



ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-
UND AGRARWESEN

MOLD-MEETING 2010

DER

**ALVA-FACHGRUPPE
MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE**

**„ERNÄHRUNGSRISIKO MYKOTOXINE –
VERMEIDUNGSSTRATEGIEN ENTLANG
DER LEBENSMITTELKETTE“**

ALVA-Mitteilungen Heft 8/2010

ISSN 1811-7317

© 2010, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien

ZUSAMMENGESTELLT: Dr. Andreas Adler

BEZUGSMÖGLICHKEITEN: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA)
Geschäftsstelle der ALVA, Grünbergstraße 24, 1130 Wien

HERSTELLUNG: RepaCopy Wien DC
Triesterstraße 122
1230 Wien

13. MOLD-Meeting

„Ernährungsrisiko Mykotoxine – Vermeidungsstrategien entlang der Lebensmittelkette“

**2. - 3. Dezember 2010
Altes Rathaus Linz – Gemeinderatssaal
4020 Linz, Hauptplatz 1**

Kurzfassungen / Abstracts

Organisation:

**Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und
Agrarwesen in Österreich (ALVA)
&
Österreichische Agentur für Gesundheit und
Ernährungssicherheit GmbH**

Inhaltsverzeichnis Vorträge

H. P. Stüger, Karin Manner, Daniela Mischek

Modellierung von Risiken entlang der Lebensmittelkette – Ansatz und Nutzungsmöglichkeiten 8

K. Münzing, Christine Schwake-Anduschus

Verfahren der Risikominimierung und Dekontamination zur Förderung der Sicherheit und Qualität bei Brot- und Speisegetreide 12

R. Öhlinger

Mykotoxine – Aktuelle EU Regelungen und Entwicklungen 16

Elke Rauscher-Gabernig, R. Grossgut

Abschätzung der Verbraucherexposition für T-2 und HT-2 Toxin durch den Verzehr von Lebensmitteln des österreichischen Marktes 17

Karin Mandl, A. Clemenz, Katja Sterflinger, W. Kneifel

Luft-Mikroflora ausgewählter Kellertypen in Österreich 21

J. Böhm

Desoxynivalenol (DON) beim Masthuhn 25

Heidi Schwartz, B. Grenier, Irene Schöner, R. Krska, G. Schatzmayr, Isabelle P. Oswald, W.-D. Moll

Fumonisin induced alteration of sphingolipid metabolism in piglets – Analytical and biological aspects 29

Karin Huber, Maria Bürstmayr, H. Bürstmayr

QTL Kartierung von Ährenfusarioseresistenz in zwei *Triticum dicoccum* x *Triticum durum* Rückkreuzungs-Populationen 34

Alexandra Scholz, Julia-Kristin Plate, Monika Goßmann, Susanne von Bargen & Carmen Büttner

Nachweis von Fumonisin-Biosynthesegenen und Fumonisin-Bildung bei *Fusarium proliferatum*- und *Fusarium oxysporum*-Isolaten aus Spargel (*Asparagus officinalis*) sowie Untersuchungen zur Pathogenität *in vitro* 38

Vitore Shala-Mayrhofer, H.-P. Kaul, M. Lemmens	
Einfluss der Bodenbearbeitung und Bewässerung auf das Auftreten von <i>Fusarium spp.</i> bei Winterweizen	42
G. Adam, F. Berthiller, W. Hametner, Stephanie Gardiner, G. Muehlbauer	
Evidenz für Glutathion-vermittelte Detoxifikation von DON in Gerste und Bäckerhefe	46
J. A. Torres Acosta, G. Wiesenberger, P. Kmiecik, F. Berthiller, M. Shams, R. Krska, G. Adam	
Ein Wirkungsmechanismus für Zearalenon in Pflanzen: Inhibition der ATPase Aktivität von Hitzeschock-Protein 90	51
M. Shams, R. Mitterbauer, R. Corradini, R. Schuhmacher, R. Krska, G. Adam und F. Berthiller	
Bildung eines nicht-toxischen Metaboliten von Diacetoxyscirpenol durch Kochen von <i>Fusarium</i> kontaminierten Erdäpfeln	55
M. Hübner	
Aktuelle Mykotoxinanalytik – Schnelltests	59
Barbara Daxner	
LC-MS(MS) Applikation in der Mykotoxinanalytik von Getreide und Futtermitteln	62
Anna Mitterauer, G. Häubl, G. Jaunecker	
Produktion von isotope-markierten Mykotoxinen – Anwendung und Vorteile in der Routineanalyse	65
Elisabeth Viktoria Reiter, P. Häggblom, P.-A. Lindqvist, E. Razzazi-Fazeli, G. Andersson	
Evaluierung von automatischer und manueller Probenahme in Ochratoxin A kontaminierten Futtermitteln	69
Barbara Cvak, Alexandra Molinelli, R. Krska	
Entwicklung von Lateral Flow Devices zur semi-quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen in verschiedenen Getreidesorten	73
W. Schweiger, Paula Kovalsky, J. Boddu, S. Shin, G. Muehlbauer, K. Mayer, F. Berthiller, G. Adam	
Nutzung der Genomsequenz des Modellgrases <i>Brachypodium distachyon</i> zum Studium der UDP-Glucosyltransferase Genfamilie von Getreide	134

Posterbeiträge

Vitore Shala-Mayrhofer, R. Marjakaj, F. Berthiller, M. Lemmens

Vorkommen von *Fusarium* spp. und Mykotoxinen in Mais aus Kosovo 77

Karin Hage-Ahmed, V. Chobot, A. Voglgruber, F. Hadacek, Siegrid Steinkellner

Einfluss von Lauch als Mischkulturpartner und arbuskulärer Mykorrhiza auf Fusariumbefall und Wurzelexsudation der Tomate 81

Monika Goßmann, Ute Gärber, Rita Grosch, Frank Ellner, Carmen Büttner

***Fusarium* spp.- Befall an Zwiebeln (*Allium cepa* L.) und Nachweis entsprechender Fumonisin-Kontaminationen** 85

Bohumila Voženílková, Bronislava Hortová, J. Moudrý, Hana Kuchynková, Lenka Štočková, Z. Štěřba, B. Čermák

The effect of farming system and year on microfungi on wheat grain 89

Hana Kuchynková, Katerina Volfová, Z. Štěřba

The mycotoxicological quality of oats 93

P. Eiblmeier, J. Rampl

Vorerntemonitoring DON in Bayern 2007-2010 im Rahmen der Qualitätssicherung Winterweizen 97

W. Brodacz

Simultane Quantifizierung von Mykotoxinen - Testmessungen mit vier aktuellen Triple-Quadrupol-Systemen 100

W. Brodacz

T-2 Toxin und HT-2 Toxin in ausgewählten Lebensmitteln 104

Claudia Unbekannt, Karin Naehrer

Das Auftreten von Mykotoxinen in europäischen Futtermittelproben im Jahr 2010 108

Karin Mandl, Daniela Schattauer

Schimmelpilzbestimmung in einem Weinkeller vor und nach Sandabstrahlung 112

Sylvia Lehner, Alexandra Parich, A. Koutnik, R. Krska, M. Lemmens, R. Schuhmacher Finding novel natural compounds against <i>Fusarium graminearum</i>	116
Irene Schöner, R. Krska, Heidi Schwartz, B. Grenier, Isabelle P. Oswald, G. Schatzmayr, W.-D. Moll Determination of FB1 and HFB1 in tissue samples of pigs	121
O. Greitbauer, Irene Schöner, R. Krska, Heidi Schwartz, B. Grenier, Isabelle P. Oswald, G. Schatzmayr, W.-D. Moll Determination of fumonisin B1 and its hydrolysis products in faeces samples of pigs	126
Alois Schiessl Ergotalkaloide in der Routineanalytik?	131

Modellierung von Risiken entlang der Lebensmittelkette – Ansatz und Nutzungsmöglichkeiten

H. P. STÜGER, KARIN MANNER, DANIELA MISCHKEK

Die Belastung von Lebensmitteln mit Schadstoffen zu beschreiben, sowie Gefahren durch die Nahrungsaufnahme zu bewerten, gehört zu zentralen Aufgaben der Risikobewertung. Eine allfällige Gefährdung von Konsumenten zu reduzieren, ist das Ziel des Risikomanagements.

Ziel der Risikobewertung ist es, frühzeitig gesundheitliche Gefahren, die von Lebensmitteln ausgehen können, zu erkennen und zu quantifizieren, um das davon ausgehende Risiko für Mensch, Tier und Pflanze abschätzen zu können.

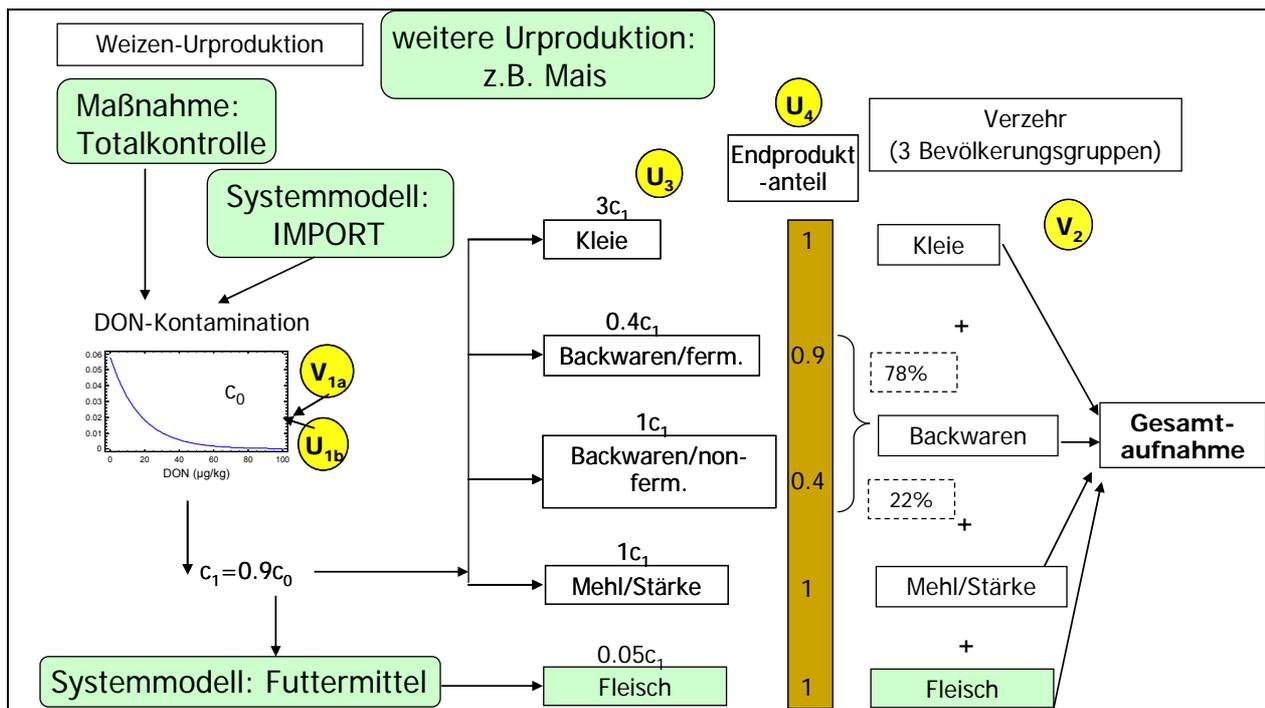
Die Risikobewertung von verzehrfertigen Lebensmitteln bezüglich ihrer Schadstoffbelastung betrachtet vor allem die letzte Stufe der Lebensmittelkette. Insbesondere bei chemischen Gefahren findet der Eintrag ins Lebensmittel aber meist wesentlich früher statt. Eine Analyse mit dem Kettenansatz untersucht die vorangegangenen Stufen der Lebensmittelkette von der Erzeugung der Primärprodukte (z.B. Tiere und Pflanzen), ihrer Gewinnung, Lagerung, Transport und Weiterverarbeitung bis hin zum Konsumenten, sozusagen vom Feld bzw. Stall bis zum Tisch („from farm-to-fork“, „from stable-to table“).

In einem AGES-internen Projekt „Systemanalyse entlang der LM-Kette“ wurden die wesentlichen Aspekte einer solchen Betrachtungsweise näher untersucht. Neben der inhaltlichen Betrachtung der Lebensmittelkette stand die Nutzung von quantitativen Informationen (Daten, Literatur, Experteneinschätzungen) im Vordergrund, um schlussendlich quantitative Aussagen tätigen zu können. Diese quantitative Kettenanalyse (QKA) wurde anhand des Beispiels „DON - Deoxynivalenol in Weizen“ zahlenmäßig konkretisiert. Dies dient vorerst nur der Illustration des Modellansatzes und keineswegs einer endgültigen quantitativen Kettenanalyse des Beispielfalles.

Der Eintrag der Gefahr sowie die Entwicklung der Gefahr auf den verschiedenen Stufen der Lebensmittelkette stellen wichtige Punkte in der Analyse dar. Als Ausgangspunkt wurde die Kontamination eines Primärproduktes (Urproduktion) verwendet, welche datenmäßig abgebildet werden kann. Für die Lebensmittelkette wurden relevante Prozesse definiert, die eine Veränderung der Gefahr bewirken können. Bei der Herstellung von Lebensmitteln aus einem Primärprodukt kann daher eine Gefahr gleich bleiben, bzw. vermindert oder angereichert werden. Primärprodukte werden jedoch nicht nur für die Herstellung von Lebensmitteln verwendet, sondern können auch für andere Zwecke wie z.B. als Futtermittel verwendet werden, was einen weiteren potentiellen Eintragspfad des Kontaminanten für die Lebensmittelkette impliziert.

Das verarbeitete Primärprodukt fließt dann mit einem bestimmten Anteil ins Endprodukt ein. Beim Konsumenten kommt es durch den Verzehr zu einer Gesamtaufnahme des Schadstoffes.

In der folgenden Abbildung ist eine schematische Analyse anhand des Beispiels „DON in Weizen“ dargestellt.



Die Darstellung enthält das Basis-Systemmodell, weist aber auch auf folgende Erweiterungen hin:

- Eintrag über weitere Urproduktionen, die mit dem gleichen Kontaminanten belastet sein können. Dies kann über die gleichen oder andere Lebensmittel erfolgen.
- Unterscheidung zwischen der Kontamination von inländischer und importierter Primärproduktion (Systemmodell: Import)
- Berücksichtigung des Eintrages über Futtermittel (Systemmodell: Futtermittel)
- Einbau einer Interventionsmaßnahme: Hier wurde als Beispiel eine Totalkontrolle aller Primärproduktionen (z.B. über Kontrolle aller Weizenanlieferungen) gewählt, um den Effekt einer solchen Maßnahme illustrieren zu können.

Die lineare Verknüpfung von Kontamination, technischen Faktoren sowie Verzehr ergibt einen Zielindikator, die Gesamtaufnahme. Anhand dieses Indikators können Niveau und Schwankungsbreiten, sowie der Einfluss von technologischen und sonstigen Maßnahmen diskutiert werden.

Nutzungsmöglichkeiten

Die QKA liefert für die Produktionskette einen oder mehrere Faktoren, die auf das Niveau des Zielindikators Einfluss haben. Damit ist schon die grundsätzlich operative Zielsetzung einer QKA ausgewiesen, weil sie Grundlagen für rationale Risikomanagementmaßnahmen in der Produktionskette bietet. Im Folgenden sind die verschiedenen Nutzungsmöglichkeiten aufgelistet.

1. Darstellung der Systemanalyse = Basis für Diskussion

Ein besseres Verständnis der Wirkungszusammenhänge und insbesondere deren Visualisierung sind notwendig, um die zumeist interdisziplinäre Diskussion strukturiert und effizient führen zu können.

2. Identifikation wichtiger Einflussfaktoren

Die QKA zeigt, an welchen Punkten (evtl. auch: durch welche Prozesse) das System beeinflusst werden kann, um den Zielindikator in eine Richtung zu verändern. Die Definition des gewünschten Effektes auf den Zielindikator ist hier besonders wichtig.

3. Abschätzung der Unsicherheiten bzw. Schwankungsbreiten von Aussagen

2 wesentliche Ursachen bewirken, dass bei einer QKA nicht nur eindeutige Punkt-Aussagen gemacht werden können (sollten):

- Variabilitäten z.B. bei Schadstoffbelastungen des Primärproduktes und/oder beim Verzehr
- Unsicherheiten durch Annahmen und Experteneinschätzungen

Eine seriöse QKA muss deshalb den resultierenden Vertrauensbereich für die Endaussagen mit angeben. Damit ergeben sich folgende Detailfragen:

- a. Wie groß ist die Schwankungsbreite des Endergebnisses?
- b. Wo liegen die worst-case-Bereiche (95%-, 99%-Perzentil, Maximum)
- c. Wo liegen die größten Unsicherheitsfaktoren?
- d. Wie wirkt sich die Unsicherheit aufgrund von Datenerhebungen aus? (Kann durch zusätzliche Daten die Unsicherheit verringert werden?)

4. Quantifizierung von Wirksamkeit und Effizienz

Der Effekt einer Maßnahme kann mittels des Zielindikators zahlenmäßig beschrieben werden. Wird zusätzlich der Aufwand für die Maßnahme mitberücksichtigt, ergibt sich ein Maß für die Effizienz dieser Maßnahme. Die QKA kann somit im Vorfeld zur Evaluierung einer Risikomanagementmaßnahme genutzt werden.

5. Vergleich von Handlungsalternativen

Der Vergleich verschiedener Maßnahmen innerhalb der Lebensmittelkette lässt sich entweder nur über den Zielindikator (Wirksamkeitsvergleich) oder auch über den erforderlichen Aufwand (Effizienzvergleich) durchführen.

Mit diesem Ansatz lassen sich aber auch Szenarien vergleichen, die keine Handlungsoptionen sind, weil sie nicht im Entscheidungsbereich des Risikomanagements liegen z.B. EU-Regelungen oder Umweltveränderungen.

6. Beurteilung einer Kombination von Maßnahmen

Maßnahmen lassen sich kombinieren. Der mögliche Vorteil liegt in der Zusammenführung mehrerer Einzelmaßnahmen, die erst bei kombinierter Anwendung zu einer nennenswerten Gesamtreduktion eines Indikators führen können.

7. Optimierung von Maßnahmen

Für eine hohe Effizienz von Maßnahmen lassen sich mit einer QKA ebenfalls Überlegungen anstellen, wenn beispielsweise ein bestimmter Zielwert angestrebt wird.

In das quantitative Modell fließen sowohl Variabilität aus Datenbeständen (hauptsächlich Auftretens- und Verzehrdaten) als auch die Unsicherheit, welche in Aussagen aus der Literatur bzw. in Experteneinschätzungen steckt, ein. Die Verteilung des Zielindikators lässt sich im Regelfall nicht mehr analytisch bestimmen, kann aber durch Simulationsmethoden ermittelt werden. Durch Sensitivitätsanalysen lässt sich der Einfluss von diesen Input-Verteilungen auf die Schwankung des Endergebnisses quantitativ beurteilen.

Autoren:

Hans Peter STÜGER, Karin MANNER, Daniela MISCHKEK; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH - Daten, Statistik und Risikobewertung, Graz/Wien, Österreich

Verfahren der Risikominimierung und Dekontamination zur Förderung der Sicherheit und Qualität bei Brot- und Speisegetreide

Procedures of minimization of risk and decontamination to promote safety and quality of bread grain and cereal based food

K. MÜNZING, CHRISTINE SCHWAKE-ANDUSCHUS

Stichworte: Dekontamination, Mykotoxine, Ergotalkaloide

Mit dem Ziel sichere und qualitativ hochwertige Lebensmittel aus Getreide herzustellen sind immense Anstrengungen in der Urproduktion, Aufbereitung und Verarbeitung verbunden. Bereits die Ex-Ernte-Anlieferung an Getreide (Mähdruschware) liefert ein beträchtliches Potenzial an gefährdenden oder beeinträchtigenden Stoffen. Jede Anlieferung kann so ein leichter Eintragspfad für unerwünschte Stoffe sein, die die Sicherheit und Qualität des Getreides gefährden (z.B. Mykotoxine, Schwermetalle, Stäube und Fremdkörper). Mit fundierten Kenntnissen über technisch-organisatorische Möglichkeiten kann es gelingen, diesen Eintragspfad effektiv zu kontrollieren. Dennoch bleiben bei Getreide oft die einfachsten Handlungsgrundsätze zur Qualitätslenkung und -sicherung teilweise unbeachtet, da Unkenntnis und Unsicherheit über die richtigen Lenkungsmaßnahmen zunehmen, ohne dass die technischen Grenzen in den Erfassungs- und Mühlenbetrieben ausgeschöpft sind.

