

Vergleichende Studie zur Qualität von konventionell und ökologisch erzeugtem Gemüse am Beispiel der Allergenität

Comparative study on the quality of vegetables derived from conventional and organic farming using the example of carrots

FKZ: 03OE249

Projektnehmer:

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Thielallee 88-92, 14195 Berlin

Tel.: +49 30 8412-0

Fax: +49 30 8412-4741

E-Mail: poststelle@bfr.bund.de

Internet: <http://www.bfr.bund.de>

Autoren:

Zagon, Jutta; Jansen, Bärbel; Dahl, Lotte; Holzhauser, Thomas; Vieths, Stefan; Broll, Hermann

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

Abschlussbericht

Projekt 03OE249

Projekttitle: „Vergleichende Studie zur Qualität von konventionell und ökologisch erzeugtem Gemüse am Beispiel der Allergenität“

Berichtszeitraum: 1.10.2004 – 31.12.2006

BfR, Berlin

Projektleitung: Hermann Broll

in Kooperation mit

Paul-Ehrlich Institut, Langen

Lotte Dahl, Kay Fötisch, Thomas Holzhauser, Stefan Vieths

und

FAL, Braunschweig

Silvia Haneklaus

Kontakt:

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Dr. Jutta Zagon und Dipl.Biol. Hermann Broll
FG 56, Produktidentität, Rückverfolgbarkeit und Neuartige Lebensmittel
Thielallee 88-92
D-14195 Berlin
Tel: +49-30-84123876/-3639 / Fax: +49-30-84123635
www.bfr.bund.de

j.zagon@bfr.bund.de h.broll@bfr.bund.de

Paul-Ehrlich-Institut (PEI)

Prof. Dr. Stefan Vieths und Dr. Thomas Holzhauser
Abteilung Allergologie
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen
Tel: +49-61032-775304 / Fax: +49-6103-771258
www.pei.de

viest@pei.de holth@pei.de

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	10
1.1	Projektziele	10
1.2	Planung und Ablauf des Projekts	11
1.3	Koordination und Kooperationen.....	9
1.4	Wissenschaftlicher und Technischer Stand an den angeknüpft wurde.....	9
1.4.1	Lebensmittelallergien in der Bevölkerung und die Bedeutung von Möhren als allergieauslösendes Gemüse	9
1.4.2	Die Hauptallergene der Möhre	10
1.4.3	Analytik	11
1.4.4	Anbausituation und Sortenrecherche	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Markt- und Sortenrecherche	13
2.2	Untersuchungsmaterial	13
2.3	Feldversuche 2005 / 2006	14
2.4	Probenahme	16
2.5	Probenaufarbeitung	17
2.6	Nährstoffgehalte der Pflanzen.....	18
2.7	Nukleinsäure-Analytik	18
2.7.1	RNA-Isolierung aus Ernteproben.....	18
2.7.2	RNA-Isolierung aus Marktproben	18
2.7.3	Bestimmung der RNA Konzentration und Extraktreinigung.....	18
2.7.4	Reverse Transkription	19
2.7.5	Primer, Sonden und PCR-Bedingungen.....	20
2.7.6	Bedingungen für die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.7.7	Bedingungen für die Real-Time- PCR	22
2.8	Immunologische Methoden.....	23
2.8.1	Proteinextraktion	23
2.8.2	ELISA zum Nachweis von Dau c.101, Dau c 1.02 und Dau c 4	23
2.8.3	IgE Immunoblot Analyse	25
2.8.4	in vitro RBL-Zell Mediator Freisetzungstest	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Marktrecherche.....	27
3.1.1	Sorten- und Marktanteile von Möhren	27
3.1.2	Saatgut.....	28
3.1.3	Angebotsformen (persönliche Auskünfte verschiedener Anbauberater)	29
3.1.4	Standortfaktoren und Anbaugebiete	29

3.1.5	Sortenauswahl für den Feldversuch	30
3.2	Verlauf der Feldversuche	30
3.2.1	Feldversuche, Zustand der Pflanzen	30
3.2.2	Probenahme	32
3.3	Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen	34
3.3.1	Assayentwicklung (ELISA)	34
3.3.2	IgE-Immunoblot Analyse zur Erstellung eines Möhren Allergogramms.....	40
3.3.3	ELISA Untersuchungen zum Allergehalt der Möhrenproben aus den Anbauversuchen 2005 und 2006	43
3.3.4	in vitro biologische Aktivität der Feldversuchsproben (2005) im RBL-Zell Mediatorfreisetzungstest.....	56
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen zur Gentranskription	58
3.4.1	Entwicklung von qRT- <i>real time</i> PCR Systeme zum mRNA Nachweis der Isoformen Dau c 1.01 und der Isoform Dau c 1.02 des Möhrenhauptallergens Dau c 1	58
3.4.2	Entwicklung und Auswahl eines Referenzsystems (Housekeeping Gene)....	62
3.4.3	Ergebnisse der qRT- <i>real time</i> PCR Messungen für die Vegetationsperiode 2005	63
3.4.4	Ergebnisse der qRT- <i>real time</i> PCR Messungen für die Vegetationsperiode 2006	66
3.4.5	Statistische Analyse	69
3.4.6	Datenanalyse mittels Delta-delta Ct-Methode für die Vegetationsperioden 2005 und 2006.....	77
3.4.7	Untersuchung von Marktproben und Proben aus anderen Projekten.....	80
3.4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptionsstudie	82
4	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse, Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung, ggf. Angaben zu Erfindungen und Schutzrechten, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse ...	85
5	Zusammenfassung	86
6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	87
7	Literaturverzeichnis.....	88
8	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter u.s.w)	90

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel
1	Zeitskala (Projektmonate t) und Meilensteine
2	Anbauversuchskonzept im Streifenversuch.
3	Schema der Probenahme
4	Fließschema der Probenaufarbeitung
5	Angebotsformen von Möhren im Deutschen Handel.
6	Auflauf der Saat
7	Reihenschluss, links konventioneller, rechts ökologischer Anbau
8	Beispiel für Ernteproben. Obere Reihe Einzelproben (5 große und 5 kleine Möhren) – untere Reihe Zufalls-Mischprobe à 20 Möhren
9	Repräsentative Standardkurven zum Nachweis von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4
10	Standardaddition von Dau c 1.01 in zwei Extrakte der Untersuchungsproben aus dem Feldversuch 2005.
11	Mittlerer Variationskoeffizient (% CV) in der Quantifizierung von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 im Jahr 2005 und 2006 in Möhre „Füllhorn (n Anzahl unabhängiger Durchgänge, MW Mittelwert ng Allergen je ml Extrakt, Stabw Standardabweichung, % CV = MW/Stabw*100)
12	Nachweis der Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 des Hauptallergens Dau c 1 der Möhre mit monoklonalen Antikörpern (links) und Kaninchenimmunseren (rechts), und des Möhren Profilins Dau c 4 mittels Kaninchenimmunserum. Ein homologes Protein zum Birkenpollenallergen Bet v 6 wurde mit einem Kaninchenimmunserum und ein Bet v 7 homologes Protein mit Mausimmunserum in Möhre nachgewiesen (P Pufferkontrolle, N Normalserumkontrolle bei Kaninchen- bzw. Mausimmunserum bzw. irrelevanter mak bei monoklonalen Antikörpern).

... Fortsetzung: Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel
13	IgE Immunoblot mit ausgewählten Seren (n=19) von Möhrenallergikern (PK Pufferkontrolle, NK Nichtallergikerkontrolle). Der Nachweis von Dau c 1, sowie Dau c 4 und einem putativen Bet v 6 homologen Allergen in Möhre sind hervorgehoben. Andere höher molekulare IgE-reaktive Proteine stellen im wesentlichen nicht relevante kreuzreagierende Kohlenhydrat Determinanten (CCDs) dar.
14	Box-Plot des Dau c 1.01 Allergens für jede Versuchsbedingung
15	Box-Plot des Dau c 1.02 Allergens für jede Versuchsbedingung
16	Box-Plot des Dau c 4 Allergens für jede Versuchsbedingung
17	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.01)
18	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.02)
19	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 4)
20	Wechselwirkungen Sorte - Probengröße (Dau c 1.01)
21	Wechselwirkungen Sorte - Probengröße (Dau c 1.02)
22	Wechselwirkungen Sorte - Probengröße (Dau c 4)
23	Wechselwirkungen Anbauart - Probengröße (Dau c 1.01)
24	Wechselwirkungen Anbauart - Probengröße (Dau c 1.02)
25	Wechselwirkungen Anbauart - Probengröße (Dau c 4)
26	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.01), 2005 (links) und 2006 (rechts)
27	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.02), 2005 (links) und 2006 (rechts)
28	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 4), 2005 (links) und 2006 (rechts)
29	Wechselwirkungen Sorte - Anbauart 2006 (Dau c 1.01, links) und (Dau c 1.02, rechts) (gleiche Abbildungen wie oben mit geänderter y-Achsenkalierung)
30	Vergleichende Darstellung der Allergengehalte an Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 aus beiden Feldversuchen (2005 und 2006) in Abhängigkeit von Sorte und Anbauweise
31	Untersuchung der biologischen Aktivität in Abhängigkeit der Sorte und Anbaubedingungen mit Extrakten aus dem Feldversuch 2005 (siehe Tabelle 16)
32	Diskriminierung genomischer DNA von cDNA durch Lage eines Primers (Primer Ia) vor der Splicing-Site. Mit genomischer DNA als Target, würde in der PCR ein um die Intronlänge größeres Amplicon erzielt als in der PCR mit cDNA. Primer Ib überspannt die Splicing-Site und bindet in Exon I und II. Mit genomischer DNA würde daher kein Amplifikat erzielt.
33	Fotografie eines Elektrophoresegeles nach Auftrennung der ethidiumbromid-markierten PCR-Produkte nach RT real time PCR mit dem eine Splicing-Site flankierenden Primersystem Dauc c_Elf / Dauc10101-r. Lane 1, 8: Größenstandards, 2: Non-Template Control mit H ₂ O anstatt DNA im PCR-Ansatz, 3: PCR-Produkt erzielt mit genomischer DNA aus Möhre, 4-7: PCR-Produkt erzielt mit cDNA aus Möhre.

... Fortsetzung Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel
34	Amplification Plots einer 1:10 Verdünnungsreihe von in die RT PCR eingesetzter RNA und Regressionsgerade für das Nachweissystem Dau c 1.01 (Primer Dau c EI2f / Dau c 1.01 r)
35	Fotografie eines Elektrophoresegeles nach Auftrennung der ethidiumbromid-markierten PCR-Produkte nach RT real time PCR von transkribierter Möhren-DNA mit dem eine Splicing Site flankierenden Primersystem Dau c 1.02f3 / A. Mit cDNA entsteht ein Amplicon von < 300 bp, mit genomischer Möhren-DNA ein > 900 bp großes PCR-Produkt
36	Amplification Plots einer 1:10 Verdünnungsreihe von in die RT PCR eingesetzter RNA mit dem Nachweissystem „GAPDH“
37	Ct-Werte (Mittelwerte aus n=12 Extrakte) für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.01, Ernteproben 2005
38	Ct-Werte (Mittelwerte aus n=12 Extrakte) für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.02, Ernteproben 2005
39	Ct-Werte für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.01, Ernteproben 2006. 12 Extrakte wurden aus vier Mischproben pro Feldfläche gewonnen.
40	Ct-Werte für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.01, Ernteproben 2006. 12 Extrakte wurden aus vier Mischproben pro Feldfläche gewonnen.
41	Korrelation der Ct-Werte für die Systeme GAPDH mit Dau c 1.01 für 12 Extrakte (N = 84) auf der Fläche Nerac, konv. Die Ct-Wertepaare (Dau c 1.01 / GAPDH) wurde nach aufsteigendem Wert geordnet.
42	Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens Dau c 1.01 (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2005
43	Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens Dau c 1.02 (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2005
44	Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens Dau c 1.01 (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2006
45	Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens Dau c 1.02 (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2006
46	Bestimmung der relativen Effizienz der qRT-PCR real time Systeme Dau c 1.01, Dau c 1.02 (Zielsequenz) und GAPDH (HKG).

... Fortsetzung: Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel
47	Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.01 in Relation zur Kalibratorprobe Rodelika, konventionell, bestimmt mittels Delta-delta Ct Methode
48	Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 in Relation zur Kalibratorprobe Rodelika, konventionell
49	Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 in Marktproben in Relation zur Feldprobe Nerac, konv. (Kalibratorprobe) und einer Projektprobe Rodelika, konv., aus der Ernte 2005. 1-3 = unabhängige Extraktionen. In jede PCR wurde 10 ng RNA eingesetzt.
50	Relative Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 in italienischen Marktproben in Relation zur Feldprobe Nerac, konv. (Kalibratorprobe) bzw. der Projektprobe Rodelika, konv., aus der Ernte 2005. I1 und I3 = Mittelwert aus zwei unabhängigen Extraktionen (eine dritte Extraktion I2 wurde als Ausreißer nicht berücksichtigt). In jede PCR wurde 10 ng RNA eingesetzt.

2. Tabellenverzeichnis

Tab. Nr.	Titel
1	Sortenrecherche – Quellen und Ansprechpartner
2	Pflanzenschutz- und Düngemaßnahmen im Feldversuch 2005
3	Für Projektproben benutzte Primersysteme
4	Accession Number / GenBank - Dau c 1.01 und Dau c 1.02
5	Accession Number / GenBank Einträge – Houskeeping Gene
6	Übersicht der häufigsten in Deutschland angebauten Möhrensorten und ihre geschätzten Marktanteile.
7	Wichtigste Anbauggebiete für Möhren mit den dort häufigsten Sorten (persönliche Mitteilung Herr Kühling, Hild Samen).
8	Aminosäuresequenzidentität (%) zwischen Bet v 1 und Dau c 1 bzw. Api g 1
9	Auswahl geeigneter monoklonaler Antikörper (mak) und polyklonaler Kaninchen Antiseren (pak) zur spezifischen Detektion von Dau c 1.01 und Dau c 1.02 sowie Dau c 4.
10	Spezifität der entwickelten ELISA
11	Wiederholbarkeit der Probenvorbereitung
12	Mittlere Wiederfindung nach Standardadditionsverfahren im Bereich der angegebenen Dotierungen für die 3 spezifischen ELISA am Beispiel von jeweils zwei unabhängigen Probeextrakten. (WF Wiederfindung).
13	Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen ELISA-Allergenanalytik der Ernteproben im Jahr 2005
14	Untersuchung der paarweisen Unterschiede zwischen den Probengrößen

... Fortsetzung: Tabellenverzeichnis

Tab. Nr.	Titel
15	Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen ELISA-Allergenanalytik der Ernteproben im Jahr 2006.
16	Allergengehalt ausgewählter Extrakte in Abhängigkeit der Verdünnung
17	Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.01 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2005
18	Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.02 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2005
19	Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.01 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2006
20	Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.02 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2006
21	Korrelation der Meßwerte (n = 24) für die Systeme GAPDH und Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02 (Ernte 2005 / pro Parzelle)
22 a+b	Datenanalyse auf Basis der Δ Ct Werte (Mittelwerte aus n=24 Werten) für die PCR Systeme Dau c1.01 und Dau c GAPDH – Ernte 2005
23	Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2005 – Dau c 1.01
24 a+b	Datenanalyse auf Basis der Δ Ct Werte (Mittelwerte aus n=24 Werten) für die PCR Systeme Dau c1.02 und Dau c GAPDH - Ernte 2005
25	Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2005 – Dau c 1.02
26 a+b	Datenanalyse auf Basis der Δ Ct Werte (Mittelwerte aus n=24 Werten) für die PCR Systeme Dau c1.01 und Dau c GAPDH – Ernte 2006
27	Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2006 – Dau c 1.01
28 a+b	Datenanalyse auf Basis der Δ Ct Werte (Mittelwerte aus n=24 Werten) für die PCR Systeme Dau c1.02 und Dau c GAPDH – Ernte 2006
29	Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2006 – Dau c 1.02
30	Vergleich der Effizienzen der real time PCR Systeme „Dau c 1.01“, „Dau c 1.02“ und „GAPDH“

3. Anhangsverzeichnis

Anhang-Nr.	Titel
1	Sortenliste
2	Nährstoffanalyse (FAL)
3	Probenregistrierung 2005
4	Effizienzmessungen von real time PCR Systemen zum Nachweis von sieben verschiedenen Houskeeping Genen mit unterschiedlichen Gewebeteilen von Möhren
5 a – d	Rohdaten für die Ct-Wert-Messungen mit den Systemen Dau c 1.01, Dau c 1.02 und GAPDH für die Ernteproben 2005 und 2006
6	Erläuterungen zur statistischen Auswertung

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

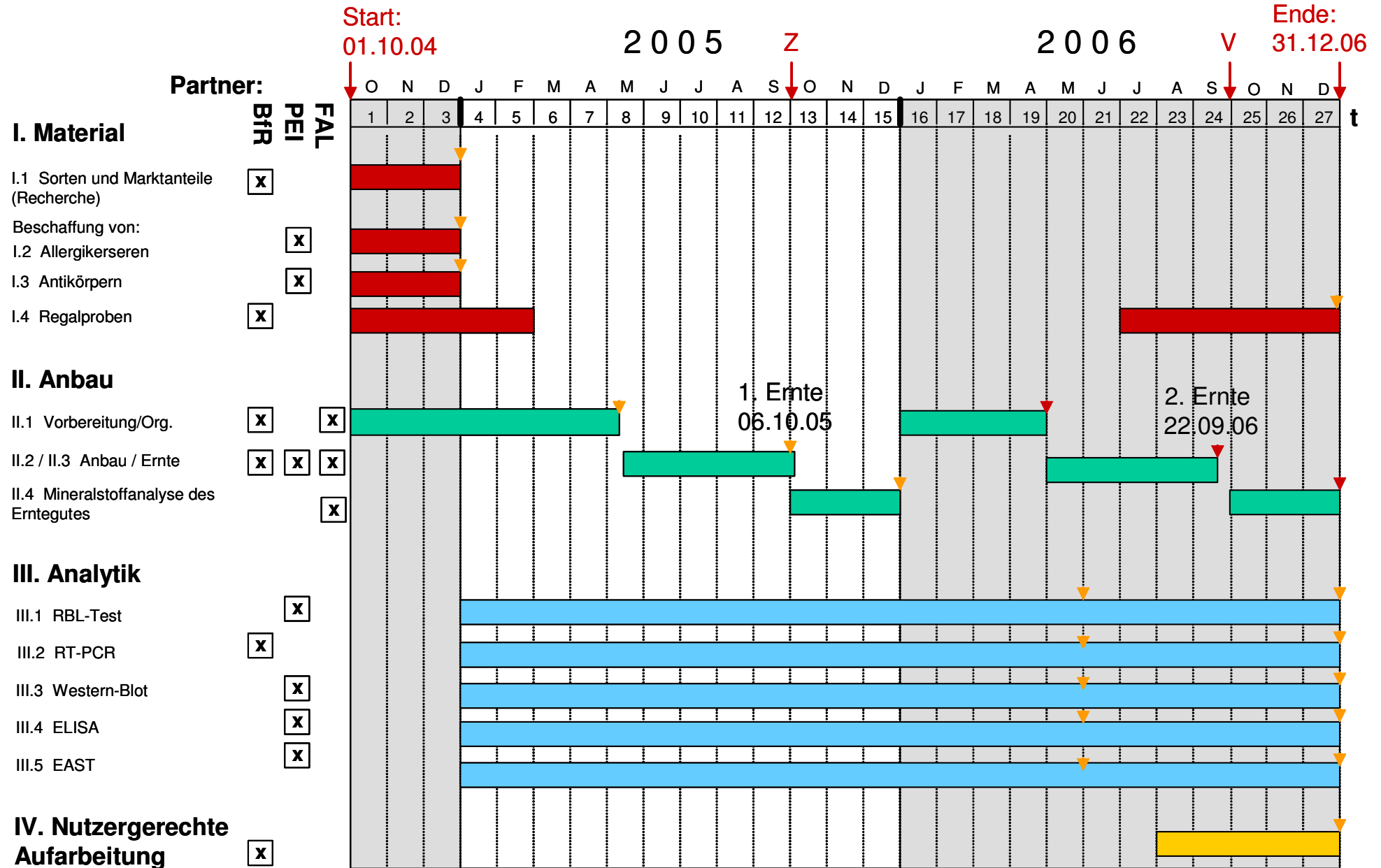
1.1 Projektziele

Ziel des Projektes war eine vergleichende Untersuchung zum allergenen Potential von konventionell angebauten und aus ökologischem Anbau stammenden Gemüse am Beispiel von Möhren. Diese wurden sowohl aufgrund der ökonomischen Bedeutung in der ökologischen wie konventionellen Landwirtschaft als auch wegen der allergologischen Bedeutung als geeignetes Agrarprodukt für die vorliegende Studie ausgewählt. Die bekannten allergenen Isoformen des Hauptallergens der Möhre, Dau c 1, weisen zudem eine hohe strukturelle Verwandtschaft zu Proteinen der *pathogenesis-related* PR-10 Proteinfamilie auf, welche unter biotischen und abiotischen Einflussfaktoren (z.B. Pilzbefall, Schädlingsfraß, Behandlung mit Chemikalien, Klimastress) unterschiedlich stark exprimiert werden könnten und somit möglicherweise die Produktqualität mit Bezug auf eine veränderte Allergenität beeinflussen. Inwiefern die Anbauweise unter Verwendung von Pflanzenschutzmitteln sowie die Art der Kultivierung (z.B. Art und Menge der Düngung) zur Veränderung des Gehaltes an allergenen "Stressproteinen" und so zu einem veränderten allergenen Potential beiträgt, sollte in diesem Projekt untersucht werden. Damit leistet das vorliegende Projekt einen Beitrag zur gesundheitlichen Beurteilung von ökologisch hergestellten aber auch konventionell erzeugten Lebensmitteln. Allein die Tatsache, dass 25% der Nahrungsmittelallergiker nach Verzehr gegen das ökonomisch wichtige Anbauprodukt Möhre allergisch reagieren, macht für den Bereich Gemüseanbau das Marktpotential für Waren mit niedrig allergenen Eigenschaften deutlich. Zur objektiven Bewertung von Qualitätsmerkmalen, beispielsweise des allergenen Potentials, sind wiederum analytische Verfahren gefordert, die entsprechende Qualitätsparameter, z.B. den Allergengehalt, eines Lebensmittels quantitativ erfassbar machen. Die Zielstellung des Projektes war deshalb der Aufbau eines leistungsfähigen, objektiven Methodenspektrums, das sowohl auf Boten RNA (messenger RNA; mRNA) als auch auf Proteinebene angewendet werden kann. Diese Methoden können in Ergänzung zu den vornehmlich im ökologischen Landbau angewendeten ganzheitlichen Verfahren, denen objektive Ergebnisfindungen mangels allgemein einsetzbarer Referenzsysteme im Wesentlichen fehlen Anwendung finden. Zwei unterschiedliche Ansätze wurden verglichen: die quantitative Bestimmung des Gehaltes der bereits bekannten Möhrenallergene mittels immunchemischer Methoden (ELISA) und die Bestimmung des relativen Anteils von mRNA spezifisch für die Allergen-kodierenden Genen. Des Weiteren wurden Probenextrakte mittels Westernblot und in einem in vitro Mediatorfreisetzung-Zelltest untersucht. Zusätzlich wurde Probenmaterial mit anderen im Rahmen des BÖL geförderten Projekten ausgetauscht sowie Marktproben untersucht.

1.2 Planung und Ablauf des Projekts

Der Projektablauf und die Aufgabenverteilung erfolgten in vier, teilweise zeitlich überlappende Arbeitsabschnitten mit insgesamt 21 Meilensteinen (Abbildung 1). Innerhalb des Abschnittes I wurden vorbereitende Arbeiten und Recherchen zur Material- und Probenbeschaffung durchgeführt. Abschnitt II beinhaltete die Organisation und Durchführung der Feldversuche, Abschnitt III die Etablierung und Anwendung der Analytik auf das Probenmaterial und Abschnitt IV deren spezifischen Analyse und Bewertung der gewonnenen Daten mit Blick auf die formulierten Projektziele.

Abb. 1: Zeitskala (Projektmonate t) und Meilensteine



1.3 Koordination und Kooperationen

Die Projektkoordination wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Abteilung Lebensmittelsicherheit Fachgruppe 56, Produktidentität, Rückverfolgbarkeit, neuartige Lebensmittel durchgeführt. Experimentelle und organisatorische Arbeiten wurden von Frau Dr. Bärbel Jansen durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten am BfR erfolgte in der Abteilung 3 (Wissenschaftliche Querschnittsaufgaben) in der Fachgruppe 33 (Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung, Frau Anett Martin). Mit dem Kooperationspartner Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Langen, Abteilung Allergologie 5/01 erfolgte eine enge Zusammenarbeit über den gesamten Projektverlauf. Am Paul-Ehrlich-Institut wurden sämtliche immunchemischen Untersuchungen durchgeführt. Die Aufarbeitung der Ernteproben aus den Feldversuchen 2005 und 2006 fand gemeinsam am PEI statt. Die molekularbiologische Analytik oblag dem BfR. Die Bundesanstalt für Landwirtschaft (FAL) mit dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde (Frau Prof. Dr. Silvia Haneklaus) stand dem Projekt beratend bei der Konzeption und Realisierung der Anbauversuche und bei der Ernte zur Seite. Von der FAL wurden außerdem die Untersuchungen zum Ernährungsstatus (Makro-/Mikronährstoffanalysen) der angebauten Möhren durchgeführt.

Von Projektbeginn an bestand eine Vernetzung mit dem BÖL-geförderten Projekt „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden“ (Projekt 02OE170/F, Universität Kassel). Aus diesem Projekt wurden in der Phase der Methodenentwicklung Möhrenproben aus Anbauversuchen (Standort Witzenhausen) erhalten. Des Weiteren wurden Marktmöhren-Paare aus kommerziellem und ökologischem Anbau über ein im Rahmen des BÖL Projektes 02OE61 aufgebauten Forschungs-Praxis-Netzwerk, welches vom Institut für Ökologischen Landbau der FAL (Trenthorst) koordiniert wird, bezogen. Im Gegenzug wurden Proben aus den Feldversuchen im vorliegenden Projekt den Teilnehmern des BÖL Projektes 03OE249 zur Verfügung gestellt.

1.4 Wissenschaftlicher und Technischer Stand an den angeknüpft wurde

1.4.1 Lebensmittelallergien in der Bevölkerung und die Bedeutung von Möhren als allergieauslösendes Gemüse

Lebensmittelallergien gegenüber Frischobst, Gemüse und Nüssen treten bei etwa 50-80% der Birkenpollenallergiker auf [1]. Ein Teil der Betroffenen zeigt dabei auch allergische Reaktionen auf gekochtes Gemüse bzw. geröstete Nüsse [2] [3].

Grund für dieses Phänomen ist die Strukturhomologie allergener Pollenproteine mit Proteinen pflanzlicher Herkunft in den Lebensmitteln. Sogenannte „Kreuzreaktionen“ zwischen

ursprünglich gegen Pollenallergene gerichteten IgE-Antikörpern und mit Pollenallergenen strukturell verwandten Lebensmittelproteinen führen dann zur Auslösung der pollenassoziierten Lebensmittelallergie. In einer Studie zur Prävalenz von Allergien in der Berliner Bevölkerung war unter den allergenen Lebensmitteln eine Sensibilisierung gegen Möhre nach Apfel und Haselnuß am häufigsten mittels Skin-Prick Test nachweisbar [3]. Im DBPCFC (Doppelt-blind placebo-kontrollierter (oral / food) Provokations Test) wurde anhand der für die Berliner Bevölkerung ermittelten und auf die Gesamtbevölkerung extrapolierten Daten eine Prävalenz von Allergien gegen Nahrungsmittel von 3,6% festgestellt. Dabei reagierten die Nahrungsmittelallergiker zu 77,6 % auf Nüsse, Kern- (z.B. Apfel) und Steinfrucht sowie zu 54,4 % auf die zusammengefasste Gruppe der Gemüse inklusive Möhre und Sellerie [3]. Im typischen Fall kommt es zur Auslösung des „Oralen-Allergie-Syndroms“ (OAS), welches durch Schwellungen, Juckreiz und Ödembildung in Mund- und Rachenraum charakterisiert ist. Bei der Mehrzahl der Patienten wird die IgE-vermittelte OAS–auslösende Wirkung von Möhren durch Kochen gemildert oder sogar beseitigt. Es liegen jedoch neuere Erkenntnisse vor, dass durch gekochte Möhren zwar die allergene Spontanreaktion häufig verschwindet oder vermindert wird, jedoch die Ausprägung eines atopischen Ekzems, so die Neigung besteht, sogar verstärkt werden kann [4]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz von Allergien gegen Möhren als ein Gemüse aus der Pflanzenfamilie der Doldenblüter (*Apiaceae*).

1.4.2 Die Hauptallergene der Möhre

In verschiedenen Publikationen wird beschrieben, dass aufgrund von Umwelteinflüssen bzw. Wachstumsbedingungen die Ausbildung von „Stressproteinen“ beobachtet werden kann [5] [6]. Nach ihrer strukturellen und funktionellen Verwandtschaft werden die Stress- oder „*pathogenesis related*“ (PR) Proteine in 14 Gruppen bzw. „Familien“ eingeteilt. Die PR-10 Familie dieser „Stressproteine“ zeigt ein hohes Maß an Sequenzidentität und strukturelle Homologie mit dem Hauptallergen aus Birkenpollen, dem Bet v 1 [1]. Ebenso weist auch das Hauptallergen der Möhre, Dau c 1, eine hohe Sequenzhomologie mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 auf und gehört den Proteinen der PR-10- Proteinfamilie an. Die klinische Relevanz von Streßproteinen als Allergene wurde in einer kürzlich publizierten Studie belegt: 20 Birkenpollenallergiker, die nicht wesentlich auf Soja allergisch waren, zeigten schwere allergische Reaktionen nach Genuss eines Diätproduktes, das zu 50 % aus einem Sojaisolat mit einem hohen Gehalt des PR-10 Proteins Gly m 4 bestand [8].

Vom Möhrenhauptallergen Dau c 1 sind zwei Isoformen bekannt, die nur etwa 51 % Aminosäuresequenzidentität untereinander aufweisen. Diese Isoformen werden als Dau c 1.01 und Dau c 1.02 bezeichnet, wobei Dau c 1.01 gegenüber Dau c 1.02 allergologisch bedeutsamer ist [9]. Neben den Allergenisformen von Dau c 1 findet man in Möhren das aufgrund seiner ubiquitären Präsenz im Pflanzenreich auch als „Panallergen“ bezeichnete Dau c 4. Dieses Allergen gehört zur Proteinfamilie der Profiline und ist am Strukturaufbau der

Pflanzenzelle beteiligt. Die Allergene der Karotte sind sowohl proteinbiochemisch als auch hinsichtlich der kodierenden Gene gut charakterisiert. Sequenzinformationen der kodierenden Gene sind für die Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 des Hauptallergens Dau c 1 sowie für das Möhrenprofilin Dau c 4 bekannt und konnten für die Entwicklung von DNA bzw. RNA-basierenden Methoden genutzt werden.

1.4.3 Analytik

Der Einfluss der Anbauweise auf das Expressionsprofil der bekannten Allergene in Möhre sollte in diesem Projekt erstmalig untersucht werden. Für die quantitative Bestimmung der relevanten Allergene wurden im PEI monoklonale Antikörper gegen die Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 hergestellt und in Kombination mit spezifischen Kaninchen Antiseren gegen die homologen Allergene Api g 1.01, Api g 1.02) in Sellerie (*Apium graveolens*) jeweils zweiseitige ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) für die quantitative Bestimmung der Allergene entwickelt und *in-house* validiert. Auf der Basis eines polyklonalen Kaninchen Antiserums gegen (*Lolium perenne*, Weidelgras) Profilin (Lol p 12) wurde ein Möhrenprofilin (Dau c 4) spezifischer kompetitiver ELISA entwickelt und validiert.

Begleitend wurden Western-Blot Untersuchungen mit Patientenseren durchgeführt, um das Spektrum der allergenen Proteine im Möhrenextrakt zu untersuchen. Des Weiteren wurde mittels IgE aus murinen Seren (Mausseren) ein am PEI etablierter RBL-Zell Mediatorfreisetzungstest als hochempfindliches Testsystem und Modell der allergischen Sofortreaktion eingesetzt. Mit Hilfe dieses *in vitro* zellulären Mediatorfreisetzungstests sollte zusätzlich das allergene Potential der Möhren aus unterschiedlicher Anbauweise bewertet und verglichen werden.

Parallel wurde am BfR die auf der Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) basierende relative Quantifizierung der Transkriptionsaktivitäten der für die allergenen Proteine Dau c 1.01 und Dau c 1.02 kodierenden Gene etabliert. Hierzu wurde zunächst die gesamte RNA isoliert, welche eine einsträngige Kopie der Gene und das erste Produkt auf dem Weg zum funktionsfähigen Protein (Allergen) ist. In einem zweiten Schritt wird die mRNA wieder in DNA „umgeschrieben“ (reverse Transkriptase Reaktion). Auf der Basis publizierter Sequenzen für die Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 wurden geeignete Primer und Sonden-Systeme entwickelt, welche einen spezifischen Genabschnitt der Allergen-Gene in der Polymerasekettenreaktion (PCR) gezielt vermehren (amplifizieren). Der Anstieg der Menge des Amplifikates im Reaktionsansatz wird über eine Fluoreszenzmarkierung in der real time PCR gemessen. Parallel wurde als Referenzsystem für die relative Quantifizierung ein in allen Gewebeteilen der Mohrrübe gleichmäßig und stetig (konstitutiv) transkribiertes Gen herangezogen. Für Möhre lagen noch keine Erfahrungen über geeignete Referenzgene vor. Daher wurde aus einer Auswahl von sieben konstitutiv transkribierten pflanzlichen Genen das für den Untersuchungszweck optimale System ermittelt.

1.4.4 Anbausituation und Sortenrecherche

Für die Konzeption des Anbauversuches war die Kenntnis über die in Deutschland hauptsächlich eingesetzten Sorten im ökologischen wie konventionellen Möhrenanbau eine wichtige Voraussetzung. Da Gemüse in Deutschland nicht nach Sorten gehandelt wird, existiert hierzu kein veröffentlichtes statistisches Material, beispielsweise des Bundessortenamtes oder des Lebensmitteleinzelhandels. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde daher eine umfangreiche Recherche in unterschiedlichsten Quellen (Ministerien und Behörden, Sortenämter, Saatguthersteller etc.) durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Markt- und Sortenrecherche

Die Recherche über Sorten- und Marktanteilen zu den in den Jahren 2004/05 am häufigsten in Deutschland angebauten Möhrensorten erfolgte mittels telefonischer Befragungen und Fachgesprächen mit den folgenden aufgelisteten Organisationen (Tab. 1):

Tabelle 1: Sortenrecherche – Quellen und Ansprechpartner:

Organisation	Name
Bundessortenamt Hannover	Herr Klocke Frau Trautwein
Ministerium für Umwelt und Naturschutz Düsseldorf	Frau Rönnebeck
Landwirtschaftskammer Hannover	Her Klug
Landwirtschaftskammer Rheinland	Herr Sauerwein, Herr Paffrath, Frau Lindner
Zentrale Markt und Preisberichtsstelle GmbH, Bonn	Herr Dr. Behr
Universität Kassel Witzenhausen	Dr. von Fragstein
Hipp, Pfaffenhofen	Frau Domes
Kaisers-Tengelmann, Mülheim	Frau Hoefe
Datenbank organicXseeds FiBL, Frankfurt	Herr Wilbois
Bioland, Mainz	Herr Holz
Naturland Nord-West, Lippetal	Herr Haase
Gemüsebauberatungsring Dithmarschen	Herr Kühling
Bejo Saaten, Sonsbeck	Herr Hugenberg Herr Müller-Steinhorst
Bingenheimer Saatgut AG, Echzell	Frau Boie Frau Humpert
Nickerson Zwaan, Breda, NL	Frau Pape
Hild Samen, Marbach	Herr Kühling
Syngenta Seeds, Bad Salzufen	Frau Hagdorn
Agri-Saaten GmbH, Bad Essen	Herr Müller
Firma Chrestensen, Erfurt	Herr Seyfahrth
Firma Nebelung, Everswinkel	Herr Schnecking
Rijk-Zwaan, Welver	Herr Schweizer
Seminis-Vegatable Seeds, Neustadt	Frau Bergmeier
Juliwa-Enza, Dannstadt-Schauernheim	Herr Müller
Dienstleistungszentrum ländlicher Raum (DLR), Rheinhessen	Herr Ziegler
Arbeitskreis Betriebswirtschaft im Gartenbau, Hannover	Herr Maack

2.2 Untersuchungsmaterial

Für die Methodenentwicklung standen ab Projektstart 2004 über das Projekt „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden“ (BÖL 02OE170/F, Universität Kassel) Möhren von ökologischen Anbauflächen aus einem Anbauversuch der Universität Kassel, FG Ökologischer Landbau (Projektleitung:

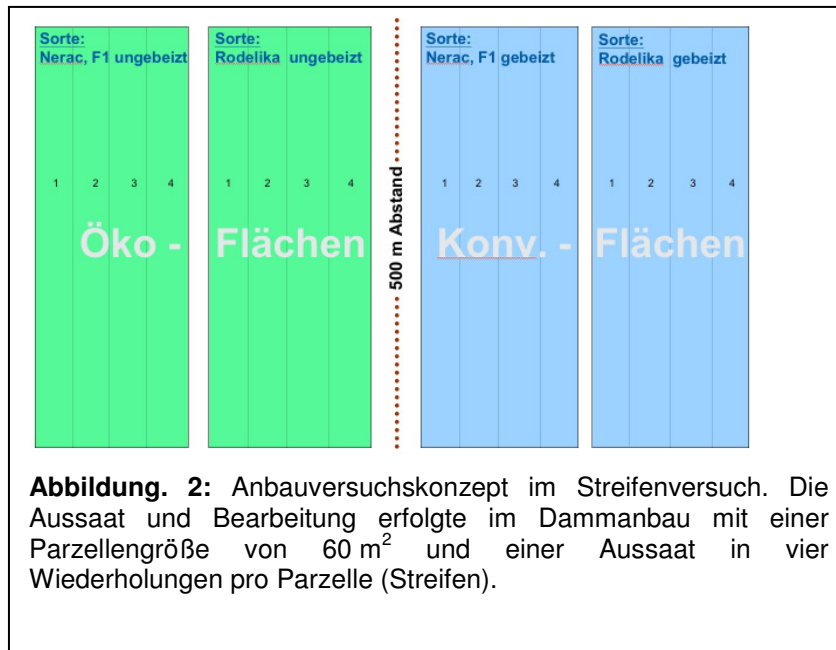
Michael Fleck, Hessische Staatsdomäne Frankenhausen [10]) zur Verfügung. Dabei handelte es sich ausschließlich um die aus der alten Sorte „Rothild“ selektierte Sorte „Rodelika“ aus biologisch-dynamischer Züchtung (Kultursaat e.V., 61231 Bad Nauheim, www.kultursaat.com). Zusätzlich wurden über das Projekt BÖL 02OE170/F Möhren von Marktqualität (jeweils Paare ökologisch / konventionell) von definierten Anbauflächen in Schleswig-Holstein (Koordination: Gerold Rahmann, FAL, Trenthorst) sowie stichprobenartig Möhren unbekannter Sorte aus dem lokalen Einzelhandel bezogen (z.B. Bundmöhren Italien und Deutschland). Die Proben aus den externen Projekten (je 52-63 Stück) wurden zum Liefertermin 5.11.2004 sowie eine Probe im Jahr 2005 unter folgender Bezeichnung an das BfR gesendet:

<u>Markt Möhren (G. Rahmann, FAL)</u>	<u>Feldmöhren (M. Fleck, Univ. Kassel)</u>
W1 = konventionell, Narbonne (2004)	F1 = ökologisch, Rodelika (2004) + N ₂
W2 = ökologisch, Narbonne (2004)	F2 = ökologisch, Rodelika (2004) - N ₂
N1 = ökologisch, Narbonne (2005)	
N2 = konventionell, (2005)	

Ab Oktober 2005 und 2006 wurden Proben aus eigenen definierten Feldversuchen untersucht.

2.3 Feldversuche 2005 / 2006

Zwei Anbauversuche wurden in der Vegetationsperiode 2005 und 2006 auf Flächen in Hedwigenkoog im Landkreis Dithmarschen, Schleswig-Holstein, durchgeführt. Konzeption und Standorte waren für beide Jahre identisch. Auf benachbarten Betrieben wurde im Dammanbau unter gleichen kleinklimatischen Bedingungen und in räumlicher Nähe (500 m Abstand) kalibriertes Präzisionssaatgut der Hybridsorte Nerac F1 (Bejo Saaten) sowie der samenfesten Sorte Rodelika (Bingenheimer Saatgut AG, Echzell-Bingenheim) sowohl gebeizt als auch ungebeizt ausgesät. Zur Beizung des Saatguts für den Anbau auf konventionellen Flächen wurden die Fungizide Thiram, Iprodione und Metalxyl eingesetzt. Die Beizung des Rodelika Saatgutes wurde von der Firma Bejo Zaden, 1749 ZH Warmenhuizen (NL) durchgeführt. Der Anbau wurde in vierfacher Wiederholung durchgeführt (Abb. 2).



Eine Fläche wurde gemäß den Vorgaben der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 (EG-Öko-VO) und den Richtlinien des Bioland Anbauverbandes bewirtschaftet. Die zweite Fläche wurde konventionell bewirtschaftet. Als Maßnahmen zur Pflanzenernährung und Gesundheit wurden über die gesamte Wachstumsperiode von ca. 143 Tagen im Jahr 2005 10 verschiedene Pestizide und 6 verschiedene Dünger auf die konventionell bewirtschaftete Fläche ausgebracht (Tab. 2). Die Behandlung im Jahr 2006 erfolgte nach dem gleichen Schema.

