihren Wirtsorganismus derart schädigen, sodass es zur Ausbildung von Schadsymptomen wie z.B. Chlorosen oder Nekrosen (siehe Abbildung 2) kommt, werden als Pathogene bezeichnet (17).



Abbildung 2: Chlorosen (links) (18), Nekrosen (rechts) (19).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über den Anteil der Phytopathogene innerhalb bestimmter Gruppen von Organismen.

Tabelle 2: Phytopathogene innerhalb bestimmter Organismengruppen (17).

Gruppe	bekannte Arten	davon Pflanzenpathogene
Viroide	30	30
Viren	2000	>500
Bakterien	1600	100
Pilze	100000	>10000

2.3.1 Phytopathologie

Die Phytopathologie (griechisch phytón = Gewächs, pathos = Krankheit und lógos = Lehre) ist die Lehre von den Pflanzenkrankheiten sowie deren wirtschaftlichen und geschichtlichen Konsequenzen. Sie beschreibt insbesondere die Ursachen, den Verlauf und die Ausbreitung einer Krankheit sowie die verursachten Schäden (20).

Ein Krankheitsausbruch bedingt verschiedene Voraussetzungen, die unbedingt erfüllt sein müssen. Die Pflanze sollte für das Eindringen in ihr Gewebe, das Wachstum und die Vermehrung des Erregers prädispositioniert sein. Weiterhin sind das Vorliegen von infektiösem Material (Pilzsporen, Pilzmyzel) zu räumlicher und zeitlicher Koinzidenz bei geeigneten Witterungsbedingungen (Feuchtigkeit, Temperatur) und eine positive Wirtserkennung wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion (7).

Wenn eine Wirtspflanze anfällig und das Pathogen hoch virulent ist, dann sind Krankheitssymptome sichtbar.

Dies wird als kompatible Wirt-Pathogen-Beziehung bezeichnet. Im Gegensatz dazu stellt eine inkompatible Wirt-Pathogen-Beziehung eine hohe Widerstandsfähigkeit der Pflanze (Resistenz) und eine geringe Angriffsfähigkeit des Erregers (Avirulenz) dar. Dem liegt eine rassenspezifische Gen-für-Gen-Interaktion zugrunde, bei der die Genotypen von Pflanze und Pathogen den Ausgang der Wechselwirkungen bestimmen (7).

2.3.2 Pathogenabwehr

Einige Pflanzenarten besitzen neben präformierten Mechanismen zur Pathogenabwehr weitere induzierbare Abwehrmechanismen, die entweder pathogenspezifisch oder unspezifisch sind. Von besonderem Interesse sind antimikrobiell wirksame organische Substanzen, die als Phytoalexine bezeichnet werden. Diese leiten sich größtenteils aus dem Terpen- oder dem Phenylpropanstoffwechsel ab und werden postinfektionell gebildet (7, 17).

Die allgemeine Abwehr, auch „pamp-triggered immunity“ genannt, beruht auf der Erkennung nichtwirtsspezifischer Elicitoren. Dabei handelt es sich um hochkonservierte Molekülstrukturen, die für das Pathogen essentiell sind (z.B. Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, Chitin) und natürlich nicht in der Wirtszelle vorkommen. Eine spezifische Abwehrreaktion der Pflanze tritt ein, wenn die passende Kombination von Avirulenz-(*avr*-) Gen und Resistenz-(*R*-) Gen gegeben ist. *Avr*-Gene codieren rassenspezifische Elicitoren, die über komplexe Enzymkaskaden Abwehrreaktionen der Pflanze aktivieren, wenn ein *R*-Gen vorhanden ist, welches den dazugehörigen Elicitorrezeptor codiert. Ein Beispiel ist der hypersensitive Zelltod, hervorgerufen durch die enzymkatalysierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, in dessen Folge es zu einer Abtötung der infizierten Zelle inklusive Pathogen kommt. Ist ein falsches oder kein *R*-Gen im Erbgut des Wirtsorganismus vorhanden, so wird keine rassenspezifische Pathogenabwehr aktiviert, die Pflanze ist somit suszeptibel gegenüber dem Pathogen und es kommt zur Erscheinung der genannten Schadbilder. Die im Verlauf der Pathogenese auftretenden Krankheitssymptome entstehen aufgrund der heterotrophen Ernährung von Pilzen und Bakterien. Hierbei werden häufig Exoenzyme produziert, die höhermolekulare Strukturen (z.B. Lignin, Cellulose) in niedermolekulare Verbindungen spalten, um diese aufnehmen zu können (17).

2.3.3 Furanocumarine/Furocumarine

Die Substanzklasse der Furocumarine ist in vielen verschiedenen Pflanzenfamilien anzutreffen. Zu ihnen zählen neben den Doldengewächsen vor allem die Rautengewächse (*Rutaceae*), zu denen alle Zitrusfrüchte gehören (21). In diesem Zusammenhang werden erhöhte Gehalte linearer FC in den ätherischen Ölen der Zitruspflanzen, die häufig in Hautcreme als Zusatzstoff verwendet werden, problematisch betrachtet (15).

FC habe einen unpolaren Charakter, reichern sich somit in unpolaren organischen Lösungsmitteln an und wirken fungistatisch (3).

Die Kernstruktur von Furocumarinen ist ein (Dihydro-)furan substituiertes 2*H*-1-benzopyran-2-on (22). Je nach Position des Furanringes wird zwischen den linearen (Psoralene) und den angularen (Angelicin und Derivate) unterschieden (23).

Die in Abbildung 3 dargestellten Ausschnitte der Biosynthese von FC in Pflanzen haben Ihren Ursprung im Shikimatweg. Die hierbei gebildete Aminosäure Phenylalanin ist Edukt des Phenylpropansäure Stoffwechselweges, in dessen Verlauf durch die Enzyme Phenylalaninammoniumlyase (1) und Zimtsäure-4-hydroxylase das 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon (2) gebildet wird, das zugleich Ausgangsverbindung für die Gruppen der angularen und linearen FC ist. Nach regiospezifischer Prenylierung, katalysiert von der Umbelliferon Dimethylallyltransferase-6 (3) oder -8 (8), und Ringschluss, katalysiert von der Marmesinsynthase (4) oder der Columbianetinsynthase (9), werden nach Abspaltung des Isopropanolrestes, katalysiert von Psoralensynthase (5) oder der Angelicinsynthase (10), Psoralen oder Angelicin erhalten. Eine anschließende enzymatische Hydroxylierung und Methylierung (6, 7) führt zu den Derivaten **2** und **3**. Alle Umwandlungsschritte nach Prenylierung sind NADPH-abhängige, Zytochrom P450 katalysierte Modifikationen oder O-methylierungen (17, 22, 24).

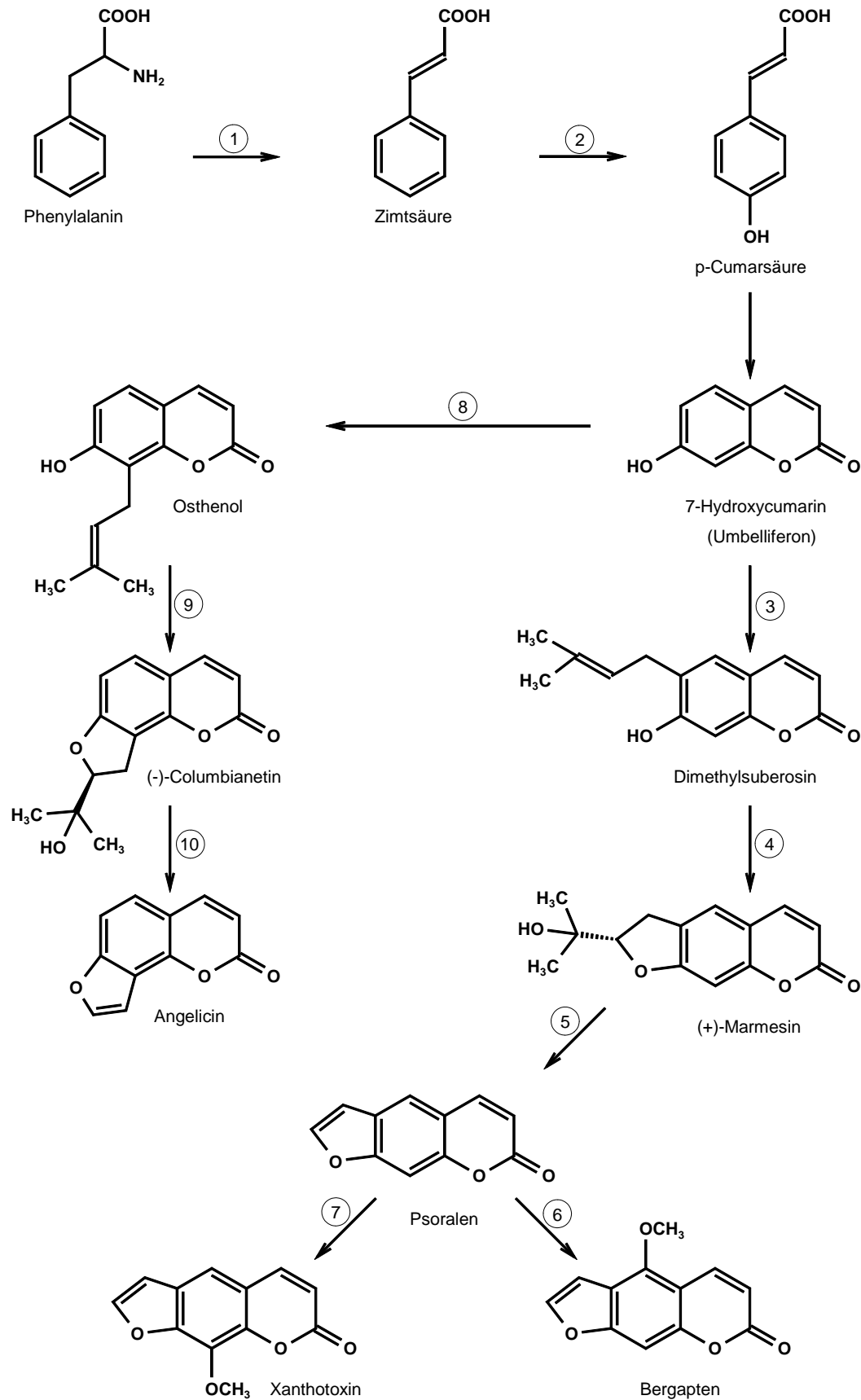


Abbildung 3: Ausgewählte Aspekte zur Furocumarinbiosynthese (24, 25).

- 1 = Phenylalaninammoniumlyase,
- 2 = Zimtsäure-4-hydroxylase,
- 3 = Umbelliferon Dimethylallyltransferase 6-Position,
- 4 = Marmesinsynthase,
- 5 = Psoralensynthase,
- 6 = Bergaptolsynthase / Bergaptol O-methyltransferase,
- 7 = Xanthotoxolsynthase / Xanthotoxol O-methyltransferase,
- 8 = Umbelliferon Dimethylallyltransferase 8-Position,
- 9 = Columbianetinsynthase,
- 10 = Angelicinsynthase (24-26).

Bei oraler oder dermaler Exposition mit linearen FC kann es zur Ausprägung verbrennungsähnlicher Erscheinungen auf der Haut (Erytheme, Ödeme und Hautbläschen) kommen, die als Photodermatitis bezeichnet werden. Hintergrund ist eine photodynamische Reaktion, in deren Verlauf die linearen FC mit der DNA und RNA interkalieren oder es zur Bildung von Mono- bzw. Diaddukten sowie zu interstrangulären Crosslinks in Gegenwart langwelliger UV-Strahlung (300 - 360 nm) kommen kann (2, 6, 15, 27-29). Hierbei wird eine Konzentrationsschwelle von 0,23 mg Xanthotoxin/kg Körpergewicht vermutet (2).

Mechanistischer Hintergrund zur Generierung von DNA/RNA Crosslinks ist eine [2 + 2] Cycloadditionsreaktion, bei der die linearen FC via ihrer 3,4- und 2,3-Doppelbindungen mit den Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil irreversible Bindungen eingehen. Aufgrund sterischer Hinderung bilden anguläre FC ausschließlich Monoaddukte, worin ihr geringeres toxisches Potential vermutet wird (2). Die Arbeitsgruppe um Larbat diskutiert mögliche synergistische Effekte zwischen angulären und linearen FC. Hierbei sollen anguläre FC inhibierend auf Monooxygenasen wirken und somit die natürliche Entgiftung der Psoralene verringern (22, 23).

Ein weiterer wichtiger Wirkungsmechanismus besteht in der von Kang beschriebenen inhibierenden Wirkung von FC auf rekombinantes humanes Zytochrome P-450 1A2 (30). Als das Phase I Enzym ist es zur Entgiftung toxischer Substanzen unerlässlich und stellt eines der wichtigsten Enzyme des menschlichen Körpers dar. Demzufolge können FC, aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung, als genotoxisch betrachtet werden, da sie den natürlichen Entgiftungsweg hemmen. Kontrovers dem gegenüber steht eine antigenotoxische Wirkung, die auf Grundlage der verhinderten Freisetzung karzinogener Verbindungen aus Prokarzinogenen postuliert wurde (30).

2.4 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (*S. sclerotiorum*), Erreger der Weißstängeligkeit, ist ein nekrotropher Pilz aus der Abteilung der Ascomyceten (Schlauchpilze) und gehört zu den weltweit verbreitetsten und erfolgreichsten pflanzenpathogenen Pilzen mit einem umfangreichen Wirtspflanzenspektrum von über 400 Arten, zu denen u.a. auch der Knollensellerie zählt. Nach einer erfolgreichen Infektion des Wirtsorganismus ernährt sich *S. sclerotiorum* parasitär von abgestorbenen Zellen und pflanzt sich auf diesen fort. *S. sclerotiorum* bildet schwarz pigmentierte Sklerotien, die aus verwobenen Pilzhyphen bestehen und eine sehr widerstandsfähige Überdauerungsform darstellen. Unter günstigen Umweltbedingungen wachsen aus den Sklerotien Fruchtkörper, die zur Verbreitung des Pilzes dienen. *S. sclerotiorum* ist demzufolge sowohl zur Bildung von Myzel, als auch von Apothecien (Fruchtkörper der Schlauchpilze) fähig (7, 11, 31). Sichtbare Symptome, die auf eine Infektion mit *S. sclerotiorum* hinweisen sind wasserdurchnässte Läsionen an den Blättern, nekrotische Gewebe und weißes watteartiges Myzel mit Sklerotien, wobei das Auftreten von weißem Myzel in Verbindung mit einer Bildung von dunkelpigmentierten Sklerotien das am häufigsten auftretende Zeichen einer *S. sclerotiorum* Infektion ist. Das auftretende Krankheitsbild der Fäule trägt über 60 Namen. Letztendlich findet stets ein Abbau der organischen Zellmasse statt, wodurch erhebliche Ertragsverluste entstehen können. Im Jahr 1999 entstand in den USA, aufgrund einer Sclerotinia Ährenfäule an Sonnenblumen, ein wirtschaftlicher Schaden von ca. 100 Millionen US Dollar (11).

2.5 *Rhizoctonia solani* (Kühn)

Rhizoctonia solani (Kühn) (*R. solani*), ein bodenbürtiger und weltweit verbreiteter, schnell wachsender Pilz aus der Abteilung der Basidiomycota, ist allgegenwärtig und befällt ein großes Wirtspflanzenspektrum (>500) aus den Bereichen der Nutz- und Zierpflanzen, zu dem u.a. auch Knollensellerie gehört (10, 32-34).

Als Anamorphe Form des Pilzes *Thanatephorus cucumeris* ([Frank] Donk) erfolgt seine Verbreitung ausschließlich asexuell durch Myzel und die Ausbildung von Sklerotien (10).

Eine eindeutige taxonomische Einteilung von *R. solani* ist bislang nicht möglich, da er vielmehr als Komplex von Arten angesehen wird (35).

Die Stämme dieses Pilzes können jedoch nach Anastomosegruppen geordnet werden. Dabei handelt es sich jeweils um eine Gruppe von Stämmen, deren Hyphenspitzen miteinander fusionieren können, indem sich die Zellwände verbinden. Anhand genetischer Untersuchungen und DNA Sequenzierungen konnte festgestellt werden, dass Stämme einer Anastomosegruppe eine homologe DNA Zusammensetzung haben (10).

Bei optimalen Wachstumsbedingungen (staunasse Böden, 15-18 °C) können wirtschaftlich bedeutende Ernteverluste durch die Krankheit der Rhizoctonia-Fäule entstehen. Desweiteren wird in Publikationen der Arbeitsgruppe um Grosch auf eine steigende Bedeutung von *R. solani* im europäischen Raum und der damit verbundenen Ausbreitung von Krankheiten hingewiesen (33). Es wird von bis zu 50 %igen Ernteaufschlägen durch die späte Zuckerrübenfäule und von bis zu 70 %igen Ertragsverlusten durch die Grundfäule an Salat berichtet. Weiterhin kann es durch eine Infektion zum schwarzen Kartoffelschorf oder zur Umfallkrankheit bei jungen Gemüsepflanzen kommen (32, 33). Hintergrund für die Ausprägung der Krankheitssymptome ist u.a. die saprophytische Ernährung dieses Pilzes (10).

Die Erarbeitung von Kontrollstrategien zur Bekämpfung des Befalls mit *R. solani* gestaltet sich, aufgrund seines widerstandsfähigen ökologischen Verhaltens bei variablen Umweltbedingungen, schwer (33).

3 Methoden und Materialien

3.1 Infektionsversuche

3.1.1 Versuchskonzept

In den vorgesehenen Versuchsreihen mit *S. sclerotiorum* und *R. solani* wurde eine Hälfte der Selleriepflanzen infiziert. Ein Teil der infizierten Pflanzen wurde, genauso wie eine Hälfte der nichtinfizierten Pflanzen, mit dem Pflanzenschutzmittel behandelt. Der Versuch wurde mit den Knollenselleriesorten `Prinz´ und `Monarch´ durchgeführt, um auch den Einfluss der Sorte auf den FC-Gehalt zu überprüfen. Die Abbildung A1 (siehe Anhang) gibt einen Überblick über die Versuchsvarianten. Der Stichprobenumfang je Variante und Probenahmetermin umfasste 10 Pflanzen, damit eine statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse möglich ist.

3.1.2 Anzucht der Knollenselleriepflanzen

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden Pflanzen der Knollenselleriesorten `Prinz´ und `Monarch´ herangezogen und anschließend auf deren FC-Gehalte in der jeweiligen Versuchsreihe untersucht. Bei dem verwendeten EG-Norm Standardsaatgut beider Sorten, bezogen von der HILD Samen GmbH, handelt es sich um lichtkeimende und ungebeizte Samen.

Die Aussaat erfolgte am 23.08.2011 in einem Gewächshaus bei Verwendung von Frühstorpher Erde Typ T als Kultursubstrat in Pflanztöpfen (Höhe = 13 cm, Durchmesser = 9 cm) bei den folgenden Bedingungen:

- Temperatur Tag 20°C
- Temperatur Nacht 18°
- Belüftungstemperatur 22°C
- Zusatzbeleuchtung 6 – 22 Uhr
- Luftfeuchtigkeit entsprach Umgebungsfeuchte
- Bewässerung täglich durch Gießen

gemessen mit einem Hygrotemp-Schreiber.

Nach Erreichen einer Wuchshöhe von ca. 15 cm fand am 24.10.2011 ein Standortwechsel von insgesamt 320 Pflanzen, 160 Pflanzen von jeder Sorte, in begehbare Klimakammern statt, um vor allem eine relativ hohe Luftfeuchtigkeit von 80 %, die für gute Infektionsbedingungen notwendig ist, zu gewährleisten. Zur Verhinderung einer Kreuzinfektion, bzw. einer Beeinflussung

nichtbehandelter Pflanzen durch Pflanzenschutzmittel über die Gasphase, wurden die jeweiligen Versuchsvarianten räumlich getrennt aufgestellt (vgl. Anhang, Abbildung A1).

Die eingestellte Solltemperatur von 20°C sowohl am Tag, als auch in der Nacht, wurde in zwei von drei Klimakammern eingehalten. Raum zwei, der die Pflanzen für die Versuchsvariante zur Infektion ohne Anwendung der Pflanzenschutzmaßnahmen enthielt, wies einen nächtlichen Abfall der Temperatur auf 15°C auf. Die Pflanzen wurden täglich gegossen und vom 03.11.2011 bis 17.11.2011 einmal die Woche bzw. vom 21.11.2011 bis 12.12.2011 zweimal wöchentlich über das Kultursubstrat gedüngt.

3.1.3 Vortest auf Pathogenität

Vor der Inokulation der Versuchspflanzen wurde die Pathogenität der Pilze getestet. Zur Desinfektion der Samen sind diese 4 Minuten in 50 ml H₂O/Chlorex (2:1, v:v) gewaschen, anschließend abfiltriert, zweimal mit Reinstwasser abgespült und unter einer Laminarbox getrocknet worden. Die Durchführung erfolgte im mikrobiologischen Versuchsmaßstab, in dessen Verlauf sechsmal jeweils fünf desinfizierte Samen einer Selleriesorten auf eine, mit Antibiotika versetzte, SNA-Platte verteilt wurden. Nach erfolgreicher Keimung und Einteilung in die drei Versuchsvarianten Kontrolle, *S. sclerotiorum* Infektion und *R. solani* Infektion, erfolgte die Inokulation der vorgesehenen Keimlinge über myzelbewachsene PDA-Stücke (siehe Abbildung 4).

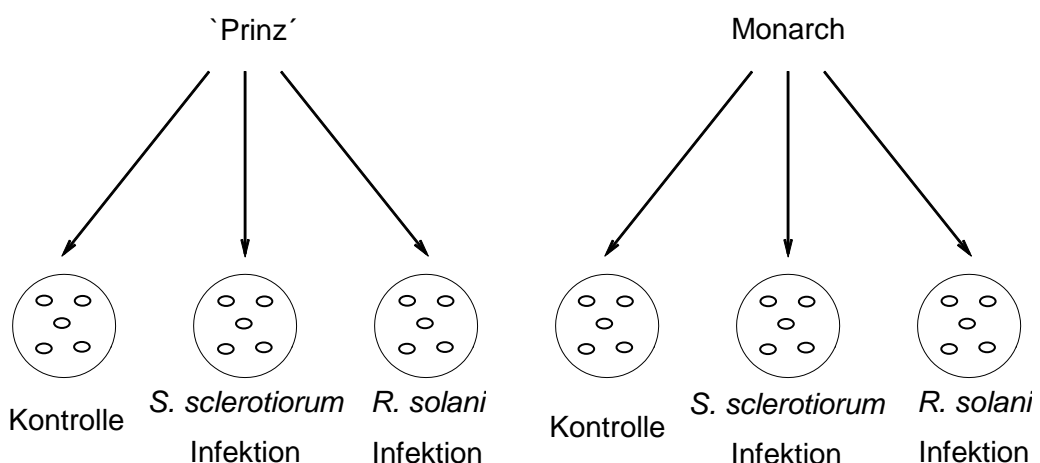


Abbildung 4: Versuchsanordnung zum Vortest auf Pathogenität der Pilze.

Nach dem neunten Tag konnte ein starker Befall der infizierten Keimlinge, sichtbar an deren bräunliche Verfärbungen und ausgetrocknete Erscheinung, festgestellt werden (vgl. Anhang, Tabelle A1).

Folglich sind die vorliegenden Pathotypen der Pilze *S. sclerotiorum* und *R. solani* für die Infektion der Wirtspflanze Knollensellerie geeignet.