Vor diesem Hintergrund werden die entscheidenden Instrumente der Qualitätslenkung bei der Getreideerfassung vorgestellt, die den lebensmittelverantwortlichen Unternehmen die Entscheidungen erleichtern. Dies beginnt im Rohwareneingang mit der klassischen Sichtkontrolle und Sensorik, aber auch mit der Beachtung der Kornfeuchte (Feuchtigkeitsgehalt und Wasseraktivität) zur Erkennung von Problemanlieferungen. Dies sind einfache Schnellmethoden, die als absolute Minimalprüfung von den Futter- und Lebensmittelverantwortlichen durchzuführen sind. Diese Vorgehensweise empfiehlt die EU-Kommission bereits seit 2006. Sie ergänzt dies mit einem konkreten Handlungsrahmen für Getreide, um Mykotoxinen vorzubeugen (Lit. 1 u. 2). Die Limitierung der Wasseraktivität entspricht der guten Fachpraxis der Getreidetechnologie.

Die weiteren Anstrengungen zur Minimierung der Mykotoxinrisiken, um die Erzeugnisse deutlich unterhalb der gesetzlich geregelten Höchstwerte zu halten (gemäß ALARA-Prinzip), beziehen sich auf die typischen Verteilungsprofile der Problemstoffe. Mykotoxine finden sich üblicherweise bis zu 80 % im Schwarzbesatz und nur zu 20 % in dem einwandfreien Grundgetreide. Da Schwarzbesatz durch sein hohes Schädigungspotenzial für den Verarbeitungswert gekennzeichnet ist, unabhängig ob Mykotoxine enthalten sind oder nicht (z.B. gallmücken-, wanzenstichiger- und *Microdochium Nivale* befallener Weizen), kommt es darauf an, diese Stoffe wie z.B. pilzgeschädigte verdorbene Körner frühzeitig zu erkennen und zu minimieren. Es genügt demzufolge keineswegs, allein bei Unterschreitung von Mykotoxin-Höchstwerten die Anlieferung für die Verarbeitung freizugeben.

Der Gehalt an Mutterkorn-Toxinen oder -Sklerotien ist lebensmittelrechtlich nicht geregelt. Lediglich die Regularien der europäischen Getreidemarktordnung enthalten Höchstwerte für den Mutterkornbesatz. Laut der Verordnungen (EG) Nr. 687/2008 und VO (EG) Nr. 670/2009 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen beträgt der Höchstanteil für Mutterkorn 500 mg/kg (0,05 %) in Weichweizen und Hartweizen. Darüber hinaus hat das deutsche Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für Mutterkorn eine offizielle Risikoabschätzung vorgenommen und Warnhinweise gegeben.

Wenig bekannt ist aber, dass bei handelsüblichen Roggenkörnern ein latentes Kontaminationsrisiko durch oberflächen-anhaftende Mutterkornstäube (Ergotalkaloide) besteht. Da die Ergotalkaloide allein durch den bloßen Berührungskontakt der Sklerotien die einwandfreien Roggenkörner nachhaltig kontaminieren, bedarf es der frühzeitigen Entfernung des Mutterkorns. Für die Risikoabschätzung bedeutet dies, dass gut gereinigter „mutterkorn- bzw. sklerotienfreier“ Roggen nicht zugleich „ergotalkaloidfrei“ ist. Anhaftende Mutterkornstäube beeinflussen darüber hinaus das Verteilungsprofil der Ergotalkaloide selbst bei hellen Roggenmehlen. Allerdings werden die mit Mutterkornstaub anhaftenden Roggenkörner effektiv mittels Friktionsschälmaschinen dekontaminiert, z.B. durch „peeling“. Die Oberflächenbearbeitung wird mittlerweile in ähnlicher Weise auch bei Weizen zur Reduzierung der DON- und ZON-Gehalte verbreitet durchgeführt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche machen deutlich, dass die Dekontaminationseffekte für bestimmte unerwünschte Stoffe wie z.B. für Mykotoxine und Mutterkornstäube für den jeweiligen Verarbeitungsprozess sehr spezifisch ausfallen. Die Verwendung von festen (standardisierten) prozessspezifischen Dekontaminationsfaktoren ist aufgrund der unterschiedlichen Stoffeigenschaften und der Variation der betriebsindividuellen Prozessbedingungen nicht möglich. Je nach Fusariumaufkommen oder Befallsdichte, sowie je nach Art und Intensität der Rohwarenreinigung, können äußerst unterschiedliche Reduzierungen des Mykotoxingehaltes und damit variable Verarbeitungsfaktoren (VF) erzielt werden.

Das Aussortieren mittels herkömmlicher Getreidereinigung bei Ex-Ernte-Anlieferungen kann Mykotoxine bis zu 50 % reduzieren, wobei insbesondere Schwarzbesatz den höchsten Anteil des auszusortierenden Risikomaterials darstellt. Eine vor der Vermahlung durchgeführte Oberflächenbearbeitung der Körner reduziert Mykotoxine durch Entfernen der äußersten Bereiche des Korns bis zu 40 % (bei einem mitteltiefen Schälen mit 0,5 bis 5 % Abtragung). Ein tiefes Schleifen (> 5 % Schälkleie-Abtragung) kann zu einer weiteren Reduzierung der Toxine führen. Bei der Vermahlung erfolgt die Reduzierung während der Zerkleinerung und dem Separieren durch Dichteunterschiede der Mahlpartikel. Günstig niedrige Verarbeitungsfaktoren von 0,65 haben z.B. Produkte der hellen Mahlpassage C2. Die Vermahlungsendprodukte für die Teigwarenindustrie erreichen je nach Mykotoxinbelastung des gereinigten Rohstoffs Verarbeitungsfaktoren

von 0,65 bis 0,85 für DON und für ZEA Werte für den VF von 0,14 bis 0,42. Damit sind Verarbeitungsfaktoren sehr unterschiedlich und daher nur betriebsindividuell zu beurteilen.

Die orientierenden Untersuchungen zeigen insgesamt, dass die technisch-organisatorische Sicherstellung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit durch vorbeugende Handlungsweisen (gezieltes Reinigen oder Aussortieren) in der Getreideannahme effektiv möglich ist. Durch Dekontamination der Kornoberfläche von anhaftenden mykotoxinbelasteten Stäuben durch scheuern, bürsten, schälen oder schleifen werden gute Voraussetzungen für sichere Lebensmittel aus Getreide geschaffen. Auch die eigentliche Herstellung von Mahlerzeugnissen erlaubt im Mahlprozess beim Zerkleinern und gezielten Separieren im Luftstrom durch Dichteunterschiede von Fraktionen Dekontaminationseffekte. So werden auch andere unerwünschte Stoffe (z.B. Cadmium), die durch die Aufnahme über die Wurzel vornehmlich im äußeren Endosperm des Getreidekornes gespeichert werden, bei der Herstellung von hellen Mahlerzeugnissen beträchtlich reduziert.

Die Betrachtungen verdeutlichen, dass Dekontaminationseffekte zunächst durch die Bedingungen am Anbaustandort beeinflusst werden, im weiteren Verlauf auch durch die technologischen Maßnahmen in der Wertschöpfungskette bis zum zubereiteten Endprodukt. Da auch das Mykotoxinaufkommen bei Getreide partiespezifisch ist und deshalb die Reduktion durch Reinigung individuell gelenkt wird, sind theoretisch abgeleitete pauschale Dekontaminations- oder Verarbeitungsfaktoren keine zuverlässige Basis für Überwachungsbehörden.

Für die Verarbeitungsunternehmen empfiehlt es sich aber im eigenen Interesse, individuelle, d.h. betriebsangepasste Verarbeitungsfaktoren zu ermitteln, um für eine zuverlässige Bewertung von unerwünschten Stoffen die richtige Datenbasis zu erhalten. Eine periodische Aktualisierung ist ratsam, da sowohl das Aufkommen an gesundheitlich bedenklichen Stoffen je nach Erntejahr und Befallslage standortabhängig variiert, als auch die Herstellungsprozesse vom Korn zum Lebensmittel, die nicht in jedem Jahr und nicht für jeden Kunden gleich sein dürften. Eine Reinigung ist wirtschaftlich sinnvoll und gesundheitlich effizient, wenn sie wegen der besseren Trennung möglichst früh, erfolgt. Eine weitgehende Separation auch unter Einsatz neuer Verfahren (Farb- / Fotoausleser) erlaubt jedoch in den meisten Fällen keine vollkommene Trennung. Wichtig ist auch, dass Mutterkorn belastete Partien im Lager wenig bewegt werden, um nicht den Bruch- und Staubanteil an diesem Risikomaterial zu erhöhen.

Für die Müllerei ist es auch sinnvoll, kontraktliche Anforderungen zu definieren, und den Befall mit der Getreideanlieferung zu erkennen und quantitativ zu erfassen. Problematisch ist, dass Anlieferungspartien stets ihr spezifisches Besatzaufkommen aufweisen. In kritischen Erntejahren gleicht keine Partie der anderen und auch die Befallintensität an Mykotoxinen kann von Anlieferung zu Anlieferung stark schwanken. Demzufolge darf keine feste Standardreinigung

durchgeführt werden, sondern es gilt das Reinigungsdiagramm dem tatsächlichen Besatzaufkommen anzupassen. Dies setzt Erfahrung der Mitarbeiter und die vorherige Besatzprüfung der Partie voraus.

Bei einer betrieblichen Kernkompetenz kann auch in der Praxis die Mykotoxin- und Staubproblematik bewältigt werden. Grundsätzlich gilt, dass trotz unerwünschter Ausputzverluste die Getreidereinigung für die Herstellung eines qualitativ hochwertigen und sicheren Lebensmittels unabdingbar ist. Neben diesen Reinigungsverlusten ist positiv zu verbuchen, dass der Vermarktungs- und Verarbeitungswert durch die Getreidereinigung gesteigert wird. Wichtig ist, dass die einfachen Handlungsgrundsätze in jeder Stufe der Wertschöpfungskette mit der vorhandenen Kernkompetenz und dem heutigen Verantwortungsbewusstsein der Lebensmittel- und Futtermittelunternehmen praktiziert wird. Nur auf diese Weise können die unterschiedlichsten Probleme in der Wertschöpfungskette, die im Zusammenhang mit der Gesunderhaltung und Qualitätssicherung von Getreide stehen bewältigt werden. Unter Berücksichtigung der genannten technisch-organisatorischen Möglichkeiten dürfte der bekannte Slogan der Lebensmittelwirtschaft „Lebensmittel genießen vertrauen!“ seine Berechtigung finden.

Literatur:

1. CODE OF PRACTICE, ANNEX 3, CAC/RCP 51-2003 Seite 7, PREVENTION AND REDUCTION OF CONTAMINATION BY OCHRATOXIN A IN CEREALS
2. Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 zur Prävention und Reduzierung von Fusarientoxinen in Getreide und Getreideprodukten, ABl.: L 234/35

Autoren:

Klaus MÜNZING

Christine SCHWAKE-ANDUSCHUS

Max Rubner-Institut (MRI)

Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide

Schützenberg 12

D-32756 Detmold

Tel: +49(0)5231.741.247

Tel: +49(0)5231.741.132

Fax: +49(0)5231.741.100

Fax: +49(0)5231.741.130

klaus.muenzing@mri.bund.de

christine.schwake-anduschus@mri.bund.de

www.mri.bund.de

www.mri.bund.de

Mykotoxine – Aktuelle EU Regelungen und Entwicklungen

R. ÖHLINGER

Mykotoxine werden in verschiedenen Bereichen geregelt. Dazu werden folgende mykotoxinbezogene Themen näher besprochen:

- Rahmenverordnungen (Auswahl): VO 315/1993, Richtlinie 96/23/EG, VO 178/2002, VO 882/2004
- Aktuelle Höchst- und Richtwerte: VO1881/2006, VO 1126/2007, VO 105/2010, VO 165/2010; Richtlinie 2002/32/EG, Empfehlung 2006/576/EG
- Probenahme und Analyse: VO 401/2006, VO 178/2010; VO 152/2009
- Sicherheitsvorkehrungen: VO 1152/2009; VO 669/2009, VO 212/2010
- Empfehlungen und Leitlinien: Empfehlung 2003/598/EG, Empfehlung 2006/583/EG; Aflatoxin-Leitlinie, Probenahme-Leitlinie
- Aktuelle Themenschwerpunkte im EU Expertenkomitee „Agrarkontaminanten“
- EU-RL Themen 2010
- Überblick über veröffentlichte CEN Methoden
- Überblick über EFSA/SCF Stellungnahmen

Neben den genannten Regulationen und Leitlinien wird auch auf eine Auswahl wichtiger Internet-Adressen verwiesen.

Autor:

Richard ÖHLINGER, AGES GmbH, CC Cluster Chemie

Wieningerstr. 8, 4020 Linz

Mail: richard.oehlinger@ages.at

Abschätzung der Verbrauchereexposition für T-2 und HT-2 Toxin durch den Verzehr von Lebensmitteln des österreichischen Marktes

Assessment of consumer exposure to T-2 and HT-2 toxin through consumption of food stuff of the Austrian market

ELKE RAUSCHER-GABERNIG, R. GROSSGUT

Summary

The mycotoxins T-2 and HT-2 toxin may occur in cereals and cereal products, especially in oats high contaminations can be found. Up to now no maximum levels in food have been set up by European legislation. 47 % of the 247 tested food samples from the Austrian market were contaminated with T-2 and HT-2 toxin. Median intake of the sum of T-2 and HT-2 toxin through consumption of bakery wares, breakfast cereals and snacks was 0.6-1 µg/d for preschoolers and 0.9-1.8 µg/d for adults. For high consumers an exposure of 1.3-4.1 µg/d was calculated. Median T-2 and HT-2 toxin intake of the Austrian population groups was below the combined tolerable daily intake (TDI) of 0.06 µg/kg. On the contrary, high consumers who frequently integrated rolled oats into their diet exceeded the TDI. Therefore, the health risk of the Austrian population through exposure to T-2 and HT-2 toxin in food seems to be low for median consumers, but may be of concern for high consumers in particular for children.

Keywords: T-2 toxin, HT-2 toxin, food, consumer exposure

Zusammenfassung

Die Mykotoxine T-2 und HT-2 Toxin können in verschiedenen Getreidearten und Getreideprodukten enthalten sein, vor allem Hafer kann hohe Kontaminationen aufweisen. Bis jetzt wurden von der Europäischen Gesetzgebung noch keine Höchstgehalte in Lebensmitteln festgelegt. 47 % der 247 untersuchten Lebensmittel des österreichischen Marktes wiesen eine Belastung mit T-2 und HT-2 Toxin auf. Die mittlere Aufnahme der Summe von T-2 und HT-2 Toxin durch den Verzehr von Backwaren, Frühstückszerealien und Snacks betrug für Vorschulkinder 0,6-1 µg/d und Erwachsene 0,9-1,8 µg/d. Für hohe Verzehrer wurde eine Exposition von 1,3-4,1 µg/d ermittelt. Die mittlere Aufnahme von T-2 und HT-2 Toxin durch die österreichische Bevölkerung lag unterhalb der kombinierten tolerierbaren täglichen Aufnahmemenge (TDI) für die Summe von T-2 und HT-2 Toxin von 0,06 µg/kg. Von Personen mit hohem Haferflockenkonsum wurde sie jedoch überschritten. Das Gesundheitsrisiko für die österreichische Bevölkerung durch die Aufnahme von T-2 und HT-2 Toxin über Lebensmittel erscheint bei mittlerem Verzehr gering, allerdings kann ihre Aufnahme für die Gesundheit von Personen mit hohem Verzehr, besonders für Kinder, bedenklich sein.

Schlüsselwörter: T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Lebensmittel, Verbrauchereexposition

Einleitung

Die Mykotoxine T-2 und HT-2 Toxin stellen die wichtigsten Vertreter der Trichothecene vom Typ A dar. Ihre Bildung erfolgt unter anderem durch *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* und *Fusarium equiseti*, daher können Kontaminationen an allen Getreidearten festgestellt werden. In Europa ist Hafer am stärksten mit T-2 und HT-2 Toxin belastet.

Die Gehalte in Mais, Weizen und Roggen sind geringer (JECFA, 2001). Aufgrund unzureichender Daten wurden von der Europäischen Kommission bis jetzt noch keine Höchstgehalte in Lebensmitteln festgelegt.

Gefahrenidentifizierung

In Getreide kann ein Großteil von T-2 und HT-2 Toxin durch Schälen entfernt werden, danach verbleiben nur noch 5-10% in der für die Lebensmittelproduktion verwendeten Graupe. Generell sind T-2 und HT-2 Toxin stabile Verbindungen, die auch bei den üblichen Verarbeitungsprozessen nicht abgebaut werden. Eine Reduktion der Toxine beim Kochen von Nudeln wird auf ihren Übertritt in das Kochwasser zurückgeführt (Scudamore, 2008).

Gefahrencharakterisierung

Die toxische Wirkung beruht wie bei anderen Trichothecenen auf ihrer Fähigkeit, die Proteinsynthese zu hemmen, wobei vor allem das Immunsystem und das blutbildende System durch T-2 und HT-2 Toxin beeinträchtigt werden. In den Risikobewertungen des Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) und des Scientific Committee on Food (SCF, 2001) wurde jeweils eine kombinierte tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI) für die Summe von T-2 und HT-2 Toxin von 0,06 µg/kg festgelegt.

Expositionsabschätzung

Von 2008-2010 wurden in Österreich 247 Proben von Lebensmitteln auf T-2 und HT-2 Toxin untersucht, wobei in 47 % Kontaminationen festgestellt wurden. Die durchschnittlichen und mittleren Gehalte in den einzelnen Lebensmittelgruppen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Bei durchschnittlichen Gehalten und mittlerem Verzehr beträgt die tägliche Exposition für Vorschulkinder 0,6 µg/d, für Frauen 0,9 µg/d und für Männer 1,1 µg/d. Bei hohem Verzehr und durchschnittlichen Gehalten steigt die Exposition auf 1,3 µg/d für Vorschulkinder, 2,1 µg/d für Frauen und 2,5 µg/d für Männer.

Werden als Frühstückszerealien ausschließlich Haferflocken verzehrt, liegt die mittlere Aufnahme von T-2 und HT-2 Toxin für Vorschulkinder bei 1 µg/d, für Frauen bei 1,6 µg/d und für Männer bei 1,8 µg/d. Ein hoher Verzehr von Haferflocken führt zu einer Exposition von 2,4 µg/d für Vorschulkinder, 3,5 mg/d für Frauen und 4,1 µg/d für Männer (Tab. 2).

Tab. 1: Gehalte von T-2 und HT-2 Toxin in verschiedenen Lebensmittelgruppen

Lebensmittelgruppe	Anzahl Proben gesamt	Anzahl Proben positiv	Summe von T-2 und HT-2 (in µg/kg)			
			Minimum	Maximum	Mittelwert ³	Median ³
Backwaren	89	4	<NG¹	12,4	2,7	2
Mehle (Weizen, Roggen, Dinkel) als Basis für Brot und Gebäck	11	1	<NG	6,9	2,6	2
Zwieback und Knäckebrot	21	1	<NG	11,4	2,8	2
Feinbackwaren	57	2	<NG	12,4	2,6	2
Getreide und Getreideprodukte						
Hafer	12	11	<BG ²	50	16,9	12,8
Frühstückszerealien	10	5	<NG	14,7	6,1	5,2
Haferflocken, Keime, Kleie	107	94	<NG	56,8	20,2	18,5
Teigwaren	1	1	-	6	-	-
Snacks	24	2	<NG	7,2	2,6	2
Kindernährmittel auf Getreidebasis	4	0	<NG	<BG	2,8	2,6

¹ NG = Nachweisgrenze = 2 µg/kg; ² BG = Bestimmungsgrenze = 4,5 µg/kg;

³ Berechnung: $x < NG = NG/2$; $NG < x < BG = BG/2$

Tab. 2: Mittlere und hohe alimentäre Exposition nach Verzehr von durchschnittlich mit T-2 und HT-2 Toxin belasteten Lebensmitteln und TDI-Auslastung für verschiedene Bevölkerungsgruppen

Bevölkerungsgruppe	Mittlere Exposition		Hohe Exposition	
	Aufnahme (µg/d)	TDI-Auslastung (%)	Aufnahme (µg/d)	TDI-Auslastung (%)
Konsum von Backwaren, Frühstückszerealien (Müsli) und Snacks¹				
Vorschulkinder	0,6	48	1,3	112
Frauen	0,9	25	2,1	58
Männer	1,1	25	2,5	58
Konsum von Backwaren, Frühstückszerealien (Haferflocken) und Snacks¹				
Vorschulkinder	1	81	2,4	200
Frauen	1,6	44	3,5	97
Männer	1,8	42	4,1	98

¹ Verzehrdaten gemäß Elmadfa und Freisling, 2004

Risikocharakterisierung

Der für T-2 und HT-2 Toxin gemeinsam festgelegte TDI von 0,06 µg/kg KG/d wurde der mittleren und hohen Exposition gegenüber gestellt. Bei durchschnittlichen Toxingehalten und mittlerem

Verzehr wird der TDI für Vorschulkinder zu 48 % und für Frauen und Männer zu jeweils 25 % ausgeschöpft. Bei hohem Verzehr steigt die Auslastung des TDI für Vorschulkinder auf 112 % und für Erwachsene auf 58%. Werden als Frühstückszerealien ausschließlich Haferflocken verzehrt, erhöht sich die Belastung mit T-2 und HT-2 Toxin in allen Bevölkerungsgruppen und der TDI wird bei mittlerem Verzehr zwischen 42 und 81 % ausgeschöpft. Bei hohem Verzehr von Haferflocken ist der TDI in der Bevölkerungsgruppe Vorschulkinder zu 200 % und bei Erwachsenen zu 100 % ausgelastet.

