

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“



Forschungsbericht

Nr. 110

Untersuchungen zum Vorkommen von Mycotoxinen bei
Auftreten der Rußfleckenkrankheit an Apfelfrüchten

Verfasser:

Thomas Feldmann, Bernhard Oertel, Ulrike Steiner und Georg Noga

Institut für Gartenbauwissenschaft

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2297; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, September 2003

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Georg Noga
Priv.-Doz. Dr. Ulrike Steiner

Projektbearbeiter: Dipl.-Ing.agr. Thomas Feldmann
Dr. Bernhard Oertel

Institut für Gartenbauwissenschaft
Auf dem Hügel 6
D-53121 Bonn
Telefon: +49 (0)228 - 73 51 35

Zitiervorschlag:

FELDMANN, T., OERTEL, B., STEINER, U. UND NOGA, G. (2003): Vorkommen von Mycotoxinen bei Auftreten der Rußfleckenkrankheit an Apfelfrüchten? Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 110, 47 Seiten.

Abkürzungen

A. demin.	demineralisiertes Wasser	PDA	Potato Dextrose Agar
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	ppb	parts per billion
CA	Controlled Atmosphere	ppm	parts per million
DAS	Diacetoxyscirpenol	PTFE	Polytetrafluorethylen
DON	Deoxynivalenol	rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
ECD	Electron Capture Detection	RT	Retentionszeit
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	sp.	species/ Art
ESI	Electrospray ionization	T-2	T-2 Toxin
HHB	Halbhöhenbreite	T-2 d ₃	T-2 Toxin dreifach deuteriert
HPLC	High performance liquid chromatography	TIN	Trichothecin
HPLC-ESI(-/+)-MS/MS	HPLC-Messung mit ESI-Ionenquelle zuerst im Negativmodus, anschließend im Positivmodus	TON	Trichothecolon
HRGC	High Resolution Gas Chromatography	UV	ultra-violett
LC	Liquid Chromatography	VOL	Verrucarol
LD ₅₀	Letale Dosis für 50 % der Testorganismen	∅	Durchmesser
Min	Minute		
ml	Milliliter		
mMol	Millimol		
MRM	Multiple Reaction Monitoring		
MS	Mass Spectrometry/ Massenspektrometrie		
NIV	Nivalenol		
NWG	Nachweisgrenze		
p. A.	pro analysi / zur Analyse		

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Aktueller Wissensstand bezüglich der Rußfleckenkrankheit an Apfel	1
1.3	Trichothecene	4
1.3.1	Einordnung und Struktur	4
1.3.2	Biosynthese der Trichothecene	5
1.3.3	Toxizität und Grenzwerte	6
1.4	Analytischer Nachweis	10
1.4.1	Stand der Technik in der Trichothecen-Analytik	10
1.4.2	Auswahlkriterien für die Analysenmethode	10
1.4.3	Eignung der HPLC/MS/MS zum Nachweis der Trichothecene	11
1.5	Zielsetzung	12
2.	Material und Methoden	12
2.1	Analysenmethode HPLC/MS/MS	12
2.1.1	Standards	12
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	HPLC-Auftrennung und Detektion	13
2.1.4	Quantifizierung	15
2.2	Pilzkulturen-Sammlung	19
2.2.1	Bezeichnung der Erreger bzw. Pilzisolate	19
2.2.2	Herstellung der Kulturmedien	21
2.2.3	Kultivierung der Pilze	21
2.3	Untersuchung von Flüssigkulturen der Pilzisolate	21
2.3.1	Auswahl der Pilzisolate und Ansetzen der Flüssigkulturen	21

2.3.2	Probenaufbereitung und Extraktion	22
2.4	Untersuchung von mit Rußfleckerregern inokulierten Äpfeln	23
2.4.1	Auswahl der Pilzisolat e und Inokulation der Äpfel	23
2.4.2	Gefriertrocknung und Mahlvorgang	23
2.4.3	Probenaufbereitung und Extraktion	24
2.5	Untersuchung von Apfelschalen frischer Äpfel mit Rußflecken- symptomen	24
2.5.1	Probenauswahl, Gefriertrocknung, Mahlvorgang, Proben- aufbereitung und Extraktion	24
2.6	Untersuchung von Apfelsäften	24
2.6.1	Probenauswahl	24
2.6.2	Probenaufbereitung und Extraktion	25
2.7	Untersuchung von Apfelmus	25
2.7.1	Probenauswahl	25
2.7.2	Probenaufbereitung und Extraktion	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Analysenmethode HPLC/MS/MS	26
3.1.1	Extraktion und Probenaufbereitung	26
3.1.2	HPLC-Auftrennung und Detektion mittels ESI(-/+)-MS/MS	26
3.2	Untersuchung von Flüssigkulturen der Pilzisolat e	28
3.3	Untersuchung von mit Rußfleckerregern inokulierten Äpfeln	30
3.4	Untersuchung von Apfelschalen frischer Äpfel mit Rußflecken- symptomen	30
3.5	Untersuchung von Apfelsäften	31
3.6	Untersuchung von Apfelmus	32
4.	Diskussion	32
5.	Zusammenfassung	35
6.	Schlussfolgerungen für die Umsetzung in die Praxis	37

7.	Literaturverzeichnis	38
8.	Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten	43
9.	Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte	43
10.	Liste über Veröffentlichungen	43
11.	Liste über Vorträge	43
12.	Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen	43
13.	Kurzfassung	44

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Sowohl im Bodenseegebiet als auch im Rheinland ist in zunehmendem Maße das Auftreten rußfleckenkranker Äpfel zu beobachten. Diese Schalenkrankheit trat überwiegend in Anlagen des organischen Apfelanbaus auf, wobei die Rußfleckenpilze mit den dort zugelassenen Spritzmitteln, wie z.B. Kupfer, nicht zu bekämpfen sind. Es sind allerdings auch Anlagen der integrierten Produktionsweise betroffen, sofern der Fungizid-Einsatz sehr stark reduziert ist, oder schorffresistente Sorten angebaut werden, die einen Verzicht auf Fungizid-Spritzungen ermöglichen. Bei einem Teil der schorffresistenten Sorten konnte allerdings auch eine geringere Anfälligkeit beobachtet werden (mündl. Mitt. S. KERN). Auch der Streuobstanbau ist betroffen, da bekanntlich Fungizidspritzungen bei Hochstämmen in der Regel gar nicht erfolgen, zumal sie den ökologischen Wert der Streuobstwiesen gefährden würden. In Intensivanlagen mit schorfanfälligen Apfelsorten, die mit Fungiziden behandelt werden, können die Rußflecken-Erreger erfolgreich kontrolliert werden und stellen zumindest dort kein Problem dar.

Untersuchungen aus den USA weisen darauf hin, dass es sich zumindest bei *Peltaster fructicola* Johnson, Sutton und Hodges um einen potentiellen Mycotoxinbildner handelt, da der Pilz in der Lage sein soll, die Mycotoxine Trichothecolon und Trichothecolon-Acetat aus der Gruppe der Typ-B-Trichothecene zu bilden (VENKATASUBBAIAH et al. 1995). Beunruhigend daran ist, dass die beiden vorgenannten, in Flüssigkultur produzierten Mycotoxine toxikologisch bedenklich sind (SMITH et al. 1985; DEUTSCHE GES. FÜR ERNÄHRUNG 1996). Es ist wie immer bei Naturstoffen damit zu rechnen, dass unter Praxisbedingungen neben den beiden zuvor genannten Substanzen weitere Trichothecene auf den Früchten gebildet werden. Bisläng sind etwa 170 Trichothecene bekannt, die von unterschiedlichen Pilzen produziert werden (SCHÜTTE 2001). Es bleibt die Frage zu klären, ob die Erreger der Rußfleckenkrankheit in der Lage sind, weitere Mycotoxine, denen der gleiche Biosyntheseweg zugrunde liegt, zu bilden.

1.2 Aktueller Wissenstand bezüglich der Rußfleckenkrankheit an Apfel

Die Rußfleckenkrankheit an Apfel (engl. sooty blotch disease of apple) ist eine von (phytopathogenen) Pilzen hervorgerufene Krankheit, die häufig in den feuchten, gemäßigten Klimazonen der Welt auftritt (WILLIAMSON et al. 2000). In Deutschland kommt die Krankheit am häufigsten in den feuchtwarmen Anbaugebieten, wie z.B. im Bodenseegebiet oder im Rheinland, vor. Sie ist allerdings in allen Regionen, in denen Apfel angebaut werden, anzutreffen (KERN 2002). Obwohl die Krankheit selbst zu keinen Ernteverlusten führt (WILLIAMSON et al 2000), kommt es zu einer deutlichen Beeinträchtigung der äußeren Fruchtqualität, ganz besonders bei Apfelsorten mit heller Schalenfarbe, die eine Vermarktung

der befallenen Äpfel nach den EU-Qualitätsnormen ausschließt, was wiederum beachtliche, ökonomische Verluste bei den Anbauern nach sich zieht (NOGA et al. 2001).

Symptomatik

Die Rußfleckenkrankheit an Apfel (*Malus x domestica* Borkh.) äußert sich durch grünlich-schwarze, verwaschene Flecken unterschiedlicher Größe auf der Fruchtoberfläche, die selbst durch kräftiges mechanisches Abreiben nur unzureichend zu entfernen sind (Abb. 1). Die Kolonien variieren in Farbe, Form und Größe, in Abhängigkeit der jeweiligen Pilze, die auf der Apfelkutikula präsent sind. Sie bestehen aus einem Mycelnetzwerk, das teilweise Fruchtkörper in Form von Pycnothyrien und einzelne Konidiophore produzieren kann. Die einzelnen Pilzarten unterscheiden sich sowohl in Anzahl, Größe und Anordnung der Fruchtkörper, als auch in der Art des Mycelwachstums. Die Kolonien variieren von olivgrün bis schwarz und können klein und ringförmig, oder groß und diffus sein. Einige Kolonien bedecken einen großen Teil der Frucht als Folge sekundärer Ausbreitung über Konidien, wohingegen andere Kolonien einzeln bleiben und sich nicht ausbreiten (GROVES 1933; JOHNSON et al. 1997).



Abb. 1: Apfelfrucht, befallen mit Erregern der Rußfleckenkrankheit

Ätiologie

Erstmals beschrieb v. Schweinitz 1832 Symptome der Rußfleckenkrankheit auf der Oberfläche reifer Äpfel der Sorte 'Newton Pippin' in Pennsylvania, USA (SCHWEINITZ 1832). Er ging davon aus, dass es sich um einen singulären Erreger handelte und gab ihm den Namen *Dothidea pomigena*. Sprague überführte 1856 die Pilzart in die viel besser passende Coelomyceten-Gattung *Asteroma* und nannte sie *Asteroma pomigena* Schw. (SPRAGUE 1856). Der Name wurde anschließend 1883 von Saccardo in *Phyllachora pomigena* (Schw.) Sacc. geändert (SACCARDO 1883). *Phyllachora pomigena* wurde in der Literatur als wissenschaftlicher Name für den Pilz, der die Rußfleckenkrankheit verursacht, bis ins frühe 20. Jahrhundert benutzt. Colby (1920) führte eine umfangreiche Untersuchung der Krankheit durch und folgerte, dass die Rußfleckenkrankheit und die Fliegenschmutzkrankheit von unterschiedlichen Pilzen verursacht werden. Aufgrund der Vielfalt der verwirrenden Angaben in der Literatur etablierte er die neue Gattung, *Gloeodes nov. gen.*, um dem Rußfleckenpilz an Apfel einzuordnen, dem er den Namen *Gloeodes pomigena* (Schw.) Colby gab. Es war ebenfalls Colby (1920), der der Rußfleckenkrankheit den bis dahin am häufigsten und bis heute verwendeten Namen „sooty blotch“ gab. Er (COLBY 1920) beobachtete deutliche Unterschiede beim Wachstum von *G. pomigena* auf Apfelfrüchten und beschrieb drei Myceltypen: farnartig (fern-like), wabenartig (honeycomb) und netzartig (reticulate).

Groves (GROVES 1933) beschrieb die Myceltypen erneut und benannte sie um: Ramose (farnartig), punctate (punktiert), fuliginous (netzartige und wabenartige Typen) und rimate. Obwohl Groves (GROVES 1933) und nachfolgende Wissenschaftler (HICKEY 1960; SUTTON et al. 1994) beachtliche Unterschiede bei den Symptomen der Rußfleckenkrankheit beobachteten, wurde *G. pomigena* als alleinige Ursache der Rußfleckenkrankheit bis 1996 akzeptiert, bis Johnson, Sutton und Hodges (JOHNSON et al. 1996) zeigten, dass die Rußfleckenkrankheit in den USA von einem Erregerkomplex von mindestens drei verschiedenen Pilzen verursacht wird. *Peltaster fructicola* Johnson, Sutton und Hodges (JOHNSON et al. 1996 und 1997) wurde als eine neue Art beschrieben und mit den Kolonien vom „ramose-Myceltyp“ assoziiert. Neueste Studien haben gezeigt, dass er jedoch mit den punktierten Kolonien hätte assoziiert werden müssen (WILLIAMSON et al. 2000). *Leptodontidium elatius* (Magenot) de Hoog (DE HOOG 1977) wurde mit dem „fuliginous-Myceltyp in Verbindung gebracht (JOHNSON et al. 1997), und *Geastrumia polystigmatis* Batista & M. L. Farr (Pir) wurde mit dem ramose-Myceltyp assoziiert (JOHNSON et al. 1996 und 1997). Johnson, Sutton und weitere Forscher (JOHNSON et al. 1997) waren nicht in der Lage, in einer großen Sammlung von Früchten aus North Carolina und sieben anderen östlichen Staaten der USA einen Pilz nachzuweisen, auf den die Beschreibung von *Gloeodes pomigena* zutrifft.

In Deutschland wurde in der Zeit von 1998 bis 2000 ebenfalls eine umfangreiche Untersuchung an Äpfeln, die Symptome der Rußfleckenkrankheit zeigten, durchgeführt. S. Kern, U. Steiner & B. Oertel (unveröff.), G.S. de Hoog (briefl. Mitteil.) und NOGA et al. 2001 konnten neben bislang unbestimmten und fraglichen Anamorphen der Gattung *Mycosphaerella* und den beiden *Tripaspermum*-Arten *Tr. myrti* (Lind.) Hughes und *Tr. camelopardus* Ingold, Dann & McDougall die Arten *Phialophora sessilis* de Hoog und

Peltaster fructicola Johnson, Sutton & Hodges genau charakterisieren. *Peltaster fructicola* wurde somit erstmals für Europa nachgewiesen. Die Konidienansatzstellen sind bei *Phialophora* als Kollarette und bei *Peltaster* als einfache Stümpfe ausgebildet. Außerdem fällt *Peltaster* durch seine eigentümlichen, dunkelfarbigem, schildförmigen Fruchtkörper auf, die in der Literatur Pycnothyrien genannt werden und die in diesem speziellen Fall die Konidien auf der unteren Seite des Schildes, d.h. abwärts gerichtet, ausbilden (inverse Pycnothyrien) (NOGA et al. 2001, unpublizierte Daten).

Wirte

Pilze, die mit der Rußfleckenkrankheit assoziiert werden, wachsen auf einer ganzen Reihe von Pflanzen, z.B. an Bäumen, Sträuchern und Kletterpflanzen, die sich in der Nähe einer Apfelplantage befinden können (BAINES 1932; COLBY 1920; GARDNER 1931; HICKEY 1960; ZARING 1929). Baines und Gardner (1932) isolierten die in Zweifel gezogene Art "*Gloeodes pomigena*" an *Malus domestica* Borkh, *Malus sylvestris* (L) Mill. und Zweigen von 23 anderen Wirten. Alle diese Forscher glaubten, dass sie mit *Gloeodes pomigena* über einen klar definierten pilzlichen Organismus verfügten. Wie jedoch oben dargelegt wurde, handelt es sich hierbei um eine in Frage zu stellende Bezeichnung (vgl. auch JOHNSON et al. 1997). So können die genannten Beobachtungen aus den Jahren 1920 - 1960 nur als vorläufig und als nicht korrekt eingestuft werden.