Tabelle 2: Pflanzenschutz- und Düngemaßnahmen im Feldversuch 2005

Pflanzenschutzmaßnahmen (Menge/ha)		Dünger (Menge/ha)	
19.05.05	1,7 l Stomp	03.05.05	500 kg 40er Kali
19.05.05	0,2 l Centium	30.06.05	100 kg Kalkammonsalpeter
29.06.05	0,25 kg Pirimor	13.08.05	2 kg Solubor
02.07.05	1,5 l Fusilade MAX	13.08.05	10 l Magnesiumnitrat
28.06.05	0,3 kg Sencor WG	21.09.05	2 kg Solubor
28.06.05	0,8 kg Afalon C	21.09.05	10 kg Kaliumnitrat
13.08.05	0,4 l Score		
13.08.05	0,15 kg Trafo WG		
21.09.05	1 l Ortiva		
21.09.05	0,075 l Karate Zeon		

2.4 Probenahme

In jeder Parzelle wurden im Jahr 2005 Einzelproben (jeweils 10 Stück: 5 große und 5 kleine Möhren) und innerhalb jedes der vier Streifen einer Parzelle eine Mischprobe (je 20 Stück) geerntet. Hieraus resultiert eine Gesamtprobenzahl $n=56$ und eine Gesamtstückzahl Möhren von $n=360$. Im Erntejahr 2006 wurden ausschließlich vier Mischproben/Parzelle (Gesamtprobenzahl $n=16$, Gesamtstückzahl $n=320$) gezogen. Zusätzlich wurden für die Nährstoffanalyse durch die FAL 10 Pflanzen/Streifen (= 40 Pflanzen/Parzelle) entnommen. Das Probenahmeschema pro Parzelle ist in Abbildung 3 illustriert. Grundsätzlich erfolgte keine Beprobung aus dem Randbereich.

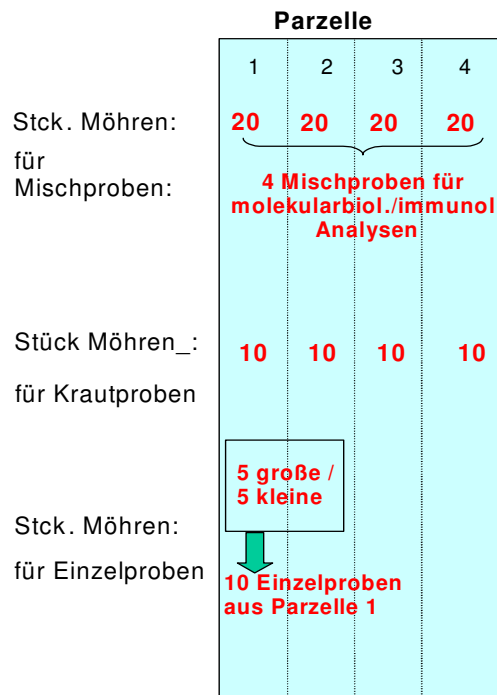


Abbildung 3: Schema der Probenahme

2.5 Probenaufarbeitung

Die Möhren wurden innerhalb 48 h nach der Ernte grob mit einer Gemüsezerkleinerungsmaschine („Cuocojet“, GAM, Bellaria-Igea Marina, Italien) in 3 mm breite Scheiben zerkleinert, die vom Zerkleinerer sofort in flüssigem Stickstoff befördert und dort tiefgefroren wurden. Bis zur Extraktion wurden die tiefgefrorenen Möhrenscheiben dampfdicht bei -80 °C gelagert, um Wasserverluste zu vermeiden. Unmittelbar vor der

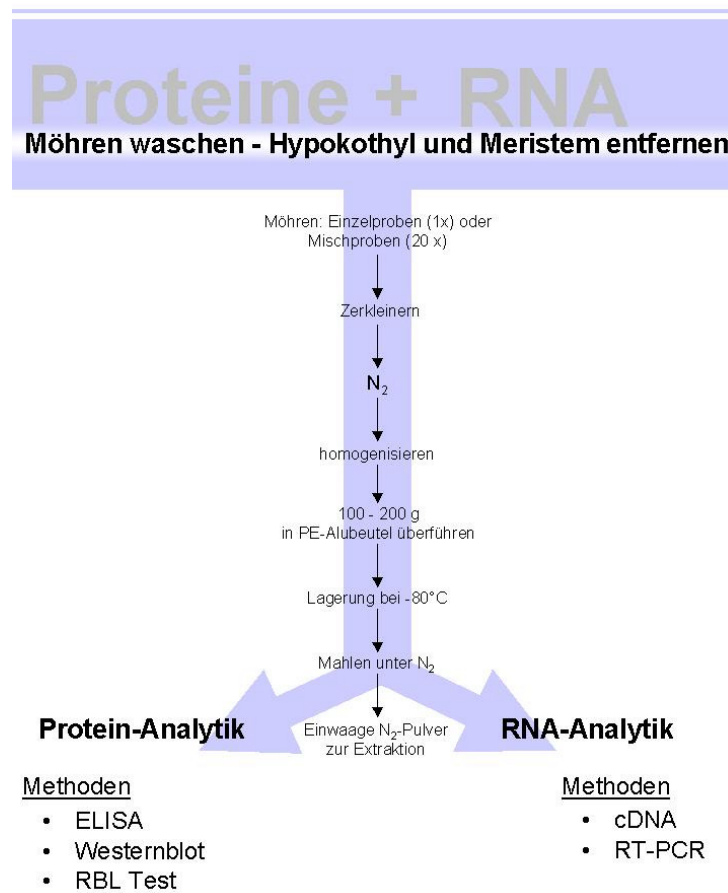


Abb. 4: Fließschema der Probenaufarbeitung

Extraktion der Proteine bzw. der RNA wurde das tiefgefrorene Untersuchungsgut unter flüssigem Stickstoff in einer Labormühle (Grindomix, Retsch, Haan, Deutschland) vermahlen (Abb. 4). Das tiefgekühlte Pulver einer Probe wurde für die immunologischen und RNA/DNA-analytischen Untersuchungen geteilt und unmittelbar danach extrahiert (Protein bzw. RNA). Die Extrakte wurden bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.6 Nährstoffgehalte der Pflanzen

Für die Bestimmung der Mineralstoffversorgung der Möhren erfolgte eine separate Beprobung, sowohl der Krautproben nach Reihenschluss, als auch der Möhrenproben. Bei den geernteten Möhren wurde die Trockenmasse bestimmt und die Möhren danach schockgefroren. Die Bestimmung der Mikro- und Makronährstoffgehalte wurde mittels trockenem Aufschluss nach Schnug und Haneklaus (1996) [11] und anschließender Bestimmung von Fe, Mn, Zn, Cu und B mittels ICP-OES, P kolorimetrisch, Ca und Mg mittels AAS und K und Na flammenfotometrisch durchgeführt. Die Bestimmung des Stickstoffs erfolgte nach *Kjeldahl* (DIN 38409 H11 (EN 25663)).

2.7 Nukleinsäure-Analytik

2.7.1 RNA-Isolierung aus Ernteproben

Aus dem gefrorenen Möhrenpulver wurde pro Sorte 3mal 200 mg in 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes zur RNA-Extraktion abgewogen und in flüssigem Stickstoff kurzfristig bis zur Extraktion aufbewahrt. Die homogenisierten Ernteproben wurden mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll im beigefügten Handbuch (*RNeasy Mini Handbook, fourth Edition, April 2006, Seite 52, Protokoll: Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi*). Zwischen Schritt sechs und sieben des Protokolls wurde ein DNase-I-Verdau gemäß Appendix E (Seite 71): *DNase Digestion of RNA before RNA Cleanup* eingebaut. In Abweichung vom Kit-Protokoll erfolgte der Verdau 30 anstatt 15 min.

2.7.2 RNA-Isolierung aus Marktproben

Je 200 mg der Regalproben wurden entweder mit dem *Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit* (Invitex) gemäß beiliegendem Protokoll (Abschnitt: *For total RNA extractions from plant cells or plant tissues and filamentous fungi*) oder mit einem Kit *PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen) gemäß Herstelleranweisung (Abschnitt: *TRIzol Plus Purification*) extrahiert.

2.7.3 Bestimmung der RNA Konzentration und Extraktreinigung

Der Gehalt an isolierter RNA wurde spektroskopisch mit Hilfe des Gerätes NanoDrop® ND-1000 bestimmt. Um die vollständige Eliminierung der DNA zu bestätigen, wurden die RNA-

Extrakte mit einem Primerpaar, welches spezifisch an eine *actin* Gen DNA-Sequenz bindet in einer konventionellen PCR und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte überprüft. Im Falle von positiven PCR Ergebnissen (DNA Verunreinigung) wurden die Extrakte in 100 µl Endvolumen einer erneuten DNase I Behandlung unterzogen (2.7.1) und wiederholte Aufreinigungsschritte mittels *TRizol Plus Purification (Invitrogen)* gemäß nachfolgendem Schema bis zur DNA-Eliminierung durchgeführt.

Aufreinigung

- Zugabe von 1 Vol Trizol (rot), 5 min bei RT stehen lassen
- 1/5 Vol Chloroform hinzufügen, 15 s per Hand schütteln, 5 min bei RT stehen lassen
- Zentrifugieren: 4 °C, 12,000 x g, 15 min
- obere wässrige Phase (klar) in ein neues 1,5 ml Tube überführen
- ca. 1 Volumen Wasser auf die verbleibende organische Phase zugeben & 15 s schütteln, 5 min - bei RT stehen lassen
- 12,000 x g, 4 °C, 15 min
- obere wässrige Phasen (klar) vereinigen

Fällung:

- Zugabe von 1/10 Vol 3 M Naac (→ 0,3 M Salzkonz. im Ansatz) der vereinigten wässrigen Phasen
- Zugabe von 1 Vol 96% Isopropanol und mischen
- mind. 2,5 h (oder über Nacht) bei –20 °C ruhen lassen
- 12,000 x g, 4 °C, 30 min, Überstand verwerfen

Waschen:

- 200 µl 70% Ethanol auf das Pallet geben und 15 s mischen,
- zentrifugieren: 4 °C, 12,000 x g, 15 min, Überstand verwerfen
- Wiederholung von Schritt 1 und 2 (empfohlen werden mindestens 2 x)
- Waschen, Schritt 1 und 2 kann beliebig oft wiederholt werden)
- RNA mit der mit Vakuumzentrifuge trocknen
- RNA mit 10-100 µl RNase- freiem Wasser lösen und bei –80 °C lagern

2.7.4 Reverse Transkription

Die aufgereinigte RNA wurde mittels SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Cat. No: 18080-051) gemäß Herstellerangaben (Protokoll Oktober 03, Seite 2) in cDNA umgeschrieben (500 ng gesamt RNA pro Ansatz).

2.7.5 Primer, Sonden und PCR-Bedingungen

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL GmbH (Berlin) synthetisiert. Sämtliche Primersysteme (Tab. 3) wurden auf Grundlage der veröffentlichten GenBank Daten (Tabellen 4 und 5) entwickelt.

Tabelle 3: Für Projektproben benutzte Primersysteme*:

Zielsequenz:	Primerpaar Bezeichnung	Sonde	Interne Primerdatenbank-Nr.	Amplicon in bp
Dau c 1.01 (Konsensussystem, erfasst alle bekannten Varianten 1.0101-1.0105)	Dau c El2f (forw.) Dau c 1.01 r2 (rev.)	Dau c 1.01 TM	471	133
			520	
			503	
Dau c 1.02 (1.0201)	Dau c 1.02 f2 (forw.) Dau c 1.02 A (rev.)	Dau c 1.02 TM	602	214
			614	
			616	
GAPDH	Dau c GAPDH-F5 Dau c GAPDH-r	Dau c GAPDH p	615	113
			505	
			616	
Actin f/r (Check auf DNA Freiheit in konv. PCR)	Dau c Ac f / Dau c Ac r	-	438 / 439	140

* Primersequenzen liegen beim Projektnehmer vor

Tabelle 4: Accession Number / GenBank* Einträge - Dau c 1.01 und Dau c 1.02

Nr.	Hauptallergen	Isoform / Variante	Accession number / GenBank
	<i>Daucus carota</i>		
1	Dau c 1	Dau c 1.01 / Dau c 1.0101	U47087
2		Dau c 1.01 / Dau c 1.0102	D88388
3		Dau c 1.01 / Dau c 1.0103	Z81361
4		Dau c 1.01 / Dau c 1.0104	Z81362
5		Dau c 1.01 / Dau c 1.0105	Z84376
6		Dau c 1.02 / Dau c 1.0201	AF456481

*NCBI (2005). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Tabelle 5: Accession Number / GenBank* Einträge - Housekeeping Gene

Nr.	Potentielle HousekeepingGene	Accession number / GenBank
1	GAPDH	U44985
2	18SrRNA	X17534
3	Actin	X17526
4	Ubiquitin	U44983
5	Tubulin like protein	X16608
6	Ribosomal Protein, S10	AF287338
7	Ribosomal Protein, S15a	AF349962

*NCBI (2005). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

2.7.6 Bedingungen für die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR)

System: Actin: forward Primer -438- Dau c Ac f
reverse Primer -439- Dau c Ac r

Geräte: Thermocycler, Applied Biosystems, GeneAmp PCR-System 9700
Elektrophorese- Kammer, Biosmart
Elektrophoresestation, Pharmacia, Elektrophoresis Power supply- EPS 3500XL

Chemikalien: Agarose - Molecular Biology grade, Eurogentec
TBE-Puffer - 10x Tris-Borat-EDTA Puffer, Merck, c Einsatz: 0,5x
Längenstandard - DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 bp ladder, Roche
Polymerase - HotStarTaq Polymerase, Qiagen
MasterMix-Komponenten:

Komponenten	Ausgangs-Konz..	Endkonz.	Vol. per Probe
Wasser			13,5 µl
Puffer mit 15mM MgCl ₂	10fach	1fach	2,0 µl
dNTPs	Jeweils 2,5 mM	Jeweils 0,2 mM	1,6 µl
Primer 438	20 mM	0,3 mM	0,3 µl
Primer 439	20 mM	0,3 mM	0,3 µl
Polymerase	5 U	1,5 U	0,3 µl
Probe cDNA			2,0 µl
Gesamtvolumen / Ansatz			20,0 µl

Durchführung:

Je nach Anzahl der Proben wurde ein MasterMix mit den oben genannten Chemikalien zusammengestellt. In einem 200 µl-PCR-Gefäß wurden je 2 µl Probe bzw. Wasser vorgelegt und 18 µl MasterMix hinzugegeben. Die Gefäße wurden in den Thermocycler gestellt und entsprechend dem nachfolgenden Temperaturprogramm für insgesamt 40 Zyklen in der PCR amplifiziert:

	Zeit [min]	Temp.[°C]
Initiale Dissoziation	12 :00	95
Dissoziation	00 :30	95
Annealing	00 :30	60
Elongation	01 :00	72
Finale Elongation	07 :00	72

Gelelektrophorese:

Die PCR-Produkte wurden in einem 2,5 %igen Agarosegel mit TBE-Puffer elektrophoretisch (Spannung: 5 V/cm) aufgetrennt. Nukleinsäuren wurden durch Ethidiumbromid im TBE-Puffer in der Elektrophoresekammer angefärbt. Bei Präsenz von genomischer DNA im RNA Extrakt ist ein 140 bp großes Fragment im Gel sichtbar.

2.7.7 Bedingungen für die Real-Time- PCR

<u>System:</u>	GAPDH:	forward Primer -615- Dau c GAPDHf5 reverse Primer -505- Dau c GAPDhr Sonde -616- Dau c GAPDHp
	Dau c1.01	forward Primer -471- Dau cEI2f reverse Primer -520- Dau c 1.01r2 Sonde -503- Dau c1.01TM
	Dau c1.02	forward Primer -602- Dau c1.02f2 reverse Primer -614- Dau c 1.02A Sonde -604- Dau c1.02TM

Geräte: Applied Biosystems (ABI), GeneAmp PCR-System 7900HT, SDS

Chemikalien: Universeller Mastermix: RT-QP2X-03-075+, Eurogentec
Mikrotiterplatten: ABI, MicroAmp 96-well optical reaction plate

MasterMix-Komponenten:

Komponenten	Ausgangskonz.	Endkonz.	Vol. per Probe
Wasser			7,20
Universal Mastermix	2fach	1fach	10,00
Primer 1 [μ M]	20	0,3	0,30
Primer 2 [μ M]	20	0,3	0,30
Probe [μ M] (cDNA)	20	0,2	0,20
Gesamtvolumen / Ansatz (μ l)			20,00

Durchführung:

Mastermixe wurden je nach Plattenbelegung und verwendeten Real-Time-PCR Systemen zusammenpipettiert. In einer 96er Mikrotiterplatte wurden je 2 μ l Probe bzw. Wasser vorgelegt und 18 μ l Master Mix hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und in das RT-PCR-Gerät gestellt. Es wurde über 40 Cyclen folgendes Temperaturprogramm durchlaufen:

Schritte	Zeit [min]	Temp.[$^{\circ}$C]
Initiale Dissoziation	02:00	50
Annealing	10:00	95
Elongation	00:15	95
Finale Elongation	01:00	60

2.8 Immunologische Methoden

2.8.1 Proteinextraktion

Das unter flüssigem Stickstoff gewonnene homogene Möhrenpulver (siehe Abschnitt 2.5) wurde zu 5 g in 10 ml PBS-Puffer (Phosphate-buffered Saline, 10 mM Phosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH 7.4) unter ständigem Rühren eine Stunde bei 4 $^{\circ}$ C extrahiert. Nach Zentrifugation bei 10,000 x g wurde der Extraktüberstand aliquotiert und bis zur Analyse mit den immunologischen Methoden (ELISA, Immunoblot Analyse, RBL-Zell Mediatorfreisetzungstest) bei -80 $^{\circ}$ C tiefgefroren gelagert.

2.8.2 ELISA zum Nachweis von Dau c.101, Dau c 1.02 und Dau c 4

Zum Nachweis der Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 des Hauptallergens der Möhre Dau c 1 wurde jeweils ein sogenannter Sandwich (zweiseitiger) ELISA entwickelt und in Bezug

auf die Anforderungen der Analytik validiert. Für das Möhrenprofilin Dau c 4 wurde ein sogenannter kompetitiver ELISA entwickelt und validiert.

Zur Steigerung der Spezifität der beiden Isoform-spezifischen ELISA wurden monoklonale Antikörper auf ihre Eignung, Dau c 1.01 von Dau c 1.02 und umgekehrt zu differenzieren, untersucht. Die monoklonalen Antikörper wurden als sogenannte Fänger-Antikörper eingesetzt, ein allergenspezifisches Kaninchen Antiserum als Detektor-Antikörper.

Für die Bestimmung von Dau c 4 in Möhrenextrakten wurden verschiedene Profilin spezifische Antiseren auf ihre Eignung, Dau c 4 zu quantifizieren, überprüft. Nachdem sich ein Lol p 12-spezifisches Kaninchen Antiserum als am besten geeignet erwies, wurde hiermit ein quantitativer ELISA entwickelt und validiert.

Die Validierung aller ELISA schloß Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Allergenextraktion und Quantifizierung im ELISA, die Testung auf Spezifität und Sensitivität der ELISA, sowie der Richtigkeit der quantitativen Bestimmungen durch Dotierungsversuche ein.

Die ELISA wurden zur absoluten Quantifizierung der Allergengehalte in den Untersuchungsproben aus den Feldversuchen der Anbaujahre 2005 und 2006 eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte gegen rekombinant hergestelltes Dau c 1.01, Dau c 1.02 oder Dau c 4. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit wurde immer ein Extrakt einer als „in-house“ Standard definierten Möhre mitgeführt. Aus dem Vergleich der Quantifizierung des Möhren in-house Standards konnte die Präzision in Form der Inter-Assay Variation bestimmt werden.

Für die Dau c 1.01 und Dau c 1.02 spezifischen ELISA wurden Mikrotiter Platten zunächst mit anti-Maus IgG Antikörper vom Schaf (Fa. Chemicon) in einer Verdünnung von 1:2222 binnen einer Stunde beschichtet, womit durch Inkubation über Nacht die monoklonalen Antikörper m3 oder m9 (m3 für Dau c 1.01, m9 für Dau c 1.02) aus dem 1:10 verdünnten Zellkulturüberstand gebunden wurden (zu ca. 200ng/well bis 1000 ng/well). Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Probeextrakten und parallel mit den rekombinanten Standards Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02 binnen einer Stunde. Gebundenes Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02 wurde mit spezifischen Kaninchenseren K1 bzw. K2 (K1 mit Spezifität für Api g 1.01 und Api g 1.02, K2 mit Spezifität für Api g 1.02) jeweils 1:10.000 verdünnt binnen 1 Stunde detektiert. Nach Markierung der Detektionskaskade mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (Fa. Sigma, Verdünnung 1:15:000, Inkubation 1 Stunde) und Zugabe von Chromogen Tetramethylbenzidin (15 – 20 min), wurde die Immundetektion visualisiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 3 M Schwefelsäure wurden die Extinktionen bei 450 nm Wellenlänge im Mikrotiterplatten Absorptionsphotometer gemessen. Zwischen allen Inkubationen (außer der enzymatischen Färbereaktion) lagen Waschschrte mit Inkubationspuffer, um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Alle Inkubationen, außer der Kopplung des Primärantikörpers (Schaf anti-Maus IgG), wurden in 10 mM PBS, pH 7,4 (0,1 % Rinderserumalbumin, BSA, 0,05 % Tween 20) durchgeführt. Die Beschichtung mit

Primärantikörper erfolgte in 10 mM PBS, pH 7,4. Alle Reagenzien wurden zu 100 µl/Kavität zugegeben.

Für die Quantifizierung von Dau c 4 wurden alle Kavitäten der Mikrotiterplatte zunächst mit 10 ng rekombinantem Dau c 4 in PBS-Puffer über Nacht beschichtet. Überschüssige Bindungsstellen wurden mit 1% BSA in PBS blockiert (1 Stunde). Im kompetitiven Schritt wurden die Dau c 4 Standards bzw. Probenextrakte zusammen mit dem 1:10.000 verdünntem anti-Profilin Kaninchenserum (Kaninchen anti Lol p 12) über Nacht den mit Dau c 4 beschichteten Kavitäten zugegeben. Die Visualisierung der Immunreaktion erfolgte nach Inkubation von Meerrettichperoxidase-konjugiertem anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (Fa. Sigma, Verdünnung 1:15.000, 1 Stunde) und TMB-Chromogen. Die Farbreaktion wurde, wie oben beschrieben, gestoppt und die Mikrotiterplatte photometrisch vermessen. Alle Puffer waren identisch denen der Bestimmung von Dau c 1. Entsprechend repräsentative Kurvenverläufe der Standards sind im Abschnitt 3.3 (Abb. 9; 3.3.1.1) dargestellt.

2.8.3 IgE Immunoblot Analyse

Auf der Basis der IgE-Immunoblot Analyse mit selektierten Seren von Möhrenallergikern wurde ein sogenanntes „Allergogramm“ erstellt: Möhrenextraktproteine wurde zunächst elektrophoretisch entsprechend der molekularen Masse der im Extrakt enthaltenen Proteine bzw. Allergene getrennt und anschließend die Proteine entsprechend des Trennungsmusters auf einer Papier (Nitrocellulose-) Membran immobilisiert. Die IgE-Reaktivität der einzelnen Seren wurde gegen die immobilisierten Proteine untersucht und somit überprüft, ob neben den bereits bekannten Möhrenallergenen Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 weitere, noch nicht charakterisierte IgE-reaktive Proteine (Allergene) für eine Quantifizierung relevant sind.

Möhrenextrakt wurde zu 40 µg/cm in einem Tris-Tricine Gel (12% Trenngel nach Schägger und von Jagow, 1987 [25]) elektrophoretisch getrennt und im Tankblot auf Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blockierung der Membran mit 1% BSA in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4) für 1 Stunde, wurde je ein Streifen der Membran mit 50 µl Allergikerserum in 500 µl Inkubationspuffer (TBS, 1 %BSA, 0.05 % Tween) über Nacht inkubiert. Gebundenes Möhren spezifisches IgE wurde mit einem biotinylierten anti-Human IgE aus der Ziege (Fa. KPL, Verdünnung 1:2000, 1 Stunde) und Neutravidin- Meerrettichperoxidase Konjugat (Fa. Pierce, Verdünnung 1:400000, 30 Minuten) detektiert. Zwischen allen Inkubationen lagen Waschschriffe mit Inkubationspuffer. Die Visualisierung erfolgte mittels chemilumineszentem Substrat (LumiGloReserve, Fa. KPL) auf Hyperfilm ECL (Fa. GE Health Care) entsprechend den Herstellerangaben.

2.8.4 in vitro RBL-Zell Mediator Freisetzungstest

Mittels eines funktionalen Mediatorfreisetzungstests auf der Basis einer permanent kultivierbaren Ratten Basophile Zelllinie wurde die biologische Aktivität der Möhrenextrakte mit

Blick auf deren IgE-Reaktivität und Fähigkeit zur Kreuzvernetzung von allergenspezifischem IgE mit anschließender Freisetzung physiologisch aktiver Mediatoren untersucht. Auf diese Weise sollte geklärt werden, inwiefern sich unterschiedliche Allergengehalte *in vitro* auf das allergene Potential der untersuchten Möhrensorten in Abhängigkeit der Anbauweise konventionell versus ökologisch auswirken.

Der RBL-Zell Mediatorfreisetzungstest wurde durchgeführt wie kürzlich beschrieben (Kaul et al., 2007) [12], die notwendigen murinen IgE-Seren wurden durch Immunisierung der Mäuse mit rekombinantem Dau c 1.01 und Dau c 1.02 gewonnen.

3 Ergebnisse

3.1 Marktrecherche

3.1.1 Sorten- und Marktanteile von Möhren

Eine Recherche der Sorten- und Marktanteile von Möhren wurde für die Anbaujahre 2004 / 2005 durchgeführt. Da Gemüse in Deutschland nicht nach Sorten gehandelt wird, existiert hierzu kein statistisches auswertbares Material z.B. des Bundessortenamtes oder des Lebensmitteleinzelhandels (LEH). Daher wurden die in Abschnitt 2.1 aufgeführten Quellen sowie relevante Literatur ausgewertet [13] [14] [15]. Umfangreiche Informationen über weit verbreitete und häufig angebaute Sorten wurden insbesondere von bundesweit tätigen Anbauberatern erhalten. Sie beraten Bauern praxisnah bei der Auswahl der für sie optimalen Anbausorte. Die befragten Berater waren entweder selbständig tätig, Vertreter von Saatgutfirmen oder Berater bei Landwirtschaftskammern oder Anbauverbänden. Sie erstellen Ratgeber und Sortenlisten (Anhang 1), die als Orientierungs- und Auswahlhilfen angesehen werden.

Das Ergebnis der Auswertung der Telefoninterviews und Sortenlisten ist für die Anbaujahre 2004 / 2005 in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Demnach haben in Deutschland fünf verschiedene Möhrenkultivare den größten Marktanteil. Im konventionellen Anbau spielte in den Anbaujahren 2004/2005 insbesondere die Hybridsorte Nerac F1 eine dominante Rolle (> 75 %), gefolgt von den Sorten Majestro und Bolero (ca. 25-30 %). Die Angabe der Prozentwerte beruht auf Schätzungen der Befragten. Für den Ökolandbau lagen die Schätzwerte für den Anteil am Gesamtmarkt für die Sorte Rodelika < 3%. Zu weiteren für den Ökolandbau geeigneten Sorten konnten keine Angaben gemacht werden.

Tabelle 6: Übersicht der häufigsten in Deutschland angebauten Möhrensorten und ihre geschätzten Marktanteile.

Aussaart / Sortenname	Gesamtmarktanteil (geschätzt)	Hersteller	Verfügbarkeit von Öko-Saatgut
Früh			
Napoli F1	k. A.	Bejo	Ja
Laguna F1	k. A.	Hild Samen	Nein - aber ungebeizt verfügbar
Mittel			
Majestro F1	Ca. 25 %-30%	Nickerson-Zwaan	Nein - aber ungebeizt verfügbar
Bolero F1			
Spät			
Nerac F1 (als Wasch- und Lagermöhre)	75 - 80 %	Bejo	Nein - aber ungebeizt verfügbar
Rodelika, samenfest	< 3 %	Bingenheimer Saatgut	Ja*

F1 bezeichnet Hybridsaatgut. k. A. keine Angabe. *vom Hersteller ausschließlich ungebeiztes Saatgut

3.1.2 Saatgut

Neben dem zu >95 % von den Befragten genannten Hybridsaatgut (F1) wird auch sogenanntes samenfestes Saatgut auf dem Markt angeboten.

Bei der Hybridzüchtung werden zwei getrennte definierte Inzuchtlinien (Elternlinien) gezüchtet bis sie homozygot auftreten. Zur Saatgutherstellung werden diese (Elternlinien) miteinander gekreuzt. Die resultierenden F1-Pflanzen zeichnen sich durch Wuchskräftigkeit und Widerstandsfähigkeit aus und werden daher in der Landwirtschaft bei vielen Kulturpflanzungen eingesetzt. Die Hybridsorten müssen in jeder Pflanzengeneration durch die Kreuzung der Elternlinien wieder neu generiert werden. Daher ist eine Vermehrung durch den Anbauer nicht oder nur unter sehr schlechten Erträgen möglich. Bei samenfesten Sorten sind die Pflanzen offen abblühend und das entstandene Saatgut kann im Folgejahr wieder ausgesät werden. Allerdings muss eine sogenannte Erhaltungszüchtung durchgeführt werden um die Qualität des Saatgutes zu gewährleisten. Samenfeste Sorten werden vor allem im biologisch-dynamischen Landbau empfohlen, von welchem die Verwendung von Hybridsaatgut größtenteils abgelehnt wird. Die Sorte Rodelika, als wichtigster Vertreter der samenfesten Sorten, wurde daher in der Gesamtaufstellung über die Anteile der Möhrensorten in Deutschland berücksichtigt. Auf den Gesamtanbau gerechnet, besitzt sie allerdings einen sehr geringen Marktanteil. In der Praxis des ökologischen Landbaus finden die F1-Sorten mittlerweile auch im Ökolandbau zunehmende Verbreitung [16].

Unter dem Begriff Ökosaatgut schließlich versteht man Saatgut, bei dem die letzte Vermehrungsstufe (Elterngeneration) auf ökologisch bewirtschafteten Feldern erfolgt ist. Die Vermehrung dauert bei Möhren zwei Jahre. Wird bei Möhren, deren spätere Vermarktung „biologisch“ erfolgen soll, Saatgut eingesetzt, das nicht aus ökologischer Vermehrung stammt,

müssen für den Anbau Ausnahmegenehmigungen gemäß VO (EG) Nr. 1452/2003 [17] über die Datenbank organicXseeds [18] eingeholt werden. Laut Aussage der Datenbankbetreiber werden für die Sorte Bolero, die nicht in ökologischer Qualität verfügbar ist (s. Tab. 6), 50 % aller Anträge gestellt.

3.1.3 Angebotsformen (persönliche Auskünfte verschiedener Anbauberater)

Man unterscheidet bei der Angebotsform zwischen Frisch-/Waschmöhren (in Bundware, unverpackt oder Schalen/Tüten angeboten), Industriemöhren (zur Verarbeitung in Säften, Konserven, Babynahrung etc.), Wasch-/Lagermöhren sowie Importmöhren. Waschmöhren werden gemäß Erntezeitpunkt nochmals in Früh-, Mittel-, und Spätmöhren unterteilt. Ein Überblick zu den gebräuchlichsten Sorten und ihre wichtigsten Charakteristika ist in Anlage 1 aufgelistet.

Von Bedeutung ist, dass im Naturkost Einzelhandel und dem Lebensmitteleinzelhandel (LEH) bei der Angebotsform der Möhren ein großer Unterschied besteht. Während im LEH bei konventioneller und Bio-Ware hauptsächlich Waschmöhren als 1 kg Gebinde in Schalen (57 %) oder Tüten (29 %) verkauft werden, sind es im Naturkost Einzelhandel eher

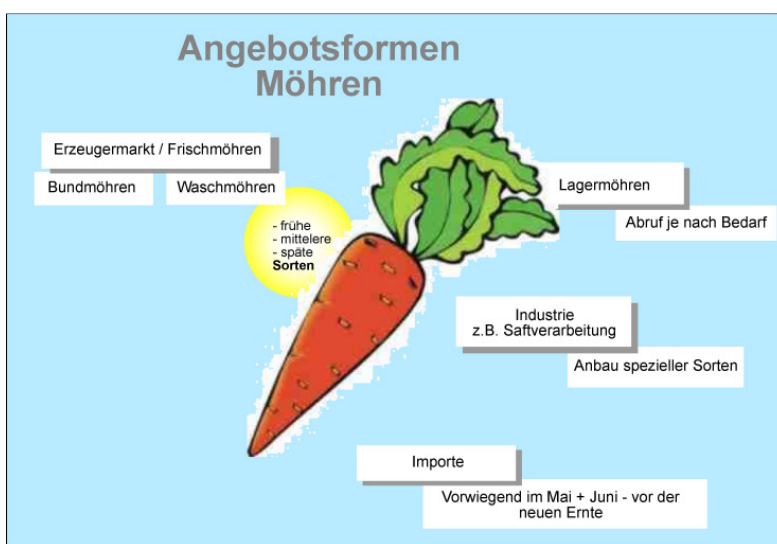


Abbildung 5: Angebotsformen von Möhren im Deutschen Handel.

unverpackte Bundmöhren. In den letzten Jahren ist eine ständig wachsende Nachfrage an Bio-Möhren zu verzeichnen. Im Mai 2006 erreichte der Anteil an Möhren aus ökologischer Landwirtschaft einen Anteil von knapp 18 % am Gesamtverkaufsvolumen in Deutschland. Annähernd 70 % der Bio-Möhren werden mittlerweile in Discountern angeboten während der Bio-Fachhandel im Jahr 2005 lediglich einen Anteil von 7 % am Verkauf von Bio-Möhren besaß. Die rasant gestiegene Nachfrage an Biomöhren hatte im Jahr 2006 in Deutschland sogar eine Verknappung der Eigenproduktion zur Folge, die ab April 2006 vor allem durch Importe aus Italien und Israel gedeckt wurde. (Quellen: [19] [20]).

3.1.4 Standortfaktoren und Anbaugebiete

Bei der Standortfrage ist in erster Linie die Beschaffenheit und Qualität des Bodens ausschlaggebend. Für unterschiedliche Bodentypen gibt es entsprechende

Sortenempfehlungen (Anhang 1). Im Zusammenhang mit den Angebotsformen und Bodenbeschaffenheiten ergeben sich für verschiedene Möhrensorten die folgenden wichtigsten Anbauggebiete mit den dort bevorzugt angebauten Sorten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Wichtigste Anbauggebiete für Möhren mit den dort häufigsten Sorten (persönliche Mitteilung Herr Kühling, Hild Samen)

Bundesland	ha	Angebotsform	Sorte
NRW	2000 – 2500	Früh / Spät	Laguna / Nerac
Schleswig-Holstein	1500 – 2000	Lager	Nerac
Rheinland Pfalz ¹	1800	Früh / Mittel	Laguna / Majestro & Bolero
Niedersachsen ²	variabel	variabel	Karotan

¹ In Rheinland Pfalz herrschen andere Böden und Anbaubedingungen vor. Das Bundesland ist Hauptanbauggebiet für Bundmöhren. Die Sorte Nerac wächst hier nicht so gut. ² In Niedersachsen herrscht der Industriebau vor, mit den wechselnden Anforderungen an Farbe und Ertrag. Der Anbau wird hier vor allem durch den Vertragsanbau für Hipp und Nestlé bestimmt.

Flächenmäßig zählen Möhren mit derzeit 10.043 ha (ZMP-Jahresbericht 2006/2007, [20]) in Deutschland zu den bedeutendsten Gemüsekulturen hinter Spargel.

3.1.5 Sortenauswahl für den Feldversuch

Basierend auf den Ergebnissen der Marktrecherche wurden aufgrund ihrer Bedeutung im ökologischen- sowie konventionellen Anbau, der Verfügbarkeit von Hybrid- oder samenfestem Saatgut sowie der vergleichbaren Wachstums- und Erntezeiten die Sorten Nerac F1 und Rodelika für die Anbauversuche ausgewählt. Die Entwicklungszeit liegt bei beiden Sorten bei ca. 140 Tagen (Aussaat im Mai, Ernte September / Anfang Oktober). Sowohl Nerac als auch Rodelika werden als Wasch-/Lagermöhre empfohlen (Anlage 1). Die Sorte Rodelika wird darüber hinaus als Industriemöhre angeboten, ist jedoch auch als samenfeste Sorte für den Ökolandbau verfügbar (z.B. Bingenheimer Saatgut). Die Sorte Nerac war zwar nicht als spezielles Ökosaatgut, jedoch auch ungebeizt erhältlich. Auf den ausgewählten Anbauflächen in Schleswig-Holstein war für beide Sorten der optimale Ertrag zu erwarten.

3.2 Verlauf der Feldversuche

3.2.1 Feldversuche, Zustand der Pflanzen

Die Anbauversuche fanden in zwei aufeinander folgenden Vegetationsperioden 2005 und 2006 im Kreuzversuch mit jeweils gebeiztem oder ungebeiztem Saatgut auf ökologisch und konventionell bewirtschafteten Parzellen mit den Sorten Nerac F1 und Rodelika in Hedwigenkoog, Schleswig-Holstein statt (Konzept und Probenahmeschema s. Abschnitt 2.3, Abb. 2 und 3). Für den Wiederholungsversuch standen weitere geeignete Flächen in enger Nachbarschaft zur Verfügung. Die Aussaat fand am 17.5.2005 und am 10.5.2006 statt. Die

Ernte erfolgte im Jahr 2005 am 6. Oktober (nach einer Entwicklungsdauer von 143 Tagen) und im Jahr 2006 am 22. September (nach einer Entwicklungsdauer von 136 Tagen). Der Ertrag lag auf der ökologisch bewirtschafteten Fläche im Jahr 2005 bei ca. 45 t/ha und im Jahr 2006 bei 52 t/ha. Der Ertrag auf den konventionell bebauten Feldern lag in beiden Anbaujahren bei ca. 85 t/ha. Die Pflanzenschutzmaßnahmen waren auf den konventionellen Flächen in beiden Anbaujahren gleich. Obwohl im Jahr 2006 ein extrem heißer und trockener Juli zu verzeichnen war wurden keine zusätzlichen Maßnahmen (z.B. Bewässerung) getroffen. Der Zustand der Möhren zum Erntezeitpunkt war in beiden Jahren auf konventionellen sowie auf den ökologisch bewirtschafteten Flächen ausnahmslos sehr gut und ohne auffälligen Pathogenbefall (bis auf einige wenige Exemplare mit Wurmlöchern).



Abbildung 6: Auflauf der Saat

Die erste Entnahme von Krautproben durch die FAL erfolgte nach Reihenschluss. Zu diesem Zeitpunkt liegt bei den Möhren der höchste Nährstoffbedarf vor. Zusätzlich wurden Kraut- und Möhrenproben zum Erntezeitpunkt gezogen sowie Bodenproben zur Bestimmung der Gehalte an Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Phosphat. Die Probenahme des Möhrenkrautes und der Möhren in Dithmarschen wurde am 18.08.05 und 06.10.05 (Ernte) sowie im Jahr 2006 am 27.06.06 und am 22.09.06 (Ernte) durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft (FAL) durchgeführt. Laut Auskunft der FAL waren die Versuchsfelder zu den Untersuchungszeitpunkten in 2005 und 2006 in einem sehr guten Zustand. Die Mineralstoffanalyse der Proben zeigte keine Auffälligkeiten, welche auf einen Ernährungsmangel der Pflanzen hinweisen und lagen für die Anbauweisen im normalen Bereich. Die Daten für Kraut und Bodenproben nach Reihenschluss für die Vegetationsperioden 2005/2006 sind dem Anhang 2 zu entnehmen.



Abbildung 7: Reihenschluss, links konventioneller, rechts ökologischer Anbau

Für beide Erntejahre wurde somit für alle Möhren – unabhängig von der Anbauweise -ein optimaler Ernährungszustand festgestellt. Somit war ein vergleichbarer physiologischer Zustand der Pflanzen gegeben und eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Mangelzustand oder Krankheitsbefall ausgeschlossen.

3.2.2 Probenahme

Entsprechend dem Probenahmeschema (Abschnitt 2.4, Abb. 3) wurden pro Parzelle vier repräsentative Misch- (n=20 Möhren) und zehn Einzelproben gezogen und eindeutig gekennzeichnet. Die zusätzlichen Einzelproben aus einer Parzelle bestanden aus fünf großen und fünf kleinen Möhren. Die Untersuchung von Einzelmöhren sollte Aufschlüsse über mögliche Einzelvariationen bei den Allergengehalten geben und wurde ausschließlich mittels immunologischer Methoden am PEI durchgeführt. Aufgrund der ELISA-Ergebnisse der Einzelprobenuntersuchung Dau c 1.01, welche am Beispiel des Erntegutes 2005 zeigten, dass die Allergengehalte in diesen Proben in der Größenordnung sehr gut mit den Mittelwerten der Mischproben korrelieren (Tab. 13, Abschnitt 3.3.3.1), wurde in der zweiten Vegetationsperiode auf die Einzelproben verzichtet und das Probenaufkommen verringert. Sortentypische Ernteproben von Rodelika und Nerac zeigt die Abbildung 8 a und b. Mit der Aufarbeitung der Proben wurde innerhalb von 24 Stunden nach der Ernte am Paul-Ehrlich Institut begonnen, so dass zwischen Probenahme und Aufarbeitung maximal 24-48 h lagen.