3.1.4 Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

S. sclerotiorum gilt als Auslöser der Weißstängeligkeit und soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Infektion des oberirdischen Pflanzensprosses dienen.

Das verwendete Isolat von *S. sclerotiorum* wurde freundlicher Weise von Frau Dr. Grosch aus der Stammsammlung des IGZ EV Großbeeren als Vorkultur auf PDA bereitgestellt und am 19.10.2011 in sechsfacher Wiederholung auf PDA-Platten überimpft und bei Raumtemperatur gelagert. Der Pilz entwickelte sich sehr gut und begann Sklerotien zu bilden. Ein Tag vor Infektion der Pflanzen ist das PDA Material von vier Platten, einschließlich Pilzmyzel und Sklerotien, in eine autoklavierte 1 L Duran Flasche überführt und mit 400 ml Reinstwasser, unter Verwendung eines Ultra Turrax mit S25N/18G Schneidaufsatzes, homogenisiert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt worden. Die Spritzinokulation, für deren Durchführung die ausgewählten Pflanzen in einen separaten Raum gebracht wurden, um einer Kreuzinfektion über den Sprühnebel vorzubeugen, fand am 21.11.2011, unter Verwendung eines Laborsprühers statt. Zur Bekämpfung von *S. sclerotiorum* Befall an Gemüsekulturen wurde das zugelassene Pflanzenschutzmittel Rovral® WG (wasserdispergierbares Granulat) angewendet. Nach Maßgabe des Herstellers BASF handelt es sich dabei um ein Kontaktfungizid mit Tiefenwirkung. Bei einer Kontaktwirkung wird der Wirkstoff nicht von der Pflanze aufgenommen und nicht über das Xylem verteilt, sondern verbleibt auf der Pflanzenoberfläche. Der aktive Inhaltsstoff von Rovral® WG ist Iprodion (750 g/kg) und soll gemäß den Angaben des Herstellers eine verändernde Wirkung auf die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum und den Zellkern der Zellen des Zielorganismus aufweisen (12). Die Spritzapplikation erfolgte 3 Tage nach Inokulation in einer geschlossenen Applikationskammer. Auch hier konnte die gleichmäßige Verteilung von ca. 5,5 ml Suspension (1,75 g/L Rovral® WG), was einem Äquivalent von 7,22 mg Iprodion pro Pflanze und somit den vorgeschlagenen Aufwandmengen von 0,7 kg/ha Rovral® WG entspricht, auf die Blattoberfläche mit einem Laborsprüher gut realisiert werden.

Die Probenahmen fanden am 25.11.2011 und 07.12.2011 mit einem Umfang von 10 Stichproben pro Sorte und Variante statt, um den zeitlichen Verlauf des FC Musters nachvollziehen zu können. Bei zwei Sorten und jeweils vier Varianten ergibt dies eine Beprobung von 80 Pflanzen. Hierzu wurden von jeder Pflanze vier Sprosse gewählt, die sowohl zum Zeitpunkt der Inokulation, als auch zur Anwendung der Pflanzenschutzmaßnahme vorhanden, dennoch weder beschädigt oder vergilbt waren. Die Einwaage von 5 g ausgewähltem Blattmaterial (siehe Abbildung 5) je Pflanze erfolgte direkt in einem verschließbaren 50 ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, PP), das stabil gegenüber Kälte und Lösungsmittel ist, um ein weiteres Auftauen und Abwiegen für die Aufarbeitung zu umgehen. Die Probengefäße wurden bei -20°C zwischengelagert. Folglich konnte die Zerkleinerung, Extraktion und das Zentrifugieren in den Zentrifugenröhrchen durchgeführt werden.



Abbildung 5: Probenahme Blattmaterial.

3.1.5 Versuchsreihe *R. solani*

Rhizoctonia solani wird, als Auslöser einer Wurzelfäule, zur Infektion der unterirdischen Pflanzenorgane, speziell der Sprossrübe, verwendet.

Das, ebenfalls am 13.10.2011 aus der Stammsammlung des IGZ EV Großbeeren erhaltene Isolat des Pilzes *R. solani* vom 07.10.2011 wurde am 19.10.2011 zur Aufbewahrung auf PDA-Platten überimpft und bei Raumtemperatur gelagert. Im Unterschied zu *S. sclerotiorum* sollte die Inokulation dieses Pilzes über das Substrat stattfinden.

Dazu wurden 2 Duranflaschen (500 ml) mit groben Haferflocken (Kaisers, Dahlem) auf 200 ml befüllt, 100 ml Reinstwasser dazugegeben und anschließend autoklaviert.

Am 16.11.2011 wurde jede Flasche mit jeweils drei myzelbewachsenen PDA-Stücken beimpft und bei 25°C in den Wärmeschrank gestellt. Vor der Beimpfung musste der Flascheninhalt mit einem sterilen Spatel aufgelockert und anschließend alle 2 Tage geschüttelt werden.

Die Inokulation der Selleriepflanzen erfolgte am 25.11.2011 über den Boden, indem ungefähr drei myzelbewachsene Haferflocken gleichmäßig um den Pflanzenspross verteilt und festgedrückt wurden.

Da das Pflanzenschutzmittel Rovral[®], im speziellen der Wirkstoff Iprodion, sowohl zur Bekämpfung von *S. sclerotiorum*, als auch von *R. solani* Befall an Gemüsekulturen eingesetzt werden kann, fand es auch in dieser Versuchsreihe, in Form einer Gießapplikation, Anwendung. Zur Behandlung am 05.12.2011 wurden jede Pflanzen mit 20 ml einer wässrigen Rovral[®]-Lösung (0,48 g/L) gegossen. Dies entspricht der gleichen Absolutmenge Iprodion (7,22 mg je Pflanze), wie sie bei der Spritzapplikation der *S. sclerotiorum* Varianten verwendet wurde.

Die Probennahmen erfolgten am 06.12.2011 und 15.12.2011 mit einem Umfang von 10 Stichproben pro Sorte und Variante. Dazu wurde von der Sprossröbe jeder Pflanze, die zunächst freigelegt, von Wurzeln befreit, gewaschen und in kleine Würfel zerteilt wurde, 5 g in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und bei -20°C zwischengelagert.

3.2 Furocumarinanalytik

3.2.1 Probenvorbereitung

Zur Entfernung von Matrixbestandteilen und zur Anreicherung der linearen FC **1**, **2** und **3** wurden alle Proben vor der HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) Trennung und Detektion wie folgt aufgearbeitet.

Die gefrorenen Proben in den Zentrifugenröhrchen wurden zunächst mit 20 ml organischem Lösungsmittel (Blattproben mit Diethylether, Knollenproben mit Essigsäureethylester) versetzt und mit einem Ultra-Turrax[®] eine Minute zerkleinert und homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 20 ml organischen Lösungsmittels wurden die Proben 30 Minuten mit einem Überkopfschüttler extrahiert (Rotierapparat, 30 U/min), 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand in eine verschließbare 100 ml Duranflasche dekantiert. Nach wiederholter Extraktion mit 40 ml organischem Lösungsmittel wurden beide organische Phasen vereint und 50 ml am Rotationsverdampfer (Diethylether: 38°C, 720 mbar; Ethylacetat: 50°C, 66-133 mbar) und anschließend

Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Nach erfolgter Aufnahme des Rückstandes in zunächst 2 ml Methanol (MeOH) und nachfolgender Verdünnung mit 4 ml Reinstwasser (H₂O) wurden diese 6 ml über eine Festphasenextraktion mit octadecylmodifiziertem Kieselgel gereinigt. Dazu wurde die Säule vor der Probenaufgabe mit 6 ml MeOH gewaschen und mit 6 ml MeOH/H₂O (20:80; v:v) vorkonditioniert. Nach erfolgter Aufgabe von 6 ml Probenlösung und Waschen mit 6 ml MeOH/H₂O (20:80; v:v) wurde mit 6 ml MeOH/H₂O (80:20; v:v) eluiert und direkt im Anschluss in einem helikalen Stickstoffstrom bei 45°C (TurboVap[®]) zur Trockne eingengt. Die Rückstandsaufnahme erfolgte in 1 ml MeOH/H₂O (50:50; v:v) unter Zuhilfenahme von Ultraschallbad und Vortex mit anschließender Überführung in ein braunes 1,5 ml Vial, aus dem 30 µl zur HPLC Vermessung injiziert wurden.

3.2.2 HPLC Messmethode

Die Injektion von 30 µl Probenlösung auf die temperierte (40°C) Trennsäule erfolgt über einen Autosampler mit 100 µl Injektionsschleife.

Zur Auftrennung hat sich der in Tabelle 3 angegebene Laufmittelgradient von Laufmittel A (5 % MeOH in H₂O) und Laufmittel B (MeOH) bei einem Volumenstrom von 1 ml/min etabliert.

Tabelle 3: Zeitlicher Verlauf der Laufmittelgradienten.

Zeit [Minuten]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0 - 5	70	30
5 - 10	70 - 50	30 - 50
10 - 17	50 - 20	50 - 80
17 - 19	20 - 0	80 - 100
19 - 21	0	100
21 - 23	0 - 70	100 - 30
23 - 25	70	30

A (5 % MeOH in H₂O)

B (MeOH)

Die Detektion erfolgte mit einem Dioden Array Multiwellen Detektor (DAD) bei 248 nm.

Externe Kalibrierung

Im Voraus wurden drei Sammelstandardlösungen zu jeweils 50 µg/ml aus den Einzelsubstanzstammlösungen [1,00 mg/ml] hergestellt (siehe 3.6), um jede Kalibrierstufen in dreifacher Wiederholung vermessen zu können. Zur Erstellung der Kalibriergeraden für Psoralen, Bergapten und Xanthotoxin sind sechs Kalibrierstufen, im Bereich von 0,1 µg/ml bis 50 µg/ml, gewählt worden (siehe Tabelle 4).

Die einzelnen Konzentrationen sind durch Verdünnung mit einem MeOH/H₂O (30:70; v:v)-Gemisch auf 500 µl realisiert worden.

Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierstufen.

Konzentration [µg/ml]	Konzentration [µg/500 µl]	entspricht Volumen Sammelstandardlösung [µl]	Volumen ^a [µl]
0,1	0,05	1	499
0,5	0,25	5	495
2,5	1,25	25	475
10	5	100	400
25	12,5	250	250
50	25	500	0

^a MeOH/H₂O (30:70; v:v)

Ermittlung der linearen Furocumariningehalte

Die Identifizierung der linearen FC erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit und des UV-Absorbtionsspektrums im Peakmaximum mit Standardreferenzen unter Zuhilfenahme der Software ChemStation[®] for LC 3D von Agilent.

Zur Quantifizierung der einzelnen Substanzen wurde die jeweilige Fläche unterhalb des Graphen durch Integration ermittelt und über eine externe Kalibrierung die dazugehörige Konzentration berechnet. Die Umrechnung auf den Gehalt, bezogen auf ein Gramm Frischgewicht, erfolgte durch Formel (1).

$$\text{Formel (1):} \quad x = \frac{a \cdot 1 \text{ ml} \cdot 1,6}{5 \text{ g}}$$

x...Gehalt [µg/g]

a...Konzentration [µg/ml]

1 ml...Volumen der Probenlösung im Vial zur Messung

1,6...Aliquotierungsfaktor (50 ml von 80 ml verwendet)

5 g...Einwaage

3.2.3 LC-MS/MS Messmethode

Zur Verifizierung der HPLC Messdaten wurden die Messproben 1:1000 mit MeOH verdünnt und der nachstehenden LC-MS/MS Messung zugeführt.

Die Injektion von 2 µl Probenlösung auf die temperierte (40°C) Trennsäule erfolgt über einen Autosampler. Zur Auftrennung wurde der in Tabelle 5 angegebene Laufmittelgradient aus Laufmittel A (MeOH) und Laufmittel B (H₂O), beide mit jeweils 0,5 % Essigsäure und 5 mmol Ammoniumacetat versetzt, bei einem Volumenstrom von 0,8 ml/min verwendet.

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf des Laufmittelgradienten.

Zeit [Minuten]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0 - 2	10 - 90	90 - 10
2 - 3	90	10
3 - 4	90 - 10	10 - 90
4 - 5	10	90

A (MeOH + 0,5 % Essigsäure + 5 mmol Ammoniumacetat)
B (H₂O + 0,5 % Essigsäure + 5 mmol Ammoniumacetat)

Die Massenspektrometrische Detektion (MS) erfolgte nach positiver Elektronensprayionisation über die Registrierung der positiven Fragmentionen aus den 2 MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Übergängen für jeden Analyten (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Quali- und Quantifier MRM-Übergänge der Analyten.

Analyt	Retentionszeit [Minuten]	Vorläuferion [m/z]	Tochterion [m/z]
Psoralen	2,31	187	115
		187	131
Xanthotoxin	2,34	217	89
		217	202
Bergapten	2,49	217	89
		217	202

Externe Kalibrierung

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für Psoralen, Bergapten und Xanthotoxin sind acht Kalibrierstufen, im Bereich von 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml, gewählt worden (siehe Tabelle 7).

Aus den Einzelsubstanzstammlösungen (1 mg/ml) wurden nach zweifacher Verdünnung (1:100, 1:20) mit MeOH Einzelsubstanzstandardlösungen (500 ng/ml) erhalten, die zur Herstellung der Kalibrierstufen herangezogen worden.

Tabelle 7: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierstufen.

Konzentration [ng/ml]	entspricht Volumen Einzelstandardlösung [μ l]	Volumen ^a [μ l]
0,1	0,2	999.8
0,5	1	999
1	2	998
5	10	990
10	20	980
25	50	950
50	100	900
100	200	880

^a MeOH

Die Vermessung jeder Kalibrierstufe erfolgte in vierfacher Wiederholung.

Die Ermittlung der Gehalte linearer FC je Gramm Probenmaterial erfolgt analog der HPLC Methode, mit dem Unterschied, dass die aus Formel (1) erhaltenen Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor 1000 multipliziert werden müssen.

3.3 Statistische Auswertung

Eine Entscheidung über signifikante Unterschiede zweier unabhängiger Schätzwerte für die Stichprobenmittelwerte kann über einen unabhängigen T-Test erfolgen. Ist das Signifikanzniveau kleiner als 5 %, so wird ein signifikanter Unterschied angenommen. Hierzu ist zunächst auf Normalverteilung, Ausreißer und Varianzhomogenität zu prüfen. Die generierten Daten werden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Kann eine Normalverteilung der Stichprobenergebnisse angenommen werden, so können Ausreißer durch den Test nach Nalimov eliminiert werden. Von den modifizierten Daten wird über den F-Test die Homoskedastizität der Varianzen der jeweiligen Stichprobenvariante überprüft. Die verwendete Software WinSTAT[®] ermöglicht die Durchführung der genannten Testverfahren.

3.4 Materialien, Chemikalien und Reagenzien

Saatgut

Sorte `Prinz´: DE08-9387St

Sorte `Monarch´: DIKA-9387St

Kultursubstrat

Frühstorpher Erde Typ T

Dünger

0,2%ige Hakaphos blau Wasserlösung

Die Herstellung aller Reagenzien erfolgte bei Zimmertemperatur.

Diethylether

Chemsolute, $\geq 99,5\%$, CAS 60-29-7, 1 L

Ethylacetat

Fluka, Pestanal[®], $\geq 99,8\%$, CAS 141-78-6, 2,5 L

Methanol

J.T.Baker, $\geq 99,8\%$, CAS 67-56-1, 2,5 L

Lösungen verschiedener Methanolkonzentrationen (vgl. Tabelle 8)

Das jeweilige Volumen Reinstwasser wird in einem Messzylinder vorgelegt, mit Methanol aufgefüllt und homogenisiert.

Tabelle 8: Methanollösungen.

Methanol [Vol. %]	Reinstwasser [Vol. %]
5	95
10	90
20	80
30	70
70	30
80	20
90	10

Acetonitril

J.T.Baker, Ultra Gradient HPLC Grade, CAS 75-05-8, 2,5 L

Psoralen

Sigma Aldrich, $\geq 99\%$, CAS 66-97-7

5-Methoxypsoralen (5-MOP), Bergapten,

Sigma Aldrich, $\geq 99\%$, CAS 484-20-8

8-Methoxypsoralen (8-MOP), Xanthotoxin

Sigma Aldrich, $\geq 98\%$, CAS 298-81-7

Stammlösung Psoralen, Bergapten und Xanthotoxin

Zur Herstellung der jeweiligen Stammlösung wurden 10 mg Einzelsubstanz über das Wägesystem in ein braunes 10 ml Glasgefäß mit Dichtung und Schraubverschluss eingewogen und mit 10 ml Acetonitril auf die Endkonzentration von 1,00 mg/ml verdünnt.

Standardlösung Psoralen, Bergapten und Xanthotoxin zur Erstellung der Kalibrierreihe für die LC-MS/MS Messung

Von der jeweiligen Stammlösung wurden 10 μ l in ein 1,5 ml Vial überführt und mit 950 μ l MeOH verdünnt (1:100). Aus dieser Verdünnung wurde 50 μ l entnommen und mit 950 μ l MeOH versetzt (1:20), sodass die so erhaltene Einzelsubstanzstandardlösung hat eine Konzentration von 500 ng/ml hat. Die Aufbewahrung erfolgte wird lichtgeschützt bei 4°C.

Sammelstandardlösung zur Erstellung der Kalibrierreihe für die HPLC Methode

Aus den Einzelsubstanzstammlösungen sind jeweils 50 μ l in ein braunes 1,5 ml Vial pipettiert und mit 850 μ l eines MeOH/H₂O (30:70; v:v)-Gemisches verdünnt worden, sodass die Konzentration sowohl für Psoralen, als auch für Bergapten und Xanthotoxin 50 μ g/ml beträgt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

Sammelstammlösung Furocumarine zur Dotierung

Es wurden jeweils 2,0 mg Standard (Psoralen, 5-MOP, 8-MOP) mit Hilfe eines Wägeschälchens auf der Laborwaage eingewogen, mit Acetonitril in einen 10 ml Maßkolben überführt und bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C in einem braunen Glasgefäß mit Dichtung und Schraubverschluss.

3.5 Geräte

Waage für die Probenahme

Mettler, PM 460, Delta Range®

Laborwaage

Mettler, Toledo AG 204, Delta Range®, d = 1 mg / 0,1 mg

Wägesystem

Waage: *Sartorius*, MC 210S, d = 0,01 mg

Software: *Sartorius*, Subcon 4.0

Ultra-Turrax® T25

Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Leerlaufdrehzahl 8000 – 24000 U/min

Schneidaufsatz S25N/18G

Dispensetten®

Brand, 1 – 10 ml, 5 – 50 ml, 10 – 100 ml

Rotierapparat

Gerhard, RA 20

Zentrifuge

Heraeus Instruments, Megafuge® 1.0, Rotor 3360

Rotationsverdampfer mit Wasserbad

Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Heidolph Laborota 4000 efficient®,

HB Digital

Vakuumpumpe *KNF Neuberger* Laboport

Manometer (Rettberg, Wulff'sche Flasche)

Reinstwasseranlage

Sartorius, arium® 611 UV, 18,2 MΩ bei 25 °C

Mehrfachpipette

Eppendorf, Multipette® 4780

Pipettenspitzen *Plastibrand*®, 2,5 ml, 5,0 ml

Vortex® Mischer

Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, VF2

Ultraschallbad

Bandelin GmbH, Sonorex® Super RK102 H

Festphasenextraktionssystem

J.T.Baker, Baker® spe-12G

Vakuumpumpe siehe Rotationsverdampfer

Verdampfungssystem

Caliper LifeScience, TurboVap® LV

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) System mit UV-Detektion

„*Agilent* 1100 Serie“

Dioden-Array & Multiwellen-Detektor (DAD), G1315B

Binärpumpe, G1312A

Autosampler, G1313A

Säulenofen, G1316A

Degasser[®], *ERC-INC*, ERC-3415

Trennsäulen

Merck KGaA, Lichrospher[®] 100 RP-18, 4 x 125 mm, 5 µm

Agilent, Zorbax[®], Eclipse XDB-C8, 4,6 x 150 mm, 5 µm

Vorsäule, *Phenomenex*, C12, 4 mm

Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography (UHPLC) System mit MS/MS-Detektion

UHPLC-System, *Dionex*, Ultimate 3000

Trennsäule

Phenomenex, Kinetex[®] C-18, 3 x 100 mm, core-shell 2,6 µm

MS-Detektionssystem, *Ab sciex*, Qtrap[®] 5500

Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss

VWR, 50 ml, Ultra High Performance, PP

Rundkolben mit Schliff

Duran, 100 ml, NS 29

Flasche mit Deckel

Duran, 100 ml

Bechergläser

VWR, Borosilicat Glas, 20 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml

Reagenzglas mit Schraubverschluss

Pyrex[®], 10 ml

Vollpipetten

Hirschmann, EM, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml

Pipetten

Discovery, Comfort[®], 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl

Pipettenspitzen, *Eppendorf*, epT.I.P.S[®] Standard

Festphasenextraktionssäule

Macherey-Nagel, Chromabond[®], C18, 6 ml/500 mg

Spritze mit Kanüle

Terumo Syringe, 5 ml

Terumo Neolus

Spritzenfilter

Macherey-Nagel, Chromafil, PTFE, Poren Ø 0,45 µm, Filter Ø 15 mm

Vial mit Inlet

Agilent, braun, 2 ml

Bürtelkappe, *Agilent*, 11 mm SLVR AL, CLR FEP TF2 SPTA

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Infektionsversuche

4.1.1 Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

Nach der Inokulation der Pflanzen mit *S. sclerotiorum* wurde fast täglich bis zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme am 07.12.2011 auf sichtbare Symptome einer erfolgten Infektion geprüft. Weder zum Zeitpunkt der ersten Probenahme am 25.11.2011, noch zum Zeitpunkt der Zweiten zeigten die oberirdischen Pflanzenteile der infizierten Versuchsvarianten Zeichen einer erfolgten Infektion. Bei den Versuchsgliedern Kontrolle, Behandlung und Infektion mit Behandlung konnten ebenfalls keine sichtbaren Krankheitssymptome festgestellt werden. Sollte es, im Falle der infizierten Pflanzen, zu einer erfolgreichen Infektion gekommen sein, so verlief diese asymptomatisch bzw. latent, da es nicht zur Ausprägung von Krankheitssymptomen oder zur verstärkten Bildung von Pilzmyzel und Sporenlagern kam. Das Vorliegen einer latenten Infektion kann an dieser Stelle jedoch noch nicht beurteilt werden. Hierfür und zur Beurteilung des Einflusses der Pflanzenschutzmittelanwendung auf den Gehalt linearer FC im Knollensellerie ist die Auswertung der Messwerte erforderlich.

4.1.2 Versuchsreihe *R. solani*

Sechs Tage nach Inokulation des Pathogens *R. solani* über das Nährmedium ist ein deutliches Myzelwachstum an den Haferflocken zu erkennen. Dieses ist im jungen Stadium weiß und färbt sich im Anschluss charakteristisch rotbraun (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: rotbraunes Myzel des Pilzes *R. solani*.

Um ein Vordringen des Pilzes in das Nährmedium zu gewährleisten ist die Behandlung mit Rovral® vier Tage später durchgeführt wurden. Die Pflanzen wurden vom Zeitpunkt der Inokulation an jeden zweiten Tag begutachtet. Die Achssprosse der Pflanzen der Kontrollvarianten beider Sorten wirkten zum Zeitpunkt der ersten Probenahme sehr labil. Zwischen den anderen Versuchsvarianten konnten keine Unterschiede am Zustand der oberen Pflanzenorgane festgestellt werden (siehe Abbildung 7 A). Inwieweit die Infektion in die Wurzeln und die Knolle vorgedrungen war, konnte erst nach dem Freilegen dieser zu den jeweiligen Probenahmen festgestellt werden.