Krankheitsentwicklung und Epidemiologie

Details der Lebenszyklen von *Peltaster fructicola*, *Leptodontidium elatius*, *Geastrumia polystigmatis*, *Tripospermum myrti*, *Tripospermum camelopardus* und *Phialophora sessilis* sind unbekannt. Diese Pilze überwintern eventuell an Apfelzweigen oder abgefallenen Mumien von Apfelfrüchten oder aber auch an anderen Gehölzen, die als Zwischenwirte fungieren können. Konidien oder Mycelfragmente breiten sich über Wind und Regen aus, um im Frühling und Frühsommer sich entwickelnde Apfelfrüchte und frisches Gewebe der Zwischenwirte zu befallen (JONES 1996; WILLIAMSON et al. 2000).

1.3 Trichothecene

1.3.1 Einordnung und Struktur

In Abhängigkeit von ihrem Biosyntheseweg werden Trichothecene in vier Gruppen eingeteilt und als Typ A-, B-, C- und D-Trichothecene bezeichnet. Ihre chemische Grundstruktur besteht aus drei Ringsystemen mit einer zusätzlichen Epoxygruppe in Position C(12). Typ B Trichothecene unterscheiden sich von Typ A-Trichothecenem dadurch, dass sich in C(8)-Position eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe befindet. Etwa 100 der bekannten Toxine zählen zur Gruppe der Typ A- oder Typ B-Trichothecene. Merkmal von Typ C-Trichothecenem ist ein zusätzlicher Oxiranring in Position C(7) und C(8). Bei den Typ D-Trichothecenem sind die Substituenten in Position C(4) und C(15) verbunden und bilden einen Makroring mit 18 Ringatomen (BERGER 2000).

1.3.2 Biosynthese der Trichothecene

Die Biosynthese der Trichothecene ist in dieser Abhandlung von Trichodien an beginnend dargestellt (Abb. 2). Trichodien ist ein Naturstoff, der erstmals von *Trichothecium roseum* isoliert wurde. Die Abfolge von Oxygenierungs-Schritten, Isomerisierungen, Cyclisierungen und Veresterungen wandeln Trichodien in die komplexeren Trichothecen-Toxine wie beispielsweise Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin um. Dies wurde durch Experimente mit *Fusarium sporotrichioides*, *Gibberella pulicaris* und *Fusarium culmorum* in mehreren Labors in den USA, Kanada und England festgestellt. Die Reihenfolge der Oxygenierungs-Schritte der Trichothecen-Biosynthese (dargestellt am Beispiel von *Fusarium sporotrichioides* und *Gibberella pulicaris*) ist: C-11 (Isotrichotriol) → C-9 (Trichotriol → Isotrichodermol) → C-15 (Didecalonectrin) → C-4 (Diacetoxyscirpenol) → C-8 (Neosolaniol → T-2 Toxin) (DESJARDINS et al. 1993). Ausführlichere Beschreibungen der Trichothecen-Biosynthese finden sich bei DESJARDINS et al. (1993), HOHN et al. (1998) und SCHÜTTE (2000).

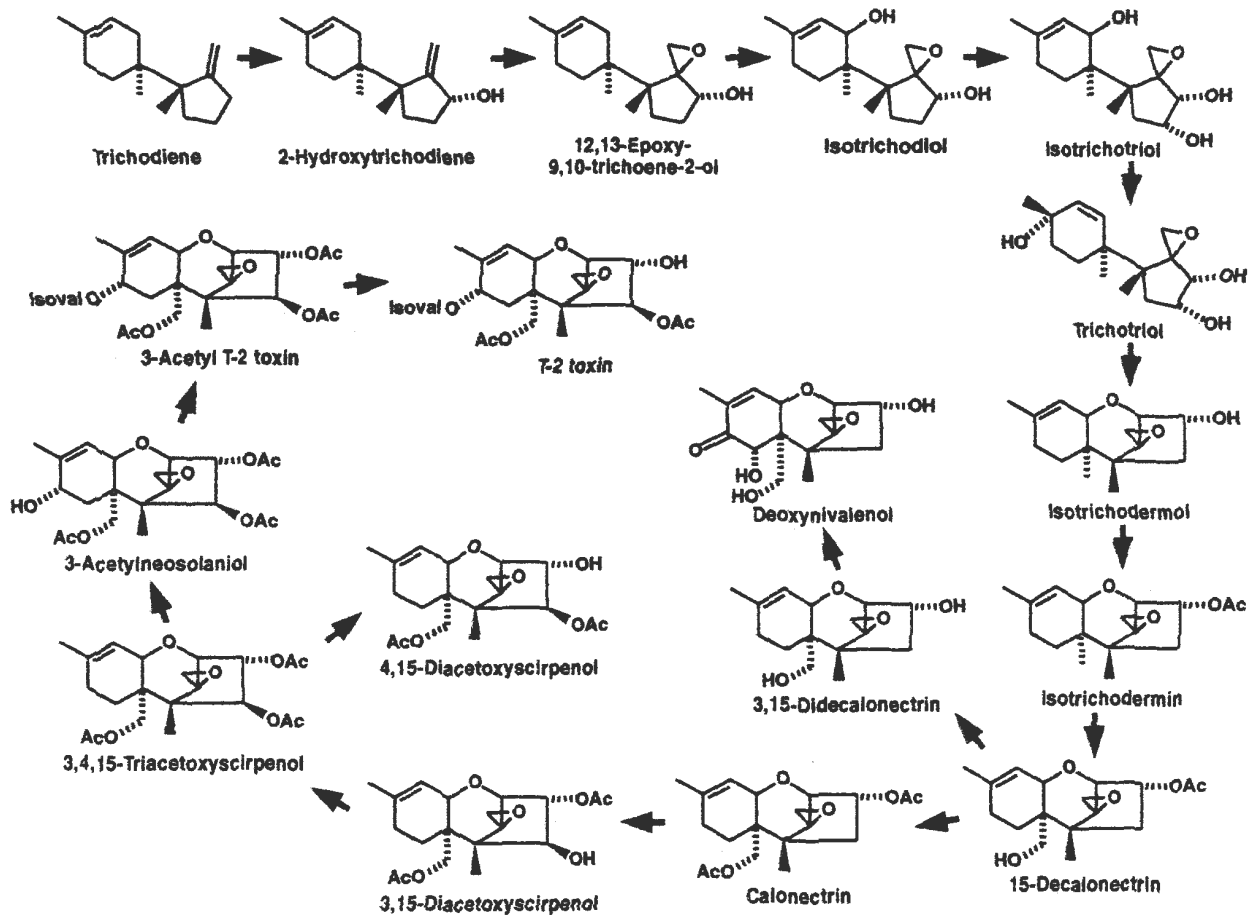


Abb. 2: Biosynthese-Weg der Trichothecene

1.3.3 Toxizität und Grenzwerte

Toxizität

Die Vielfalt der Trichothecen-Strukturen hat naturgemäß sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eine ganze Reihe von unterschiedlichen toxischen Effekten zur Folge. Werden die Toxine mit der Nahrung aufgenommen, so werden der Verdauungstrakt, das Nervensystem, die Blutbildung, das Knochenmark u.a. angegriffen. Durch Unterdrückung der Proteinsynthese und Wechselwirkung mit den Zellmembranen kommt es zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems (PESTKA et al. 1994). Infolge der Schwächung des Immunsystems lässt die körpereigene Abwehr nach, und Sekundärinfektionen durch Bakterien und Viren treten auf. Zahlreiche Todesfälle sind auf diese Sekundärinfektionen zurückzuführen. Schweine und andere Monogastrier, inklusive der Species Mensch, reagieren am empfindlichsten auf Trichothecene. Erste Reaktionen sind Nahrungsverweigerung und Unwohlsein. Im weiteren Verlauf kann es zu Erbrechen, Durchfall und Teilnahmslosigkeit kommen (PRELUSKY et al. 1994). Die Toxizität von Trichothecenen nimmt mit der Anzahl der Estergruppierungen je Molekül zu. So ist beispielsweise T-2 Toxin (extrem toxisch; 3 Estergruppen) weitaus giftiger als Trichothecin (1 Estergruppe), und Trichothecin ist wiederum toxischer als Trichothecolon (0 Estergruppen) (NISHIE et al. 1989).

Typ B-Trichothecene

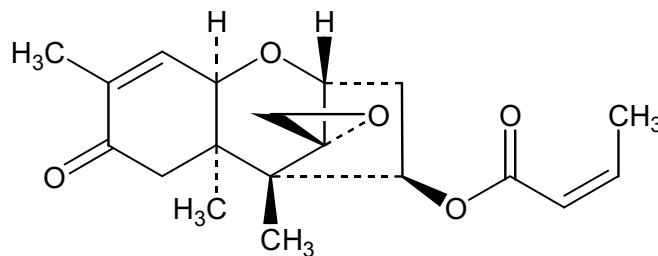


Abb. 3: Strukturformel von Trichothecin

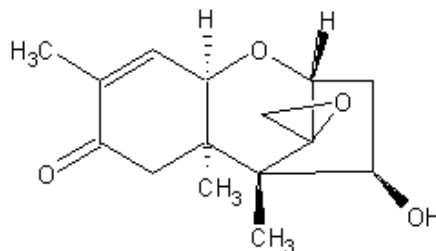


Abb. 4: Strukturformel von Trichothecolon

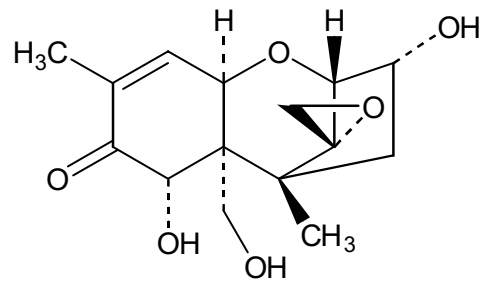


Abb. 5: Strukturformel von Nivalenol

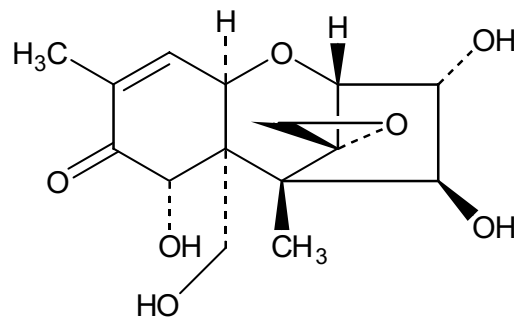


Abb. 6: Strukturformel von Deoxynivalenol

Typ A-Trichothecene

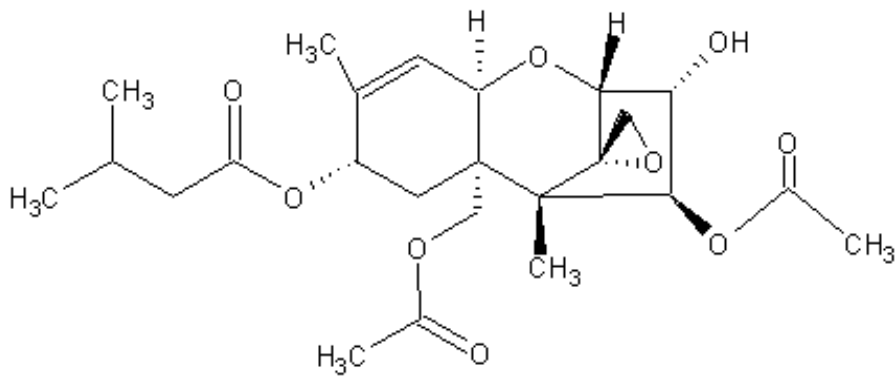


Abb. 7: Strukturformel von T-2-Toxin

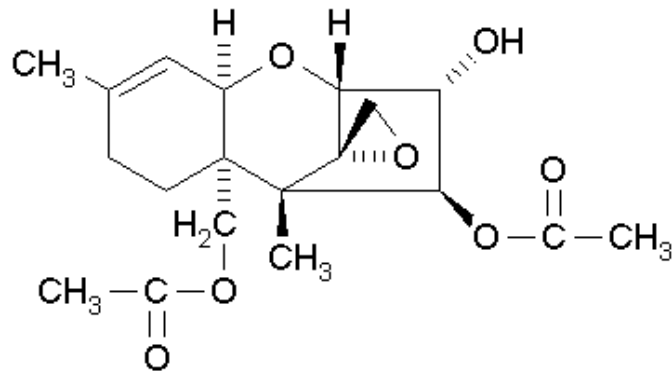


Abb. 8: Strukturformel von Diacetoxyscirpenol

Die nachfolgende Tab. 1 zeigt, bei welchen Mengen und welcher Verabreichungsform 50 % der Testorganismen gestorben sind. Eine sehr detaillierte Liste mit Angaben zur Toxizität von Trichothecenen findet sich bei TRENHOLM, H. L. et al. (1990) sowie bei BETINA (1989).

Tab. 1 LD₅₀-Werte von Trichothecenen; Quellen: 1 – COLE and COX, 1981, 2 – UENO, 1983, 3 – TATSUNO et al., 1968, 4 – TAMM and TORI, 1984, 5 – GLATZ et al., 1966, 6 – Toxicol. Appl. Pharmacol. (1975) 31, 465 1975;

Mycotoxin	LD ₅₀	Tier	Verabreichung	Literatur
Deoxynivalenol	70 mg / kg	Maus	intraperitoneal	1
Diacetoxyscirpenol	23,0 mg / kg	Maus	intraperitoneal	2
	0,75 mg / kg	Ratte	intraperitoneal	2
	7,3 mg / kg	Ratte	oral	2
Nivalenol	4,1 mg / kg	Maus	intraperitoneal	3
T-2 Toxin	3,04 mg / kg	Maus	intraperitoneal	1
	4,0 mg / kg	Ratte, Schwein	oral	1
T-2 Toxin-d ₃	3,8 mg / kg	siehe T-2 Toxin	siehe T-2 Toxin	1
Trichothecin	250 mg / kg	Maus	subkutan	4
Trichothecolon	100 mg / kg	Maus	intraperitoneal	5
Verrucarol	20 mg / kg	Hähnchen	oral	6

Grenzwerte

Einige Länder geben Grenzwerte für einzelne Mycotoxine bei getreidehaltigen Lebensmitteln vor; eine weltweite, standardisierte Gesetzgebung gibt es für Trichothecene jedoch nicht. Einer internationalen Erhebung zufolge, die 1994 und 1995 von der Food and Agriculture Organization der Vereinten Nationen (FAO 1997; ROSNER et al. 1995) durchgeführt wurde, gibt es Grenzwerte in Brasilien, Frankreich, Holland, Kanada, Österreich, Rumänien, Russland, Ungarn, Uruguay und den USA. In Abhängigkeit von dem jeweiligen Produkt bewegen sie sich im Bereich zwischen 5 ppb und 10 ppm. Ein typischer Grenzwert für Deoxynivalenol-Gehalte bei Getreide, welches der menschlichen Ernährung dienen soll, liegt bei 500 ppb. In der EU und somit auch in Deutschland gibt es Diskussionen über die einheitliche Einführung von Grenzwerten für Deoxynivalenol und T-2 Toxin.