8 a) Ernteproben der Sorte Rodelika



8 b) Ernteproben der Sorte Nerac

Abbildung 8 a und b: Beispiel für Ernteproben. Obere Reihe Einzelproben (5 große und 5 kleine Möhren) – untere Reihe(n) Zufalls-Mischprobe à 20 Möhren

Jede Probe wurde nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und das Material auf PEI und BfR aufgeteilt. Mit dieser Vorgehensweise war gewährleistet, dass für die Untersuchungen identisches Ausgangsmaterial sowohl für die immunchemische als auch RNA basierte Analytik verwendet wurde. Die Stoffwechselaktivität wurde zu einem einheitlichen Zeitpunkt gestoppt, um die Daten aus der Protein- und RNA-Bestimmung miteinander vergleichen zu können. Da insbesondere mRNA in der intakten Zelle schnellen turn-over Raten unterliegt würde eine zeitverzögerte Aufarbeitung die Korrelation zwischen Allergengehalt und Transkriptionsaktivität der Allergen-Gene unmöglich machen. Von jeder Probe wurden drei unabhängige Extraktionen untersucht. Die durchgängige

Nummerierung der Extrakte jeder Erntekampagne nach einem einheitlichen Schema (Beispiel für Ernteproben 2005, Anhang 3) ermöglichte die eindeutige Zuordnung der Ergebnisse von PEI und BfR zu der jeweiligen Probenfraktion.

3.3 Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen

3.3.1 Assayentwicklung (ELISA)

3.3.1.1 Auswahl geeigneter Immunreagenzien

Zum Aufbau neuer spezifischer ELISA zum Nachweis der bereits bekannten Möhrenallergene Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 mussten zunächst geeignete Immunreagenzien identifiziert werden.

Bei den bekannten Allergenen handelt es sich um sogenannte pollenassoziierte Allergene, die sequenziell homolog zu den Birkenpollenallergenen Bet v 1 und Bet v 2 sind. Zum Birkenpollenhauptallergen Bet v 1 wurde bereits eine Vielzahl von homologen Allergenen in verschiedenen Gemüsen und Früchten beschrieben. Entsprechendes gilt auch für die Bet v 2 homologen Profilin. Aufgrund der großen sequenziellen Ähnlichkeiten der Allergene sind oftmals auch immunologische Reagenzien, die gegen solche Strukturen gewonnen werden, immunologisch kreuzreaktiv. Zur Verdeutlichung zeigt Tabelle 8 die Aminosäuresequenzidentitäten zwischen dem Birkenpollen Hauptallergen Bet v1 und den Hauptallergenen in Möhre und Sellerie, dem Dau c 1 und Api g 1, bzw. deren Isoformen.

Tabelle 8: Aminosäuresequenzidentität (%) zwischen Bet v 1 und Dau c 1 bzw. Api g 1

Allergen	Bet v 1a	Api g 1.01	Api g 1.02	Dau c 1.01	Dau c 1.02
Bet v 1a	100	41.9	40	38.1	39.4
Api g 1.01		100	52.9	81.2	51
Api g 1.02			100	50.3	95.5
Dau c 1.01				100	50.3
Dau c 1.02					100

Auffallend ist die große Sequenzidentität zwischen den Isoformen Dau c 1.01 und Api g 1.01 bzw. Dau c 1.02 und Api g 1.02. Aus diesem Grunde wurden für die Entwicklung Dau c 1 spezifischer ELISA neben Antikörpern gegen Dau c 1 auch solche gegen Api g 1 und Bet v1 näher untersucht. Neben einer Reihe monoklonaler Antikörper gegen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 waren auch monoklonale Antikörper für Bet v 1 und dessen Isoformen sowie polyklonale Kaninchenserum gegen Api g 1.01 und Api g 1.02 bzw. in Kombination Api g 1.01/1.02 verfügbar. Zur Detektion von Möhrenprofilin wurden verschiedene polyklonale

Antiseren untersucht sowie monoklonale Antikörper gegen Sonnenblumenprofilin untersucht. Exemplarisch sind die monoklonalen Antikörper gegen Dau c 1 aus dem Paul-Ehrlich-Institut (mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Susanne Kaul) sowie die polyklonalen Kaninchenseren aus verschiedenen Forschungs Kooperationen des Paul-Ehrlich-Institutes in Tabelle 9 zusammengefaßt. Alle verfügbaren Immunreagenzien wurden auf deren Spezifität mit rekombinantem Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 im Mikrotiterplatten Format untersucht.

Tabelle 9 Auswahl geeigneter monoklonaler Antikörper (mak) und polyklonaler Kaninchen Antiseren (pak) zur spezifischen Detektion von Dau c 1.01 und Dau c 1.02 sowie Dau c 4.

Maus mak	Kodierung	Spezifität nach Vortestung	Kann. pak	Bezeichnung	Spezifität	Spezifität nach Vortestung
1	8B9-F9	Dau c 1.01	A	anti-Api g 1.01	Sellerie Profilin	Dau c 1.01
2	6G6-A2	Dau c 1.01	B	anti Api g 1.02	Sellerie Profilin	Dau c 1.02
3	1F6-B3	Dau c 1.01	C	anti-Api g1.01/1.02	Sellerie Profilin	Dau c 1.01/1.02
4	3E11-H4	Dau c 1.01 und 1.02	D	anti-Pyr c 4	Birnen Profilin	Dau c 4
5	2C4-F7	Dau c 1.01 und 1.02	E	anti-Lol p 12	Weidelgras Profilin	Dau c 4
6	2C4-E9	Dau c 1.01 und 1.02	F	anti-Amb a 8	Lieschgras Profilin	Dau c4
7	2C4-G8	Dau c 1.01 und 1.02	G			
8	9D5-E2	Dau c 1.02	H			
9	2C9-H2	Dau c 1.02	I			
10	1F6-A5	Dau c 1.02	J			

Aus diesem ersten Screening ergab sich eine Vorauswahl geeigneter Immunreagenzien, die in weiteren immunologischen Testungen zudem auf deren Sensitivität gegenüber den rekombinanten Standards ausgesucht wurden (siehe Markierungen). Die Sensitivitätstestung berücksichtigte neben der Nachweisbarkeit möglichst geringer Allergengehalte auch eine möglichst gute Signalausbeute zur robusten photometrischen Detektion der Antigen-Antikörper Reaktion.

Primär sollten für alle zu detektierenden Allergene zweiseitige ELISA für eine möglichst hohe Spezifität aufgebaut werden. Für Dau c 1.01 war dies in der Kombination von mak 3 und anti-Api g 1.01/1.02 möglich, sowie für Dau c 1.02 in der Kombination von mak 9 und anti-Api g 1.02. Für Dau c 4 konnte ein entsprechendes „Pärchen“ aus Maus mak und Kaninchen pak nicht identifiziert werden. Allerdings erwies sich das anti-Lol p 12 Kaninchen Antiserum als sehr reaktiv gegenüber Dau c 4 und konnte somit in einem kompetitiven ELISA Format eingesetzt werden.

Erste Untersuchungen zur Robustheit der ELISA zeigten stabile Standardkurven zur Quantifizierung von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 (Abbildung 9). Dabei hatten der rekombinante Standard und das natürliche Allergen aus den untersuchten Extrakten vergleichbare und parallele Kurvenverläufe, d.h. annähernd identische Bindungseigenschaften.

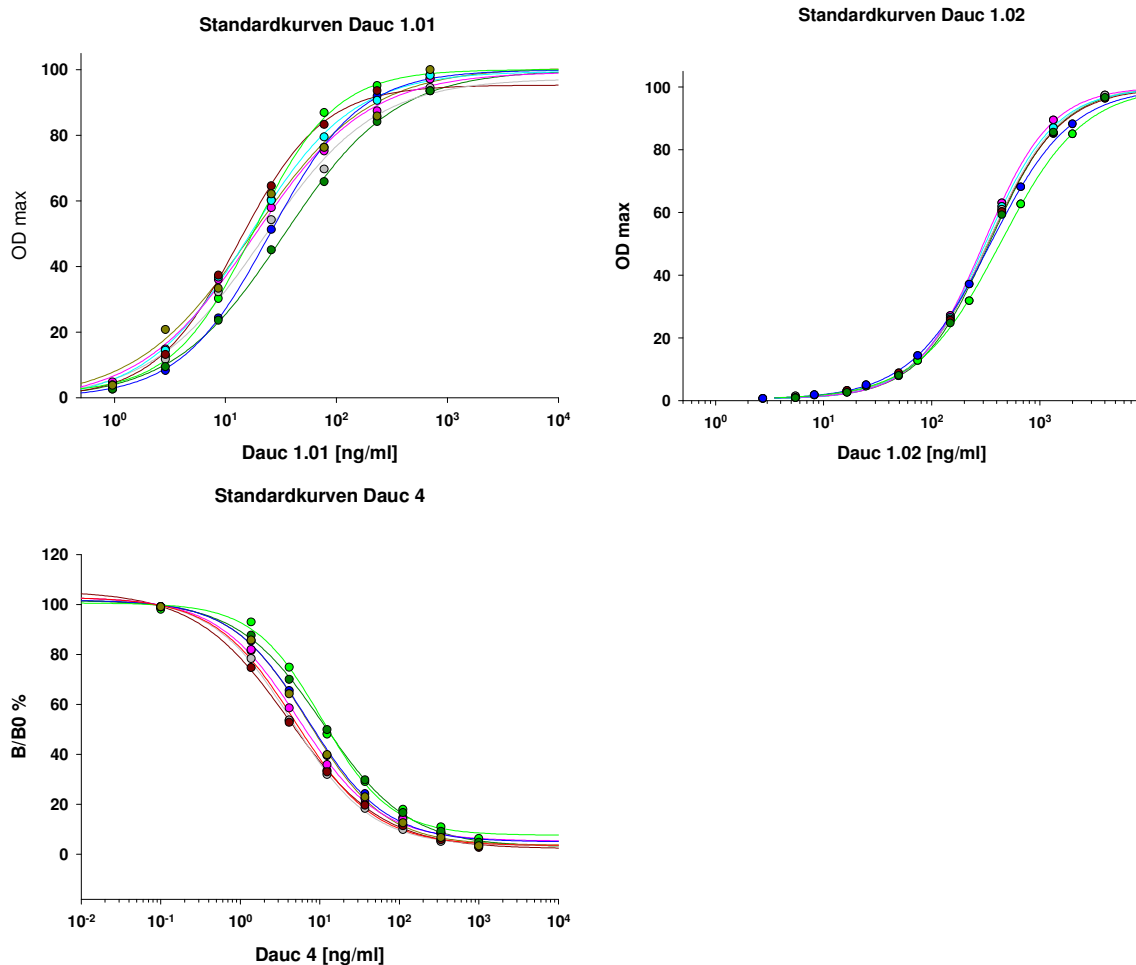


Abbildung 9: Repräsentative Standardkurven zum Nachweis von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4.

3.3.1.2 Sensitivität und Spezifität

Unter Berücksichtigung der kleinsten vom Hintergrund noch zu differenzierenden Extinktion ergaben sich als Nachweisgrenzen 1 ng/ml Dau c 1.01, 10 ng/ml Dau c 1.02 und 1 ng/ml Dau c 4 im Extrakt (siehe Abbildung 9). Unter Berücksichtigung der Extraktion von 5 g Möhregut in 10 ml Extraktionspuffer und einer Mindestverdünnung der Extrakte von 1:5 in Inkubationspuffer sind noch 10 ng/g Dau c 1.01 bzw. Dau c 4 und 100 ng/g Dau c 1.02 nachweisbar. Dies entspricht 1 µg Dau c 1.01, 10 µg Dau c 1.02 oder 1 µg Dau c 1.02 in einer Probe von 100 g.

Zur Überprüfung der Spezifität wurden die ELISA auf ihre Reaktivität gegenüber den bekannten Möhrenallergenen getestet. Wie Tabelle 10 verdeutlicht, waren die ELISA hoch spezifisch. Keiner der ELISA wies zudem eine Reaktivität gegen die auf höhermolekularen IgE-bindenden Sellerieproteinen bekanntermaßen vorkommenden M0XF-Glycopeptidstrukturen auf. Auf andere Proteine oder Allergene mußte im Falle dieser ELISA nicht getestet werden, da als Untersuchungsproben lediglich reine Möhrenproben in Frage kamen.

Tabelle 10: Spezifität der entwickelten ELISA

ELISA Allergen	Dau c 1.01	Dau c 1.02	Dau c 4
Dau c 1.01	+	-	-
Dau c 1.02	-	+	-
Dau c 4	-	-	+
CCD (MOXF)	-	-	-

3.3.1.3 Reproduzierbarkeit der Extraktion

Um die Reproduzierbarkeit der Extraktion zu überprüfen, wurden von einer handelsüblichen Möhrenprobe (Fa. Füllhorn, gezogen im August 2005) jeweils 4 unabhängige Vermahlungen zur Probenhomogenisierung durchgeführt. Aus jeder der Vermahlungen wurden zwei parallele Proteinextrakte hergestellt und diese im ELISA jeweils für Dau c 1.01 und Dau c 1.02 quantifiziert. Aus dem Mittelwert zweier quantifizierter Extrakte resultierte der absolute quantitative Gehalt je Vermahlung. Die Einzelergebnisse sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Allergengehalte für Dau c 1.01 und Dau c 1.02 in Abhängigkeit der Probenvorbereitung sind in Tabelle 11 summiert. In vier unabhängigen Ansätzen für die Probenvorbereitung konnte in der ausgewählten Möhrenprobe „Füllhorn“ für Dau c 1.01 ein Gehalt von 457 µg je 100 g Probe mit einer Wiederholbarkeit von 91,6 % (8,4 % Variationskoeffizient, CV) und für Dau c 1.02 ein Gehalt von 263 µg je 100 g Probe mit einer Wiederholbarkeit von 85,3 % (14,7 % CV) quantifiziert werden. Für die Quantifizierung der beiden Hauptallergen Isoformen in Möhre wurde somit eine Schwankung in der Quantifizierung von weniger als 15 % ermittelt. Geht man davon aus, daß ein Teil der Schwankung auf die

Tabelle 11: Wiederholbarkeit der Probenvorbereitung

Mahlung & Extraktion	µg Allergen/100 g Probe	
	Dau c 1.01	Dau c 1.02
1	501,9	215,8
2	410,2	293,9
3	468,3	246,4
4	448,1	295,3
Mittelwert	457,1	262,9
Standardabweichung	38,4	38,7
% CV	8,4	14,7

Variation der Meßmethoden zurückzuführen ist, so ist die Proteinextrahierbarkeit der Möhrenproben als hoch reproduzierbar anzusehen.

3.3.1.4 Richtigkeit

Neben den extrahierten Zielproteinen können co-extrahierte Bestandteile eines Extraktes die Richtigkeit der Quantifizierung stark beeinflussen. Um dies zu überprüfen wurden verschiedene Extrakte aus Möhren des ersten Feldversuches (Kalenderjahr 2005) knapp oberhalb der Nachweisgrenze der einzelnen ELISA (siehe 3.3.2) mit dem jeweiligen Allergen dotiert und quantifiziert. Aus vorausgegangen Versuchen war der Einzelallergengehalt der hier untersuchten Extrakte sowie eine adäquate Verdünnungsstufe zur Quantifizierung der Einzelallergene in den Extrakten bekannt. Zusätzlich wurde aus den Ergebnissen der Vorversuche berücksichtigt, daß für eine präzise Quantifizierung der Extrakte die Messverdünnungen so gewählt wurden, daß das Messsignal (Extinktion beim Sandwich ELISA; Inhibition beim kompetitiven ELISA) unterhalb der Hälfte des Maximalsignals (Maximalextinktion bzw. Maximalinhibition) der Standardkurven lag. In Abbildung 10 ist exemplarisch das Standardadditionsverfahren für die Extrakte Nr. 1 und Nr. 24 aus dem Feldversuch 2005 für die Bestimmung von Dau c 1.01 dargestellt. Die Dotierung „0 ng/ml“ (Nulldotierung) entspricht dem gemessenen Gehalt an natürlichen Dau c 1.01 im Probenextrakt

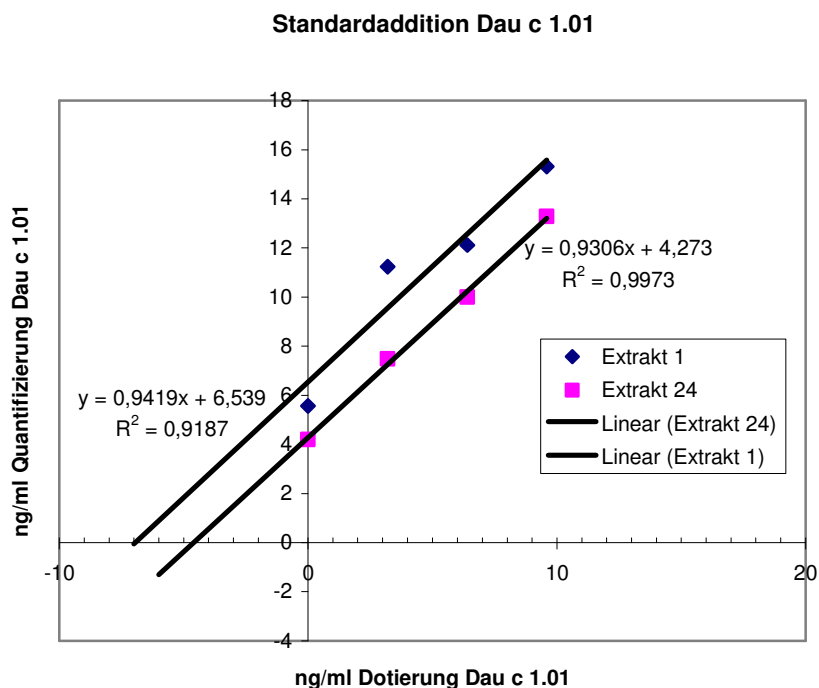


Abbildung 10: Standardaddition von Dau c 1.01 in zwei Extrakten der Untersuchungsproben aus dem Feldversuch 2005.

in der gewählten Messverdünnung, also ohne Dotierung. Entsprechend wurde rekombinantes Dau c 1.01 zu den Extrakten dotiert und der Signalzuwachs zur Ermittlung einer linearen Regression genützt. Aus dem Schnittpunkt der Regression der Standardadditionskalibration mit der X-Achse (Achse der Dotierung) läßt sich der „wahre“ Gehalt an Dau c 1.01 in der Messverdünnung ablesen oder aus der Regressionsgleichung am Punkt der Nulldotierung

(Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit Y-Achse) berechnen. Die Wiederfindung entspricht dann dem Verhältnis aus dem Meßwert bei Nulldotierung (Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse) und dem errechneten Gehalt gemäß Auflösung der linearen Regression nach der Nulldotierung (Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse). Auf diese Weise lassen sich mittlere Wiederfindungsraten im Bereich der Dotierung ermitteln. In Tabelle 12 sind die ermittelten mittleren Wiederfindungen für Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 an jeweils zwei verschiedenen Extrakten dargestellt. Für alle 3 ELISA waren die Wiederfindungen im Bereich niedriger Konzentrationen der einzelnen Allergene gut bis sehr gut und bestätigen somit eine richtige Quantifizierung der Probenextrakte mit den spezifischen ELISA. Anhand der guten bis sehr guten Wiederfindungen zeigte sich auch die vergleichbar gute Nachweisbarkeit von sowohl natürlichem als auch rekombinant hergestelltem Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4.

Tabelle 12: Mittlere Wiederfindung nach Standardadditionsverfahren im Bereich der angegebenen Dotierungen für die 3 spezifischen ELISA am Beispiel von jeweils zwei unabhängigen Probeextrakten. (WF Wiederfindung).

Allergen	Extrakt Nr.	% WF	Extraktverdünnung	Dotierung
Dau c 1.01	1	80	1:2200	3-10 ng/ml
	24	92		
Dau c 1.02	85	94	1:30	80-240 ng/ml
	115	90		
Dau c 4	1	102	1:120	3-9 ng/ml
	118	137		

3.3.1.5 Reproduzierbarkeit (Inter-Assay Variation)

Es wurde untersucht, mit welcher Präzision die Messung eines Extraktes zwischen verschiedenen Versuchstagen (Inter-Assay Varianz) durchgeführt werden kann. Hierzu wurde eine handelsübliche Möhrenprobe (Fa. Füllhorn, gezogen im August 2005) extrahiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Möhrenprobe „Füllhorn“ wurde für jedes Feldversuchsjahr neu extrahiert, aliquotiert und der gewonnene Extrakt jeweils in allen ELISA Messungen eines Erntejahres quantifiziert. Auf jeder ELISA Platte wurde somit der Gehalt an Dau c 1.01, Dau c 1.02 bzw. Dau c 4 in der „Füllhorn“ Möhre wiederholt quantifiziert, woraus sich die Inter-Assay Varianz der jeweiligen ELISA ableiten ließ. In Abbildung 11 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die Quantifizierung der Einzelallergene im Jahr 2005 und 2006 gegenübergestellt. Für Dau c 1.01 und Dau c 4 konnte mit 12-19% Variation eine sehr gute Präzision der Wiederholungsmessungen erzielt werden, so daß hier für die Ergebnisse der Untersuchungen der Feldversuchsproben von einer hohen Messpräzision auszugehen ist. Im Fall der Dau c 1.02 Quantifizierung war die Variation der Wiederholungsmessungen mit circa 25-37 % höher. Allerdings ist diese Präzision der

Messungen ausreichend gut, um Allergengehalte in den Untersuchungsproben mit $\pm 50\%$ eindeutig voneinander unterscheiden zu können (siehe dort). Während der Gehalt von Dau c 1.02 nahezu identisch in beiden Möhrenextrakten quantifiziert wurde, war im Jahr 2006 gegenüber 2005 die Quantifizierung von Dau c 4 um circa 25 % und von Dau c 1.01 um circa 50 % niedriger. Da die aufgemahlene Möhre zwischen beiden Extraktionen ein Jahr bei -80 °C gelagert wurde, konnte die tendenzielle Abnahme der Allergengehalte aufgrund einer Lagerinstabilität des Materials entstanden sein. Leider liegen zur Lagerstabilität von Untersuchungsmaterial keine systematischen Untersuchungen vor, so daß hier keine endgültige Aussage über den Grund der niedrigeren Allergengehalte in 2006 gemacht werden können. Um einen Einfluß von lagerungsbedingter Instabilität des Untersuchungsmaterials für die Ernteproben ausschließen zu können, wurden alle Untersuchungsproben der jeweiligen Erntekampagnen unmittelbar verarbeitet und deren Allergengehalte zeitnah quantifiziert.

in 2005	Allergen ELISA		
	Dau c 1.01	Dau c 1.02	Dau c 4
n	27	25	34
MW [ng/ml]	2781,07	341,74	633,76
Stabw	356,86	126,77	100,34
% CV	12,8	37,1	15,8

in 2006	Allergen ELISA		
	Dau c 1.01	Dau c 1.02	Dau c 4
n	8	8	7
MW [ng/ml]	1438,63	343,38	479,29
Stabw	253,16	86,48	90,61
% CV	17,6	25,2	18,9

Abbildung 11: Mittlerer Variationskoeffizient (% CV) in der Quantifizierung von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 im Jahr 2005 und 2006 in Möhre „Füllhorn“ (n Anzahl unabhängiger Durchgänge, MW Mittelwert ng Allergen je ml Extrakt, Stabw Standardabweichung, % CV = $MW/Stabw \cdot 100$)

3.3.2 IgE-Immunoblot Analyse zur Erstellung eines Möhren Allergogramms

Der Nachweis von Allergenen in Möhren erfolgte im sogenannten Immunoblotting (Western blotting). Hierbei wurden die Proteine eines Proteinextraktes aus Möhre entsprechend ihrer molekularen Masse elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt. Für die anschließende

Immundetektion mit Tierenseren erfolgte die Trennung nach der Methode nach Laemmli (1970) [24] und für die Immundetektion mit Allergen spezifischem IgE (von Möhrenallergikern) nach der Methode nach Schägger & von Jagow (1987) [25]. Die separierten Proteine wurden mittels Elektrotransfer im „semi-dry“ Modus auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die spezifische Detektion einzelner Möhrenallergene erfolgte mittels monoklonaler Antikörper (mAk), Immunsereum aus Maus bzw. Kaninchen oder mittels Allergikerseren. Die spezifischen Immunreaktionen wurden mittels geeigneter Sekundärantikörper/Enzymkonjugate sowohl kolorimetrisch als auch über Chemilumineszenz durch eine enzymatische Reaktion nachgewiesen. In Abbildung 12 ist der Nachweis der Möhrenallergene Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 dargestellt. Darüber hinaus ließen sich Proteine mit Homologie zu den Birkenpollenallergenen Bet v 6 und Bet v 7 nachweisen. Allerdings war deren Relevanz als Allergene in Möhre bis dato unbekannt. So war es erforderlich eine größere Auswahl an Seren von Möhrenallergikern auf IgE-Reaktivität im entsprechenden Molekulargewichtsbereich zu analysieren.

Nach Optimierung der Immunoblotting Bedingungen zum Nachweis von IgE-reaktiven Proteinen (Allergenen) in Möhre, wurden IgE-Immunoblot Analysen mit ausgewählten Seren von Möhrenallergikern durchgeführt (Abbildung 13).

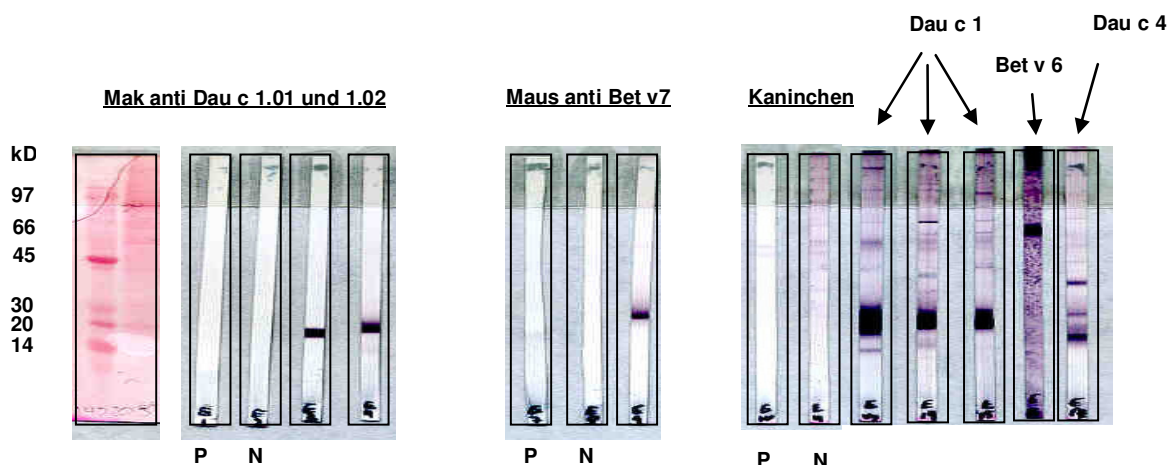


Abbildung 12: Nachweis der Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 des Hauptallergens Dau c 1 der Möhre mit monoklonalen Antikörpern (links) und Kaninchenimmunsereum (rechts), und des Möhren Profilins Dau c 4 mittels Kaninchenimmunsereum. Ein homologes Protein zum Birkenpollenallergen Bet v 6 wurde mit einem Kaninchenimmunsereum und ein Bet v 7 homologes Protein mit Mausimmunsereum in Möhre nachgewiesen (P Pufferkontrolle, N Normalserumkontrolle bei Kaninchen- bzw. Mausimmunsereum bzw. irrelevanter mak bei monoklonalen Antikörpern).

Mittels der unter Standardbedingungen durchgeführten Proteinextraktion waren die bereits bekannten und charakterisierten Möhrenallergene Dau c 1 und Dau c 4 im Extrakt nachweisbar und IgE-reaktiv. Damit wurde die qualitative Eignung der Extraktionsmethode zum Nachweis der bekannten Möhrenallergene bestätigt. Zusätzlich konnte eine IgE-Reaktivität im

Molekulargewichtsbereich des Bet v 6 homologen Möhrenproteins beobachtet werden, wie in Abbildung 13 exemplarisch für das Allergikerserum Nr. 9 hervorgehoben ist. Allerdings war diese IgE-Reaktivität sehr selten: in insgesamt 34 untersuchten Seren von Möhrenallergikern aus der PEI Serumbank (n=20), Spanien (n=8) und Portugal (n=6) war in nur 3 Seren (8 %) eine IgE-Reaktivität für das putative Bet v 6 homologe Möhrenallergen nachweisbar. Ein Bet v 7 homologes Möhrenallergen konnte nicht bestätigt werden. Die im Vergleich zum Bet v 6 homologen Möhrenprotein höhermolekularen IgE-Reaktivitäten sind aufgrund der Erkenntnisse vorausgegangener Studien als kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD) einzuschätzen. Die Rolle dieser IgE-bindenden CCD in der klinischen Allergologie ist indes zweifelhaft und in nur wenigen Beispielen konnte eine Basophilenaktivierung durch CCD beschrieben werden.

Aufgrund der in unserer Patientengruppe geringen IgE-Bindung an andere Möhrenproteine als den bereits bekannten Allergenen Dau c 1 und Dau c 4 erschien die Quantifizierung der bekannten Allergene mittels ELISA als ausreichend für die Beschreibung der Allergengehalte in Möhrenproben. Folglich wurden keine weiteren spezifischen ELISA entwickelt.

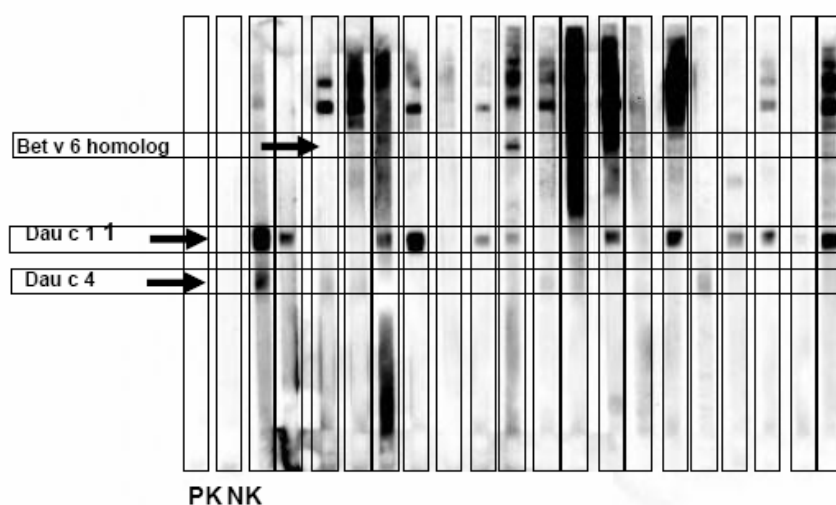


Abbildung 13: IgE Immunoblot mit ausgewählten Seren (n=19) von Möhrenallergikern (PK Pufferkontrolle, NK Nichtallergikerkontrolle). Der Nachweis von Dau c 1, sowie Dau c 4 und einem putativen Bet v 6 homologen Allergen in Möhre sind hervorgehoben. Andere höher molekulare IgE-reaktive Proteine stellen im wesentlichen nicht relevante kreuzreagierende Kohlenhydrat Determinanten (CCDs) dar.

3.3.3 ELISA Untersuchungen zum Allergengehalt der Möhrenproben aus den Anbauversuchen 2005 und 2006

3.3.3.1 Feldversuch im Jahr 2005

Entsprechend der Feldversuchsplanung (Abschnitt 2.3), der Probennahme (Abschnitt 2.4) und der Probenaufarbeitung (Abschnitt 2.5) wurden je Sorte (Rodelika, Nerac) und Anbaubedingung (ökologisch, konventionell) je 4 Parzellen beprobt, um Mischproben zu 20 Stück Möhren je Parzelle zu erhalten. So wurden insgesamt 16 Mischproben gezogen und analysiert. Zusätzlich wurden je Kombination aus Sorte und Anbaubedingung 10 Einzelproben gezogen, um die Biovariabilität zu untersuchen. So wurden weitere 40 Proben analysiert. Die Einzelproben wurden systematisch nach großen und kleinen Möhren (je 5 Stück) sortiert. Somit wurden aus dem Feldversuch im Jahr 2005 insgesamt 56 Proben analysiert. Jede Probe wurde in drei unabhängigen parallelen Extrakten quantifiziert. Die Extraktion war hoch reproduzierbar (siehe Abschnitt 3.3.1.3). Jede Quantifizierung umfaßte eine Verdünnungsreihe der Proben mit mindestens 4 Messverdünnungen, die wiederum mindestens in Doppelbestimmung quantifiziert wurden. Diese Systematik wurde für alle 3 Messparameter strikt eingehalten, so daß mindestens 4032 Einzelbestimmungen durchgeführt wurden, exklusive der Standardreihen zur Aufstellung einer Kalibration und der Positivkontrolle Möhre „Füllhorn“ zur Kontrolle der Wiederholbarkeit der Ansätze.

Auf eine detaillierte Abbildung der Einzelergebnisse wird zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Eine reproduzierbare Analytik mit niedriger Inter-Assay Varianz war durch den Kontrollparameter Möhre „Füllhorn“ überprüfbar und jederzeit gegeben (siehe Abschnitt 3.3.1.5).

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen ELISA-Allergenanalytik der Ernteproben im Jahr 2005

Jahr 2005	Probe	Dau c 1.01			Dau c 1.02			Dau c 4		
		n	µg/100 g	%CV	n	µg/100 g	%CV	n	µg/100 g	%CV
Rodelika, konv.	groß	5	1558	26	5	77,4	57	5	181,2	6
	klein	5	2058	37	5	61,9	49	5	185,7	11
	misch	4	1958	23	4	65,8	43	4	204,7	12
Nerac, konv.	groß	5	871	53	5	23,6	99	5	170,8	21
	klein	5	568	42	5	12,9	60	5	131,9	14
	misch	4	712	49	4	30,0	15	4	161,1	16
Rodelika, öko.	groß	5	2784	31	5	98,8	26	5	230,0	30
	klein	5	1412	54	5	120,2	42	5	211,0	18
	misch	4	2013	18	4	116,2	27	4	187,8	6
Nerac, öko.	groß	5	712	13	5	24,8	71	5	147,5	27
	klein	5	547	47	5	21,0	115	5	129,2	4
	misch	4	1023	24	4	32,1	14	4	145,7	16

Die ELISA waren hoch spezifisch und sensitiv (Abschnitt 3.3.1.2). Die Richtigkeit der quantitativen Analytik wurde in Dotierungsversuchen bestätigt (siehe Abschnitt 3.3.1.4).

In Tabelle 13 sind die mittleren Werte der Allergengehalte von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 bezogen auf 100 g Möhre zusammengefaßt. Anhand des Vergleichs der quantitativen Werte der Einzelproben und der Mischproben wird in der Tendenz deutlich, daß bei einer Analyse von Einzelproben mit einer größeren Schwankungsbreite (%CV) der quantitativen Werte gerechnet werden muß, wobei die quantitativen Allergengehalte der Einzelproben in der Größenordnung sehr gut mit den mittleren Werten der Mischproben korrelieren.

Im Folgenden werden die quantitativen Ergebnisse auf der Basis der bestimmten Allergengehalte der Extrakte statistisch analysiert.

Abbildung 14: Box-Plot des Dau c 1.01 Allergens für jede Versuchsbedingung

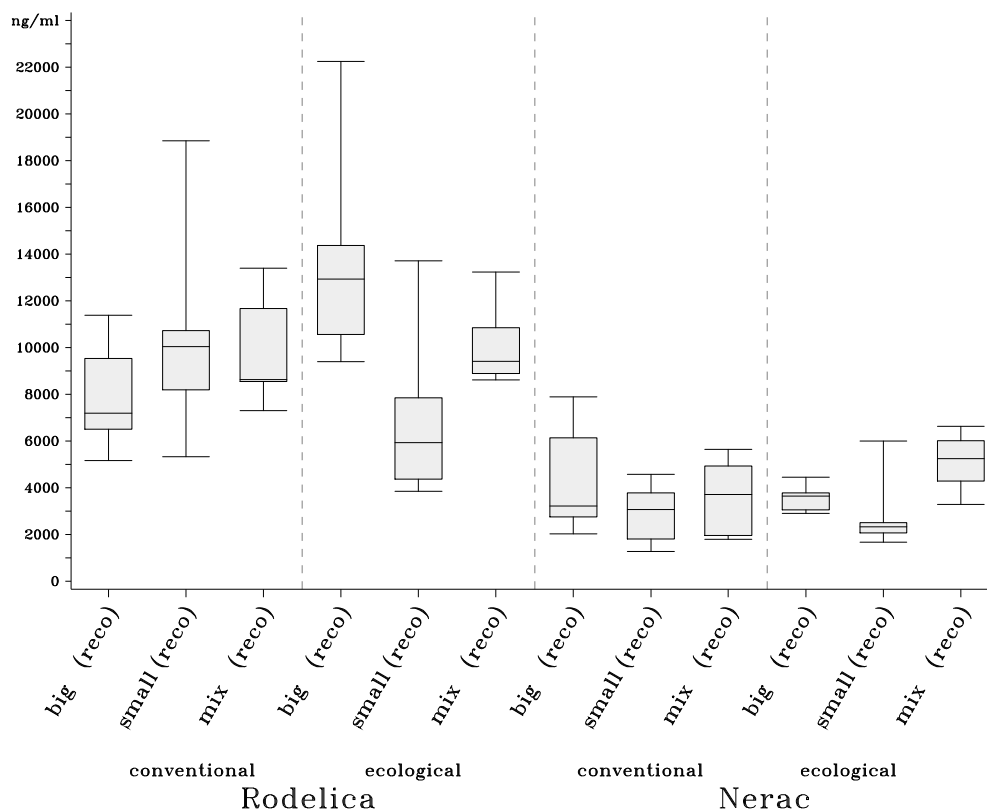


Abbildung 15: Box-Plot des Dau c 1.02 Allergens für jede Versuchsbedingung

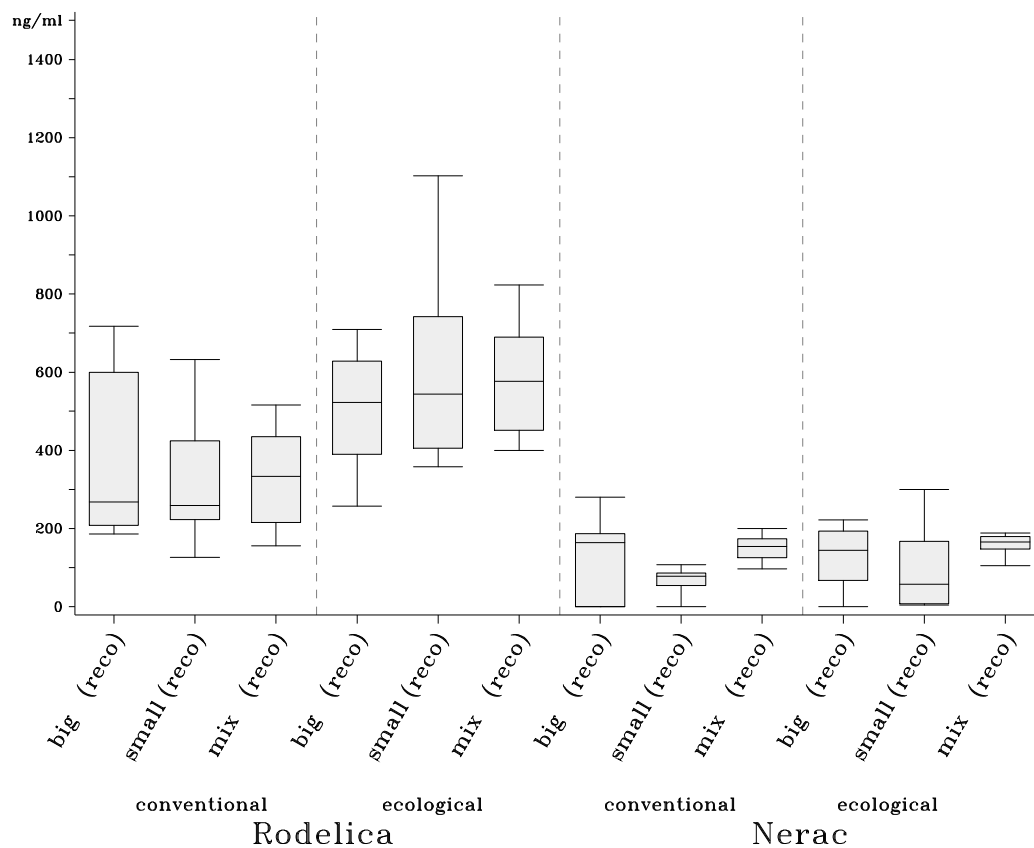
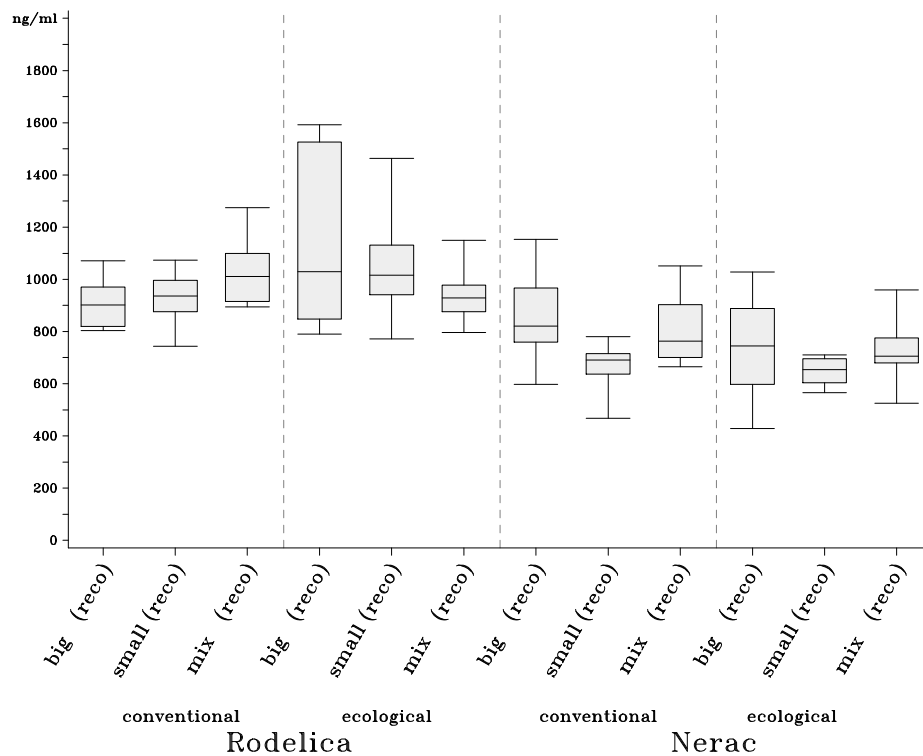


Abbildung 16: Box-Plot des Dau c 4 Allergens für jede Versuchsbedingung



In den Box-Plot-Graphiken sieht man einen deutlichen Unterschied bzgl. des Allergengehaltes zwischen den **Sorten** Rodelica und Nerac für Dau c 1.01 (Abbildung 14) und Dau c 1.02 (Abbildung 15); für Dau c 4 (Abbildung 16) ist kaum ein Unterschied zu erkennen.