Ein mittlerer Verzehr von Lebensmitteln mit durchschnittlichen Gehalten von T-2 und HT-2 Toxin führt in keiner Bevölkerungsgruppe zur Ausschöpfung des TDI. Eine längerfristige Überschreitung kann für die österreichische Bevölkerung, vor allem für Vorschulkinder, durch die Aufnahme von T-2 und HT-2 Toxin über den häufigen Verzehr von Haferprodukten gegeben sein. Dies erfordert erhöhte Aufmerksamkeit und Risikominimierungsmaßnahmen. Ein kurzfristig höherer Verzehr und ein Überschreiten des TDI stellen jedoch keine Gefährdung für den Konsumenten dar, da dieser gegenüber dem Tierversuch mit einem ausreichenden Sicherheitsfaktor versehen ist und unter der Annahme einer täglichen lebenslangen Exposition abgeleitet wurde.

Literatur

Elmadfa I., Freisling H. (2004): Wissenschaftliche Auswertung des neu erhobenen Datenmaterials zu den Aufnahmemengen von Lebensmitteln durch verschiedene Bevölkerungsgruppen. Universität Wien (nicht veröffentlicht).

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2001): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series: 47.

Schuhmacher U., Heine K., Schneider K. (2010): Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. Wissenschaftlicher Bericht erstellt im Auftrag der EFSA. Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH, Freiburg, Deutschland.

Scientific Committee on Food (SCF) (2001): Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin adopted on 30 May 2001. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General.

Scudamore K.A. (2008): Fate of fusarium mycotoxins in the cereal industry: recent UK studies. World Mycotoxin Journal 1: 315-323.

Autoren

ELKE RAUSCHER-GABERNIG und R. GROSSGUT, AGES, Bereich Daten, Statistik, Risikobewertung, Spargelfeldstr. 191, 1220 Wien, Austria.

Luft-Mikroflora ausgewählter Kellertypen in Österreich

Characterisation of the aero mycological flora of selected wine cellars in Austria

Karin MANDL, A. CLEMENZ, Katja STERFLINGER, W. KNEIFEL

Zusammenfassung

Der größte Teil der mikrobiologischen Flora in einem Weinkeller besteht aus Schimmelpilzen. In dieser wissenschaftlichen Studie wurden verschiedene Typen von Weinkellern in Niederösterreich und im Burgenland untersucht, um das potentielle Risiko für die Gesundheit und für den Wein zu erfassen. In den Jahren 2005 und 2006 wurden über einen Zeitraum von 9 Monaten zwei Parameter erfasst. Es wurde die relative Feuchtigkeit und die Temperatur gemessen. Die Gesamtkeimzahl in dieser Zeit bewegte sich zwischen 357KBE und 4769KBE/m³ Luft. Es wurden die Medien CASO, DG18 und MEA verwendet. Nach der Kultivierung wurden die Keime mit Hilfe des Mikroskops bestimmt. Die häufigsten Gattungen waren *Penicillium*, *Aspergillus*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Phoma*, *Trichoderma* und *Ulcocladium*.

Schlüsselwörter: Schimmel, Keller, Kellerklima

Summary

In wine cellar fungi constitute the main part of the aero- microbiological flora. In this scientific study different types of wine cellars in Lower-Austria and Burgenland were compared with each other regarding to fungal decay and recognising the potential risks of health and wine in general. During the calendar years 2005/ 2006 for the period of nine months two parameters were measured in cellars: the ambient temperature and the relative humidity. The total number of fungi which have been collected in this time periode amounts between 357 and 4769 CFU/m³ air. The used culture media were CASO, DG18 and MEA. After cultivation of the germs they were analysed with a microscope. In the main we determined the genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Phoma*, *Trichoderma* and *Ulcocladium*.

Keywords: fungi, cellar, climate

Einleitung

Viele Keller bieten gute Voraussetzungen für das Wachstum von Schimmelpilzen. Oft ist der Pilz *Zasmidium cellare* mit seinem typischen schwarzen Film sichtbar. In Österreich ist dieser Pilz als Schwarze Katze oder Kellerrotz bekannt. Der schwarze Pilz ist ein Indikator für die Luftfeuchtigkeit von 85% und für gutes Kellerklima.

Die Schimmel und Bakterien haben einen Einfluss auf den Wein und den Gesundheitsstatus der Kellermeister. Im Prinzip werden durch die Sporen Allergien, Infektionen und toxische Erkrankungen ausgelöst. Natürlich ist die Wahrscheinlichkeit zu erkranken variabel und abhängig vom Allgemeinzustand des Einzelnen. Einige Studien haben gezeigt, dass Pilzkontamination von Innenluftschimmelpilzen im Zusammenhang stehen mit nicht spezifischen respiratorischen Symptomen und Ausbruch von Lungenerkrankungen wie z.B. Asthma (CLEMENZ 2008).

Material und Methoden

Die Proben wurden in acht verschiedenen Kellern in Niederösterreich und Burgenland gesammelt.

Weinkellerkategorien:

Die Keller wurden eingeteilt aufgrund ihrer Bauweise.

Alte Erdkeller (Keller A,B,C)

Hauskeller (Keller D, E)

Klimatisierte Keller (Keller F, G, H)

Ein Protokoll aus den Schimmelpilz-Leitfaden (SEIFERT 2002) wurde für diese Untersuchungen angepasst.

Aufzeichnung der physikalischen Daten:

Die Daten für die Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden erhoben mit dem Datenlogger ILOG (Escort, VWR, Wien) und dem TFM (ELV Elektronik AG).

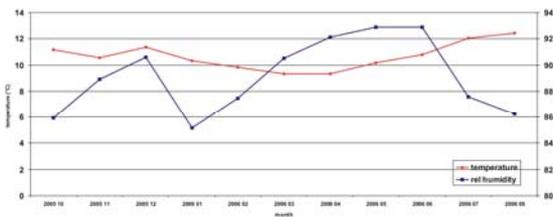
Mikrobiologische Probennahme:

Für das Sammeln und das Ankultivieren von den Keimen wurden drei verschiedene Medien verwendet. CASO Agar wurde für die Gesamtkeimzahl und Dichloran Glycerol Agar (DG18, Roth, Nr. AE26.1) für die xerophilen Pilze eingesetzt. Malzextrakt (MEA) wurde zur Erfassung der restlichen Pilze verwendet.

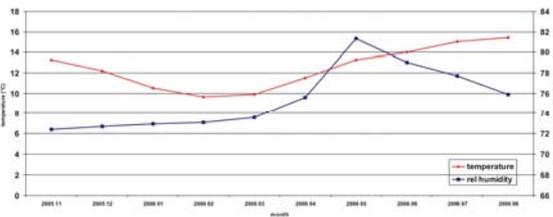
Die MEA und DG18 Platten wurden für 6Tage bebrütet und ausgezählt. Der CASO Agar wurde nach einer Bebrütungszeit von zwei Tagen das erste Mal ausgewertet und danach mit bei Raumtemperatur weiter bebrütet. Die zweite Auswertung erfolgte nach sechs Tagen. Die Anzahl der Mikroorganismen wurde in KBE (koloniebildende Einheiten) /m³ angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

In Grafik 1 und 2 sind zwei typische Keller dargestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit ist zwischen 85% und 93%. Es ist ersichtlich, dass die Raumtemperatur bei beiden Kellern einen ähnlichen Verlauf zeigt.



Grafik 1: Darstellung der relativen Luftfeuchtigkeit und Temperaturverlaufes eines alten Erdkellers



Grafik 2: Darstellung der relativen Luftfeuchtigkeit und Temperaturverlaufes eines klimatisierten Kellers

Culture Medium	Bestimmung von	Kellerkategorie	CFU/m ³ (Mittelwert)
	Gesamtkeimzahl		
CASO	Mikroorganismen	Alte Erdkeller	3.456
DG18	Schimmelpilzen		4.088
MEA	Schimmelpilzen		4.769
	Gesamtkeimzahl		
CASO	Mikroorganismen	Hauskeller	4.643
DG18	Schimmelpilzen		4.624
MEA	Schimmelpilzen		4.293
	Gesamtkeimzahl		
CASO	Mikroorganismen	Klimatisierte Keller	717
DG18	Schimmelpilzen		868
MEA	Schimmelpilzen		357

Abb1.: Mittelwert der Luftkeimsammlungen der einzelnen Kellerkategorien

Die häufigsten Gattungen waren *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Phoma*, *Trichoderma* und *Ulcocladium*.

Alte Gewölbekeller

In zwei der drei untersuchten Keller lag die Luftfeuchtigkeit im Jahresschnitt über 90%. In allen drei Kellern wird die Mikroflora von *Penicillium* (im Mittel 77%) und *Aspergillus* (im Mittel von 16%) dominiert, was zum Teil sicherlich daran liegt, dass diese beiden Gattungen besonders stark sporulieren und besonders leicht in der Luft verbreitet werden.

Hauskeller

In beiden untersuchten Weinkellern gab es offensichtlichen Schimmelbefall. Die Keimzahl lag auf MEA im Schnitt 4293KBE/m³. Die Verteilung der Gattungen war nahezu identisch der in den Gewölbekellern und somit hauptsächlich von Penicillien (78%) und Aspergillen (15%) geprägt.

Klimatisierte Keller

Die durchwegs niedrige relative Luftfeuchtigkeit lag im Jahresschnitt über 75% und spiegelte sich in den wesentlich niedrigeren Keimzahlen wieder. Der Anteil der Penicillien liegt nur bei 52% und das Spektrum der gefundenen Schimmelpilzgattungen ist wesentlich stärker diversifiziert als in den Kategorien Gewölbekeller und Hauskeller.

Literatur

CLEMENZ A., MANDL K. (2007): Das Heimliche Leben im Keller: Guter Schimmel- Böser Schimmel. Winzer, Vol 01/2007.

CLEMENZ A., STERFLINGER K., KNEIFEL W., MANDL K. (2008): Airborne fungal microflora of selected types of wine-cellars in Austria. Mitteilungen Klosterneuburg

SEIFERT, B. (2002): Leitfaden zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Schimmelpilzwachstum in Innenräumen. Umweltbundesamt Berlin

Autoren

Karin MANDL¹, A. CLEMENZ¹, Katja STERFLINGER², W. KNEIFEL²

¹ LFZ für Wein- und Obstbau, Klosterneuburg

² Universität für Bodenkultur, Wien

Ansprechpartner: Dr. Karin MANDL Karin.Mandl@weinobst.at

Desoxygenivalenol (DON) beim Masthuhn

Deoxynivalenol (DON) affecting health in the broiler

J. BÖHM

Summary

Low Deoxynivalenol (DON) of 1,8 ppm in the feed for broilers may induce injuries of malformed and shortened jejunum villi, electrophysiological disturbances in glucose resorption and paradox immunological viral titer responses. Higher DON concentration of 18 ppm in feed leads to reduced zootechnical performance as already known from literature.

Key words: deoxynivalenol, jejunum villi malformation, disfunction, vaccination titers

Zusammenfassung

Subklinische Störungen sind schon bei 1,8 ppm Desoxygenivalenol (DON)- Konzentrationen im Futter zu beobachten: Darmveränderungen wie Zottenlängenverkürzungen, Darmgewebeverkleinerungen, sowie elektrophysiologische Transportstörungen von Glucoseresorption und paradoxe immunologische virale Impftiterverläufe.

Wie aus der Literatur bekannt ist, waren signifikante Minderungen der zootechnischen Leistungsparameter erst bei hohen 18 ppm DON im Broilerfutter nachweisbar.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol, Dünndarmzottenveränderungen, Impftiterverläufe

Einleitung

Deoxynivalenol (DON) bewirkt als Futterkontaminant besonders beim Schwein empfindliche Produktionseinbußen. Unsere Untersuchungen bezogen sich vorwiegend auf subklinische Messungen beim Masthuhn, welches überraschend bereits bei geringen oralen DON Belastungen gesundheitsrelevante Wirkungen im Dünndarmbereich und in der Immunabwehr zeigt.

Mastleistungen

Ergebnisse der wöchentlichen und gesamten Futtermittelverwertungen (Relation von Futteraufnahme zur Gewichtszunahme der Tiere) zeigen tendenzielle Erhöhungen (Verslechterungen) mit steigenden DON-Konzentrationen im kommerziellen Alleinfutter für Broiler (Tabelle 1).

DON wurde aus einer *Fus. graminearum* Kultur isoliert und dem Alleinfutter in den Dosierungen 1,8 und 18 ppm zugemischt. In der 18 ppm DON-Futtergruppe war von Beginn an eine deutliche Gewichtsreduktion zu beobachten, die verminderte Futteraufnahme war erst später nach der 2. Woche deutlich bemerkbar.

Tabelle 1: Wöchentliche und gesamte Futtermittelverwertungszahlen
(kg Futtermittelaufnahme/ kg Zuwachs, n=25 Ross 308)

Alter (Tage)	Kontrolle n.n. DON (<50 ppb)	1,8 ppm DON	18 ppm DON
8 to 14	1.22	1.24	1.27
15 to 21	1.48	1.52	1.59
22 to 28	1.76	1.83	1.86
gesamt 8 to 28	1.53	1.57	1.62

Metabolische Studien

Die Untersuchungen zum DON-Serumspiegel zeigten ähnliche Ergebnisse wie die des Schweines. DON erreichte nach peroraler Verabreichung von 190 µg DON eine Maximalkonzentration von 1,2 bis 1.6 ppb und wurde nach 4 bis 6 Stunden auf 0,2 ppb (direkte MS Technik mit Nachweisgrenze im Serum) reduziert. Wie Untersuchungen mit 5 ppm natürliches DON (aus kontaminierter Weizenkomponente) im Broilerfutter ergeben haben, wird DON besonders in den Blinddarminhalten des Broilers angereichert. Nicht nachweisbar war DON in der Leber und Galle.

Tabelle 2: Studien über ppm DON- Gehalte im Futter, Darmtrakt und Leber an männlichen Ross 308 (n=6)

	Kontrolle	1 ppm DON	5 ppm DON
Futter	0,05	1,0	5,0
Kropfinhalt	n.n. (<25 ppb)	0,5	2,5
Muskelmageninhalt	n.n.	0,1	0,5
Leber	n.n.	n.n.	n.n.
Galle	n.n.	n.n.	n.n.
Blinddarminhalt	0,02	0,15	0,85
Kot	n.n.	0,05	0,25

Blutbild

Die Untersuchungen des weißen Blutbildes ergaben Veränderungen der Relation zwischen Heterophilen/Granulozyten zu Lymphozyten von 1,5 auf 2,0, die typisch bei erhöhtem Stress auftreten und Hinweise auf eine Immunsuppression geben (Awad et al. 2010).

Impftiterverläufe

Alle DON-gefütterten Tiere zeigten bei der Obduktion verkleinerte Thymusorgane.

Die ersten Impfungen gegen drei wirtschaftlich wichtige virale Erkrankungen erhielten die Küken beim Schlupf. Die für von Viren verursachten Atemwegserkrankungen wie Newcastle Disease (NDV), Infektiöse Bronchitis (IBV) wurden erheblich im Impftiterspiegel nach der Boosterung mit den Stämmen Hitchner und 4-91 reduziert, während die Titer der Infektiösen Bursitis (IBD oder Gumboro) eine paradoxe Steigerung gegenüber der DON unbelasteten Kontrolltiere nach erfolgter Boosterung am Tag 13 mit D78 erzielten.

Die Impftiterspiegel gegen virale Erkrankungen sind in den Tabellen 4 bis 6 gelistet.

Tabelle 4: Titerhöhe gegen NDV (n=7 Ross 308 männlich)

	Alter (Tage) Boosterung Tag 10				
	3	7	15	29	42
Kontrolle	18950	6576	468	888	8122
1,8 ppm DON			686	2149	3965
18 ppm DON			1065	3122	3564
Standardfehler	2070	773	74	722	943

Tabelle 5: Titerhöhe gegen IBV (n= 7 Ross 308 männlich)

	Alter (Tage) Boosterung Tag 12				
	3	7	15	29	42
Kontrolle	10249	3051	414	1914	6603
1,8 ppm DON			499	1448	3919
18 ppm DON			554	2458	2262
Standardfehler	956	506	44	255	779

Tabelle 6: Titerhöhe gegen IBD (n=7 Ross 308 männlich)

	Alter (Tage) Boosterung Tag 13				
	3	7	15	29	42
Kontrolle	12873	5037	429	48	10838
1,8 ppm DON			611	159	15459
18 ppm DON			810	119	14257
Standardfehler	1418	769	71	612	834

Pathohistologische und elektrophysiologische Untersuchungen

Die Gewebemassen der Dünndarmstücke der DON-gefütterten Tiere nahmen gegenüber denen der Kontrolltiere deutlich ab.

Mikroskopisch konnten Zottenverkürzungen und gleichzeitige Verdickungen beobachtet werden. Darüber hinaus waren Epithelschäden in Form von Fissuren bereits bei den 1,8 ppm DON-gefütterten Tieren erstmals zu beobachten.

Gewebeproben aus dem Dünndarmbereich wurden elektrophysiologisch in Ussing-Kammern auf Ströme und Widerstände bei gleichbleibender Spannung vermessen. Veränderungen der Messwerte deuteten auf Störungen im Glucosetransport (Elektrolyttransport) hin und wurden bereits mehrfach eingehender untersucht. Als Ursachen der veränderten elektrophysiologischen Werte werden Störungen an den Glucose-Rezeptoren vermutet. (Awad et al. 2007, 2008, 2009).

Literatur

Yunus, A. W., H. Valenta, S. M. Abdel-Raheem, and J. Böhm. 2010. Blood plasma levels of deoxynivalenol and its de-epoxy metabolite in broilers after a single oral dose of the toxin. *Mycotoxin Research* 26 (4): 217-220.

Autor:

Josef BÖHM, Institut für Tierernährung, Department für Nutztiere und öffentliches Veterinärwesen
 Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A 1210 Wien

josef.boehm@vetmeduni.ac.at

Fumonisin-induzierte Veränderung des Sphingolipid Stoffwechsels in Schweinen – Analytische und biologische Effekte

*Fumonisin induced alteration of sphingolipid metabolism in piglets –
Analytical and biological aspects*

Heidi Schwartz, B. Grenier, Irene Schöner, R. Krska, G. Schatzmayr,
Isabelle P. Oswald, W.-D. Moll

Summary

The ratio of the free sphingoid bases sphinganine (Sa) to sphingosine (So) in plasma has been proposed as a biomarker for exposure to fumonisins. The aim of this work was to investigate the influence of different concentrations of fumonisins in animal feed on the sphingolipid metabolism in growing pigs.

To this end, a method for determination of the Sa/So ratio in plasma- and tissue samples was developed and applied to analysis of samples collected in the course of 2 feeding trials. Mean Sa/So ratios in tissue and plasma samples of piglets receiving 2 mg fumonisin B1/kg body weight for 14 days were 5.4 (kidney), 3.1 (liver), 1.4 (lung) und 2.5 (plasma) compared to Sa/So ratios between 0.11 and 0.24 in tissue and plasma samples of the control group. Administration of 4.6 mg/kg fumonisin B1 containing diet *ad libitum* caused a first significant increase in the Sa/So ratio to 0.42 after 2 weeks. In the subsequent 3 weeks, a steady increase of the mean Sa/So ratio in plasma up to a final value of 1.0 was observed.

Keywords: Fumonisin, biomarker, sphingosine, sphinganine, pigs

Zusammenfassung

Das Verhältnis der freien Sphingoidbasen Sphinganin (Sa) zu Sphingosin (So) in Plasma und Geweben ist ein möglicher Biomarker für die Exposition zu Fumonisinen. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Fumonisinen in Tierfutter auf den Sphingolipid Metabolismus in heranwachsenden Schweinen zu untersuchen.

Dafür wurde eine Methode zur Bestimmung des Sa/So Verhältnisses in Plasma- und Gewebeproben entwickelt und auf Proben, die im Laufe zweier Fütterungsversuche gezogen wurden, angewandt. Mittlere Sa/So Verhältnisse (n=6) in Gewebe- und Plasmaproben von Schweinen nach Verabreichung von 2 mg Fumonisin B1 pro kg Körpergewicht für 14 Tage waren 5.4 (Niere), 3.1 (Leber), 1.4 (Lunge) und 2.5 (Plasma). In Geweben und Plasma von Schweinen der Kontrollgruppe wurden Sa/So Verhältnisse zwischen 0.11 und 0.24 ermittelt. Fütterung von 4.6 mg/kg Fumonisin B1 enthaltender Nahrung *ad libitum* führte zu einer ersten signifikanten Erhöhung des Sa/So Verhältnisses in Plasma auf 0.42 nach 2 Wochen. In den folgenden 3 Wochen kam es zu einem stetigen Anstieg des mittleren Sa/So Verhältnisses auf einen finalen Wert von 1.0.