Bei der ersten Probenahme konnten die in Abbildung 7 B, C und D dargestellten Infektionsherde ausschließlich in der infizierten und unbehandelten Variante beobachtet werden. Ein Vordringen des Pilzes in die Wurzeln hat somit bei jeder der 10 Stichproben stattgefunden. Sichtbare Infektionssymptome direkt an der Knolle waren nur zu 40 % vorhanden. Die Pflanzen der anderen Versuchsvarianten wiesen ein gesundes und weißes Wurzelsystem auf. Auch zeigten die Knollen keine Symptome einer Infektion (siehe Abbildung 8).

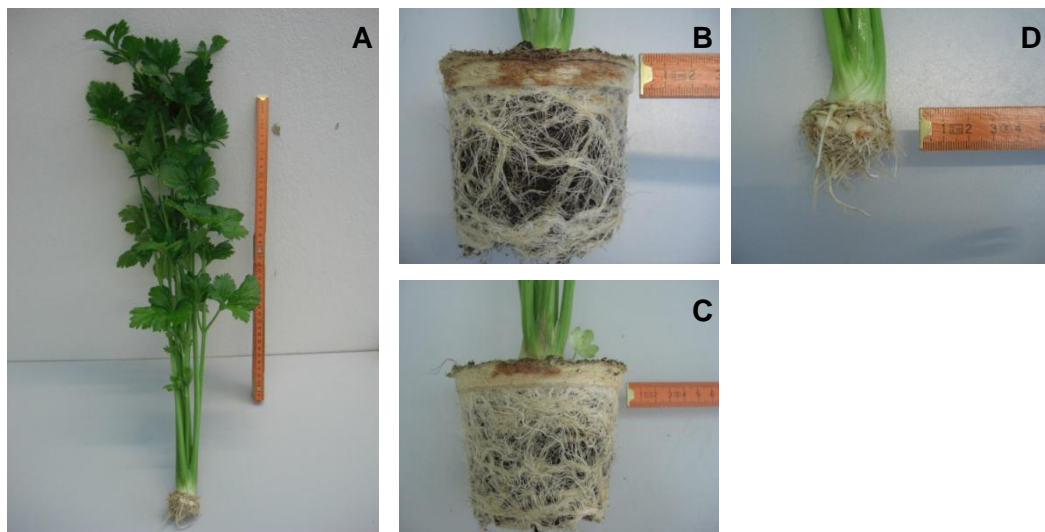


Abbildung 7: Beobachtungen an einer mit *R. solani* infizierten Pflanze.

A Oberirdische Pflanzenteile + Knolle, **B** und **C** Infektionsherde an äußerer Wurzelschicht, **D** Knolle mit Infektionsherd.

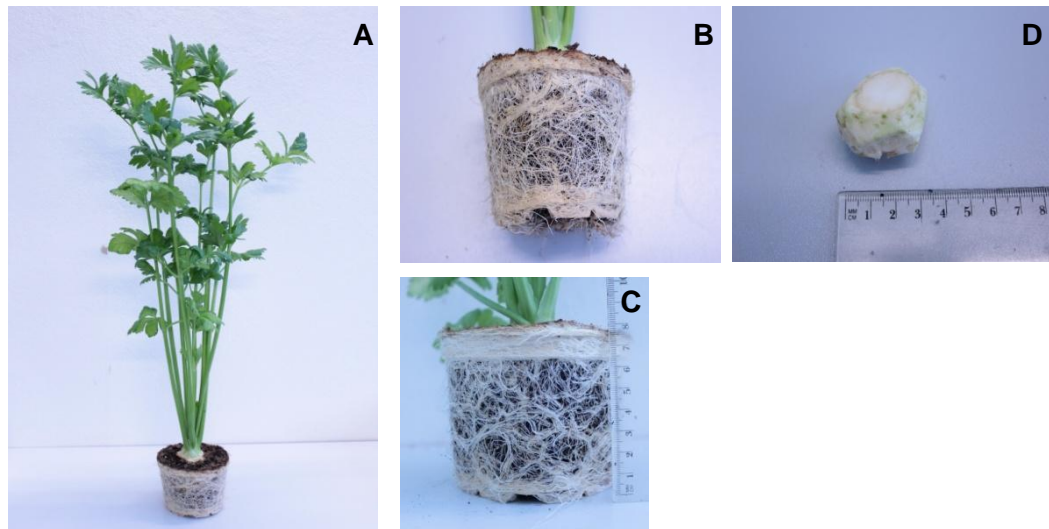


Abbildung 8: Beobachtungen an einer Kontrollpflanze.

A Gesamter Habitus, **B** und **C** Äußerer Wurzelschicht, **D** Knolle.

Zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme schienen die Kontrollpflanzen vitaler. Es konnte eine Vergrößerung der Infektionsherde bei Pflanzen der infizierten Versuchsvariante festgestellt werden. Zudem wiesen acht von zehn Pflanzen Infektionssymptome an den Knollen auf. Alle Pflanzen der Kontroll- und Behandlungsvarianten waren ohne sichtbare Krankheitssymptome.

4.2 Furocumarinanalytik

4.2.1 Entwicklung einer HPLC Messmethode

Vor Erarbeitung und Optimierung der Probenaufbereitung war es notwendig, eine robuste Methode zur Quali- und Quantifizierung der linearen FC **1**, **2** und **3** zu etablieren. Eine HPLC-Methode, bei der eine einfache Trennung und Identifizierung der FC Angelicin, **1**, **2**, **3**, Trioxsalen und Isopimpinellin über eine C18-silica Umkehrphase (Reversed Phase, RP) bei 40°C mit einem MeOH/H₂O-Gradienten bei 1 ml/min und einer UV-Detektion bei 248 nm erreicht werden kann, wurde durch die Arbeitsgruppe um Peroutka beschrieben (15). Es wurde ebenfalls auf problematische Matrixeinflüsse bei der Vermessung von Knollenproben hingewiesen, die durch Verwendung eines Massenselektiven (MS) Detektors verringert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit soll primär eine robuste HPLC-Methode mit UV-Detektion erarbeitet werden, in dessen Anschluss eine Stichprobenartige Verifizierung der Ergebnisse über eine MS/MS Detektion erfolgen soll.

Zur Bestimmung der Retentionsfolge und der Absorptionsspektren, wurden 30 μl Einzelsubstanzstandard vermessen. Dazu wurde eine Lichrospher® 100, RP 18 (5 μm) Trennsäule der Firma Merck, temperiert auf 40°C, verwendet. Die eingesetzten Laufmittel und deren zeitliche Zusammensetzung sind in Tabelle 9 dargestellt. Der isokratische MeOH-Gehalt soll intensive Wechselwirkungen zwischen Analytmolekülen und der stationären Phase gewährleisten, die für eine gute Auftrennung Voraussetzung sind. Der anschließende lineare Anstieg des MeOH-Gehaltes auf 100 % und das folgende Plateau dienen der Elution von Analytmolekülen und Matrixverunreinigungen. Zur Konditionierung und Vorbereitung für die nächste Messung wird die Trennsäule equilibriert.

Tabelle 9: Laufmittelgradient.

Zeit [Minuten]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0 - 8	75	25
8 - 18	75 - 0	25 - 100
18 - 25	0	100
25 - 27	0 - 75	100 - 25
27 - 30	75	25

Laufmittel A: 5 % MeOH in Reinstwasser

Laufmittel B: 100 % MeOH

Für die Analyten Psoralen, Xanthotoxin und Bergapten wurden Spektren bei 248 nm aufgenommen (siehe Abbildung 9), die Basis für die weitere analytische Bearbeitung war.

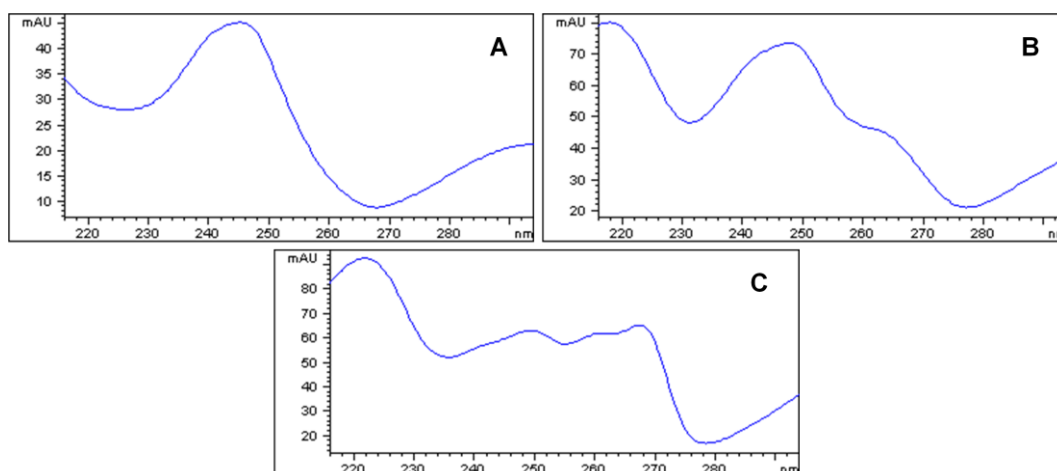


Abbildung 9: UV-Absorptionsspektrum von: **A** Psoralen, **B** Xanthotoxin und **C** Bergapten.

Die Vermessung eines 10 µg/ml Sammelstandards, der durch 1:5 Verdünnung des 50 µg/ml Sammelstandards mit einem MeOH/H₂O (30:70; v:v)-Gemisches hergestellt wurde, unter genannten Bedingungen, zeigte keine Trennung von **1** und **2** (vgl. Abbildung 10), sondern ausschließlich ein Signal (Peak) bei 14.2 Minuten mit einem UV-Absorptionsspektrum, das als Mischspektrum interpretiert werden kann, da die UV-Absorptionsspektren der Reinsubstanzen **1** und **2** zu ungefähr gleichen Teilen enthalten sind (siehe Abbildung 11 A, B). Das zweite Signal bei 15.3 Minuten konnte, nach Vergleich der UV-Absorptionsspektren, eindeutig als **3** identifiziert werden (vgl. Abbildung 11 C).

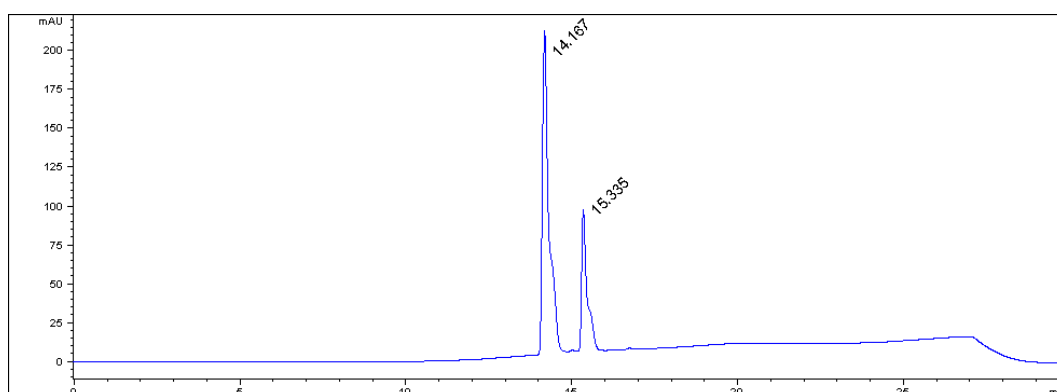


Abbildung 10: Chromatogramm des 10 µg/ml Sammelstandards.

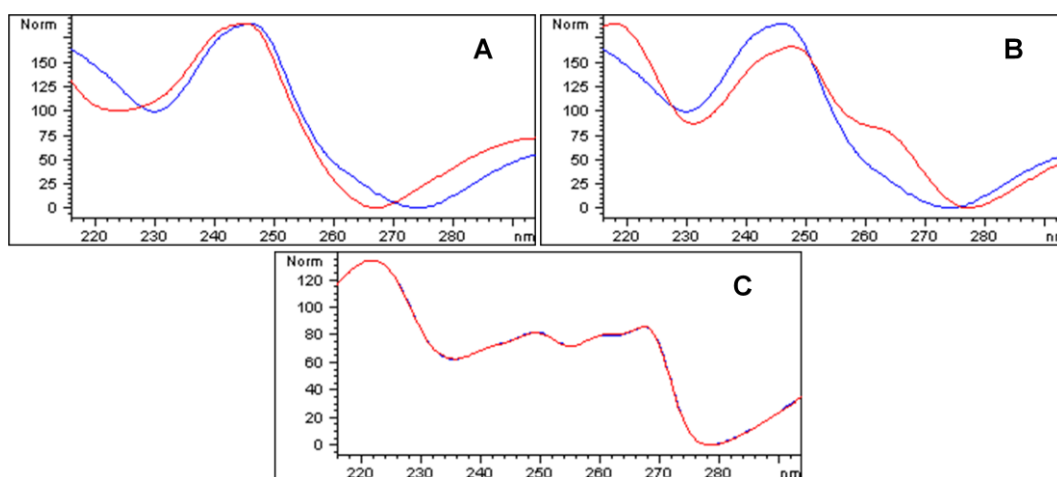


Abbildung 11: Abgleich der UV-Absorptionsspektren (- Standard, - Signal) im Peakmaximum.

A Psoralen und Signal bei 14.167 Minuten, **B** Xanthotoxin und Signal bei 14.167 Minuten und **C** Bergapten und Signal bei 15.335.

Die Veränderung der Anfangslaufmittelzusammensetzung auf MeOH/H₂O (23:77; v:v), wodurch längere unpolare Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer C18 Phase gewährleistet werden, brachte nicht den gewünschten

Effekt der Trennung der Signale von **1** und **2**. Die Änderung der stationären Phase auf eine Zorbax® Eclipse XDB-C8 (5 µm) Trennsäule, bei gleichzeitiger Verwendung des in Tabelle 10 dargestellten MeOH/H₂O Laufmittelgradienten, zeigte eine für die Quali- und Quantifizierung ausreichende Trennung der Substanzen **1** und **2** (siehe Abbildung 12).

Tabelle 10: Laufmittelgradient.

Zeit [Minuten]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0 - 5	70	30
5 - 10	70 - 50	30 - 50
10 - 15	50 - 20	50 - 80
15 - 17	20 - 0	80 - 100
17 - 20	0	100
20 - 23	0 - 70	100 - 30
23 - 25	70	30

Laufmittel A: 5 % MeOH in Reinstwasser

Laufmittel B: 100 % MeOH

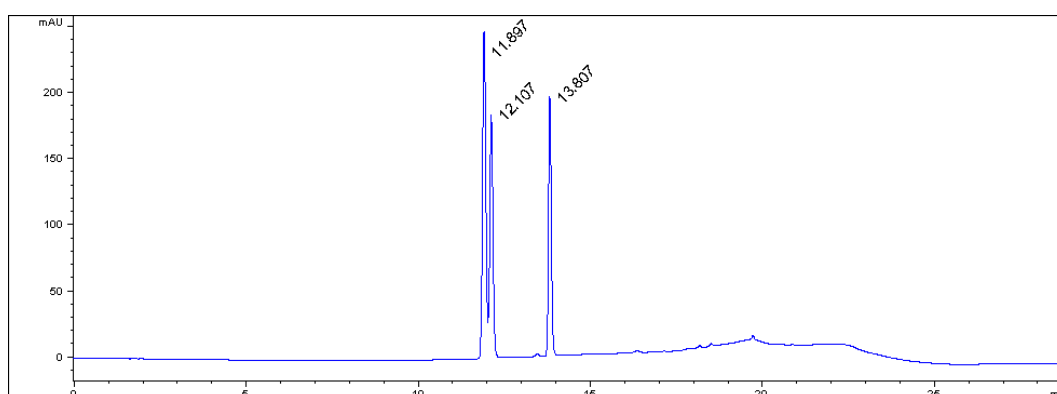


Abbildung 12: Chromatogramm des 10 µg/ml Sammelstandards mit neuem Laufmittelgradient und C8 Trennsäule.

Aufgrund der C8 Trennsäule mit polarerem Charakter und dem schnelleren Anstieg des MeOH-Gehaltes im Laufmittel retinieren die Substanzen früher. Die erhaltenen Peaks sind dennoch symmetrisch und haben eine Basisbreite von maximal 0,2 Minuten. Durch Vergleich der UV-Absorptionsspektren von Signal und Standard konnte **1** dem Signal bei 11,8, **2** dem Signal bei 12,1 und **3** dem Signal bei 13,8 zugeordnet werden (siehe Abbildung 13).

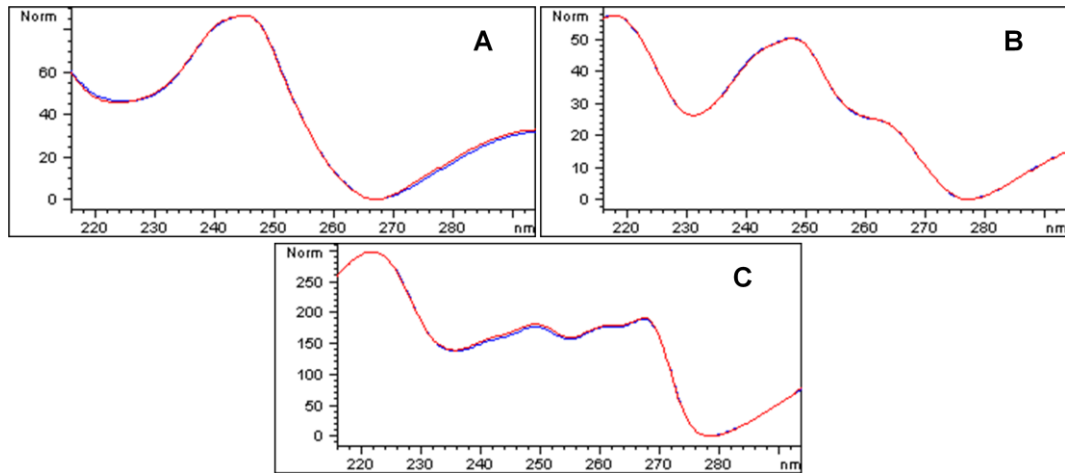


Abbildung 13: Abgleich der UV-Absorptionsspektren (- Standard, - Signal) im Peakmaximum.

A Psoralen und Signal bei 11.897 Minuten, **B** Xanthotoxin und Signal bei 12.107 Minuten und **C** Bergapten und Signal bei 13.807.

Ein letzter Optimierungsschritt bestand in der Anpassung des Laufmittelgradienten, sodass **1** und **2** eine Basislinientrennung aufweisen. Die Verringerung des Anstieges des MeOH-Gehaltes (siehe 3.3) brachte nicht den gewünschten Trennungseffekt. Dennoch wurde dieser Gradient beibehalten, da sich nach Aufarbeitung von Blattmaterial zeigte, dass eine erhöhte Reinheit des Signals von **3** erreicht werden konnte.

Die Identifizierung der Analyten **1**, **2** und **3** erfolgt über die Retentionszeit und das UV-Absorptionsspektrum. Zur Quantifizierung kann entweder die Peakfläche oder die Peakhöhe herangezogen werden. Dazu wurde eine externe sechspunkt Sammelstandardkalibrierung in zweifacher Wiederholung im Bereich von 0,1 µg/ml bis 50 µg/ml durchgeführt. Aus den erhaltenen Mittelwerten der Messwerte für Peakfläche und Peakhöhe wurden jeweils zwei Kalibriergleichungen für jeden Standard durch lineare Regression erhalten (vgl. Anhang Tabelle A2 - A4, Abbildung A2 - A7). In allen Fällen konnten die Datenpunkte als Teil einer linearen Funktion angenommen werden, da das Bestimmtheitsmaß R^2 stets nahe eins lag. Der Vergleich berechneter Wiederfindungen, ermittelt durch parallele Aufarbeitung und Vermessung dotierter (30 µg/ml) und undotierter Extraktaliquote (jeweils 30 ml von 80 ml Extraktionslösung) von Knollen- und Blattmaterial, nach Peakfläche oder -höhe ergab, dass sich die Quantifizierung über die Peakfläche besser eignet, da höhere Wiederfindungen erzielt werden können (siehe Abbildung 14).

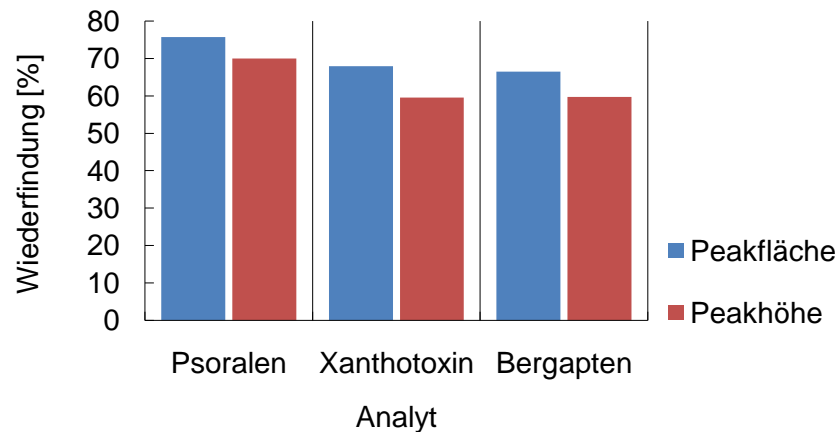


Abbildung 14: Vergleich der Wiederfindung der Furocoumarine in Blatt und Knolle, berechnet aus der Peakfläche oder -höhe.

4.2.2 Probenvorbereitung

Die Zerkleinerung und Homogenisierung des in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorliegenden Probenmaterials mit der Extraktionslösung ließ sich mit einem Ultra-Turrax[®] gut durchführen, da sich weder faseriges Blattmaterial, noch Knollenmaterial um die Drehachse des Schneidaufsatzes wickelte. Es wurden bereits zahlreiche Extraktionsverfahren, unter Verwendung von Lösungsmitteln divergierender Polarität, beschrieben. Diese reichen von einfachem „vortexen“ mit Toluol, über mehrstündige Soxhlet-Extraktion mit Ethanol, bis hin zu Apparaturen zur Extraktion mit superkritischem Kohlendioxid (5, 14, 36). Im gegebenen Rahmen galt es abzuschätzen, welches Extraktionsverfahren schnell und zugleich annähernd erschöpfend ist, da ein hoher Probendurchsatz erreicht werden soll. Am sinnvollsten erschien das Verfahren des Überkopfschüttelns in einfacher Wiederholung mit jeweils 40 ml Lösungsmittel, da dieses Verfahren leicht reproduzierbar ist und direkt mit den Zentrifugengefäßen durchgeführt werden kann.