Unterschiede zwischen den **Anbauarten** sind anhand der Graphiken zunächst nicht zu erkennen.

Auch scheint es keinen Einfluss zu haben, ob kleine, große oder gemischte **Proben** betrachtet werden, lediglich bei Dau c 1.01, Sorte Rodelica, Anbau ökologisch gibt es Schwankungen im Allergengehalt abhängig von der Probenart.

Die Daten wurden mit einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiede im Allergengehalt untersucht, bedingt durch die Faktoren ‚Sorte‘, ‚Anbauart‘, und ‚Probengröße‘ sowie durch Wechselwirkungen zwischen den Faktoren ‚Sorte‘ und ‚Anbau‘, ‚Sorte‘ und ‚Probengröße‘ bzw. ‚Anbau‘ und ‚Probengröße‘. Die Auswertung erfolgte mit der SAS/STAT Software, Version 9.1. Dabei konnten statistisch signifikante Unterschiede (zum Testniveau $\alpha = 0.05$) zwischen den **Sorten** („Nerac“ und „Rodelica“) bei allen drei Allergenen (Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4) beobachtet werden (siehe SAS-Output). Die **Anbauart** hat nur bei Allergen Dau c 1.02 einen signifikanten Einfluss ($p < 0.0001$), die **Größen** der untersuchten Karotten („big“, „mix“, „small“) nur bei den Allergenen Dau c 1.01 und Dau c 4 ($p = 0.0027$ bzw. $p = 0.0135$).

Zusätzlich scheint es signifikante Wechselwirkungen zwischen ‚Sorte‘ und ‚Anbau‘ bei den Allergenen Dau c 1.02 und Dau c 4 zu geben, das heißt, durch die Anbauart scheint sich der Unterschied im Allergengehalt, der zwischen den Sorten besteht, noch zu verstärken (siehe Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19).

Keine signifikanten Wechselwirkungen gibt es zwischen ‚Sorte‘ und ‚Größe‘ (siehe Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 22).

Wechselwirkungen konnten auch zwischen ‚Anbau‘ und ‚Größe‘ bei Dau c 1.01 und Dau c 1.02 (siehe Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25) festgestellt werden. Das heißt, die Abstufung im Allergengehalt, bedingt durch die Probengröße, wird durch die Anbauart bei einzelnen Allergenen zusätzlich beeinflusst.

Abbildung 17: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.01)

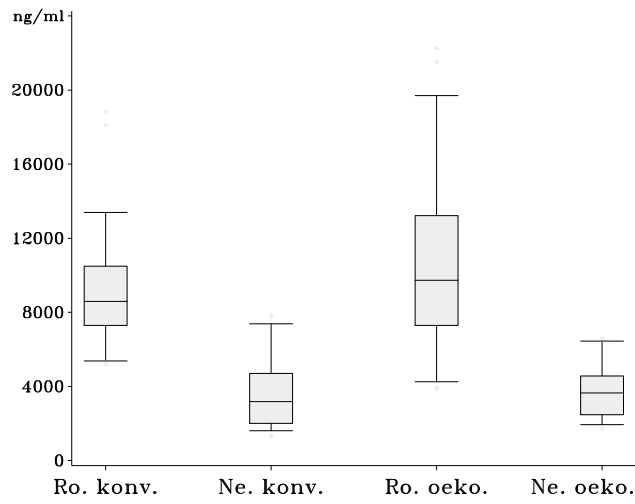


Abbildung 18: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.02)

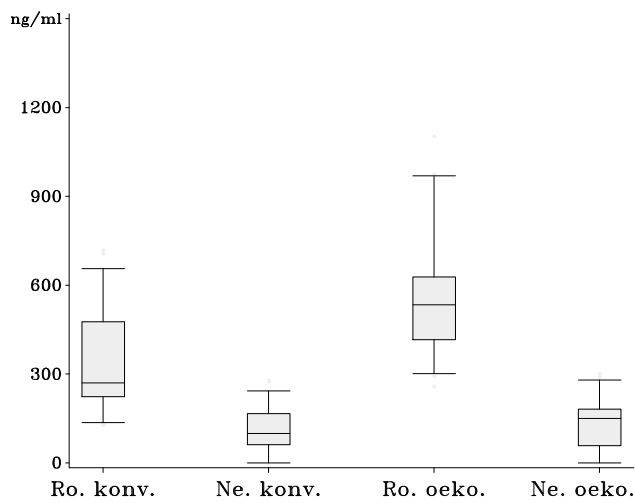


Abbildung 19: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 4)

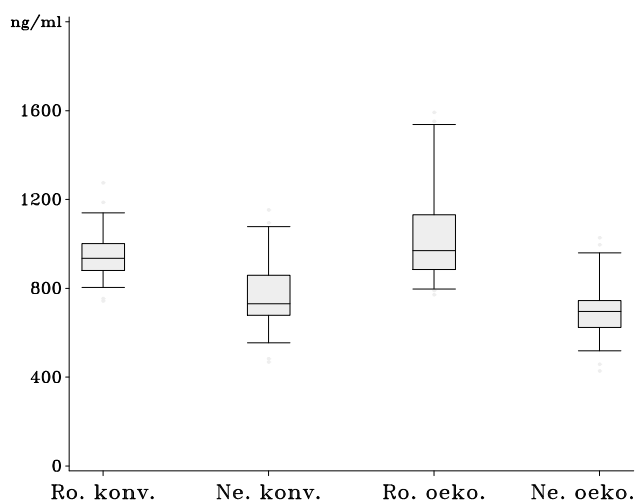


Abbildung 20: Wechselwirkungen Sorte - Probengröße (Dau c 1.01)

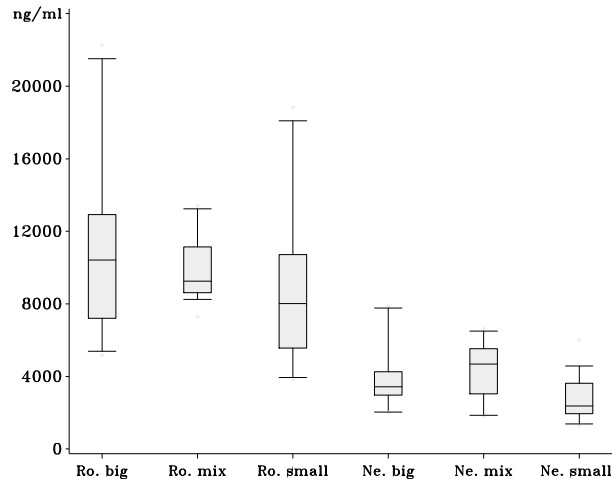


Abbildung 21: Wechselwirkungen Sorte - Probengröße (Dau c 1.02)

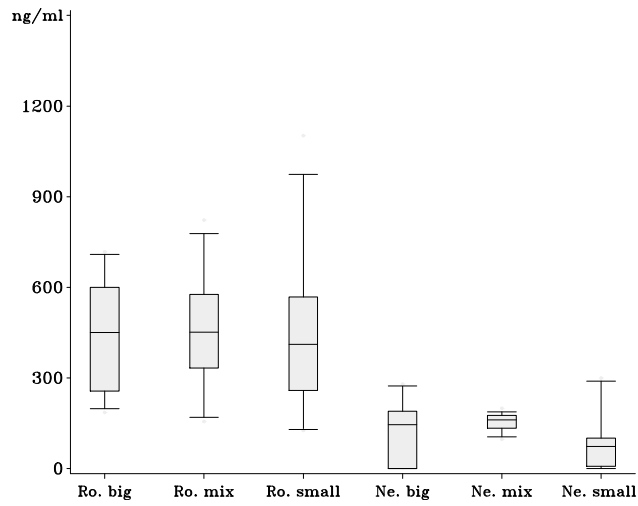


Abbildung 22: Wechselwirkungen Sorte - Probengröße (Dau c 4)

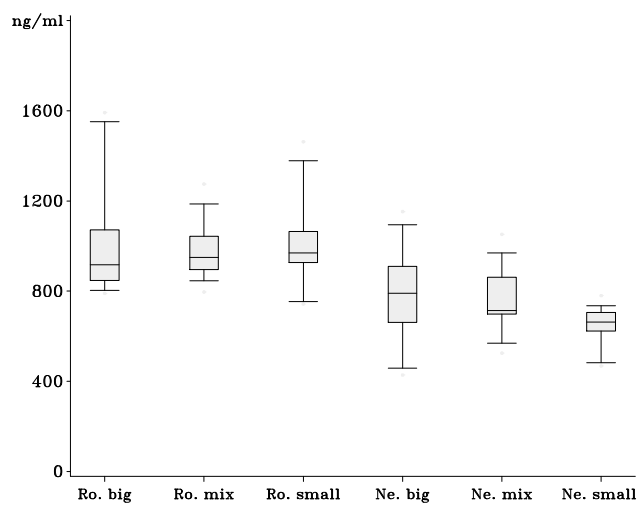


Abbildung 23: Wechselwirkungen Anbauart - Probengröße (Dau c 1.01)

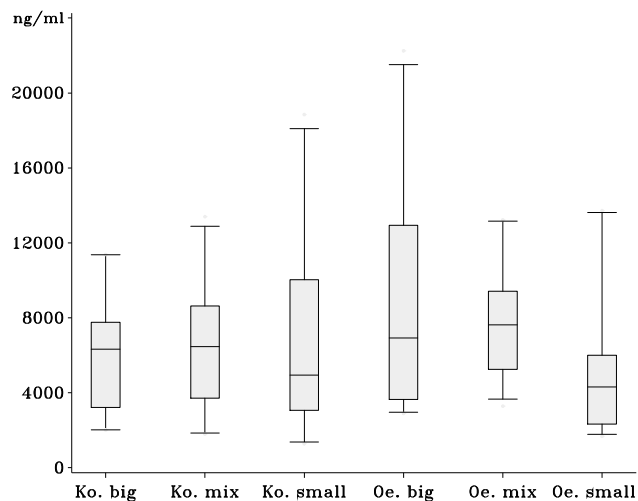


Abbildung 24: Wechselwirkungen Anbauart - Probengröße (Dau c 1.02)

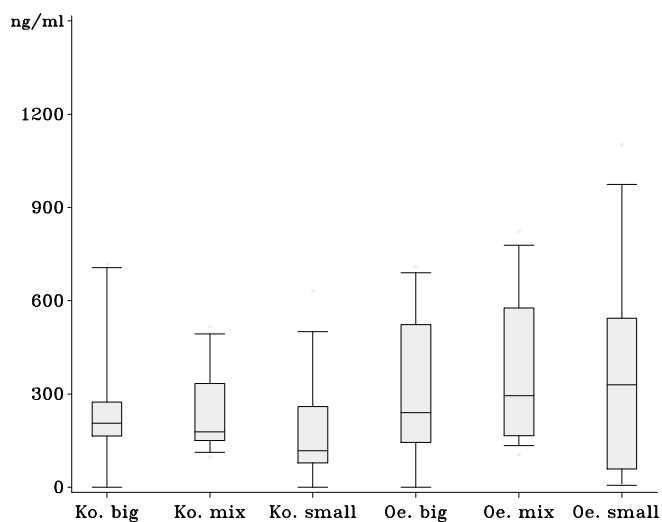
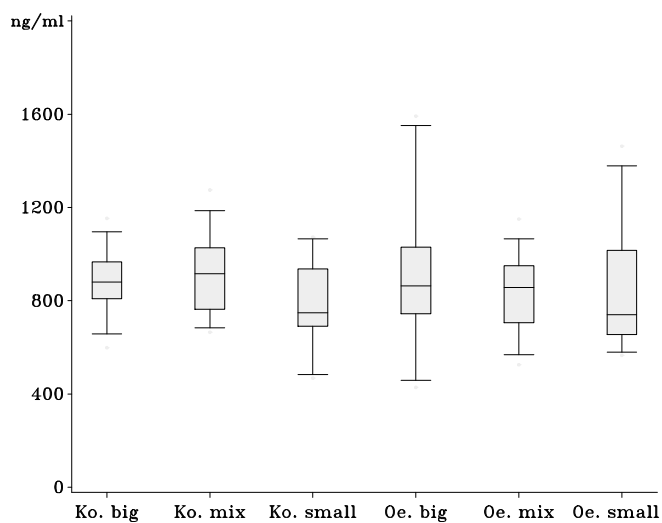


Abbildung 25: Wechselwirkungen Anbauart - Probengröße (Dau c 4)



Weiterhin wurden multiple Vergleiche (Bonferroni-Holm adjustiert) zwischen den verschiedenen Größen der Proben durchgeführt (siehe SAS-Output und Tabelle 14). Dabei verhält es sich so, dass beim Allergen Dau c 1.01 der Allergengehalt der kleinen („small“) Probe signifikant von der gemischten („mix“) bzw. großen („big“) Probe verschieden ist. Bei Dau c 4 gibt es nur zwischen der großen und der kleinen Probe signifikante Unterschiede.

Tabelle 14: Untersuchung der paarweisen Unterschiede zwischen den Probengrößen

Allergen, Wechselwirkung	p-Wert	Bonferroni-Holm adjustiertes Signifikanzniveau α	Testergebnis (ANOVA)
Dau c 1.01			
big vs. small	0.0012	0.0167	signifikant
mix vs. small	0.0090	0.0250	signifikant
big vs. mix	0.5936	0.0500	nicht signifikant
Dau c 1.02			
mix vs. small	0.1925	0.0167	nicht signifikant
big vs. mix	0.3630	0.0250	nicht signifikant
big vs. small	0.6705	0.0500	nicht signifikant
Dau c 4			
big vs. small	0.0036	0.0167	signifikant
mix vs. small	0.1024	0.0250	nicht signifikant
big vs. mix	0.2268	0.0500	nicht signifikant

Inwieweit alle statistisch signifikanten Wechselwirkungen eine Relevanz in der biologischen Aktivität der Möhren oder echte klinische Relevanz haben, muss noch geklärt werden.

3.3.3.2 Feldversuch im Jahr 2006

Der Feldversuch im Jahr 2006 wurde identisch wie der Feldversuch im Jahr 2005 durchgeführt. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse zwischen Einzelproben und Mischproben und der besseren Präzision der quantitativen Ergebnisse der Mischproben im Versuchsjahr 2005, wurden im Feldversuch 2006 nur Mischproben, wie unter 3.3.3.1 beschrieben, analysiert. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der gemittelten Werte der Allergengehalte von Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 zusammengefaßt.

Auf den ersten Blick ist der Gehalt an Dau c 1.01 und Dau c 1.02 in den Untersuchungsproben im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Jahr 2005 deutlich niedriger. Hingegen bleibt der quantifizierte Gehalt von Dau c 4 unabhängig von der gezogenen Möhrenprobe in allen Sorten und bei allen Anbauweisen vergleichbar hoch wie im Jahr 2005. Die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode wurde experimentell bestätigt (Abschnitt 3.3.1.3). Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit in der Quantifizierung mit den ELISA anhand der Kontrollmöhre „Füllhorn“ bestätigt (Abschnitt 3.3.5). Danach waren Schwankungen in den Allergenquantifizierungen in der Kontrollmöhre zwischen den Jahren 2005 und 2006 nur zu 25% (für Dau c 4) bis maximal 50 % (für Dau c 1.01) zu beobachten. Folglich müssen die unterschiedlich quantifizierten Allergengehalte von Dau c 1.01 und Dau c 1.02 in den Vegetationsperioden 2005 und 2006 als hoch signifikant gewertet werden, woraus ein starker Einfluß durch das Anbaujahr resultiert.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen ELISA-Allergenanalytik der Ernteproben im Jahr 2006.

Jahr 2006	Probe	Dau c 1.01			Dau c 1.02			Dau c 4		
		n	µg/100 g	%CV	n	µg/100 g	%CV	n	µg/100 g	%CV
Rodelika, konv.	misch	4	309,5	31	4	26,3	8	4	180,2	18
Nerac, konv.	misch	4	107,4	30	4	2,4	52	4	162,9	15
Rodelika, öko.	misch	4	253,5	38	4	21,4	8	4	153,1	26
Nerac, öko.	misch	4	182,7	12	4	19,8	44	4	163,6	16

Im Folgenden werden die Ergebnisse auf der Basis der quantitativen Allergengehalte der Extrakte statistisch analysiert. Hierbei werden die Ergebnisse aus dem Jahr 2006 denen aus dem Jahr 2005 direkt gegenüber gestellt, um eine bessere grafische Vergleichbarkeit zur erzielen (Abbildungen 26 – 29).

Abbildung 26: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.01), 2005 (links) und 2006 (rechts)

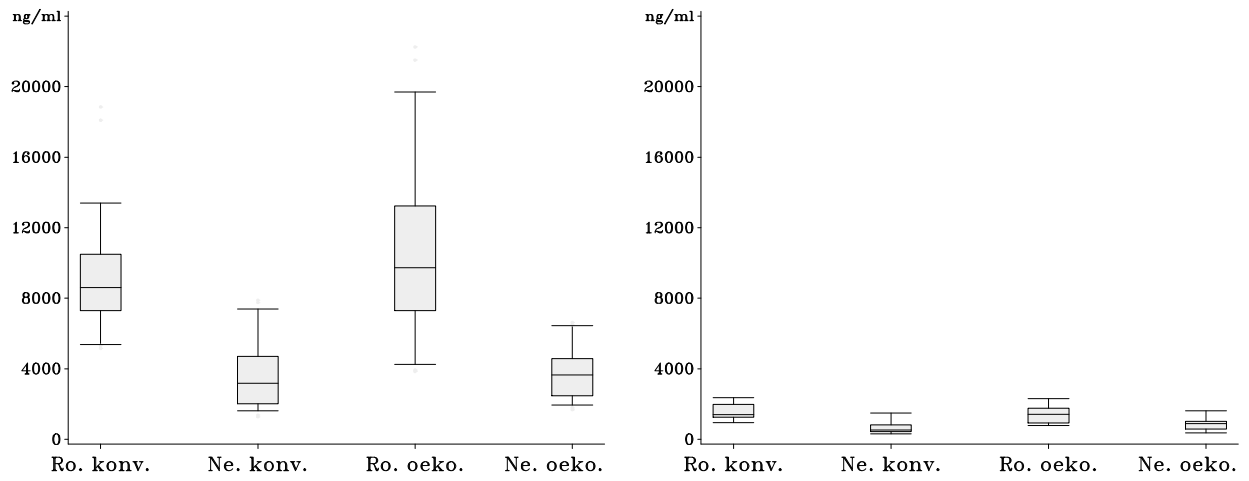


Abbildung 27: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 1.02), 2005 (links) und 2006 (rechts)

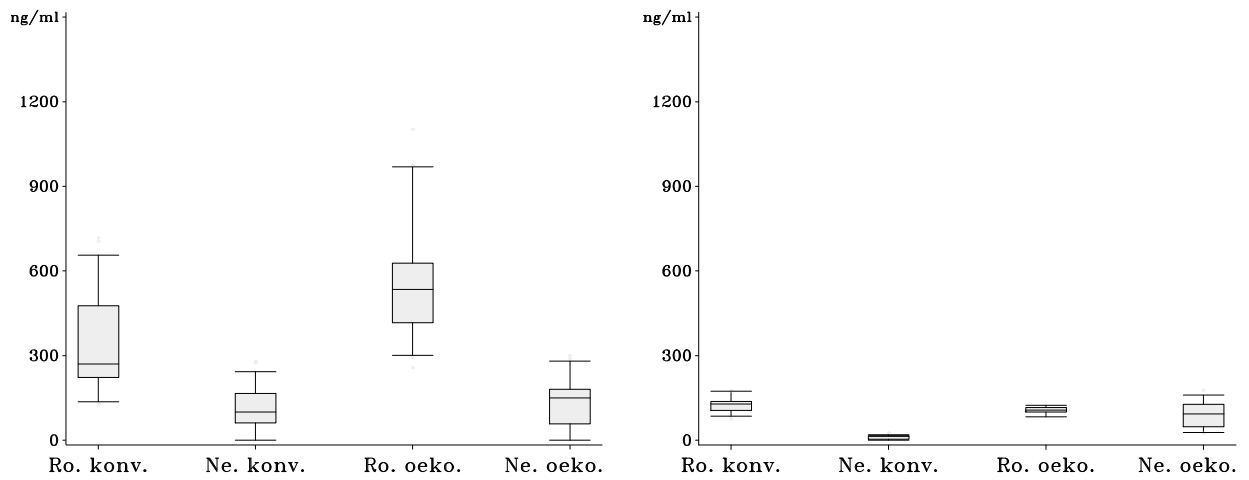


Abbildung 28: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart (Dau c 4), 2005 (links) und 2006 (rechts)

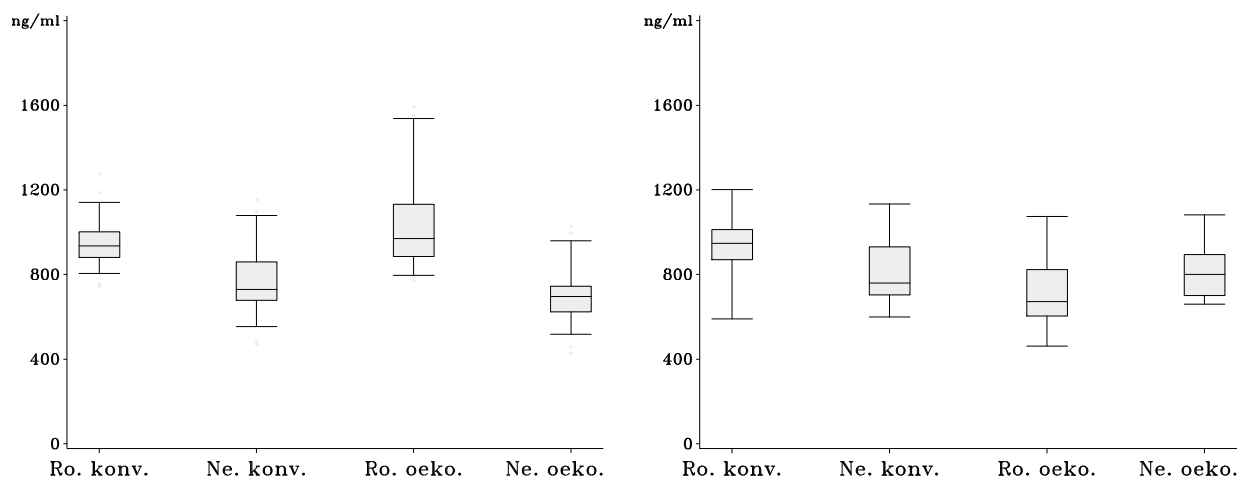
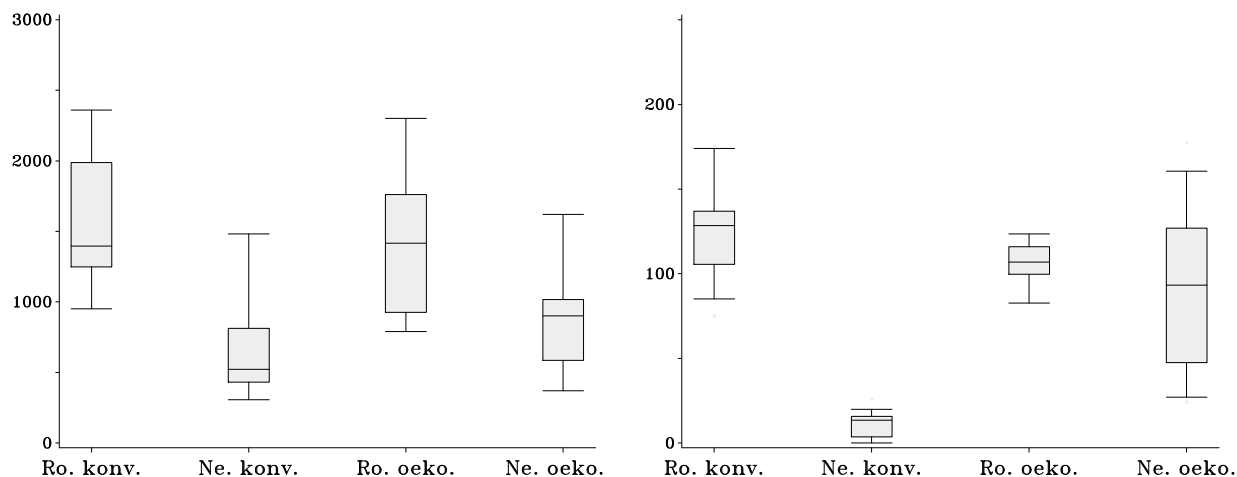


Abbildung 29: Wechselwirkungen Sorte - Anbauart 2006 (Dau c 1.01, links) und (Dau c 1.02, rechts) (gleiche Abbildungen wie oben mit geänderter y-Achsenkalierung)



Die Daten wurden explorativ mit einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiede im Allergengehalt untersucht, bedingt durch die Faktoren ‚Sorte‘ und ‚Anbauart‘ sowie durch Wechselwirkungen zwischen den Faktoren ‚Sorte‘ und ‚Anbauart‘. Die Auswertung erfolgte mit der SAS/STAT Software, Version 9.1. Dabei konnten statistisch signifikante Unterschiede (zum Testniveau $\alpha = 0.05$) zwischen den **Sorten** (‚Nerac‘ und ‚Rodelika‘) bei den Allergenen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 beobachtet werden (siehe SAS-Output), nicht jedoch für Dau c 4 (hier waren 2005 noch signifikante Unterschiede vorhanden). Die **Anbauart** hat bei Allergen Dau c 1.02 einen signifikanten Einfluss ($p=0.0001$) und – im Gegensatz zu 2005 – auch bei Dau c 4 ($p=0.0093$).

3.3.3.3 Zusammenfassung der mittels ELISA quantifizierten Allergengehalte in Abhängigkeit des Feldversuchs (2005 vs. 2006)

Um die mittels ELISA gewonnenen quantitativen Ergebnisse der Gehalte an Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 in Abhängigkeit von Möhrensorte und Anbauweise leichter überblicken zu können, wurden im folgenden die in 100 g Möhre enthaltenen, extrahierbaren und quantifizierbaren Allergengehalte in einer Abbildung gegenübergestellt (Abbildung 30). Hieraus wird deutlich, daß die Gehalte an Dau c 4 zwischen den Sorten und den Anbauweisen sowie Anbaujahren kaum Unterschiede aufweisen. Dies könnte mit der Funktion des Möhrenprofilins Dau c 4 am funktionalen Aufbau der Zellwand und somit der Aufrechterhaltung des zellulären Strukturen zusammenhängen, so daß große Unterschiede zwischen verschiedenen Möhrensorten nicht zu erwarten sind.

Im Gegensatz dazu waren im Gehalt von Dau c 1.01 deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der Sorte und des Anbaujahres, nicht aber durch die Anbauweise erkennbar.

Ähnlich waren Unterschiede im Dau c 1.02 Gehalt von der Sorte und den Anbaujahren abhängig, nicht aber von der Anbauweise.

In Vereinfachung läßt sich zusammenfassen, daß der größte Einfluß auf den Allergengehalt der untersuchten Möhren durch die Vegetationsperiode gegeben war, gefolgt von der Wahl der Sorte und, wenn tatsächlich relevant und nicht nur statistisch signifikant, durch die Art des Anbaus.

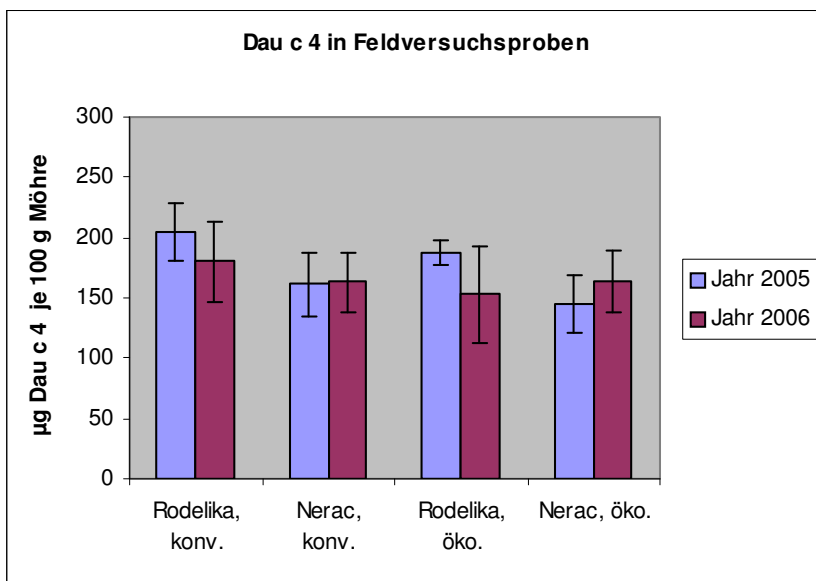
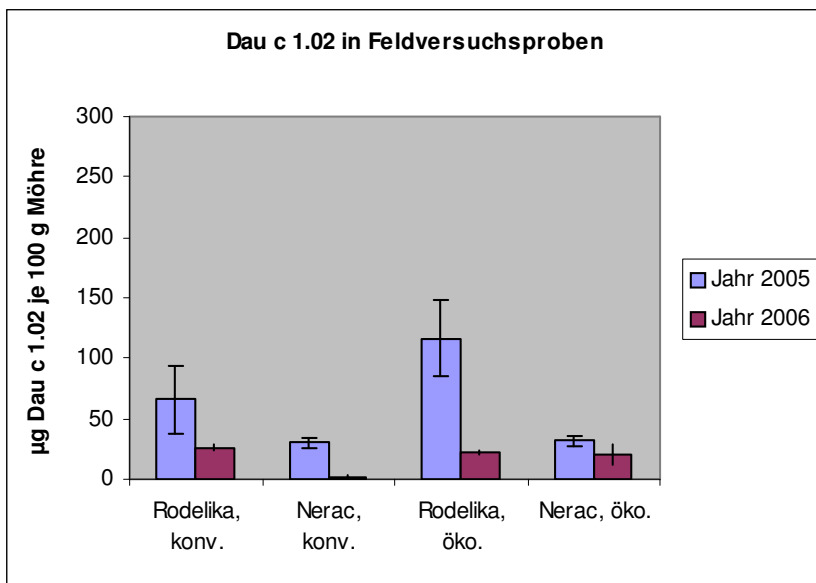
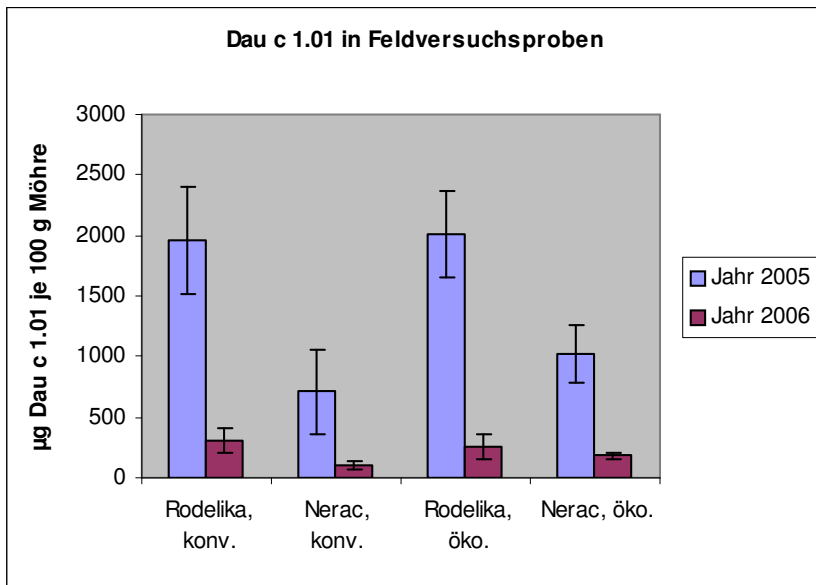


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Allergengehalte an Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 aus beiden Feldversuchen (2005 und 2006) in Abhängigkeit von Sorte und Anbauweise.

3.3.4 in vitro biologische Aktivität der Feldversuchsproben (2005) im RBL-Zell Mediatorfreisetzungstest.

Die im Feldversuch 2005 festgestellten quantitativen Unterschiede in den Allergengehalten Dau c 1.01 und Dau c 1.02 der Untersuchungsproben in Abhängigkeit der Sortenwahl und der Anbaubedingungen wurden im RBL-Zell Mediatorfreisetzungstest auf ihre biologische Aktivität hin, physiologisch wirksame Mediatoren durch Kreuzvernetzung allergenspezifischer IgE Antikörper auf der Oberfläche von Basophilen auszuschütten, überprüft.

Zur Gewinnung muriner Seren mit Dau c 1.01 und Dau c 1.02 spezifischem IgE, wurden Balb/c Mäuse mit den rekombinanten Isoformen des Hauptallergens der Möhre immunisiert. Ratten Basophile Leukämiezellen wurden mit dem 1:25 verdünnten allergenspezifischen Serum passiv sensibilisiert. Danach wurden ausgewählte Allergenextrakte, die jeweils die im Feldversuch 2005 festgestellten Unterschiede im Allergengehalt von Dau c 1.01 und Dau c 1.02 widerspiegeln in Reihenverdünnung auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Aus Vorversuchen war ersichtlich, daß die Möhrenextrakte eine endogene β -Hexosaminidase Aktivität besitzen, die erst ab eine 10^{-3} Verdünnung der Extrakte ausverdünnt werden konnte. Folglich wurden die Extrakte mindestens zu 10^{-3} bis 10^{-7} verdünnt untersucht, um unspezifische Effekte auszuschließen. In Tabelle 16 sind die Extrakte und deren Allergengehalte bei einer 10^{-3} bis 10^{-7} Verdünnung dargestellt.

Die spezifischen Ausschüttungen von β -Hexosaminidase in Abhängigkeit der Extrakte und

Tabelle 16: Allergengehalt ausgewählter Extrakte in Abhängigkeit der Verdünnung

Extrakt Nr.	Probe	Allergengehalt bei 1E-3 bis 1E-7 Verdünnung	
		Dau c 1.01/ml	Dau c 1.02/ml
31	Rodelika, konv.	13 ng - 1,3 pg	0,9 ng - 0,09 pg
67	Nerac, konv.	3,5 ng - 0,35 pg	0,7 ng - 0,07 pg
95	Rodelika, öko.	10 ng - 1,0 pg	1,0 ng - 0,1 pg
146	Nerac, öko.	1,9 ng - 0,2 pg	0,6 ng - 0,06 pg

Extraktverdünnungen ist in Abbildung 31 gezeigt. Demgegenüber steht die β -Hexosaminidase Ausschüttung durch rekombinantes Dau c 1.01, das als Standard parallel untersucht wurde. Ersichtlich ist, daß die quantitativen Unterschiede in den Allergengehalten der Extrakte im biologischen Mediatorfreisetzungstest nicht aufgelöst werden. Alle Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf. Aus den Ergebnissen ist zu vermuten, daß derartige Unterschiede im Allergengehalt physiologisch keine Relevanz besitzen. Allerdings müßte dies zusätzlich klinisch an Möhrenallergikern durch kontrollierte und dosisabhängige Provokationsstudien überprüft werden, um eine abschließende Bewertung vornehmen zu können. Weiterhin wird durch den mengenmäßigen Vergleich von Dau c 1.01 und Dau c 1.02 in den Extrakten und der Lage der

Dau c 1.01 Standardkurve deutlich, daß eine Mediatorfreisetzung in den untersuchten Extrakten im wesentlichen durch den Gehalt an Dau c 1.01 bedingt ist.

Aufgrund der geringen Unterschiede in der biologischen Aktivität der Extrakte, wurden keine weiteren Extrakte aus dem Anbauversuch analysiert.

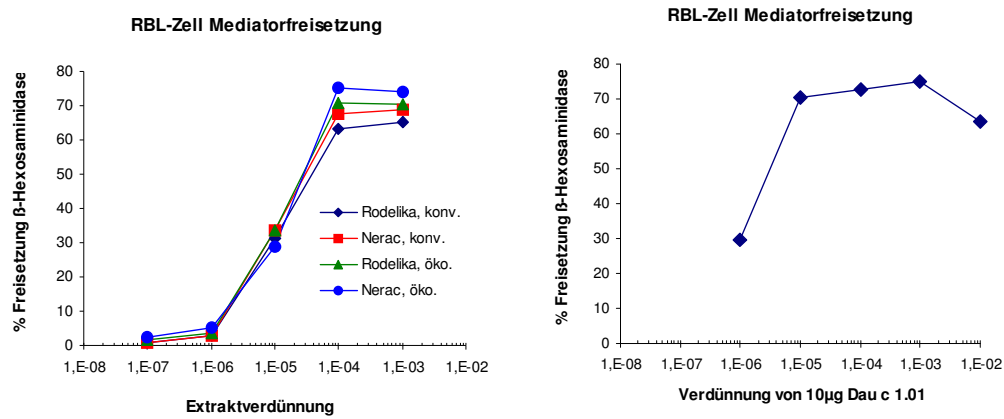


Abbildung 31: Untersuchung der biologischen Aktivität in Abhängigkeit der Sorte und Anbaubedingungen mit Extrakten aus dem Feldversuch 2005 (siehe Tabelle 16)

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen zur Gentranskription

Parallel zu den immunologischen Untersuchungen wurde auf RNA Ebene untersucht, ob Unterschiede in der Transkriptionsaktivität der allergenkodierenden Gene nachweisbar sind. Die Transkriptionsbestimmung erfasst die Zu- bzw. Abnahme von mRNA in Relation zu einem stetig abgelesenen Referenzgen als Maß für die Transkriptionsaktivität des Zielgens (Allergen-Gen). Zunächst wird die aus den Proben isolierte einzelsträngige RNA durch das Enzym reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Daran schließt sich eine PCR (Polymerasekettenreaktion) an, bei welcher die Zielsequenz spezifisch in einer zyklischen Reaktion vermehrt (amplifiziert) wird. Die amplifizierte Zielsequenz (Amplicon) wird in der Real Time PCR während der Reaktion durch einen Farbstoff markiert und der Anstieg in der exponentiellen Phase der Reaktion in jedem Zyklus verfolgt. Der Zyklus, in welchem die Kurve in die exponentielle Phase übergeht, wird als Treshold Cycle (Ct) bezeichnet. Der Ct-Wert ist ein Maß für die Kopienanzahl der Zielsequenz in der Ausgangslösung. Es gilt: je kleiner der Ct-Wert, desto früher der Kurvenanstieg und desto höher die Ausgangskopienzahl im Reaktionsansatz. Das Amplicon kann auch als Endprodukt in einer klassischen Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden (eine praxisnahe Einführung in die PCR ist z.B. in [21] zu finden). Basierend auf dem beschriebenen Prinzip wurden reverse Transkriptase real time PCR Systeme (qRT real time PCR) für die Allergenisoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 entwickelt und für die analytische Fragestellung optimiert. Auf die Entwicklung eines qRT real time PCR Systems für die Bestimmung der Transkriptionsraten für das Gen Dau c 4 wurde verzichtet, da die immunologischen Untersuchungen auf eine gleichmäßige Expression in allen Proben hinweisen (s. Abschnitt 3.3.3.3; Abb. 30) und somit auch keine wesentlichen Unterschiede im Transkriptionslevel zu vermuten sind.

3.4.1 Entwicklung von qRT-real time PCR Systeme zum mRNA Nachweis der Isoformen Dau c 1.01 und der Isoform Dau c 1.02 des Möhrenhauptallergens Dau c 1

Für den Dau c 1.01 Nachweis wurden auf Basis veröffentlichter DNA-Sequenzen (Tab. 4, Abschnitt 2.7.5) verschiedene Primersysteme entwickelt. Das für die Projektproben eingesetzte RT real time PCR System (PCR Bedingungen s. Abschnitt 2.7.7), nachfolgend vereinfacht als „Dau c 1.01“-System bezeichnet, detektiert mit dem Primerpaar Dau c EL2f / Dau c 1.01 r2 alle fünf bekannten Gen-Varianten (Dau c 1.0101-1.0105) des Hauptallergens und ist somit ein Konsenssystem für das Gen Dau c 1.01. Das gewählte Primersystem überspannt eine Splicing-Site. Durch die Auswahl der Primer kann die Vervielfältigung genomischer DNA,

welche eventuell als Kontamination in der RNA-Präparation präsent ist, von der in der PCR amplifizierten cDNA unterschieden werden (Abbildung 32).