Schlüsselwörter: Fumonisine, Biomarker, Sphingosin, Sphinganin, Schweine

Einleitung

Fumonisine sind cancerogene Mykotoxine, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den Sphingolipiden Sphinganolin und Sphingosin den Sphingolipid Stoffwechsel verändern können. Konkret beruht dies auf einer Hemmung des Enzyms Ceramid-synthase, das ausgehend von Sphinganolin Ceramide (Signalmoleküle, Komponenten der Zellmembran) herstellt. Eine Anhäufung von Sphinganolin führt zu erhöhten Sphinganolin zu Sphingosin (Sa/So) Verhältnissen (z.B. Riley and Voss, 2006) in Plasma, Geweben und Urin.

Allerdings war dieser Biomarker in Plasma und Urin bei einigen Humanstudien nicht aussagekräftig (zusammengefasst von Shephard et al., 2007), was unter anderem auf unterschiedliche Sa/So Verhältnisse in Plasma von nicht Fumonisin exponierten Personen, auf zu geringe Fumonisin-exposition oder auf einen zu geringen Zeitraum der Exposition zu Fumonisinen zurückgeführt werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Fumonisinen in Tierfutter auf den Sphingolipid Metabolismus in heranwachsenden Schweinen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei Fütterungsversuche durchgeführt und eine Methode zur Bestimmung der Sphingoidbasen Sphinganolin und Sphingosin in Plasma und Gewebeproben entwickelt und validiert.

Material und Methoden

Fütterungsversuche: Es wurden zwei Fütterungsversuche mit heranwachsenden Schweinen durchgeführt: Im ersten wurden einer Gruppe von 6 Schweinen über einen Zeitraum von 2 Wochen 2 mg Fumonisin B1/kg Körpergewicht zusätzlich zu nicht kontaminiertem Futter verabreicht. Im zweiten Fütterungsversuch wurde eine Gruppe von 6 Schweinen über einen Zeitraum von 5 Wochen mit Futter, das 4.6 mg/kg Fumonisin B1 enthielt, ad libitum gefüttert. Bei beiden Versuchen gab es je eine Kontrollgruppe von 6 Schweinen, die Fumonisin freies Futter erhielten.

Plasmaproben wurden 1 x pro Woche gesammelt. Am Ende des ersten Fütterungsversuches wurden die Schweine eingeschläfert. Es wurde Leber-, Lungen- und Nierenproben genommen, sogleich mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Probenaufarbeitung: 200 µl Aliquote von Plasmaproben wurden mit C17-Sphingosin und C20-Sphinganolin als Wiederfindungsstandards gespikt, mit 400 µl Chloroform und 1.3 ml methanolischer Kaliumhydroxidlösung (0.154 M) versetzt und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 1.2 ml Chloroform wurde die Chloroformphase 3 x mit alkalischem Wasser gewaschen und anschließend zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit OPA-reagens (Riley et al., 1994) derivatisiert (Endvolumen 300 µl) und mittels HPLC-FLD gemessen.

Zur Aufarbeitung von Gewebeproben wurden Aliquote von verschiedenen Stellen der Gewebe genommen (insgesamt 1 g) und auf Eis im vierfachen Volumen von kaltem 50 mM K₂HPO₄-puffer homogenisiert. 100 µl Aliquote wurden anschließend auf gleichem Weg wie die Plasmaproben aufgearbeitet und derivatisiert.

Chromatographische Analyse: 25 µl von Standard und Probelösungen wurden in das chromatographische System injiziert und bei 25°C auf einer C6 Phenylsäule (50 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße, Phenomenex) mit Vorsäule des gleichen Materials im Gradientenmodus aufgetrennt. Mobile Phase A bestand aus 60% wässrigem Methanol und 0.1% Eisessig, mobile Phase B aus 90% wässrigem Methanol und 0.1% Eisessig. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor (Anregung bei 335 nm, Emission bei 440 nm).

Ergebnisse und Diskussion

Methodenvalidierung: Die Nachweisgrenze von Sphinganin und Sphingosin (S/N = 3) lag bei 0.2 ng/ml in Standardlösungen, bei 0.6 ng/ml in Plasmaproben und bei 12 ng/g in Gewebeproben. Die Bestimmungsgrenze war 1.6 ng/ml in Plasmaproben und 42 ng/g in Gewebeproben. Die Ausbeute von Analyten und internen Standards lag zwischen 75 und 91% in Plasmaproben und zwischen 73 und 88% in Gewebeproben.

Die relative Standardabweichung der Sa/So Verhältnisse bei mehrfacher Aufarbeitung und Messung an einem Tag (n = 5) war 5% für Plasmaproben und zwischen 5 und 7% für Gewebeproben. Wiederholte Aufarbeitung und Analyse einer Kontrollprobe (Lungenhomogenisat) an 11 Tagen über den Zeitraum von 6 Wochen ergab eine relative Standardabweichung des Sa/So Verhältnisses von 6.4%. Typische HPLC-Chromatogramme von Plasma- und Leberproben sind in **Abbildung 1** dargestellt.

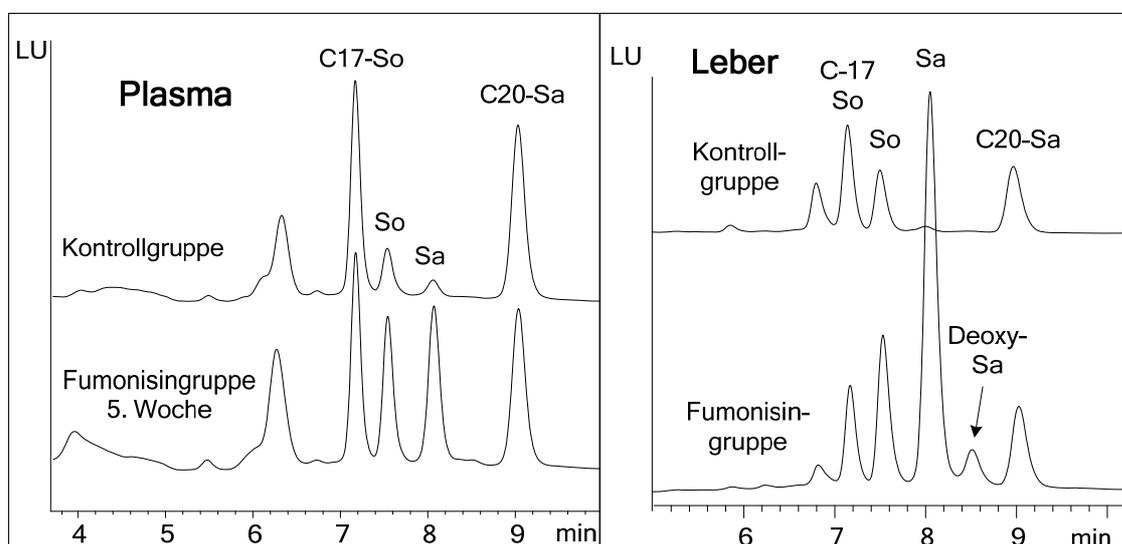


Abbildung 1: HPLC-FLD Chromatogramme von Plasmaproben des zweiten und Leberproben des ersten Fütterungsversuchs. C17-So: C17-Sphingosin, So: Sphingosin, Sa: Sphinganin, C20-Sa: C20-Sphinganin, Deoxy-Sa: Deoxy-Sphinganin

Ergebnisse der Fütterungsversuche: Vor der ersten Verabreichung von FB1 im Zuge des ersten Fütterungsversuches wurden in Plasmaproben der Fumonisingruppe und in Plasmaproben der Kontrollgruppe ähnliche Sphingarin zu Sphingosin (Sa/So) Verhältnisse ermittelt. Jedoch bereits nach 7 Tagen Exposition zu 2 mg FB1/kg Körpergewicht waren die Sa/So Verhältnisse in Plasma der Fumonisingruppe signifikant von 0.24 ± 0.04 auf 2.1 ± 0.2 erhöht. Nach weiteren 7 Tagen wurde ein weiterer Anstieg auf 2.5 ± 0.5 verzeichnet. In Gewebeproben wurden ebenfalls signifikante Unterschiede im Sa/So Verhältnis zwischen der Fumonisingruppe und der Kontrollgruppe erhalten. Höchste Anstiege wurden bei Nieren- und Leberproben festgestellt (siehe **Tabelle 1**).

Tabelle 1: Mittlere Sa/So Verhältnisse (\pm natürliche Standardabweichungen, $n = 6$) in Gewebeproben von Schweinen nach Konsum von Kontrolldiät oder Kontrolldiät plus 2 mg Fumonisin B1 pro kg Körpergewicht für 14 Tage.

	Kontrollgruppe	Fumonisingruppe
Plasma	0.24 ± 0.04	2.5 ± 0.5
Kidney	0.15 ± 0.03	5.4 ± 0.3
Lung	0.15 ± 0.02	1.4 ± 0.6
Liver	0.11 ± 0.02	3.1 ± 1.1

Im zweiten Fütterungsversuch wurde erst nach 2 Wochen (3. Probenahme) ein leichter, aber signifikanter Anstieg des Sa/So Verhältnisses von 0.24 ± 0.06 auf 0.42 ± 0.17 nachgewiesen. Bei den weiteren Probenahmen (3. bis 5. Woche) zeigte sich ein stetiger Anstieg des mittleren Sa/So Verhältnisses bis auf einen finalen Wert von 1.04 ± 0.22 . Die mittleren Sa/So Verhältnisse in der Kontrollgruppe waren ähnlich zu den Werten in der Fumonisingruppe in der ersten Woche und blieben über den Verlauf des Fütterungsversuchs stabil. Ein Vergleich der Sa/So Verhältnisse in Plasmaproben des ersten und zweiten Fütterungsversuchs ist in **Abbildung 2** gegeben.

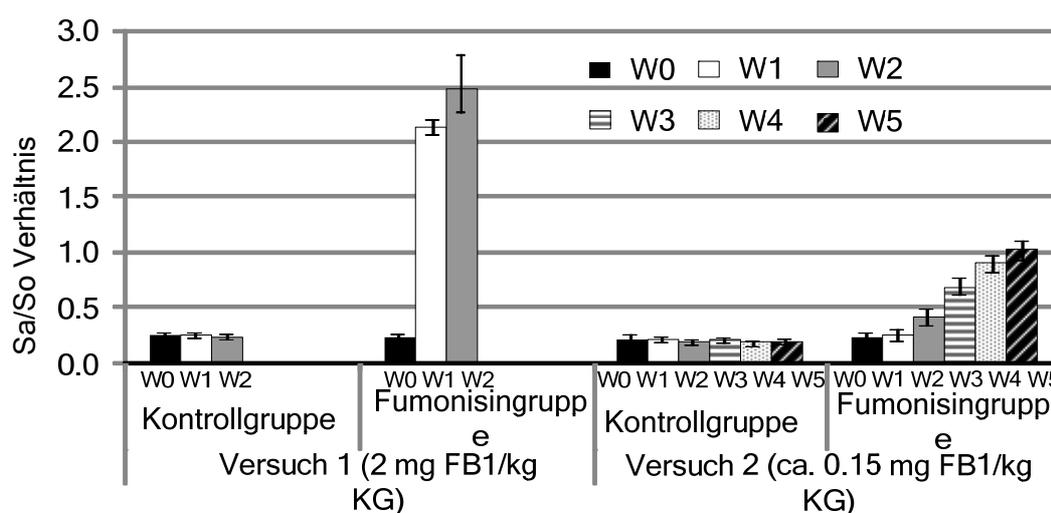


Abbildung 2: Mittlere Sa/So Verhältnisse (\pm natürliche Standardabweichungen, $n = 6$) in Plasmaproben von Schweinen des ersten und zweiten Fütterungsversuchs. W: Woche

Conclusio

Verabreichung von Fumonisin B1 an Schweine erhöht das Sa/So Verhältnis in Plasma und Geweben von Schweinen. Zeitpunkt und Ausmaß der Erhöhung sind von der zugeführten Menge an FB1 abhängig. Verfütterung von Futter, das 4.6 mg/kg Fumonisin B1 enthielt und dessen FB1 Konzentration damit knapp unter dem gesetzlichen Grenzwert von 5 mg/kg lag, führte nach 2 Wochen zu signifikant erhöhten Sa/So Verhältnissen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Sa/So Verhältnis erwies sich demnach als geeigneter Biomarker für Fütterungsversuche auch bei geringen Konzentrationen, sofern diese eine Laufzeit von mindestens 2 Wochen haben. Allerdings ist die Verwendung des Sa/So Verhältnisses als alleiniger Expositionsbiomarker bei geringen Fumonisin B1 Konzentrationen im Futter und kurzer Expositionsdauer kritisch. Hier ist die Analyse von Fumonisin B1 und seinen hydrolysierten Formen in Kotproben als weiterer Biomarker anzuraten (siehe Beitrag von Greitbauer et al. In diesem Tagungsband). Bestimmung von Fumonisin B1 in Gewebeproben ist bei geringer Exposition zu Fumonisin B1 nicht anzuraten, da selbst bei verabreichten Konzentrationen von 2 mg Fumonisin B1/kg Körpergewicht über zwei Wochen Fumonisin B1-Konzentrationen nur im ng/g Bereich ermittelt werden konnten (siehe Beitrag von Schöner et al. In diesem Tagungsband).

References

- Riley R.T., Voss K.A. 2006. Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicol. Sci.* 92: 335-345.
- Shephard G.S., van der Westhuizen L., Sewram V. 2007. Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: A review. *Food Add. Contam.* 24: 1196-1201.
- Riley R.T., Wang E., Merrill A.H.Jr. 1994. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: Use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J. AOAC Int.* 77: 533-540.

Autoren

Heidi SCHWARTZ, Irene SCHÖNER, Rudolf KRŠKA, Analytikzentrum, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln, Österreich

Bertrand GRENIER, Isabelle P. OSWALD, INRA Toulouse, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, F-31027 Toulouse, Frankreich

Gerd SCHATZMAYR, Wulf-Dieter MOLL, Biomin Research Center, Technopark 1, A-3430 Tulln, Österreich

QTL Kartierung von Ährenfusarioseresistenz in zwei *Triticum dicoccum* x *Triticum durum* Rückkreuzungs-Populationen

Back-cross QTL mapping of resistance to Fusarium head blight derived from Triticum dicoccum

Karin Huber, Maria Bürstmayr, H. Bürstmayr

Summary

In the present study the line *Triticum dicoccum*-161 (genome AABB, 2n=28), a relative of durum wheat, was used to identify quantitative trait loci (QTL) conferring quantitative resistance against *Fusarium* head blight (FHB). Three back-cross populations (BC₁F₄) were field evaluated after artificial spray inoculations for FHB resistance during 4 seasons. In parallel the recombinant lines were genotyped with molecular markers (SSR and AFLP) for resistance against FHB. One QTL was identified on chromosome 4B at the *RhtB1* locus, accounting for 40% and 9.3% of the phenotypic variation in the *T. dicoccum*-161 x Helidur and *T. dicoccum*-161 x Floradur populations, respectively. In the *T. dicoccum*-161 x Floradur population one further QTL mapped to chromosome 3B, at the AFLP marker XS24M12_7, explaining 14% of the phenotypic variation. The present study demonstrated a strong correlation between FHB resistance and plant height.

Key words: *Fusarium* head blight, tetraploid wheat, resistance, QTL, mapping, DNA marker

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Ährenfusarioseresistenz der *Triticum dicoccum*-161 Linie (Genom AABB, 2n = 28), einem nahen Verwandten des Durumweizens, im Rahmen von QTL Analysen zu charakterisieren. Dazu wurden 3 Rückkreuzungs-Populationen (BC₁F₄) über 4 Jahre am Feld nach Sprühinokulation auf Ährenfusarioseresistenz geprüft. Gleichzeitig wurden die Populationen mit molekularen Markern (SSR und AFLP) auf Resistenz gegenüber Ährenfusariose genotypisiert. Ein QTL für Ährenfusarioseresistenz kartierte auf dem Chromosom 4B in der Nähe des Wuchshöhegens *RhtB1*. Dieser QTL erklärte 40% der phänotypischen Varianz in der *T. dicoccum*-161 x Helidur Population und 9.3% in der *T. dicoccum*-161 x Floradur Population. In der *T. dicoccum*-161 x Floradur Population kartierte ein weiterer Ährenfusarioseresistenz QTL auf Chromosom 3B nahe dem AFLP Marker XS24M12_7, welcher 14% der phänotypischen Varianz erklärte. Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit weisen auf einen starken Zusammenhang zwischen Wuchshöhe und Fusariumresistenz hin.

Schlüsselwörter: *Fusarium*, Durumweizen, Resistenz, QTL, Kartierung, DNA Marker

Einleitung

Durumweizen (*Triticum durum*) ist gegenüber Ährenfusariose sehr anfällig (Stack et al. 2002), wodurch in Befallsjahren hohe Qualitäts- und Ertragseinbußen entstehen. Der Anbau von resistenten Sorten stellt eine effiziente Maßnahme dar, den Befall mit Ährenfusariose zu vermindern. Allerdings sind für Durumweizen bisher nur wenige und unzureichende

Resistenzquellen bekannt. Der Versuch Ährenfusarioseresistenz von hexaploiden in tetraploiden Weizen zu transferieren war bis jetzt wenig erfolgreich. Aufgrund der geringen Variation der Resistenz gegenüber Ährenfusariose in kultivierten Hartweizen bieten sich alte Landsorten wie Wildemmer oder Kulturemmer als alternative Resistenzquellen für Ährenfusarioseresistenz an (Bürstmayr et al. 2003, Oliver et al. 2007, 2008).

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die molekulargenetische und phänotypische Charakterisierung von Resistenzeigenschaften gegenüber Ährenfusarium in Durum Populationen, welche aus Kreuzungen mit der resistenten tetraploiden *T. dicoccum*-161 Linie (Genom AABB, 2n=28) hervorgegangen sind.

Material und Methoden

Drei Hartweizenpopulationen wurden durch Kreuzung mit den gegenüber Ährenfusariose anfälligen, jedoch agronomisch gut angepassten österreichischen Sorten Helidur, Floradur und DS_131621_B_1 und der resistenten tetraploiden Linie *T. dicoccum*-161 erzeugt. Dazu wurde *T. dicoccum*-161 mit einzelnen Pflanzen der drei anfälligen Durumsorten gekreuzt. F₁ Pflanzen wurden mit dem jeweiligen *T. durum* Elter rückgekreuzt und mittels Einzelkornramsch zur BC₁F₄ Generation geführt. Über 4 Jahre wurden im Durchschnitt je Population 130 BC₁F₄ Nachkommen im Feld nach Sprühinokulation mit den beiden Isolaten *F. graminearum* und *F. culmorum* auf Ährenfusarioseresistenz geprüft. Die Bonitierung der Krankheit erfolgte visuell. Für jede Parzelle wurden die infizierten Ährchen in Prozent an fünf Zeitpunkten nach der Inokulation ermittelt. Gleichzeitig wurden die Linien in der *T. dicoccum* x Helidur Population mit 84 SSR und 207 AFLP Marker und in der *T. dicoccum* x Floradur Population mit 84 SSR und 223 AFLP Marker genotypisiert. Die QTL Kartierung erfolgte in den Programmen CarthaGène (Simon de Givry et al. 2004) und QGene (Nelson 1997).

Ergebnisse und Diskussion

Die Linien aller Populationen zeigten eine kontinuierliche Variation hinsichtlich Fusariumbefall über alle Jahre, welche auf eine quantitative Vererbung der Fusariumresistenz hinweisen. Ein Großteil der Linien war hoch anfällig gegenüber Ährenfusariose. Deutliche Variationen im Befall mit Ährenfusariose konnten sowohl zwischen den Populationen als auch innerhalb einer Population beobachtet werden. Die Inokulation mit *F. culmorum* rief im Vergleich zu *F. graminearum* höhere Infektionsraten hervor. Diese Aggressivitätsunterschiede zwischen den beiden Isolaten erlaubten eine Differenzierung zwischen hoch resistenten und hoch anfälligen Genotypen. Die QTL Analyse mit simple interval mapping (SIM) lokalisierte einen Resistenz QTL auf Chromosom 4B nahe dem SSR Locus *RhtB1*, welcher 40% der phänotypischen Varianz in der *T. dicoccum* x Helidur Population und 9.3% in der *T. dicoccum* x Floradur Population erklärte. Dieser Ährenfusarioseresistenz QTL wurde jedoch von einem Wuchshöhe QTL überlagert (Abb. 1).