Tab. 2 Grenzwerte für die *Fusarium*-Mycotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON); Quelle: (FAO 1997; ROSNER et al. 1995);

Land	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ZON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Produkt
Österreich	500	60	Weizen und Roggen
	750	60	Hartweizen
Brasilien	-	200	Mais
Kanada	2000	-	ungereinigter Weichweizen,
	1000	-	(für Babynahrung vorgesehen)
Frankreich	-	200	Mais, kleine Getreidekörner
Ungarn	-	50	für alle Lebensmittel
Rumänien	-	30	für alle Lebensmittel
Russland	500	-	Weizen (außer Hartweizen)
	1000	-	Hartweizen
	-	1000	Getreide, Salatöl
Uruguay	-	200	Mais, Gerste
USA	1000	-	verarbeitete Getreideprodukte

1.4 Analytischer Nachweis

1.4.1 Stand der Technik in der Trichothecen-Analytik

Für den Nachweis von Trichothecenen in Apfelfrüchten und Apfelprodukten wie z.B. Apfelsaft ist eine empfindliche Analysetechnik notwendig. Mit konventionellen Methoden stellt die Isolierung und Quantifizierung der Mycotoxine ein arbeits- und zeitaufwendiges Verfahren dar. Zur sicheren Identifizierung und Quantifizierung von Trichothecenen in den unterschiedlichsten Matrices existieren verschiedene Analysemethoden (GILBERT 1993; LANGSETH et al. 1998; KRŠKA et al. 2001; LIN et al. 1998; SCOTT 1995). Aufreinigungsverfahren (KRŠKA 1998) umfassen Flüssig-Flüssig Auftrennung, Festphasenextraktion, Flüssigchromatographie auf Multilayer-Säulen (ROMER 1986), Immunoaffinitätssäulen sowie Supercritical Fluid Extraktion (Berger et al. 2000). Für die Abtrennung von Trichothecenen werden die Dünnschichtchromatographie, die HPLC oder die High Resolution Gas Chromatography (HRGC) angewendet. Die HRGC bedarf einer Derivatisierung der Hydroxygruppen zu Trifluoroacetyl-, Heptafluorobutyryl- oder Trimethylsilyl-Derivaten. Die Dünnschicht-Chromatographie wird in Verbindung mit den unterschiedlichsten Analysetechniken verwendet (LIN et al. 1998). Trichothecene (des A-Typs) enthalten nur eine einzeln olefinische Doppelbindung und zwei davon entfernt stehende Ether-Strukturen im Molekül und zeigen auf Grund dieser schwachen Chromophore im UV-Detektor konventioneller HPLC-Anlagen eine nur sehr geringe Absorption. Daher scheidet diese einfache Art der Detektion aus. Auch fehlen Fluoreszenzeigenschaften, so dass auch diese Detektionsmöglichkeit ausgeschlossen ist. So musste früher in jedem Fall ein Derivatisierungsschritt vorgenommen werden; dies führte aber stets zu Fehlern bei der Quantifizierung der Komponenten. Häufiger wird das ELISA-Verfahren für die Mycotoxinanalytik angewendet (KRÄMER et al. 1997), doch stehen für die etwas ausgefalleneren Toxine Trichothecolon und Trichothecin die entsprechenden Antigene nicht zur Verfügung. Momentan ist die HRGC, entweder in Kombination mit einer Elektronenfalle (ECD) oder mit einer massenspektrometrischen Detektion, die am häufigsten angewendete Methode. In den letzten Jahren wurden neuere Techniken wie beispielsweise die Supercritical Fluid Chromatography (YOUNG et al. 1992 und 1993) und Immuno-Assays (PARK et al. 1996) entwickelt.

1.4.2 Auswahlkriterien für die Analysemethoden

Ein Azeotrop, bestehend aus Acetonitril und Wasser, wurde als Extraktionsmittel gewählt, da auf diese Weise weniger störende Verunreinigungen der HPLC-Analyse zugeführt werden, als wenn ein Gemisch aus Methanol und Wasser verwendet wird (TRENHOLM et al. 1985). Des Weiteren ließen sich mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (75/25) im Vergleich zu Acetonitril/Wasser (90/10), Acetonitril/Wasser (60/40), sowie verschiedenen Verhältnissen von Methanol/Wasser und reinem Acetonitril bzw. reinem Methanol die besten Ergebnisse bei Extraktion von Nivalenol und Deoxynivalenol erzielen (TANAKA et al. 1985). Ein positives Azeotrop (Siedepunkt 80 °C) bildet sich, wenn man 84 Teile Acetonitril und 16

Teile Wasser vermischt. Daher ist diese Mischung zur Volumenkontraktion am besten geeignet.

Diverse Vergleiche von Aufreinigungsverfahren für die Trichothecen-Analyse sind publiziert worden (KRSKA et al. 2001; KRSKA 1998; LANGSETH and RUNDBERGET 1998; RADOVÁ et al. 1998). Die Mehrschichtsäulen (ROMER 1986) haben mehrere Vorteile gegenüber den konventionellen Techniken. Die Probenaufbereitung ist sehr schnell, einfach, robust und zuverlässig.

Nachdem unterschiedliche C18-HPLC-Säulen getestet worden waren, wurde die Hydro-RP der Synergi™-Serie der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) bevorzugt. Die Säule war mit einer C 18 Phase auf hochreiner Kieselgelbasis mit polarem Endcapping mit einer Partikelgröße von 4 µm und einer Porengröße von 80 Å gefüllt (siehe 2.1.3). Diese Säule ermöglichte sehr gute Halbhöhenbreiten der Signale, die zumindest bei den im Positivmodus analysierten Analyten zwischen vier und sieben Sekunden lagen (siehe Tab. 4). Als Schutz für die Hauptsäule wurde das Security-Cartridge-System von Phenomenex (Aschaffenburg) ausgewählt. Mit dem Unterschied zu konventionellen Vorsäulen kann hier an Stelle einer kleinen Vorsäule ein kleines Kartuschenplättchen von 3 mm Dicke und 9 mm Durchmesser eingelegt werden, welches ebenso leistungsfähig wie eine konventionelle Vorsäule ist.

Die Zugabe von Ammonium-Acetat als Puffer war sehr hilfreich, da die Nachweisgrenzen durch Verwendung von $[M+Ac]^-$ (Addukt aus Molekulargewicht und Acetat) und $[M+NH_4]^+$ (Addukt aus Molekulargewicht und Ammonium) gegenüber $[M-H]$ bzw. $[M+H]^+$ deutlich abgesenkt werden konnten.

Sämtliche Stammlösungen und Standardlösungen wurden bei -18 °C aufbewahrt. Wie bereits BERGER (2000) beschrieb, dass sich keinerlei Hinweis auf eine Instabilität bei einer solchen Lagerung innerhalb von 24 Monaten findet, zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass die Stammlösungen und Standardlösungen zumindest 13 Monate stabil waren. WEI und CHU (1986) untersuchten die Stabilität von acht Trichothecenen in Methanol. Nach 24 Tagen bei Zimmertemperatur waren alle Trichothecene in mehrere Produkte umgewandelt worden. Bei Toxinen mit Acetylgruppen an beiden C(3) und C(4)-Atomen kam es am häufigsten zu einer Methanolyse.

1.4.3 Eignung der HPLC/MS/MS zum Nachweis der Trichothecene

Die Entwicklung der HPLC/MS/MS-Geräte eröffnete ganz neue Möglichkeiten in der Trichothecen-Analytik. Die HPLC ist die Auftrennungsmethode der Wahl, da sie eine bessere Auflösung als die Dünnschichtchromatographie ermöglicht und eine Derivatisierung der Trichothecene, die bei Anwendung der HRGC Voraussetzung ist, nicht erforderlich macht (HARTL 2000; BERGER 2000). Die Triplequadrupolmassenspektrometrie erlaubt eine einwandfreie Detektion und Identifizierung von bekannten Typ A- und B- Trichothecenen.

1.5 Zielsetzung

Äpfel aus dem organischen Anbau zeichnen sich in der Regel durch einen deutlich höheren Befall mit pilzlichen Erregern aus. Dies impliziert in bestimmten Fällen das Risiko einer Kontamination der Erzeugnisse mit Mycotoxinen. Mit dem hier umrissenen Forschungsprojekt soll daher anhand eines besonders bedeutsamen Produktes der organischen Obstproduktion Klarheit bei Verbrauchern und Behörden geschaffen werden.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Flüssigkulturen der Erreger der Rußfleckenkrankheit, von Äpfeln mit Symptomen der Rußfleckenkrankheit und von Apfelprodukten auf das Vorkommen der Mycotoxine Trichothecin, Trichothecolon, Nivalenol, Deoxynivalenol, T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol. Als häufig vorkommende Vertreter des Erregerkomplexes der Krankheit wurden im Rheinland die Pilze *Peltaster fructicola* und *Phialophora sessilis* bestimmt. Es sollte geklärt werden, ob diese auf der Oberfläche der Früchte siedelnden Pilze die zuvor genannten Mycotoxine sowohl in Flüssigkultur als auch *in vivo* auf der Oberfläche von Äpfeln zu bilden vermögen. Ferner sollte der Frage nachgegangen werden, ob bei befallenen Äpfeln eine Diffusion der Toxine durch die Kutikula und Epidermis in das Fruchtfleisch zu verzeichnen ist. Dazu wurde zunächst eine Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Mycotoxine mit der Hilfe der HPLC/MS/MS-Technik entwickelt, um die komplexen Fragestellungen bearbeiten zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Analysenmethode HPLC/MS/MS

2.1.1 Standards

Folgende als Referenzsubstanzen eingesetzte Trichothecen-Standards wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen und hatten nach Angaben des Herstellers nachstehende Reinheit: Diacetoxyscirpenol > 99 %, Deoxynivalenol > 99 %, Nivalenol > 98 %, T-2-Toxin > 99 %, Trichothecin > 99 %. Der von Sigma-Aldrich Chemie zugesicherte Reinheitsgrad für die internen Standards lag bei 99 % für T-2 Toxin-d₃ sowie bei 98 % für Verrucarol. Eine kleine Menge an Trichothecolon wurde uns freundlicherweise von Prof. P. M. Abreu vom Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Caparica, Portugal, überlassen. Der Reinheitsgrad dieser Substanz lag bei etwa 95 %. Aufgrund der geringen Menge an Standardsubstanz konnte Trichothecolon nur qualitativ nachgewiesen werden. Hergestellt wurden die Standards auf zwei unterschiedliche Arten. Wurde der betreffende Analyt in einer 1 mg Packung geliefert, so wurden zunächst einige Milliliter Methanol „LiChrosolv® gradient grade“, Reinheit > 99,9 % von Merck (Darmstadt) in den Glasflakon der Chemikalienpackung der Fa. Sigma pipettiert und kurz gewartet, bis ein Großteil des

Toxins in Lösung gegangen ist. Diese Lösung wurde in braune 13 Milliliter Glasfläschchen mit Schraubverschluss und PTFE beschichtetem Septum von CS Chromatographie Service (Düren) überführt. Der Glasflakon der Chemikalienpackung der Fa. Sigma wurde mehrfach und gründlich mit Methanol gespült und die Spüllösung ebenfalls in das 13 Milliliter Glasfläschchen überführt bis am Ende dieses Vorgangs die gesamte Menge des Toxins in 10 ml Methanol entsprechend einer Konzentration von 100 ppm gelöst war. Die Firma Sigma-Aldrich Chemie sicherte zu, dass die Abfüllprozesse der Toxine eine Genauigkeit von 98,5 % \pm 1,5 % bei einer Füllmenge von 1 mg aufwiesen. Enthielten die Glasflakons von Sigma Toxinmengen, die oberhalb von 1 mg lagen, so wurde eine spezifische Menge z.B. 1 mg mit einer Analysenwaage abgewogen. Daran schloss sich zuvor beschriebene Lösungsprozedur an. Aufgrund der hochtoxischen Stäube, die beim Öffnungsvorgang der Glasflakons entstehen können, wurden die Standards unter einer Sicherheitswerkbank HERAsafe[®] HSP 9 der Firma Heraeus / Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau) angesetzt. Nach Ansetzen der Stammlösungen der einzelnen Analyten wurden daraus Mischstandards in der jeweils benötigten Konzentration, beginnend von 50 ppb, über 100 ppb, 250 ppb, 500 ppb, 750 ppb bis 1000 ppb hergestellt.

2.1.2 Geräte

Die HPLC/MS/MS-Anlage setzte sich aus einer HPLC-Anlage der Serie 1100 der Firma Agilent Technologies (Böblingen), einem Probengeber HTC PAL der Firma CTC Analytics AG (Zwingen, Schweiz) und einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer API 2000 der Firma Sciex / Applied Biosystems (Darmstadt) zusammen. Die HPLC-Anlage bestand aus einer binären Pumpe, einem Mikrodegasser sowie einem Säulentermostat. Verwendet wurde eine HPLC-Säule Hydro-RP der Synergi-Serie der Firma Phenomenex (Aschaffenburg). Ihre Länge betrug 150 mm und ihr Innendurchmesser 2,0 mm. Das Adsorbens Hydro-RP entspricht einer C 18- Phase auf Basis hochreinen Kieselgels mit polarem Endcapping mit einer Partikelgröße von 4 μ m und einer Porengröße von 80 Å. Als Vorsäule wurde ein Security-Cartridge-System von Phenomenex (Aschaffenburg) benutzt, das ebenfalls hochreines C-18 Material enthält (4mm Länge, 3 mm Durchmesser). Der Probengeber verfügt über ein 324 Probenfläschchen fassendes Kühlsystem, eine LC-Hamilton[®]-Spritze und ein spülbares Hochdruckinjektionsventil. Ausgerüstet war der Probengeber mit einer 20 μ l Injektionsschleife aus Edelstahl.

2.1.3 HPLC-Auftrennung und Detektion

Die wässrige Phase setzte sich zu 7,5 % aus Methanol „LiChrosolv[®] gradient grade“, Reinheit > 99,9 % und zu 92,5 % aus Wasser „LiChrosolv[®] gradient grade“ Merck (Darmstadt) unter Zugabe von 5 mMol Ammoniumacetat zusammen. Die organische Phase bestand zu 100 % aus Methanol „LiChrosolv[®] gradient grade“, Reinheit > 99,9 % dem ebenfalls 5 mMol Ammoniumacetat „p.A.“ Merck (Darmstadt) zugegeben wurden. Für die Injektion von Proben, die in Methanol / Wasser (50 / 50; v / v) gelöst waren, wurde ein Injektionsvolumen von 20 μ l gewählt. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 375 ml / Min. Vom Zeitpunkt der

Injektion an wurde eine Minute 100 % wässrige Phase gefördert. Nach dieser isokratischen Phase wurde der Methanolgehalt von 7,5 % (100 % wässrige Phase) bis zur zehnten Minute auf 100 % (100 % organische Phase) angehoben, gefolgt von einem fünf-minütigen Spülvorgang mit Methanol (100 % organische Phase). Anschließend wurde der Methanolgehalt innerhalb einer Minute auf 7,5 % (100 % wässrige Phase) reduziert und die HPLC-Säule 6 Min. reequilibriert. Der Säulenthermostat wurde auf 30° C eingestellt.

Das über drei Quadrupole verfügende Massenspektrometer wurde mit der Electrospray-Ionenquelle (ESI) zur Ionisierung der Analyten bestückt und im Multiple Reaction Monitoring Modus (MRM) betrieben. In den ersten 7,5 Min. wurden Nivalenol und Deoxynivalenol im Negativmodus, anschließend Verrucarol, Trichothecol, Diacetoxy-scirpenol, T-2 Toxin, T-2 Toxin-d₃ und Trichothecin im Positivmodus detektiert. Die nachfolgenden Tabellen geben eine Übersicht über die Parameter, mit denen das Massenspektrometer betrieben wurde.

Tab. 3: Einstellungen der Parameter der Ionenquelle

Temperatur / Temperature (TEM)	375° C
Vorhanggas / Curtain Gas (CUR)	30
Kollisionsgas / Collision Gas (CAD)	3
Gas 1	30
Gas 2	70
Spannung / Ion Spray voltage (IS) Positivmodus	+ 5000
Negativmodus	- 5000
Interface Heater (ihe)	EIN / ON

Tab. 4 Übersicht Ionenübergänge (Q1- und Q3-Massen), Declustering Potential (DP), Focusing Potential (FP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE) und Collision Cell Exit Potential (CXP). Fett gedruckt sind die Quantifizierer, normal gedruckt die Qualifizierer

	Q1-Masse	Q3-Masse	DP	FP	EP	CE	CXP
Nivalenol (NIV)	371,1	281,1	- 8,5	- 330	8,5	- 16	- 13
	371,1	311	- 8,5	- 330	8,5	- 12	- 13
Deoxynivalenol (DON)	355,1	295,1	- 6	- 330	6,5	- 12	-18
	355,1	265,1	- 6	- 330	6,5	- 12	- 8
Verrucarol (VOL)	284,2	249,1	5	360	- 3	12	5
	284,2	231,1	5	360	- 3	14	5
Trichothecolon (TON)	282,2	211,1	16	360	- 3,5	19	10
	282,2	229,1	16	360	- 3,5	17	10
Diacetoxyscirpenol (DAS)	384,2	307,1	21	360	- 8	21	8
	384,2	229,1	21	360	- 8	23	10
T-2 Toxin (T-2)	484,2	305,2	26	360	- 7	23	6
	484,2	215,2	26	360	- 7	29	6
T-2 Toxin-d₃ (T-2-d ₃)	487,3	308,1	1	360	- 7	23	10
	487,3	215,2	1	360	- 7	29	8
Trichothecin (TIN)	350,2	211,1	31	360	- 12	23	8
	350,2	229,1	31	360	- 12	21	8

2.1.4 Quantifizierung

Die Analyten Nivalenol, Deoxynivalenol, Trichothecolon, Diacetoxyscirpenol, T-2 Toxin und Trichothecin wurden anhand ihrer Retentionszeit, ihrer Q1-Masse, ihrer ersten Q3-Masse, die als auch als Quantifizierer diente, sowie ihrer zweiten Q3-Masse, die als Qualifizierer genutzt wurde, identifiziert. Die Integration der Peakflächen der jeweiligen Analyten wurde automatisch von der Analyst Software 1.1 ausgeführt, nachdem in allen Einzelspuren der Analyten manuell die Eignung der Einstellungen der Bunching- und Smoothingfaktoren, die eine Voraussetzung für eine einwandfreie Integration darstellen, geprüft wurde.