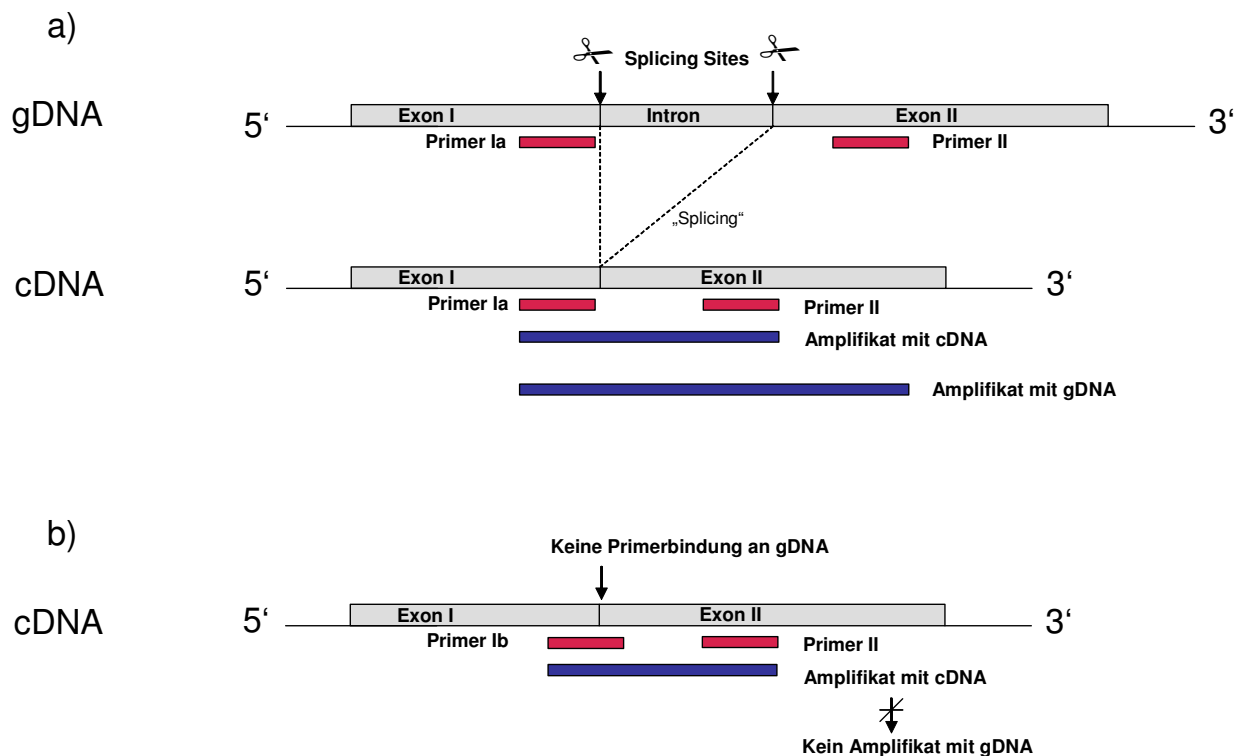


Abbildung 32: (a) Diskriminierung genomischer DNA von cDNA durch Lage eines Primers (Primer Ia) vor der Splicing-Site. Mit genomischer DNA als Target, entsteht in der PCR ein um die Intronlänge größeres Amplicon als in der PCR mit cDNA. (b) Primer Ib überspannt die Splicing-Site und bindet in Exon I und II. Mit genomischer DNA würde daher kein Amplicat erzielt.

Das typische Ergebnis einer konventionellen PCR mit dem RT-real time PCR System Dau c c_Elf / Dau c10101-r nach Auftrennung der PCR-Produkte (Amplicate) in einer Agarosegelelektrophorese ist in Abbildung 33 dargestellt. Das für das Gen Dau c 1.01 spezifische Primersystem umschließt ein Intron, das nach dem Spleißing in der cDNA nicht mehr vorhanden ist. Unter Einsatz von revers transkribierter RNA (cDNA), die zuvor aus Möhrengewebe isoliert wurde, erhält man mit dem Primerpaar eine Bande von ca. 217 bp Größe während bei Einsatz genomischer DNA mit diesem Primersystem in der PCR ein größeres Produkt von ca. 348 bp resultiert. Bei Einsatz dieses Systems kann man also erkennen, ob die in die PCR eingesetzte und in cDNA umgeschriebene mRNA frei von amplifikationsfähigen DNA-Verunreinigungen war und somit zwischen cDN und genomischer DNA diskriminieren. Im weiteren Verlauf der Systemoptimierung wurde mit dem modifizierten „forward“ Primer Dau c Elf2f ein an die Splicing-Site (im Exon) bindender Primer entwickelt. In Kombination mit dem reversen Primer Dau c 1.01r2 ergibt dieses Primerpaar in der PCR ein gewünschtes kürzeres Amplicat von 133 bp Länge. Theoretisch würde mit diesem System kontaminierende DNA nicht amplifiziert, da das Primerpaar Dau c Elf2f / Dau c 1.01r2

ausschließlich an cDNA bindet. Es zeigte sich jedoch bei der RNA Präparation, daß auf einen zusätzlichen DNAase-I-Verdauungsschritt und weitere Aufreinigungen nicht verzichtet werden konnte, um die Extraktionsausbeute von RNA zu erhöhen.

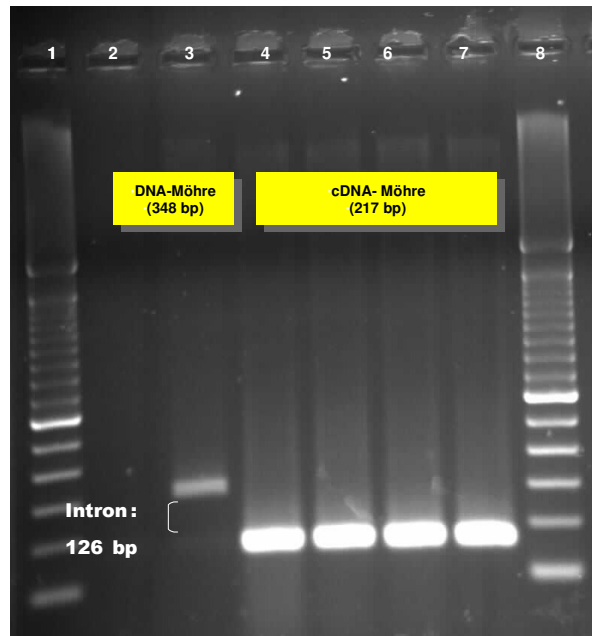


Abbildung 33: Fotografie eines Elektrophoresegeles nach Auftrennung der ethidiumbromid-markierten PCR-Produkte nach RT real time PCR mit dem eine Splicing-Site flankierenden Primersystem Dau c c_Elf / Dauc10101-r. Lane 1, 8: Größenstandards, 2: Non-Template Control mit H₂O anstatt DNA im PCR-Ansatz, 3: PCR-Produkt erzielt mit genomischer DNA aus Möhre, 4-7: PCR-Produkt erzielt mit cDNA aus Möhre.

Der charakteristische Reaktionsverlauf in der real time PCR mit dem Nachweissystem Dau c 1.01 von aus Möhrengewebe isolierter RNA nach reverser Transkription ist in Abbildung 34 anhand der Reaktionskurven (Amplification Plots) und Regressionsgerade dargestellt. Der Lauf zeigt beispielhaft ein Experiment aus der System-Validierung. Hierzu wurde in die RT PCR eine 1:10 Verdünnungsreihe der RNA eingesetzt. Die resultierende Regressionsgerade ergibt sich aus dem Logarithmus der Ausgangsmenge an Ziel-cDNA aufgetragen gegen den Ct-Wert. Bei einer Effizienz der PCR von 100% wäre theoretisch pro Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt zu erwarten (d.h. nach 3,333 Zyklen würde die zehnfache Ausgangsmenge der Zielsequenz vorliegen). Die Steigung der Regressionsgeraden als Maß für die Effizienz ($=10^{(-1/\text{Steigung})}$) des hier verwendeten Systems (Abb. 16) zeigt eine sehr gute Annäherung an den Idealwert. Die Sensitivität des Systems Dau c 1.01 lag bei 10^{-5} ng RNA (eingesetzt in die PCR). Da das System ausschließlich zum Einsatz an reinem Möhrenmaterial und nicht in

Abschlussbericht BÖL, Projekt 03OE249

Mischprodukten bestimmt ist, konnte auf weitere Spezifitätstestungen mit Pflanzenmaterial verzichtet werden.

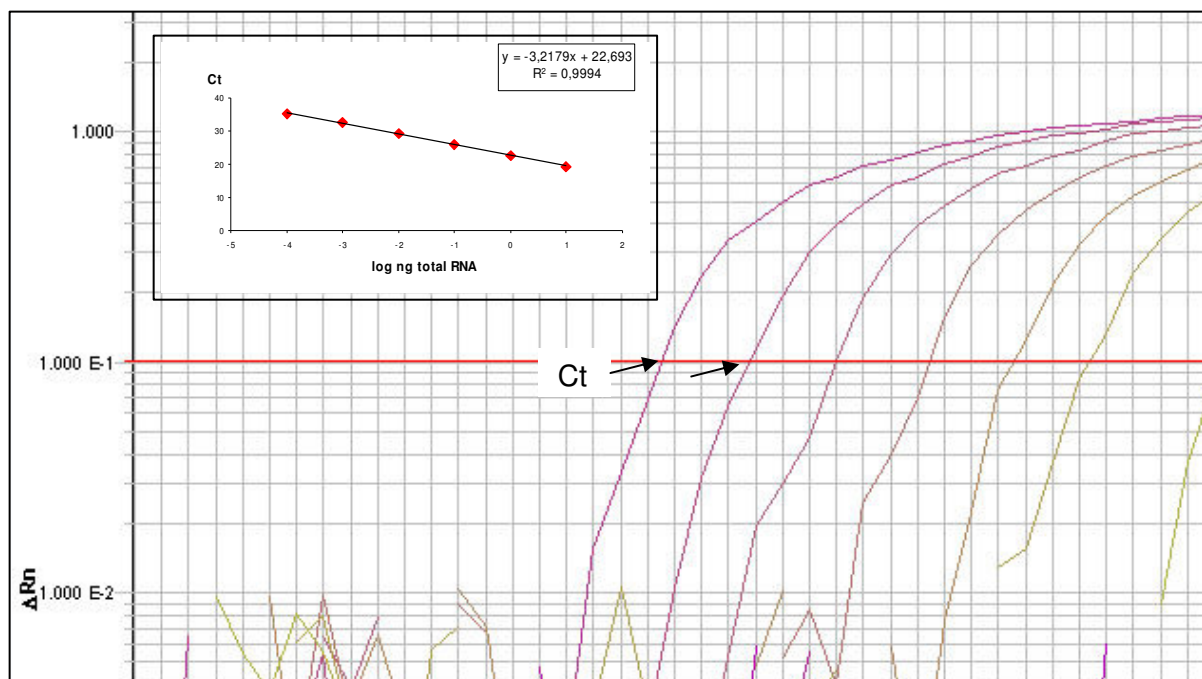


Abbildung 34: Amplification Plots einer 1:10 Verdünnungsreihe von in die RT PCR eingesetzter RNA und Regressionsgerade für das Nachweissystem Dau c 1.01 (Primer Dau c EI2f / Dau c 1.01 r)

Das auf Basis GenBank-publizierter Sequenzen entwickelte real time PCR System „Dau c 1.02“ (PCR-Bedingungen s. Abschnitt 2.7.7) detektiert spezifisch die Allergen-Isoform Dau c 1.02. Dabei wurde die von Hoffmann-Sommergruber et al. (1997) [22] in der Familie der *Apiaceae* vermutete Splicing-Site im Codon 62 für Möhren erstmalig sequenziert und bestätigt. Wie für das System „Dau c 1.01“ lassen sich in der klassischen PCR sowohl mit genomischer als auch mit cDNA aus Möhre PCR-Produkte nachweisen (Abbildung 35).

Im Rahmen der Systemvalidierung wurde die Effizienz und Sensitivität des Systems Dau c 1.02 mittels Verdünnungsreihen mit aus Möhre isolierter RNA in der PCR bestimmt. Die Sensitivität des Systems Dau c 1.02 ist gegenüber dem System Dau c 1.01 um ca. zwei Zehnerpotenzen niedriger. Die Effizienz beider Systeme wurde mittels Verdünnungsreihen bestimmt (Tabelle 30, Abschnitt 3.4.6)

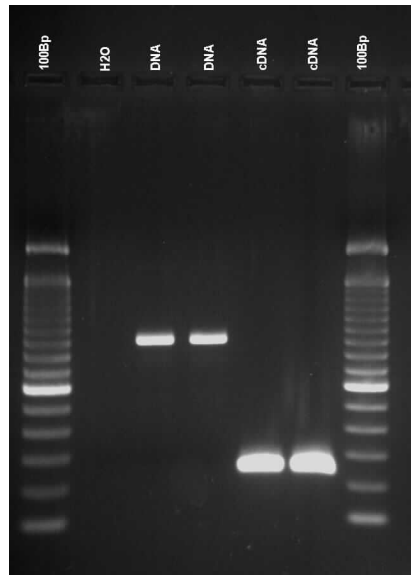


Abbildung 35: Fotografie eines Agarosegels nach Auftrennung der ethidiumbromid-markierten PCR-Produkte nach RT real time PCR von transkribierter Möhren-DNA mit dem eine Splicing Site flankierenden Primersystem Dauc c 1.02f3 / A. Mit cDNA entsteht ein Amplicon von < 300 bp, mit genomischer Möhren-DNA ein > 900 bp großes PCR-Produkt

3.4.2 Entwicklung und Auswahl eines Referenzsystems (Housekeeping Gene)

Bei der Ermittlung der relativen Expressionsraten (z.B. nach Livak und Schmittgen, 2001) [23] wird zur Bestimmung der Transkriptionslevel der Allergen-kodierenden Gene eine endogene Kontrolle zur Normalisierung der Werte benötigt. Als endogene Kontrollen eignen sich „Housekeeping Gene“ (HKG), welche in allen Geweben konstitutiv (stetig) abgelesen werden. Als Kriterium für deren Auswahl wurde neben einer möglichst beständigen Transkription in verschiedenen Möhrengeweben eine mit dem Zielgen vergleichbare Effizienz in der PCR Effizienz vorausgesetzt. Zur Auswahl eines geeigneten HKG wurden sieben verschiedene Gene untersucht, die in der Literatur als gleichmäßig transkribierte Gene beschrieben sind. Hierbei handelte es sich um die Gene für: GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), 18S rRNA, Actin, Ubiquitin, Tubulin, Ribosomales Protein S10 und Ribosomales Protein S15a. Für alle Gensequenzen wurden Primerpaare und PCR-Systeme auf Basis der veröffentlichten Sequenzen (s. Abschnitt 2.7.5, Tab. 5, und 2.7.7) generiert und die Effizienzen in der PCR mittels Verdünnungsreihen bestimmt. Mit allen PCR-Systemen wurden Amplifikate mit Möhrenproben erhalten. Des Weiteren konnte an isolierten Gewebeteilen (Schale, Speichergewebe, Zentralzylinder) aus der Möhrenwurzel für alle Systeme der konstitutive Charakter bestätigt werden (Anhang 4).

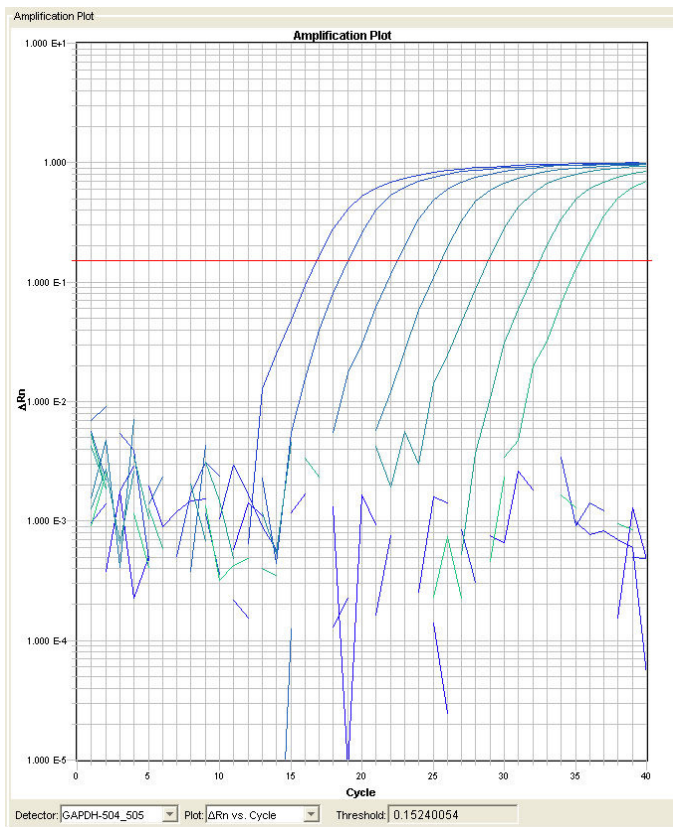


Abbildung 36: Amplification Plots einer 1:10 Verdünnungsreihe von in die RT PCR eingesetzter RNA mit dem Nachweissystem „GAPDH“

Im Verlauf der Systemoptimierung erwiesen sich für die Untersuchung an Möhrengewebe die RT real time PCR Systeme für die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase) kodierenden Gene, Actin und das ribosomale Protein S15a besonders gut geeignet. Da jedoch beim GAPDH Gen, im Gegensatz zum ribosomalen Protein S15a, die Möglichkeit bestand, ein Splicing site überspannendes Primer-System zu entwickeln, wurde schließlich das GAPDH-System mit dem Primerpaar Dau c GAPDH-f5 / Dau c GAPDhr (Abschnitt 2.7.7) für den Einsatz als Housekeeping Gen favorisiert (Abbildung 36). Das entwickelte Actin real time PCR System wurde standardmäßig eingesetzt, um die Extrakte auf DNA-Freiheit zu testen.

3.4.3 Ergebnisse der qRT-real time PCR Messungen für die Vegetationsperiode 2005

Von allen Proben wurde wie in den Abschnitten 2.7.1 – 2.7.5 beschrieben die Gesamt-RNA isoliert, von DNA-Kontaminationen gereinigt, in cDNA umgeschrieben und die qRT-real time PCR Messungen mit den Systemen Dau c 1.01 / Dau c 1.02 sowie GAPDH (auf jeweils einer Mikrotiterplatte) durchgeführt. Die ermittelten Ct-Werte sind ein Maß für die ursprüngliche Menge an Zielgenen in der Probe. Es gilt: je niedriger der Ct-Wert desto höher der

Ausgangsgehalt an Zielgen in der Probe. Die Ct-Werte (Rohdaten) für alle untersuchten Ernteproben sind in den Datenblättern im Anhang 5 (a-d) dokumentiert.

Da allen Untersuchungen eine identische Einsatzmenge von 10 ng RNA bei vergleichbaren PCR-Effizienzen zugrunde lag, können die Ct-Werte direkt miteinander verglichen werden.

3.4.3.1 Transkription des Gens Dau c 1.01 und Dau c 1.02 – Ernte 2005

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse für die Ernte 2005 für das Nachweissystem Dau c 1.01 im Vergleich zum HKG (GAPDH) grafisch dargestellt. Die Differenzen der Ct Werte (Zielgen – HKG) für die Ernteproben des Jahres 2005 sind in der Tabelle 17 zusammengefaßt.

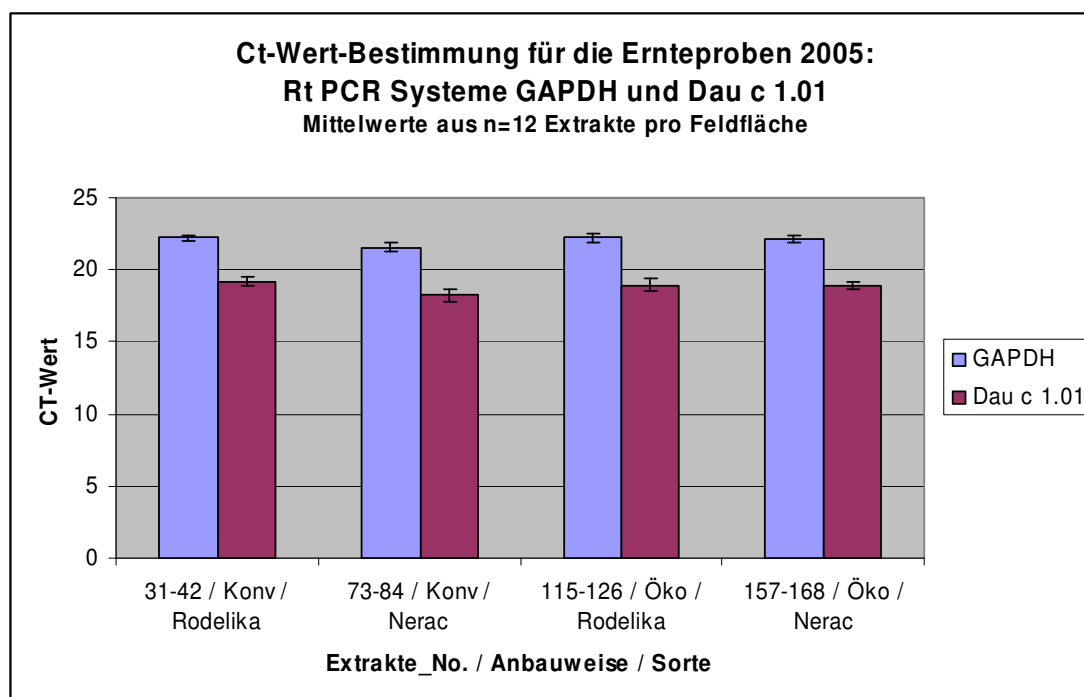


Abbildung 37: Ct-Werte (Mittelwerte aus n=12 Extrakte) für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.01, Ernteproben 2005

Tabelle 17: Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.01 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2005

Anbaufläche	GAPDH*	STAW GAPDH	Dau c 1.01*	STAW Dau c 1.01	Delta Ct: Dau c 1.01 - GAPDH-
Rodelika, konv.	22,23	0,22	19,21	0,27	-3,02
Nerac, konv.	21,56	0,31	18,24	0,43	-3,32
Rodelika, öko.	22,23	0,29	18,94	0,43	-3,28
Nerac, öko.	22,15	0,24	18,93	0,29	-3,22

*Mittelwerte aus n=12 Extrakte

Das Säulendiagramm (Abb. 37) bildet die Ct-Messwerte auf den vier Versuchsfeldern (ökologisch / konventionell / Rodelika / Nerac) ab. Für das System GAPDH läßt sich für alle Versuchfelder und beide Sorten ein vergleichbarer Ct-Wert für die untersuchten Proben feststellen. Für das System Dau c 1.01 ergab sich in der Ernte 2005 für alle Anbaubedingungen

und Sorten verglichen mit dem HKG-System ein ähnliches Bild, jedoch lagen die Ct-Werte im Mittel um ca. drei Ct-Werte unter den HKG-Werten. Dies bedeutet, daß gegenüber dem HKG das Gen Dau c 1.01 deutlich stärker exprimiert wurde. Auffällige Unterschiede zwischen Sorten oder Anbauweise bezüglich des Transkriptionslevels von Dau c 1.01 lassen sich anhand der Grafik und der Ct-Wert Differenzen (Tab. 17) zunächst nicht feststellen.

3.4.3.2 Transkription des Gens Dau c 1.02 – Ernte 2005

Die Ergebnisse für das System Dau c 1.02 sind in Abbildung 38 dargestellt. Deutlich lagen die Ct-Werte von Nerac auf beiden Anbauflächen höher als die für Rodelika gemessenen Werte, was auf eine geringere Expression von Dau c 1.02 in Nerac gegenüber Rodelika hinweist und zwar unabhängig von der Art des Anbaus. Für Rodelika lagen demgegenüber die Ct-Werte und damit Expressionslevel für beide Anbauvarianten konstant im Bereich des HKG (Tabelle 18).

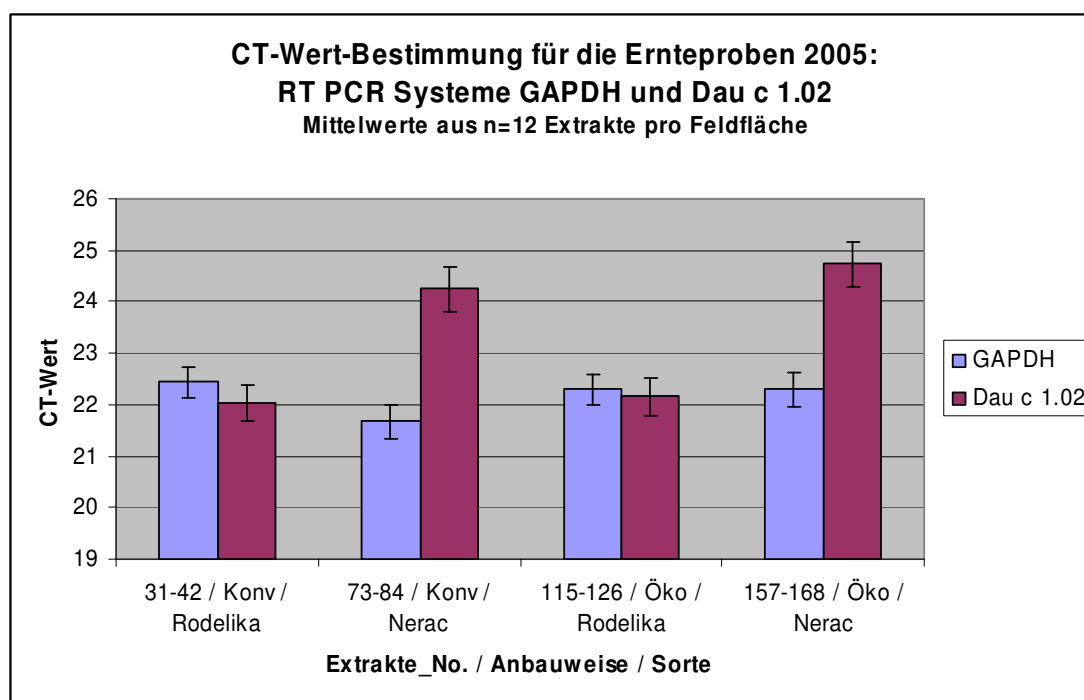


Abbildung 38: Ct-Werte (Mittelwerte aus n=12 Extrakte) für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.02, Ernteproben 2005

Tabelle 18: Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.02 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2005

Anbaufläche	GAPDH*	STAW GAPDH	Dau c 1.02*	STAW Dau c 1.02	Delta Ct Dau c 1.02 - GAPDH
Rodelika, konv.	22,43	0,29	22,03	0,34	-0,4
Nerac, konv.	21,67	0,34	24,25	0,44	2,57
Rodelika, öko.	22,29	0,29	22,16	0,36	-0,13
Nerac, öko.	22,29	0,33	24,73	0,43	2,44

*Mittelwerte aus n=12 Extrakte

3.4.4 Ergebnisse der qRT-real time PCR Messungen für die Vegetationsperiode 2006

3.4.4.1 Transkription des Gens Dau c 1.01 – Ernte 2006

Die Auswertung für die Ernteproben des Jahres 2006 ist in Abbildung 39 und in der Tabelle 19 dargestellt.

Zunächst ist festzustellen, daß die Ct-Werte für die Ernteproben 2006 durchschnittlich höher liegen, als in der Saison 2005 und zwar grob um drei Ct-Werte. Dieser Effekt tritt bei allen Proben auf und könnte sowohl auf eine systematische, apparativ bedingte Abweichung bei der Messung als auch auf einen gegenüber dem Jahr 2005 zum Erntezeitpunkt anderen physiologischen Zustand der Möhrenwurzeln hinweisen. Die Daten von zwei Vegetationsperioden reichen jedoch nicht aus, um die Ursache abschließend zu beurteilen. Da der Ct-Schift bei allen Systemen gleichmäßig auftritt, wird das Verhältnis von HKG zu Zielgenen nicht beeinflusst. Wie im Jahr 2005 sind auch für das Jahr 2006 um ca. drei Ct-Werte niedrigere Werte für das System Dau c 1.01 gegenüber GAPDH bei beiden Sorten unabhängig von der Anbauweise zu verzeichnen (Abb. 39).

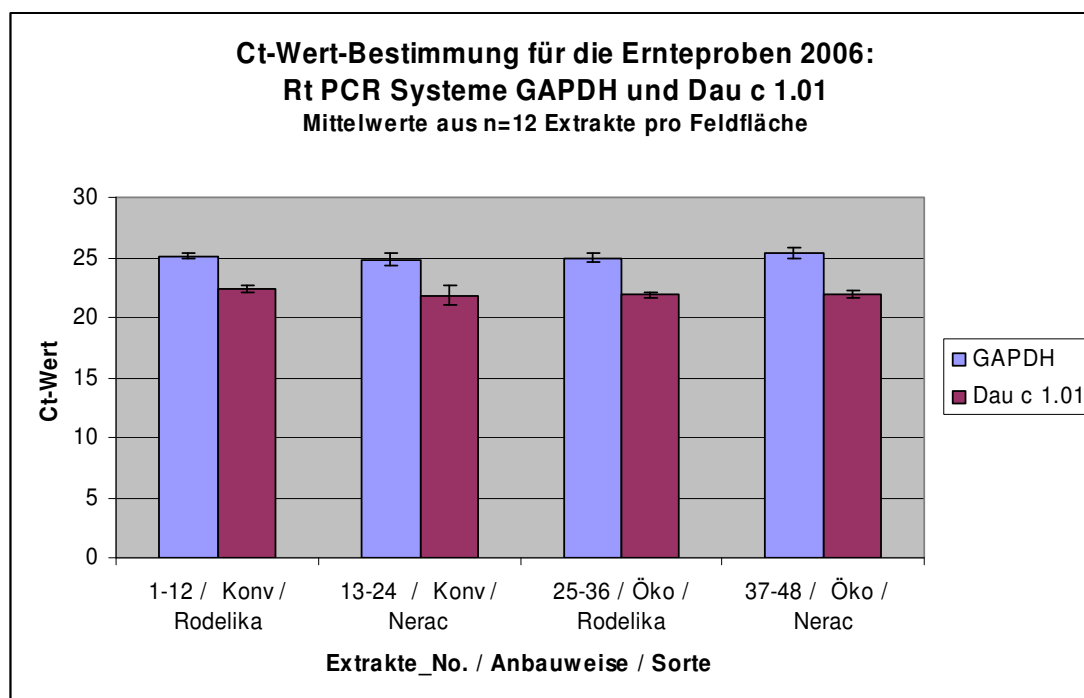


Abbildung 39: Ct-Werte für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.01, Ernteproben 2006. 12 Extrakte wurden aus vier Mischproben pro Feldfläche gewonnen.

Tabelle 19: Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.01 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2006

Anbaufläche	GAPDH*	STAW GAPDH	Dau c 1.01*	STAW Dau c 1.01	Delta Ct Dau c 1.01 - GAPDH
Rodelika, konv.	25,13	0,27	22,42	0,26	-2,71
Nerac, konv.	24,84	0,56	21,84	0,80	-3,01
Rodelika, öko.	25,00	0,39	21,93	0,22	-3,00
Nerac, öko.	25,35	0,40	21,97	0,34	-3,38

*Mittelwerte aus n=12 Extrakte

3.4.4.2 Transkription des Gens Dau c 1.02 – Ernte 2006

Die Auswertung der Daten für die Ernteproben des Jahres 2006 ist in Abbildung 40 und in der Tabelle 20 dargestellt.

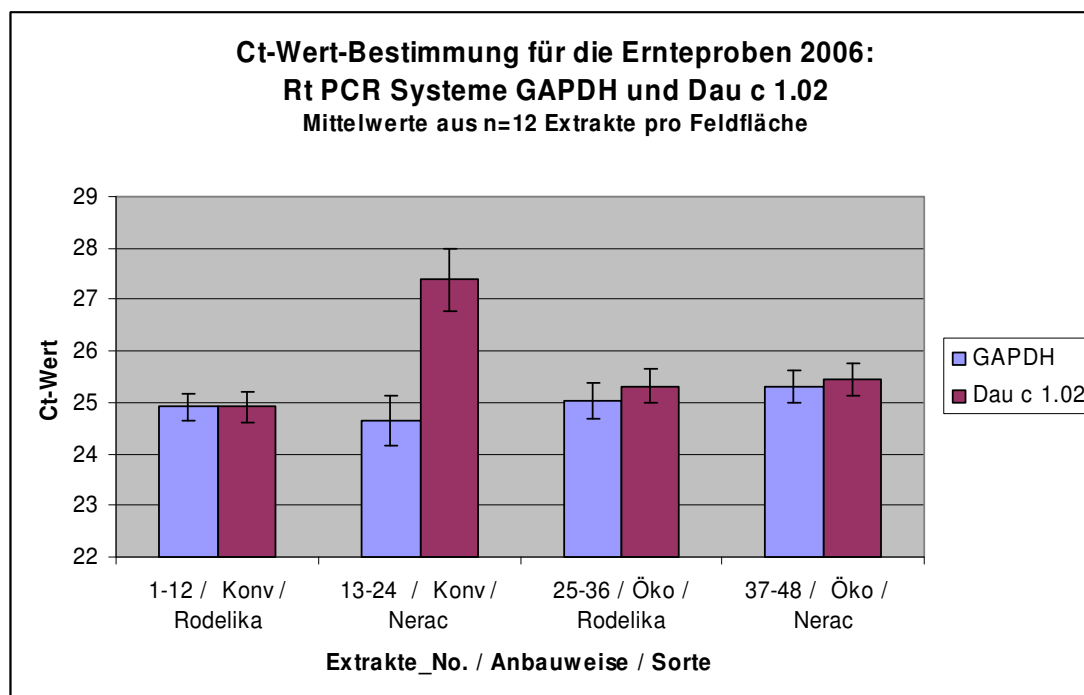


Abbildung 40: Ct-Werte für die Nachweissysteme GAPDH und Dau c 1.01, Ernteproben 2006. 12 Extrakte wurden aus vier Mischproben pro Feldfläche gewonnen.

Tabelle 20: Delta Ct-Werte (Ct Dau c 1.02 – Ct GAPDH) für die Ernteproben 2006

Anbaufläche	GAPDH*	STAW GAPDH	Dau c 1.02*	STAW Dau c 1.02	Delta Ct GAPDH- Dau c 1.02
Rodelika, konv.	24,92	0,27	24,91	0,30	-0,01
Nerac, konv.	24,65	0,50	27,39	0,62	2,71
Rodelika, öko.	25,05	0,35	25,32	0,35	0,28
Nerac, öko.	25,31	0,31	25,45	0,31	0,14

*Mittelwerte aus n=12 Extrakte

Für die Sorte Rodelika ergaben sich im Jahr 2006 verglichen mit dem Jahr 2005 für das System Dau c 1.02 ein identischer Verlauf der Werte ohne einen offensichtlichen Einfluß der Abauweise. Ein abweichendes Ergebnis zwischen den Jahren 2005 und 2006 zeigen allerdings die Daten für Nerac. Für die Sorte Nerac auf der ökologisch bewirtschafteten Fläche wurden im Jahr 2005 durchschnittlich deutlich niedrigere Ct-Werte als im Jahr 2006 gemessen, d.h. auf dieser Fläche war das Transkriptionslevel gegenüber dem HKG (und im Vergleich mit dem Jahr 2005) erhöht. Das Transkriptionslevel von Nerac auf der konventionellen Flächen entsprach demgegenüber im Jahr 2006 dem Vorjahr.

Insgesamt kann für die Ct-Werte für HKG und Zielgene der untersuchten Proben in beiden Anbaujahren getrennt nach Sorten und Flächen eine lineare Korrelation festgestellt werden (d. h. Werteschwankungen von Analyse zu Analyse laufen für Ziel- wie Referenzsystem synchron), die sich mathematisch in den Korrelationskoeffizienten nach Pearson – wie am Beispiel des Jahres 2005 gezeigt (Tabelle 21) – widerspiegelt und sich grafisch durch die parallel verlaufenden Trendlinien darstellen läßt (Beispiel, Abbildung 41). Dieses Ergebnis unterstreicht die Vergleichbarkeit der Effizienzen beider PCR Systeme.

Tabelle 21: Korrelation der Meßwerte (n = 24) für die Systeme GAPDH und Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02 (Ernte 2005 / pro Parzelle)

Parzelle	Korrelationskoeffizient nach Pearson (GAPDH / Dau c 1.01)	Interpretation:
Konventionell Rodelika	0,678	moderate bis gute Korrelation
Konventionell Nerac	0,873	sehr gute Korrelation
Ökologisch Rodelika	0,898	sehr gute Korrelation
Ökologisch Nerac	0,756	gute Korrelation
Parzelle	Korrelationskoeffizient nach Pearson (GAPDH / Dau c 1.02)	Interpretation:
Konventionell Rodelika	0,818	sehr gute Korrelation
Konventionell Nerac	0,673	moderate bis gute Korrelation
Ökologisch Rodelika	0,765	sehr gute Korrelation
Ökologisch Nerac	0,521	moderate bis gute Korrelation

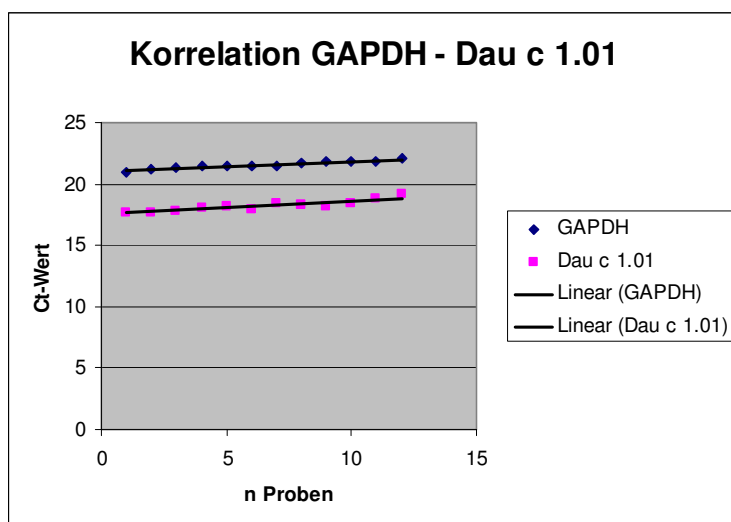


Abbildung 41: Korrelation der Ct-Werte für die Systeme GAPDH mit Dau c 1.01 für 12 Extrakte (No. 73 – 84) auf der Fläche Nerac, konv. Die Ct-Wertepaare (Dau c 1.01 / GAPDH) wurden nach aufsteigendem Wert geordnet.

3.4.5 Statistische Analyse

Zur Ermittlung der Signifikanz der Ergebnisse sind im Folgenden die um den CT-Wert für das HKG normalisierten Werte (Δ Ct-Werte) für jede Saison statistisch ausgewertet (Tabelle 22 a und b) (allgemeine Erläuterungen zur statistischen Auswertung und zur Interpretation der Boxplots s. Anhang 6).

Der delta Ct-Wert ergibt sich aus der Differenz:

$$\text{Ct-Wert Zielgen (Dau c 1.01 oder Dau c 1.02)} - \text{Ct-Wert HKG (GAPDH)}$$

3.4.5.1 Transkription des Dau c 1.01 Gens – Ernteproben 2005

Die Daten wurden mit der univariaten Varianzanalyse auf Unterschiede in der Transkriptionsaktivität für das Gen Dau c 1.01 untersucht. Es wurde der Einfluss der Faktoren 'Anbauart' und 'Möhrensorte' und die Wechselwirkung zwischen beiden analysiert.

Dabei konnten insgesamt statistisch signifikante Unterschiede (Testniveau $\alpha=0,05$) zwischen den beiden Möhrensorten festgestellt werden ($p<0,05$). D. h. die Delta Ct-Wert Differenz wies eine stärkere Transkription des Gens Dau c 1.01 in der Sorte Nerac gegenüber Rodelika auf. Die Anbauart hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß ($p=0,169$) auf den Allergengehalt.

Tabelle 22 a und b: Datenanalyse auf Basis der Δ Ct Werte (Mittelwerte aus n=24 Werten) für die PCR Systeme Dau c1.01 und Dau c GAPDH – Ernte 2005

a) Kenngrößen des Allergengehaltes (Δ Ct) für die beiden Möhrensorten

Möhrensorte	N	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung	p-Wert
Rodelica	24	-3,1498	-3,1492	-3,58	-2,71	,24592	<0,05
Nerac	24	-3,2715	-3,2817	-3,62	-2,90	,20808	
Insgesamt	48	-3,2107	-3,2000	-3,62	-2,71	,23360	

b) Kenngrößen des Allergengehaltes (Δ Ct) für die beiden Anbauarten

Anbauart	N	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung	p-Wert
konventionell	24	-3,1687	-3,1217	-3,62	-2,71	,26011	0,169
ökologisch	24	-3,2526	-3,2183	-3,58	-2,90	,20046	
Insgesamt	48	-3,2107	-3,2000	-3,62	-2,71	,23360	

Abbildung 42 zeigt das Boxplot Diagramm der Datenauswertung für die Ernteproben 2005:

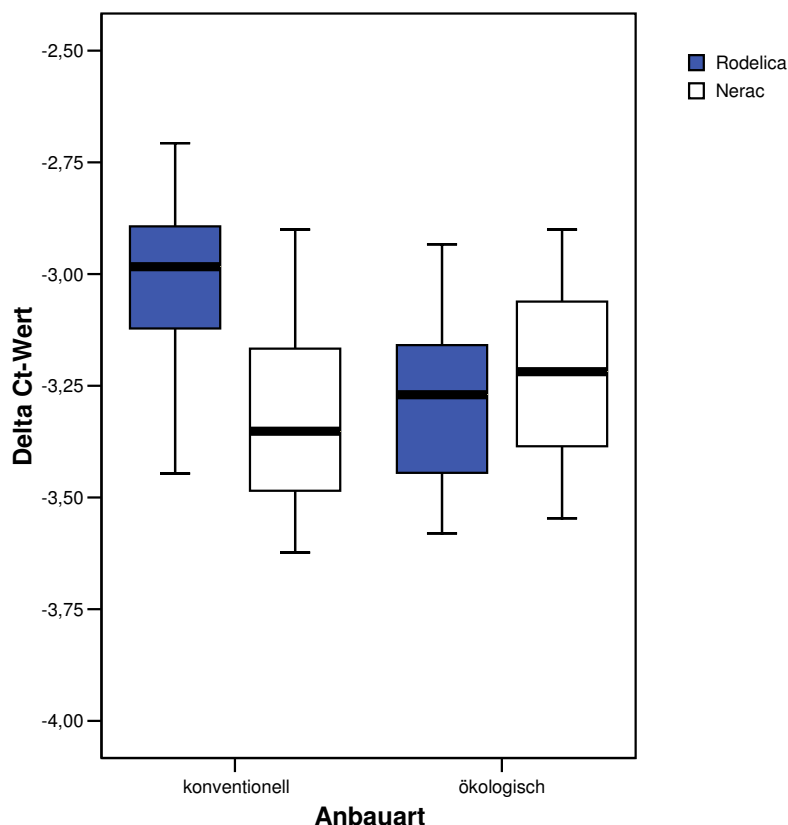


Abbildung 42: Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens Dau c 1.01 (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2005

Zwischen Sorte und Anbau gibt es jedoch signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,01$), d. h. die beobachteten Sortenunterschiede können durch die Anbauweise noch verstärkt oder abgeschwächt werden. Diese Wechselwirkungen können folgendermaßen interpretiert werden (Tabelle 23):

Für die beiden Sorten betrachtet, liegen für die 'Sorte' Rodelika (1. Stufe des Parameters „Sorte“ in Abb. 42) signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den beiden Anbauweisen von 'Anbau' (konventionell, ökologisch) vor. Dau c 1.01 in der samenfesten Sorte Rodelika wurde auf der ökologischen Fläche signifikant schwächer transkribiert als auf der konventionellen Fläche.