Für die *T. dicoccum* x Floradur Population ergab die QTL Analyse mit SIM einen Ährenfusarioseresistenz QTL auf Chromosom 3B nahe dem AFLP Locus XS24M12_7. Dieser QTL erklärte 14% der phänotypischen Varianz und konnte in der Nähe des Gens *Fhb1* (Cuthbert et al. 2006) lokalisiert werden. Das Gen *Fhb1* auf Chromosom 3B stellt einen der effektivsten genetischen Abschnitte für Ährenfusarioseresistenz in hexaploiden Weizen dar. Ein Allelvergleich zwischen dem QTL auf Chromosom 3B in der *T. dicoccum* x Floradur Population mit dem *Fhb1* Locus auf Chromosom 3B von verschiedenen hexaploiden Weizen ergab keine gute Übereinstimmung. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich tetraploider Weizen möglicherweise unabhängig von hexaploiden Weizen entwickelt hat. Eine andere Theorie ist, dass die Gene für Ährenfusarioseresistenz in tetraploiden und hexaploiden Weizen die gleichen sind, jedoch der Marker nicht nah genug am Ährenfusarioseresistenz Merkmal sitzt.

Beide Eltern vererbten günstige Allele für reduzierte Ährenfusariose. Für den QTL auf Chromosom 4B trug der resistente Elter *T. dicoccum*-161 zu einer reduzierten Ährenfusarioseinfektion bei, während der Donor für den QTL auf Chromosom 3B der anfällige Elter Floradur war.

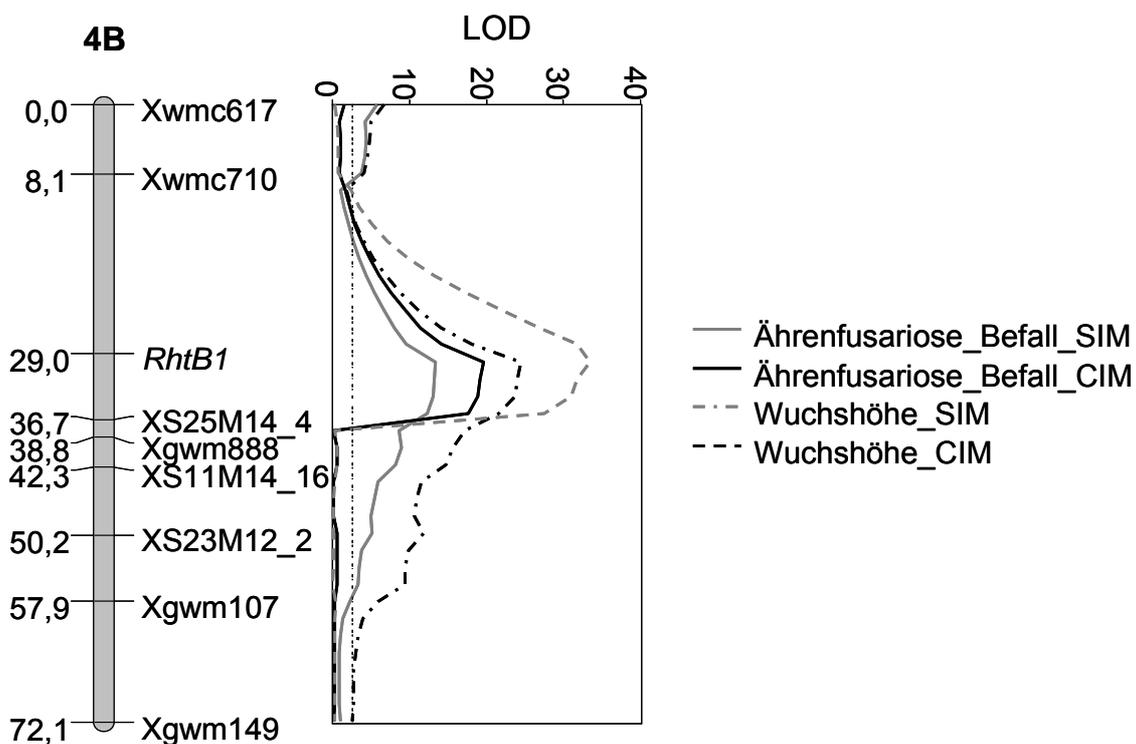


Abb. 1: Genetische Karte für die Merkmale Ährenfusarioserebefall und Wuchshöhe auf Chromosom 4B für die *T. dicoccum* x Helidur Population.

Obwohl es bis jetzt nur eine geringe Anzahl von publizierten und stabilen QTL für Ährenfusarioseresistenz in tetraploiden Weizen gibt, lassen bereits diese wenigen Studien den Schluss zu, dass die Resistenz von komplexer und quantitativer Natur ist. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen ebenfalls, dass das morphologische Merkmal Wuchshöhe Einfluss auf eine erhöhte Ährenfusariose Anfälligkeit hat.

Die Tatsache, dass Durumweizen gegenüber Ährenfusariose hochanfällig ist und pflanzenbauliche und chemische Mitteln nicht ausreichen um die Krankheit zu verhindern, zeugt von der Notwendigkeit für immer neue und bessere Resistenzquellen in Durumweizen, vorallem auch im Hinblick auf qualitativ hochwertige Lebensmitteln. Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit lassen den Schluss zu, dass ausreichend Variation für Ährenfusarioseresistenz in tetraploiden Weizen vorhanden ist, und die Linie *T. dicoccum*-161 einen Beitrag zur Erhöhung der Resistenz gegenüber Ährenfusariose in Durumweizen leisten kann.

Literatur

- Stack, W. R., M. E. Elisas, M. Fetch, D. J. Miller, R. L. Joppa, 2002: Fusarium head blight reaction of Langdon durum - *Triticum dicoccoides* chromosome substitution lines. *Crop science* 42, 637-642.
- Bürstmayr, H., M. Stierschneider, B. Steiner, M. Lemmens, M. Griesser, E. Nevo, F. Tzion, 2002: Variation for resistance to head blight caused by *Fusarium graminearum* in wild emmer *Triticum dicoccoides* originating from Israel. *Euphytica* 130, 17-23.
- Oliver, E. R., W. R. Stack, D. J. Miller, X. Cai, 2007: Reaction of Wild Emmer Wheat Accessions to Fusarium Head Blight. *Crop Science* 47, 893-899.
- Oliver, E. R., X. Cai, L. T. Friesen, S. Halley, W. R. Stack, S. S. Xu., 2008: Evaluation of Fusarium Head Blight Resistance in Tetraploid Wheat (*Triticum turgidum* L.). *Crop Science* 48, 213-222.
- De Givry, S., M. Bouchez, P. Chabrier, D. Milan, T. Schiex, 2005: CARTHAGENE: multipopulation integrated genetic and radiated hybrid mapping. *Bioinformatics* 21, 1703-1704.
- Nelson, J., 1997: QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding* 3, 239-245.
- Cuthbert, P., D. Somers, J. Thomas, S. Cloutier, A. Brulé-Babel, 2006: Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling Fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical applied genetics* 112, 1465-1472.

Autoren

Karin HUBER; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Saatgut, Spargelfeldstrasse 191, 1220 Wien, Austria

Hermann BÜRSTMAYR, Maria BÜRSTMAYR; Universität für Bodenkultur Wien, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Konrad Lorenz Strasse 20, 3430 Tulln, Austria

Nachweis von Fumonisin-Biosynthesegenen und Fumonisin-Bildung bei *Fusarium proliferatum*- und *Fusarium oxysporum*-Isolaten aus Spargel (*Asparagus officinalis*) sowie Untersuchungen zur Pathogenität *in vitro*

*Detection of fumonisin genes, fumonisin production and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium oxysporum* strains from asparagus*

ALEXANDRA SCHOLZ, JULIA-KRISTIN PLATE,
MONIKA GOßMANN, SUSANNE VON BARGEN & CARMEN BÜTTNER

Summary

Fusarium oxysporum and *F. proliferatum* are causal agents of the crown and root rot of asparagus. They are able to produce fumonisins, which are toxic to humans and may increase the virulence of the fungi. Studies showed that already young asparagus plants can be infected with *Fusarium* spp. The genetic analysis (PCR) of selected strains of the species mentioned above demonstrated, that essential genes involved in fumonisin biosynthesis (*FUM1* and *FUM8*) were detectable in investigated strains of *F. proliferatum* but not in all strains of *F. oxysporum*.

Besides, the HPLC showed that these strains were not able to produce fumonisins. All tested *F. oxysporum* and *F. proliferatum* strains were pathogenic to asparagus, although they differed significantly in their virulence.

Keywords

Asparagus officinalis, fumonisins, *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, HPLC, pathogenicity test

Zusammenfassung

Die zu den Fumonisin-Bildnern gehörenden Arten *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* sind Verursacher der Wurzel- und Kronenfäule an Spargel. Fumonisine stellen ein Gesundheitsrisiko dar und spielen ggf. eine Rolle bei der Pathogenese an der Pflanze. Untersuchungen zeigten, dass bereits Spargelpflanzgut mit *Fusarium* spp. infiziert ist.

Eine Überprüfung ausgewählter Isolate durch PCR ergab, dass essentielle Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges (*FUM1* und *FUM8*) in den untersuchten *F. proliferatum*-Isolaten, nicht aber in allen Isolaten von *F. oxysporum* nachweisbar waren. Die HPLC bestätigte zudem, dass diese *F. oxysporum*-Isolate keine Fumonisine bilden.

Eine Korrelation zwischen dem Fumonisin-Bildungsvermögen der Isolate und deren Pathogenität konnte nicht festgestellt werden. Die Isolate unterschieden sich aber in ihrer Virulenz.

Schlüsselwörter

Asparagus officinalis, Fumonisine, *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, HPLC, *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest

Einführung

Fusarium oxysporum und *F. proliferatum* sind Verursacher der Wurzel- und Kronenfäule an Spargel und in der Lage Fumonisine zu bilden [1]. Fumonisine stellen ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar und werden als Virulenzfaktoren an der Pflanze diskutiert [2].

Fumonisine und deren Biosynthesegene

FUM1 (kodiert für eine Polyketidsynthase) und *FUM8* (kodiert für eine Aminoacyltransferase) stellen essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese dar [3]. Auf diese Gene hin untersucht wurden zwei *F. proliferatum*- und fünf *F. oxysporum*-Isolate aus Spargel. Dabei konnte mittels PCR bei beiden *F. proliferatum*-Isolaten und bei einem *F. oxysporum*-Isolat (Foxy-155-Sp) das *FUM1*- und das *FUM8*-Gen nachgewiesen werden. Bei den restlichen *F. oxysporum*-Isolaten zeigten sich bei der *FUM1*-PCR nur schwache oder keine Amplifikate (Abb. 1). Das *FUM8*-Genfragment konnte bei diesen Isolaten nicht amplifiziert werden.

Eine Kultivierung der Isolate auf Maisextrakt-Agar erlaubte eine Fumonisin-Quantifizierung (FB₁ und FB₂) per HPLC. Dabei erwies sich die *F. proliferatum*-Isolate als starke FB₁- und FB₂-Bildner. Bei den *F. oxysporum*-Isolaten bildete nur das Isolat Foxy-155-Sp FB₁ (Abb. 2).

Bei den anderen *F. oxysporum*-Isolaten muss, trotz teilweise vorhandener Messwerte, davon ausgegangen werden, dass keine Fumonisine gebildet wurden.

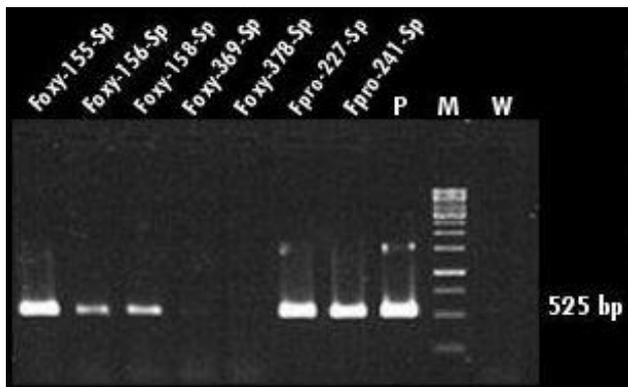


Abb. 1: PCR-amplifiziertes *FUM1*-Genfragment (525 bp) der Isolate, P = Positivkontrolle, M = Marker, W = Negativkontrolle

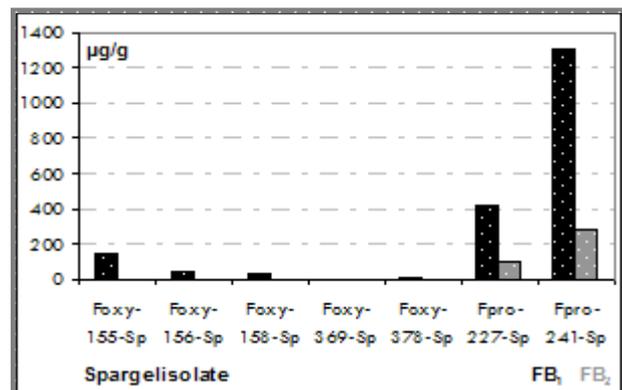


Abb. 2: Mittelwerte (n = 6) der FB₁- und FB₂-Gehalte der Spargelisolates kultiviert auf Maisextraktagar

In vitro-Pathogenitätsschnelltest

Ein Pathogenitätsschnelltest [4] an Spargeljungpflanzen (Sorte RAMOS) sollte von den o. g. genannten Isolaten die Fähigkeit zur Besiedelung und Etablierung in der Pflanze ermitteln und mögliche Korrelationen zwischen der Fumonisin-Bildung und der Virulenz untersuchen.

Der Befallsgrad (errechnet anhand der Wurzelbonitur bzw. Einteilung der Wurzeln anhand ihres Zustandes in 4 Schadensklassen) bestätigte die Fähigkeit aller Isolate in die Wurzel einzudringen, sich in den Leitbahnen anzusiedeln und zu Verbräunungen zu führen. Die *F. proliferatum*-Isolate

unterschieden sich dabei in ihrer Virulenz signifikant von den *F. oxysporum*-Isolaten und wiesen Befallsgrade von fast 60 % auf, während bei *F. oxysporum* die Befallsgrade zwischen 31 und 43 % lagen (Abb 3).

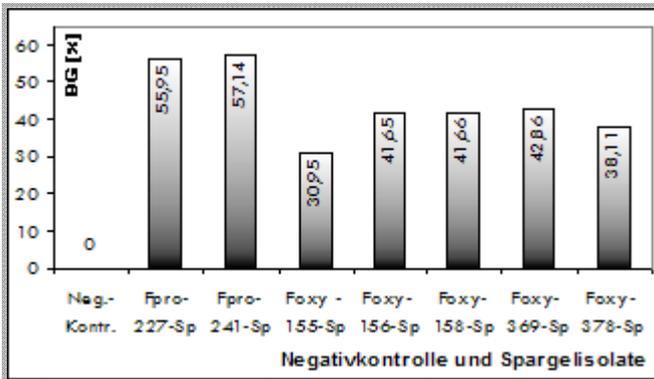


Abb. 3: Befallsgrade der geprüften *Fusarium* spp.-Isolate an Spargeljungpflanzen nach zweiwöchiger Inkubation

Freilanduntersuchungen

Im Frühjahr 2009 wurden zwei Flächen auf dem Versuchsfeld der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät in Berlin-Dahlem mit Spargelpflanzen (Sorte RAVEL) bepflanzt.

Um die Pilzbesiedlung des einjährigen Spargelpflanzgutes zu ermitteln, wurden 100 Jungpflanzen vor der Pflanzung zufällig ausgewählt und drei Wurzelstücke pro Pflanze kronennah entnommen, oberflächendesinfiziert und auf Nährmedium (Spezieller Nährstoffarmer Agar) ausgelegt. Nach einer zehntägigen Inkubation erfolgte eine lichtmikroskopische Determinierung des Pilzauswuchses auf morphologischer Basis. Bei 90 Pflanzen waren die Wurzeln mit Pilzen besiedelt (31 Wurzeln mit einem Pilz, 28 mit zwei Pilzen und 31 mit drei oder mehreren Pilzen).

Ein besonderer Fokus lag auf der endophytischen Besiedlung durch *Fusarium* spp. (Abb. 4). Insgesamt waren die Wurzeln von 44 Pflanzen mit *Fusarium* spp. kontaminiert; davon entfiel ein hoher Anteil (26 Pflanzen) auf eine Besiedelung mit *F. oxysporum* und anderen Pilzen (z. B. *Chaetomium* sp., *Monocillium* sp., *Acremonium* sp.). *F. redolens* wurde an fünf Pflanzen in Kombination mit weiteren Pilzen gefunden. An sechs Pflanzen konnte eine alleinige Kontamination mit *F. oxysporum* und an einer Pflanze eine alleinige Kontamination mit *F. redolens* nachgewiesen werden. Mischinfektionen von *F. oxysporum* und *F. redolens*, sowie weiteren Pilzen traten an fünf Pflanzen auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass schon Jungpflanzen mit *Fusarium* spp. kontaminiert sein können.

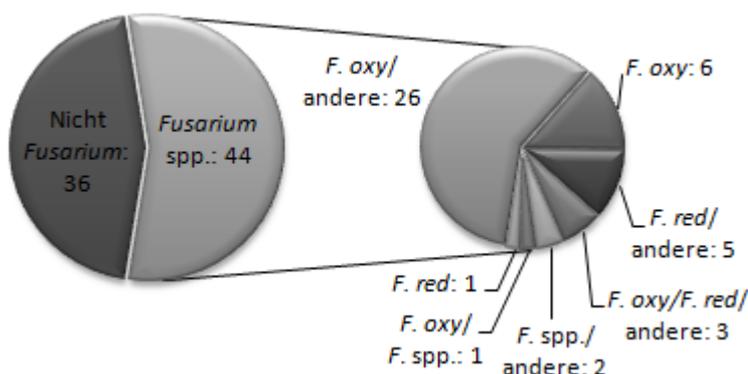


Abb. 4: Zusammensetzung der Kontamination der Wurzeln von Spargeljungpflanzen (n = 100) mit *Fusarium* spp.

Diskussion

Infektionen mit *Fusarium* spp. stellen ein erhebliches Problem im Spargelanbau dar. Wie kürzliche Untersuchungen erneut belegten, können bereits Spargeljungpflanzen mit *F. oxysporum* u. a. *Fusarium*-Arten belastet sein. *F. oxysporum* zählt zu den Fumonisin-Bildnern [1], wobei nicht alle Isolate, aufgrund der hohen genetischen Varianz dieser Art [5], Fumonisine bilden können.

Mittels PCR wurden essentielle Gene (*FUM1* und *FUM8*) des Biosyntheseweges bei den *F. proliferatum*-Isolaten sowie bei einem *F. oxysporum*-Isolat (Foxy-155-Sp) nachgewiesen. Zudem konnte bei diesen Isolaten die Fumonisin-Bildung mittels HPLC belegt werden. Bei den restlichen *F. oxysporum*-Isolaten kann davon ausgegangen werden, dass weder das kodierende Gen für die *FUM1*-Polyketidsynthase noch für die Aminoacyltransferase (*FUM8*) vorliegen. Der negative Nachweis der Fumonisin-Bildung bestätigen diese Annahme. Bei den Isolaten Foxy-156-Sp und Foxy-158-Sp zeigten sich zwar schwache Amplifikate bei der *FUM1*-PCR, wobei es zu bedenken gilt, dass Polyketidsynthasen sowohl Grundgerüste für die Fumonisine, wie für andere Stoffwechselprodukte sind [6]. Bei diesen beiden Isolaten scheint, im Gegensatz zu den restlichen *F. oxysporum*-Isolaten, auf genetischer Ebene eine Polyketidsynthase mit sehr ähnlicher Sequenz, wie die der *FUM1*-Polyketidsynthase im Bereich der Primerbindung vorzuliegen.

Der *in vitro*-Pathogenitätstest zeigte keine Korrelation zwischen der Fumonisin-Bildung und der Pathogenität. Alle getesteten Isolate erwiesen sich als pathogen an Spargel, unterschieden sich aber in ihrer Virulenz. Die starken Fumonisin-Bildner (Fpro-227-Sp und Fpro-241-Sp) stellten sich im Test als sehr virulent heraus. Bei *F. oxysporum* hingegen waren diejenigen Isolate die keine Fumonisine bildeten aggressiver. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Isolate andere/weitere Virulenzfaktoren besitzen, die eine erfolgreiche Infektion von Spargel ermöglichen. Dies können beispielsweise andere Mykotoxine sein, die durch *F. oxysporum* gebildet werden [7].