Die Arbeitsgruppe um Peroutka verglich die Effizienz der Lösungsmittel Wasser, Ethylacetat und Dichlormethan nach zweimaliger Extraktion von 10 g homogenisiertem Probenmaterial mit jeweils 40 ml Lösungsmittel (15). Dabei wurden die höchsten Mengen der drei linearen FC 1, 2 und 3 mit Ethylacetat extrahiert. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Diethylether als Extraktionslösung, da es ebenfalls ein gutes Extraktionsvermögen aufweist (13). Aus den genannten Publikationen geht jedoch nicht hervor, welches Probenmaterial aufgearbeitet wurde. Es wurden Praxisproben mit real gebildeten Furocoumarinen von Blatt Knollen zweifach mit jeweils 40 ml Ethylacetat oder

Diethylether extrahiert und wie in 3.2 und 3.3 beschrieben aufgearbeitet und vermessen. Es stellte sich heraus, dass die Extraktion mit Ethylacetat für Knollenmaterial geeignet ist. Für die Extraktion von Blattproben ist, bei Vermessung mit der etablierten HPLC Methode, Ethylacetat nicht als Extraktionsmittel geeignet. Dessen liegt ein unreines UV-Absorptionsspektrum im Peakmaximum des Bergaptenesignals (siehe Abbildung 15) zugrunde.

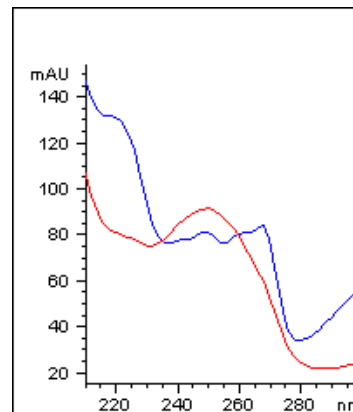


Abbildung 15: UV-Absorptionsspektrum (- Bergapten, - unbekannte Verbindung) im Peakmaximum des Bergaptenesignals.

Der in Abbildung 16 dargestellte graphische Vergleich der Extraktionseffizienz von Ethylacetat und Diethylether bei Knollenmaterial zeigt, dass Ethylacetat ein höheres Extraktionsvermögen aufweist.

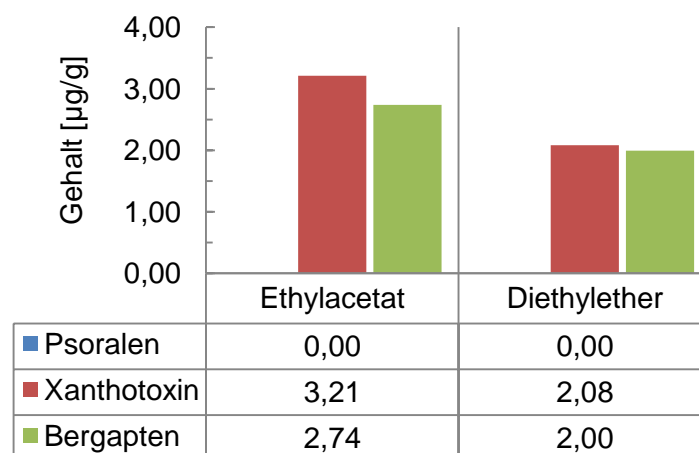


Abbildung 16: Gegenüberstellung der Extraktion der FC mit Ethylacetat und Diethylether bei Knollenmaterial.

Schlussfolgernd sind Blattproben zur Versuchsreihe *S. sclerotiorum* mit Diethylether und Knollenproben zur Versuchsreihe *R. solani* mit Ethylacetat in

einfacher Wiederholung zu jeweils 40 ml mit einem Überkopfschüttler extrahiert worden.

Von 80 ml Extraktionslösung wurden 50 ml am Rotationsverdampfer vollständig eingengt, in 2 ml MeOH gelöst und anschließend mit 4 ml Reinstwasser verdünnt. Es konnte stets eine Trübung der Lösung beobachtet werden. Demzufolge wurden stark hydrophobe Verbindungen ausgefällt. Anhand von Vorversuchen zur Löslichkeit linearer FC kann davon ausgegangen werden, dass diese in Lösung bleiben. Zur Aufreinigung eignet sich, aufgrund der unpolaren Eigenschaften der linearen FC, eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) mit einer octadecylmodifizierten (C-18) Kieselgelsäule. Die zwischen Analyt und C-18 Seitenkette stattfindenden unpolaren Wechselwirkungen erlauben eine Abtrennung von Matrixbestandteilen mit polarerem Charakter durch die Auswahl einer geeigneten Waschlösung. Dazu wurde ein MeOH/H₂O (20:80; v:v)-Gemisch verwendet, bei dessen Polarität Matrix teilweise eluiert, Analyt jedoch nicht. Dies konnte durch Vermessung der Fraktion nach Probenaufgabe und Waschschrift bestätigt werden (vgl. Abbildung 17). Zur Elution der linearen FC ist der Methanolgehalt der Lösung zunächst auf 70 % eingestellt worden. Bei einer anschließenden Nachelution mit 90 %iger Methanollösung konnten sehr geringe Mengen linearer FC nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Um einen vollständigen Übergang der Analyten in die mobile Phase zu garantieren wurde der Methanolgehalt der Elutionslösung von 70 % auf 80 % erhöht.

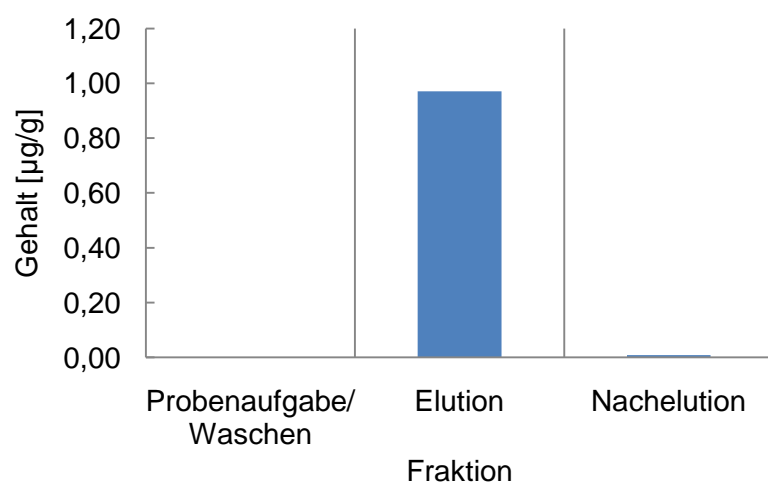


Abbildung 17: Gesamtfurocumarinergehalt in den SPE-Fractionen Probenaufgabe/Waschen, Elution (MeOH/H₂O, 70:30; v:v) und Nachelution (MeOH/H₂O, 90:10; v:v).

Im Anschluss sollten die erhaltenen sechs Milliliter aufgereinigter Probenlösung auf einen Milliliter eingengt werden, um eine möglichst hohe Konzentration der Analyten zu erhalten. Hierzu galt es zu entscheiden, wie das Lösungsmittel schnell und schonend abgedampft werden kann und welche MeOH-Konzentration nötig ist, um die linearen FC wieder vollständig zu lösen. Zum einengen kam entweder der Rotationsverdampfer oder der Turbo Evaporizer (Turbovap[®]) in Frage. Die Arbeitsweise des Turbovap[®] besteht in der Erzeugung eines helikalen Gasstroms (Stickstoff, N₂), wodurch das Prinzip des Kamineffektes ausgenutzt wird, um ein schnelles Verdampfen bei geringen Temperaturen zu ermöglichen. Aufgrund ähnlicher Wiederfindungen beider Verfahren im Bereich von 60 - 70 % und aufgrund des schonenderen und schnelleren Einengens des SPE-Eluates ist der Turbovap[®] verwendet worden.

Als entscheidender Punkt zur Erhöhung der Wiederfindung hat sich die Aufnahme des Rückstandes, erhalten nach dem Einengen mittels Turbovap[®], herausgestellt. Bei Aufnahme in zunächst 150 µl MeOH und anschließender Verdünnung mit Reinstwasser auf 500 µl konnte bei jeder Probe die Bildung eines Niederschlages beobachtet werden. Zum Schutz der HPLC Trennsäule wurde jede Probenlösung über einen 45 µm PTFE Spritzenfilter gereinigt. Die ermittelten Wiederfindungen nach Standardaddition (30 µg/ml Probenlösung zur Vermessung) schwankten stark zwischen 40 - 77 %. Eine mögliche Ursache kann in der Koagulation von unbekanntem Matrixbestandteilen liegen, wodurch es zu Inklusionseffekten kommen kann, die einen Verlust von Analyt nach sich ziehen. Weiterhin sind auch Oberflächenwechselwirkungen zwischen Niederschlag und Analyt denkbar. Durch eine Erhöhung des MeOH-Gehaltes auf 80 %, bei Beibehaltung des Gesamtvolumens von 500 µl, konnte zwar die Bildung eines Niederschlages verhindert werden, jedoch waren die Peaks im Chromatogramm unsymmetrisch (front tailing). Symmetrische Peakformen und eine bessere chromatographische Auftrennung der Komponenten **1** und **2**, sowie eine klare Lösung konnten durch die Aufnahme des Rückstandes in 250 µl MeOH und anschließender Verdünnung mit 250 µl Reinstwasser erreicht werden (siehe Abbildung 18).

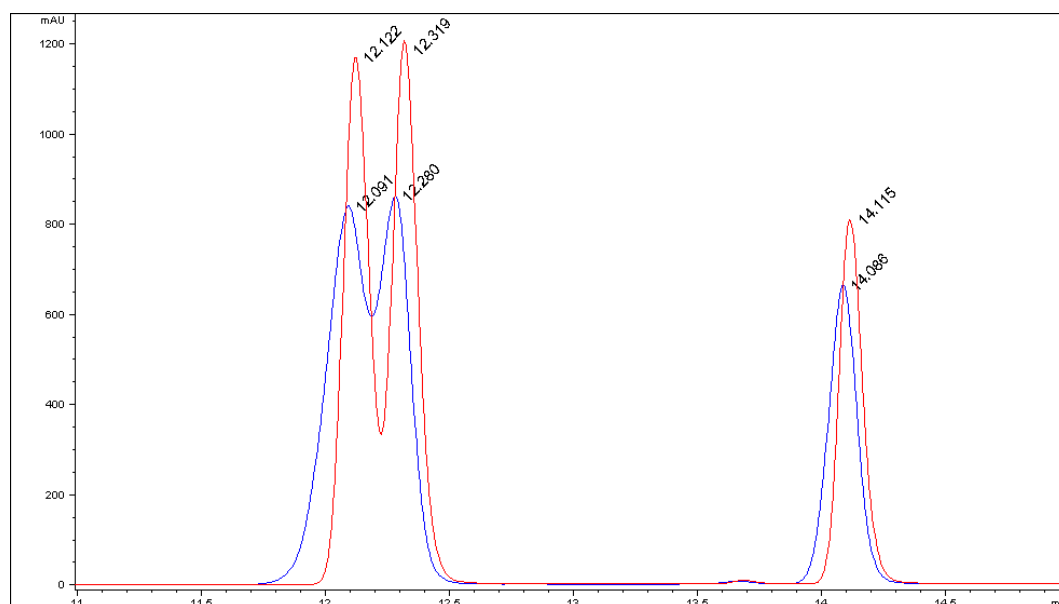


Abbildung 18: Peakformen nach Einstellung des MeOH-Gehaltes auf - 80 % und auf - 50 % in der Injektionslösung.

Ein Vorversuch zur Lichtstabilität der linearen FC **1**, **2** und **3** ergab, dass diese bei den gegebenen Laborbeleuchtungsbedingungen stabil sind (vgl. Tabelle 11). Es wurde 5 µg/ml Sammelstandard in doppelter Wiederholung, erhalten durch 1:10 Verdünnung des 50 µg/ml Sammelstandards, bei der gegebenen Laborbeleuchtung 0, 30 und 60 Minuten beleuchtet und anschließend vermessen. Da die Wiederfindungen um 100 % streuen, findet während der Aufarbeitung kein photodynamischer Abbau statt.

Tabelle 11: Wiederfindungen zur Lichtstabilität.

Beleuchtung [Minuten]	Wiederfindung [%]		
	Psoralen	Xanthotoxin	Bergapten
0	102	100	102
30	103	100	102
60	101	100	101

Werte für Wiederfindung sind Mittelwerte (N = 3)

4.2.3 Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

Die im Anhang tabellierten Messergebnisse zur Versuchsreihe der *S. sclerotiorum* Infektion werden systematisch nach Pflanzensorte und Variante ausgewertet und unter Zuhilfenahme des statistischen T-Tests auf signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau 5 %) miteinander verglichen. Im Vorfeld wurden die Messdaten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Demnach liegen die Messdaten normalverteilt vor. Die im Anschluss festgestellten Ausreißer, identifiziert mittels des Ausreißertests nach Nalimov, sind nicht für die weiteren Berechnungen berücksichtigt worden.

Mit Hilfe der optimierten Aufarbeitungs- und HPLC Messmethode ist eine Identifizierung und Quantifizierung der linearen FC im Chromatogramm möglich. In diesem Zusammenhang sind in den Abbildungen 19 und 20 die Chromatogramme einer undotierten und einer dotierten aufgearbeiteten Blattprobe aus der Versuchsreihe S.s. infiziert dargestellt.

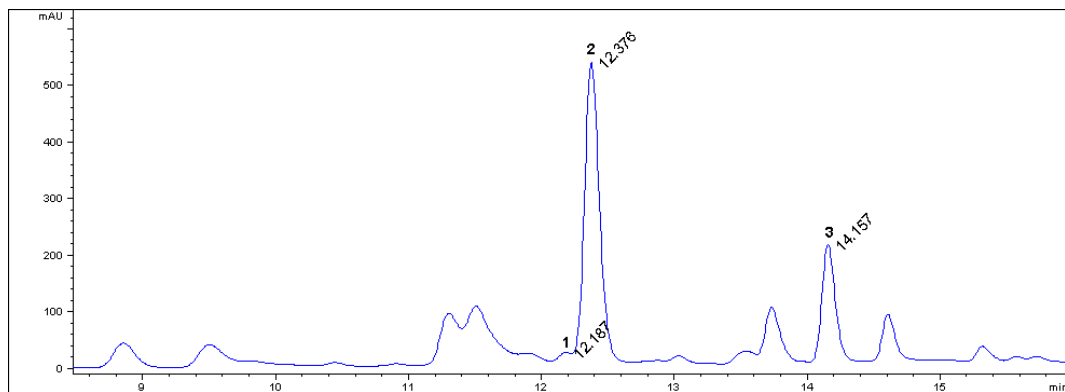


Abbildung 19: Ausschnitt eines Chromatogramms einer aufgearbeiteten und undotierten Blattprobe.

Es sind die Analyten Psoralen **1**, Xanthotoxin **2** und Bergapten **3** enthalten.

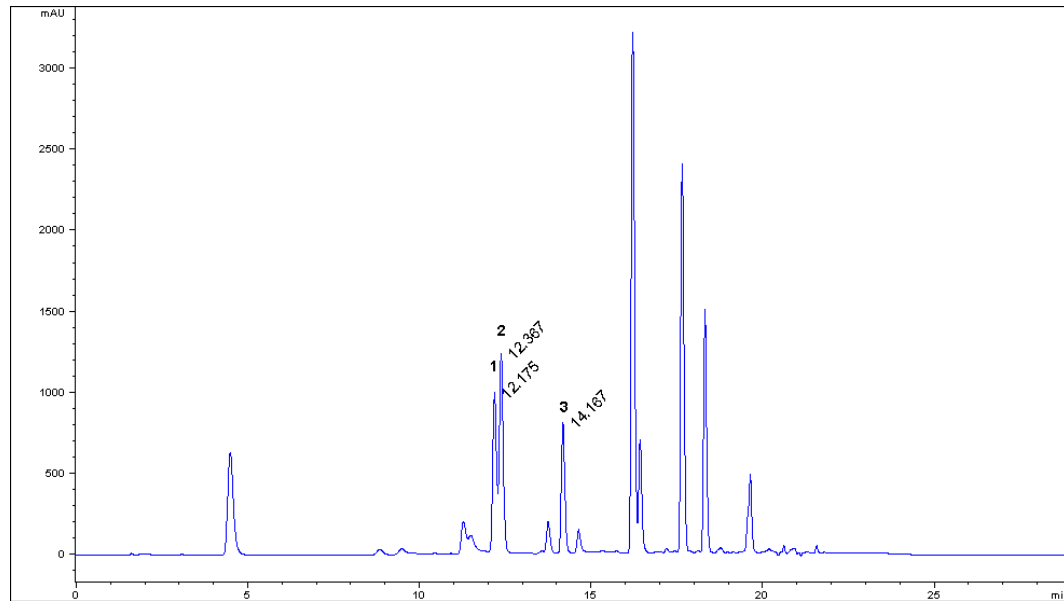


Abbildung 20: Das Chromatogramm einer aufgearbeiteten und mit Standard dotierten Blattprobe.

Es können Psoralen **1**, Xanthotoxin **2** und Bergapten **3** eindeutig identifiziert und quantifiziert werden.

Während jedes Analyseansatzes wurde eine dotierte Probe parallel aufgearbeitet und vermessen. Anhand der daraus ermittelten Wiederfindungen werden mögliche Verluste durch systematische Fehler erfasst. Auf Grundlage des von Chaudhary beschriebenen erhöhten Gehalte (Xanthotoxin 21,35 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht), die augenscheinlich aufgrund von Infektion und Lagerung gebildet werden können, wurde vor Beginn der Aufarbeitung auf eine Sollkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Analyt und im weiteren Verlauf auf eine Sollkonzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ Analyt vor Beginn dotiert (6). Der ermittelte Furocumarinrundgehalt, der im gleichen Analyseansatz aufgearbeiteten Probe derselben Variante, wurde vom Messwert der dotierten Probe abgezogen. Die durchschnittlich erreichten Wiederfindungen liegen für Psoralen bei $(95 \pm 4) \%$, für Xanthotoxin bei $(99 \pm 14) \%$ und für Bergapten bei $(95 \pm 7) \%$ (Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung; N = 19).

Pflanzensorte `Monarch`

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Stichproben von Blättern der Pflanzensorte `Monarch` dargestellt.

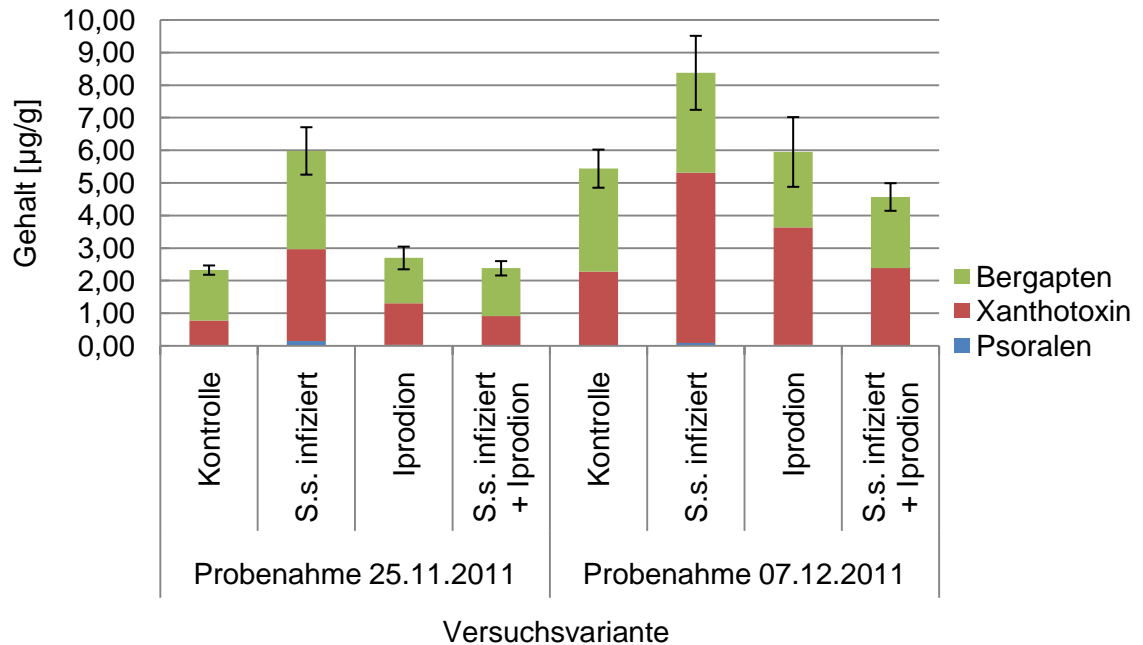


Abbildung 21: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Blätter der Pflanzensorte `Monarch` in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).

Grundlegend ist ein Anstieg des Analytgehaltes, der sich fast ausschließlich zu annähernd gleichen Teilen aus **2** und **3** zusammensetzt, im Verlaufe der Versuchsdurchführung in allen Varianten sichtbar. Dies bestätigt den beschriebenen Einfluss von Umweltfaktoren auf die Bildung linearer FC, insbesondere bei den Kontrollpflanzen (4).

Zum Zeitpunkt der ersten Probenahme ist der Gesamtfurocumaringehalt der Variante S.s. infiziert signifikant größer als die Gesamtgehalte der anderen Versuchsglieder, die untereinander wiederum keine signifikanten Unterschiede zeigen. Demzufolge hat eine latente Infektion der Wirtspflanze mit dem Pilz *S. sclerotiorum* stattgefunden, die zu einer erhöhten Bildung der drei linearen FC geführt hat.

Die Auswertung der Messergebnisse für die Stichproben der zweiten Probenahme ergab, dass ein signifikanter Unterschied nur noch zwischen den Versuchsgliedern S.s. infiziert und S.s. infiziert + Iprodion festzustellen ist.

Bei Erhöhung des Signifikanzniveaus auf 10 % sind die Analytgehalte der Kontrollreihe ebenfalls signifikant kleiner als die der infizierten Variante. Dies trifft

jedoch nicht für den Vergleich der Varianten S.s. infiziert und Iprodion zu. In diesem Fall liegt das Signifikanzniveau mit 12 % knapp über dem gesetzten Grenzwert. Mögliche Ursachen für die geringeren Unterschiede zwischen den Varianten können zum einen in der erfolgreichen fungistatischen Wirkung der linearen FC und der damit verbundenen verringerten Biosynthese dieser bei den infizierten Pflanzen ohne Behandlung liegen oder aber in der höheren Biosyntheserate in den anderen Versuchsgliedern, verursacht durch Stress, liegen. Dieser Effekt sollte jedoch durch den Versuchsaufbau in den Klimakammern keine Rolle spielen. Eine genaue Abgrenzung wird nicht getroffen. Es ist eher von einem Multikomponenteneinfluss auszugehen, da die Regulierung des Primär- und Sekundärstoffwechsels der Pflanze durch komplexe Wechselwirkungen mit Umweltfaktoren beeinflusst wird.

Dennoch ist ein Trend erkennbar, der dem der ersten Probenahme entspricht.

Für die Pflanzensorte `Monarch´ in der Versuchsreihe *S. sclerotiorum* kann sowohl die Aussage der anfangs postulierten ersten, als auch der zweiten Hypothese folglich als zutreffend beurteilt werden.

Interessanterweise scheint der Wirkstoff Iprodion einen schnellen Abfall der FC-Konzentrationen zu bewirken, da die Analytkonzentration in der Variante S.s. infiziert + Iprodion mit 2 µg/g Blatt bereits bei der ersten Beprobung niedrig ist und keinen signifikanten Unterschied zu den Versuchsvarianten Kontrolle und Iprodion aufweist.

Die höchsten Einzelgehalte, die bei der Sorte `Monarch´ in dieser Versuchsreihe nachgewiesen werden konnten, lagen für Psoralen bei 0,19 µg/g Blatt, für Xanthotoxin bei 9,91 µg/g Blatt und für Bergapten bei 4,37 µg/g Blatt und wurde stets in der infizierten Versuchsreihe gemessen.