Für die 'Sorte' (Nerac) (2. Stufe des Parameters „Sorte“ in Abb. 42) liegen dagegen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den beiden Stufen von 'Anbau' vor, d. h. bei dieser Sorte hatte die Anbauweise keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Auf der ersten Stufe des Parameters 'Anbau' (= konventionell, Abb. 42) liegen signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den beiden Stufen von 'Sorte' (Rodelika, Nerac) vor (Nerac wird auf der Fläche „konventionell“ stärker transkribiert als Rodelika).

Auf der zweiten Stufe von 'Anbau' (= ökologisch, Abb. 42) liegen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den beiden Stufen von Sorte vor.

Tabelle 23: Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2005 – Dau c 1.01

Wechselwirkung	p-Wert	Testergebnis
Sorte 'Rodelika' vs. Anbau	<0,01	Signifikant
Sorte 'Nerac' vs. Anbau	0,248	Nicht signifikant
Anbau 'konventionell' vs. Sorte	<0,01	Signifikant
Anbau 'ökologisch' vs. Sorte	0,465	nicht signifikant

3.4.5.2 Transkription des Dau c 1.02 Gens – Ernteproben 2005

Es konnten statistisch signifikante Unterschiede (Testniveau $\alpha = 0,05$) zwischen den beiden Möhrensornten festgestellt werden ($p < 0,001$). Die Sorte Nerac weist gegenüber Rodelika eine deutlich geringere Transkription des Gens Dau c 1.02 auf. Die Anbauart hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss ($p = 0,452$) auf die Transkription.

Tabelle 24 a und b: Datenanalyse auf Basis der ΔCt Werte (Mittelwerte aus $n = 24$ Werten) für die PCR Systeme Dau c1.02 und Dau c GAPDH – Ernte 2005

a): Kenngrößen des Allergengehaltes (ΔCt) für die beiden Möhrensornten

Möhrensorte	N	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung	p-Wert
Rodelica	24	,2688	,2650	-,68	,28	,25020	<0,001
Nerac	24	2,5057	2,5083	1,69	3,35	,35456	
Insgesamt	48	1,1185	,9817	-,68	3,35	1,43439	

b): Kenngrößen des Allergengehaltes (ΔCt) für die beiden Anbauarten

Anbauart	N	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung	p-Wert
konventionell	24	1,0862	,9867	-,68	3,35	1,54149	0,452
ökologisch	24	1,1507	,9817	-,54	3,00	1,35131	
Insgesamt	48	1,1185	,9817	-,68	3,35	1,43439	

Abbildung 43 zeigt das Boxplot Diagramm der Datenauswertung für die Ernteproben 2005:

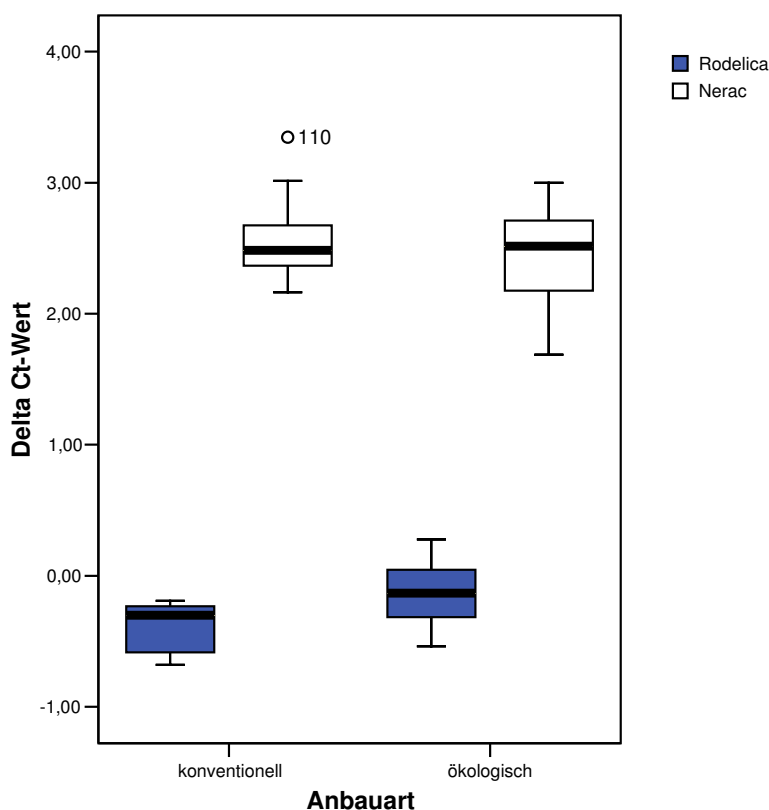


Abbildung 43: Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens Dau c 1.02 (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2005

Zwischen Sorte und Anbau gibt es wiederum signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$). Die Wechselwirkungen können folgendermaßen interpretiert werden (Tabelle 25):

Auf der ersten Stufe des Parameters 'Sorte' (= Rodelica, Abb. 43) liegen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), zwischen den beiden Stufen des Parameters 'Anbau' (konventionell, ökologisch) vor und zwar ist die Transkription des Dau c 1.02 Gens für Rodelica auf der konventionellen Fläche etwas stärker gegenüber der ökologischen Fläche.

Auf der zweiten Stufe von 'Sorte' (= Nerac, Abb. 43) liegen dagegen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,27$) zwischen den beiden Stufen von 'Anbau' vor.

Auf der ersten Stufe des Parameters 'Anbau' (= konventionell) liegen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den beiden Stufen von 'Sorte' (Rodelica, Nerac) vor.

Auf der zweiten Stufe des Parameters 'Anbau' (ökologisch) liegen ebenfalls signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den beiden Stufen von Sorte vor.

Tabelle 25: Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2005 – Dau c 1.02

Wechselwirkung	p-Wert	Testergebnis
Sorte 'Rodelica' vs. Anbau	<0,05	Signifikant
Sorte 'Nerac' vs. Anbau	0,27	Nicht signifikant
Anbau 'konventionell' vs. Sorte	<0,001	Signifikant
Anbau 'ökologisch' vs. Sorte	<0,001	Signifikant

3.4.5.3 Transkription des Dau c 1.01 Gens – Ernteproben 2006

Die Daten wurden mit der univariaten Varianzanalyse auf Unterschiede in den Delta Ct-Werten untersucht (Tabelle 26 a und b). Es wurde der Einfluß der Faktoren 'Anbauart' und 'Möhrensorte' auf die Delta Ct-Werte und die Wechselwirkung zwischen beiden untersucht.

Tabelle 26 a und b: Datenanalyse auf Basis der Δ Ct Werte (Mittelwerte aus n=24 Werten) für die PCR Systeme Dau c1.01 und Dau c GAPDH – Ernte 2006

a): Kenngrößen der Delta Ct-Werte für die beiden Möhrensornten

Möhrensorte	N	Mittelwert	Median	Min	Max	Standardabweichung	p-Wert
Rodelica	24	-2,8553	-2,7500	-3,3433	-2,3933	0,2773	<0,01
Nerac	24	-3,1938	-3,1800	-3,8767	-1,8833	0,4736	
Insgesamt	48	-3,0245	-3,0300	-3,8767	-1,8833	0,4203	

b): Kenngrößen der Delta Ct-Werte für die beiden Anbauarten, getrennt nach Möhrensorte

Anbauart	N	Mittelwert	Median	Min	Max	Standardabweichung	p-Wert
Konventionell	24	-2,8564	-2,7933	-3,8467	-1,8833	0,4263	<0,01
ökologisch	24	-3,1926	-3,1967	-3,8767	-2,5533	0,3468	
Insgesamt	48	-3,0245	-3,0300	-3,8767	-1,8833	0,4203	

Dabei konnten statistisch signifikante Unterschiede (Testniveau $\alpha=0,05$) zwischen den beiden Möhrensornten (unabhängig vom Anbau) festgestellt werden ($p<0,01$) und zwar kann (wie im Vorjahr) für die Sorte Rodelika eine geringere Transkription des Gens Dau c 1.01 gegenüber Nerac festgestellt werden. Die Anbauart (unabhängig von der Möhrensorte) hat ebenfalls einen signifikanten Einfluß ($p<0,01$) auf die Transkription.

Abbildung 44 zeigt das Boxplot Diagramm für die Ernteproben 2006 bezüglich der Transkription des Gens *Dau c 1.01*:

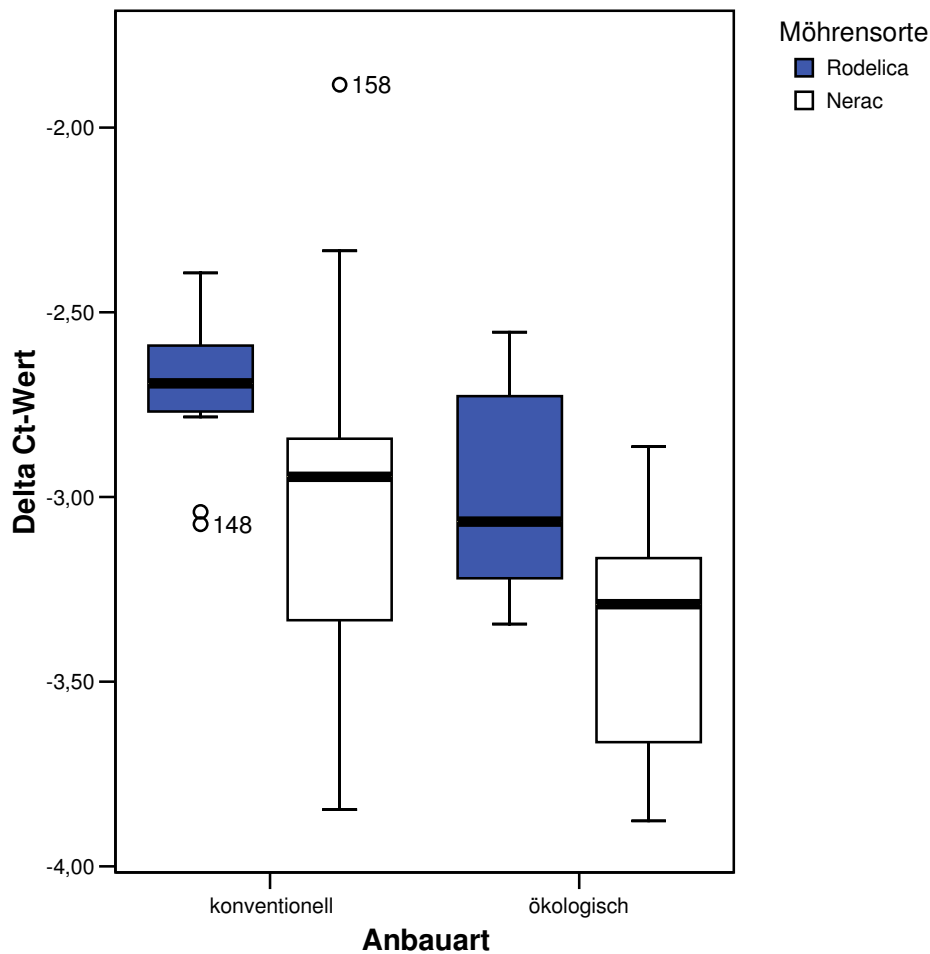


Abbildung 44: Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens *Dau c 1.01* (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2006, die gesonderten Punkte außerhalb der Boxplots markieren Ausreisser

Zwischen der Sorte und der Anbauart sind die Wechselwirkungen nicht signifikant ($p=0,674$). D.h. durch die Anbauart wird der Unterschied der Delta Ct-Werte, der zwischen den beiden Möhrensorten besteht, nicht verstärkt (Tabelle 27):

Auf der ersten Stufe des Parameters 'Sorte' (Rodelika) liegen keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$), zwischen den beiden Stufen des Parameters 'Anbau' (konventionell, ökologisch) vor. Auf der zweiten Stufe von 'Sorte' (Nerac) liegen signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den beiden Stufen von 'Anbau' vor.

Auf der ersten Stufe von 'Anbau' (konventionell) liegen signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den beiden Stufen von 'Sorte' (Rodelica, Nerac) vor.

Auf der zweiten Stufe des Parameters 'Anbau' (ökologisch) liegen ebenfalls signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Stufen von Sorte vor.

Tabelle 27: Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2006 – Dau c 1.01

Einflussfaktoren	p-Wert	Testergebnis
Sorte 'Rodelica' vs. Anbau	0,0509	Nicht signifikant
Sorte 'Nerac' vs. Anbau	<0,05	Signifikant
Anbau 'konventionell' vs. Sorte	<0,05	Signifikant
Anbau 'ökologisch' vs. Sorte	<0,05	Signifikant

3.4.5.4 Transkription des Dau c 1.02 Gens – Ernteproben 2006

Statistisch signifikante Unterschiede (Testniveau $\alpha = 0,05$) konnten zwischen den beiden Möhrensornten (unabhängig vom Anbau) festgestellt werden ($p < 0,001$). Die Anbauart (unabhängig von der Möhrensorte) hat ebenfalls einen signifikanten Einfluß ($p < 0,001$) auf den Delta Ct-Wert. Zwischen der Sorte und der Anbauart sind die Wechselwirkungen signifikant ($p < 0,001$) (Tabelle 28 a und b).

Tabelle 28 a und b: Datenanalyse auf Basis der ΔCt Werte (Mittelwerte aus $n = 24$ Werten) für die PCR Systeme Dau c1.02 und Dau c GAPDH – Ernte 2006

a): Kenngrößen der Delta Ct-Werte für die beiden Möhrensornten

Möhren- sorte	N	Mittelwert	Median	Min	Max	Standard- abweichung	p-Wert
Rodelica	24	0,1360	0,1065	-0,5484	0,8233	0,3097	<0,001
Nerac	24	1,4351	1,4384	-0,5740	3,4310	1,4085	
Insgesamt	48	0,7856	0,3027	-0,5740	3,4310	1,2036	

b): Kenngrößen der Delta Ct-Werte für die beiden Anbauarten

Anbauart	N	Mittelwert	Median	Min	Max	Standard- abweichung	p-Wert
Konven- tionell	24	1,3636	1,1869	-0,5484	3,4310	1,4603	<0,001*
ökologisch	24	0,2075	0,1958	-0,5740	1,0263	0,3615	
Insgesamt	48	0,7856	0,3027	-0,5740	3,4310	1,2036	

Ausreisser n. berücksichtigt

Abbildung 45 zeigt das Boxplot Diagramm für die Ernteproben 2006 bezüglich der Transkription des Gens *Dau c 1.02*:

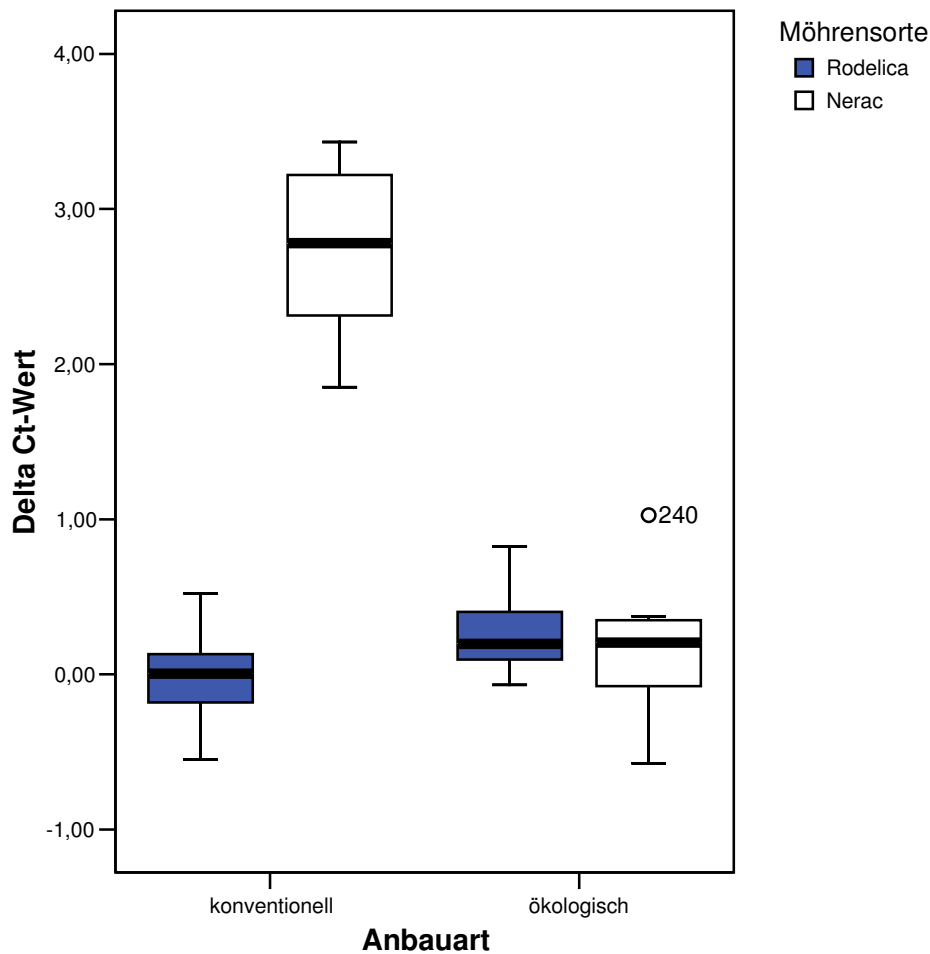


Abbildung 45: Boxplot-Diagramm der Transkription des Gens *Dau c 1.02* (delta Ct-Werte) nach Anbauart und Möhrensorte für das Jahr 2006

Abbildung 45 und Tabelle 29:

Betrachtet man die Sorte Rodelika dann liegen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,0867$), zwischen den beiden Anbauarten (konventionell, ökologisch) im Transkriptionslevel für *Dau c 1.02* (Delta Ct) vor. Bei der Sorte Nerac liegen dagegen signifikante Unterschiede ($p<0,001$) zwischen den beiden Anbauarten im Allergengehalt Delta Ct vor und zwar war für das Jahr 2005 gegenüber dem Jahr 2006 eine deutlich erhöhte Transkription des Gens *Dau c 1.02* auf der ökologischen Fläche zu verzeichnen.

Betrachtet man die Anbauart 'konventionell', dann liegen signifikante Unterschiede ($p<0,001$) zwischen den beiden Möhrensorten (Rodelika, Nerac) in der Transkription von *Dau c 1.02* vor. Bei ökologischer Anbauart gibt es hingegen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,3885$) zwischen den beiden Möhrensorten im Transkriptionsgehalt bestimmt durch die Delta Ct-Methode.

Tabelle 29: Wechselwirkungen zwischen Sorte und Anbauart – Ernte 2006 – Dau c 1.02

Einflussfaktoren	p-Wert	Testergebnis
Sorte 'Rodelica' vs. Anbau	0,0867	Nicht signifikant
Sorte 'Nerac' vs. Anbau	<0,001	Signifikant
Anbau 'konventionell' vs. Sorte	<0,001	Signifikant
Anbau 'ökologisch' vs. Sorte	0,3885	Nicht signifikant

3.4.6 Datenanalyse mittels Delta-delta Ct-Methode für die Vegetationsperioden 2005 und 2006

Einen Eindruck über die Relation der festgestellten Unterschiede zwischen Feldflächen und Sorten gewinnt man durch eine zusätzliche Auswertung mittels Delta-Delta ($\Delta\Delta Ct$) Ct-Methode nach Livak und Schmittgen (2001) [23]. Hierzu werden die auf das HKG normalisierten Messwerte nochmals von einem „Kalibrator“-Wert abgezogen:

$$\Delta Ct \text{ Probe} - \Delta Ct \text{ Kalibrator} = \Delta\Delta Ct$$

Die Menge an Zielsequenz, normalisiert auf das HKG und relativ zu einer Kalibratorprobe, berechnet sich aus der Formel:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die $\Delta\Delta Ct$ -Methode zur Bestimmung der Transkription relativ zu einer (externen) Kalibratorprobe darf nur angewendet werden, wenn die verwendeten Systeme für Zielsequenz und HKG eine vergleichbare Effizienz aufweisen. Dieser Nachweis erfolgte für beide RT PCR real time Systeme -1.01 und 1.02 - in Relation zum HKG über eine Verdünnungsreihe mit der in die PCR eingesetzten RNA (Tabelle 30). Die Differenz der Ct-Werte (Zielgen - HKG) wird gegen den log der eingesetzten RNA Konzentration aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Die $\Delta\Delta Ct$ -Methode darf eingesetzt werden, wenn der Proportionalitätsfaktor der Steigung $\leq 0,1$ ist (User Bulletin #2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, 2001). Abbildung 46 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Validierung des Systems 1.01. Der Steigungsfaktor betrug 0,0862 und erfüllt damit die Bedingung zur Anwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode.

Tabelle 30: Vergleich der Effizienzen der real time PCR Systeme „Dau c 1.01“, „Dau c 1.02“ und „GAPDH“

Gehalt total RNA (ng)	log ng total RNA	Ct Werte Dau c 1.01	Ct Werte Dau c 1.02_	GAPDH	Delta Ct 1.01	Delta Ct 1.02
10	1	19,38	27,76			
1	0	22,70	30,76	24,11	-1,41	6,65
0,1	-1	25,95	33,88	27,57	-1,63	6,31
0,01	-2	29,23	37,49	30,76	-1,53	6,73
0,001	-3	32,55	> 40	34,09	-1,54	-
0,0001	-4	35,34	> 40	37,22	-1,88	-
0,00001	-5	-	-			
Steigung		-3,22	-3,23	-3,27		
Effizienz		1,05	1,04	1,02		
Differenz der Steigungen der Regressionsgeraden*, (m spezifisches System – m GAPDH)					0,0862	0,041

* Die Delta-delta Ct-Methode darf angewendet werden wenn der Wert $\leq 0,1$ ist

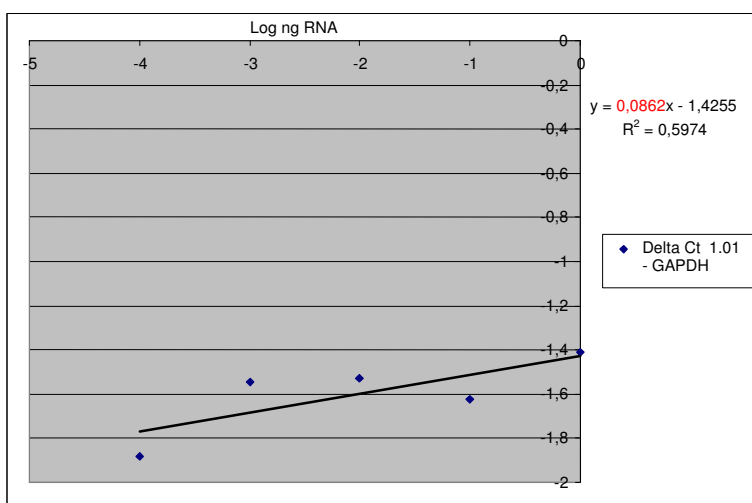


Abbildung 46: Bestimmung der relativen Effizienz der qRT-PCR real time Systeme Dau c 1.01, Dau c 1.02 (Zielssequenz) und GAPDH (HKG). Die Regression liegt mit 0,0862 unterhalb des geforderten Wertes von 0,1.

Als Kalibratorprobe für einen Transkriptionsvergleich wurde für beide Jahre willkürlich das Feld „Rodelika, konventionell“ herangezogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 47 dargestellt.

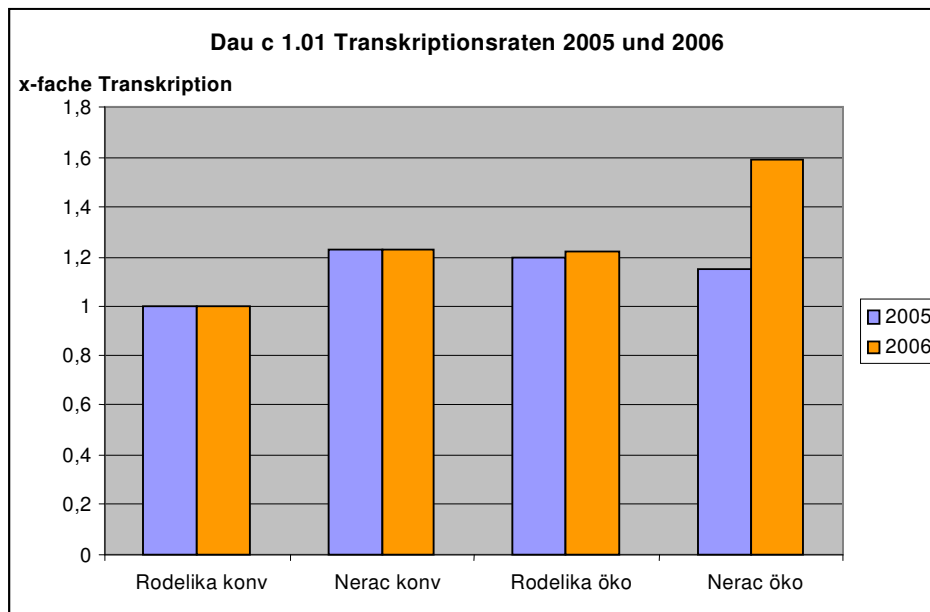


Abbildung 47: Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.01 in Relation zur Kalibratorprobe Rodelika, konventionell, bestimmt mittels Delta-delta Ct Methode

Die Grafik zeigt die Transkriptionsunterschiede für das Gen Dau c 1.01 zwischen der Kalibratorprobe (Rodelika konv.) und den übrigen Proben. Diese waren überwiegend sehr gering (ca. 1,2 fach gegenüber Rodelika, konv.). Die physiologische Relevanz im Transkriptionsgeschehen ist bei diesen Größenordnungen nicht abzuschätzen und wohl eher als biologisch nicht relevant zu betrachten. Gleichwohl sind die Unterschiede statistisch signifikant (s. o.). Als auffälligstes Resultat kann im Jahr 2006 für die Feldfläche Nerac (öko.) eine deutlich erhöhte Zunahme der Dau c 1.01 Transkription relativ zur Kalibratorprobe (Rodelika, konv.) um den Faktor 1,6 verzeichnet werden. Dies ist eine deutliche Abweichung zum Vorjahr (< 1,2 fach gegenüber Rodelika, konv.). Die Ergebnisse der Transkriptionsstudie für das Gen Dau c 1.01 korrelieren nicht mit den Messungen des Allergens mittels immunologischer Methoden.

Für das Gen Dau c 1.02 läßt sich für die Sorte und Anbaufläche Nerac konv. (2005 und 2006) sowie Nerac, öko (2005) eine deutlich niedrigere Transkriptionsaktivität gegenüber Rodelika feststellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Messungen der immunologischen Bestimmung des Dau c 1.02 Gehaltes (für das Jahr 2005). Wiederum auffällig war die Fläche und Sorte (Nerac, öko.), für welche im Jahr 2006 gegenüber 2005 eine erhöhte Transkriptionsaktivität für das Gen Dau c 1.02 gemessen wurde (Abbildung 48).

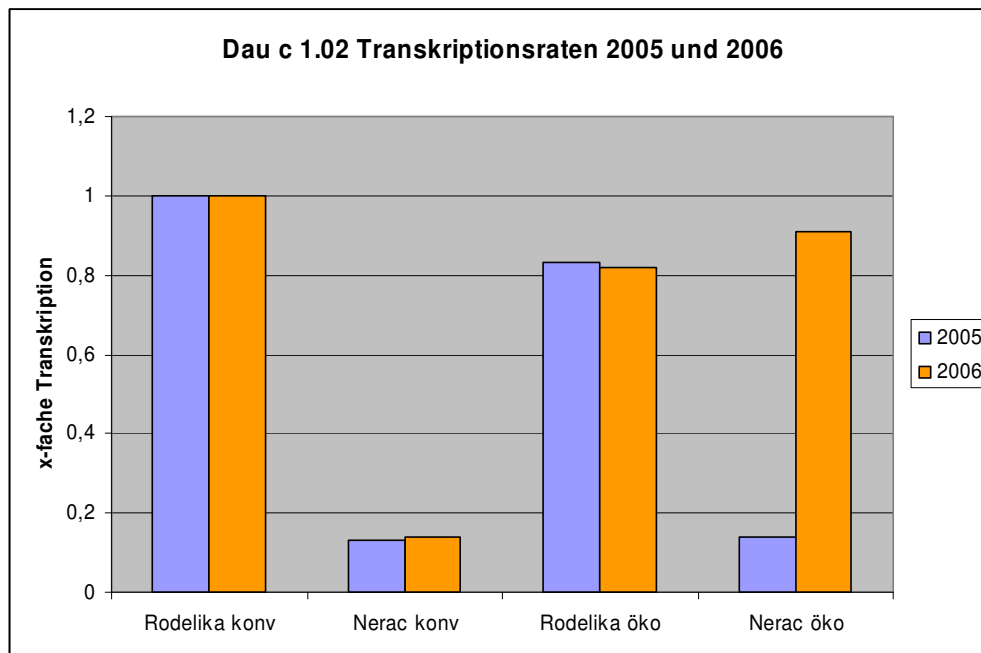


Abbildung 48: Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 in Relation zur Kalibratorprobe Rodelika, konventionell

3.4.7 Untersuchung von Marktproben und Proben aus anderen Projekten

Aufgrund der Ergebnisse der Transkriptionsstudie mit den Proben aus den definierten Feldversuchen beschränkt sich hier die Auswertung der parallel untersuchten Marktproben und Proben aus anderen BÖL Projekten (s. Abschnitt 2.2) auf das PCR-System „Dau c 1.02“. Die nachfolgend präsentierten Ergebnisse basieren auf vorläufigen Daten, die zur Zeit am BfR im Rahmen einer Diplomarbeit erstellt werden (Meike Knoppik, 2007).

Um eine Einschätzung der Meßdaten vorzunehmen, wurden die auf das HKG normalisierten Meßergebnisse gemäß der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auf die Mittelwerte (aus $n=12$) für jeweils die Feldproben mit der niedrigsten gemessenen Dau c 1.02 Transkription (=Nerac, Extrakte 73-84/konventionell Ernte 2005) sowie die Feldproben mit der höchsten Dau c 1.02 Transkription (=Rodelika, Extrakte: 31-42/konventionell, Ernte 2005) bezogen. Es wurden jeweils 10 ng RNA in die RT-PCR eingesetzt. Die Auswertung ist in Abbildung 49 und 50 grafisch anhand der relativen Transkriptionsraten bezogen auf eine Kalibratorprobe dargestellt.

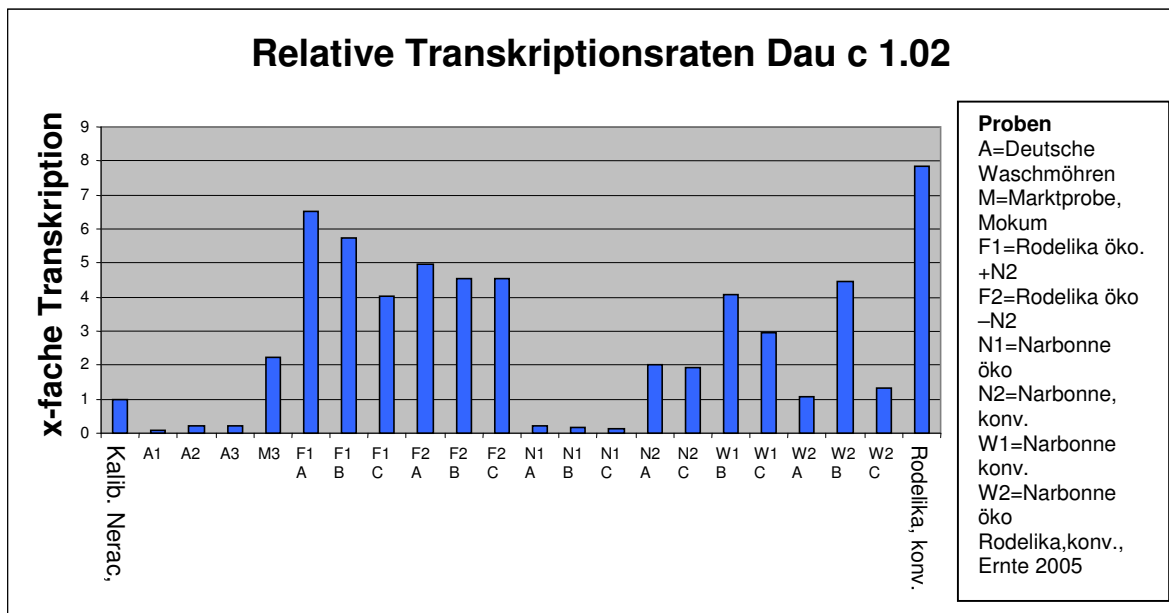


Abbildung 49: Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 in Marktproben in Relation zur Feldprobe Nerac, konv. (Kalibratorprobe) und einer Projektprobe Rodelika, konv., aus der Ernte 2005. Die Buchstaben A, B, C stellen unabhängige Extrakte derselben Probe dar. In jede PCR wurden 10 ng RNA eingesetzt.

Zwei Proben zeichnen sich durch besonders niedrige Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 sowohl gegenüber der Probe Nerac, konv. (Ernte 2005) als auch Rodelika, konv. (Ernte 2005) aus, nämlich die Probe A (Deutsche Waschmöhren, Sorte unbekannt) und die Probe N1, Narbonne aus ökologischem Anbau. Demgegenüber ist die Transkriptionsrate Dau c 1.02 in den Proben N2 (Narbonne, konv.) annähernd verdoppelt. Die N2 Probe lag damit im Bereich der Handelsprobe „Mokum“. Bei den W-Proben (Narbonne aus ökologischem und konventionellem Anbau) ist aufgrund der Streuung der Werte für die verschiedenen Extraktionen (A-C) eine Wertung nur auf Basis des hier nicht berücksichtigten Mittelwertes möglich (Probe W2 ist eventuell als Ausreißer aus der Wertung herauszunehmen). Tendentiell liegt die Probe – wie auch die übrigen - unter dem Dau c 1.02 Transkriptionslevel von Rodelika. Interessanterweise kann für die Sorte Rodelika aus einem Anbauversuch der Universität Kassel-Witzenhausen (F-Proben) eine Annäherung an die Werte der Feldversuchs-Probe aus dem vorliegenden Projekt beobachtet werden. Bei den F-Möhrenproben läßt sich aufgrund der Wertestreuung für die RNA Extrakte der Proben F1 (öko, +N2) gegenüber den Proben F2 (öko., -N2) kein Unterschied feststellen. Die drei Extraktionen der Öko-Proben F2 waren jedoch bezüglich der Delta delta Ct-Werte homogener als die F1 Proben.

Das extremste Ergebnis (ca. 30fache Transkription gegenüber der Kalibratorprobe Nerac, konv.) wurde für eine Probe italienischer Importmöhren (Tüte, aus konv. Anbau) unbekannter Sorte bestimmt (Abbildung 50). Ob dieses Ergebnis eine Folge der Lagerung, aufarbeitungs (-

die Probe wurde lyophilisiert, nicht wie üblich schockgefroren) oder sortenbedingt ist, läßt sich nicht feststellen.

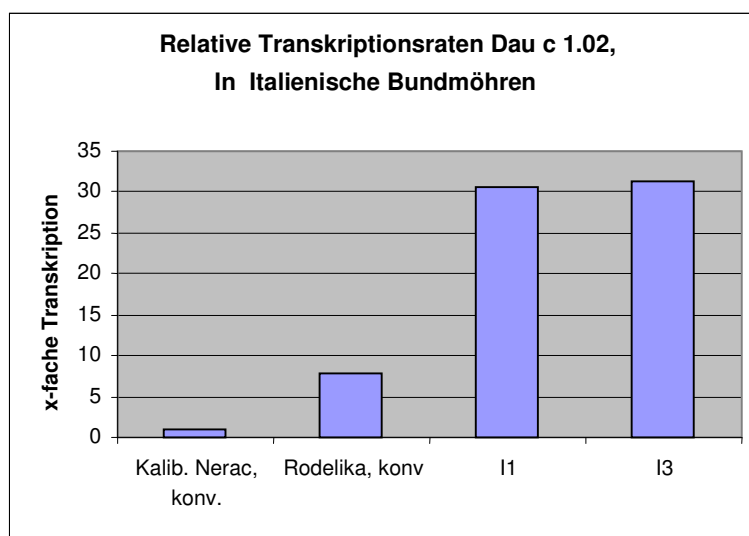


Abbildung 50: Relative Transkriptionsraten für das Gen Dau c 1.02 in italienischen Marktproben in Relation zur Feldprobe Nerac, konv. (Kalibratorprobe) bzw. der Projektprobe Rodelika, konv., aus der Ernte 2005. I1 und I3 = Mittelwert aus zwei unabhängigen Extraktionen (eine dritte Extraktion I2 wurde als Ausreißer nicht berücksichtigt). In jede PCR wurde 10 ng RNA eingesetzt.

Zusammengefaßt weisen die Ergebnisse der Markt- und anderen Projektproben ebenso wie die Resultate aus dem definierten Feldversuch auf eine primäre Sortenabhängigkeit hinsichtlich der Transkriptionsaktivität für das Allergen-Gen Dau c 1.02 hin. Darüber hinaus scheinen jedoch auch exogene Faktoren das Resultat zu beeinflussen, die im Rahmen des vorliegenden Projektes nicht geklärt werden konnten. Die Sorten Nerac und Narbonne als relativ niedrig transkribierende Sorten sowie Rodelika als mittel- bis höher transkribierende Sorte sind für einen Sortenvergleich und eventuelle Einstufungen weiterer Proben sehr gut geeignet. Welchen Einfluss die Lagerung nach der Ernte auf die Stabilität der RNA hat, wurde aufgrund der Versuchsanordnung nicht untersucht.

3.4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptionsstudie

Die Ergebnisse der Transkriptionsstudie für zwei aufeinander folgende Vegetationsperioden lassen sich wie folgt interpretieren:

- Die Ergebnisse (Ct-Werte) für die Ernte 2005 und 2006 waren für beide Gene (Dau c 1.01 und Dau c 1.02) mit einer Ausnahme reproduzierbar.
- Eine auffällige Abweichung zum Vorjahr ergab sich ausschließlich für die Sorte und Feldfläche Nerac (öko.). Für beide Gene (Dau c 1.01 und 1.02) wurde hier eine signifikante Zunahme der Transkriptionsaktivität in 2006 gegenüber 2005 gemessen.

Hinsichtlich des Ernährungszustandes der Pflanzen bestand weder eine Mangelsituation noch auffälliger Pathogenbefall. Das kann somit als Ursache ausgeschlossen werden.

- Das Hauptallergen-Gen Dau c 1.01 wird in allen Proben stärker (um ca. drei Ct-Werte in der real time PCR) transkribiert als das Referenzgen GAPDH. Die Transkriptionsraten für alle Proben und Parzellen lagen in einem vergleichbaren Rahmen, d.h. es gab zwar signifikante Unterschiede zwischen den Sorten, diese sind aber für dieses Gen als sehr gering einzustufen.
- Das gegenüber Dau c 1.01 in geringerer Menge exprimierte Allergen Dau c 1.02 wird gegenüber dem Referenzgen GAPDH tendenziell gleich (Rodelika) oder schwächer transkribiert (Nerac).
- Die statistische Auswertung zeigt, daß der Einfluß der Sorte auf die Transkription der Allergen-Gene größer als der Einfluß der Anbauweise ist. Darüber hinaus hatte das Anbaujahr (bzw. physiologische Zustand der Möhren zum Erntezeitpunkt) einen dominanten aber sortenunabhängigen Einfluß auf die messbare Transkriptionsaktivität.
- Die samenfeste Sorte Rodelika zeichnete sich gegenüber der Hybridsorte Nerac insgesamt durch konstantere Ergebnisse und tendenziell geringere Werteschwankung insbesondere auf den ökologischen Flächen in beiden Versuchsjahren aus.

3.4.9 Vergleich der Ergebnisse aus der Transkriptionsstudie mit den ELISA-Ergebnissen

Für das Hauptallergen der Möhre, Dau c 1.01, wurde im ELISA in beiden Anbaujahren ein statistisch signifikanter geringerer Gehalt an allergenem Protein in der Sorte Nerac gegenüber Rodelika festgestellt. Hinsichtlich der Transkriptionsaktivität für dieses Gen lässt sich diese klare Aussage nicht machen, da unabhängig von Sorte und Anbauweise ein nahezu konstantes Transkriptionsniveau gemessen und allenfalls eine schwache (gleichwohl statistisch signifikante) Tendenz zu einer höheren Transkriptionsaktivität für Dau c 1.01 bei der Sorte Nerac gegenüber der Sorte Rodelika (im Gegensatz zum ELISA-Ergebnis) bestimmt wurde. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Unterschiede im Transkriptionsgeschehen als gering und vermutlich physiologisch unbedeutend einzustufen sind. Das Allergen Dau c 1.01 war gemäß ELISA-Bestimmung im Jahr 2005 auf allen Flächen generell stärker exprimiert, als im Folgejahr 2006. Der durchschnittlich um eine Zehnerpotenz niedrigere absolute Gehalt an Dau c 1 Allergen im Jahr 2006 gegenüber 2005 spiegelte sich größenordnungsmäßig auch im Transkriptionsgeschehen wider. Aufgrund der schlechten Relation zum immunologisch bestimmten Allergengehalt ist das Dau c 1.01 PCR-System jedoch als Alternativmethode zum quantitativen ELISA ungeeignet.