Literatur

1. SEIFERT et al. (2004): European Journal of Plant Pathology **110**, 449-471
2. DESJARDINS et al. (1995): Applied and Environmental Microbiology **61**, 79-86
3. BROWN et al. (2007): Eukaryotic Cell **6**, 1210-1218
4. SCHOLZ et al. (2009): ALVA-Mitteilungen **7**, 61-64
5. KISTLER (1997): Phytopathology **87**, 474-479
6. KROKEN et al. (2003): PNAS **100**, 15670-15675
7. MARASAS et al. (1984): The Pennsylvania State University Press, University Park

Autoren

Alexandra SCHOLZ, Julia-Kristin PLATE, Dr. Monika GOßMANN, Dr. Susanne VON BARGEN, & Prof. Dr. Carmen BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einfluss der Bodenbearbeitung und Bewässerung auf das Auftreten von *Fusarium spp.* bei Winterweizen

Influence of the tillage system and irrigation on the incidence of Fusarium spp. on winter wheat

VITORE SHALA-MAYRHOFER, H.-P. KAUL, M. LEMMENS

Summary

Within the framework of this research field and laboratory tests were carried out on winter wheat in 2010, at the location Groß-Enzersdorf under different soil and climatic conditions. The aim of the study was to investigate the influence of reduced tillage on the incidence of Fusarium head blight (FHB) and identity of the *Fusarium species* isolated from naturally infected winter wheat grains. The level of incidence and the composition of *Fusarium species* are highly dependent on the year, location and weather conditions. The results obtained in 2010 showed that the infestation of FHB on winter wheat was generally low (under 12 % disease incidence) and no effect of tillage system (plough vs. reduced tillage) could be established. The most frequently *Fusarium species* identified on wheat kernels was *Fusarium graminearum* (95 %). Less frequently isolated species included *F. culmorum* (< 3 %), *F. equiseti* and *F. avenaceum* (< 2 %).

Key words: tillage systems, Fusarium head blight, winter wheat

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden im Jahre 2010 Feld- und Laboruntersuchungen bei Winterweizen am Standort Groß-Enzersdorf durchgeführt. Ziel der Arbeit war, den Einfluss konventioneller und konservierender Bodenbearbeitung auf das Auftreten von Ährenfusariose zu untersuchen, sowie die unter natürlichem Befall isolierte *Fusarium*-Arten zu identifizieren. Die Höhe des Befalls und die Artenzusammensetzung sind stark vom Jahr und Standort abhängig. Die erzielten Ergebnisse im Jahre 2010 zeigten dass, der Befall von Ährenfusariose bei Winterweizen niedrig war (unter 12 % Befallshäufigkeit) und kein Einfluss der Bodenbearbeitungsvarianten zwischen Pflug und Grubber festgestellt werden konnte. Die meist identifizierte *Fusarium*-Art an Weizenkörnern war *Fusarium graminearum* (95 %). Weniger häufig wurden die Arten *F. culmorum* (< 3 %), *F. equiseti* und *F. avenaceum* (< 2 %) isoliert.

Schlüsselworte: Bodenbearbeitung, Ährenfusariose, Winterweizen

Einleitung

Dem Ziel, die Ertragsfähigkeit eines Standortes zu steigern und zu verbessern, dienen ackerbauliche Maßnahmen wie Fruchtfolge, Bewässerung und technische Aspekte der Bodenbearbeitung. Als Alternative zur „konventionellen Bodenbearbeitung“ wird seit mehr als 30 Jahren die reduzierte Bodenbearbeitung mit ihren Auswirkungen auf Pflanzenschutzprobleme kritisch beurteilt. Pilzliche Krankheiten sind dabei zentrale Problembereiche.

Ein besonderes Augenmerk wurde in den vorliegenden Untersuchungen auf den Befall des Erntegutes von Winterweizen mit Arten der Gattungen *Fusarium* gerichtet. *Fusarien* zeichnen sich durch eine große Artenvielfalt aus. Sie sind weltweit verbreitet und in den gemäßigten Klimazonen optimal angepasst. Kulturpflanzen befallen sie auf dem Felde und bevorzugen dabei warm-feuchte Witterung. Neben Ertragsausfällen durch „Kümmerkörner“ kommt es bei Ährenfusariose v.a. zu vielfältigen Qualitätseinbußen: verminderte Keimfähigkeit des Saatguts, verminderte Backfähigkeit durch Abbau von Proteinen, verminderte Nahrungsqualität durch Kontamination mit Mykotoxinen. Das Ziel der Arbeit war, die Befallshäufigkeit, Befallsstärke, Befallsintensität und die Artenzusammensetzung von *Fusarium spp.*, durch visuelle Auswertungen am Feld und Laboruntersuchungen in Abhängigkeit von der Bodenbearbeitung und Bewässerung bei Winterweizen festzustellen und zu identifizieren.

Material und Methodik

Der zugrunde liegende Feldversuch wird auf den Versuchsflächen Raasdorf der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf (Marchfeld, Niederösterreich, 156 m NN, Ø Jahrestemperatur 9,8 °C, Ø Jahresniederschlag 546 mm, Parabraunerde-Tschernosem, schluffiger Lehm) durchgeführt. Der Versuch (4,8 ha) wurde in einer 7-faktoriellen Spaltanlage in 3 Wiederholungen im August 2002 angelegt. Diese Studie beschränkt sich allerdings auf die Faktoren Bodenbearbeitung (Pflug, Grubber) und Bewässerung (ohne Beregnung und mit Beregnung; 100 mm in 3 Gaben: Mitte Juni, Anfang u. Mitte Juli). Im Jahr 2010 wurde wegen des niederschlagreichen Sommers allerdings keine Bewässerung durchgeführt.

Die Düngung und Pflanzenschutzmaßnahmen erfolgen gemäß den „Richtlinien für die sachgerechte Düngung“ (BMLF), wobei keine Wirkstoffe mit *Fusarium*-Wirksamkeit eingebracht wurden. Die Winterweizensorte war Josef (*Fusarium*anfälligkeit 5 = mittel). Zur Ermittlung des *Fusarium*-Befalls wurden durch visuelle Bonitur von 100 Ähren pro Parzelle die Befallshäufigkeit (% erkrankte Ähren), Befallsstärke (% erkrankte Ährchen / Ähre) und -intensität (% erkrankte Ährchen / alle Ähren) im Stadium BBCH 75-77 bestimmt. Die mikroskopische Identifizierung der einzelnen *Fusarium*-Arten anhand der gebildeten Mikro- und Makrokonidien sowie der Konidiophoren erfolgte im Labor nach NELSON et al. (1983). Die Befallsbonituren wurden entsprechend der faktoriellen Versuchsanlage mit der Prozedur GLM von SAS varianzstatistisch geprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abb. 1 dargestellt, konnte generell kein hoher Befall mit Ährenfusariose bei Winterweizen im Jahre 2010 am Standort Groß-Enzersdorf festgestellt werden, und somit konnte auch der erwartete Anstieg des Befallsdrucks nach nunmehr neun Versuchsjahren in Behandlungsvarianten mit erhöhter *Fusarium*-Gefährdung (pfluglose Bewirtschaftung) nicht nachgewiesen werden.

Die Höhe des Befalls und die Artenzusammensetzung sind stark vom Jahr abhängig. Die seit 2002 durchgeführte Untersuchungen vom KAUL et. al. (2009) über die *Fusarium*-Populationsentwicklung unter dem Einfluss der produktionstechnischen Maßnahmen (Fruchtfolge, Bodenbearbeitung und Bewässerung) haben ergeben, dass die Befallshäufigkeit vom Jahr zu Jahr unterschiedlich ist. So konnte in den Jahren 2004 und 2006 deutlich erhöhte Befallshäufigkeiten gegenüber den Jahren 2003, 2005, und 2008 festgestellt werden. Der jahresabhängige Einfluss der Bewässerung auf die Befallshäufigkeit führte dazu, dass in den beiden Jahren mit hohem Befall die Beregnungsgaben diesen zusätzlich deutlich erhöht haben.

SHALA-MAYRHOFER (2005) stellte auch fest, dass die Höhe des Befalls und die Artenzusammensetzung von Ährenfusariose bei unterschiedlichen Bodenbearbeitungsvarianten stark von Jahr, Fruchtfolge und Witterungsbedingungen abhängig ist. Tabelle 1 belegt die identifizierten *Fusarium* spp., isoliert bei den Laboruntersuchungen von Weizenkörnern. Die am häufigsten identifizierte *Fusarium*-Art war *F. graminearum* (95,5 %). Weniger häufig wurden die Arten *F. culmorum* (< 3 %), *F. equiseti* und *F. avenaceum* (< 2 %) isoliert. Die Artenzusammensetzung bestätigt die bisherigen Untersuchungen von *Fusarium*-Arten in anderen Ländern in Europa (LEMMENS et al., 2004).

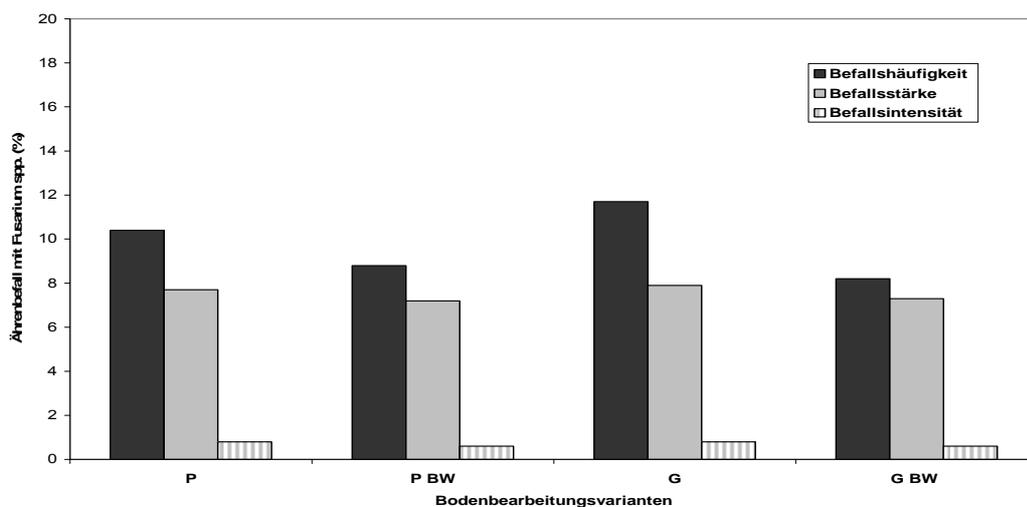


Abb. 1: Ährenbefall mit *Fusarium* spp. bei Winterweizen in Abhängigkeit von Bodenbearbeitung und Bewässerung im Jahr 2010.

Abkürzungen: P = Pflug, G = Grubber, BW = mit Bewässerung

Tabelle 1: Morphologisch identifizierte *Fusarium*-Arten von Weizenkörnern in Abhängigkeit von der Bodenbearbeitung.

<i>Fusarium</i> species	Year 2010		Tillage systems	
	Number	%	Plough	Grubber
Total	266	100	Number	Number
<i>F. graminearum</i>	254	95,5	138	116
<i>F. culmorum</i>	6	2,2	5	1
<i>F. equiseti</i>	3	1,1	1	2
<i>F. avenaceum</i>	3	1,1	1	2

Literatur

KAUL, H.-P., BÜCHTER, M., WICHMANN, S., ZEITLHOFER, C., LEMMENS, M. (2009): Populationsentwicklung unter dem Einfluss produktionstechnischer Maßnahmen an einem Trockenstandort. ALVA-Mitteilungen, 7, 23-26 [Mold-Meeting 2008, Linz, 4.-5. Dez. 2008].

LEMMENS, M. (2003): *Fusarium* head blight in wheat: application of artificial inoculation techniques in resistance breeding and mycotoxin research. Habilitation thesis, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna.

NELSON, P. E., TOUSSOUN T. A., MARASAS, W. F. O. (1983): *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.

SHALA-MAYRHOFER, V. (2005): Pflanzenschutzprobleme bei Weizen, Mais, Sonnenblume und Raps durch reduzierte Bodenbearbeitung. Dissertation der Universität für Bodenkultur. Verlag Guthmann-Peterson. Wien und Mülheim a. d. Ruhr.

Autoren

Vitore SHALA-MAYRHOFER, Hans-Peter KAUL; Universität für Bodenkultur, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Gregor Mendel-Str. 33, 1180 Wien.

Marc LEMMENS; Universität für Bodenkultur, Department für Agrarbiotechnologie - IFA Tulln, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln.

Evidenz für Glutathion-vermittelte Detoxifikation von Deoxynivalenol in Gerste und Bäckerhefe

Glutathione mediated detoxification of deoxynivalenol in barley and yeast

G. ADAM, F. BERTHILLER, C. HAMETNER, STEPHANIE A. GARDINER, G. J. MUEHLBAUER

Summary:

A screen for yeast genes conferring deoxynivalenol (DON) resistance when overexpressed resulted in identification of a cysteine biosynthesis gene, *CYS4*. A genome-wide transcriptome analysis of DON challenged barley showed that also in the plant cysteine biosynthesis genes are highly induced. The hypothesis that increased cysteine biosynthesis might be needed for production of the cysteine-containing tripeptide glutathione, which plays a prominent role in detoxification of a broad range of compounds, was tested. Supplementation of the growth medium with glutathione increased DON resistance of yeast. Several genes encoding glutathione-S-transferases (GSTs), which might catalyze formation of DON-glutathione conjugates *in vivo* were highly induced in DON treated barley. Chemical investigation by HPLC and NMR provided evidence for formation of DON-glutathione conjugates. Such conjugates are formed even non-enzymatically, but are unstable in the presence of oxygen, where glutathione (GSH) is removed from the equilibrium by formation of glutathione-disulfide (GSSG). NMR data indicates formation of a GSH adduct to the double bond at C-10 of DON, but also other reactions occur.

Keywords: deoxynivalenol, detoxification, glutathione, conjugate formation

Zusammenfassung:

In einem Screen nach Hefegenen deren Überexpression Deoxynivalenol (DON)-Resistenz hervorruft, wurde das Cystein-Biosynthesegen *CYS4* identifiziert. Eine genomweite Analyse der durch DON Behandlung hervorgerufend Änderungen der Genexpression in Gerste zeigte ebenfalls eine dramatische Induktion von Cystein-Biosynthesegenen. Die Hypothese, dass erhöhte Cystein-Synthese für die Produktion des cysteinhaltigen Tripeptides Glutathion benötigt wird, das in der Detoxifikation einer Vielzahl von Substanzen eine wichtige Rolle spielt, wurde getestet. Eine Erhöhung der Glutathionkonzentration im Wachstumsmedium führte zu erhöhter DON-Resistenz von Hefe. In Gerste führte DON-Behandlung zur Induktion verschiedener GSTs, welche *in vivo* die Bildung von DON-Glutathion Konjugaten katalysieren könnten. Chemische Untersuchungen mittels HPLC und NMR zeigten, dass GSH-DON Addukte auch nichtenzymatisch gebildet werden können. Diese sind jedoch instabil, wenn Glutathion z.B. in Gegenwart von Sauerstoff als Glutathion-disulfid dem Gleichgewicht entzogen wird. NMR Daten deuten darauf hin, dass eine Addition von GSH an die Doppelbindung von DON (am C-10) stattfindet, vermutlich aber auch weitere Reaktionen.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol, Detoxifikation, Glutathion, Konjugatbildung

Einleitung:

Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) ist ein ungewöhnliches Tripeptid, bei dem eine Amidbindung zwischen Glutaminsäure und Cystein über die γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure ausgebildet wird. Glutathion kann von Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren in einem zweistufigen Prozess aus den Aminosäure-Bausteinen synthetisiert werden. Glutathion spielt einerseits eine wichtige Rolle als Redox-Puffer der Zelle, andererseits in der Phase II Detoxifikation von vielen giftigen Substanzen. Dabei katalysieren Enzyme der Klasse der Glutathion-S-Transferasen (GSTs) Reaktionen der Thiol-Gruppe von Cystein mit reaktiven Kohlenstoffatomen, wobei es zur Substitution von Halogen-, Sulfat-, Phosphat- oder Nitrogruppen kommen kann. Es kann jedoch auch zur Addition an aktivierte Doppelbindungen oder zur Öffnung von Epoxid-Ringen kommen. Glutathionkonjugate sind meist wasserlöslicher als die ursprünglichen toxischen Substanzen und können durch aktive Transportprozesse entweder in der Vakuole zwischengespeichert oder aus der Zelle ausgeschieden werden. Pflanzen besitzen etwa 50-60 GST-Gene mit weitgehend unbekannter Substratspezifität, die eine wichtige Rolle in der Resistenz gegen mikrobielle Toxine und Xenobiotika (z.B. Herbizide) spielen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch das *Fusarium* Mykotoxin Deoxynivalenol in Pflanzen durch glutathionvermittelte Reaktionen detoxifiziert werden kann.

Durchführung:

Ein DON sensitiver *Saccharomyces cerevisiae* Stamm wurde mit einer Expressions-Genbank transformiert. Die in den Plasmiden unter Kontrolle des *GAL1* Promoters vorliegenden HefecDNAs [1] werden auf Galaktosemedium stark überexprimiert. Transformanten wurden über Nacht auf YP-Galaktose Flüssigmedium vorkultiviert und dann auf YPGal Platten mit 200 ppm DON ausplattiert. Aus Hefetransformanten mit erhöhter DON-Resistenz auf Galaktose wurde durch Plasmid-Isolation und Retransformation die Plasmidabhängigkeit der Resistenz getestet.

Gerste wurde zur Blütezeit mit 200 ppm wässriger DON Lösung behandelt (9 Ährchen in der Mitte der Ähre mit je 10 μ l). Die RNA Isolation erfolgte nach einer, 12, 24 und 48 Stunden. Für die Analyse der Genexpression wurde der Barley1 Affymetrix GeneChip verwendet. Details der experimentellen Bedingungen sind in Gardiner et al. [2] beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion:

Aus mehr als einer Million primärer Transformanten auf Glucosemedium wurden etwas mehr als 50 DON-resistente Kolonien selektiert und analysiert. In den meisten Fällen war die Resistenz nicht plasmidabhängig, jedoch konnten zwei unabhängige Plasmide mit *CYS4* als resistenzvermittelndem Insert isoliert werden. Dieses Gen ist in Hefe für den ersten Schritt der zweistufigen Cystein-Biosynthese - ausgehend von Homocystein - verantwortlich.

In DON behandelte Gerste waren die am stärksten induzierten Gene solche, die auf die wichtige Rolle von bereits postulierten Toxinresistenzmechanismen hindeuten, wie z.B. aktiver Toxin-Efflux. So ist beispielsweise das Gen „Contig21298_at“ mit der bioinformatischen Annotation „multidrug resistance“ nach 12 Stunden mehr als 180-fach induziert (siehe [2]). Ebenfalls stark induziert sind einige Gene die für postulierte UDP-Glucosyltransferasen kodieren. Darunter befindet sich auch das Gen „Contig13248_at“ das nach 12 Stunden mehr als 80-fach induziert ist. Durch Rekonstruktion des gesamten Leserahmens und Expression in Hefe konnte gezeigt werden, dass dieses Gen im Gegensatz zu anderen, ebenfalls induzierten Glucosyltransferasen, wirklich für ein Enzym kodiert, das DON zu DON-3-O-Glucosid entgiften kann [3].

Ein weiteres extrem stark DON-induziertes Gersten-Gen ist „HV12E23u_at“, annotiert als „cysteine synthase“ (113-fach nach 12 Stunden). Pflanzen synthetisieren Cystein auf anderem Wege als Hefe. In einem ersten Schritt wird Serin in O-Acetyl-Serin (Enzym „SATase“: Serin-O-Acetyltransferase) übergeführt. Im zweiten Schritt, wird von der O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase (= Cystein-Synthase) Sulfid direkt in Cystein eingebaut. Beide Enzyme kommen in einem Komplex vor, mit einem massiven Überschuss an Cysteinsynthase. Der erste Schritt ist allerdings geschwindigkeitsbestimmend und die SATase hat regulatorische Funktion. Auch ein Gen für dieses Schrittmacher-Enzym ist in Gerste DON-induziert (z.B: „Contig23272_at“, „SATase isoform“, mehr als 7-fach nach 12 Stunden).

Es stellte sich die Frage, warum DON-Stress mit Neusynthese von Cystein beantwortet wird. Eine naheliegende Hypothese ist, dass Cystein für die Resynthese von Glutathion benötigt wird, das in einem Glutathion-S-transferase vermittelten Detoxifikationsprozess verbraucht wird. Mindestens 5 verschiedene GST Gene der Gerste sind stark DON induziert (z.B. „Contig15264_at“ nahezu 30-fach nach 12 Stunden). In Hefe zeigte sich, dass die Zugabe von GSH im physiologischen Bereich (5-10 mM) die DON Resistenz nahezu verdoppelt. Allerdings zeigten weiterführende Experimente auch, dass unter leicht unphysiologischen pH-Bedingungen GSH mit DON auch ohne Enzymkatalyse reagiert.