Im Gegensatz dazu waren die Proben mit den geringsten Einzelgehalten für Xanthotoxin (0,49 mg/g Blatt) und für Bergapten (1,04 µg/g Blatt) in der Variante Kontrolle oder S.s. infiziert + Iprodion anzutreffen, was wiederum ein Zeichen für die erfolgreiche Bekämpfung des Befalles darstellt.

Pflanzensorte `Prinz`

Der Vergleich der Versuchsvarianten der Pflanzensorte `Prinz` bezüglich der FC-Gehalte zu zwei Probenahmezeitpunkten ist in Abbildung 22 dargestellt.

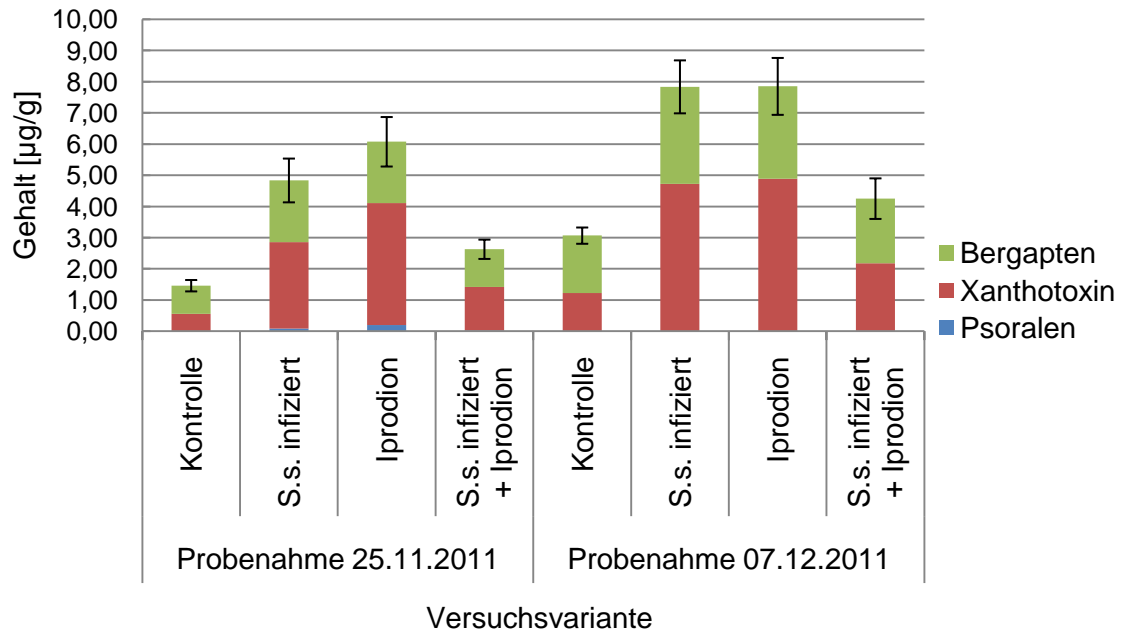


Abbildung 22: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichungen untersuchter Blätter der Pflanzensorte `Prinz` in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).

Ein Anstieg des Gesamtgehaltes linearer FC über den Zeitraum der Versuchsdurchführung ist bei der Pflanzensorte `Prinz` ebenfalls in allen Varianten erkennbar.

Gemäß der postulierten ersten Hypothese soll eine Infektion einen erhöhten FC verursachen. Erwartungsgemäß sollten die Gehalte infizierter Pflanzenblätter signifikant höher sein, als die in den Kontrollpflanzen. Dies trifft sowohl für die erste Probenahme, vier Tage nach Infektion, als auch für die zweite Probenahme, 16 Tage nach Infektion, zu.

Durch die Spritzapplikation des Pflanzenschutzmittels Rovral® über den gesamten Versuchsverlauf näherten sich die Summenfurocumaringehalte zwischen Kontrolle und S.s infiziert + Iprodion an. Verdeutlicht wird dies anhand der Werte für die Versuchsvariante S.s. infiziert + Iprodion, die in beiden Probenahmegliedern signifikant kleiner sind als die des infizierten und unbehandelten Versuchsgliedes und bereits zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme nicht mehr von denen der Kontrollpflanzen signifikant unterschieden werden können. Tendenziell kann somit von einer Angleichung

der Gehalte der beiden Varianten im weiteren Verlauf ausgegangen werden. Damit ist die Aussage der zweiten Hypothese, gemäß der eine Anwendung einer Pflanzenschutzmaßnahme den Furocumaringehalt senkt, auch bei dieser Pflanzensorte bestätigt.

Unerwartet, dennoch interessant sind die sich nicht signifikant unterscheidenden Gesamtfurocumaringehalte der Versuchsglieder S.s. infiziert und Iprodion. Eine logische Erklärung für dieses Phänomen kann an dieser Stelle nicht getroffen werden. Von einem stimulierenden Effekt des Pflanzenschutzmittels Rovral® auf die Phytoalexinbildung ist nicht auszugehen, da weder die Pflanzensorte 'Monarch', noch Stichproben der Pflanzen Infektion mit Behandlung der Sorte 'Prinz' diese Reaktion gezeigt haben. Einzig und allein eine latent verlaufene Fremdinfection der Pflanzen könnte als Grund diskutiert werden, da bei den Probenahmen keine Symptome eines Befalls sichtbar waren.

Die höchsten Einzelgehalte, die bei der Sorte 'Prinz' in dieser Versuchsreihe nachgewiesen werden konnten, lagen für Psoralen bei 0,71 µg/g Blatt, für Xanthotoxin bei 7,93 µg/g Blatt und für Bergapten bei 4,21 µg/g Blatt und wurde sowohl in der infizierten, als auch in der mit Rovral® behandelten Versuchsvariante gemessen.

Im Gegensatz dazu waren die Proben mit den geringsten Einzelgehalten für **2** (0,36 mg/g Blatt) und für **3** (0,68 µg/g Blatt) aus den Varianten Kontrolle oder S.s. infiziert + Iprodion, was wiederum ein Zeichen für die erfolgreiche Bekämpfung des Befalles darstellt.

Vergleich der Sorten 'Monarch' und 'Prinz'

Die Chromatogramme der Sorten unterscheiden sich nur gering voneinander. Gut erkennbar wird dies anhand der Abbildung 23. Das dort dargestellte Mischchromatogramm weist für beide Sorten ein sehr ähnliches Verhältnis der Analytsignale zueinander auf. Es wurden bewusste zwei Proben gewählt, die annähernd gleiche Analytgehalte aufweisen, um einen repräsentativen Vergleich zu erhalten.

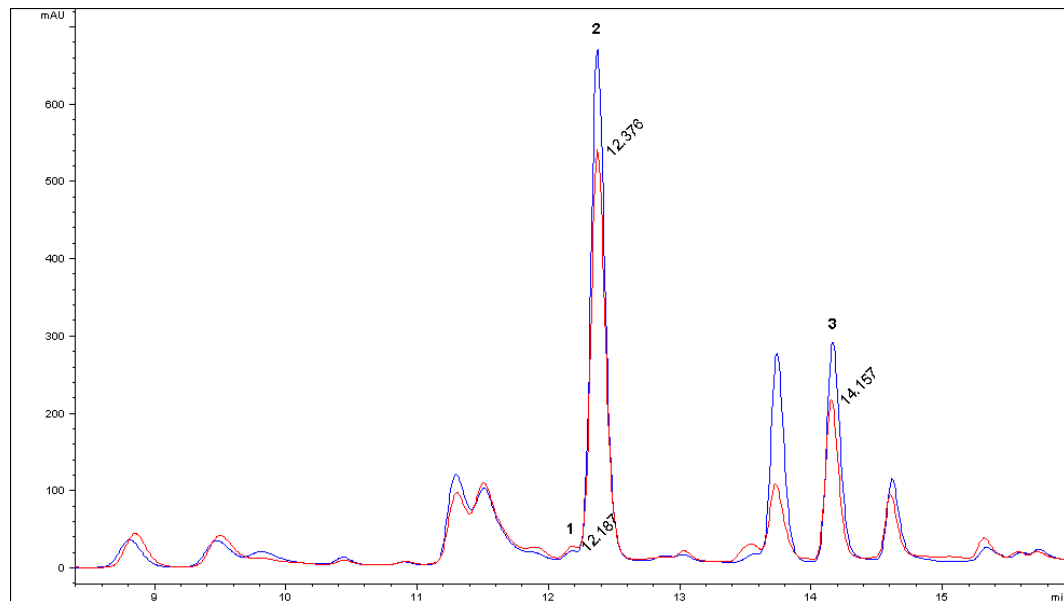


Abbildung 23: Vergleich von Chromatogrammausschnitten ausgewählter Blattstichproben der Sorten `Monarch` (-) und `Prinz` (-) mit ähnlichen Analytgehalten.

Ein direkter grafischer Vergleich der Summenfurocumaringehalte aus **1**, **2** und **3** beider Knollenselleriesorten zeigt, dass sich die Induktion der Phytoalexinbildung, abgesehen von der Iprodionbehandelten Kontrolle der Sorte `Prinz`, ähnlich verhält (siehe Abbildung 24).

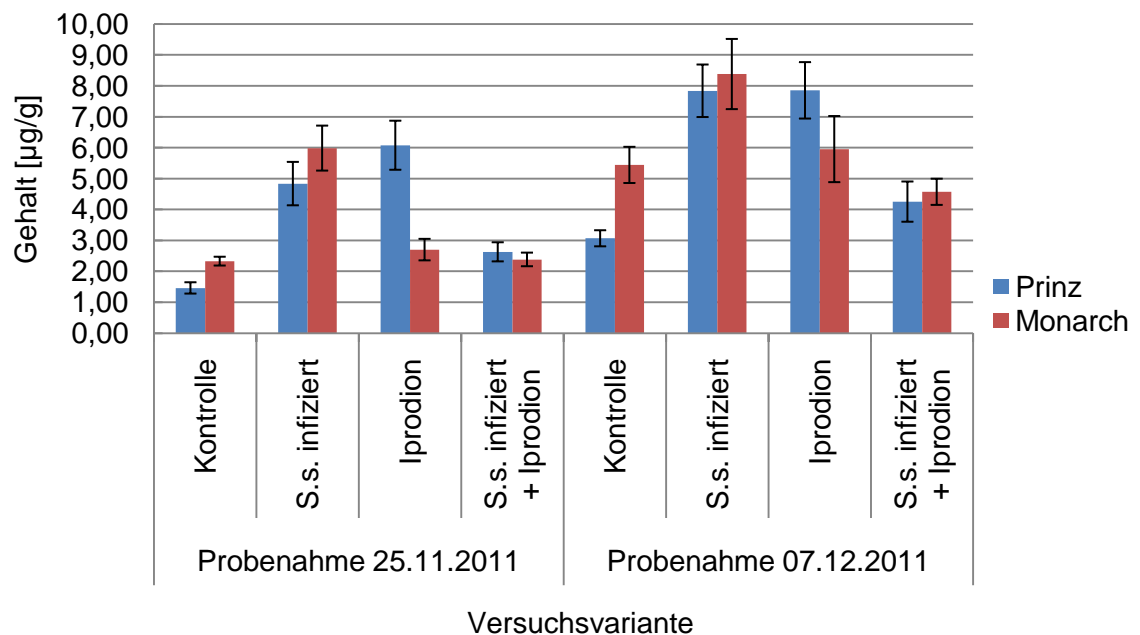


Abbildung 24: Summenfurocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Blätter der Pflanzensorte `Prinz` und `Monarch` in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).

Publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen entsprechend, setzt sich der Gesamtgehalt linearer FC in beiden Sorten fast ausschließlich aus **2** und **3** zusammensetzt (14). Oftmals lag der Gehalt für **1** unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 µg/ml. Möglicherweise könnte dies ein Indiz dafür sein, dass **1** eventuell nur als kurzlebige Intermediat im Biosyntheseweg von **2** und **3** vorliegt und deshalb auch nur in sehr geringen Spuren nachgewiesen werden konnte.

Das Verhältnis von **2** und **3** ist in den Kontrollproben nahezu gleich und verschiebt sich durch Infektion mit/ohne Behandlung und ausschließlicher Behandlung mit Rovral® auf die Seite des Xanthotoxins. Das hat zum Einen den Anschein, dass **2** eine größere Rolle in der Pathogenabwehr spielt, zum Anderen ist es in Hinsicht auf den Verbraucherschutz als bedenklich einzuschätzen, da **2** nachweislich ein größeres toxisches Potential als **3** zugewiesen wird (2).

Der Schwellenwert bei oraler Exposition, ab dem das Auftreten phototoxischer Effekte beobachtet wurde, wird in der Literatur mit 0,23 mg Xanthotoxin je kg Körpergewicht angegeben (2). Demzufolge müsste eine erwachsene Person (60 kg) 14 mg Xanthotoxin aufnehmen. Das würde, bei Verwendung der Blätter mit den höchsten gemessenen Gehalten (Xanthotoxin 9,19 µg/g Blatt, 'Monarch', zweite Probenahme, Variante S.s. infiziert), einer Masse von 1,52 kg entsprechen, die innerhalb kurzer Zeit verzehrt werden müssten. Da realistische Konsummengen bei ca. 300 g liegen, wurde der Schwellenwert um das 5-fache unterschritten. Bei einem stärkeren und intensiveren Befall, der folglich höhere FC-Gehalte bedingt, könnte es durchaus zur oralen Aufnahme bedenklicher Mengen kommen. In diesem Zusammenhang spielen jedoch Matrixeffekte der Pflanze und anderer, zeitgleich verkonsumierter Lebensmittel eine sehr große Rolle bei der Resorption.

Kritischer ist der häufige Hautkontakt mit Pflanzen zu sehen, wie er z.B. bei Feldarbeitern oder Gemüsehändlern vorkommen kann. Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch einen latenten Infektionsverlauf zur Bildung höherer FC-Gehalte kommen kann. Je nach Grad und Schwere einer Infektion mit *S. sclerotiorum*, die nicht zwangsläufig mit sichtbaren Symptomen verlaufen muss, können bedenkliche Konzentrationen, vor allem des Xanthotoxins, gebildet werden.

Eine verringerte Exposition durch explizite Auswahl einer der beiden Sorten kann nicht erreicht werden, da sich die Gehalte nur unwesentlich unterscheiden.

4.2.4 Versuchsreihe *R. solani*

Die im Anhang tabellierten Messergebnisse zur Versuchsreihe der *R. solani* Infektion werden systematisch nach Pflanzensorte und Variante ausgewertet und verglichen. Hierbei wird, aufgrund der hohen Schwankungsbreiten der FC-Gehalte innerhalb der einzelnen Varianten, auf eine statistische Bearbeitung der generierten Daten verzichtet. Zur Verifizierung fragwürdiger HPLC Messergebnisse wurden die betroffenen Messproben über eine LC-MS/MS-Methode vermessen. Da der analytische Schwerpunkt bei der Etablierung einer HPLC-Methode liegt, wird an dieser Stelle nicht näher auf die massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster eingegangen.

Die HPLC-Vermessung des aufgearbeiteten Knollenmaterials mit und ohne Standarddotierung liefert das in Abbildung 25 dargestellte Chromatogramm.

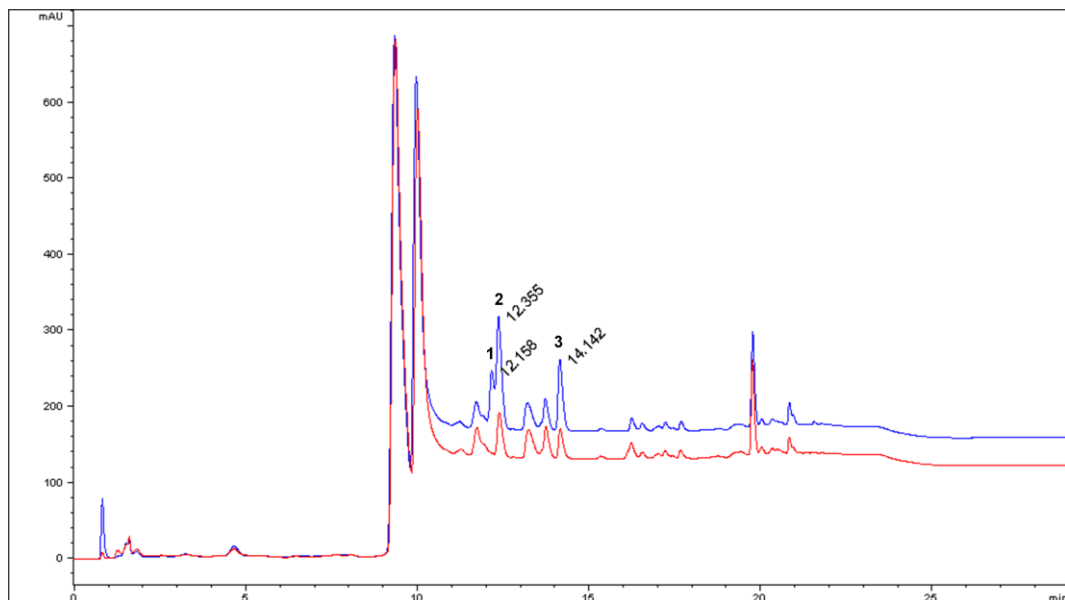


Abbildung 25: Vergleich der Chromatogramme einer Knollenstichprobe mit (-) und ohne (-) Dotierung.

Die Wiederfindungsraten für die Analyten wurden über die Methode der Standardaddition ermittelt. Die durchschnittlich erreichten Wiederfindungen liegen für **1** bei $(83 \pm 2) \%$, für **2** bei $(111 \pm 2) \%$ und für **3** bei $(93 \pm 1) \%$ (Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung; $N = 5$). Im Verlauf der Probenanalysen konnte eine Verschlechterung der Auflösung der HPLC Trennsäule beobachtet werden. Zu sehen ist dies anhand der schlechteren Trennung der Signale für **1** und **2** im Chromatogramm der dotierten Probe. Dennoch wichen die Wiederfindungen von **1** und **2** jeweils nur um 10 % ab. Obwohl vor der Quantifizierung stets die Reinheit der Signale überprüft wurde,

kann nicht ausgeschlossen werden, dass Anteile der Peakfläche von **1** derer von **2** zugeordnet worden sind.

Pflanzensorte `Monarch`

Eine graphische Auswertung der Untersuchungsergebnisse der einzelnen Versuchsvarianten zu zwei Probenahmen ist in Abbildung 26 dargestellt.

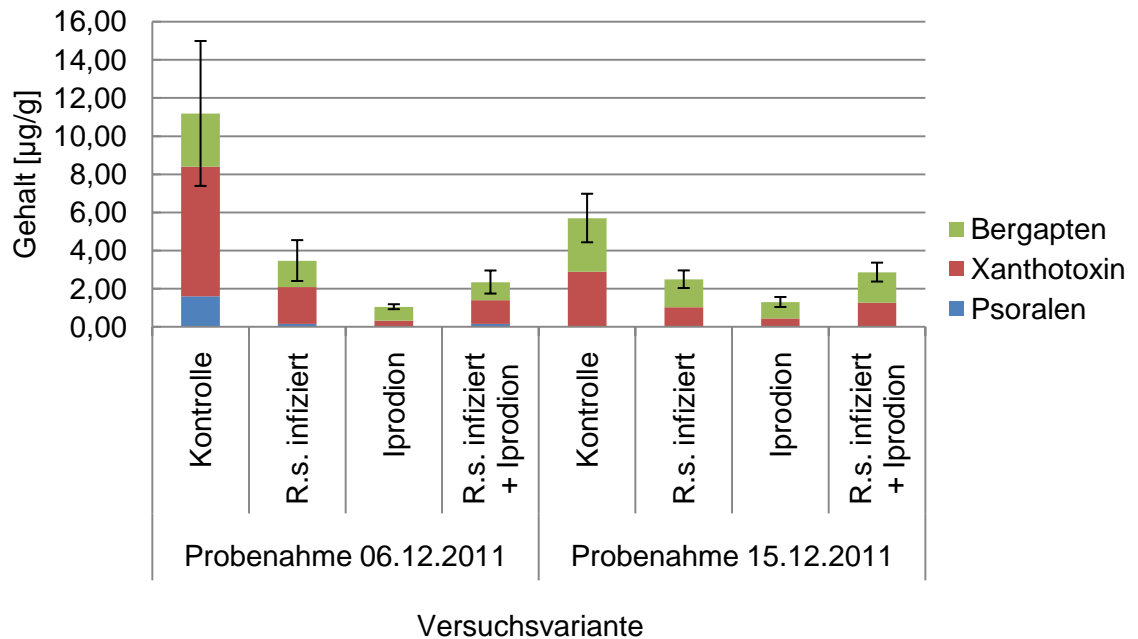


Abbildung 26: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Knollen der Pflanzensorte `Monarch` in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).

Eine wesentliche Problematik bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse ist der fehlende Bezug zu Kontrollproben. Die vorliegenden Messdaten für die Kontrollproben scheinen durch Trockenstress, sichtbar an den labilen Achssprossen, deutlich erhöht zu sein. Eine Stimulation der FC Biosynthese, verursacht bei der Probenahme und Aufarbeitung kann ausgeschlossen werden, da alle Pflanzen jeglicher Varianten gleich behandelt wurden. Besonders zum Zeitpunkt der ersten Probenahme unterliegen die Messdaten starken Schwankungen. Der Gesamtgehalt von 11,18 $\mu\text{g/g}$ setzt sich aus 61 % Xanthotoxin, 25 % Bergapten und 14 % Psoralen zusammen.

Die Unterschiede in den FC- Mengen zwischen beiden Probenahmen sind in den Versuchsvarianten R.s. infiziert, Iprodion und R.s. infiziert + Iprodion sehr gering. Werden die Pflanzen der Versuchsvariante Iprodion als Kontrollreferenz herangezogen, so zeigt sich, dass durch Infektion der Pflanze mit *R. solani* die

Biosynthese linearen FC **1**, **2** und **3** stimuliert wird. Aufgrund der gering erhöhten FC-Konzentrationen und der schwach ausgeprägten Infektionssymptome an den Knollen sollte bei Wiederholung der Versuche eine längere Zeitspanne zwischen Inokulation und Probenahme gewählt werden.

Die Anwendung von Rovral® zeigt in diesem Zusammenhang nur einen geringen Effekt auf die FC-Gehalte in der Variante R.s. infiziert + Iprodion.

Entgegen den Erwartungen kann somit anhand der Untersuchungsergebnisse für die Knolleninfektion bei der Pflanzensorte `Monarch` weder die erste, noch die zweite Hypothese eindeutig bestätigt werden.

Pflanzensorte `Prinz`

Der Vergleich der Versuchsvarianten der Pflanzensorte `Prinz` bezüglich der FC-Gehalte in den Knollen zu zwei Probenahmezeitpunkten ist in Abbildung 22 dargestellt.