Demgegenüber war eine sehr gute Korrelation der Transkriptionsaktivität für das Gen Dau c 1.02 mit den mittels ELISA bestimmten Proteinwerten für dieses Allergen gegeben. Dies

gilt in beiden Anbaujahren, wobei – analog zum Allergen Dau c 1.01 - wiederum eine ca. zehnfache Reduktion der Werte gegenüber dem Vorjahr in 2006 mit beiden Methoden gezeigt werden konnte. Im Falle einer definierten Korrelation, erfüllt das PCR System Dau c 1.02 die Voraussetzung für eine alternative Messmethode zum ELISA. Zwar ist das Dau c 1.02 Protein, wie im Rahmen dieser Studie gezeigt wurde, für den Allergiker von untergeordneter praktischer Bedeutung. Da aber offensichtlich eine Parallelität des Gehaltes an Dau c 1.01 zu Dau c 1.02 besteht, würde die PCR-Methode die Voraussetzung für ein Screening-Verfahren zur Einschätzung der potentiellen Allergenität von Möhren erfüllen, wie z.B. der praktische Einsatz der Methode an Marktproben zeigt. Allerdings ist zur Interpretation des Ergebnisses und zu Vergleichszwecken die Heranziehung einer geeigneten Kalibratorprobe angeraten.

Insgesamt war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in beiden Untersuchungsjahren für die Feldflächen und für beide Methoden sehr gut. Mittels ELISA und quantitativer RT real time PCR liessen sich sowohl jahresbedingte Unterschiede in den Allergengehalten - und parallel hierzu - Transkriptionsaktivitäten nachvollziehen, als auch ein abweichendes Einzelergebnis für die Feldfläche Nerac, ökologisch, im Vergleich der Anbaujahre 2005 und 2006 bestätigen. Somit kann diese Abweichung als offensichtlich physiologisch bedingt eingestuft werden.

Die statistische Auswertung für beide Systeme – ELISA wie PCR – weist auf einen dominanten Sorteneinfluss hin, gefolgt von geringeren aber ebenfalls teils signifikanten Einflüssen durch die Anbauweise. Darüber hinaus waren die absoluten Werte sehr stark (Unterschiede um ca. eine Zehnerpotenz) vom Anbaujahr bestimmt. Der Einfluss externer Faktoren prägt also das Ergebnis erheblich. In wieweit hierbei klimatische Faktoren oder der Erntezeitpunkt eine Rolle gespielt haben, lässt sich anhand von zwei Vegetationsperioden und der Versuchsanordnung nicht abschließend beantworten. Um die Auswirkung äußerer, steuernder Faktoren auf die Ausprägung der Allergenität landwirtschaftlicher Produkte zu klären bieten sich weitführende Feld- und Gewächshausexperimente an.

4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse, Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung, ggf. Angaben zu Erfindungen und Schutzrechten, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Untersuchungen über die Allergengehalte von Möhren in Bezug auf die landwirtschaftliche Produktionsweise existierten bis dato nicht. Eine Vergleichsuntersuchung eines auf der reversen Transkriptase real time PCR basierenden Nachweissystems mit den absoluten Werten aus dem Antikörper-basierenden Nachweissystem anhand von Gemüse aus einem definierten Feldversuch wird hier erstmalig vorgenommen („Proof of Principle“). Die Ergebnisse sowie die entwickelten Nachweissysteme sind wegweisend für weitere Untersuchungen zum allergenen Potential an anderen Kulturpflanzen (z.B. weitere Obst- und Gemüsesorten) und könnten z.B. praktische Anwendung in einer auf allergen-arme Qualität ausgerichteten Züchtung oder Sortenauswahl für bestimmte Anbauweisen finden. Vor diesem Hintergrund sind detaillierte fachliche Veröffentlichungen (Publikationen in Fachzeitschriften, Poster, Vortrag) zu den Nachweissystemen geplant. Eine verständliche Zusammenfassung wird z.B. im Internet-Portal des BfR erscheinen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersucht die potentielle Allergenität von Gemüse am Beispiel von Möhren in Abhängigkeit von der Anbauweise. Als Untersuchungsmaterial wurden in zwei aufeinander folgenden Vegetationsperioden (2005 und 2006) zwei Möhrensorten, die samenfeste Sorte Rodelika und die F1 Hybridsorte Nerac, auf ökologisch- oder konventionell bewirtschafteten Anbauflächen im Kreuzversuch ausgesät. Am Erntegut wurde die Expression (Präsenz des allergenen Proteins) und Transkription (Präsenz von RNA) des Hauptallergens Dau c 1.01 und dessen Variante Dau c 1.02 in Möhren bestimmt. Zusätzlich zu den Hauptallergenen der Möhre wurde das profilinhomologe im Pflanzenreich weit verbreitete Allergen Dau c 4 mittels ELISA untersucht. Für die Allergen-Messungen wurden im Rahmen des Projektes sowohl hochsensitive und spezifische quantitative ELISA als auch auf der reversen Transkriptase basierende quantitative real time PCR Systeme entwickelt und *in-house* validiert (Erhebung von Kenngrößen wie Sensitivität, Spezifität, Wiederholbarkeit etc.). Die Daten aus beiden methodischen Ansätzen wurden statistisch ausgewertet und gegenübergestellt. Die physiologische Bedeutung der Allergenpräsenz in den Proben wurde qualitativ im Westernblot über das Reaktionsprofil von Allergiker-Seren sowie quantitativ *in vitro* mittels eines Mediatorfreisetzungszelltestes überprüft.

Die Auswertung der Daten aus beiden Ernteperioden weist bezüglich des allergenen Potentials der Möhren auf einen dominanten Sorteneffekt hin während die Anbauweise selber eine untergeordnete Rolle spielt. Darüber hinaus hatte das Anbaujahr (bzw. physiologische Zustand der Möhren zum Erntezeitpunkt) einen starken aber sortenunabhängigen Einfluß auf die mit beiden Methoden bestimmten Absolutwerte. Die ELISA Tests belegen, dass sowohl bezüglich der Menge an nachweisbarem Dau c 1.01 (dem mengenmäßig überwiegenden Möhrenallergen) als auch dem in geringerer Menge vorhandenem Allergen Dau c 1.02 die Sorte Rodelika gegenüber der Sorte Nerac zu signifikant höheren Allergen-Gehalten neigt. Dieser Effekt ist allerdings für das Hauptallergen Dau c 1.01, welches in grob zehnfacher Menge gegenüber Dau c 1.02 vorlag, schwächer ausgeprägt als für die Variante Dau c 1.02. In beiden Anbaujahren wiederholte sich die Tendenz. Allerdings war die absolute Menge an messbarem allergenen Protein im Jahr 2006 auf allen Flächen deutlich niedriger als im Vorjahr. Die geringeren Allergengehalte spiegelten sich auch im Transkriptionsgeschehen wider. In beiden Anbaujahren stimmen die Ergebnisse der immunologischen wie auch der molekularbiologischen Messungen nach Auswertung der Grafiken größenordnungsmäßig gut überein. Für die Genvariante Dau c 1.02 besteht eine sehr gute Vergleichbarkeit der RT-PCR Methode mit den ELISA Werten. Die Ergebnisse zeigen, dass in einem Frischgemüse die RT-PCR Methode neben dem ELISA unter der Voraussetzung einsetzbar ist, dass eine definierte Korrelation zwischen Proteinexpression und dem Transkriptionslevel besteht.

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

In Abänderung zur ursprünglichen Planung wurde nach Vorliegen der Ergebnisse der ersten Vegetationsperiode mit Möhren auf die parallele Untersuchung von ursprünglich als zweite Feldfrucht erwogene Sellerie (schwierigere Beprobung und Beschaffung von Anbauflächen, geringere ökonomische Bedeutung als Frischgemüse) verzichtet. Stattdessen wurde entschieden, die Ergebnisse in einer zweiten Vegetationsperiode auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die Wiederholung des Anbauversuchs erhöhte die Richtigkeit der wissenschaftlichen Erkenntnisse. Durch diese Vorgehensweise waren praxisrelevante und durch einen Wiederholungsversuch gestützte Ergebnisse zu erwarten. Die Modifikation des Arbeitsprogrammes erfolgte in Absprache mit dem Mittelgeber (BLE). Der Arbeitsplan und das Zeitschema wurden aufgrund des Erntetermins 2006 und der erforderlichen nachfolgenden Aufarbeitungszeit angepasst (s. GANTT-Diagramm, Abb. 1) und die Projektlaufzeit auf drei Monate bis Ende Dezember 2006 verlängert.

Der hier durchgeführte Vergleich zwischen ökologischen und konventionellen Anbaubedingungen mit zwei Möhrensornten zeigt erstmalig, dass überwiegend die Möhrensorte und nicht die Anbauweise einen entscheidenden Einfluß auf den Allergengehalt ausübt. Basierend auf diesen ersten Ergebnissen ist es daher von erheblichem praktischem Interesse, das Sortenspektrum zu erweitern und zu untersuchen, ob solche wissenschaftlich für die hier untersuchten Möhrensornten nachgewiesenen Unterschiede im Allergengehalt auch bei anderen im ökologischen Landbau häufig verwendeten Möhrensornten nachweisbar sind. Auf diese Weise lassen sich für den ökologischen Landbau geeignete "allergenarme" Sorten identifizieren. Diese Frage läßt sich durch eine Sortenstudie unter Einbeziehung typischer im ökologischen Landbau verwendeten Möhrensornten (oder auch weiterer im Ökolandbau wichtige Agrarpflanzen) beantworten. Neben dem primären Sorteneinfluss lagen jedoch auch experimentelle Hinweise auf einen externen Einfluss auf die Allergenität vor. Die Fragestellung, unter welchen Bedingungen und inwieweit der dominante Sorteneinfluss von den äußeren Wachstumsbedingungen positiv oder negativ beeinflusst wird, ist von gleichermaßen wissenschaftlicher wie praktischer Relevanz und ein lohnenswertes Thema im Rahmen von Diplom- oder Doktorarbeiten.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Vieths, S., Scheurer, S., Ballmer-Weber, B. K. (2002): Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen, *Ann NY Acad Sci* 964: 47-68
- [2] Ballmer-Weber, B.K; Hoffmann, A.; Wuthrich, B.; Luttkopf, D.; Pompei, C.; Wangorsch A; Kastner, M.; Vieths, S. (2002): Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy *Allergy* 57 (3): 228-235
- [3] Skamtrup Hansen, K., Ballmer-Weber, B.K., Lüttkopf, D., Stahl Skov, P., Wüthrich, B., Bindslev-Jensen, C., Vieths, S., Poulsen, L.K. (2003): Roasted hazelnuts – allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy* 58: 132-138
- [4] Zuberbier, T., Edenharter, G., Worm, M., Ehlers, I., Reimann, S., Hantke, T., Roehr, C. C., Bergmann, K. E. and Niggemann, B (2004). Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy* 59 (3):338-345, 2004.
- [5] Bohle, B., Zwolfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B. , Antonia, Y. D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L. , van Ree, R. , Werfel, T. and Ebner, C. (2006): Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 118 (1):242-249
- [6] Crowell, D.N., John, M. E, Russell, D., and Amasino, R.M. (1992): Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean. *Plant Mol Biol* 18 (3):459-466
- [7] Atkinson, R.G., Perry, J., Matsui, T., Ross, G. S., Macrae, E. A. (1996): A stress-, pathogenesis-, and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Vol. 24: 103-107 [7] S. Vieths et al. (2002): *Ann NY Acad Sci.*, 965: 47-68
- [8] Kleine-Tebbe, J, Vogel, L., Crowell, D.N., Haustein, U.F, and Vieths, S. (2002): Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 110 (5):797-804
- [9] Reese, G., Ballmer-Weber, B.K., Wangorsch, A., Randow, S., Vieths, S. (2007): Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: Destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol*, Feb 8, (Epub ahead of print)
- [10] <http://orgprints.org/3840/01/3840.pdf>
- [11] Schnug, E. und Haneklaus, S. (1996): Parameters influencing the calcination of plant materials in muffle furnaces and their importance for micronutrient analysis. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 27: 993-1000

- [12] Kaul, S., Lüttkopf, D., Kastner, B., Vogel, L., Hölzt, G., Vieths, S., Hoffmann, A. (2007): Mediator release assay based on human or murine immunoglobuline E in allergen standardization. *Clin Exp Allergy*, 37: 141-150
- [13] George und Eghbal (Hrsg.) (2003). *Ökologischer Gemüsebau. Handbuch für Beratung und Praxis*. Bioland Verlags GmbH.
- [14] Krug, H., Liebig, H.P., Stützel, H. (Hrsg.) (2002). *Gemüseproduktion*. Ulmer Verlag.
- [15] Wonneberger, C., Keller, F. (2004). *Gemüsebau*. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- [16] Arncken, Ch.: Samenfeste Möhrensorten im Vergleichsanbau mit Hybridsorten, Abschlussbericht der Versuchsjahre 2002 und 2003, Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), CH-5070 Frick, Schweiz, Quelle: Datenbank organic eprints, <http://orgprints.org/00008564>, freies download).
- [17] Verordnung (EG) Nr. 1452/2003 der Kommission vom 14. August 2003 zur Beibehaltung der Ausnahmeregelung gemäß Artikel 6 Absatz 3 Buchstabe a) der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates für bestimmte Arten von Saatgut und vegetativem Vermehrungsmaterial und zur Festlegung von Verfahrensschritten und Kriterien für diese Ausnahmeregelung.
- [18] organicXseeds (2005). <http://www.organicXseeds.de> und <http://www.fibl.de>
- [19] Agrarmärkte, Jahresheft 2006, Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Internetveröffentlichung, <http://www.lfl.bayern.de/iem/agrarmarktpolitik/23835/linkurl0900.pdf>
- [20] Ralf Goessler (Hrsg.), *Ökomarkt Jahrbuch 2006*, ZMP, 2006, 272 Seiten
- [21] Müller, Hans-Joachim ISBN: 978-3-8274-1058-02001, 134 Seiten, 40 s/w Abb., 20 s/w Tab., Ringheftung
- [22] Hoffmann-Sommergruber K., Vanek-Krebitz, M., Radauer, C., Wen, J., Ferreira, F., Scheiner, O., Breiteneder, H. (1997). Genomic characterisation of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene* 197, 91-100.
- [23] Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2003): Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25: 402-408
- [24] Laemmli, U.K (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- [25] Schagger, H., von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368-79.

8 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter u.s.w)

Die Daten aus zwei Ernteperioden lagen erst im März 2007 vollständig zur Gesamtauswertung vor. Die Veröffentlichung von experimentellen Tendenzen war wenig sinnvoll. Bei den in der Laufzeit des Projektes veröffentlichten Informationen handelt es sich daher um Statusberichte und Vorträge über den Projektfortschritt sowie die Präsentation vorläufiger Ergebnisse. Teile der experimentellen Arbeiten (Analyse von Marktproben) werden im Rahmen einer Diplomarbeit veröffentlicht (Meike Knoppik, 2007).

Jansen B. Potentielle Allergenität von konventionell versus ökologisch produziertem Gemüse. Rahmann G. Anonymous. Braunschweig:Veranstalter: Senatsarbeitsgruppe "Ökologischer Landbau", Sprecher: Gerold Rahman. (Tagungsreader, Das Neuste aus der Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2006 zum Statusseminar am 2. März 2006 im Forum der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, FAL, Braunschweig):9-10, 2006.

Jansen, B., B. Dahl L., Fötisch K., Haneklaus S., Zagon J., Vieths S., Holzhauser T., Broll H. Vergleich der Qualität von Möhren aus ökologischem- und konventionellem Anbau am Beispiel der Allergenität. Landbauforschung Völkenrode (FAL Agricultural Research). Braunschweig, Ed. Gerold Rahman. Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2006 - Sonderheft 298:9-17, 2006.

Zagon, J., Jansen B., Dahl L., Holzhauser T., Vieths S., Broll H.. Determination of the allergenic potential of carrots derived from organic and conventional cultivation systems. Universität Kassel. Anonymous. 2nd. European Conference "New approaches in food quality analysis", Karlsruhe(Konferenzband - Abstract - Vortrag):18, 2006. 09-14-2006.

DANKSAGUNG

Wir danken für die finanzielle Unterstützung aus dem Bundesprogramm Ökologische Landwirtschaft.

Des Weiteren danken Frau Meike Knoppik für die Marktprobenanalyse im Rahmen ihrer Diplomarbeit und Herrn Johannes Geier für kompetente technische Unterstützung. Unser spezieller Dank gilt Herrn Kühling, Gemüsebauberatungsring Dithmarschen, für die Hilfe bei der Organisation und Durchführung der Feldversuche in Hedwigenkoog, der Firma Bejo Saaten, Sonsbeck, (Herr Hugenberg und Herr Müller-Steinhorst) für die Bereitstellung und Beizung von Saatgut, ebenso der Firma Bingenheimer Saatgut AG, Echzell (Frau Boie und Frau Humpert) für die Überlassung von ökologischem Saatgut, Herrn Dr. Kahl und Herrn Dr. Rahmann für die Überlassung von Proben aus Parallelprojekten sowie allen Personen, die unser Projekt mit sachkundigem Rat unterstützt haben. Weiterhin gilt unser besonderer Dank Frau Dr. Susanne Kaul vom Paul-Ehrlich-Institut für die Überlassung der Dau c 1.01 und Dau c 1.02 spezifischen monoklonalen Antikörper, sowie den Herren Dr. Jonas Lidholm (Fa. Phadia, Schweden) und Prof. Dr. Arndt Petersen (Forschungszentrum Bortsel) für die großzügige Bereitstellung der Api g 1.01/1.02 bzw. Api g 1.02 spezifischen Kaninchenseren und Herrn Dr. Ronald van Ree für die freundliche Bereitstellung des Lol p 12 spezifischen Kaninchen Antiserums.

Möhrensorten				
Verwendung	Sorte	Hersteller	Charakteristika	
Frisch-/ Bundmöhren	Nantaise 2 / Narome	<u>Bi</u>	mittelfrüh, abgestumpft, glatte Haut, gesund	
	Nantaise 2 / Hilmar	<u>Bi</u>	gute Innenqualität, intensiv rot, auch zum Lagern	
	Napoli F1	Bejo	sehr früh, glatt, stabiles, langes Laub	
	Mokum F1	Bejo	sehr früh, schlank, (mittel)-lang, für erste Sätze, auch u.Gl., sehr guter Geschmack	
	Jeanette F1	<u>JW</u>	sehr früh, stabiles Laub, satzweiser Anbau, schön	
	Merida F1	Hi	früh, glatt, lang, guter Geschmack	
	Damco F1	Hi	sehr früh, glatt, gesundes, kräftiges Laub, auch für letzte späte Aussaaten bis Anfang Juli geeignet	
	Infinity F1	Bejo	extrem langer(30cm) Imperator-Typ, knackig, guter Geschmack, auch als gelegte lose Ware in Kiste	
	Waschmöhren	Napoli F1	Bejo	s.o.
		Puma F1	SG	sehr gleichmäßig, bruchfest, auch f. Bund
Nevis F1		Bejo	glatt, relativ gesundes Laub, guter Geschmack, auch f. Bund	
Laguna F1		Hi	frühe, schöne ertragreiche Möhre, Bund- und Kiloware	
Presto F1		NZ	früh, sehr einheitlich, Bund- und Kiloware	
Chambor F1		NZ	frühe Kiloware, bruchfest, guter Geschmack	
Wasch/Lager		Bolero F1	NZ	Standardsorte, Alternaria-tolerant, schön abgestumpft, glatt, sehr guter Geschmack, Vorsicht auf schwarzen und sandigen Böden !
	Nantaise 2 / Fanal	<u>Bi</u>	lang, zylindrisch-abgestumpft, ohne grüne Schultern, glatt, süßer Geschmack, gute, gleichmäßige Durchfärbung, platzgefährdet, empfindliches Laub	
	Nantaise 2 / Hilmar	<u>Bi</u>	s.o.	
	Nantaise 2 / Tito	NZ	gute samenfeste Sorte, guter Geschmack	
	Monanta	RZ	Bund-Wasch-Lager, sehr guter Geschmack, empfindlich auf staunassen Böden	
	Starca F1	Hi	zylindrisch, lagerfähig, kräftiges Laub	
	Anglia F1	SG	bruchfest, schöne Form,	
	Riga F1	RZ	früh, guter Geschmack, stabiler Ertrag,	
	Milor F1	NZ	schöne, einheitliche Wurzelqualität, guter Geschmack	
	Valor F1	NZ	sehr einheitlich, gesund, bruchfest, guter Geschmack, auf leichten, humosen Böden auch als Lagermöhre o. Waschen	
	Major F1	NZ	leicht konische, gut einziehende Überwinterungsmöhre (unter Stroh/Folienabdeckung–Überwinterungsmöhren nur für milde, eher maritime Klimagebiete); guter Geschmack	
	Nevis	<u>Bejo</u>	s.o.	
	Noveno F1	<u>Bejo</u>	sehr gleichmäßig, für Hauptanbau, guter Geschmack	
	Nerac F1	Bejo	bruchfest, uniform, auch nach dem Waschen mit schöner Farbe, robust, für lange Lagerung geeignet	
	Robila	<u>Bi</u>	ausgesprochen süßer, möhrentypischer Geschmack (Sortenamt-getestet), alternariatolerant, für leichte bis mittelschwere Böden, mittlerer Ertrag	
	Rodelika	<u>Bi</u>	besonders Glattschalig, intensiv rot, süß-aromatisch, nur für schwere Böden, ungeeignet auf Moor und Sand	
	Industrie	Rodelika	<u>Bi</u>	s.o., max. 140 Tage Reifezeit
		Rothild	<u>Hi</u>	guter Aufgang, günstiges Saatgut, guter Geschmack
		Karotan	<u>RZ</u>	alter Standard, hoher Karotingehalt, gute Färbeseigenschaft
		Indiana F1	Bejo	lang, zylindrisch, Imperator-Typ f. Scheibenware
Soler F1		Se	Imperatortyp für Scheibenware, stabiles Laub	
Kamaron F1		Bejo	konisch, platzfest, sehr gute Innenfärbung, Scheiben	
Kazan F1		Bejo	konisch, sehr platzfest, Diätkost, Saft	
Kingston F1		Bejo	sehr ertragreich, gute Innenqualität, gute Lagereigenschaften, Alternaria-anfällig!	

Ges.-Gehalte				Null	0,09	TV	Probevol.				Ernte											
Marne				Faktor	2,8	ml Probe	0,1	Meßvol.	50													
Möhren								VF K	21	0,5+10												
Kraut						1ppm	0,794	VF Mg	251	0,04+10	101	0,1+10										
2005								VF Ca	101	0,1+10												
								VF Na	5	2+8	10	1+9										
								VF Fe, Mn	1													
								Cu, Zn														
Probe	Einw.	ml 0.2 n	mg N	Einw.	Ext.	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm
	g	H2SO4	g		882nm	P	K	K	Mg	Mg	Ca	Ca	Na	Na	Fe	Fe	Mn	Mn	Cu	Cu	Zn	Zn
Ro Bio 1	0,5045	6,74	36,91	2,00	0,210	3306	72,35	37984	0,400	2510	8,92	22523	21,0	2625	4,436	110,9	0,772	19,3	0,627	15,7	0,589	14,7
2	0,5056	6,13	33,45	2,00	0,174	2739	82,20	43155	0,375	2353	7,87	19872	21,1	2638	4,001	100,0	0,577	14,4	0,689	17,2	0,738	18,5
3	0,5076	6,74	36,68	2,00	0,165	2598	94,94	49844	0,457	2868	9,05	22851	19,7	2463	4,868	121,7	0,698	17,5	0,501	12,5	0,749	18,7
4	0,5033	6,22	34,10	2,00	0,159	2503	85,13	44693	0,443	2780	9,21	23255	23,8	2975	3,803	95,1	0,633	15,8	0,535	13,4	0,807	20,2
Ne Bio 1	0,5025	6,22	34,16	2,00	0,162	2550	71,63	37606	0,550	3451	11,14	28129	33,5	4188	3,592	89,8	0,713	17,8	0,575	14,4	0,679	17,0
2	0,5003	6,24	34,42	2,00	0,147	2314	73,98	38840	0,529	3319	10,80	27270	32,9	4113	3,365	84,1	0,630	15,8	0,593	14,8	0,809	20,2
3	0,5056	5,99	32,67	2,00	0,135	2125	73,01	38330	0,599	3759	8,80	22220	34,6	4325	4,272	106,8	0,809	20,2	0,343	8,6	0,703	17,6
4	0,5081	6,61	35,93	2,00	0,164	2582	85,66	44972	0,540	3389	8,23	20781	21,3	2663	5,065	126,6	0,728	18,2	0,453	11,3	0,761	19,0
Ro konv. 1	0,5018	7,26	40,01	2,00	0,187	2944	45,97	24134	0,525	3294	9,11	23003	44,4	11100	4,204	105,1	1,136	28,4	0,541	13,5	0,721	18,0
2	0,5036	7,21	39,59	2,00	0,169	2661	54,52	28623	0,512	3213	10,03	25326	38,4	9600	3,707	92,7	1,100	27,5	0,710	17,8	0,705	17,6
3	0,5002	7,52	41,59	2,00	0,172	2708	43,21	22685	0,521	3269	10,18	25705	44,4	11100	4,510	112,8	1,124	28,1	0,628	15,7	0,669	16,7
4	0,5004	7,06	39,00	2,00	0,175	2755	54,59	28660	0,467	2930	9,67	24417	340,1	85025	3,715	92,9	1,124	28,1	0,637	15,9	0,684	17,1
Ne konv. 1	0,5002	6,26	34,54	2,00	0,165	2598	48,29	25352	0,686	4305	10,12	25553	43,6	10900	2,983	74,6	1,092	27,3	0,539	13,5	0,711	17,8
2	0,5000	6,51	35,95	2,00	0,160	2519	48,27	25342	0,663	4160	10,80	27270	43,3	10825	2,973	74,3	1,185	29,6	0,493	12,3	0,724	18,1
3	0,5016	6,24	34,33	2,00	0,161	2535	44,31	23263	0,735	4612	10,42	26311	42,9	10725	2,928	73,2	1,175	29,4	0,449	11,2	0,693	17,3
4	0,5047	6,52	35,67	2,00	0,172	2708	43,88	23037	0,647	4060	10,47	26437	45,3	11325	3,254	81,4	1,340	33,5	0,649	16,2	0,755	18,9

Probe	Einw.	ml 0.2 n	mg N	Einw.	Ext.	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm
	g	H2SO4	g		882nm	P	K	K	Mg	Mg	Ca	Ca	Na	Na	Fe	Fe	Mn	Mn	Cu	Cu	Zn	Zn
Steckrübe																						
1	0,5024	1,51	7,91	2,00	0,274	4314	62,45	32786	0,251	634	7,96	20099	12,8	320	2,211	55,3	0,171	4,3	0,175	4,4	0,568	14,2
2 B-mangel	0,5037	2,88	15,51	2,00	0,341	5368	82,02	43061	0,332	838	9,06	22877	14,9	373	2,534	63,4	0,247	6,2	0,200	5,0	0,821	20,5

Bodenproben	Einw.	Mw	ppm	Einw.	Mw	ppm	Mw	ppm	Einw.	Ext	ppm	Mw	ppm	pH
		50		WH	80				CAL	0,212				
		10			1									
Bio	5,00	0,341	34,1	8,00	0,157	1,6	0,946	9,5	5,00	0,152	37,2	0,946	18,9	7,10
Konv	5,00	1,081	108,1	8,00	0,384	3,8	1,723	17,2	5,00	0,198	47,0	1,723	34,5	7,13

Ges.-Gehalte		Null	0,07	TV			Probevolum.	50																	
Marne		Faktor	1,4		ml Probe	0,1	Meßvol.	50																	
Möhren			2,8				VF K	21	0,5+10																
Kraut					1ppm	0,807	VF Mg	251	0,04+10	101	0,1+10														
2006							VF Ca	101	0,1+10	201	0,05+10	51	0,2+10												
27.06.06							VF Na	5	2+8	10	1+9														
							VF Fe, Mn	1	unv	10	1+9														
							Cu, Zn																		
Probe	Nr.	Einw.	ml 0.1 n	mg N	Einw.	Ext.	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	ppm	MW	
		g	H2SO4	g		882nm	P	K	K	Mg	Mg	Ca	Ca	Na	Na	Fe	Fe	Mn	Mn	Cu	Cu	Zn	Zn		
Ro Bio 1	1	0,5030	13,54	37,49	2,00	0,193	2989	54,94	28844	0,763	4788	10,37	26184	42,3	5288	2,230	55,8	1,264	31,6	0,367	9,2	1,096	27,4		
	2	0,5012	13,35	37,09	2,00	0,229	3547	50,22	26366	0,781	4901	10,34	26109	41,2	5150	2,367	59,2	1,390	34,8	0,374	9,4	1,057	26,4		
	3	0,5034	13,88	38,41	2,00	0,237	3671	53,86	28277	0,737	4625	9,53	24063	38,0	4750	2,321	58,0	1,402	35,1	0,384	9,6	1,102	27,6		
	4	0,5019	14,14	39,25	2,00	0,241	3733	55,83	29311	0,734	4606	9,06	22877	26,3	3288	2,326	58,2	1,479	37,0	0,406	10,2	1,102	27,6		
Ne Bio 1	5	0,5031	13,21	36,57	2,00	0,226	3501	49,61	26045	0,724	4543	9,55	24114	33,0	4125	2,408	60,2	1,410	35,3	0,396	9,9	1,115	27,9		
	2	0,5074	13,16	36,12	2,00	0,228	3532	48,77	25604	0,704	4418	9,51	24013	36,0	4500	2,381	59,5	1,414	35,4	0,391	9,8	1,037	25,9		
	3	0,5013	13,69	38,04	2,00	0,229	3547	54,38	28550	0,814	5108	9,63	24316	26,5	3313	2,350	58,8	1,504	37,6	0,383	9,6	1,044	26,1		
	4	0,5003	13,06	36,35	2,00	0,225	3485	58,78	30860	0,807	5064	10,02	25301	22,3	2788	2,240	56,0	1,621	40,5	0,357	8,9	1,116	27,9		
Ro konv. 1	9	0,5028	13,57	37,59	2,00	0,208	3222	66,03	34666	0,724	4543	10,61	26790	23,9	2988	2,235	55,9	1,280	32,0	0,360	9,0	1,072	26,8		
	2	0,5079	12,94	35,48	2,00	0,204	3160	65,31	34288	0,661	4148	11,41	28810	24,0	3000	2,454	61,4	1,230	30,8	0,367	9,2	0,900	22,5		
	3	0,5018	12,39	34,37	2,00	0,201	3113	69,95	36724	0,646	4054	11,39	28760	23,3	2913	2,657	66,4	1,251	31,3	0,390	9,8	0,930	23,3		
	4	0,5046	12,62	34,82	2,00	0,203	3144	62,44	32781	0,663	4160	10,52	26563	19,2	2400	2,612	65,3	1,220	30,5	0,392	9,8	0,899	22,5		
Ne konv. 1	13	0,5014	11,60	32,19	2,00	0,201	3113	57,60	30240	0,551	3458	12,12	30603	24,5	3063	2,492	62,3	1,490	37,3	0,363	9,1	1,074	26,9		
	2	0,5028	11,89	32,91	2,00	0,194	3005	58,01	30455	0,567	3558	11,99	30275	20,3	2538	3,098	77,5	1,699	42,5	0,408	10,2	1,048	26,2		
	3	0,5094	11,52	31,47	2,00	0,198	3067	57,23	30046	0,722	4531	11,61	29315	27,6	3450	2,916	72,9	1,577	39,4	0,399	10,0	0,944	23,6		
	4	0,5049	11,65	32,11	2,00	0,199	3082	61,66	32372	0,709	4449	11,72	29593	20,6	2575	2,777	69,4	1,575	39,4	0,419	10,5	0,934	23,4		

**KR=Konventionell Rodelika, KN=Konventionell Nerac, ÖR=Ökologisch Rodelika;
ÖN=Ökologisch Nerac, 1,2,3,4=Parzellenummerierung einer Anbaufläche**

Sample registration BOL project

Samples	Comments	Extract number
KR1 Single1	1 big	1,2,3
KR1 Single2	2 big	4,5,6
KR1 Single3	3 big	7,8,9
KR1 Single4	4 big	10,11,12
KR1 Single5	5 big	13,14,15
KR1 Single6	6 small	16,17,18
KR1 Single7	7 small	19,20,21
KR1 Single8	8 small	22,23,24
KR1 Single9	9 small	25,26,27
KR1 Single10	10 small	28,29,30
KR1 MIX	11	31,32,33
KR2MIX	12 2 carrots with worm wounds	34,35,36
KR3MIX	13	37,38,39
KR4MIX	14 1 carrot with worm wounds	40,41,42
KN1 Single1	15 big	43,44,45
KN1 Single2	16 big	46,47,48
KN1 Single3	17 big	49,50,51
KN1 Single4	18 big	52,53,54
KN1 Single5	19 big	55,56,57
KN1 Single6	20 small	58,59,60
KN1 Single7	21 small	61,62,63
KN1 Single8	22 small	64,65,66
KN1 Single9	23 small	67,68,69
KN1 Single10	24 small	70,71,72
KN1 MIX	25	73,74,75
KN2MIX	26	76,77,78
KN3MIX	27 Decapitated for longer time	79,80,81
KN4MIX	28 Slower frozen	82,83,84
OR1 single1	29 big	85,86,87
OR1 single2	30 big	88,89,90
OR1 single3	31 big	91,92,93
OR1 single4	32 big	94,95,96
OR1 single5	33 big No shuttling in last 15 min of extraction	97,98,99
OR1 single6	34 Small No shuttling in 2nd 15 min of extraction	100,101,102
OR1 single7	35 small - sample is finished	103,104,105
ÖR1 single8	36 small	106,107,108
OR1 single9	37 small	109,110,111
ÖR1 single10	38 small	112,113,114
ÖR1 MIX	39	115,116,117
OR2MIX	40	118,119,120
ÖR3MIX	41	121,122,123
ÖR4MIX	42	124,125,126
ÖN1 single1	43 big	127,128,129
ON1 single2	44 big	130,131,132
ÖN1 single3	45 big	133,134,135
ÖN1 single4	46 big	136,137,138
ON1 single5	47 big	139,140,141
ÖN1 single6	48 small	142,143,144
ÖN1 single7	49 small	145,146,147
ON1 single8	50 small	148,149,150
ÖN1 single9	51 small	151,152,153
ÖN1 single10	52 small	154,155,156
ON1 MIX	53	157,158,159
ÖN2MIX	54	160,161,162
ON3MIX	55	163,164,165
ÖN4MIX	56	166,167,168

Gegenüberstellung der Transkriptionslevel potentieller HKG bei unterschiedlichen Gewebetypen aus 3 verschiedenen Möhren

Proben: Möhren N1, N2, L. **Gewebe:** S = Schale; Sp = Speicherparenchym; Z = Zentralzylinder. Ct-Werte für einen Gesamt- RNA Gehalt von 1 ng.

Strukturgene: Actin, RibProtS10, RibProt S15a f/r, RibProtS15a S_A, Tubilin. **Stoffwechselfgene:** GAPDH, Ubiquitin.

Probe / PCR-System	N1S1			N1S2			N1Sp1			N1Sp2			N1Z1			N1Z2		
	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz
GAPDH	21,91	-3,27	1,02	21,69	-3,33	1,00	23,13	-3,59	0,90	23,49	-3,45	0,95	23,96	-2,90	1,21	23,28	-3,47	0,94
Ubiquitin	23,66	-3,58	0,90	23,81	-3,12	1,09	24,22	-3,42	0,96	24,46	-3,16	1,07	24,95	-2,86	1,24	24,38	-3,75	0,85
RibProt S15a f/r	24,51	-3,15	1,07	24,64	-3,39	0,97	25,34	-4,22	0,73	25,55	-3,09	1,11	26,50	-2,75	1,31	25,55	-3,19	1,06
RibProtS15a S_A	24,39	-3,37	0,98	24,64	-3,87	0,81	25,31	-2,91	1,20	25,67	-3,29	1,01	26,13	-2,87	1,23	25,24	-3,59	0,90
Tubilin	25,71	-3,25	1,03	25,79	-3,39	0,97	26,16	-3,47	0,94	26,21	-3,36	0,99	26,71	-3,28	1,02	26,15	-3,26	1,02
Actin	25,78	-3,06	1,12	25,79	-3,41	0,97	26,36	-3,41	0,97	26,37	-3,25	1,03	26,83	-3,29	1,02	25,97	-3,48	0,94
RibProtS10	28,68	-3,05	1,13	29,08	-3,78	0,84	29,08	-3,03	1,14	30,04	-3,40	0,97	30,45	-2,08	2,02	29,68	-3,44	0,95

Probe / PCR-System	N2S1			N2S2			N2Sp1			N2Sp2			N2Z1			N2Z2		
	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz
GAPDH	23,62	-3,64	0,88	23,45	-3,91	0,80	23,95	-2,60	1,42	22,66	-3,77	0,84	23,03	-3,68	0,87	23,92	-3,44	0,95
Ubiquitin	24,25	-3,87	0,81	24,28	-3,35	0,99	24,48	-2,74	1,32	23,22	-3,83	0,82	24,44	-3,77	0,84	24,80	-3,55	0,91
RibProt S15a f/r	25,66	-3,41	0,96	25,46	-3,26	1,03	26,03	-3,16	1,07	24,75	-3,36	0,98	25,16	-3,78	0,84	25,88	-3,44	0,95
RibProtS15a S_A	25,21	-3,06	1,12	25,12	-3,16	1,07	25,58	-2,81	1,27	24,55	-4,13	0,75	25,18	-3,59	0,90	25,70	-3,51	0,93
Tubilin	26,17	-2,86	1,24	26,43	-3,37	0,98	26,48	-3,15	1,08	25,77	-3,70	0,86	25,72	-3,60	0,90	26,46	-3,76	0,84
Actin	25,95	-3,00	1,15	25,65	-3,51	0,93	26,63	-2,91	1,21	25,89	-4,45	0,68	25,88	-3,15	1,08	26,38	-3,56	0,91
RibProtS10	28,76	-2,69	1,35	29,41	-3,22	1,04	29,59	-2,89	1,22	28,50	-3,40	0,97	28,86	-2,97	1,17	29,81	-3,71	0,86

Probe / PCR-System	LS1			LS2			LSp1			LSp2			LZ1			LZ2		
	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz	Ct-Wert	Steigung	Effizienz
GAPDH	21,36	-3,20	1,06	21,60	-3,07	1,12	22,58	-3,13	1,09	22,11	-3,48	0,94	22,20	-3,45	0,95	22,41	-3,38	0,98
Ubiquitin	22,95	-3,87	0,81	23,20	-3,02	1,14	23,79	-3,61	0,89	23,55	-3,83	0,82	23,41	-3,73	0,85	23,51	-3,98	0,78
RibProt S15a f/r	24,28	-3,60	0,90	24,28	-3,07	1,12	26,60	-3,64	0,88	26,29	-3,20	1,05	24,72	-3,59	0,90	24,76	-3,56	0,91
RibProtS15a S_A	24,16	-3,33	1,00	24,29	-3,05	1,13	26,29	-3,04	1,13	25,79	-3,16	1,07	24,84	-3,21	1,05	24,69	-3,53	0,92
Tubilin	24,92	-3,01	1,15	25,01	-3,12	1,09	24,70	-3,22	1,05	24,42	-3,19	1,06	26,49	-3,38	0,98	26,50	-3,01	1,15
Actin	26,20	-2,97	1,17	25,71	-3,25	1,03	24,78	-3,06	1,12	24,41	-3,21	1,05	26,51	-3,54	0,92	26,82	-3,39	0,97
RibProtS10	28,42	-2,69	1,35	29,21	-3,38	0,98	29,19	-2,86	1,24	28,97	-3,39	0,97	30,00	-3,12	1,09	30,36	-3,50	0,93

CT-Werte für die real time PCR mit dem System GAPDH und Dau c 1.01 mit Mischproben (n=20 Möhren/Probe) - Ernte 2005¹

1.

RT PCR System Dau c GAPDH - Extraktion 31-42								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	11	31_10	22,67	22,59	22,83	22,70	0,12	0,54
Konv. Rodelika.	11	32_10	21,97	22,02	21,87	21,95	0,08	0,35
Konv. Rodelika	11	33_10	22,04	21,92	21,98	21,98	0,06	0,27
Konv. Rodelika	12	34_10	22,41	22,55	22,52	22,49	0,07	0,32
Konv. Rodelika	12	35_10	22,28	22,24	22,21	22,24	0,03	0,14
Konv. Rodelika	12	36_10	22,42	22,45	22,47	22,44	0,03	0,12
Konv. Rodelika	13	37_10	22,15	22,25	22,19	22,20	0,05	0,21
Konv. Rodelika	13	38_10	22,05	22,00	22,18	22,07	0,09	0,42
Konv. Rodelika	13	39_10	22,11	22,13	22,18	22,14	0,03	0,15
Konv. Rodelika	14	40_10	22,01	22,04	22,09	22,05	0,04	0,18
Konv. Rodelika	14	41_10	22,28	22,33	22,24	22,28	0,05	0,22
Konv. Rodelika	14	42_10	22,22	22,04	22,27	22,17	0,12	0,55
Mittelwert						22,23		

2.