Wenn DON und GSH in einem NMR (Kernspinresonanzspektroskopie)-Röhrchen in D₂O gemischt werden, so kommt es nach einem Tag zur Abnahme von DON- und GSH-spezifischen Peaks des Spektrums, und zum Entstehen von neuen Peaks. Dabei entstehen anscheinend komplexe Gemische (2 Ausgangssubstanzen plus vermutlich 3 verschiedene Reaktionsprodukte in zeitabhängig variablen Mengen), sodass eine Strukturaufklärung nicht möglich ist. Auch LC-MS/MS Analysen des Gemisches zeigen, dass mehrere Substanzen entstehen, welche die theoretische Masse eines DON-Glutathion Adduktes haben und DON bzw. Glutathion abspalten können. Die wahrscheinlichste Reaktion ist die Addition an die (konjugierte) Doppelbindung (am C10), wofür es Evidenz aus dem ¹H NMR Spektrum gibt. Jedoch kommt es vermutlich auch zur Addition an die Carbonyl-Gruppe (und zur Epimerisierung von DON in iso-DON). Die

hypothetischen Strukturen der Glutathion-Addukte an die Doppelbindung und Keto-Gruppe sind in Abbildung 1 gezeigt.

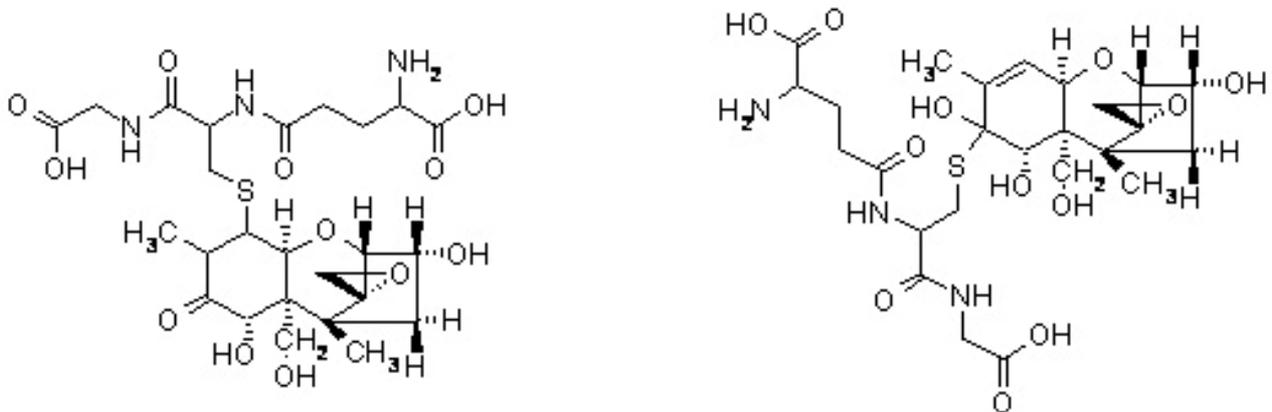


Abbildung 1: Vermutliche Strukturen der Glutathion-Addukte an die Doppelbindung (links) und die Keto-Gruppe von DON (rechts)

Versuche, die Konjugate für Strukturaufklärung und Toxizitätstests aufzureinigen waren jedoch erfolglos. Sobald Glutathion aus dem Gleichgewicht entfernt wird, z.B. auch durch Reaktion mit Luftsauerstoff und Bildung von Glutathion-Disulfid, zerfallen auch die Addukte in die Bestandteile. Es ist jedoch anzunehmen, dass ein DON-GSH Addukt nicht mehr am ribosomalen Wirkungsort angreifen kann und es sich somit um eine Detoxifikationsreaktion handelt. Von einem analogen zumindest im sauren Milieu stabilen Addukt von Na-Bisulfit an die C=C Doppelbindung von DON [4] ist bekannt dass es weniger toxisch ist. In der Pflanze findet wahrscheinlich eine enzymkatalysierte Reaktion statt. Ob GST Gene/Allele mit unterschiedlicher Substratspezifität gegen DON, bzw. Expressionsunterschiede in solchen Genen eine Rolle in der DON- und *Fusarium*-Resistenz spielen, bleibt zu klären. Da vermutlich auch in Hefe nicht die GST-Enzymaktivität sondern die Verfügbarkeit des Co-Substrates Glutathion für die Detoxifikation limitierend ist, werden derzeit Hefestämme hergestellt, in denen mehrere der endogenen GST-Gene der Hefe inaktiviert sind, um sie als Wirt für die heterologe Expression von GST-Kandidatengenen aus Pflanzen nutzbar zu machen.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF Spezialforschungsbereich Projekte F3702 und F3706).

Literatur:

1. Espinet C, de la Torre MA, Aldea M, Herrero E (1995) An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast* **11**: 25-32
2. Gardiner SA, Boddu J, Berthiller F, Hametner C, Stupar RM, Adam G, Muehlbauer GJ (2010) Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**: 962-76.
3. Schweiger W, Boddu J, Shin S, Poppenberger B, Berthiller F, Lemmens M, Muehlbauer GJ, Adam G (2010) Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**: 977-986.
4. Young JC (1986) Formation of sodium bisulfite addition products with trichothecenes and alkaline hydrolysis of deoxynivalenol and its sulfonate. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 919–923

Autoren:

Gerhard ADAM, Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien.

Franz BERTHILLER, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

Christian HAMETNER, Institut für Angewandte Synthesechemie, TU Wien, Getreidemarkt 9, 1060 Wien.

Stephanie GARDINER, Dr. Gary J. MUEHLBAUER, Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108.

**Ein Wirkungsmechanismus für Zearalenon in Pflanzen:
Inhibition der ATPase Aktivität von Hitzeschock-Protein 90**

A mode of action for zearalenone in plants:

Inhibition of the ATPase activity of heat shock protein 90

J. A. TORRES ACOSTA, GERLINDE WIESENBERGER, P. KMIECIK, F. BERTHILLER, M. SHAMS, R. KRŠKA,
G. ADAM

Summary:

The mycotoxin zearalenone (ZON) is produced by several species of *Fusarium* and is well known for its estrogenic activity. The mode of action of ZON *in planta* was previously unknown. In particular, it is questionable if ZON is advantageous for the producing fungus during plant infection. We have identified a prominent target for ZON: heat shock protein 90 (Hsp90). ZON and β -zearalenol (bZOL) inhibit the ATPase activity of purified Hsp90 *in vitro*, raising the question how the fungus is resistant to its own toxin. We found that *HSP90* from *F. graminearum* encodes a highly ZON insensitive protein. Work is ongoing to identify which amino-acid differences in the evolutionary highly conserved protein are responsible for this effect. In plants, ZON was found to be rapidly converted into ZON-4-O-glucoside and ZON-4-sulfate. Both conjugates do not have inhibitor activity in the Hsp90 *in vitro* assay. It has been demonstrated that Hsp90 is essential for plant defense. Yet, previous results with *Fusarium* gene disruption mutants deficient in ZON biosynthesis indicate that ZON-production is not a relevant virulence factor. Possible reasons for these conflicting results are discussed.

Keywords: zearalenone, detoxification, target insensitivity, conjugate formation

Zusammenfassung:

Das Mykotoxin Zearalenon (ZON) wird von mehreren *Fusarium* Arten gebildet und ist bekannt wegen seiner starken östrogenen Wirkung. Welchen Wirkungsmechanismus ZON in Pflanzen besitzt und ob die Produktion von ZON für den Pilz vorteilhaft bei der Infektion von Wirtspflanzen ist, war bisher unklar. Ein prominenter Angriffsort für ZON konnte nunmehr identifiziert werden: Hitzeschock-Protein 90 (Hsp90). ZON und β -Zearalenol (bZOL) inhibieren die ATPase Aktivität von gereinigtem Hsp90 *in vitro*. Damit stellt sich die Frage, wie der Pilz resistent gegen sein eigenes Toxin ist. Untersuchungen zeigten, dass das *HSP90*-Genprodukt aus *F. graminearum* weitgehend insensitive gegen ZON ist. Derzeit laufen Versuche um herauszufinden, welche Aminosäureunterschiede des evolutionär extrem konservierten Hsp90 dafür verantwortlich sind. In Pflanzen wird ZON rasch in ZON-4-O-Glucosid and ZON-4-Sulfat metabolisiert. Beide Konjugate sind nicht mehr als ATPase-Inhibitor wirksam. Hsp90 spielt eine essentielle Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Bisher publizierte Ergebnisse mit *Fusarium* Gen-

Disruptionsmutanten zeigten jedoch, dass ZON-Produktion nicht maßgeblich zur Virulenz beiträgt. Mögliche Ursachen für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse werden diskutiert.

Schlüsselwörter: Zearalenon, Detoxifikation, Targetmodifikation, Konjugatbildung

Einleitung:

ZON ist ein Resorzylsäure-Lacton das von den Mitgliedern des - nunmehr in mehr als ein Dutzend Arten aufgeteilten - *F. graminearum* Spezies-Komplexes gebildet wird und weiters von *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense/cerealis* sowie *F. semitectum*. ZON bindet mit hoher Affinität an den Östrogenrezeptor von tierischen und menschlichen Zellen und seine Aufnahme kann daher zu Hyperöstrogenismus führen. Zum Schutz der menschlichen Gesundheit wurden niedrige Höchstwerte für Nahrungsmittel erlassen, z.B. 20 µg/kg für Baby-Nahrung. In infizierten Pflanzenteilen, insbesondere Mais-Spindeln, können jedoch durchaus 1000-fach höhere ZON-Werte auftreten (20-80 mg/kg). Pflanzen besitzen keinen Östrogenrezeptor und es war daher bislang unbekannt, welche Rolle ZON in Pflanzen spielt und ob die Produktion von ZON vorteilhaft für den Pilz beim Befall von Wirtspflanzen ist.

Durchführung:

Zum Testen der Aktivität wurde das Hitzeschock-Protein 90 Gen der Bäckerhefe (Produkt von *HSP82*) zuerst in *E. coli* exprimiert und mittels eines 6xHis-Tags affinitätsgereinigt. In gleicher Weise wurden *HSP90* Gene von *F. graminearum* (von Weizen, *Arabidopsis*) und Hybridgene in den Expressionsvektor kloniert. Zusätzlich zur Nickel-Chelat Affinitätssäule wurde nach Gel-Filtration (Sephadex G25) ein weiterer Reinigungsschritt auf einer Ionenaustauschersäule (Resource Q1) vorgenommen. Die ATPase Aktivität der gewonnenen Proteine wurde mittels eines nichtradioaktiven auf Phosphatfreisetzung aus ATP beruhenden Tests bestimmt [1]. Die ZON- und ZOL-Konjugate wurden wie zuvor beschrieben [2] mittels präparativer HPLC aus dem Überstand von behandelten Hefekulturen isoliert, die UDP-Glukosyltransferase Gene von *Arabidopsis* exprimieren. ZON-4-Sulfat und Radicol wurden aus Reiskulturen von *Fusarium* und *Nectria radicola* isoliert.

Ergebnisse und Diskussion:

Eine genomweite Transkriptionsanalysen an *Arabidopsis* ergab, dass ZON sehr interessante Änderungen in der Genexpression hervorruft, wobei insbesondere Gene mit einer Rolle in der Zellwandverstärkung reprimiert werden [3]. Auf welche Weise die pleiotropen Änderungen zustandekommen bzw. was der direkte Angriffspunkt von ZON ist, blieb jedoch unklar. ZON weist strukturelle Ähnlichkeit mit Radicol [4] auf, der von einer Reihe von Pilzen, z.B. *Nectria radicola*, produziert wird. Da diese Substanz ein bekannter Inhibitor von Hsp90 ist [5], wurde getestet ob auch ZON und seine biosynthetische Vorläufersubstanz β -ZOL diese Aktivität aufweisen. Dazu

wurden zuerst das Hefe-HSP90 Gen in *E. coli* exprimiert und die ATPase Aktivität des affinitätsgereinigten Proteins mit dem Malachit-Grün Assay [1] untersucht. Die Positivkontrolle Radicolin inhibierte sehr stark ($IC_{50}=1,5 \mu\text{M}$), aber auch ZON und stärker β -ZOL zeigten klare Inhibitorwirkung ($IC_{50} 49 \mu\text{M}$ und $8.6 \mu\text{M}$).

Fusarium graminearum besitzt nur ein *HSP90* Gen, dieses wurde ebenfalls in *E. coli* exprimiert. Das gereinigte Protein wurde von Radicolin inhibiert, jedoch im Vergleich zum Hefe-Protein in wesentlich geringerem Ausmaß von den *Fusarium* Toxinen ZON und β -ZOL. Gegenwärtig werden Hybridproteine hergestellt, um herauszufinden welche Aminosäure-Unterschiede im Bereich der N-terminalen ATP-Bindungsstelle für die höhere Resistenz verantwortlich sind. Neben der erhöhten Target-Insensitivität dürfte auch noch relevant sein, dass *Fusarium* nach Behandlung mit hohen Konzentrationen von ZON dieses rasch in ZON-4-Sulfat umwandeln kann. Neben dem Hauptprodukt ZON-4-O-Glucosid wird der Metabolit ZON-4-Sulfat auch von *Arabidopsis* gebildet [6]. Die isolierten Konjugate ZON-4-O-Glucosid, α - und β -ZOL-4-O-Glucosid, und ZON-4-Sulfat wurden im ATPase Assays getestet und erwiesen sich als inaktiv bis zur höchsten getesteten Konzentration von $150 \mu\text{M}$. Die Konjugatbildung ist also eine Detoxifikationsreaktion von Pflanzen.

Hsp90 wird für die korrekte Faltung und Stabilität vieler sogenannter "Klienten-Proteine" benötigt. Darunter befinden sich wichtige Signalübertragungskomponenten der Zelle wie Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, aber auch Produkte von pflanzlichen Resistenzgenen. Inhibition von Hsp90 führt häufig dazu, dass Klientenproteine destabilisiert und abgebaut werden. Durch Verminderung der Hsp90 Menge in der Zelle (durch „virus induced gene silencing“) oder durch Verwendung von Inhibitoren wie Geldanamycin und Radicolin wurde gezeigt, dass *HSP90* für das Funktionieren spezifischer Gen-für-Gen Resistenzen essentiell ist (z.B. Geste-Mehltau (*Mla*), Weizen-Braunost (*Lr21*), Tabak-Tabakmosaikvirus (*N*), Tomate-Nematod (*Mi*), *Arabidopsis-Pseudomonas* (*RPS2*)). Da Hsp90 eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Resistenz spielt (bzgl. Literatur-übersicht siehe [7]) wäre es naheliegend, dass ZON-Produktion ein relevanter Virulenzfaktor von *Fusarium* ist. Untersuchungen von 3 Arbeitsgruppen gaben jedoch keinen Hinweis auf reduzierte Virulenz von ZON-defizienten Mutanten auf Gerste und Weizen. Allerdings wurden diese Versuche unter Bedingungen durchgeführt, unter denen die ZON-Biosynthesegene vom Pilz kaum exprimiert werden. Wir haben daher ZON-defiziente Mutanten ($\Delta pks4-pks13$) hergestellt, und auch Doppelmutanten die sowohl Deoxynivalenol- ($\Delta tri5::loxP$) als auch ZON-defizient sind. Infektionsassays mit Mais im geschlossenen System sind im Gange. Unsere Arbeitshypothese ist, dass die ZON-Biosynthesegene nicht nur *in-vitro* nach einem Temperatur-Abfall induziert werden, wenn auch weniger Hsp90 vom Wirt gebildet wird. Dies wäre in der Natur in kühlen Nächten der Fall, einerseits bei der Keimung im Frühjahr, andererseits spät im Jahr im reifenden Maiskolben, oder sogar bei offener Lagerung von Maiskolben über den Winter.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF Spezialforschungsbereich Projekte F3702 und F3706).

Literatur:

1. Rowlands MG, Newbatt YM, Prodromou C, Pearl LH, Workman P, Aherne W (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal Biochem* **327**: 176-83.
2. Berthiller F, Hametner C, Krenn P, Schweiger W, Ludwig R, Adam G, Krska R, Schuhmacher R (2009a): Preparation and characterization of the masked *Fusarium* mycotoxins zearalenone-4O-beta-D-glucopyranoside, alpha-zearalenol-4O-beta-D-glucopyranoside and beta-zearalenol-4O-beta-D-glucopyranoside by MS/MS and 2D-NMR. *Food Addit. Contam.* **26**: 207-213.
3. Werner U (2005) Characterization of the effect of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in *Arabidopsis thaliana*. Ph.D. thesis, BOKU – University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
4. Mirrington RN, Ritchie E, Shoppee CW, Sternhell S and Taylor WC (1965) Some metabolites of *Nectria radicola* Gerlach & Nilsson (syn. *Cylindrocarpon radicola* Wr.): The structure of radicicol (monorden). *Aust J Chem* **19**: 1265 – 1284.
5. Wimssinger N, Barluanga S (2005). "Chemistry and biology of resorcylic acid lactones". *Chem. Commun.* **13**: 22–36.
6. Berthiller F, Werner U, Sulyok M, Krska R., Hauser MT, Schuhmacher R (2006) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit Contam.* **23**: 1194-1200
7. Shirasu (2009) The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 139-64.

Autoren:

Juan Antonio TORRES ACOSTA, Gerlinde WIESENBERGER, Przemek KMIECIK, Gerhard ADAM
Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien,
Muthgasse 18, A-1190 Wien.

Franz BERTHILLER, Mehrdad SHAMS, Rudolf KRKA, Analytikzentrum, Interuniversitäres
Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz
Straße 20, 3430 Tulln.

Bildung eines nicht-toxischen Metaboliten von Diacetoxyscirpenol durch Kochen von *Fusarium* kontaminierten Erdäpfeln

Formation of a non-toxic metabolite of diacetoxyscirpenol by cooking of

Fusarium contaminated potatoes

M. SHAMS, R. MITTERBAUER, R. CORRADINI, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, G. ADAM, F. BERTHILLER

Summary:

Diacetoxyscirpenol (DAS) is a *Fusarium* mycotoxin, commonly found in a variety of agricultural products, especially potatoes. We discovered the reduction of DAS after thermal treatment in aqueous solution and detected a novel metabolite, named DAS-M1. The structure of DAS-M1 was elucidated with LC-HR-MS, LC-MS/MS and NMR. Potatoes were infected with *F. sambucinum* and cooked at 100°C or at 121°C (2 bar) for one and four hours. This resulted in a reduction of DAS concentrations between 25% and 100%. The inhibition of protein synthesis by DAS and its novel metabolite was examined *in vitro* and their toxicity towards yeast was tested on plates supplemented with the compounds. The results show that DAS is at least 100 times more toxic than DAS-M1.

Keywords: *Fusarium*, diacetoxyscirpenol, detoxification, potatoes

Zusammenfassung:

Diacetoxyscirpenol (DAS) ist ein *Fusarium* Mykotoxin, welches in einer Vielzahl von landwirtschaftlichen Erzeugnissen, insbesondere Erdäpfel, gefunden werden kann. Wir entdeckten eine Verringerung der DAS-Konzentration nach thermischer Behandlung in wässriger Lösung und die Bildung des neuen Metaboliten DAS-M1. Die chemische Struktur von DAS-M1 wurde mit LC-HR-MS, LC-MS/MS und NMR aufgeklärt. Erdäpfel wurden mit *F. sambucinum* infiziert und bei 100°C bzw. bei 121°C (2 bar) für eine bzw. vier Stunden gekocht. Dies führte zu einer Abnahme von DAS zwischen 25% und 100%. Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch DAS und den neuen Metaboliten wurde *in vitro* untersucht und die Toxizität der Substanzen gegenüber Hefe auf Platten getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass DAS mindestens 100fach toxischer als DAS-M1 ist.

Schlüsselwörter: *Fusarium*, Diacetoxyscirpenol, Entgiftung, Erdäpfel

Einleitung:

Pilze der Gattung *Fusarium* sind weltweit verbreitete Pflanzenpathogene und verursachen neben Ertrags- und Qualitätseinbußen auch die Bildung von Schimmelpilzgiften. So können auch Fusarien-Stämme die aus Erdäpfeln isoliert wurden Mykotoxine, insbesondere das Typ A-Trichothecen DAS, produzieren (Latus-Zietkiewicz et al. 1995). Die Bildung von Trichothecenen durch *F. sambucinum*, dem weltweit wichtigsten Erreger der Trockenfäule von Erdäpfeln, kann entweder im Feld oder während der Lagerung auftreten (Desjardins and Plattner 1989). Trichothecene zeichnen sich neben einem charakteristischen tricyclischen Grundgerüst durch eine

Epoxid-Gruppe an C-12 und C-13 aus, welche für ihre Toxizität verantwortlich ist (Grove and Mortimer 1969). DAS besitzt eine vergleichbare Toxizität wie das bekanntere T-2 Toxin (Sato et al. 1978) und wirkt giftig auf Pflanzen (Hasan 1999, Dahleen and McCormick 2001) und Tiere (Marasas et al. 1984). Diese Arbeit beschreibt die Reduktion des DAS-Gehalts in Erdäpfeln durch Umwandlung in einen neuen Metaboliten – DAS-M1 – nach thermischer Behandlung in wässriger Lösung. Nach Isolation und Strukturaufklärung wurde mit Hilfe von Toxizitätstests die Giftigkeit von DAS-M1 im Vergleich zu DAS bestimmt.