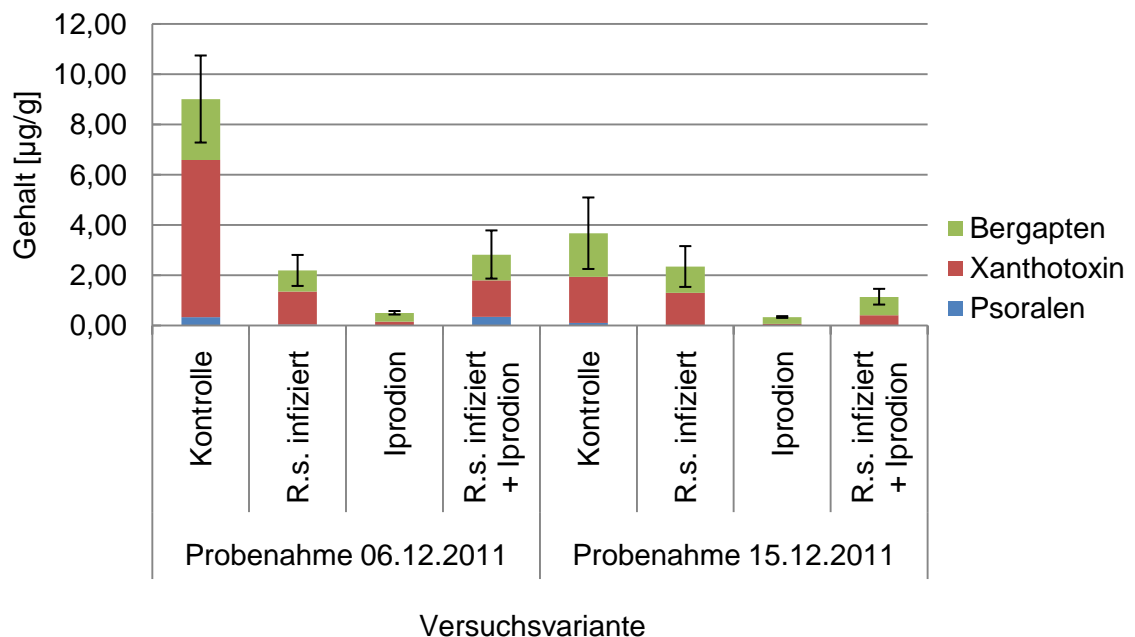


Abbildung 27: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Knollen der Pflanzensorte `Prinz` in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).

Die Pflanzensorte `Prinz` zeigt bei den untersuchten Knollen, die Pflanzensorte `Monarch`, ein ähnliches FC-Muster mit großen Schwankungen.

Die FC-Gehalte der Kontrollproben sind ebenfalls zur ersten Probenahme erhöht und fallen bis zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme um 50 %.

Sehr geringe Konzentrationen konnten in der Variante Iprodion nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den beschriebenen Beobachtungen bei beiden Probenahmen.

Eine Erhöhung der FC-Konzentration auf ca. 2,2 µg/g bei beiden Probenahmen durch eine Infektion mit *R. solani* ist nur im Vergleich mit dem Versuchsglied Iprodion festzustellen.

Eine genaue Einschätzung des Einflusses von Rovral® auf infizierte Pflanzen kann nicht getroffen werden. Augenscheinlich ist die Wirkung des Iprodions erst nach der ersten Probenahme eingetreten. Die Gießapplikation scheint nicht die optimalste Applikationsform zu sein. An dieser Stelle ist eine Optimierung notwendig.

Vergleich der Sorten 'Monarch' und 'Prinz'

Die Chromatogramme der Sorten weisen einen ähnlichen Verlauf auf. Gut erkennbar wird dies anhand der Abbildung 28, in der das Mischchromatogramm beider Sorten dargestellt ist. Es wurden bewusste zwei Proben gewählt, die annähernd gleiche Analytgehalte aufweisen, um einen repräsentativen Vergleich zu erhalten.

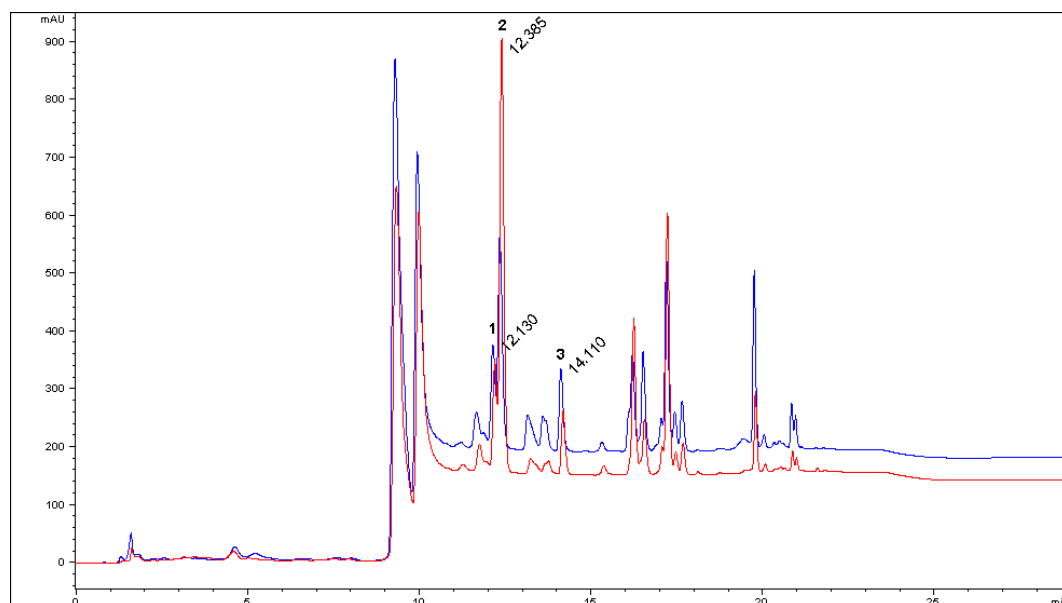


Abbildung 28: Vergleich der Chromatogramme ausgewählter Knollenstichproben der Sorten 'Monarch' (-) und 'Prinz' (-) mit ähnlichen Analytgehalten.

Anhand des Vergleiches der Summenfurocumaringehalte verschiedener Versuchsvarianten der Sorten 'Prinz' und 'Monarch' zu zwei Probenahmen

(siehe Abbildung 29) sind parallelen zwischen beiden Sorten, hinsichtlich der gemessenen Konzentrationen, erkennbar.

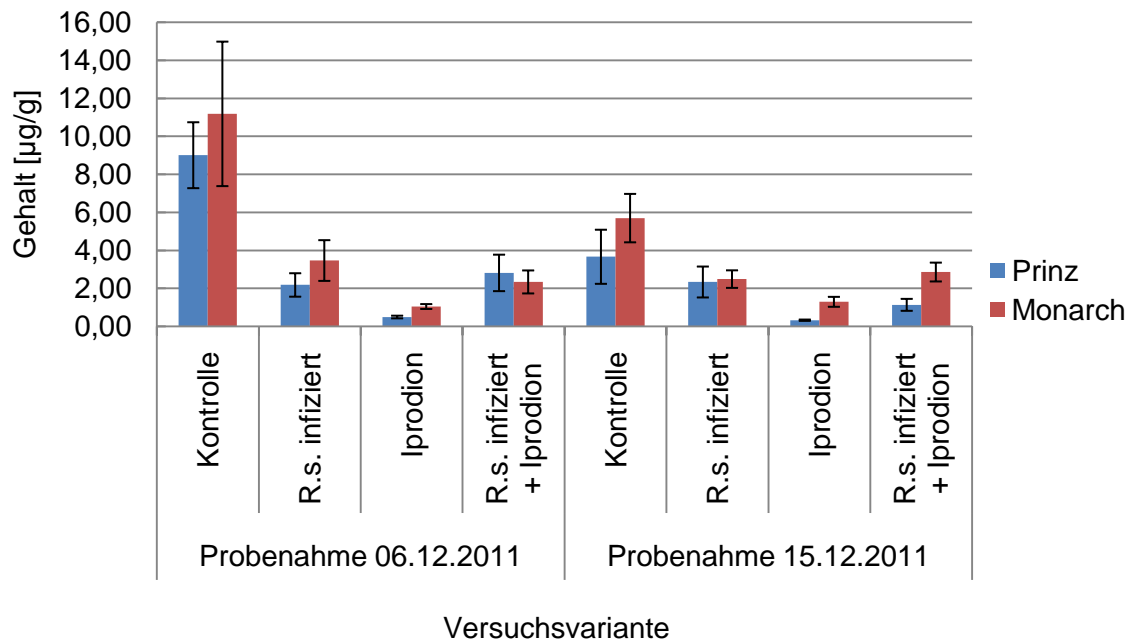


Abbildung 29: Summenfurocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Knollen der Pflanzensorte 'Prinz' und 'Monarch' in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).

Die Summenfurocumaringehalte der Knollen in den Versuchsvarianten R.s. infiziert, Iprodion und R.s. infiziert + Iprodion überschreiten bei keiner Sorte zu keiner Probenahme 4 µg/g. Im Vergleich zur Versuchsreihe der *S. sclerotiorum* Infektion, bei denen die Gehalte der genannten Varianten spätestens zur zweiten Probenahme oberhalb von 4 µg/g liegen, ist ein klarer Unterschied in der Biosyntheserate zu erkennen.

Ein interessanter Effekt, der nicht Ziel dieser Untersuchungen sein sollte, ist der deutlich erhöhte FC-Gehalt in den Kontrollen, vor allem zum Zeitpunkt der ersten Probenahme. Dieser wurden vermutlich durch Trockenstress verursacht. Demzufolge ist nicht auszuschließen, dass es zur Bildung großer Mengen der linearen FC **1**, **2** und **3** in der Knolle auch ohne Infektion kommen kann. Die höchsten gemessenen Konzentrationen (Psoralen 12,74 µg/g, Xanthotoxin 18,49 µg/g und Bergapten 3,57 µg/g) wurde in Kontrollproben ermittelt. Zwischen dem ersten und zweiten Probenahmetermin halbierten sich die FC-Mengen in den Knollen der Kontrollvariante. Hier ist ein möglicher Zusammenhang zwischen Vitalität und FC Biosynthese erkennbar.

Bei Verwendung der Knolle mit den gemessenen Höchstwerten müssten 760 g in kurzer Zeit konsumiert werden, um den Schwellenwert für die orale Aufnahme von 0,23 mg Xanthotoxin/kg Körpergewicht zu erreichen. Das entspricht der Hälfte der Menge, die aus der Versuchsreihe der *S. sclerotiorum* Infektion ermittelt wurde.

Anhand der Versuchsreihe *R. solani* ist nur ein bedingter Rückschluss auf die postulierten Hypothesen möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass durch einen präventiven Einsatz des Pflanzenschutzmittels Rovral® die FC-Konzentrationen in den Knollen der Selleriesorten 'Prinz' und 'Monarch' auf einem sehr geringen Niveau verbleiben. Ob gemäß zweiter Hypothese eine Senkung der FC-Gehalte durch den Einsatz von Rovral® bei akutem Befall mit *R. solani* erreicht werden kann, ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich.

Es sind daher weitere Untersuchungen nötig, die unter einem größeren zeitlichen Versuchsrahmen mit konstanten Bedingungen durchgeführt werden sollten.

5 Zusammenfassung

Der wirtschaftlich bedeutende Knollensellerie (*Apium graveolens* L. var. *rapaceum* (Mill.) Gaud.) aus der Familie der Doldengewächse (*Apiaceae* oder *Umbelliferae*) findet häufig als Gewürzpflanze Anwendung in Lebensmitteln (1, 2, 16).

Ein Pilzbefall bedingt erhöhte Konzentrationen linearer Furocumarine, die zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählen und als Phytoalexine eine fungistatische und humantoxische Wirkungen aufweisen (2, 3).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten eine angemessene Probenvorbereitung und eine robuste HPLC Messmethode etabliert werden, die eine Identifizierung und Quantifizierung der Analyten Psoralen, Xanthotoxin und Bergapten ermöglichen und gute Wiederfindungsraten liefern.

Die latente Infektion oberirdischer Pflanzenteile der Knollenselleriesorten `Prinz´ und `Monarch´ mit dem Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary führt zu erhöhten Konzentrationen der linearen Furocumarine Xanthotoxin und Bergapten. Durch die Anwendung des fungiziden Pflanzenschutzmittels Rovral® WG konnte eine Verringerung der Analytkonzentrationen auf das Niveau unbehandelter Kontrollen beobachtet werden.

Die Infektion der verdickten Sprossknolle mit dem Pathogen *Rhizoctonia solani* (Kühn) und damit verbunden eine erhöhte Furocumarinbiosynthese gelang nur in geringem Maße. Eine Auswertung war, aufgrund deutlich erhöhter Furocumarinergehalte in den Knollen der unbehandelten Kontrollen, nur eingeschränkt möglich. Der präventive Einsatz von Rovral® WG scheint die Biosyntheserate dieser Phytoalexine zu verringern. Ein senkender Einfluss auf die Analytgehalte bei akutem Befall durch das Pflanzenschutzmittel konnte nicht beobachtet werden.

Zur genaueren Klärung der Zusammenhänge zwischen der Bildung von Furocumarinen in Knollensellerie durch Pathogenbefall und dem Einfluss einer Anwendung von Pflanzenschutzmittel bei Befall, vor allem in der Sprossknolle, sind weitere Untersuchungen notwendig.

6 Summary

Celery (*Apium graveolens* L. var. *rapaceum* (Mill.) Gaud.), belonging to the family of umbelliferous plants, is a spice plant with great economic importance in foodstuff (2, 16). Stress and infection with fungi initiates the production of three phytoalexin furocoumarins, namely psoralen, xanthotoxin and bergapten, in celeriac plants. They are the secondary metabolites acting as fungistatins which may affect toxic reactions in human (1-3).

During these studies we could establish an adequate sample preparation and a robust HPLC method for identification and quantification of the three furocoumarins psoralen, xanthotoxin and bergapten with good recovery rates.

The latent infection of sprouts and leaves of two celeriac species 'Prinz' and 'Monarch' with the fungi *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary led to increased levels of the linear furocoumarins xanthotoxin and bergapten. The treatment of infected plants with the fungicide Rovral® WG shows decreased concentrations of the furocoumarins, similar to untreated controls.

An increased production of furocoumarins in roots and stem tubers by infection with the fungi *Rhizoctonia solani* (Kühn) could be reached only in a small extent. There were very high levels of furocoumarins, observed in untreated controls, caused by drought stress. For this reason, an evaluation based on reference samples was restricted. A preventive application of Rovral® WG seems to decrease the production of these phytoalexins in tubers. In contrast, no effect was observed by the treatment of acute infection.

For a more detailed clarification of the relationship between the formation of furocoumarins in celery by pathogen *Rhizoctonia solani* and the influence of pesticide treatment after infestation, especially in the stem tuber, further studies are necessary.

7 Poster



Bildung von Furocumarinen in Knollensellerie in Abhängigkeit von Pathogenbefall und Pflanzenschutz

A. Hintenaus¹, F. M. Ellner²

Knollensellerie, eine Pflanze aus der Familie der Doldenblütengewächse, ist aufgrund der enthaltenen ätherischen Öle in den ober- und unterirdischen Pflanzenteilen eine wertvolle Gewürzpflanze, die in Deutschland in bedeutendem landwirtschaftlichen Umfang angebaut wird (1, 2).

Ein Pilzbefall kann zur Bildung erhöhter Konzentrationen der linearen Furocumarine Psoralen (Pso), Xanthotoxin (8-MOP) und Bergapten (5-MOP) führen (3). Diese zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und fungieren als fungistatische Phytoalexine (4). In Kombination mit UVA-Strahlung können sie phototoxisch wirken und zu verbrennungsähnlichen Symptomen auf der Haut führen (2, 3).

Es sollen die Einflüsse einer Blattinfektion mit *Sclerotinia sclerotiorum* (*S. sclerotiorum*), einer Knolleninfektion mit *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) und einer präventiven und akuten Anwendung des Pflanzenschutzmittels Rovral® WG auf die Bildung der linearen Furocumarine Pso, 8-MOP und 5-MOP untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Blatt- und Knollenproben genommen, aufgearbeitet und analysiert.

1 Infektionsversuche

Pflanzenkultur:

- Knollensellerie (*Apium graveolens* L. var. *rapaceum* (Mill.) Gaud.)
- Sorten 'Prinz' und 'Monarch'

Pilzkulturen:

- *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (S.s.)
- *Rhizoctonia Solani* (Kühn) (R.s.)

Pflanzenschutzmittel:

- Rovral® WG (750 g/kg Iprodion)
- 7,22 mg Iprodion / Pflanze

Versuchsbedingungen:

- Klimmakammerversuche (Temperatur 20°C, Luftfeuchtigkeit 80 %)

3 Ergebnisse

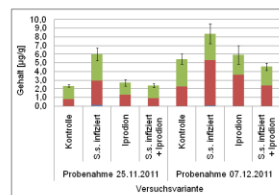


Abb. 1: Versuchsreihe *S. sclerotiorum* Blattinfektion 'Monarch'.

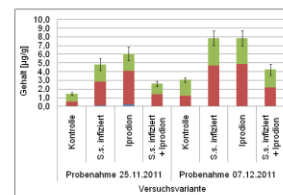


Abb. 2: Versuchsreihe *S. sclerotiorum* Blattinfektion 'Prinz'.

2 Furocumarinanalytik

Aufarbeitung:

- Homogenisierung und Extraktion (Diethylether (Blätter) / Ethylacetat (Knollen))
- Reinigung über C-18 Festphasenextraktion

Identifizierung und Quantifizierung:

- HPLC-DAD (Agilent® 1100 Series)
- Verifizierung mittels LC-MS/MS

Wiederfindungen [%]

Dotierung [µg/ml]	N	Psoralen	Xanthotoxin	Bergapten
50	12	95 ± 3	97 ± 13	92 ± 5
30	16	90 ± 8	103 ± 13	97 ± 7
5	5	83 ± 2	111 ± 2	93 ± 1

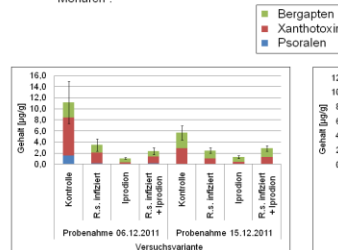


Abb. 3: Versuchsreihe *R. solani* Knolleninfektion 'Monarch'.

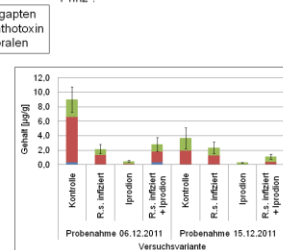


Abb. 4: Versuchsreihe *R. solani* Knolleninfektion 'Prinz'.

4 Diskussion

Die latent verlaufene Infektion oberirdischer Pflanzenteile der Knollenselleriearten 'Prinz' und 'Monarch' mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* führt zu erhöhten Gehalten der linearen Furocumarine 8-MOP und 5-MOP. Durch die Anwendung des fungiziden Pflanzenschutzmittels Rovral® WG konnte eine Verringerung der Konzentrationen auf das Niveau unbehandelter Kontrollen beobachtet werden.

Die Infektion der verdickten Sprossknolle mit dem Pathogen *R. solani* und der damit verbundenen erhöhten Furocumarinbiosynthese gelang nur in geringem Maße. Ein Bezug auf den Furocumarin Gehalt unbehandelter Kontrollen war, aufgrund deutlich erhöhter Konzentrationen, bedingt durch Trockenstress, nicht möglich. Der präventive Einsatz von Rovral® WG scheint die Biosyntheserate dieser Phytoalexine zu verringern. Ein senkender Einfluss auf die Analytgehalte bei akutem Befall durch das Pflanzenschutzmittel konnte nicht beobachtet werden. Weitere Untersuchungen sind zur detaillierteren Klärung notwendig.

¹ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

² Julius Kühn-Institut, Institut für Ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin

[1] Ami-Markbilanz Gemüse, 2012.

[2] Eisenbrand, G. Toxicological assessment of furocumarins in foodstuffs. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007, 51 (3), 367-373.

[3] Beier, R. C.; Oertli, E. H. Psoralen and other linear Furocumarins as Phytoalexins in *Celery*. *Phytochemistry* 1983, 22 (11), 2595-2597.

[4] Uecker, S.; Jira, T.; Beyrich, T. Untersuchungen zur Furocumarinbildung in *Apium graveolens* L. und *Pastinaca sativa* L. nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pharmazie* 1991, 46 (8), 599-601.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lineare Furocumarine Psoralen 1 , Xanthotoxin 2 und Bergapten 3	3
Abbildung 2: Chlorosen (links) (18), Nekrosen (rechts) (19).	5
Abbildung 3: Ausgewählte Aspekte zur Furocumarinbiosynthese (24, 25).	8
Abbildung 4: Versuchsanordnung zum Vortest auf Pathogenität der Pilze.	13
Abbildung 5: Probenahme Blattmaterial.	15
Abbildung 6: rotbraunes Myzel des Pilzes <i>R. solani</i>	25
Abbildung 7: Beobachtungen an einer mit <i>R. solani</i> infizierten Pflanze.	26
Abbildung 8: Beobachtungen an einer Kontrollpflanze.	27
Abbildung 9: UV-Absorptionsspektrum von: A Psoralen, B Xanthotoxin und C Bergapten.	28
Abbildung 10: Chromatogramm des 10 µg/ml Sammelstandards.	29
Abbildung 11: Abgleich der UV-Absorptionsspektren (- Standard, - Signal) im Peakmaximum.	29
Abbildung 12: Chromatogramm des 10 µg/ml Sammelstandards mit neuem Laufmittelgradient und C8 Trennsäule.	30
Abbildung 13: Abgleich der UV-Absorptionsspektren (- Standard, - Signal) im Peakmaximum.	31
Abbildung 14: Vergleich der Wiederfindung der Furocumarine in Blatt und Knolle, berechnet aus der Peakfläche oder - höhe.	32
Abbildung 15: UV-Absorptionsspektrum (- Bergapten, - unbekannte Verbindung) im Peakmaximum des Bergaptensignals.	33
Abbildung 16: Gegenüberstellung der Extraktion der FC mit Ethylacetat und Diethylether bei Knollenmaterial.	33
Abbildung 17: Gesamtfurocumarinegehalt in den SPE-Fractionen Proben- aufgabe/Waschen, Elution (MeOH/H ₂ O, 70:30; v:v) und Nachelution (MeOH/H ₂ O, 90:10; v:v).	34
Abbildung 18: Peakformen nach Einstellung des MeOH-Gehaltes auf - 80 % und auf - 50 % in der Injektionslösung.	36
Abbildung 19: Ausschnitt eines Chromatogramms einer aufgearbeiteten und undotierten Blattprobe.	37
Abbildung 20: Das Chromatogramm einer aufgearbeiteten und mit Standard dotierten Blattprobe.	38

Abbildung 21: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Blätter der Pflanzensorte `Monarch´ in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).....	39
Abbildung 22: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichungen untersuchter Blätter der Pflanzensorte `Prinz´ in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).....	41
Abbildung 23: Vergleich von Chromatogrammausschnitten ausgewählter Blattstichproben der Sorten `Monarch´ (-) und `Prinz´ (-) mit ähnlichen Analytgehalten.....	43
Abbildung 24: Summenfurocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Blätter der Pflanzensorte `Prinz´ und `Monarch´ in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).	43
Abbildung 25: Vergleich der Chromatogramme einer Knollenstichprobe mit (-) und ohne (-) Dotierung.....	45
Abbildung 26: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Knollen der Pflanzensorte `Monarch´ in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).....	46
Abbildung 27: Furocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Knollen der Pflanzensorte `Prinz´ in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).....	47
Abbildung 28: Vergleich der Chromatogramme ausgewählter Knollenstichproben der Sorten `Monarch´ (-) und `Prinz´ (-) mit ähnlichen Analytgehalten.....	48
Abbildung 29: Summenfurocumaringehalte \pm Summenstandardabweichung untersuchter Knollen der Pflanzensorte `Prinz´ und `Monarch´ in Abhängigkeit von Probenahmezeitpunkt und Versuchsvariante (N = 7-9).	49
Abbildung A 1: Versuchsvarianten und schematischer Versuchsaufbau in den Klimakammern.....	I
Abbildung A 2: Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakfläche für Psoralen.	III
Abbildung A 3: Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakhöhe für Psoralen. III	
Abbildung A 4: Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakfläche für Xanthotoxin.....	IV