Die Quantifizierung basierte auf der Anwendung interner Standards. Sowohl den Messlösungen als auch den Lösungen der externen Standards wurden aliquote Mengen von

einem internen Standard beigegeben, so dass Schwankungen der Ionisation von Injektion zu Injektion durch einfache Rechenvorgänge herausgemittelt werden konnten. Als interne Standards dienten Verrucarol (VOL) als Surrogatstandard und das dreifach deuterierte T-2 Toxin (T-2 d₃), die zu Beginn der jeweiligen Extraktion zugegeben wurden. Die Berechnungen wurden größtenteils mit Hilfe der Software Analyst 1.1 / Analyst Validation Kit durchgeführt.

Berechnung der Mycotoxingehalte in den untersuchten Apfelprodukten

Bevor der endgültige Gehalt m_i berechnet werden konnte, musste zunächst der relative Response-Faktor rrf_i berechnet werden (BERGER 2000).

$$rrf_i = \frac{C_{ISTD} \cdot A_i}{C_i \cdot A_{ISTD}}$$

rrf_i relativer Responsefaktor der Substanz i relativ zum internen Standard

C_{ISTD} Konzentration des internen Standards in der Referenzlösung [ppb]

A_{ISTD} Signalfläche des internen Standards [counts]

C_i Konzentration der Substanz i in der Referenzlösung [ppb]

A_i Signalfläche der Substanz i [counts]

Der Gehalt m_i einer Substanz i in einer Probe wurde wie folgt berechnet:

$$m_i = \frac{m_{ISTD} \cdot A_i}{rrf_i \cdot A_{ISTD}}$$

m_i Gesamtgehalt einer Substanz i in einer Probe [ppb]

m_{ISTD} insgesamt zugeführte Menge des internen Standards [ppb]

A_{ISTD} Signalfläche des internen Standards [counts]

A_i Signalfläche der Substanz i [counts]

rrf_i relativer Responsefaktor der Substanz i

Berechnung der Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholungsbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe (Kromidas, 1999).

$$W = \frac{S_{dot}}{S_{ref}} \cdot 100 \% \qquad k_f = 100 \% : W$$

W Wiederfindungsrate in %

S_{dot} Signalfläche des zu einer Probe dotierten Analyten

S_{ref} Signalfläche des Analyten im Referenzstandard

k_f Korrekturfaktor bzgl. der Wiederfindung

Zur Berechnung der Wiederfindungsraten wurden folgende Experimente durchgeführt: Unbelastete Proben der jeweiligen Untersuchungsmatrix (Flüssigkultur, Apfelschalen, Apfelsaft, Apfelmus) wurden beschafft. Der ersten Probe der jeweiligen Untersuchungsmatrix wurde ein Mischstandard in einer solchen Höhe zugesetzt, dass eine Konzentration von 100 ppb in der ersten Probe, 500 ppb in der zweiten und 1000 ppb in der dritten Probe erhalten wurde. Die Proben wurden wie unter 2.2.2 für Flüssigkulturen, 2.3.3 für Apfelschalen, 2.5.2 für Apfelsaft und 2.6.2 unter Apfelmus beschrieben aufbereitet und extrahiert. Diese Messserien wurden dreimal wiederholt.

Berechnung der Nachweisgrenze

Zur Berechnung der Nachweisgrenze C_{nwg} wurde nachstehende Formel verwendet:

$$C_{nwg} = \frac{3,5 \cdot S_p S_p \cdot C_{lsg}}{S_h \cdot f_r \cdot 3}$$

C_{nwg} Nachweisgrenze [ppb]

$S_p S_p$ Entfernung von Spitze zu Spitze des Rauschens [mm]

C_{lsg} Konzentration des Analyten in Messlösung [ppb]

S_h Signalthöhe des gemessenen Analyten [mm]

f_r Faktor der Vergrößerung des Rauschens

Zur Messung der Nachweisgrenze wurden Signale von Analyten, denen eine Konzentration von jeweils 50 ppb zugrunde lagen, verwendet. Die Nachweisgrenze stellt die kleinste Konzentration oder Menge dar, welche noch qualitativ erfasst werden kann. Das Signal sollte mindestens dreimal über dem Rauschen liegen (Meyer, 1999).

Berechnung der Halbhöhenbreite

Anhand der Halbhöhenbreite eines HPLC Signals kann dessen Qualität eingeordnet werden. Während einer Methodenentwicklung kann unter anderen wichtigen Parametern auf diese Weise beurteilt werden, ob sich die Qualität der Peaks verbessert oder verschlechtert. Nach unseren Erfahrungen sollte die Halbhöhenbreite eines Peaks möglichst zwischen 4 und 15 Sekunden liegen.

$$h_{hb} = b_p \cdot f_e$$

h_{hb} Halbhöhenbreite eines HPLC Signals [sec]

b_p Breite des HPLC- Signals gemessen auf halber Höhe [cm]

f_e Faktor zur Anpassung an Chromatogrammskala [sec / cm]

Berechnung des A_c -Wertes

$$A_c = \frac{A_a}{C_a}$$

A_c Signalflächenwert eines Analyten bei einer Konzentration von 1 ppm

A_a Gemessener Flächenwert

C_a Konzentration des Analyten in einer Referenzmesslösung, z.B. in einem Standard mit 1 ppm [ppm]

Anhand der A_c -Werte können die Signalstärken der Analyten begleitend zur Methodenentwicklung verglichen werden. Somit kann verhindert werden, dass sich die Signalstärken von Analyten sehr stark verschlechtern, weil beispielsweise die Signalstärke eines anderen Analyten durch eine Methoden-Änderung geringfügig verbessert wurde.

2.2 Pilzkulturen-Sammlung

2.2.1 Bezeichnung der Erreger bzw. Pilzisolat

Die aufgeführten Pilzisolat sind Bestandteil einer Pilzkulturen-Sammlung, die in der Zeit zwischen 1996 und 2001 zusammengestellt wurde. Die Pilze dieser Kulturen-Sammlung wurden von Apfelfrüchten, die Symptome der Rußfleckenkrankheit zeigten, aus Apfelplantagen im Bodenseegebiet und im Rheinland abisoliert, sowie mittels Lichtmikroskopie und nach Kulturmerkmalen bestimmt und benannt (KERN 2002).

Tab. 5 Bezeichnung der Isolate der Gattung *Peltaster fructicola* Johnson, Sutton und Hodges (Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen, Deutschland)

Isolat-Nr.	Herkunft	Datum der Isolierung	isoliert von
131 ra P	Schloss Türnich (Kerpen-Türnich)	Jan. / Feb. 1999	Apfel - 'Ingrid Marie'
117 p P	Versuchsstation Bavendorf	Jan. / Feb. 1999	Apfel - 'Ravensburger'
116 p P	Schloss Türnich - (Kerpen-Türnich)	Nov. 1998	Apfel - 'Ingrid Marie'
102 III a	"Pestalozzi.-Kinderd." Wahlwies bei Ravensburg	Nov. 1996	Apfel - 'Glockenapfel'
107 ra P	Versuchsstation Bavendorf	Nov. 1998	Apfel - 'Rubinette'
99 I a	Klein Altendorf - Rheinbach	Nov. 1996	Apfel - 'Pilot'
97III a	Klein Altendorf - Rheinbach	Nov. 1996	Apfel - 'Pilot'
65 ra P	Versuchsstation Bavendorf	Nov. / Dez. 1997	Apfel - 'Pinova'

Tab. 6 Bezeichnung der Isolate der Gattung *Phialophora sessilis* de Hoog, (Baden-Württemberg, Deutschland)

Isolat-Nr.	Herkunft	Datum der Isolierung	isoliert von:
44 II a	Obstbau-Betrieb Brugger Friedrichshafen	Nov. 1996	Apfel - 'Golden Delicious'
57 III a	Obstbau-Betrieb Brugger Friedrichshafen	Nov. 1996	Apfel - 'Golden Delicious'
126 ra P	Versuchsstation Bavendorf	Jan. / Feb. 1999	Apfel - 'Coop25'

Tab. 7 Bezeichnung der Isolate von *Tripospermum myrti* (Lind) S. J. Hughes und *Tripospermum camelopardus* Ingold, Dann & P. J. McDougall, (Baden-Württemberg, Deutschland)

Isolat-Nr.	Herkunft	Datum der Isolierung	isoliert von
102 p St / Tr. myrti	Versuchsstation Bavendorf	Nov. / Dez. 1997	Apfel - 'Sir Prize'
109 II c / Tr. camelopardus	Pestalozzi KD. – Wahlwies	Nov. 1996	Apfel - 'Glockenapfel'

Tab. 8 Bezeichnung der Isolate von *Trichothecium roseum* (Pers.: Fr.) Link, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)

Isolat-Nr.	Herkunft	Datum der Isolierung	isoliert von:
001 T r	Bonn, Inst. f. Pflanzenk.	Sept. / Okt. 1986	Beeren / Weinrebe

Tab. 9 Bezeichnung des Isolates mit einer mutmaßlichen Zuordnung zur Gattung *Mycosphaerella*, (Baden-Württemberg, Deutschland)

Isolat-Nr.	Herkunft	Datum der Isolierung	isoliert von
51 III a	Obstbau-Betrieb Brugger Friedrichshafen	Nov. 1996	Apfel - 'Golden Delicious'

Tab. 10 Bezeichnung der Isolate von *Peltaster fructicola* Johnson, Sutton und Hodges - Referenzisolate aus den USA

Isolat-Nr.	Herkunft	Datum der Isolierung	isoliert von
USA 98 a	Raleigh, NC USA	1991 / 1992	Apfel
USA 17 a	Raleigh, NC USA	1991 / 1992	Apfel
USA 10 p	Raleigh, NC USA	1991 / 1992	Apfel
USA 4 a	Raleigh, NC USA	1991 / 1992	Apfel
USA 18 R	Raleigh, NC USA	1991 / 1992	Apfel

2.2.2 Herstellung der Kulturmedien

Die Kulturmedien wurden bei 121° C und 1 bar für 20 min. autoklaviert. Der pH-Wert aller Medien wurde auf 6,0 eingestellt.

Potato Dextrose Agar (PDA)

39,0 g PDA-Extrakt Merck (Darmstadt)

1000 ml A. demin.

2.2.3 Kultivierung der Pilze

Die Pilze wurden auf künstlichen Nährmedien (PDA) bei 6 °C im Dunkeln gehalten. Zum Zwecke eines besseren und schnelleren Heranwachsens wurden die frisch beimpften Petrischalen bei Zimmertemperatur für 14 Tage unter Lichtabschluss platziert, um sie dann entweder der Mycothek zuzuführen oder um sie zu Inokulationszwecken weiter zu verwenden. Die Stammkulturen wurden in PDA-Schrägröhrchen bei 6°C aufbewahrt.

2.3 Untersuchung von Flüssigkulturen der Pilzisolat

2.3.1 Auswahl der Pilzisolat und Ansetzen der Flüssigkulturen

Es wurden alle unter 2.2.1 aufgeführten Pilzisolat in Flüssigkultur genommen.

RM-Nährlösung (nach RUSAN und MANOLIU, 1978), modifiziert nach Feldmann

50,0 g Glucose

2,0 g Diammoniumhydrogencitrat

0,5 g Magnesiumsulfat

1,0 g Dikaliumhydrogenphosphat

0,5 g Kaliumchlorid

0,01 g Eisen-II-sulfat

4,0 g Pepton aus Casein

4,0 g Hefeextrakt

1000 ml A. demin.

Diese Nährlösung wurde auf pH 6,0 eingestellt, autoklaviert und zum Abkühlen unter eine Sicherheits- bzw. Sterilwerkbank HERAsafe[®] HSP 9 der Firma Heraeus / Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau) gestellt. Aus einer Petrischale, auf der das jeweilige Pilzisolat mindestens sechs Wochen gewachsen war, wurde mit einem Korkbohrer, ø 6 mm, ein Pellet ausgestanzt und in den bereitstehenden Erlenmeyerkolben überführt. Die mit dem jeweiligen Pilzisolat beimpften Medien wurden für 5 Wochen auf einem Kreisschüttler des Typs 3017 der Firma GFL (Burgwedel) bei 130 rpm und 24° C platziert. Der Hersteller aller angegebenen Chemikalien war Merck (Darmstadt), die Qualitätsstufe entsprach „p.A.“ bzw. „für die Mikrobiologie“.

2.3.2 Probenaufbereitung und Extraktion

Ein 50 ml-Scheidetrichter wurde mit 2,5 ml Kulturlösung des jeweiligen Pilzisolates befüllt. Für die Quantifizierung wurden 100 µl des internen Standards Verrucarol (VOL, 10 ppm) und 100 µl des zweiten internen Standards T-2 Toxin-d₃ (T-2 d₃, 10 ppm), die in Methanol gelöst worden waren, in den Scheidetrichter pipettiert. Nach Zugabe von 10 ml Acetonitril / Wasser 84:16 (v/v; Azeotrop) wurde die Lösung zwei Min. von Hand ausgeschüttelt. Die Scheidetrichter wurden 15 Min. in ein Ultraschallbad gestellt. Es wurden 9 ml der Lösung in ein Kulturröhrchen überführt und mittels einer Myco-Sep-Säule aufgereinigt, die innerhalb einer Minute durch die Lösung gedrückt wurde. Innerhalb der Myco-Sep-Säule wurden 4 ml des Überstandes entnommen. Die Extrakte wurden mit einem SLS 03 Evaporator „Sweet Little Sixteen[®]“ der Firma SLS Färber Skutlarek GbR (Bad Münstereifel) in Kombination mit einem Wasserbad SV 24 der Firma Gerhardt (Bonn) mit Stickstoff bis kurz vor der Trockene eingengt.

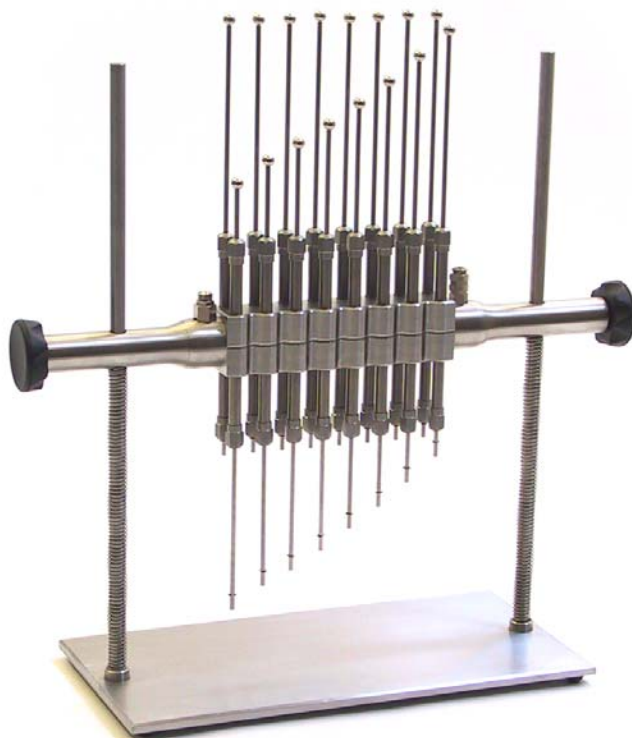


Abb. 9: SLS 03 Evaporator „Sweet Little Sixteen[®]“

Nach Zugabe von einem Milliliter 50 % igem Methanol wurde die Messlösung in ein braunes Autosampler-Glasfläschchen mit Scrabverschluss Aluminium, Red Rubber, PTFE beschichtet, CS-Chromatographie Service (Düren), überführt. Methanol „LiChrosolv[®] gradient grade“, und Wasser „LiChrosolv[®] gradient grade“ wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Acetonitril „Chromasolv[®] gradient grade“ wurde bei Riedel-de Haën erworben. Den Stickstoff lieferte ein Stickstoffgenerator der Firma Whatman (Haverhill, MA, USA; heute

Parker-Hanifin) mit einer Reinheit von 99 % +/- 0,5 % (laut Angaben des Herstellers). Die bei der Probenaufbereitung eingesetzten Myco-Sep Zearalenon-Kartuschen # 226 wurden bei Coring System Diagnostix GmbH (Gernsheim) bezogen. Sie enthalten verschiedenartige Adsorbentien wie zum Beispiel Aluminiumoxid.