RT PCR System Dau c 1.01 - Extraktion 31-42								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	11	31_10	19,85	19,74	19,68	19,76	0,09	0,43
Konv. Rodelika.	11	32_10	19,10	19,20	19,44	19,24	0,17	0,90
Konv. Rodelika	11	33_10	19,15	19,27	19,20	19,21	0,06	0,33
Konv. Rodelika	12	34_10	19,61	19,40	19,62	19,54	0,12	0,63
Konv. Rodelika	12	35_10	19,20	18,88	18,95	19,01	0,17	0,89
Konv. Rodelika	12	36_10	20,17	19,19	19,17	19,51	0,57	2,94
Konv. Rodelika	13	37_10	19,22	19,06	19,01	19,09	0,11	0,57
Konv. Rodelika	13	38_10	18,95	19,17	19,56	19,22	0,31	1,62
Konv. Rodelika	13	39_10	19,12	19,19	19,06	19,12	0,06	0,33
Konv. Rodelika	14	40_10	18,94	18,82	18,95	18,90	0,07	0,38
Konv. Rodelika	14	41_10	18,94	18,65	18,92	18,84	0,16	0,85
Konv. Rodelika	14	42_10	19,14	19,06	19,05	19,08	0,05	0,25
Mittelwert						19,21		

¹ Alle Werte bestimmt bei Einsatz von 10 ng DNA in die PCR und drei unabhängigen Extraktionen pro Probe; Werte A-C = Dreifachbestimmung pro Probe; Proben 1-10 / 15-24 / 29-38 / 43-52 (Einzelproben: 5 große und 5 kleine Möhren) wurden ausschließlich immunologisch untersucht

3.

RT PCR System Dau c GAPDH - Extraktion 73-84								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	25	73_10	21,58	21,34	21,37	21,43	0,13	0,60
Konv. Nerac	25	74_10	21,45	21,43	21,27	21,38	0,10	0,45
Konv. Nerac	25	75_10	21,91	21,81	21,83	21,85	0,05	0,24
Konv. Nerac	26	76_10	21,61	21,34	21,53	21,49	0,14	0,66
Konv. Nerac	26	77_10	21,64	21,81	21,68	21,71	0,09	0,43
Konv. Nerac	26	78_10	21,20	20,77	20,96	20,98	0,22	1,04
Konv. Nerac	27	79_10	21,37	21,50	21,51	21,46	0,08	0,35
Konv. Nerac	27	80_10	21,95	22,06	22,12	22,04	0,08	0,38
Konv. Nerac	27	81_10	21,52	21,64	21,40	21,52	0,12	0,56
Konv. Nerac	28	82_10	21,85	21,86	21,86	21,86	0,01	0,03
Konv. Nerac	28	83_10	21,82	21,91	21,86	21,86	0,05	0,21
Konv. Nerac	28	84_10	21,24	21,10	21,12	21,15	0,08	0,36
Mittelwert						21,56		

4.

RT PCR System Dau c 1.01 - Extraktion 73-84								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	25	73_10	18,10	18,08	18,11	18,09	0,01	0,08
Konv. Nerac	25	74_10	17,92	17,83	17,70	17,82	0,11	0,62
Konv. Nerac	25	75_10	17,92	18,50	18,26	18,23	0,29	1,61
Konv. Nerac	26	76_10	17,79	18,13	17,98	17,97	0,17	0,93
Konv. Nerac	26	77_10	18,40	18,41	18,21	18,34	0,11	0,61
Konv. Nerac	26	78_10	17,66	17,73	17,63	17,67	0,05	0,29
Konv. Nerac	27	79_10	18,23	18,03	18,42	18,23	0,19	1,06
Konv. Nerac	27	80_10	19,37	19,05	19,01	19,14	0,19	1,02
Konv. Nerac	27	81_10	18,76	18,56	18,12	18,48	0,33	1,78
Konv. Nerac	28	82_10	18,30	18,60	18,34	18,42	0,16	0,89
Konv. Nerac	28	83_10	18,53	18,91	18,85	18,76	0,21	1,10
Konv. Nerac	28	84_10	17,65	17,75	17,80	17,73	0,08	0,43
Mittelwert						18,24		

5.

RT PCR System Dau c GAPDH - Extraktion 115-126								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Rodelika	39	115_10	22,21	21,97	22,09	22,09	0,12	0,55
Öko-Rodelika	39	116_10	22,12	22,22	22,24	22,19	0,06	0,29
Öko-Rodelika	39	117_10	22,11	22,07	22,04	22,07	0,04	0,17
Öko-Rodelika	40	118_10	22,21	22,36	22,27	22,28	0,08	0,34
Öko-Rodelika	40	119_10	22,04	22,00	21,94	21,99	0,05	0,23
Öko-Rodelika	40	120_10	21,91	22,02	21,95	21,96	0,06	0,25
Öko-Rodelika	41	121_10	22,15	22,14	22,00	22,10	0,08	0,37
Öko-Rodelika	41	122_10	22,32	22,35	22,29	22,32	0,03	0,13
Öko-Rodelika	41	123_10	22,09	21,91	21,76	21,92	0,17	0,76
Öko-Rodelika	42	124_10	23,04	22,95	22,92	22,97	0,06	0,28
Öko-Rodelika	42	125_10	22,23	22,40	22,38	22,34	0,09	0,41
Öko-Rodelika	42	126_10	22,56	22,38	22,48	22,47	0,09	0,40
Mittelwert						22,23		

6.

RT PCR System Dau c 1.01 - Extraktion 115-126								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Rodelika	39	115_10	18,50	18,78	18,74	18,68	0,15	0,81
Öko-Rodelika	39	116_10	18,86	18,67	18,67	18,73	0,11	0,59
Öko-Rodelika	39	117_10	18,69	18,27	18,52	18,49	0,22	1,16
Öko-Rodelika	40	118_10	18,65	18,91	18,99	18,85	0,18	0,94
Öko-Rodelika	40	119_10	18,51	18,45	18,33	18,43	0,09	0,49
Öko-Rodelika	40	120_10	18,72	18,62	18,52	18,62	0,10	0,55
Öko-Rodelika	41	121_10	18,89	18,82	19,09	18,93	0,14	0,75
Öko-Rodelika	41	122_10	19,16	19,17	34,84	19,17	0,00	0,01
Öko-Rodelika	41	123_10	18,86	18,62	18,68	18,72	0,13	0,68
Öko-Rodelika	42	124_10	20,16	19,47	19,75	19,79	0,35	1,75
Öko-Rodelika	42	125_10	19,60	19,24	19,37	19,40	0,19	0,95
Öko-Rodelika	42	126_10	19,53	19,43	19,50	19,49	0,05	0,27
Mittelwert						18,94		

7.

RT PCR System Dau c GAPDH - Extraktion 157-168								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Nerac	53	157_10	22,32	22,45	22,45	22,41	0,07	0,33
Öko-Nerac	53	158_10	21,90	21,58	21,76	21,74	0,16	0,74
Öko-Nerac	53	159_10	21,70	22,01	21,91	21,87	0,16	0,73
Öko-Nerac	54	160_10	22,14	22,31	22,20	22,21	0,09	0,40
Öko-Nerac	54	161_10	22,04	22,02	22,12	22,06	0,05	0,25
Öko-Nerac	54	162_10	21,97	21,98	22,09	22,01	0,07	0,30
Öko-Nerac	55	163_10	22,58	22,75	22,66	22,67	0,09	0,38
Öko-Nerac	55	164_10	22,01	22,06	22,12	22,06	0,06	0,25
Öko-Nerac	55	165_10	22,35	22,02	22,21	22,19	0,17	0,75
Öko-Nerac	56	166_10	22,00	22,14	22,17	22,10	0,09	0,42
Öko-Nerac	56	167_10	22,31	22,15	22,22	22,23	0,08	0,35
Öko-Nerac	56	168_10	22,31	22,27	22,16	22,25	0,08	0,34
Mittelwert						22,15		

8.

RT PCR System Dau c 1.01 - Extraktion 157-168								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Nerac	53	157_10	19,35	19,41	19,24	19,33	0,09	0,45
Öko-Nerac	53	158_10	18,64	18,71	18,77	18,71	0,06	0,34
Öko-Nerac	53	159_10	18,85	18,87	18,75	18,82	0,07	0,36
Öko-Nerac	54	160_10	19,09	18,94	19,02	19,02	0,07	0,38
Öko-Nerac	54	161_10	18,93	18,91	18,56	18,80	0,21	1,11
Öko-Nerac	54	162_10	18,43	18,47	18,85	18,58	0,23	1,25
Öko-Nerac	55	163_10	19,53	19,47	19,28	19,42	0,13	0,68
Öko-Nerac	55	164_10	18,95	18,98	18,81	18,91	0,09	0,50
Öko-Nerac	55	165_10	18,94	18,84	18,77	18,85	0,09	0,46
Öko-Nerac	56	166_10	18,59	18,67	18,77	18,68	0,09	0,46
Öko-Nerac	56	167_10	18,75	18,55	18,74	18,68	0,11	0,61
Öko-Nerac	56	168_10	20,08	18,91	19,05	19,34	0,64	3,30
Mittelwert						18,93		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System GAPDH und Dau c 1.02 mit Mischproben (n=20 Möhren/Probe) - Ernte 2005¹

1.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakte No. 31-42								
Feld	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	11	31_10	22,88	22,98	22,82	22,89	0,08	0,34
Konv. Rodelika	11	32_10	22,08	22,13	21,86	22,02	0,14	0,64
Konv. Rodelika	11	33_10	22,51	22,45	22,31	22,42	0,10	0,46
Konv. Rodelika	12	34_10	22,87	22,81	22,82	22,83	0,03	0,14
Konv. Rodelika	12	35_10	22,44	22,57	22,74	22,58	0,15	0,67
Konv. Rodelika	12	36_10	22,68	22,66	22,56	22,63	0,06	0,28
Konv. Rodelika	13	37_10	22,72	22,62	22,63	22,66	0,06	0,26
Konv. Rodelika	13	38_10	22,25	22,47	22,25	22,32	0,12	0,56
Konv. Rodelika	13	39_10	22,24	22,16	22,26	22,22	0,06	0,25
Konv. Rodelika	14	40_10	22,01	21,96	22,05	22,00	0,04	0,20
Konv. Rodelika	14	41_10	22,32	22,25	22,36	22,31	0,06	0,26
Konv. Rodelika	14	42_10	22,27	22,35	22,26	22,29	0,04	0,20
Mittelwert						22,43		

2.

RT PCR System Dau c 1.02 – Extrakte No. 31-42								
Feld	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	11	31_10	22,22	22,33	22,42	22,32	0,10	0,44
Konv. Rodelika	11	32_10	21,77	21,90	21,77	21,81	0,07	0,33
Konv. Rodelika	11	33_10	22,15	22,23	22,04	22,14	0,10	0,43
Konv. Rodelika	12	34_10	22,76	22,64	22,50	22,63	0,13	0,58
Konv. Rodelika	12	35_10	22,28	22,14	22,50	22,30	0,18	0,81
Konv. Rodelika	12	36_10	22,59	22,36	22,38	22,44	0,13	0,56
Konv. Rodelika	13	37_10	22,20	21,80	21,95	21,98	0,20	0,93
Konv. Rodelika	13	38_10	21,74	21,81	21,63	21,73	0,09	0,41
Konv. Rodelika	13	39_10	21,51	21,41	21,70	21,54	0,15	0,70
Konv. Rodelika	14	40_10	21,58	21,74	21,75	21,69	0,09	0,43
Konv. Rodelika	14	41_10	22,50	21,96	21,71	22,06	0,41	1,85
Konv. Rodelika	14	42_10	22,02	21,67	21,53	21,74	0,25	1,16
Mittelwert						22,03		

¹ Alle Werte bestimmt bei Einsatz von 10 ng DNA in die PCR und drei unabhängigen Extraktionen pro Probe; Werte A-C = Dreifachbestimmung pro Probe; Proben 1-10 / 15-24 / 29-38 / 43-52 (Einzelproben: 5 große und 5 kleine Möhren) wurden ausschließlich immunologisch untersucht

3.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakte No. 75-84								
Feld	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	25	73_10	21,42	21,53	21,51	21,49	0,06	0,28
Konv. Nerac	25	74_10	21,6	21,4	21,5	21,52	0,11	0,50
Konv. Nerac	25	75_10	21,81	21,90	21,85	21,85	0,04	0,20
Konv. Nerac	26	76_10	21,38	21,44	21,34	21,38	0,05	0,23
Konv. Nerac	26	77_10	21,87	21,84	21,86	21,86	0,02	0,08
Konv. Nerac	26	78_10	21,14	21,18	21,07	21,13	0,06	0,26
Konv. Nerac	27	79_10	21,67	21,46	21,57	21,57	0,10	0,48
Konv. Nerac	27	80_10	22,09	22,33	22,18	22,20	0,12	0,54
Konv. Nerac	27	81_10	21,88	22,07	21,79	21,92	0,14	0,66
Konv. Nerac	28	82_10	21,89	21,93	22,08	21,96	0,10	0,46
Konv. Nerac	28	83_10	21,93	22,04	22,02	22,00	0,06	0,26
Konv. Nerac	28	84_10	21,13	21,34	21,17	21,21	0,11	0,52
Mittelwert						21,67		

4.

RT PCR System Dau c 1.02 - Extrakte No. 75-84								
Probe	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	25	73_10	24,02	24,01	24,1	24,04	0,05	0,22
Konv. Nerac	25	74_10	24,93	24,82	24,87	24,87	0,06	0,22
Konv. Nerac	25	75_10	24,86	24,85	24,89	24,86	0,02	0,08
Konv. Nerac	26	76_10	24,08	24,15	24,26	24,16	0,09	0,37
Konv. Nerac	26	77_10	24,48	24,32	24,05	24,28	0,22	0,89
Konv. Nerac	26	78_10	23,58	23,51	23,27	23,45	0,16	0,70
Konv. Nerac	27	79_10	23,58	23,67	23,94	23,73	0,19	0,81
Konv. Nerac	27	80_10	24,42	24,64	24,56	24,54	0,11	0,44
Konv. Nerac	27	81_10	24,46	24,14	24,32	24,31	0,16	0,67
Konv. Nerac	28	82_10	24,49	24,38	24,29	24,39	0,10	0,41
Konv. Nerac	28	83_10	24,63	24,62	24,45	24,57	0,10	0,40
Konv. Nerac	28	84_10	23,65	23,73	23,89	23,76	0,12	0,52
Mittelwert						24,25		

5.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 115-126								
Feld	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko Rodelika	39	115_10	22,25	22,20	22,22	22,22	0,02	0,11
Öko Rodelika	39	116_10	22,40	22,26	22,09	22,25	0,15	0,69
Öko Rodelika	39	117_10	22,08	22,00	22,12	22,06	0,06	0,28
Öko Rodelika	40	118_10	22,21	22,43	22,22	22,29	0,13	0,56
Öko Rodelika	40	119_10	22,05	22,08	21,84	21,99	0,13	0,59
Öko Rodelika	40	120_10	21,95	22,04	21,81	21,93	0,12	0,53
Öko Rodelika	41	121_10	22,44	22,33	22,30	22,35	0,07	0,33
Öko Rodelika	41	122_10	22,34	22,29	22,29	22,30	0,03	0,12
Öko Rodelika	41	123_10	21,93	22,03	22,02	21,99	0,06	0,25
Öko Rodelika	42	124_10	22,87	22,86	22,88	22,87	0,01	0,03
Öko Rodelika	42	125_10	22,61	22,73	22,61	22,65	0,07	0,31
Öko Rodelika	42	126_10	22,58	22,61	22,65	22,61	0,04	0,17
Mittelwert						22,29		

6.

RT PCR System Dau c 1.02 - Extrakt No. 115-126								
Feld	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko Rodelika	39	115_10	22,40	22,01	21,85	22,09	0,28	1,26
Öko Rodelika	39	116_10	21,87	21,86	21,86	21,86	0,00	0,02
Öko Rodelika	39	117_10	21,37	21,48	21,74	21,53	0,19	0,90
Öko Rodelika	40	118_10	22,46	22,37	22,33	22,39	0,07	0,30
Öko Rodelika	40	119_10	21,94	22,00	22,15	22,03	0,11	0,50
Öko Rodelika	40	120_10	22,10	22,24	22,29	22,21	0,10	0,43
Öko Rodelika	41	121_10	22,45	22,36	22,42	22,41	0,05	0,20
Öko Rodelika	41	122_10	22,22	21,93	22,01	22,05	0,15	0,67
Öko Rodelika	41	123_10	21,66	21,73	21,61	21,66	0,06	0,28
Öko Rodelika	42	124_10	22,70	22,79	22,73	22,74	0,05	0,20
Öko Rodelika	42	125_10	22,68	22,57	22,57	22,61	0,06	0,27
Öko Rodelika	42	126_10	22,42	22,30	22,21	22,31	0,11	0,48
Mittelwert						22,16		

7.

RT PCR System Dau c GAPDH - Extrakt 157-168								
Field	Probe	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko. Nerac	53	157_10	22,36	22,50	22,40	22,42	0,07	0,32
Öko. Nerac	53	158_10	21,77	21,74	21,65	21,72	0,06	0,29
Öko. Nerac	53	159_10	21,92	21,85	21,81	21,86	0,06	0,27
Öko. Nerac	54	160_10	22,11	22,11	22,08	22,10	0,02	0,09
Öko. Nerac	54	161_10	22,24	22,36	22,24	22,28	0,07	0,33
Öko. Nerac	54	162_10	22,03	22,10	22,00	22,05	0,05	0,24
Öko. Nerac	55	163_10	22,94	23,01	22,84	22,93	0,09	0,38
Öko. Nerac	55	164_10	22,12	22,30	22,17	22,19	0,09	0,41
Öko. Nerac	55	165_10	22,45	22,59	22,57	22,54	0,08	0,34
Öko. Nerac	56	166_10	22,39	22,46	22,48	22,44	0,05	0,22
Öko. Nerac	56	167_10	22,55	22,50	22,63	22,56	0,06	0,29
Öko. Nerac	56	168_10	22,44	22,42	22,37	22,41	0,04	0,16
Mittelwert						22,29		

8.

RT PCR System Dau c 1.02 - Extrakt No. 157-168								
Field	Sample	Extract no. RNA	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko. Nerac	53	157_10	24,73	24,68	24,78	24,73	0,05	0,20
Öko. Nerac	53	158_10	24,05	24,27	24,26	24,19	0,12	0,50
Öko. Nerac	53	159_10	24,99	24,42	24,41	24,60	0,33	1,36
Öko. Nerac	54	160_10	24,82	24,59	24,92	24,78	0,17	0,67
Öko. Nerac	54	161_10	24,61	24,47	24,76	24,61	0,15	0,59
Öko. Nerac	54	162_10	24,81	24,91	24,91	24,88	0,06	0,23
Öko. Nerac	55	163_10	25,38	25,52	25,64	25,51	0,13	0,52
Öko. Nerac	55	164_10	24,82	24,77	24,68	24,76	0,07	0,29
Öko. Nerac	55	165_10	25,74	25,48	25,39	25,54	0,18	0,72
Öko. Nerac	56	166_10	24,64	24,48	24,34	24,49	0,15	0,61
Öko. Nerac	56	167_10	24,20	24,18	24,36	24,24	0,10	0,41
Öko. Nerac	56	168_10	24,47	24,35	24,46	24,42	0,06	0,27
Mittelwert						24,73		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System GAPDH und Dau c 1.01 mit Mischproben (n=20 Möhren/Probe) - Ernte 2006¹

1.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 1-12								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	1	1_10	25,27	25,17	25,13	25,19	0,06	0,23
Konv. Rodelika.	1	2_10	25,30	25,33	25,18	25,27	0,07	0,26
Konv. Rodelika	1	3_10	25,57	25,74	25,58	25,63	0,08	0,31
Konv. Rodelika	2	4_10	25,33	25,39	25,49	25,40	0,07	0,26
Konv. Rodelika	2	5_10	25,08	25,15	25,13	25,12	0,03	0,13
Konv. Rodelika	2	6_10	25,04	25,03	25,03	25,04	0,00	0,01
Konv. Rodelika	3	7_10	25,34	25,35	25,29	25,33	0,03	0,10
Konv. Rodelika	3	8_10	24,57	24,73	24,64	24,64	0,06	0,26
Konv. Rodelika	3	9_10	25,14	25,16	25,23	25,18	0,04	0,15
Konv. Rodelika	4	10_10	24,99	24,80	24,84	24,88	0,08	0,34
Konv. Rodelika	4	11_10	24,99	25,13	25,14	25,08	0,07	0,28
Konv. Rodelika	4	12_10	24,82	24,93	24,64	24,80	0,12	0,47
Mittelwert						25,13		

2,

RT PCR System Dau c 1.01 – Extrakt No. 1-12								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	1	1_10	22,27	22,56	22,65	22,49	0,16	0,73
Konv. Rodelika.	1	2_10	22,88	22,71	22,77	22,79	0,07	0,30
Konv. Rodelika	1	3_10	22,95	23,23	22,65	22,94	0,24	1,05
Konv. Rodelika	2	4_10	22,49	22,44	22,06	22,33	0,19	0,86
Konv. Rodelika	2	5_10	22,48	22,54	22,48	22,50	0,03	0,13
Konv. Rodelika	2	6_10	22,27	22,44	22,71	22,47	0,18	0,79
Konv. Rodelika	3	7_10	22,27	22,28	22,31	22,29	0,02	0,08
Konv. Rodelika	3	8_10	22,13	21,88	21,92	21,98	0,11	0,49
Konv. Rodelika	3	9_10	22,58	22,28	22,32	22,39	0,14	0,61
Konv. Rodelika	4	10_10	21,84	22,06	22,47	22,12	0,26	1,18
Konv. Rodelika	4	11_10	22,44	22,39	22,19	22,34	0,11	0,48
Konv. Rodelika	4	12_10	22,17	22,61	22,43	22,40	0,18	0,80
Mittelwert						22,42		

¹ Alle Werte bestimmt bei Einsatz von 10 ng DNA in die PCR und drei unabhängigen Extraktionen pro Probe; Werte A-C = Dreifachbestimmung pro Probe

CT-Werte für die real time PCR mit dem System Dau c 1.01 nach reverser Transkriptase (Ernte 2006)

3.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 13-24								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	5	13_10	24,30	24,56	24,62	24,49	0,14	0,56
Konv. Nerac	5	14_10	25,20	25,20	25,16	25,19	0,02	0,09
Konv. Nerac	5	15_10	24,13	24,37	24,22	24,24	0,10	0,41
Konv. Nerac	6	16_10	24,24	24,37	24,00	24,20	0,15	0,63
Konv. Nerac	6	17_10	25,60	25,76	25,66	25,68	0,07	0,26
Konv. Nerac	6	18_10	24,84	25,00	24,87	24,91	0,07	0,28
Konv. Nerac	7	19_10	25,22	25,08	25,02	25,11	0,08	0,33
Konv. Nerac	7	20_10	24,59	24,63	24,55	24,59	0,03	0,13
Konv. Nerac	7	21_10	25,98	26,07	25,98	26,01	0,05	0,17
Konv. Nerac	8	22_10	25,17	25,07	25,06	25,10	0,05	0,20
Konv. Nerac	8	23_10	24,55	24,42	24,25	24,41	0,12	0,51
Konv. Nerac	8	24_10	24,27	24,14	24,15	24,18	0,06	0,24
Mittelwert						24,84		

4.

RT PCR System Dau c 1.01 – Extrakt No. 13-24								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	5	13_10	22,31	21,98	22,19	22,16	0,14	0,62
Konv. Nerac	5	14_10	22,64	22,59	24,68	23,30	0,97	4,18
Konv. Nerac	5	15_10	20,47	20,62	21,13	20,74	0,28	1,36
Konv. Nerac	6	16_10	21,43	21,28	21,26	21,32	0,07	0,35
Konv. Nerac	6	17_10	22,74	22,69	22,73	22,72	0,02	0,10
Konv. Nerac	6	18_10	22,21	21,60	21,48	21,76	0,32	1,48
Konv. Nerac	7	19_10	21,04	21,25	21,49	21,26	0,19	0,88
Konv. Nerac	7	20_10	21,77	21,64	21,57	21,66	0,08	0,39
Konv. Nerac	7	21_10	23,14	23,13	22,95	23,07	0,09	0,39
Konv. Nerac	8	22_10	21,52	21,33	21,43	21,43	0,08	0,36
Konv. Nerac	8	23_10	21,52	21,16	21,04	21,24	0,20	0,96
Konv. Nerac	8	24_10	21,33	21,18	21,64	21,38	0,19	0,90
Mittelwert						21,84		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System Dau c 1.01 nach reverser Transkriptase (Ernte 2006)

5.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 25-36								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Rodelika	9	25_10	24,89	25,34	25,07	25,10	0,18	0,73
Öko-Rodelika	9	26_10	25,05	24,88	24,55	24,83	0,21	0,83
Öko-Rodelika	9	27_10	24,47	24,90	24,82	24,73	0,19	0,75
Öko-Rodelika	10	28_10	24,36	24,54	24,37	24,42	0,08	0,33
Öko-Rodelika	10	29_10	25,21	25,42	25,15	25,26	0,12	0,46
Öko-Rodelika	10	30_10	25,11	25,11	24,86	25,03	0,12	0,48
Öko-Rodelika	11	31_10	24,57	24,45	24,60	24,54	0,06	0,26
Öko-Rodelika	11	32_10	25,40	25,43	25,34	25,39	0,04	0,15
Öko-Rodelika	11	33_10	24,82	24,99	24,79	24,87	0,09	0,35
Öko-Rodelika	12	34_10	25,31	25,28	25,19	25,26	0,05	0,20
Öko-Rodelika	12	35_10	25,27	25,34	25,35	25,32	0,03	0,13
Öko-Rodelika	12	36_10	25,37	25,10	25,09	25,19	0,13	0,51
Mittelwert						24,99		

6.

RT PCR System Dau c1.01 – Extrakt No. 25-36								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Rodelika	9	25_10	21,71	21,68	21,88	21,76	0,09	0,41
Öko-Rodelika	9	26_10	22,10	22,04	22,18	22,11	0,06	0,26
Öko-Rodelika	9	27_10	22,09	21,96	21,94	22,00	0,07	0,30
Öko-Rodelika	10	28_10	21,39	21,69	22,20	21,76	0,33	1,53
Öko-Rodelika	10	29_10	21,98	22,25	22,06	22,10	0,11	0,50
Öko-Rodelika	10	30_10	22,03	21,78	21,67	21,83	0,15	0,68
Öko-Rodelika	11	31_10	22,10	21,92	21,94	21,99	0,08	0,36
Öko-Rodelika	11	32_10	22,44	22,05	21,96	22,15	0,21	0,93
Öko-Rodelika	11	33_10	21,31	21,60	21,74	21,55	0,18	0,82
Öko-Rodelika	12	34_10	22,47	22,33	22,12	22,31	0,14	0,64
Öko-Rodelika	12	35_10	21,91	22,45	22,26	22,20	0,22	1,01
Öko-Rodelika	12	36_10	22,10	22,23	22,17	22,16	0,05	0,25
Mittelwert						21,99		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System Dau c 1.01 nach reverser Transkriptase (Ernte 2006)

7.

RT PCR System Dau cGAPDH – Extrakt No. 37-48								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Nerac	13	37_10	25,07	25,20	25,20	25,15	0,06	0,25
Öko-Nerac	13	38_10	24,88	24,79	24,79	24,82	0,04	0,16
Öko-Nerac	13	39_10	25,65	25,70	25,62	25,65	0,03	0,13
Öko-Nerac	14	40_10	25,28	25,21	25,01	25,17	0,11	0,45
Öko-Nerac	14	41_10	24,43	24,89	24,92	24,75	0,23	0,91
Öko-Nerac	14	42_10	25,02	25,06	25,02	25,03	0,02	0,08
Öko-Nerac	15	43_10	25,91	25,94	26,05	25,97	0,06	0,24
Öko-Nerac	15	44_10	25,59	25,56	25,43	25,53	0,07	0,27
Öko-Nerac	15	45_10	25,73	25,81	25,91	25,82	0,07	0,28
Öko-Nerac	16	46_10	25,31	25,31	25,40	25,34	0,04	0,17
Öko-Nerac	16	47_10	25,70	25,99	25,78	25,82	0,12	0,48
Öko-Nerac	16	48_10	25,28	25,21	25,07	25,18	0,09	0,34
Mittelwert						25,35		

8.

RT PCR System Dau c1.01 – Extrakt No. 37-48								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Nerac	13	37_10	21,86	21,81	21,98	21,88	0,07	0,33
Öko-Nerac	13	38_10	21,27	21,21	21,22	21,23	0,03	0,12
Öko-Nerac	13	39_10	22,01	21,85	21,89	21,92	0,07	0,30
Öko-Nerac	14	40_10	21,96	22,25	22,08	22,10	0,12	0,53
Öko-Nerac	14	41_10	21,96	21,73	21,96	21,88	0,11	0,49
Öko-Nerac	14	42_10	21,74	21,74	22,21	21,90	0,22	1,00
Öko-Nerac	15	43_10	22,52	22,64	22,82	22,66	0,12	0,54
Öko-Nerac	15	44_10	22,64	22,35	22,01	22,33	0,26	1,16
Öko-Nerac	15	45_10	21,96	21,86	22,00	21,94	0,06	0,27
Öko-Nerac	16	46_10	21,73	21,91	21,71	21,79	0,09	0,41
Öko-Nerac	16	47_10	22,00		22,16	22,08	0,08	0,36
Öko-Nerac	16	48_10	21,99	21,91	21,89	21,93	0,04	0,19
Mittelwert						21,97		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System GAPDH und Dau c 1.02 mit Mischproben (n=20 Möhren/Probe) - Ernte 2006¹

1.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 1-12								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	1	1_10	25,27	25,01	24,93	25,07	0,18	0,71
Konv. Rodelika.	1	2_10	25,04	24,97	24,77	24,93	0,14	0,55
Konv. Rodelika	1	3_10	25,31	25,35	25,42	25,36	0,05	0,20
Konv. Rodelika	2	4_10	25,12	25,42	25,19	25,24	0,16	0,62
Konv. Rodelika	2	5_10	25,04	24,90	24,91	24,95	0,08	0,32
Konv. Rodelika	2	6_10	24,69	24,88	24,81	24,80	0,09	0,38
Konv. Rodelika	3	7_10	25,21	25,16	25,03	25,13	0,09	0,37
Konv. Rodelika	3	8_10	24,50	24,61	24,45	24,52	0,08	0,34
Konv. Rodelika	3	9_10	24,99	24,97	24,97	24,98	0,01	0,05
Konv. Rodelika	4	10_10	24,51	24,71	24,55	24,59	0,11	0,43
Konv. Rodelika	4	11_10	24,92	24,89	24,86	24,89	0,03	0,13
Konv. Rodelika	4	12_10	24,81	24,51	24,25	24,52	0,28	1,14
Mittelwert						24,92		

2.

RT PCR System Dau c 1.02 – Extrakt No. 1-12								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Rodelika	1	1_10	24,37	24,68	25,14	24,73	0,39	1,56
Konv. Rodelika.	1	2_10	25,36	25,60	25,39	25,45	0,13	0,50
Konv. Rodelika	1	3_10	25,48	25,36	25,49	25,44	0,07	0,29
Konv. Rodelika	2	4_10	25,17	24,58	24,33	24,69	0,43	1,74
Konv. Rodelika	2	5_10	24,33	24,76	24,91	24,67	0,30	1,23
Konv. Rodelika	2	6_10	24,85	24,72	24,58	24,72	0,14	0,55
Konv. Rodelika	3	7_10	25,11	25,11	25,06	25,09	0,03	0,13
Konv. Rodelika	3	8_10	24,68	24,58	24,46	24,57	0,11	0,44
Konv. Rodelika	3	9_10	25,05	25,25	25,10	25,13	0,10	0,40
Konv. Rodelika	4	10_10	24,89	24,59	24,59	24,69	0,17	0,70
Konv. Rodelika	4	11_10	24,85	24,81	24,83	24,83	0,02	0,08
Konv. Rodelika	4	12_10	24,75	24,97	24,94	24,89	0,12	0,48
Mittelwert						24,91		

¹ Alle Werte bestimmt bei Einsatz von 10 ng DNA in die PCR und drei unabhängigen Extraktionen pro Probe; Werte A-C = Dreifachbestimmung pro Probe

CT-Werte für die real time PCR mit dem System Dau c 1.02 nach reverser Transkriptase (Ernte 2006)

3.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 13-24								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	5	13_10	24,16	24,26	24,22	24,21	0,04	0,17
Konv. Nerac	5	14_10	24,58	24,87	24,68	24,71	0,15	0,60
Konv. Nerac	5	15_10	24,21	24,10	24,14	24,15	0,06	0,23
Konv. Nerac	6	16_10	24,07	24,20	24,05	24,11	0,08	0,33
Konv. Nerac	6	17_10	25,45	25,56	25,42	25,48	0,07	0,18
Konv. Nerac	6	18_10	24,84	24,90	24,76	24,83	0,07	0,29
Konv. Nerac	7	19_10	24,67	24,78	24,61	24,69	0,09	0,35
Konv. Nerac	7	20_10	24,52	24,73	24,51	24,59	0,12	0,50
Konv. Nerac	7	21_10	25,59	25,68	25,71	25,66	0,06	0,24
Konv. Nerac	8	22_10	24,76	24,77	24,78	24,77	0,01	0,05
Konv. Nerac	8	23_10	24,48	24,42	24,28	24,39	0,10	0,41
Konv. Nerac	8	24_10	24,19	24,25	24,24	24,23	0,03	0,13
Mittelwert						24,65		

4.

RT PCR System Dau c 1.02 – Extrakt No. 13-24								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Konv. Nerac	5	13_10	27,50	27,63	27,55	27,56	0,06	0,23
Konv. Nerac	5	14_10	28,04	28,02	28,37	28,14	0,19	0,69
Konv. Nerac	5	15_10	26,95	27,38	27,60	27,31	0,33	1,22
Konv. Nerac	6	16_10	27,46	27,44	27,24	27,38	0,12	0,45
Konv. Nerac	6	17_10	28,44	28,28	28,25	28,33	0,10	0,36
Konv. Nerac	6	18_10	27,90	27,56	27,18	27,55	0,36	1,30
Konv. Nerac	7	19_10	26,35	26,85	27,06	26,76	0,36	1,36
Konv. Nerac	7	20_10	27,13	27,12	27,09	27,11	0,02	0,08
Konv. Nerac	7	21_10	28,25	28,38	28,16	28,27	0,11	0,39
Konv. Nerac	8	22_10	26,83	26,60	26,43	26,62	0,20	0,76
Konv. Nerac	8	23_10	26,46	26,57	26,46	26,49	0,06	0,24
Konv. Nerac	8	24_10	27,14	27,10	27,06	27,10	0,04	0,14
Mittelwert						27,38		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System Dau c 1.02 nach reverser Transkriptase (Ernte 2006)

5.

RT PCR System Dau c GAPDH – Extrakt No. 25-36								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Rodelika	9	25_10	24,97	24,97	24,92	24,95	0,03	0,11
Öko-Rodelika	9	26_10	25,02	24,87	24,54	24,81	0,24	0,98
Öko-Rodelika	9	27_10	24,61	24,95	24,83	24,79	0,17	0,69
Öko-Rodelika	10	28_10	24,24	24,74	24,41	24,46	0,26	1,05
Öko-Rodelika	10	29_10	25,39	25,50	25,42	25,44	0,06	0,23
Öko-Rodelika	10	30_10	25,05	25,07	25,09	25,07	0,02	0,09
Öko-Rodelika	11	31_10	24,48	24,72	24,57	24,59	0,12	0,49
Öko-Rodelika	11	32_10	25,46	25,54	25,56	25,52	0,05	0,20
Öko-Rodelika	11	33_10	25,00	24,93	24,86	24,93	0,07	0,30
Öko-Rodelika	12	34_10	25,28	25,23	25,17	25,23	0,06	0,22
Öko-Rodelika	12	35_10	25,43	25,51	25,35	25,43	0,08	0,32
Öko-Rodelika	12	36_10	25,33	25,35	25,32	25,33	0,02	0,06
Mittelwert						25,05		

6.

RT PCR System Dau c 1.02 – Extrakt No. 25-36								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Rodelika	9	25_10	25,09	25,10	25,16	25,12	0,04	0,16
Öko-Rodelika	9	26_10	24,97	25,19	24,95	25,03	0,13	0,53
Öko-Rodelika	9	27_10	24,94	24,96	24,81	24,90	0,08	0,32
Öko-Rodelika	10	28_10	24,52	24,60	25,19	24,77	0,37	1,48
Öko-Rodelika	10	29_10	24,97	25,57	26,02	25,52	0,52	2,05
Öko-Rodelika	10	30_10	25,46	25,59	25,65	25,57	0,10	0,38
Öko-Rodelika	11	31_10	25,33	25,52	25,39	25,41	0,10	0,38
Öko-Rodelika	11	32_10	25,90	25,51	24,95	25,45	0,48	1,87
Öko-Rodelika	11	33_10	24,70	25,15	25,34	25,06	0,33	1,31
Öko-Rodelika	12	34_10	26,03	25,90	25,77	25,90	0,13	0,49
Öko-Rodelika	12	35_10	25,88	25,65	25,69	25,74	0,12	0,48
Öko-Rodelika	12	36_10	25,51	25,37	25,36	25,42	0,09	0,34
Mittelwert						25,32		

CT-Werte für die real time PCR mit dem System Dau c 1.02 nach reverser Transkriptase (Ernte 2006)

7.

RT PCR System Dau cGAPDH – Extrakt No. 37-48								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Nerac	13	37_10	25,18	25,13	25,24	25,18	0,05	0,21
Öko-Nerac	13	38_10	24,85	24,94	24,85	24,88	0,05	0,22
Öko-Nerac	13	39_10	25,45	25,45	25,50	25,47	0,03	0,12
Öko-Nerac	14	40_10	25,63	25,27	24,99	25,30	0,32	1,27
Öko-Nerac	14	41_10	24,55	24,87	24,93	24,78	0,21	0,83
Öko-Nerac	14	42_10	25,34	25,33	25,16	25,28	0,10	0,40
Öko-Nerac	15	43_10	25,73	25,82	25,90	25,82	0,08	0,33
Öko-Nerac	15	44_10	25,46	25,54	25,41	25,47	0,07	0,26
Öko-Nerac	15	45_10	25,65	25,63	25,69	25,66	0,03	0,12
Öko-Nerac	16	46_10	25,29	25,17	25,11	25,19	0,09	0,35
Öko-Nerac	16	47_10	25,68	25,55	25,54	25,59	0,08	0,31
Öko-Nerac	16	48_10	25,11	25,04	25,13	25,10	0,05	0,18
Mittelwert						25,31		

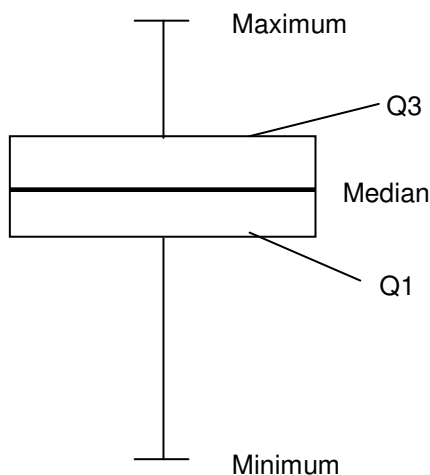
8.

RT PCR System Dau c 1.02 – Extrakt No. 37-48								
Feld	Probe	RNA Extrakt No.	A	B	C	Mittelwert	Std.Dev.	CV %
Öko-Nerac	13	37_10	25,53	25,45	25,56	25,51	0,06	0,22
Öko-Nerac	13	38_10	25,24	25,16	25,21	25,20	0,04	0,15
Öko-Nerac	13	39_10	25,52	25,63	25,50	25,55	0,07	0,27
Öko-Nerac	14	40_10	25,41	25,29	25,42	25,37	0,08	0,30
Öko-Nerac	14	41_10	25,21	25,10	25,14	25,15	0,06	0,24
Öko-Nerac	14	42_10	25,30	25,37	26,28	25,65	0,55	2,14
Öko-Nerac	15	43_10	24,95	25,32	25,48	25,25	0,27	1,08
Öko-Nerac	15	44_10	25,32	25,29	25,11	25,24	0,11	0,44
Öko-Nerac	15	45_10	25,10	25,03	25,19	25,11	0,08	0,32
Öko-Nerac	16	46_10	25,26	25,37	25,28	25,30	0,06	0,24
Öko-Nerac	16	47_10	25,83	25,88	25,95	25,89	0,06	0,23
Öko-Nerac	16	48_10	26,48	25,98	25,91	26,12	0,31	1,20
Mittelwert						25,45		

Die **Standardabweichung s** ist ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariable um ihren Mittelwert \bar{x} . Sie ist das gebräuchlichste Streuungsmaß. Je mehr die einzelnen Messwerte von ihrem Mittelwert abweichen, desto größer wird die Standardabweichung. Die anschauliche Bedeutung der Standardabweichung ergibt sich aus folgender Regel: Im Intervall von $\bar{x} - s$ bis $\bar{x} + s$ liegen etwa zwei Drittel (67%) aller Werte, im Intervall von $\bar{x} - 2 \cdot s$ bis $\bar{x} + 2 \cdot s$ etwa 95% aller Werte.

Bsp. Mittelwert = 10, Standardabweichung = 2 (Angabe: 10 ± 2). D.h. im Intervall $10 - 2$ und $10 + 2$ liegen 67 % aller Werte.

Boxplot: Die untere und die obere waagerechte Linie markieren das Minimum und das Maximum. Die untere Begrenzung der Box ist das 1. Quartil (Q1), die obere Begrenzung ist das 3. Quartil (Q3). Die mittlere Linie der Box kennzeichnet den Median.



Der **Median** ist derjenige Wert, unterhalb oder oberhalb dessen jeweils die Hälfte (50%) der Messwerte liegen. Zwei weitere Punkte sind das **1. Quartil (Q1)** und das **3. Quartil (Q3)**. Unterhalb des 1. Quartils liegen 25% der Werte, unterhalb des 3. Quartils 75% der Werte (siehe auch Boxplot).

p-Wert:

Der p-Wert ist das Ergebnis eines statistischen Testes. Er gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die gewonnenen Daten rein zufällig entstanden sein können. Bei einer ermittelten Signifikanz liegt der p-Wert unter dem Signifikanzniveau, das in drei Abstufungen unterteilt wird: 0,1 %, 1 % und 5 %. Je nachdem, wie hoch der p-Wert liegt, wird er wie folgt angegeben: $p < 0,001$ oder $p < 0,01$ oder $p < 0,05$ bzw. $p > 0,05$.