Abbildung A 5: Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakhöhe für Xanthotoxin.....	IV
Abbildung A 6: Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakfläche für Bergapten.	V
Abbildung A 7: Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakhöhe für Bergapten.	V

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einige Hauptgruppen pflanzlicher Toxine (17).	4
Tabelle 2: Phytopathogene innerhalb bestimmter Organismengruppen (17).	5
Tabelle 3: Zeitlicher Verlauf der Laufmittelgradienten.....	17
Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierstufen.....	18
Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf des Laufmittelgradienten.	19
Tabelle 6: Quali- und Quantifizier MRM-Übergänge der Analyten.....	19
Tabelle 7: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierstufen.....	20
Tabelle 8: Methanollösungen.	21
Tabelle 9: Laufmittelgradient.	28
Tabelle 10: Laufmittelgradient.	30
Tabelle 11: Wiederfindungen zur Lichtstabilität.	36
Tabelle A 1: Vortest auf Pathogenität.....	II
Tabelle A 2: Kalibrierung Psoralen.....	III
Tabelle A 3: Kalibrierung Xanthotoxin.	IV
Tabelle A 4: Kalibrierung Bergapten.....	V

10 Literaturverzeichnis

1. Ami-Marktbilanz Gemüse. **2012**.
2. Eisenbrand, G. Toxicological assessment of furocoumarins in foodstuffs. *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, 51 (3), 367-373.
3. Uecker, S.; Jira, T.; Beyrich, T. Untersuchungen zur Furocumarinbildung in *Apium graveolens* L. und *Pastinaca sativa* L. nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pharmazie* **1991**, 46 (8), 599-601.
4. Beier, R. C.; Oertli, E. H. Psoralen and other linear Furocoumarins as Phytoalexins in Celery. *Phytochemistry* **1983**, 22 (11), 2595-2597.
5. Trumble, J. T.; Millar, J. G.; Ott, D. E.; Carson, W. C. Seasonal Patterns and Pesticidal Effects on the Phototoxic Linear Furanocoumarins in Celery, *Apium-Graveolens* I. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40 (9), 1501-1506.
6. Chaudhary, S. K.; Ceska, O.; Warrington, P. J.; Ashwoodsmith, M. J. Increased Furocoumarin Content of Celery During Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1985**, 33 (6), 1153-1157.
7. Schlösser, E. *Allgemeine Phytopathologie*; Thieme: **1997**; Vol. 2.
8. Karasawa, D.; Shibata, H.; Horiuchi, N.; Andou, Y.; Simada, M. Photoactive Furocoumarins in Diseased Celery (*Apium-Graveolence*). *Agricultural and Biological Chemistry* **1990**, 54 (8), 2141-2142.
9. Nigg, H. N.; Strandberg, J. O.; Beier, R. C.; Petersen, H. D.; Harrison, J. M. Furanocoumarins in Florida celery varieties increased by fungicide treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45 (4), 1430-1436.
10. Adams, G. C. *Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani)* a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology* **1988**, 6, 535-552.
11. Bolton, M. D.; Thomma, B. P. H. J.; Nelson, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* **2006**, 7 (1), 1-16.
12. BASF Gebrauchsanleitung Rovral® WG. **2011**.
13. Beier, R. C.; Ivie, G. W.; Oertli, E. H.; Holt, D. L. Hplc Analysis of Linear Furocoumarins (Psoralens) in Healthy Celery (*Apium-Graveolens*). *Food and Chemical Toxicology* **1983**, 21 (2), 163-165.

14. Jarvenpaa, E. P.; Jestoi, M. N.; Huopalahti, R. Quantitative determination of phototoxic furocoumarins in celeriac (*Apium graveolens* L. var. *rapeceum*) using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* **1997**, 8 (5), 250-256.
15. Peroutka, R.; Schulzova, V.; Botek, P.; Hajslova, J. Analysis of furanocoumarins in vegetables (Apiaceae) and citrus fruits (Rutaceae). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2007**, 87 (11), 2152-2163.
16. Rothmaler, W. B.; Jäger, E. J.; Werner, K. H. *Exkursionsflora in Deutschland*; Spektrum Akademischer Verlag, München, **2005**.
17. Bresinsky, A.; Körner, C.; Kadereit, J.; Neuhaus, G.; Sonnewald, U. *Strasburger Lehrbuch der Botanik*; Spektrum Akademischer Verlag: **2008**; Vol. 36.
18. Ökolandbau.de <http://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/pflanzenschutz/schadorganismen-im-arznei-und-gewuerzpflanzenbau/petersilie/selleriemosaikvirus-celery-mosaic-virus-cemv/>; 06.02.2012, 17.00.
19. TU München <http://www.forst.tu-muenchen.de/EXT/LST/BOTAN/LEHRE/PATHO/BETULA/marsbet.htm>; 06.02.2012, 17.00.
20. Thieme RÖMPP Online: **2011**.
21. Schlatter, J. Toxicological Evaluation of Furocoumarins in Vegetable Foods. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **1988**, 79 (1), 130-143.
22. Larbat, R.; Kellner, S.; Specker, S.; Hehn, A.; Gontier, E.; Hans, J.; Bourgaud, F.; Matern, U. Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282 (1), 542-554.
23. Parast, B. M.; Chetri, S. K.; Sharma, K.; Agrawal, V. In vitro isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. *Plant Physiology and Biochemistry* **2011**, 49 (10), 1138-1146.
24. Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., Eds.; American Society of Plant Physiologists: Rockville, Maryland, USA, **2000**; pp 1250-1318.
25. Weisshaar, B.; Jenkins, G. I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **1998**, 1 (3), 251-257.
26. Hock, B.; Elstner, E. F. *Schadwirkungen auf Pflanzen: Lehrbuch der Pflanzentoxikologie*; 3., überarb. Aufl.; Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl., **1995**.

27. Beier, R. C.; Ivie, G. W.; Oertli, E. H. Linear furanocoumarins and graveolone from the common herb parsley. *Phytochemistry* **1994**, 36 (4), 869-872.
28. Krauch, C. H.; Krämer, D. M.; Wacker, A. Zum Wirkungsmechanismus photodynamischer Furocumarine Photoreaktion von Psoralen-(4-14C) mit DNS, RNS, Homopolynucleotiden und Nucleosiden. *Photochemistry and Photobiology* **1967**, 6 (5), 341-354.
29. Krauch, C. H.; Farid, S.; Kraft, S.; Wacker, A. Zum Wirkungsmechanismus photodynamischer Furocumarine. *Radiation and Environmental Biophysics* **1965**, 2 (4), 301-302.
30. Kang, A. Y.; Young, L. R.; Dingfelder, C.; Peterson, S. Effects of Furanocoumarins from Apiaceous Vegetables on the Catalytic Activity of Recombinant Human Cytochrome P-450 1A2. *The Protein Journal* **2011**, 30 (7), 447-456.
31. http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/sclerotinia_sclerotiorum/MultiHome.html; 21.03.2012, 20.00.
32. Heller, E. H. *Rhizoctonia solani* (Kühn): Ursache von Wurzelfäulen bei vielen Kulturen. Schweizerische Eidgenossenschaft: **2009**.
33. Grosch, R.; Scherwinski, K.; Lottmann, J.; Berg, G. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research* **2006**, 110, 1464-1474.
34. Buhr, K. *Rhizoctonia* -ein zunehmendes Qualitätsproblem. Möglichkeiten der Bekämpfung für erfolgreiche Vermarktung genussfähiger Speisekartoffeln. 38. Woche der bayerischen Erzeugergemeinschaften, **2008**.
35. *Bodenbedingte Ursachen für das Auftreten der Rhizoctonia-Rübenfäule*; 1; Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL): Freising-Weihenstephan, **2005**.
36. Berenbaum, M. R.; Zangerl, A. R.; Nitao, J. K. Furanocoumarins in Seeds of Wild and Cultivated Parsnip. *Phytochemistry* **1984**, 23 (8), 1809-1810.

11 Anhang

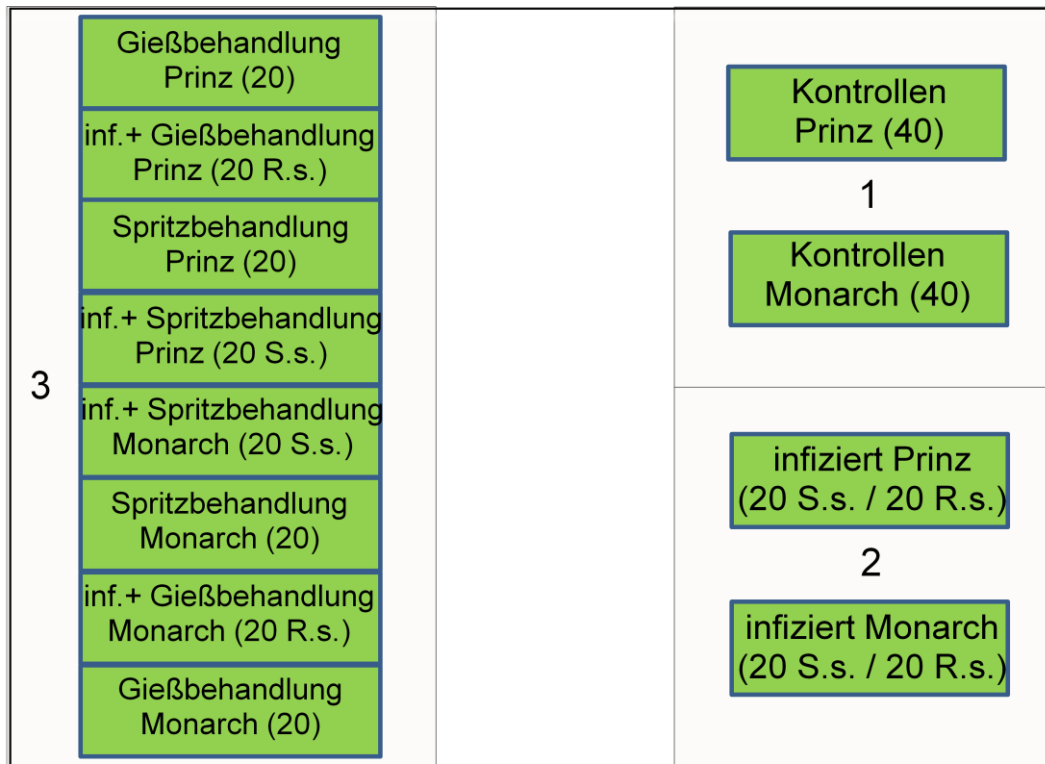


Abbildung A 1: Versuchsvarianten und schematischer Versuchsaufbau in den Klimakammern.







inf. = infiziert,

Klimakammer 1 mit jeweils 40 Pflanzen `Prinz´ und `Monarch´,

Klimakammer 2 mit jeweils 20 Pflanzen `Prinz´/`Monarch´ zur Infektion mit *S. sclerotiorum* (S.s.) und 20 Pflanzen `Prinz´/`Monarch´ zur Infektion mit *R. solani* (R.s.),

Klimakammer 3 mit jeweils 20 Pflanzen `Prinz´/`Monarch´ zur Behandlung in der jeweiligen aufgeführten Variante.

Tabelle A 1: Vortest auf Pathogenität.

Variante	Zeit	Tag 0	Tag 9
Kontrolle			
`Prinz`	S.s. infiziert		
	R.s. infiziert		
`Monarch`	S.s. infiziert		
	R.s. infiziert		

S. sclerotiorum (S.s.), *R. solani* (R.s.)

Tabelle A 2: Kalibrierung Psoralen.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Retentionszeit [Minuten]	Peakfläche ^a	Peakhöhe ^a
0,1	11.950	26,93 \pm 14,25	3,37 \pm 1,70
0,5	11.931	84,87 \pm 21,89	10,30 \pm 2,65
2,5	11.921	411,30 \pm 3,75	49,87 \pm 0,38
10	11.939	1642,47 \pm 24,69	202,30 \pm 3,20
25	11.954	4085,83 \pm 37,84	503,10 \pm 3,70
50	11.935	7764,40 \pm 144,60	969,47 \pm 20,22

^a Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

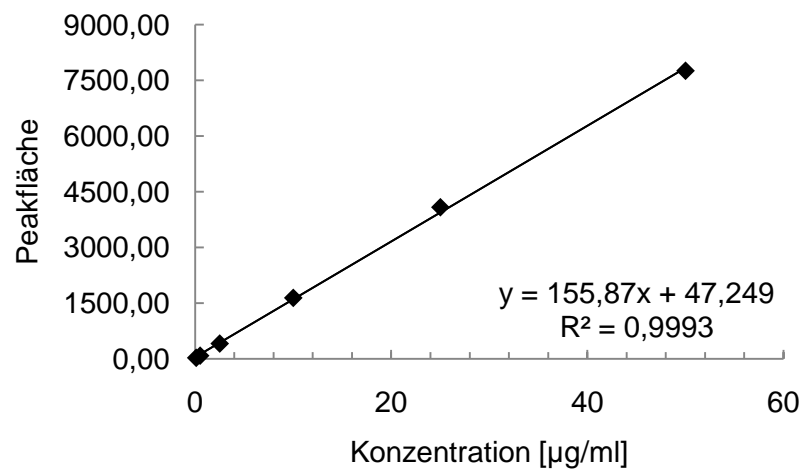
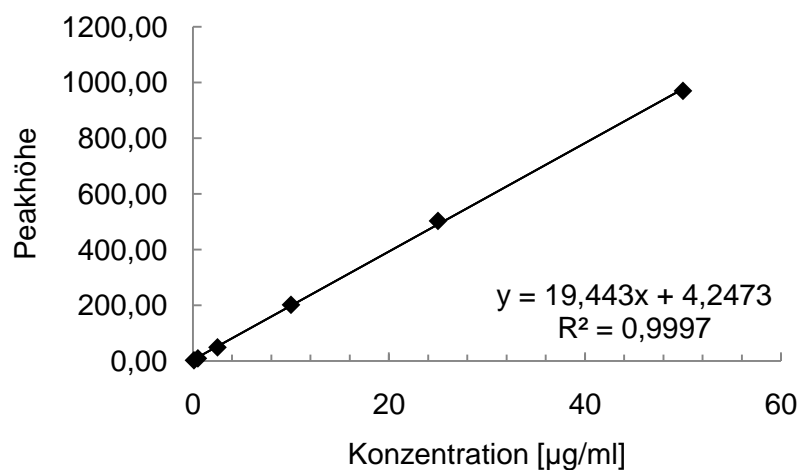
**Abbildung A 2:** Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakfläche für Psoralen.**Abbildung A 3:** Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakhöhe für Psoralen.

Tabelle A 3: Kalibrierung Xanthotoxin.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Retentionszeit [Minuten]	Peakfläche ^a	Peakhöhe ^a
0,1	12.155	28,43 \pm 12,00	3,37 \pm 1,56
0,5	12.141	84,17 \pm 21,92	10,07 \pm 2,61
2,5	12.134	409,63 \pm 3,93	48,50 \pm 0,53
10	12.148	1672,17 \pm 51,73	196,90 \pm 4,59
25	12.164	4311,27 \pm 43,18	497,03 \pm 0,97
50	12.147	8877,53 \pm 131,67	984,50 \pm 2,78

^a Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

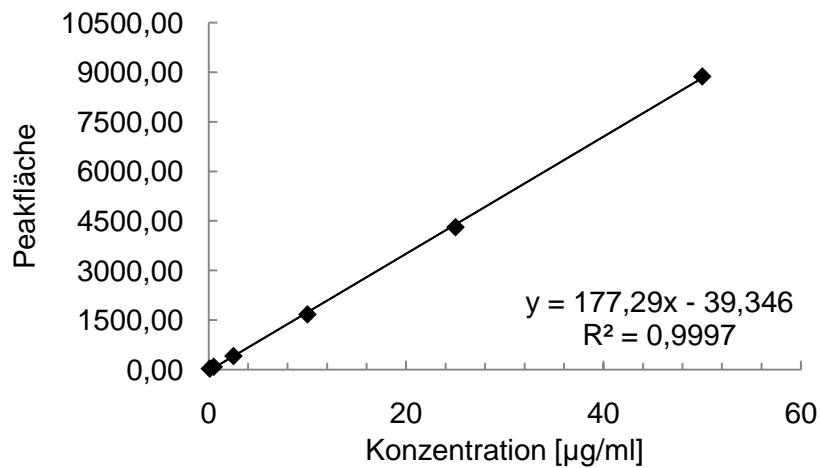
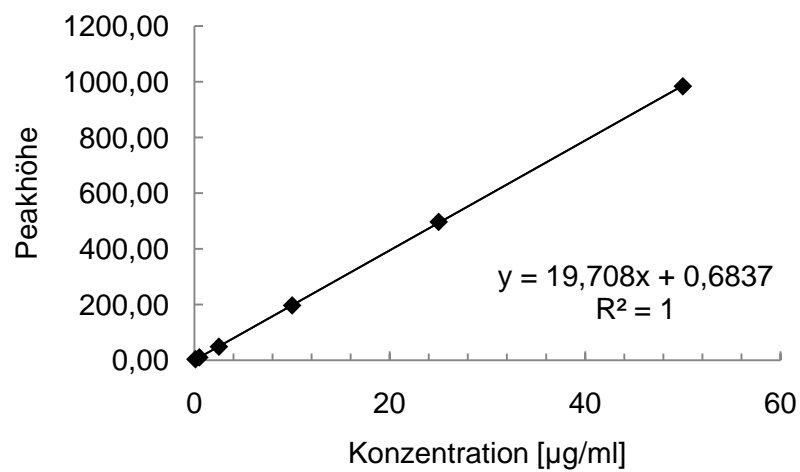
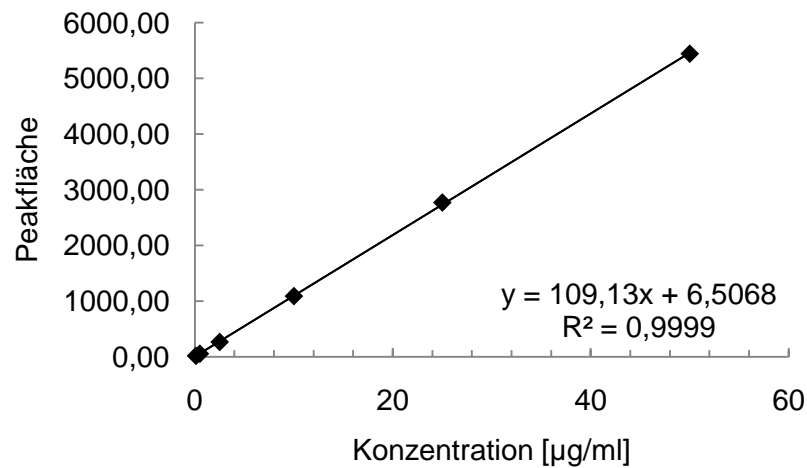
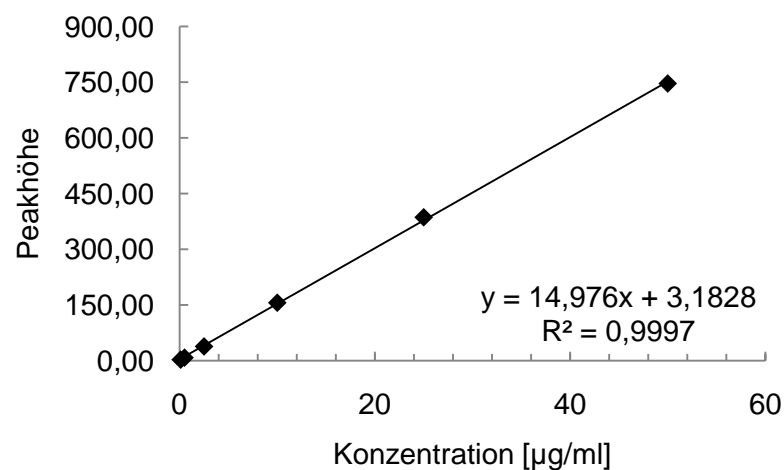
**Abbildung A 4:** Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakfläche für Xanthotoxin.**Abbildung A 5:** Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakhöhe für Xanthotoxin.

Tabelle A 4: Kalibrierung Bergapten.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Retentionszeit [Minuten]	Peakfläche ^a	Peakhöhe ^a
0,1	13,851	19,00 \pm 8,95	2,60 \pm 1,30
0,5	13.834	56,20 \pm 15,71	8,03 \pm 2,17
2,5	13.837	267,87 \pm 0,55	38,30 \pm 0,17
10	13.847	1091,73 \pm 24,40	156,05 \pm 0,92
25	13.850	2772,70 \pm 1,57	386,40 \pm 1,01
50	13.842	5445,80 \pm 28,09	747,10 \pm 14,22

^a Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

**Abbildung A 6:** Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakfläche für Bergapten.**Abbildung A 7:** Lineare Regression der Kalibrierwerte Peakhöhe für Bergapten.