2.4 Untersuchung von mit Rußfleckenenerregern inokulierten Äpfeln

2.4.1 Auswahl der Pilzisolat und Inokulation der Äpfel

Aus jeder der in 2.2.1 aufgeführten Pilzgattungen wurde ein Isolat stellvertretend für die Gattung zur Inokulation befallsfreier Äpfel entnommen.

Die Inokulationsversuche wurden an Äpfeln der Sorte 'Golden Delicious' vorgenommen. Zur Herstellung des Impfmateri als wurden 14 Tage alte Pilzkolonien, die auf PDA gewachsen waren, mit entionisiertem Wasser vermischt und in einem Mixer fein zerkleinert. Die erhaltene Suspension wurde über drei Lagen Filterpapier gefiltert. Das Inokulum wurde auf 5×10^5 Vermehrungseinheiten pro ml entionisiertem Wasser eingestellt. Es wurden 0,5 % Apfelsaft und das Detergens Tween 20 (0,1 %) hinzugefügt. Eine Vermehrungseinheit bestand aus Konidien und / oder Mycelfragmenten. Die zu inokulierenden Früchte durften keinen Krankheitsbefall und keine Verformungen aufweisen. Die Fruchtoberfläche wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend unter fließendem entionisiertem Wasser abgespült. Die Konidien suspension wurde mit einer Pipette auf der Apfeloberfläche aufgebracht und an der Luft trocknen gelassen. Pro Isolat wurden 10 Früchte beimpft. Als Kontrolle diente jeweils ein Apfel, der mit sterilem, entionisiertem Wasser beträufelt wurde. Die Früchte wurden mit sterilem, entionisiertem Wasser besprüht und in eine Klimakammer bei 97 % rel. LF gestellt. Die Klimakammer war auf 24 h Dunkelheit eingestellt. Die Temperatur betrug 25°C. Die Früchte wurden nach 14 tägiger Inokulation auf Rußfleckensymptome untersucht und nach fünf Wochen entnommen.

2.4.2 Gefriertrocknung und Mahlvorgang

Die Äpfel wurden mit einer Schälmaschine des Typs Triumph der Firma Pefra (Stolberg) mit einer Schälstärke von 2 mm von der Stiel- zur Kelchgrube hin vollständig geschält. Die erhaltenen Schalenringe wurden in etwa 15 cm lange Stücke zerschnitten und in flachen Kristallschalen ausgelegt. Die Kristallschalen wurden in eine Gefriertrocknungsanlage der Firma Martin Christ (Osterode) des Typs LMC-1 (100802) mit Stellflächenkühlung gestellt und über einen Zeitraum von 36 h getrocknet. Nach dem Trocknungsvorgang wurden die Apfelschalen mittels einer Ultrazentrifugalmühle ZM 100 der Firma Retsch (Haan) unter Verwendung eines 0,25 mm Ringsiebeinsatzes fein gemahlen. Das Apfelschalensmehl einer jeden Variante wurde sorgfältig homogenisiert, in Plastikbeutel abgefüllt und nach Evakuierung der Luft eingeschweißt. Gelagert wurden die Beutel bei Zimmertemperatur im Dunkeln in einem Exsikkator.

2.4.3 Probenaufbereitung und Extraktion

Für den Toxinnachweis aus mit Rußfleckenerregern inokulierten, frischen Äpfeln wurden 3 g der zuvor gefriergetrockneten und gemahlten Probe eingewogen und mit 12 ml Acetonitril / Wasser (84 / 16) vermischt. Für die Quantifizierung wurden 100 µl des internen Standards Verrucarol (VOL, 10 ppm) und 100 µl des zweiten internen Standards T-2 Toxin-d₃ (T-2 d₃, 10 ppm), die in Methanol gelöst worden waren, in den Scheidetrichter pipettiert. Nach einem 15 minütigen Schüttelvorgang mit einem handelsüblichen Laborschüttler wurden die Proben für 45 Min. in ein Ultraschallbad gegeben und anschließend bei 20° C und 2100 g 15 Min. mittels einer Varifuge® 3.OR der Firma Heraeus / Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau) zentrifugiert. Es wurden 9 ml der Lösung in ein Kulturröhrchen überführt und mit Myco-Sep Säulen aufgereinigt. Der Myco-Sep-Säule wurden 4 ml des Überstandes entnommen und mit Stickstoff bis kurz vor die Trockene eingengt. Nach Zugabe von einem Milliliter 50 % igem Methanol wurde die Messlösung in ein braunes Autosampler-Glasfläschchen überführt.

2.5 Untersuchung von Apfelschalen frischer Äpfel mit Rußfleckensymptomen

2.5.1 Probenahme, Gefriertrocknung, Mahlvorgang, Probenaufbereitung und Extraktion

Ausgewählt wurden unterschiedliche Apfelsorten der Jahre 2000, 2001 und 2002. Dabei wurden Proben aus dem Raum Bad Neuenahr-Ahrweiler, aus dem Stuttgarter Raum und dem Raum Ravensburg entnommen. Es wurden nur solche Früchte als Probe mitgeführt, deren Oberfläche mindestens zu 75 % mit rußfarbenen Mycelien bedeckt war. Die Beurteilung erfolgte durch eine visuelle Bonitur.

Die Gefriertrocknung und das Mahlen der Proben erfolgten wie unter 2.4.2 beschrieben. Für den Toxinnachweis aus getrockneten Apfelschalen frischer Äpfel mit Rußfleckensymptomen wurde wie unter 2.4.3 beschrieben verfahren.

2.6 Untersuchung von Apfelsäften

2.6.1 Probenauswahl

Es wurden sowohl naturtrübe als auch klare Säfte – hier nur integrierter Anbau – untersucht. Der extensive Apfelanbau wurde in der Art berücksichtigt, dass auch Streuobstwiesensäfte analysiert wurden. Vorgaben waren, dass die Säfte zum einen aus integriertem Anbau und zum anderen aus biologischem Anbau entstammen sollten. Aus dem Handel wurden 10 verschiedene Apfelsäfte bezogen. Dabei handelte es sich um zwei klare Säfte, zwei naturtrübe

Säfte, einen naturtrüben Apfelsaft mit Vitamin-C-Zugabe und um zwei naturtrübe Säfte aus biologischem Anbau. Ein Streuobstwiesensaft aus integriertem Anbau sowie ein Streuobstwiesensaft aus biologischem Anbau wurden ebenfalls analysiert. Ein Birnensaft aus biologischem Anbau wurde mit in die Untersuchung aufgenommen, da die Symptome der Rußfleckenkrankheit auch an Birne auftreten können.

2.6.2 Probenaufbereitung und Extraktion

Zur Extraktion der Apfelsäfte wurden jeweils 2,5 ml Apfelsaft in einen 50 ml-Scheidetrichter gefüllt. Für die Quantifizierung wurden 100 µl des internen Standards Verrucarol (VOL, 10 ppm) und 100 µl des zweiten internen Standards T-2 Toxin-d₃ (T-2 d₃, 10 ppm), die in Methanol gelöst worden waren, in den Scheidetrichter pipettiert. Nach Zugabe von 10 ml Acetonitril / Wasser 84 / 16, wurde die Lösung 2 Min ausgeschüttelt. Die Scheidetrichter wurden 15 Min. in ein Ultraschallbad gestellt, wo sie zur Phasentrennung 5 Min. belassen wurden. Neun Milliliter der Oberphase wurden in ein Kulturröhrchen überführt, dessen Inhalt anschließend durch die Myco-Sep-Säule gedrückt wurde. Oberhalb der Myco-Sep-Säule wurden 4 ml des Überstandes entnommen und mit Stickstoff bis kurz vor die Trockene eingengt. Nach Zugabe von einem Milliliter 50 % igem Methanol wurde die Messlösung in ein braunes Autosampler-Glasfläschchen überführt.

2.7 Untersuchung von Apfelmus

2.7.1 Probenauswahl

Apfelmus vier verschiedener Hersteller wurde bezogen. Auswahlkriterium war, dass die Äpfel, die für das Apfelmus verwendet wurden, entweder aus integrierter oder aus biologischer Produktion Deutschlands stammten.

2.7.2 Probenaufbereitung und Extraktion

In einen 50 ml-Scheidetrichter wurden 5 g Apfelmus gefüllt. Für die Quantifizierung wurden 100 µl des internen Standards Verrucarol (VOL, 10 ppm) und 100 µl des zweiten internen Standards T-2 Toxin-d₃ (T-2 d₃, 10 ppm), die in Methanol gelöst worden waren, in den Scheidetrichter pipettiert. Nach einer Zugabe von 10 ml Acetonitril / Wasser 84 / 16, wurde die Lösung zwei Min. ausgeschüttelt. Die Scheidetrichter wurden 15 Min. in ein Ultraschallbad gestellt. Um 9 ml der Oberphase in ein Kulturröhrchen überführen zu können, wurde der Scheidetrichter zur Sedimentation der Feststoffe einige Minuten stehen gelassen. Mittels einer Zearalenon Myco-Sep-Säule # 226 wurde der Extrakt aufgereinigt, und es wurden 4 ml des Überstandes der Säule entnommen. Mit Stickstoff wurde die Lösung bis kurz vor die Trockene eingengt. Nach Zugabe von einem Milliliter 50%igem Methanol wurde die Messlösung in ein braunes Autosampler-Glasfläschchen überführt.

3 Ergebnisse

3.1 Analysenmethode HPLC/MS/MS

3.1.1 Extraktion und Probenaufbereitung

Die Korrekturfaktoren - abgeleitet von den jeweiligen Wiederfindungsraten - lagen bei Flüssigkulturen für Nivalenol bei 1,23, für Deoxynivalenol bei 1,19, für Diacetoxyscirpenol bei 1,45, für T-2 Toxin bei 1,05 und für Trichothecin bei 1,85. Bei Apfelschalen lagen die Korrekturfaktoren für Nivalenol bei 1,67, für Deoxynivalenol bei 1,24, für Diacetoxyscirpenol bei 2,15, für T-2 Toxin bei 2,08 und für Trichothecin bei 2,57. Bei Apfelsaft zeigten sich Korrekturfaktoren für Nivalenol bei 0,98, für Deoxynivalenol bei 0,91, für Diacetoxyscirpenol bei 1,24, für T-2 Toxin bei 1,33 und für Trichothecin bei 2,13. Die Korrekturfaktoren bei Apfelmus betragen für Nivalenol bei 1,12, für Deoxynivalenol bei 1,31, für Diacetoxyscirpenol bei 1,28, für T-2 Toxin bei 1,39 und für Trichothecin bei 2,22; bezogen auf eine Zugabe in Höhe 500 ppb. Angaben für Trichothecolon entfallen, da dieser Analyt nur qualitativ nachgewiesen werden konnte.

3.1.2 HPLC-Auftrennung und Detektion mittels HPLC-ESI(-/+)-MS/MS

Die kurze HPLC-Auftrennungszeit von 10 Minuten (22 Minuten inklusive Spülvorgang und Reequilibrierung) erlaubte einen hohen Probendurchsatz. In Abb. 10 ist das Chromatogramm einer 250 ppb Standardlösung der sechs Typ A- und B-Trichothecene inklusive der internen Standards zu sehen. Die absoluten Retentionszeiten bei gespiketen Nullkontrollen sowie bei den externen Standards waren innerhalb von sechs Stunden äußerst stabil und variierten höchstens um etwa 3 bis 6 sec. bei den polareren Analyten Nivalenol und Deoxynivalenol und um etwa 1 sec. bei den restlichen Analyten wie T-2 Toxin etc. Alle analysierten Trichothecene wurden basislinienorientiert aufgetrennt. Die Addukt-Ionen wurden während des ersten Sprüh- und Ionisierungsvorgangs in der Ionenquelle erzeugt. In der nachfolgenden Tabelle 11 sind die Addukt-Ionen (Q1-Masse), die Fragment-Ionen (Q3-Masse), die Retentionszeit (Rt-Zeit), der Flächenwert (A/c), die Halbhöhenbreite (HHB) und die Nachweisgrenze (NWG) der einzelnen Analyten im HPLC-ESI(-/+)-Massenspektrum nach erfolgter Methodenentwicklung zusammenfassend dargestellt.

Tab. 11 Darstellung der Eltern-Ionen (erste Q1-Masse) mit den dazugehörigen Quantifizierern (erste Q3-Masse) und den jeweiligen Qualifizierern (zweite Q3-Masse), sowie deren Retentionszeit (Rt-Zeit), Flächenwert (A/c-Wert), HHB (Halbhöhenbreite) und NWG (Nachweisgrenze)

Analyt	Q1-Masse	Q3-Masse	Rt-Zeit	A/c gemittelt	HHB	NWG
Nivalenol	371,1	281,1	5,91 min	79.100	10,3 sec	14,71 ppb
	371,1	311,0	5,89 min	64.950	25,7 sec	20,53 ppb
Deoxynivalenol	355,1	295,1	7,04 min	108.500	7,7 sec	5,08 ppb
	355,1	265,1	7,06 min	125.500	8,6 sec	5,68 ppb
Verrucarol	284,2	249,1	8,48 min	360.000	7,6 sec	1,16 ppb
	284,2	231,1	8,47 min	190.600	6,9 sec	0,95 ppb
Trichothecolon	282,2	211,1	8,53 min	--	7,3	--
	282,2	229,1	8,53 min	--	6,6	--
Trichothecolon-Acetat	324,0	211,1	--	--	--	--
	324,0	229,1	--	--	--	--
Diacetoxyscirpenol	384,2	307,1	9,95 min	1,53 Mio	5,9 sec	1,16 ppb
	384,2	229,1	9,94 min	840.500	6,0 sec	1,51 ppb
T-2 Toxin	484,2	305,2	11,00 min	1,17 Mio	5,9 sec	1,01 ppb
	484,2	215,2	11,00 min	909.500	6,1 sec	1,62 ppb
T-2 Toxin d₃	487,3	308,1	11,00 min	380.000	5,6 sec	0,54 ppb
	487,3	215,2	11,01 min	282.000	5,8 sec	0,44 ppb
Trichothecin	350,2	211,1	11,03 min	52.850	4,0 sec	21,78 ppb
	350,2	229,1	11,06 min	51.450	4,6 sec	9,32 ppb

Für die negativ ionisierten Analyten erwies sich $[M+Ac]^-$ als das am besten geeignete Ion. Bei den positiv ionisierten Analyten zeigte sich, dass mit $[M+NH_4]^+$ die besten Ergebnisse zu erzielen waren. Bei der Auswahl der verschiedenen Ionen-Übergänge (Q1-Masse in Kombination mit Q3-Masse) wurde genau darauf geachtet, dass keine Fragmente genommen wurden, die lediglich das Resultat eines simplen Hydrolysevorgangs, einer Adduktabsplaltung oder sonstigen Störungs- bzw. Verunreinigungs-Effekte (Kunststoffreste etc.) darstellen. An dieser Stelle wird auf den Contamination Finder Knowledge Base Version 1.1 verwiesen.