Messdaten

Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

Pflanzensorte `Monarch´

Probenahme: 25.11.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
1.1 a	5,00	0,03	1,47	0,90
1.1 b	5,05	0,00	1,76	0,96
1.1 c	4,98	0,00	1,19	0,60
1.1 d	5,08	0,10 ^a	1,68	1,36 ^a
1.1 e	5,03	0,00	1,65	0,92
1.1 f	5,02	0,00	1,92	0,78
1.1 g	5,06		Dotierung	
1.1 h	5,04	0,00	1,33	0,49
1.1 i	4,98	0,00	1,41	0,76
1.1 j	5,01		Dotierung	
2.1 a	5,07	0,00	2,46	1,50
2.1 b	4,97	0,16	4,37	4,04
2.1 c	5,06	0,01	2,15	1,23
2.1 d	5,07	0,22	2,17	3,30
2.1 e	5,06		Dotierung	
2.1 f	5,05	0,25	2,72	3,87
2.1 g	5,08	1,80 ^a	3,82	10,52 ^a
2.1 h	4,98	0,27	3,44	2,93

^a Ausreißer

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
4.1 a	5,08	0,00	1,78	2,52
4.1 b	5,01	0,00	1,39	1,29
4.1 c	5,01		Dotierung	
4.1 d	5,02	0,11	1,47	0,85
4.1 e	4,93	0,00	1,08	0,55
4.1 f	5,03	0,10	1,27	0,81
4.1 g	5,06	0,00	1,36	1,39
4.1 h	5,03	0,01	1,63	2,55
4.1 i	5,10	0,00	0,81 ^a	0,66
4.1 j	5,07	0,06	1,18	0,85
6.1 a	5,06	-	-	-
6.1 b	4,97	0,10 ^a	1,37	0,89
6.1 c	4,96	0,06	1,69	1,71 ^a
6.1 d	5,05	0,00	1,65	0,58
6.1 e	5,04	0,00	1,58	1,15
6.1 f	4,98	0,00	1,04	0,72
6.1 g	5,02	0,00	1,20	0,70
6.1 h	5,00	0,05	1,93	1,49
6.1 i	4,94	0,02	1,70	1,07
6.1 j	4,93	0,00	1,08	0,57

^a Ausreißer

Testvariable	1.1	2.1	4.1
1.1	-	-	-
2.1	signifikant Unterschiedlich P < 5 %	-	-
4.1	kein signifikanter Unterschied	signifikant Unterschiedlich P < 5 %	-
6.1	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied

signifikant Unterschiedlich P < 5 %
 signifikant Unterschiedlich P < 10 %
 kein signifikanter Unterschied

Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

Pflanzensorte `Monarch´

Probenahme: 07.12.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
1.2 a	5,02	0,11	3,23	2,71
1.2 b	4,98	0,00	2,44	1,49
1.2 c	5,04	0,00	2,64	0,75
1.2 d	5,00	0,01	3,91	2,52
1.2 e	5,04	0,00	3,39	4,27
1.2 f	5,03	0,15 ^a	2,90	2,05
1.2 g	5,03		Dotierung	
1.2 h	4,99	0,00	2,65	2,02
1.2 i	5,04	0,03	4,10	6,28 ^a
1.2 j	5,03		Dotierung	
2.2 a	5,03	0,10	5,93 ^a	9,19
2.2 b	4,99	0,18	3,48	4,04
2.2 c	5,01	0,11	2,84	3,61
2.2 d	5,04	0,07	3,04	6,30
2.2 e	5,06	-	-	-
2.2 f	4,97	0,02	2,25	2,61
2.2 g	5,01	0,19	3,68	7,32
2.2 h	5,03	0,00	4,33	6,56
2.2 i	5,00	0,04	1,86	2,17
2.2 j	0,00	-	-	-

^a Ausreißer

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
4.2 a	5,01	0,00	2,29	1,33
4.2 b	4,99	0,06	1,20	1,73
4.2 c	5,01		Dotierung	
4.2 d	0,00		nicht belegt	
4.2 e	5,03	0,70 ^a	3,25	7,18
4.2 f	5,00	0,00	1,62	2,43
4.2 g	4,98	0,04	2,40	3,45
4.2 h	5,01	0,00	1,39	1,27
4.2 i	4,99	0,08	3,20	5,31
4.2 j	5,00	0,10	3,17	6,18
6.2 a	4,97		Keine Daten	
6.2 b	5,00	0,04	2,65	3,24
6.2 c	5,03	0,03	1,22 ^a	0,92
6.2 d	5,02	0,00	1,67	1,97
6.2 e	5,01	0,00	2,19	3,62
6.2 f	5,00	0,00	2,74	5,28 ^a
6.2 g	4,96	0,00	1,90	1,64
6.2 h	5,03	0,00	2,32	2,91
6.2 i	4,96	0,00	2,04	2,58
6.2 j	4,99	0,00	1,95	2,18

^a Ausreißer

Testvariable	1.2	2.2	4.2
1.2	-	-	-
2.2		-	-
4.2			-
6.2			

signifikant Unterschiedlich P < 5 %
 signifikant Unterschiedlich P < 10 %
 kein signifikanter Unterschied

Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

Pflanzensorte 'Prinz'

Probenahme: 25.11.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
1.1 a	5,04	0,00	3,06 ^a	0,91
1.1 b	5,08	0,00	0,69	0,29
1.1 c	5,03	0,00	1,03	0,70
1.1 d	5,04	0,00	0,85	0,53
1.1 e	5,08	0,02 ^a	0,74	0,65
1.1 f	5,08	0,00	0,73	0,45
1.1 g	4,97		Dotierung	
1.1 h	4,96	0,01	1,60	1,62 ^a
1.1 i	5,06	0,00	0,68	0,37
1.1 j	5,06		Dotierung	
2.1 a	5,05	0,06	1,72	2,18
2.1 b	5,08	0,38 ^a	3,74 ^a	6,90 ^a
2.1 c	4,99	0,16	1,54	1,86
2.1 d	4,97	0,02	1,62	1,06
2.1 e	5,08		Dotierung	
2.1 f	5,07	0,03	1,58	1,51
2.1 g	5,07	0,04	2,15	2,85
2.1 h	5,01	0,11	2,79	5,22
2.1 i	5,00	0,15	1,95	2,33
2.1 j	4,98	0,10	2,50	5,17

^a Ausreißer

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
4.1 a	5,04	0,08	1,92	2,02
4.1 b	5,06	0,16	1,67	3,78
4.1 c	5,01		Dotierung	
4.1 d	5,07	0,99 ^a	2,44	5,92
4.1 e	4,99	0,01	2,41	5,35
4.1 f	5,03	0,30	2,57	5,39
4.1 g	5,07	0,71	2,10	5,18
4.1 h	5,07	0,02	1,79	3,86
4.1 i	5,01	0,00	1,14	1,26
4.1 j	5,02	0,27	1,64	2,51
6.1 a	5,08		Dotierung	
6.1 b	4,94	0,00	0,91	0,36
6.1 c	4,95	0,00	0,94	0,98
6.1 d	4,99	0,06	1,25	2,01
6.1 e	5,02	0,00	1,47	2,09
6.1 f	4,98	0,00	1,06	1,33
6.1 g	5,02	0,02	1,48	1,05
6.1 h	5,10	0,17 ^a	1,54	2,09
6.1 i	5,02	0,00	2,22 ^a	4,70 ^a
6.1 j	5,09	0,14	1,04	1,26

^a Ausreißer

Testvariable	1.1	2.1	4.1
1.1	-	-	-
2.1			
4.1			
6.1			

Versuchsreihe *S. sclerotiorum*

Pflanzensorte 'Prinz'

Probenahme: 07.12.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
1.2 a	5,05	0,00	1,91	2,00
1.2 b	5,01	0,02	2,08	1,21
1.2 c	5,00	0,05 ^a	2,12	1,54
1.2 d	4,98	0,00	1,28	0,64
1.2 e	4,97	0,00	1,84	1,31
1.2 f	4,98	0,03	1,65	1,40
1.2 g	4,98		Dotierung	
1.2 h	4,96	0,00	0,96 ^a	0,50
1.2 i	5,02	0,00	1,97	1,17
1.2 j	5,06		Dotierung	
<hr/>				
2.2 a	5,04	0,00	2,77	4,58
2.2 b	5,03	0,00	3,50	5,27
2.2 c	5,00	0,00	2,39	2,78
2.2 d	4,98	0,00	2,21	2,25
2.2 e	5,02		Dotierung	
2.2 f	5,04	0,00	4,16	7,57
2.2 g	5,04	0,00	3,26	5,82
2.2 h	5,00	0,00	4,21	6,85
2.2 i	5,01	0,00	2,86	4,16
2.2 j	5,03	0,00	2,69	3,21

^a Ausreißer

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Blatt Frischgewicht]		
		Psoralen	Bergapten	Xanthotoxin
4.2 a	5,02	0,00	2,79	5,34
4.2 b	5,02	0,15 ^a	4,17	7,52
4.2 c	4,96		Dotierung	
4.2 d	5,02	0,00	2,02	3,68
4.2 e	5,02	0,00	3,28	7,93
4.2 f	4,98	0,00	2,67	3,14
4.2 g	5,02	0,00	3,02	6,64
4.2 h	4,98	0,02	2,36	3,66
4.2 i	5,01	0,04	3,89	3,09
4.2 j	5,00	0,00	2,51	2,93
6.2 a	4,97		Dotierung	
6.2 b	5,01	0,06	2,13	0,68
6.2 c	5,04	0,00	1,92	1,62
6.2 d	4,97	0,03	3,09	4,16
6.2 e	4,98	0,00	1,05	0,89
6.2 f	5,03	0,00	2,68	4,09
6.2 g	5,00	0,00	1,95	1,87
6.2 h	5,00	0,00	1,51	0,93
6.2 i	4,97	0,00	2,42	2,87
6.2 j	5,02	0,00	1,87	2,45

^a Ausreißer

Testvariable	1.2	2.2	4.2
1.2	-	-	-
2.2	signifikant Unterschiedlich P < 5 %	-	-
4.2	signifikant Unterschiedlich P < 10 %	kein signifikanter Unterschied	-
6.2	signifikant Unterschiedlich P < 5 %	signifikant Unterschiedlich P < 5 %	signifikant Unterschiedlich P < 5 %

Versuchsreihe *R. solani*

Pflanzensorte 'Monarch'

Probenahme: 06.12.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
1.3 a	4,99	0,00	0,00	1,32	0,83	2,77	1,99
1.3 b	4,97	0,00	0,00	1,85	2,45	0,61	0,87
1.3 c	5,04	0,16	0,26	3,30	2,98	6,73	6,37
1.3 d	5,03	0,00	0,01	1,57	1,41	1,36	1,21
1.3 e	5,02	0,00	0,07	2,52	2,42	3,34	3,70
1.3 f	4,95	0,00	0,27	4,19	3,86	11,89	12,09
1.3 g	4,99	0,34		4,47		15,05	
1.3 h	4,99	2,72		3,35		5,92	
1.3 i	5,00	0,00		1,70		1,87	
1.3 j	4,97	12,74		3,57		18,49	
3.3 a	5,04	1,04	1,57	2,84	3,49	5,81	6,61
3.3 b	4,98	0,00	0,17	1,07	1,25	1,66	2,07
3.3 c	5,02	0,00	0,00	0,22	0,24	0,04	0,12
3.3 d	5,01	0,00	0,10	1,64	1,48	1,64	1,24
3.3 e	4,97	0,00	0,00	0,75	0,69	0,32	0,66
3.3 f	4,99	0,17	0,40	2,27	2,49	3,77	4,26
3.3 g	4,96	0,00		0,69		0,32	
3.3 h	4,98	0,00		1,55		1,98	
3.3 i	0,00			Nicht belegt			
3.3 j	0,00			Nicht belegt			

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
5.3 a	5,00	0,00	0,00	0,92	1,36	0,61	0,928
5.3 b	4,99	0,00	0,00	0,79	1,26	0,39	0,71
5.3 c	5,01	Dotierung					
5.3 d	4,99	0,00		0,65		0,20	
5.3 e	5,00	0,00		0,97		0,27	
5.3 f	5,00	0,00		0,68		0,36	
5.3 g	4,98	0,00		0,98		0,40	
5.3 h	4,98	0,00		0,32		0,17	
5.3 i	5,04	0,00		0,37		0,19	
5.3 j	4,96	0,00		0,88		0,30	
7.3 a	4,99	Dotierung					
7.3 b	5,02	1,14	1,09	1,04	0,92	1,75	2,09
7.3 c	5,01	0,20		1,11		2,01	
7.3 d	4,99	0,00	0,03	0,52	0,54	0,16	0,24
7.3 e	5,02	0,00		1,64		2,30	
7.3 f	5,01	0,00		0,86		0,96	
7.3 g	4,98	0,00		1,64		2,76	
7.3 h	5,06	0,00		0,52		0,60	
7.3 i	5,02	0,00		0,80		0,56	
7.3 j	4,99	0,00		0,33		0,20	

Versuchsreihe *R. solani*

Pflanzensorte 'Monarch'

Probenahme: 15.12.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
1.4 a	5,00	0,00	0,00	1,53	1,51	0,68	0,71
1.4 b	5,00	0,00	0,01	2,30	2,22	2,28	2,32
1.4 c	5,00	0,00	0,00	2,71	2,65	2,75	2,71
1.4 d	5,00	0,00	0,01	1,93	2,13	0,63	0,64
1.4 e	4,99	0,00	0,01	2,47	2,47	3,72	3,91
1.4 f	5,00	0,00	0,00	2,90	2,70	0,84	0,75
1.4 g	5,01	0,00		4,16		9,25	
1.4 h	5,00	0,00		4,45		5,16	
1.4 i	5,00	0,00		2,79		0,75	
1.4 j	0,00			Nicht belegt			
3.4 a	5,01	0,00	0,07	2,41	2,29	3,01	3,12
3.4 b	5,00	0,00	0,00	1,02	1,04	0,32	0,32
3.4 c	5,00	0,00		1,86		1,06	
3.4 d	5,00	0,00		0,71		0,66	
3.4 e	5,01	0,00		1,14		0,73	
3.4 f	4,99	0,00		2,21		1,29	
3.4 g	5,00	0,00		1,80		1,68	
3.4 h	5,00	0,00		1,03		0,53	
3.4 i	5,00	0,00		1,09		0,33	
3.4 j	5,00	0,00		1,28		0,75	

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
5.4 a	5,00	0,00		0,63		0,24	
5.4 b	4,99	0,00		0,55		0,31	
5.4 c	5,01			Dotierung			
5.4 d	5,00	0,00	0,01	1,98	1,89	1,16	1,07
5.4 e	5,00	0,00		0,50		0,39	
5.4 f	5,00	0,00		0,99		0,49	
5.4 g	5,00	0,00		1,18		0,63	
5.4 h	5,00	0,00		0,67		0,30	
5.4 i	5,00	0,00		0,76		0,22	
5.4 j	5,00	0,00		0,51		0,17	
7.4 a	5,01			Dotierung			
7.4 b	5,01	0,00	0,01	1,18	1,26	0,42	0,38
7.4 c	5,00	0,00		1,63		1,09	
7.4 d	5,01	0,00		2,78		1,07	
7.4 e	5,01	0,00	0,00	1,64	1,68	2,33	2,5
7.4 f	5,00	0,00		1,92		1,49	
7.4 g	5,00	0,00		1,03		1,08	
7.4 h	5,00	0,00		2,13		2,94	
7.4 i	5,00	0,00		1,25		0,26	
7.4 j	5,00	0,00		0,87		0,66	

Versuchsreihe *R. solani*

Pflanzensorte 'Prinz'

Probenahme: 06.12.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
1.3 a	5,01	0,00	0,00	1,03	1,43	0,21	0,32
1.3 b	5,00	2,82	2,71	2,44	2,33	11,63	10,13
1.3 c	5,06	0,00	0,04	2,37	2,26	6,66	6,97
1.3 d	4,96	0,00	0,07	3,16	2,70	9,96	9,26
1.3 e	4,97	0,00	0,03	2,08	2,10	4,97	5,42
1.3 f	5,02	0,00	0,17	2,90	2,73	10,15	10,63
1.3 g	4,96	0,00		2,84		8,13	
1.3 h	5,04	0,00		2,19		4,40	
1.3 i	5,06	0,44		2,30		2,21	
1.3 j	4,99	0,00		2,94		4,26	
3.3 a	5,02	0,00	0,21	1,35	1,80	3,00	4,16
3.3 b	5,06	0,00	0,00	0,49	0,76	0,16	0,24
3.3 c	4,98	0,00	0,12	1,57	1,69	3,06	3,55
3.3 d	5,00	0,00		0,48		0,12	
3.3 e	4,99			Dotierung			
3.3 f	4,98	0,00		0,79		0,65	
3.3 g	4,99	0,36		1,00		3,03	
3.3 h	5,04	0,00		0,49		0,09	
3.3 i	5,02	0,00		0,75		0,48	
3.3 j	5,02	0,00		0,65		1,16	

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
5.3 a	4,99	0,00	0,00	0,26	0,44	0,08	0,15
5.3 b	5,04	0,00	0,00	0,33	0,52	0,23	0,28
5.3 c	5,04	Dotierung					
5.3 d	5,00	0,00		0,44		0,06	
5.3 e	4,99	0,00		0,46		0,33	
5.3 f	5,01	0,00		0,46		0,15	
5.3 g	5,01	0,00		0,38		0,28	
5.3 h	5,04	0,00		0,19		0,00	
5.3 i	5,03	0,00		0,34		0,05	
5.3 j	5,06	0,00		0,27		0,18	
7.3 a	5,00	Dotierung					
7.3 b	5,04	0,00	0,08	0,89	1,26	0,88	1,14
7.3 c	5,04	0,04		1,34		1,25	
7.3 d	5,01	0,00	0,00	0,48	0,51	0,09	0,17
7.3 e	5,02	0,00	0,09	2,00	2,01	3,81	4,35
7.3 f	5,01	0,00		1,16		1,34	
7.3 g	5,00	0,00		0,63		0,59	
7.3 h	5,01	0,00		0,43		0,28	
7.3 i	5,02	0,00		0,86		1,23	
7.3 j	5,03	3,02		1,39		3,68	

Versuchsreihe *R. solani*

Pflanzensorte 'Prinz'

Probenahme: 15.12.2011

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
1.4 a	5,00	0,00	0,00	0,89	0,89	0,30	0,45
1.4 b	5,00	0,00	0,00	4,05	4,00	9,42	10,21
1.4 c	5,00	0,00	0,00	1,32	1,24	0,54	0,54
1.4 d	5,00	0,00	0,00	1,38	1,27	0,24	0,00
1.4 e	5,00	0,00	0,00	1,08	1,06	0,23	0,00
1.4 f	5,00	0,00	0,02	2,36	2,12	1,28	1,21
1.4 g	5,00	0,00		1,07		0,32	
1.4 h	5,01	0,88		1,61		3,18	
1.4 i	5,00	0,00		1,81		1,05	
1.4 j	0,00			Nicht belegt			
3.4 a	5,00	0,00		0,84		0,98	
3.4 b	5,00	0,00	0,00	0,33	0,34	0,06	0,16
3.4 c	5,00	0,00		0,90		1,11	
3.4 d	5,01	0,00		1,52		0,69	
3.4 e	5,01	0,00		0,74		0,42	
3.4 f	5,00	0,00		1,10		1,26	
3.4 g	5,00	0,00		0,67		0,07	
3.4 h	5,01	0,00		1,07		0,88	
3.4 i	5,00	0,00		2,26		6,17	
3.4 j	0,00			Nicht belegt			

Probe	Einwaage [g]	Gehalt [$\mu\text{g/g}$ Knolle Frischgewicht]					
		Psoralen		Bergapten		Xanthotoxin	
		HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS	HPLC	LC-MS
5.4 a	5,01	0,00		0,39		0,06	
5.4 b	5,01	0,00		0,18		0,04	
5.4 c	5,01			Dotierung			
5.4 d	5,00	0,00		0,27		0,05	
5.4 e	4,99	0,00		0,24		0,09	
5.4 f	5,00	0,00		0,26		0,00	
5.4 g	4,99	0,00		0,32		0,09	
5.4 h	5,01	0,00		0,29		0,09	
5.4 i	5,01	0,00		0,16		0,06	
5.4 j	5,00	0,00		0,29		0,11	
7.4 a	5,01			Dotierung			
7.4 b	5,01	0,00		0,55		0,24	
7.4 c	5,00	0,00		0,76		0,30	
7.4 d	5,00	0,00		0,39		0,08	
7.4 e	5,00	0,00		0,78		0,80	
7.4 f	5,00	0,00		1,46		0,52	
7.4 g	5,01	0,00		1,44		1,56	
7.4 h	5,00	0,00		0,54		0,01	
7.4 i	5,00	0,00		0,36		0,00	
7.4 j	5,00	0,00		0,35		0,11	

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andy Hintenaus, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde an keiner weiteren Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Andy Hintenaus

Halle (Saale), 26.April 2012

„Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft“ erscheinen seit 1995 in zwangloser Folge

Seit 2008 werden sie unter neuem Namen weitergeführt:
„Berichte aus dem Julius Kühn-Institut“

- Heft 145, 2008: NEPTUN 2007 – Zuckerrüben. Dietmar Roßberg, Erwin Ladewig, Pavel Lukashyk, 44 S.
- Heft 146, 2009: Chronik zum 75jährigen Jubiläum des Instituts für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland. Bärbel Schöber-Butin, 47 S.
- Heft 147, 2009: NEPTUN 2007 – Obstbau. Dietmar Roßberg, 71 S.
- Heft 148, 2009: 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. July 5 – 10, 2009, Neustadt, Germany, 92 S.
- Heft 149, 2009: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz – Jahresbericht 2008. Bearbeitet von: Bernd Freier, Bernhard Pallutt, Marga Jahn, Jörg Sellmann, Volkmar Gutsche, Wolfgang Zornbach, Eckard Moll, 64 S.
- Heft 150, 2009: NEPTUN 2008 – Hopfen. Dietmar Roßberg, 17 S.
- Heft 151, 2010: NEPTUN 2009 – Weinbau. Dietmar Roßberg, 19 S.
- Heft 152, 2010: NEPTUN 2009 – Zuckerrübe. Dietmar Roßberg, Eike-Hennig Vassel, Erwin Ladewig, 45 S.
- Heft 153, 2010: NEPTUN 2009 – Gemüsebau. Dietmar Roßberg, 72 S.
- Heft 154, 2010: Bewertung der Resistenz von Getreidesortimenten: Planung und Auswertung der Versuche mit Hilfe der SAS-Anwendung RESI 2. Eckard Moll, Kerstin Flath, Ines Tessenow, 109 S.
- Heft 155, 2010: Biofumigation als Pflanzenschutzverfahren: Chancen und Grenzen. Beiträge des Fachgesprächs vom 5. Mai 2010 in Bonn-Roleber. Bearbeitet von: Johannes Hallmann, Johannes Keßler, Rita Grosch, Michaela Schlathöler, Florian Rau, Wolfgang Schütze, Matthias Daub, 102 S.
- Heft 156, 2010: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz - Jahresbericht 2009. Bearbeitet von: Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jürgen Schwarz, Marga Jahn, Eckard Moll, Volkmar Gutsche, Wolfgang Zornbach. Unter Mitwirkung von: Anita Herzer, Merle Sellenriek, Rene Brand, Benita Burghardt, Christiane Seidel, Florian Kluge, Ute Müller, Christina Wagner, Christoph Hoffmann und den Pflanzenschutzdiensten der Länder, 83 S.
- Heft 157, 2010: Drittes Nachwuchswissenschaftlerforum 2010; 23. - 25. November in Quedlinburg - Abstracts , 47 S.
- Heft 158, 2010: 14. Fachgespräch: „Pflanzenschutz im Ökologischen Landbau – Probleme und Lösungsansätze“. Phosphonate. Bearbeitet von Stefan Kühne, Britta Friedrich, 34 S.
- Heft 159, 2011: Handbuch. Berechnung der Stickstoff-Bilanz für die Landwirtschaft in Deutschland, Jahre 1990 – 2008. Martin Bach, Frauke Godlinski, Jörg-Michael Greef, 28 S.
- Heft 160, 2011: Die Version 2 von FELD_VA II und Bemerkungen zur Serienanalyse. Eckard Moll, 34 S.
- Heft 161, 2011: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz - Jahresbericht 2010 - Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2010. Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jürgen Schwarz, Marga Jahn, Eckard Moll, Volkmar Gutsche, Wolfgang Zornbach, 86 S.
- Heft 162, 2011: Viertes Nachwuchswissenschaftlerforum 2011 - Abstracts - , 62 S.
- Heft 163, 2012: Bewertung und Verbesserung der Biodiversität leistungsfähiger Nutzungssysteme in Ackerbaugebieten unter Nutzung von Indikatorvogelarten. Jörg Hoffmann, Gert Berger, Ina Wiegand, Udo Wittchen, Holger Pfeffer, Joachim Kiesel, Franco Ehlert, 215 S. , Ill., zahlr. graph. Darst.
- Heft 164, 2012: Fachgespräch: „Kupfer als Pflanzenschutzmittel“ Berlin-Dahlem, 1. Dezember 2011. Bearbeitet von Stefan Kühne, Britta Friedrich, Peter Röhrig, 102 S.
- Heft 165, 2012: Nationaler Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln – Bericht 2008 bis 2011. Bernd Hommel, 162 S.
- Heft 166, 2012: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz - Jahresbericht 2011 - Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2011. Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jürgen Schwarz, Bettina Klocke, Eckard Moll, Volkmar Gutsche, Wolfgang Zornbach, 104 S.
- Heft 167, 2012: Fünftes Nachwuchswissenschaftlerforum 2012, 4. - 6. Dezember in Quedlinburg, 50 S.