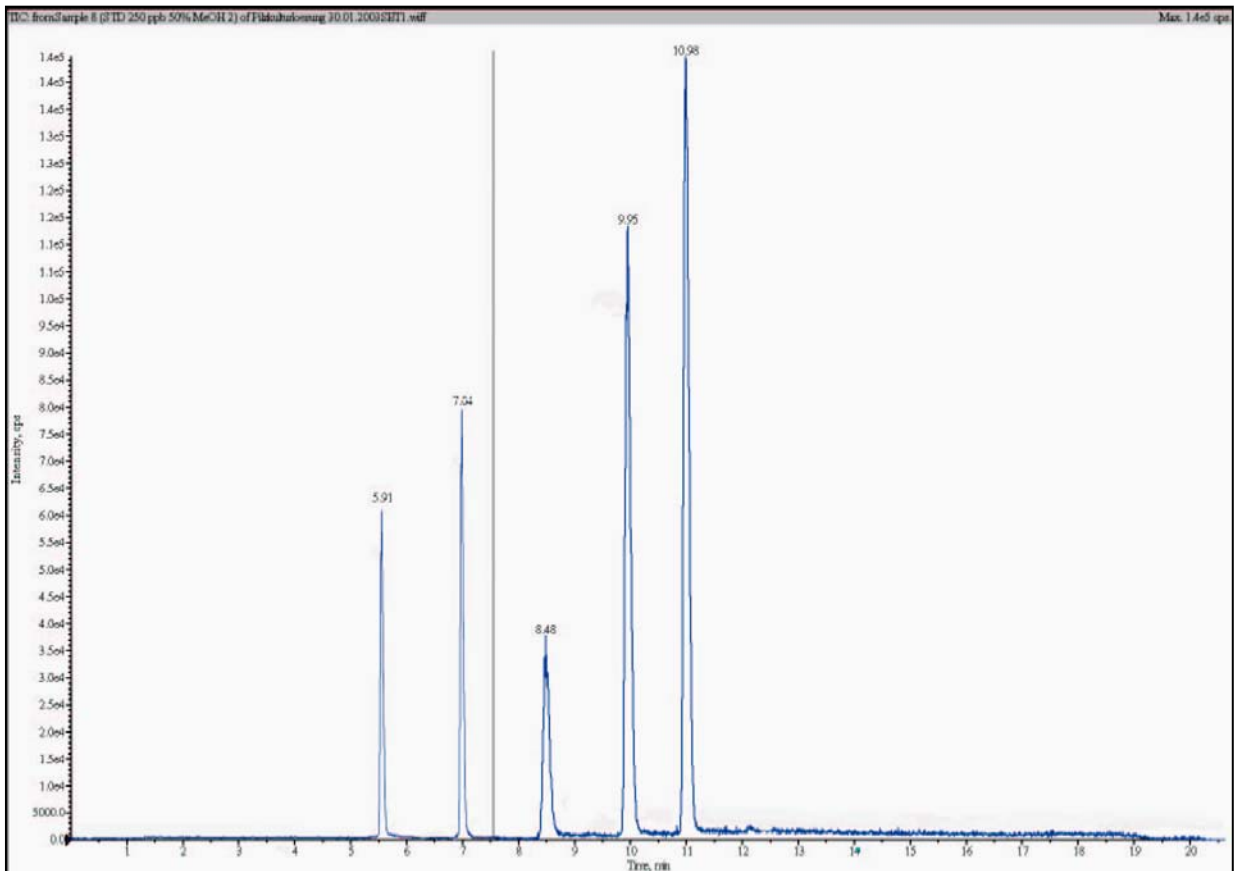


Abb. 10 HPLC-ESI(-/+)-MS/MS Basispeak-Chromatogramm einer 250 ppb Standardlösung der Mycotoxine Nivalenol (5,9 Min.) und Deoxynivalenol (7,1 Min.) im Negativmodus, sowie von Trichothecolon und Verrucarol (8,4 Min. in einem Peak; zwei Spuren im Hintergrund), Diacetoxyscirpenol (9,9 Min.) und T-2 Toxin, T-2 Toxin d3 und Trichothecin (11 Min.; ebenfalls in einem Peak, hinter dem mehrere Einzelspuren verborgen sind)

3.2 Untersuchung von Flüssigkulturen der Pilzisolat

Die Analysenserien ergaben, dass sich die Mycotoxine Trichothecin und Trichothecolon ausschließlich im Kulturfiltrat von *Trichothecium roseum* (Pers.: Fr.) Link, dem Erreger der Rosafäule, z.B. an Weinbeeren nachweisen ließen. Dieser Pilz stellt als Referenz-Pilzisolat eine Art Positivkontrolle dar. Isolate von *Peltaster fructicola* Johnson, Sutton und Hodges, *Phialophora sessilis* de Hoog, *Mycosphaerella* sp., *Tripospermum myrti* (Lind) S.J. Hughes und *Tripospermum camelopardus* Ingold, Dann & P.J. McDougall bildeten weder Trichothecin noch Trichothecolon noch eines der anderen analysierten Trichothecene. Auch in den Flüssigkulturen der aus den USA stammenden Isolate von Erregern der Rußfleckenkrankheit konnten diese Toxine nicht gefunden werden.

Tab. 12 Untersuchung von Flüssigkulturen der Pilzisolat e einiger Erreger der Rußfleckenkrankheit sowie von *Trichothecium roseum* als Positivkontrolle; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze

	NIV	DON	TON	DAS	T-2	TIN
8 Isolate <i>Peltaster fructicola</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
3 Isolate <i>Phialophora sessilis</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolate <i>Tripospermum myrti</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolat <i>Tripospermum camelopardus</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolat <i>Mycosphaerella sp.</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
5 Isolate (USA) <i>Peltaster fructicola</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolat <i>Trichothecium roseum</i>	< NWG	< NWG	Spuren	< NWG	< NWG	3,8 ppm

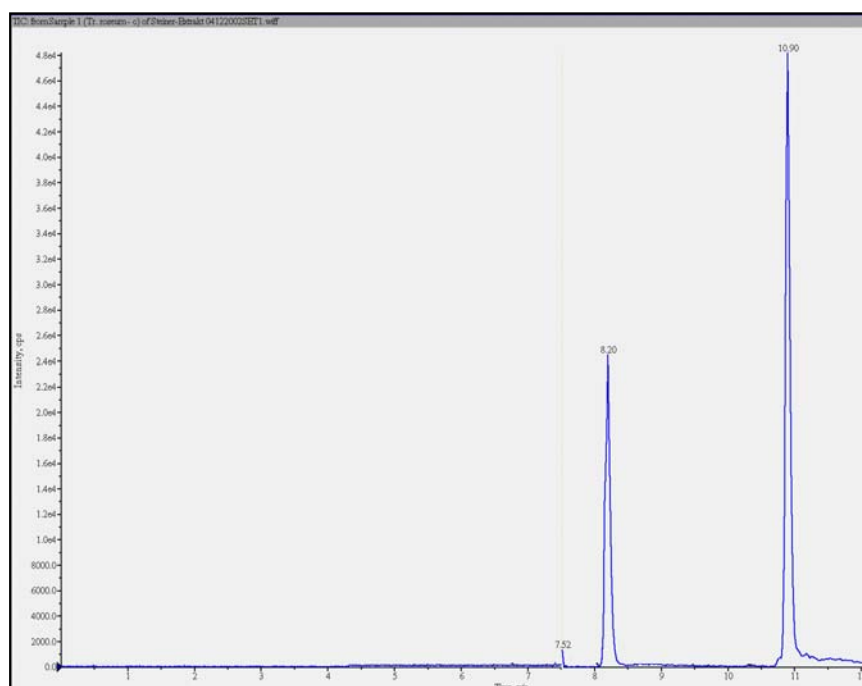


Abb. 11 HPLC-ESI(-/+)-MS/MS Basispeak-Chromatogramm eines Extraktes der Flüssigkultur von *Trichothecium roseum* mit Auftreten der beiden Mycotoxine Trichothecolon bei 8,2 Min. und Trichothecin bei 10,9 Min

3.3 Untersuchung von mit Rußfleckerregern inokulierten Äpfeln

Die Untersuchung von getrockneten Apfelschalen frischer Äpfel, die einige Wochen zuvor mit verschiedenen Erregern der Rußfleckenkrankheit inokuliert worden waren, ergab, dass sich in keiner Probe Mycotoxine finden ließen. Es zeigte sich das gleiche Bild wie bei den Flüssigkulturen, dass auch die mit Erregern aus den USA inokulierten Apfelschalen frei von Toxinen waren.

Tab. 13 Untersuchung von mit Rußfleckerregern inokulierten Äpfeln; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze

	NIV	DON	TON	DAS	T-2	TIN
8 Isolate <i>Peltaster fructicola</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
3 Isolate <i>Phialophora sessilis</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolate <i>Tripaspermum myrti</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolat <i>Tripaspermum camelopardus</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolat <i>Mycosphaerella sp.</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
5 Isolate (USA) <i>Peltaster fructicola</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
1 Isolat <i>Trichothecium roseum</i>	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG

3.4 Untersuchung von Apfelschalen frischer Äpfel mit Rußfleckensymptomen

Analysiert wurden Apfelschalen mit Rußfleckensymptomen. Dabei handelte es sich im Jahr 1999 um Proben der Sorten `Sir Prize`, `Topaz`, `Querina` und `Hilde` aus Bavendorf, im Jahr 2001 um Proben der Sorten `Goldrush`, `Topaz`, `Boskoop`, `Pilot`, `Glockenapfel` aus dem Raum Stuttgart und im Jahr 2002 um Proben der Sorten `Goldrush`, `Sir Prize`, `Vesga` aus dem Raum Bad Neuenahr-Ahrweiler. Es fanden sich weder Trichothecin noch Trichothecolon in den Proben.

3.6 Untersuchung von Apfelmus

Es wurden vier verschiedene Apfelmussorten aus Deutschland auf ein Vorkommen von Mycotoxinen untersucht. Dabei stammten zwei der Apfelmussorten aus integriertem Anbau, sowie die beiden anderen Sorten aus biologischem Anbau. Die Analyse ergab, dass alle Apfelmussorten frei von den untersuchten Toxinen waren.

Tab. 16 Untersuchung von Apfelmus; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze; IPM – aus integrierter Produktion, BIO – aus biologischer Produktion

	NIV	DON	TON	DAS	T-2	TIN
Apfelmus IPM Nordrhein-Westfalen	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Apfelmus IPM Baden-Württemberg	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Apfelmus BIO Nordrhein-Westfalen	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Apfelmus BIO Niedersachsen	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG

4 Diskussion

Die Untersuchung der Flüssigkulturextrakte von Erregern der Rußfleckenkrankheit, die in Deutschland von befallenen Apfelfrüchten abisoliert worden waren, ergab, dass diese frei von den bislang bekannten Mycotoxinen waren. Daher wurden Flüssigkulturen mit Isolaten aus den Südstaaten der USA angesetzt, um zu sehen, ob diese Toxine bildeten. Das Resultat war, dass sich auch in dieser Variante keine Mycotoxine finden ließen. Venkatasubbaiah et al. hatten 1995 die Trichothecene Trichothecolon und Trichothecolon-Acetat sowie andere Metabolite in Flüssigkulturen eines *Peltaster fructicola*-Isolates mit der Bezeichnung 2C3F1 bzw. ATCC 76560, isoliert von Apfelfrüchten in North Carolina, USA, mittels HPLC/UV nachgewiesen. Leider war es mangels Verfügbarkeit nicht möglich, dieses Isolat bei der American Type Culture Collection zu beziehen. Bedauerlicherweise ist auch das Rückstellisolat, welches sich bei Prof. Sutton der North Carolina State University in Raleigh, NC, USA befand, abhanden gekommen. Daher war es für uns nicht möglich, den Positivbefund von Venkatasubbaiah und Mitarbeitern (1995) zu bestätigen. Trichothecolon-Acetat hemmte das Wachstum von *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa* und *Peltaster fructicola* *in vitro*. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die Fähigkeit von *P. fructicola* diese Toxine zu produzieren, ihn in die

Lage versetzt mit *Botryosphaeria spp.* und *Colletotrichum spp.* auf der Apfelkutikula zu konkurrieren. Die Rolle dieser Toxine bei der Etablierung und dem Wachstum von *P. fructicola* auf der Apfelkutikula und ihrer Gegenwart auf *P. fructicola*-infizierten Früchten wurde noch nicht geklärt (VENKATASUBBAIAH, 1995).

Eine andere Erklärung für das Auftreten von Toxinen in den Pilzstämmen der Isolate von T.B. Sutton und Mitarbeitern könnte der Umstand sein, dass Pilzrassen aus subtropisch-feuchten Regionen wie North und South Carolina, USA, Mycotoxine bilden, um sich auf Grund des stärkeren Konkurrenzdruckes gegen andere Pilze auf der Fruchtoberfläche besser durchzusetzen. Beispielsweise weisen Apfelsäfte aus Nordafrika im Allgemeinen gewisse Mengen an Ochratoxinen und Aflatoxinen auf, während diese Toxine in mitteleuropäischen Apfelsäften keine Rolle als Kontaminanten spielen (ABDEL-SATER et al. 2001). Hier setzt auch der weitergehende Forschungsbedarf an. Es sollen am Institut für Gartenbauwissenschaft Untersuchungen initiiert werden, die Isolate von ein und derselben Pilzart aus verschiedenen warmen Regionen der Erde auf ihr Toxin-Bildungsverhalten hin untersuchen.

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass viele Pilze nur unter bestimmten Stresssituationen Mycotoxine produzieren. Hinzu kommt, dass die dem Pilz zur Verfügung stehenden Nährstoffe, insbesondere deren Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte und die Art der angebotenen Nährstoffe, einen wesentlichen Einfluss auf die Mycotoxinbildung zu haben scheinen. Hier besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf.

Letztlich können Fehlpeaks auch der Grund dafür sein, dass Venkatasubbaiah und Mitarbeiter glaubten, die zuvor erwähnten Mycotoxine gefunden zu haben. Betrachtet man die Probenaufbereitung und die Technik, mit der diese Autoren damals ihre Proben analysiert haben, so ist es durchaus möglich, dass sie eine Matrixstörung oder ein Verschleppungsphänomen als positiven Befund gedeutet hatten. In unserem Labor traten im ersten Monat der vorliegenden Untersuchungsreihe zahlreiche falsch-positive Befunde auf, die durch die Verwendung des verschleppungsarmen Probengebers HTC-PAL der Fa. CTC allerdings dann sofort beseitigt werden konnten (s. unten).

Mit Anwendung der HPLC/MS/MS-Technologie, die bei der vorliegenden Untersuchung zum Einsatz kam, ist man in der Lage, einen Analyten über vier Identifikationspunkte sicher zu identifizieren: 1.) Retentionszeit, 2.) Q1-Masse (Eltern-Ion), 3.) die Q3-Masse des Hauptfragment-Ions (Quantifizierer) und 4.) eine zweite Q3-Masse eines anderen Fragment-Ions (Qualifizierer).

Zunächst wird ein Analyt anhand seiner Retentionszeit grob bestimmt z.B. T-2 Toxin bei ca. 11 Minuten. Hinter dem Peak im Chromatogramm siehe Tabelle 10 verbergen sich allerdings zahlreiche Einzelspuren verschiedener Analyten. Das Massenspektrometer sollte als Vielkanalanalysator angesehen werden, da die Quantifizierung zahlreicher Analyten mit identischer Retentionszeit ohne weiteres möglich ist. Die Einzelspur von T-2 Toxin anhand der Q1-Masse 484,2 kann zur Identifizierung herangezogen werden (Identifizierung über das Eltern-Ion). Es ist aber nicht auszuschließen, dass Isomere dieses Analyten vorkommen, die

ebenfalls in der Lage sind, zur gleichen Retentionszeit eluiert zu werden und dieses spezifische Addukt bzw. Eltern-Ion von 484,2 zu bilden. Daher schließt sich eine Fragmentierung an, bei der hochspezifische Fragmente entstehen. Der Analyt T-2 Toxin wird anhand seiner ersten Q3-Masse 305,2 (1. Fragment / Quantifizierer) ein drittes Mal identifiziert. Um jegliches Risiko auszuschließen, wird die zweite Q3-Masse 215,2 (2. Fragment / Qualifizierer) hinzugezogen, da mit 99,9% Sicherheit (Angabe Applied Biosystems) keine weitere Substanz in der Lage ist, zur gleichen Zeit zu retenieren, das gleiche Addukt zu bilden und gleich zwei der hochspezifischen Fragmente zu bilden.

Venkatasubbaiah und Mitarbeiter verfügte 1995 lediglich über eine einfache HPLC/UV Technologie, die eine Absicherung der Analyten bzw. der Analyse nur über zwei Identifikationspunkte, nämlich die Retentionszeit in Kombination mit der jeweiligen Wellenlänge, erlaubt. Die UV-Detektion der Trichothecene muss im untersten Wellenlängenbereich vorgenommen werden und ist damit vergleichsweise unspezifisch. Hinzu kommt, dass der damals verwendete Autosampler der HP 1090-Serie leicht zu nicht unerheblichen Verschleppungen führen kann, da er weder in Lage ist, das Injektionssystem, noch das Injektionsventil mit organischen Lösemitteln zu spülen, bevor eine weitere Probe injiziert wird. Auch wurden die Proben nicht gekühlt, was ebenfalls zu verfälschten Ergebnissen geführt haben könnte.

Diese Problematik wurde bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Technologie gelöst, indem ein CTC HTC-PAL für die Injektionen verwendet wurde. Dieser Probengeber ist in der Lage, bis zu 324 verschiedene Proben zu kühlen und seine HPLC-Injektionspritze sowie sein Injektionsventil mit zwei unterschiedlich polaren, beliebig auswählbaren organischen Lösemitteln zu spülen. Eine Verschleppung durch hinter den Teflonstößel gelangende Probenlösung wird vermieden, indem zwischen Teflonstößel und Probenflüssigkeit eine Luftblase eingefügt wurde.

Die relativ geringen Wiederfindungsraten lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei Apfelprodukten um eine sehr diffizile Matrix handelt, die zu erheblichen Signalreduzierungen führt. Bei der Entwicklung einer Multimethode müssen Kompromisse unter den einzelnen Analyten gefunden werden, was ebenfalls zu schlechteren Signalen führt. Die vorliegende Untersuchung sollte ein erstes Screening nach Mycotoxin-Vorkommen im Zusammenhang mit der Rußfleckenkrankheit an Apfel sein. In kurzer Zeit sollten möglichst viele Apfelprodukte untersucht werden. Daher war die Ausarbeitung einer für jeden einzelnen Analyten optimierten Nachweismethode nicht das Ziel. Dennoch wäre bei einem Vorkommen von Mycotoxinen in toxikologisch relevanten Konzentrationen, bei Deoxynivalenol beispielsweise 500 ppb, ein deutliches und großes Signal erkennbar gewesen. Solche Analysen mit ausreichend großen HPLC-Peaks von Trichothecenen werden in unserem Labor routinemäßig an Proben mit kontaminiertem Getreide durchgeführt (Meyer et al. 2003).

Trichothecolon-Acetat konnte nur mit Einschränkungen analysiert werden, da es als Standard nicht zu beschaffen war. Die vermutliche Q1-Masse des Addukt-Ions wurde aufgrund der verfügbaren Strukturformel errechnet, indem zu dem Molekulargewicht von Trichothecolon-Acetat das Molekulargewicht des Ions (H^+ bzw. NH_4^+) addiert wurde. Um Q3-Massen zu

erhalten, wurde davon ausgegangen, dass Trichothecolon-Acetat in der Lage ist, die gleichen Fragmente zu bilden wie Trichothecolon oder Trichothecin. Die vermutliche Retentionszeit ließ sich ebenfalls ungefähr einordnen. Da Trichothecolon-Acetat unpolarer als Trichothecolon ist, müsste es, falls es vorgekommen wäre, nach Trichothecolon auftreten.

Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse liegen keinerlei Hinweise vor, dass deutsche Äpfel oder Apfelprodukte mit Mycotoxinen aus der Gruppe der Trichothecene kontaminiert sind. Daher ist nach bisherigen Erkenntnissen keine Gefährdung der deutschen Verbraucher durch den Konsum heimischer Apfelprodukte gegeben. Ohne weitergehende Untersuchungen lässt sich nicht endgültig klären, ob die Erreger der Rußfleckenkrankheit aus anderen Herkunftsorten als den hier ausgewählten deutschen Bundesländern in der Lage sind, Mycotoxine zu bilden. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass viele Pilze nur unter bestimmten Stresssituationen Mycotoxine produzieren. Hinzu kommt, dass die dem Pilz zur Verfügung stehenden Nährstoffe, insbesondere deren Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalte, einen wesentlichen Einfluss auf die Mycotoxinbildung zu haben scheinen. Hier besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf. Auch wäre zu klären, ob die in Betracht gezogenen Erreger der Rußfleckenkrankheit über die für eine Mycotoxin-Synthese notwendigen Gene verfügen.

5 Zusammenfassung

Bei Obst, Weinbeeren und Nüssen können verschiedene Mycotoxine nach Pilzbefall auftreten; Beispiele sind Patulin in Apfelsaft, hervorgerufen durch Früchte mit Faulstellen, Trichothecin in Weinbeeren durch Befall mit Rosafäule und Aflatoxine an pilzbefallenen Nüssen. Mycotoxine spielen als mögliche Ursache für latente Lebensmittelintoxikationen oder Krebserkrankungen eine Rolle. Eine in neuerer Zeit vermehrt beobachtete Pilzkrankheit bei Äpfeln ist die Rußfleckenkrankheit (engl. Apple sooty blotch disease), die mittlerweile mit zunehmender Tendenz bei Früchten nicht nur aus organischem Anbau auftritt. In manchen Betrieben werden die befallenen Früchte zur Safterstellung oder zur Produktion von Apfelsaft und Trockenfrüchten verwendet, so dass der Verbraucher alle diejenigen Sekundärstoffe, die möglicherweise von den pilzlichen Erregern dieser Krankheit synthetisiert werden, mit dem betreffenden Lebensmittel aufnimmt.

Die Gefahr des Befalls mit Rußflecken-Erregern steigt mit vermindertem Einsatz von Fungiziden sowie mit dem vermehrten Anbau schorfresistenter Apfelsorten, die in der Regel wenigen oder keinen Fungizidspritzungen ausgesetzt sind. Dies trifft vor allem im ökologischen Anbau zu. In den USA wurde nachgewiesen, dass die Krankheit durch einen Erregerkomplex verursacht wird. Zu den Erregern dort zählen die Pilze *Geastrum polystigmatis*, *Leptodontidium elatius* und *Peltaster fructicola*. In Deutschland wurden als Rußflecken-Erzeugende Pathogene neben *Peltaster fructicola* die Pilze *Phialophora sessilis*, *Tripaspermum myrti* und *Tripaspermum camelopardus* identifiziert. Im Jahr 1995 wurde eine amerikanische Studie veröffentlicht, wonach der Deuteromycet *Peltaster fructicola* Johnson, T. B. Sutton & Hodges in Flüssigkultur zwei Mycotoxine aus der Substanzklasse der

Trichothecene produziert: Trichothecolon und Trichothecolon-Acetat (VENKATASUBAIAH et al. 1995). Trichothecolon ist das Hydrolyseprodukt von Trichothecin, ein Mycotoxin, das auch bei *Fusarium*- und *Trichothecium*-Befall von Weizen und anderen Getreidearten gebildet wird (ISHII et al., 1986). Da *P. fructicola* einer der Erreger der Rußfleckenkrankheit an Äpfeln und Birnen ist, wird erneut die Problematik der Verwertung von pilzbefallenem Obst in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Trichothecolon ist die direkte Biosynthese-Vorstufe von Trichothecin. Es kann daher ohne genaue chemische Analysen nicht ausgeschlossen werden, dass *P. fructicola* zusätzlich noch das sehr viel gefährlichere Trichothecin bildet.

Es wurde geprüft, ob aus Deutschland stammende Isolate von *P. fructicola* und *P. sessilis* in der Lage sind, die Mycotoxine Trichothecin und Trichothecolon sowie zusätzlich Nivalenol, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol und T-2-Toxin *in vitro* zu bilden, und ob in Apfelschalen, die Symptome der Rußfleckenkrankheit aufwiesen – inokuliert und natürlich befallen-, diese Mycotoxine vorkommen. Außerdem wurden Apfelsäfte und Apfelmussorten unterschiedlicher Herkunft analysiert.

Die Analyse der Mykotoxine erfolgte mittels HPLC/MS/MS. Im Vergleich zu anderen Analysemethoden erfordert diese Methode weder eine Derivatisierung der Proben, wie bei gaschromatographischen Verfahren, noch ist eine sehr aufwendige Probenaufbereitung wie bei HPLC/UV notwendig. Die deutlichen Vorteile der HPLC/MS/MS liegen in der hohen Spezifität und Sensitivität. Hinzu kommt, dass Multimethoden entwickelt werden können, mit deren Hilfe man in den jeweiligen Proben zahlreiche Analyten gleichzeitig in einem HPLC-Lauf quantifizieren kann. Die dargestellte Methode ist eine schnelle und sensitive Methode für die Detektion der Typ A- und Typ-B Trichothecene. Die von anderen Methoden bekannten Probleme hinsichtlich der Quantifizierung, wie beispielsweise nichtlineare Eichgeraden, Matrixstörungen, Fehlpeaks, die einen positiven Befund implementieren, konnten mit diesem Nachweisverfahren umgangen werden, da die Methode die Identifizierung eines Analyten über vier Identifikationspunkte erlaubt: a) die Retentionszeit, b) die Q1-Masse (Eltern-Ion) c) die erste Q3-Masse (Quantifizierer) d) eine zweite Q3-Masse (Qualifizierer).

Die Mycotoxine Trichothecin und Trichothecolon konnten in der Flüssigkultur von *Trichothecium roseum*, Referenz-Pilzisolat für diese Metabolite, nachgewiesen werden. In den Flüssigkulturen von *Peltaster fructicola*, *Phialophora sessilis*, *Mycosphaerella sp.*, *Tripospermum myrti* und *Tripospermum camelopardus* fanden sich hingegen keine Toxine. Die Untersuchung der mit den Rußfleckenenerregern inokulierten Äpfel ergab, dass sich ebenfalls keiner der Analyten in den Proben finden ließ. Auch die getrockneten Schalen frischer deutscher Äpfel, die von diesen Pilzen besiedelt waren, enthielten diese Mycotoxine nicht. In den untersuchten Apfelsäften und Apfelmussorten konnten unabhängig von der Herkunft aus deutscher integrierter oder ökologischer Produktion keine Mycotoxine detektiert werden.

Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse liegen keinerlei Hinweise vor, dass Apfelfrüchte oder Apfelprodukte mit Mycotoxinen aus der Gruppe der Trichothecene kontaminiert sind. Dennoch sind weitergehende Untersuchungen erforderlich, da es Hinweise gibt, dass viele Pilze nur unter bestimmten Stresssituationen Mycotoxine produzieren. Hinzu kommt, dass die dem Pilz zur Verfügung stehenden Nährstoffe, insbesondere deren Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalte, einen wesentlichen Einfluss auf die Mycotoxinbildung zu haben scheinen. Des Weiteren ist zu untersuchen inwiefern eine Mycotoxinproduktion von der jeweiligen, klimatisch unterschiedlichen Herkunft der Erreger abhängig ist. Auch wäre zu klären, ob die in Betracht gezogenen Erreger der Rußfleckenkrankheit über die für eine Mycotoxin-Synthese notwendigen Gene verfügen. Hier besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf.

6 Schlussfolgerungen für die Umsetzung in die Praxis

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass weder in Flüssigkulturen der einzelnen Erreger der Rußfleckenkrankheit, in Schalen befallener Apfelfrüchte noch in Apfelsäften die Trichothecene Trichothecin und Trichothecolon vorkommen. Auch die zusätzlich analysierten Toxine Nivalenol, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin wurden nicht gefunden. Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse liegen keinerlei Hinweise vor, dass hiesige Äpfel oder Apfelprodukte mit Mycotoxinen aus der Gruppe der Trichothecene kontaminiert sind. Dennoch sind weitergehende Untersuchungen erforderlich, da es Hinweise gibt, dass viele Pilze nur unter bestimmten Stresssituationen Mycotoxine produzieren. Hinzu kommt, dass die dem Pilz zur Verfügung stehenden Nährstoffe, insbesondere deren Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalte, einen wesentlichen Einfluss auf die Mycotoxinbildung zu haben scheinen. Auch wäre zu klären, ob die in Betracht gezogenen Erreger der Rußfleckenkrankheit über die für eine Mycotoxin-Synthese notwendigen Gene verfügen. Hier besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf.

7. Literaturverzeichnis

ABDEL-SATER, M.A., ZOHRI A.A. and ISMAIL M.A. (2001)

Natural contamination of some Egyptian fruit juices and beverages by mycoflora and mycotoxins, *J. Food Sci. Technol.* **38**, 407-411.

BAINES, R. C. and GARDENER, M. W. (1932)

Pathogenicity and cultural characters of the apple sooty-blotch fungus, *Phytopathology* **22**: 937-951.

BERGER, U. (2000)

Structure Elucidation and Quantification of trichothecenes and bisphenol diglycidyl ether derivatives in food by HPLC combined with multiple mass spectrometry, Dissertation Universität Basel.

BETINA, V. (1989)

Bioactive molecules Vol. 9, Mycotoxins – Chemical, Biological and Environmental Aspects, Chapter 10 Trichothecenes: 192-238, Elsevier.

BITANCOURT, A.A. (1934)

Stomiopeltis citri n.sp., agente da “fuligem” dos Citrus no estado de Sao Paulo, *Arquivos Inst. Biol. Sao Paulo* **5**: 251-262 und Taf. 26/27

CANNON, P.F. (1996)

Systematics and diversity of the Phyllachoraceae associated with Rosaceae, with a monograph of *Polystigma*, *Mycol. Res.* **100**: 1409-1427

COLBY, A. S. (1920)

Sooty blotch of pomaceous fruits, *Trans. Illinois State. Acad. Sci.*, **13**: 139-175

COLE, R. J. and COX, R. H. (1981)

Handbook of the Toxic Fungal Metabolites, Academic Press, New York.

DE HOOG, G. S. (1977)

Rhinocladiella and allied genera, S. 1-140 in: *Studies in Mycology*, No. **15**, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands.

DESJARDINS, A. E., HOHN, T. M. and McCORMICK, S. P. (1993)

Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance, *Microbiol. Rev.* **57**: 595-604.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (1996)

Ernährungsbericht 1996, Frankfurt am Main, 368 S.

DUGGAR, B. M. (1909)

Sooty blotch and flyspeck of apple and other plants, *Leptothyrium pomi* (Mont. & Fr.) Sacc. S. 367 – 369 in: *Fungous Diseases of Plants*. Ginn & Co., Boston.

FAO (1997)

Food and Nutrition Paper 64, Worldwide regulations for mycotoxins 1995, A compendium, FAO Rome .

GARDNER, M. W. and BAINES, R. C. (1931)

Cultural Characters and host range of the apple sooty-blotch fungus, (Abstr.) *Phytopathology* **21**: 112.

GILBERT, J. (1993)

Recent Advances in analytical methods for mycotoxins, *Food Addit. Contam.* **10**(1), 37-48.

GLATZ, E. T., CSANYI, E. and GYIMESI, J. (1966)

Supplementary data on crotochin, an antifungal antibiotic, *Nature* **212**: 617.

GROVES, A. B. (1933)

A study of the sooty blotch disease of apples and the causal fungus *Gloeodes pomigena*, *Virginia Agric. Exp. Stn. Bull.* **50**: 1-43.

HARTL, M. (2000)

Fumonisine: Neuartige Fusarium-Mykotoxine, Untersuchungen zur Stereochemie, zum Vorkommen in Lebensmitteln und zur biologischen Aktivität, Dissertation Universität Würzburg.

HESLER, L. R. and WHETZEL, H. H. (1917)

Sooty-blotch and flyspeck, S. 104-108, in: *Manual of Fruit Diseases*, MacMillan Company, New York.

HICKEY, K. D. (1960)

The sooty blotch and flyspeck diseases of apple with emphasis on variation within *Gloeodes pomigena* (Schw.) Colby, Ph.D. thesis Pennsylvania State University, University Park.

HOHN, T. M., McCORMICK, S. P., ALEXANDER, A. E. and DESJARDINS, A. E. (1998), Function and Biosynthesis of Trichothecenes produced by *Fusarium* Species, K. Kohmoto and O. C. Yoder (eds.) *Molec. Genet. of Host-Specific Toxins in Plant Disease*, 17-24.

JOHNSON, E. M. and SUTTON, T. B. (1994)

First report of *Gaeastrum polystigmatum* on apple and common blackberry in North America, *Plant Disease*, **78**: 1219.

JOHNSON, E. M., SUTTON, T. B. and HODGES, C. S. (1996)

Peltaster fructicola: A new species in the complex of fungi causing apple sooty blotch disease. *Mycologia*, **88**: 114-120.

JOHNSON, E. M., SUTTON, T. B. and HODGES, C. S. (1997)

Etiology of Apple Sooty Blotch Disease in North Carolina, *Phytopathology* **87**: 88-95.

JONES, A. L. and Sutton, T. B. (1996)

Sooty Blotch and Flyspeck, *Diseases of Tree Fruit in the East*, S. 19-20.

KERN, S. (2002)

Die Rußfleckenkrankheit am Apfel – neue Erkenntnisse über die verursachenden Pilze dieser Krankheit und deren Biologie, 111 S. (unpublizierte Daten).

KROMIDAS, S. (1999)

Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim.

KRSKA, R. (1998)

Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals, *J. of Chromatography A* **815** : 49-57.

KRSKA, R., BAUMGARTNER, S. and JOSEPHS, R. (2001)

The state-of-the-art in the analysis of the type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals, Fresenius J. Anal. Chem. **371**: 285-299.

LANGSETH, W. and RUNDBERGET, T. (1998)

Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures, J. Chromatography A **815**, 103-121.

LIN, L., ZHANG, J., WANG, P., WANG, Y. and CHEN, J. (1998)

Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods, J. Chromatography A **815**: 3-20.

KRÄMER, J. B., KUNZ, M., BERLETH, M. and WEIDENBÖRNER, M. (1997)

Nachweis von Indikator-Mykotoxinen, Lehr- und Forschungsschwerpunkt "Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft" an der Universität Bonn, Forschungsbericht 44 (61 S.).

MEYER, G., FELDMANN, T., OERKE, E. C., STEINER, U., OERTEL, B. and DEHNE, H. W. (2003), Diversität der *Fusarium*-Arten an Weizen und Analytik des Mykotoxinspektrums, Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V., 25. Mycotoxin-Workshop, Giessen.

NISHIE, K., CUTLER, H. G. and COLE, R. J. (1989)

Toxicity of Trichothecenes, Moniliformin, Zearalenone / ol, Griseofulvin, Patulin, Pr Toxin and Rubratoxin B on Protozoan *Tetrahymena pyriformis*, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm. **65**: 197-210.

NOGA, G., DEHNE, H. W., STEINER, U. and KERN, S. (2001)

Die Rußfleckenkrankheit beim Apfel, in: Hoegen, B. (Hrsg.), Arbeitsergebnisse aus dem Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Untersuchungen im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes NRW, 8 S., ISSN: 0943-9684.

PARK, J. J. and CHU, F. S. (1996)

Assesment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn, J. of AOAC Internat. **79**: 465-471.

PESTKA, J. J. and BONDY, G. S. (1994)

Mycotoxins in Grain, Compounds other than Aflatoxins, Miller J. D., Trenholm H. L. (Eds.), Eagan Press, St. Paul, MN, USA, 339-358.

PIROZYNSKI, K. A. (1971)

Note on *Geastrum polystigmatis*, Mycol. **63**: 897-901.

PRELUSKY D. B., ROTTER B. A. and ROTTER, R. G. (1994)

Mycotoxins in Grain, Compounds other than Aflatoxins, Miller J. D., Trenholm H. L. (Eds.), Eagan Press, St. Paul, MN, USA, 359-403.

ROMER, T. R. (1986)

Use of a small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feed, J. of AOAC Internat. **69**: 699-703.

ROSNER, H. and VAN EGMOND, H. P. (1995)

Mykotoxin-Höchstmengen in Lebensmitteln, Bundesgesundheitsblatt **12**: 467-473.

RUSAN, M. and MANOLIU, A. L. (1978)

Improvement of trichothecine biosynthesis using ultraviolet irradiations and different culture media, Rev. Roum. Biol.-Biol. Veg. **23**, 65.

SACCARDO, P. A. (1883)

Sylloge Fungorum **2**: 622, Pavia.

SCHWENK, S. (1987)

Untersuchungen zur Bedeutung der Mykotoxine des Pilzes *Trichothecium roseum* Link ex Fr. für den Weinbau sowie der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf an Reben vorkommenden Mycotoxin bildende Pilzgattungen. Dissertation, Universität Kaiserslautern.

SCHÜTTE, H. R. (2000)

Secondary Plant Substances: Trichothecenes, Prog. Bot. **61**: 269-281.

SMITH J. E. and MOSS M. O. (1985)

Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance, Wiley, Chichester etc., 148 S.

SPRAGUE, C. J. (1856)

Spilocaea fructigena Schw. and *Asteroma pomigena* Schw., Boston Soc. Nat. History **5**: 338-339

SUTTON, A. L. and SUTTON, T. B. (1994)

The Distribution of mycelial types of *Gloeodes pomigena* on apples in North Carolina and their relationship to environmental conditions, Plant Dis. **78** (7): 668–673.

TAMM, C., TORI, M. and BETINA, V. (1984)

Mycotoxins – Production, Isolation, Separation and Purification, Elsevier, S. 131

TANAKA, T., HASEGAWA, A., MATSUKI, Y., ISHII, K. and UENO, Y. (1985)

Food Addit. Contam. **2**: 125-137.

TATSUNO, T., SAITO, M., ENOMOTO, M. and TSUNODA, H. (1968)

Chem. Pharm. Bull., **16**: 2519.

TRENHOLM, H. L., WARNER R. M. and PRELUSKY, D. B. (1985)

Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for Deoxynivalenol (Vomitoxin), J. of AOAC Internat. **68**: 645-649.

UENO, Y. (1983)

Trichothecenes – Chemical, Biological, and Toxicological Aspects, Kodansha, Tokyo and Elsevier, Amsterdam.

VENKATASUBBIAH, P., SUTTON, T. B. and CHILTON, W. S. (1995)

The structure and biological properties of secondary metabolites produced by *Peltaster fructicola*, a fungus associated with apple sooty blotch disease, Plant Disease **79**: 1157-1160.

SCHWEINITZ, v., L.D. (1832)

Synopsis fungorum in America boreali media degentium, Trans. Amer. Philos. Soc. NS **4**, 141-316 (S. 232).

WILLIAMSON, S. M. and SUTTON, T. B. (2000)

Sooty Blotch and Flyspeck of Apple: Etiology, Biology, and Control, Plant Disease **84** (7): 714-724.

WEI, R. D. and CHU F. S. (1986)

Instability of some trichothecenes in methanol, J. of AOAC Internat. **69**: 902-903.

YOUNG, J. C. and GAMES, D. E. (1992)

Supercritical fluid chromatography of *Fusarium* mycotoxins, J. of Chromatogr. **627**: 247-254.

YOUNG, J. C. and GAMES, D. E. (1993)

Analysis of Fusarium Mycotoxins by Supercritical-Fluid Chromatography with Ultraviolet or Mass-Spectrometric Detection, J. Chromatogr. A **653** : 374-379.

ZARING, D. (1929)

Studies on sooty blotch of apples, M.S. thesis Purdue University, West Lafayette, IN, USA.

8 Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten

Es empfiehlt sich bei weiteren Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet, gezielt eine mögliche Mycotoxinproduktion in Abhängigkeit der klimatisch bedingten Herkunft der Rußfleckenerreger detailliert zu untersuchen, was aus zeitlichen und finanziellen Gründen in dieses Projekt nicht einbezogen werden konnte. Auch wäre zu klären, ob die in Betracht gezogenen Erreger der Rußfleckenkrankheit über die für eine Mycotoxin-Synthese notwendigen Gene verfügen.

9 Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte

keine

10 Liste über Veröffentlichungen

Die Ergebnisse und die grundsätzliche Problematik wurden in der BGDL-Schriftenreihe Band **21**, (2003) von Feldmann, T., Oertel, B., Steiner, U. und Noga, G., mit dem Titel ‚Sind die Erreger der Rußfleckenkrankheit beim Apfel potentielle Mykotoxinbildner?‘ publiziert.

Eine ausführlichere Version dieser Veröffentlichung befindet sich in Vorbereitung und wird nach Erscheinen als Sonderdruck nachgereicht.

11 Liste über Vorträge

Die Thematik und eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studie wurden in einem Vortrag mit dem Titel ‚Sind die Erreger der Rußfleckenkrankheit beim Apfel potentielle Mykotoxinbildner?‘ bei der 40. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung vom 26.02.-01.03.2003 in Freising bei München präsentiert.

12 Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen

Die komplexe Analysentechnologie wurde im Rahmen des Besuchs von Professor T.B. Sutton der North Carolina State University, der eine bedeutende Kompetenz auf dem Gebiet der Rußfleckenkrankheit besitzt, demonstriert und die gesamte Thematik und Problemstellung ausführlich diskutiert.

13 Kurzfassung

In den Anbaugebieten der gemäßigten Klimazonen ist die Rußfleckenkrankheit eine häufig auftretende Pilzkrankheit beim Apfel (*Malus x domestica* Borkh.). Die Gefahr des Befalls mit Rußfleckenerregern steigt durch einen verminderten Einsatz von Fungiziden sowie mit dem vermehrten Anbau schorfresistenter Apfelsorten, die ebenfalls in der Regel wenigen oder keinen Fungizidspritzungen ausgesetzt sind. Dieses trifft vor allem im ökologischen Anbau zu. In den USA wurden 1993 in einer Flüssigkultur eines *Peltaster fructicola*-Isolates, einem der pilzlichen Erreger der Rußfleckenkrankheit, die Mycotoxine Trichothecolon und Trichothecolon-Acetat gefunden. Daher wurden die in Deutschland als Erreger der Rußfleckenkrankheit geltenden Pilze auf ihre Fähigkeit untersucht, Mycotoxine der Gruppe der Trichothecene zu bilden. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass weder in Flüssigkulturen der einzelnen Erreger der Rußfleckenkrankheit, noch in Schalen befallener Apfelfrüchte, noch in Apfelsäften die Trichothecene Trichothecin und Trichothecolon vorkommen. Auch die zusätzlich analysierten Toxine Nivalenol, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin wurden nicht gefunden. Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse liegen keinerlei Hinweise vor, dass deutsche Apfelfrüchte oder Apfelprodukte mit Mycotoxinen aus der Gruppe der Trichothecene kontaminiert sind. Dennoch sind weitergehende Untersuchungen erforderlich, da es Hinweise gibt, dass viele Pilze nur unter bestimmten Stresssituationen Mycotoxine produzieren. Hinzu kommt, dass die dem Pilz zur Verfügung stehenden Nährstoffe, insbesondere deren Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalte, einen wesentlichen Einfluss auf die Mycotoxinbildung zu haben scheinen. Des Weiteren ist zu untersuchen, inwiefern eine Mycotoxinproduktion von der jeweiligen, klimatisch unterschiedlichen Herkunft der Erreger abhängig ist. Auch wäre zu klären, ob die in Betracht gezogenen Erreger der Rußfleckenkrankheit über die notwendigen Gene für eine Mycotoxin-Synthese verfügen. Hier besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf.

Anhang

Verzeichnis der Abbildungen

	Seite	
Abb. 1	Apfel Frucht, befallen mit Erregern der Rußfleckenkrankheit	2
Abb. 2	Biosynthese-Weg der Trichothecene	5
Abb. 3	Strukturformel von Trichothecin	6
Abb. 4	Strukturformel von Trichothecolon	6
Abb. 5	Strukturformel von Nivalenol	7
Abb. 6	Strukturformel von Deoxynivalenol	7
Abb. 7	Strukturformel von T-2 Toxin	7
Abb. 8	Strukturformel von Diacetoxyscirpenol	8
Abb. 9	SLS 03 Evaporator „Sweet Little Sixteen [®] “	22
Abb. 10	HPLC-ESI(-/+)-MS/MS Basispeak Chromatogramm einer 250 ppb Standardlösung der Mycotoxine Nivalenol (5,9 Min.) und Deoxynivalenol (7,1 Min.) im Negativmodus, sowie von Trichothecolon und Verrucarol (8,4 Min. in einem Peak; zwei Spuren im Hintergrund), Diacetoxyscirpenol (9,9 Min.) und T-2 Toxin, T-2 Toxin d3 und Trichothecin (11 Min.; ebenfalls in einem Peak, hinter dem mehrere Einzelspuren verborgen sind, dargestellt).	28
Abb. 11	HPLC-ESI(-/+)-MS/MS Basispeak-Chromatogramm eines Extraktes der Flüssigkultur von <i>Trichothecium roseum</i> mit Auftreten der beiden Mycotoxine Trichothecolon bei 8,2 Minuten und Trichothecin bei 10,9 Minuten	29

Verzeichnis der Tabellen

	Seite	
Tab. 1	LD ₅₀ -Werte von Trichothecenen; Quellen: 1 – COLE and COX, 1981, 2 – UENO, 1983, 3 – TATSUNO et al., 1968, 4 – TAMM and TORI, 1984, 5 – GLATZ et al., 1966, 6 – Toxicol. Appl. Pharmacol. (1975) 31, 465 1975	8
Tab. 2	Grenzwerte für <i>Fusarium</i> -Mycotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON); Quelle: (FAO 1997; ROSNER et al. 1995)	9
Tab. 3	Einstellungen der Parameter der Ionenquelle	14

Tab. 4	Übersicht Ionenübergänge (Q1- und Q3-Massen), Declustering Potential (DP), Focusing Potential (FP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE) und Collision Cell Exit Potential (CXP). Fett gedruckt sind die Quantifizierer, normal gedruckt die Qualifizierer	15
Tab. 5	Bezeichnung der Isolate der Gattung <i>Peltaster fructicola</i> Johnson, Sutton und Hodges (Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	19
Tab. 6	Bezeichnung der Isolate der Gattung <i>Phialophora sessilis</i> de Hoog, (Baden-Württemberg, Deutschland)	19
Tab. 7	Bezeichnung der Isolate von <i>Tripospermum myrti</i> (Lind) S. J. Hughes und <i>Tripospermum camelopardus</i> Ingold, Dann & P. J. McDougall, (Baden-Württemberg)	20
Tab. 8	Bezeichnung des Isolates von <i>Trichothecium roseum</i> (Pers.: Fr.) Link, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	20
Tab. 9	Bezeichnung des Isolates mit einer mutmaßlichen Zuordnung zur Gattung <i>Mycosphaerella</i> , (Baden-Württemberg, Deutschland)	20
Tab. 10	Bezeichnung der Isolate von <i>Peltaster fructicola</i> Johnson, Sutton und Hodges - Referenzisolate aus den USA	20
Tab. 11	Darstellung der Eltern-Ionen (erste Q1-Masse) mit den dazugehörigen Quantifizierern (erste Q3-Masse) und den jeweiligen Qualifizierern (zweite Q3-Masse), sowie deren Retentionszeit (Rt-Zeit), Flächenwert (A/c-Wert), HHB (Halbhöhenbreite) und NWG (Nachweisgrenze).	27
Tab. 12	Untersuchung von Flüssigkulturen der Pilzisolate einiger Erreger der Rußfleckenkrankheit sowie von <i>Trichothecium roseum</i> als Positivkontrolle; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze	29
Tab. 13	Untersuchung von mit Rußfleckenerregern inokulierten Äpfeln; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze	30

Tab. 14	Untersuchung von Apfelschalen frischer Äpfel mit Rußfleckensymptomen; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze	31
Tab. 15	Untersuchung von Apfelsäften; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze; IPM – aus integrierter Produktion, BIO – aus biologischer Produktion	31
Tab. 16	Untersuchung von Apfelmus; Analyten: NIV – Nivalenol, DON – Deoxynivalenol, TON – Trichothecolon, DAS – Diacetoxyscirpenol, T-2 – T-2 Toxin, TIN – Trichothecin; < NWG : unterhalb der Nachweisgrenze; IPM – aus integrierter Produktion, BIO – aus biologischer Produktion	32