Durchführung:

Herstellung und Isolierung von DAS-M1

DAS-M1 wurde aus einer wässrigen Lösung von DAS durch Kochen unter Rückfluss hergestellt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Strukturaufklärung

Zur Bestimmung der Summenformel des neuen Metaboliten wurde ein hochauflösendes Massenspektrometer (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) verwendet. ¹H und ¹³C-NMR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Parma in Italien durchgeführt. Zur Quantifizierung von DAS und DAS-M1 wurde ein QTrap LC-MS/MS System (Applied Biosystems) mit einer APCI Quelle im positiven Ionisierungs-Modus verwendet. Die chromatographische Trennung konnte auf einem Agilent 1100 HPLC-System mittels einer Phenomenex Gemini RP-C18-Säule und einem Methanol/Wasser Gradienten erreicht werden.

Thermische Behandlung von *F. sambucinum* beimpften Erdäpfeln

25 ähnlich große Erdäpfel der Sorte Tosca wurden gewaschen und oberflächensterilisiert. Jeder Erdapfel wurde mittels Korkbohrer eingeschnitten. Anschließend wurden Agar-Blöcke von 3 Tage alten Kulturen von *F. sambucinum* MRC 514 in die entstandenen Einschnitte eingefügt. Die Erdäpfel wurden für 14 Tage bei 20°C im Dunkeln inkubiert. 5 Erdäpfel wurden zufällig als Kontrolle gewählt und nicht gekocht. Jeweils 5 weitere Erdäpfel wurden für eine bzw. vier Stunden bei 100°C gekocht oder bei 121°C autoklaviert. Erdäpfel und Kochwasser wurden gemeinsam mit Hilfe eines Ultra-Turrax zerkleinert und mit Acetonitril verdünnt. Nach 10 min. Rühren wurden die Proben zentrifugiert. Je 2 ml Überstand wurden eingetrocknet und in 100 µl 50%igem wässrigen Methanol wieder aufgenommen. Die Konzentrationen an DAS und DAS-M1 wurden direkt danach mittels LC-MS/MS im SRM-Modus bestimmt.

Toxizitätstests

Unterschiedliche Verdünnungen exponentiell wachsender Hefezellkulturen wurden auf YPD-Platten getropft, welche DAS-M1 bzw. DAS enthalten. Die Platten wurden bei 30°C für 48 Stunden inkubiert und das Wachstum anschließend ausgewertet. Zum Vergleich der Auswirkungen von DAS-M1 und DAS auf die Hemmung der Proteinbiosynthese, wurde ein zellfreier *in vitro* Translations-Assay mit Weizenribosomen durchgeführt.

Ergebnisse:

Strukturaufklärung

Mittels hochauflösender Massenspektrometrie wurde die Summenformel von DAS-M1 als $C_{19}H_{28}O_8$ identifiziert. Dies entspricht formal einer Addition eines Wassermoleküls an DAS. NMR-Messungen ergaben die in Abbildung 1 dargestellte Struktur für DAS-M1.

Thermische Behandlung von *F. sambucinum* beimpften Erdäpfeln

Durch Kochen bei $100^{\circ}C$ konnte eine Umwandlung von ca. 25% des DAS zu DAS-M1 nach 1h beobachtet werden. Nach 4h waren bereits 80% des DAS umgewandelt. Mit Hilfe eines Dampfkochtopfs wurden 90% bzw. 100% des DAS nach Kochen unter 2 bar Druck bei $121^{\circ}C$ für 1h bzw. 4h zu DAS-M1 umgewandelt.

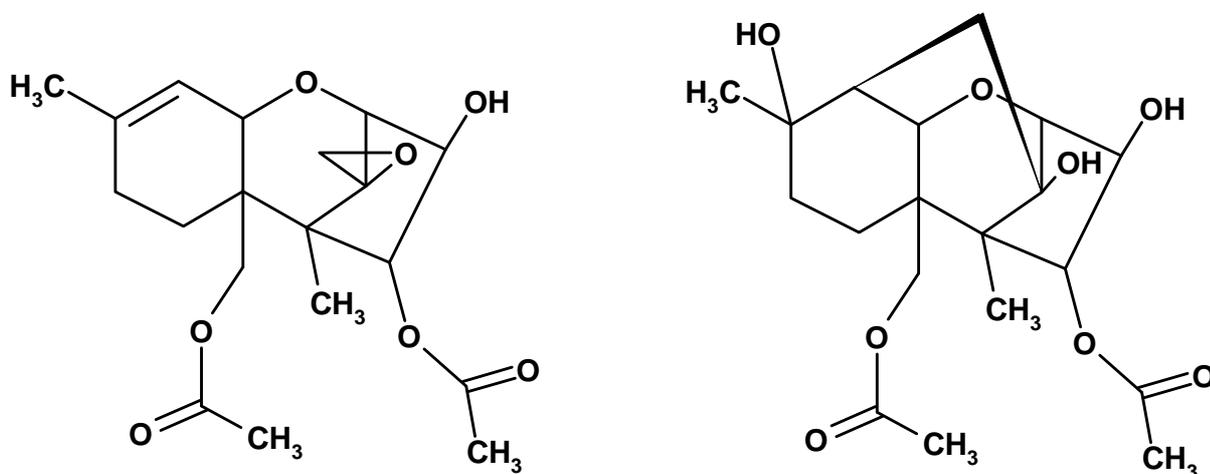


Abbildung 1: Chemische Struktur von DAS (links) und DAS-M1 (rechts)

Toxizitätstests

Während bereits Konzentrationen von $< 2\mu M$ DAS das Wachstum von Hefe vollständig inhibierten, konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums bei allen verwendeten Konzentrationen an DAS-M1 festgestellt werden. Der *in vitro* Translations-Assay mit Weizenribosomen ergab eine relative Hemmung der Proteinbiosynthese um 33% bei einem Wert von etwa $0.02\mu M$ DAS bzw. $2\mu M$ DAS-M1. Dies entspricht einer um den Faktor 100 verringerten Toxizität von DAS-M1 im Vergleich zu DAS.

Diskussion:

Obwohl sich Mykotoxine im Allgemeinen durch hohe chemische und thermische Stabilität auszeichnen, kann DAS schon bei Temperaturen um die $100^{\circ}C$ im wässrigen Milieu umgewandelt werden. Dabei entsteht durch einen intramolekularen Angriff der Doppelbindung an den Epoxid-Ring mit anschließender Addition von Wasser irreversibel eine neue Verbindung – DAS-M1. Durch die Öffnung des Epoxids verliert diese Verbindung deutlich an Toxizität. Andere getestete Trichothecene zeigten dieses Verhalten nicht. DAS-kontaminierte Erdäpfel konnten nach langem

Kochen unter Druck vollständig entgiftet werden. Da dieses Vorgehen aber nicht wirtschaftlich ist, versuchen wir momentan eine Dekontamination unter leicht sauren Bedingungen. Da die Reaktion säurekatalysiert ist, erwarten wir uns eine Abnahme der DAS-Konzentration schon bei kürzeren Kochzeiten.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF Projekt L225). Das LC-HR-MS System wurde vom Land NÖ und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung der EU finanziert.

Literatur:

Dahleen LS, McCormick SP, 2001. Trichothecene toxin effects on barley callus and seedling growth. *Cereal Res. Comm.* **29**, 115-120.

Desjardins AE, Plattner RDJ, 1989. Trichothecene toxin production by strains of *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) in liquid culture and potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 388-392.

Grove JF, Mortimer PH, 1969. The cytotoxicity of some transformation products of diacetoxyscirpenol. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1473-1478.

Hasan HAH, 1999. Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. *Mycopathologia* **148**, 149-155.

Latus-Zietkiewicz D, Perkowski J, Chelkowski J, 1995. Mycotoxins production pathogenicity and toxicity of *Fusarium* species isolated from potato tubers with dry rot injuries. *Microbiol. Alim. Nutr.* **13**, 87-100.

Marasas WFO, Nelson PE, Tousson TA, 1984. *Toxigenic Fusarium species - identity and mycotoxicology.* University Park, Pennsylvania State University Press.

Sato N, Ito T, Kumada H, Ueno Y, Asano K, Saito M, Ohtsubo K, Ueno I, Hatanaka Y, 1978. Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. XIII. Haematological changes in mice by a single and repeated administrations of trichothecenes. *J. Toxicol. Sci.* **3**, 335-356.

Autoren:

Mehrdad SHAMS, Rainer SCHUHMACHER, Rudolf KRSKA, Franz BERTHILLER, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

Rudolf MITTERBAUER, Gerhard ADAM, Zentrum für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, 1190 Wien

Roberto CORRADINI, Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma, Italien

Aktuelle Mykotoxinanalytik – Schnelltests

Recent mycotoxin analysis – Rapid Tests

M. HÜBNER

Zusammenfassung

Um den steigenden Anforderungen an eine schnelle und einfache Mykotoxinanalytik gerecht zu werden, wurde das RIDA®QUICK SCAN Lesegerät entwickelt, um die bereits seit einiger Zeit auf dem Markt befindlichen RIDA®QUICK Mykotoxin Tests quantitativ und objektiv auswerten zu können.

Schlüsselwörter: Mykotoxine, Lateral Flow, Lesegerät

Summary

The requirements for a fast and easy mycotoxin analysis are steadily increasing. To comply with these requirements the RIDA®QUICK SCAN was developed for the quantitative and objective evaluation of the RIDA®QUICK Mycotoxin Tests.

Keywords: Mycotoxins, Lateral Flow, Reader

Seit Nahrungsmittel von Menschen angebaut und gelagert werden, sind diese mit Mykotoxinen belastet. Diese Mykotoxine (griechisch für Pilzgifte) werden von Schimmelpilzen unter dem Einfluss bestimmter Umweltbedingungen in landwirtschaftlichen Produkten, wie Getreide gebildet. Mykotoxine können somit auch in Lebens- und Futtermitteln sowie Produkten von landwirtschaftlichen Nutztieren vorkommen.

Unter Laborbedingungen konnten bisher ca. 400 Mykotoxine in Reinkultur erzeugt werden. Darunter sind ca. 20 Toxine, die in Lebensmitteln und Futtermitteln vorkommen und damit grundsätzlich für die Lebensmittelsicherheit, das heißt den Verbraucherschutz relevant sind. Für den Anwender stellt sich im wesentlichen die Frage nach einer schnellen, einfach zu handhabenden und präzisen Analytik sowohl von Einzelproben als auch von hohen Probenzahlen. Dazu werden sogenannte Screeningmethoden verwendet, die schnell ein Ergebnis liefern. RIDA®QUICK DON, RIDA®QUICK Aflatoxin und RIDA®QUICK Fumonisin sind Teststreifen im Lateral Flow Format. Diese RIDA®QUICK Teststreifen können mit einer Vergleichskarte semiquantitativ ausgewertet werden. Um den gestiegenen Ansprüchen einer Quantifizierung und Dokumentation gerecht zu werden, wurde ein Teststreifenlesegerät, der RIDA®QUICK SCAN, entwickelt. Parallel dazu wurden auch neue an das Lesegerät angepasste und optimierte Teststreifen entwickelt.

Diese haben in der Produktbezeichnung den Zusatz „RQS“ (RIDA®QUICK SCAN). Der RIDA®QUICK SCAN kann mit Akkus betrieben im Feld, aber auch als stationäres Messgerät in einem Labor verwendet werden. Die Teststreifen werden inkubiert, nach Ablauf der Inkubationszeit in das Lesegerät eingelegt und dort durch eine optische Einheit ausgelesen. Die Auswertung durch das Lesegerät gewährleistet eine objektive Beurteilung der vorhandenen Testbanden. Mittels intuitiver Menüführung wählt der Anwender eine spezifische Nutzeridentifikation und die Auswertemethode aus und startet die Messung. Ein optischer Sensor belichtet den Teststreifen mit einer bestimmten Wellenlänge und misst die Reflektion über das Bandenprofil.



Anschließend wird anhand der gemessenen Bandenintensitäten der Gehalt an Mykotoxin in ppb oder ppm berechnet. Der RIDA®QUICK SCAN kann bis zu 100 Ergebnisse speichern. Diese können mit der mitgelieferten Software RIDA®QUICK SCAN Manage jederzeit per USB auf einen PC exportiert, gespeichert und bequem mit einem Datenverwaltungsprogramm wie beispielsweise Excel verwaltet werden.

Ein portabler Thermotransferdrucker ermöglicht zusätzlich den sofortigen Ausdruck der Ergebnisse. Die Resultate können somit sicher und eindeutig dokumentiert werden.

Somit gewährleistet der RIDA®QUICK SCAN in Kombination mit den RIDA®QUICK Teststreifen eine flexible, schnelle und präzise Analytik von Mykotoxinen. Dabei liegt der Nachweisbereich mit 0,5 ppm–5,5 ppm bzw. 0,25 ppm–0,9 ppm für DON, 4 ppb–75 ppb für Gesamt-Aflatoxin und 0,8 ppm–3 ppm bzw. 4 ppm–10 ppm für Fumonisin im Bereich der geforderten EU-Grenzwerte.

Die gute Vergleichbarkeit der Methode mit der Referenzmethode HPLC zeigt folgende Tabelle:

Matrix	Sample	HPLC [ppm]	QUICK DON [ppm]	recovery % HPLC
Wheat	1633-6	0.3	< 0.5	
Wheat	100	0.3	< 0.5	
Wheat	1633-4	0.95	0.83 ± 0.05	87
Wheat	137	1	1.13 ± 0.15	113
Wheat	1633-3	1.12	1.17 ± 0.18	104
Wheat	1633-2	1.29	1.00 ± 0.21	77
Wheat	1633-7	1.8	2.17 ± 0.41	121
Wheat	1633-1	1.83	1.86 ± 0.18	102
Wheat	134	1.9	1.67 ± 0.17	88
Wheat	1446-4	1.93	1.61 ± 0.14	84
Wheat	1633-5	2.34	2.19 ± 0.15	94
Wheat	138	4.7	4.16 ± 0.60	89
Durum wheat	1425-1	0	< 0.5	
Durum wheat	1425-2	0.74	0.70 ± 0.10	95
Durum wheat	1425-3	0.92	0.88 ± 0.06	95
Durum wheat	1425-4	1.09	1.05 ± 0.14	97
Durum wheat	1425-5	1.13	1.06 ± 0.17	94
Durum wheat	1425-6	2.48	2.52 ± 0.22	102
Triticale	1201-12	1.4	1.44 ± 0.18	103
Triticale	1201-19	5.4	3.88 ± 0.27	72
Triticale	1201-4	7.8	> 5	
			total recovery	95

Autor:

MARC HÜBNER, R-Biopharm AG, An der neuen Bergstr. 17, 64297 Darmstadt

Telefon: 0 61 51 – 81 02-0; e-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

LC-MS(MS) Applikation in der Mykotoxinanalytik von Getreide und Futtermitteln

Application of LC-MS(MS) methods for mycotoxin detection in cereals and feedstuffs

BARBARA DAXNER

Summary

The application of LC-MS(MS) (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) methods combined with ISO 17025 accreditation for mycotoxin detection is getting more and more common.

However, the complexity of MS detection requires more knowhow of the operator and also the consideration of more parameters compared to other detection methods. Hence, it is important to have a steady control in routine operation to assure quality standards. The use of matrix reference materials and isotope labeled standards should be included. Ideally, stable ^{13}C -isotope labeled standards are used as internal standards to handle unwanted matrix and ionization effects. Additionally, an extensive validation of the whole method including various matrices and realistic contamination levels should be performed to determine the most important parameters.

Keywords: ISO 17025, LC-MS(MS), reference materials, stable ^{13}C -isotope labeled standard, method validation

Zusammenfassung

Die Anwendung von LC-MS(MS) (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) Methoden in der Mykotoxinanalytik in Kombination mit ISO 17025 Akkreditierung setzt sich zunehmend durch.

Die Komplexität der MS-Detektion verlangt jedoch mehr Know How des Bedieners und die Berücksichtigung von mehr Parametern im Vergleich zu anderen Detektionsmethoden. Im Routinebetrieb muss daher eine stetige Kontrolle stattfinden, um Qualitätsstandards zu gewährleisten. Unter anderem sollten Matrixreferenzmaterialien und isotopenmarkierte Standards verwendet werden. Idealerweise werden stabile ^{13}C -isotopenmarkierte Standards als interne Standards in der LC-MS Analytik bevorzugt, um unerwünschte Matrix- und Ionisierungseffekte leichter handzuhaben. Des Weiteren sollte eine umfangreiche Validierung der gesamten Methode mit unterschiedlichen Matrices und realistischen Kontaminationsbereichen zur Bestimmung der wichtigsten Parameter durchgeführt werden.

Schlüsselwörter: ISO 17025, LC-MS(MS), Referenzmaterialien, stabile ^{13}C -isotopenmarkierte Standards, Methodvalidierung

In der Mykotoxinanalytik hat die Anwendung von LC-MS(MS) Methoden in den letzten Jahren immer mehr an Beliebtheit gewonnen.

Seitens der EU werden bestehende Grenzwerte von Mykotoxinen nach und nach gesenkt und weitere neue Richtlinien und Regulierungen eingeführt. Die ISO 17025 [1] Akkreditierung von Labors gewinnt dadurch zunehmend an Bedeutung. Akkreditierte Labors müssen in allen Bereichen des Akkreditierungsumfangs hohen Qualitätsanforderungen entsprechen. Ein gut funktionierendes Qualitätsmanagementsystem soll von allen Mitarbeitern gelebt werden und durch ständige Wartung und Verbesserungen 100% Rückverfolgbarkeit gewährleisten. Gleichzeitig müssen auch die gesetzlichen Rahmenbedingungen eingehalten werden, die neben der ISO 17025 insbesondere auch die Richtlinie 96/23/EC und Analyten spezifische Normen mit einschließen.

Für zuverlässige Ergebnisse ist eine umfangreiche, vollständige Methodvalidierung vom Probeneingang bis zur Ausstellung des Zertifikats unumgänglich. Mit möglichst vielen separat aufgearbeiteten Proben sollten verschiedene, für den jeweiligen Analyten typische Matrices inkludiert und ein breiter realistischer Kontaminationsbereich abgedeckt werden.

Für statistisch wertvolle Ergebnisse ist es wichtig, dass nicht nur eine Vielzahl an Proben separat aufgearbeitet wird, sondern dass dies auch durch mehrere Mitarbeiter geschieht und die Validierung an einem anderen Tag wiederholt wird. An Hand von Spiking mit niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationen sollten folgende Parameter im Zuge der Validierung bestimmt werden: Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Selektivität, Wiederfindung jeder Matrix, Linearität, Präzision und Robustheit [2].

Jede Methode bringt auch Herausforderungen mit sich:

Im Vergleich zu anderen Detektionsmethoden ist die MS Detektion deutlich komplexer. Dies bedeutet, dass mehr Parameter bestimmt und optimiert werden müssen, was wiederum mehr Know-How des Bedieners, insbesondere in bezug auf chemische Strukturen und Verhalten des Analyten, verlangt. Aufgrund dieser Komplexität müssen im Routinebetrieb auch mehr Parameter auf einer regelmäßigen Basis überprüft werden. Diese Kontrolle schließt etwa die Verwendung von Matrixreferenzmaterialien (Kontrollprobe) in jeder laufenden Sequenz wie auch die Verwendung von isopenmarkierten Standards ein. Für die Kalibration sollten zertifizierte Referenzmaterialien verwendet und auf Linearität geachtet werden.

Als interner Standard in der LC-MS Analytik sollte ein stabil ^{13}C -isotopenmarkierter Standard bevorzugt werden, um Probleme mit Matrixeffekten oder Ionensuppression/-verstärkung relativ einfach handhaben zu können. Vorgehend können Matrixeffekte auch durch entsprechende Aufreinigungsmethoden (z.B. Immunaффinitätssäulchen) reduziert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Der große Vorteil von isotopenmarkierten Standards ist das praktisch idente Verhalten dem natürlichen Analyten gegenüber bei der chromatografischen Trennung und der Ionisierung des Moleküls. Eine klare Identifikation kann daher über die unterschiedlich großen Molekülmassen stattfinden.

Referenzen:

- [1] Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005), Ed. 2007-01-01
- [2] Stavros Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley VCH 2005

Autorin:

Barbara DAXNER, Romer Labs Diagnostic GmbH, Analytisches Service,
Technopark 1, 3430 Tulln, Austria
barbara.daxner@romerlabs.com

Produktion von isotoopenmarkierten Mykotoxinen – Anwendung und Vorteile in der Routineanalyse

Production of fully stable isotope labeled mycotoxins – Use and advantages in routine analysis.

ANNA MITTERAUER, G. HÄUBL, G. JAUNECKER

Summary

The use of stable isotope labeled mycotoxins enables the compensation of severe matrix effects when using LC-MS/MS which furthermore lead to very weak recoveries and high measurement uncertainties. Stable isotope labeled mycotoxins are characterized by the same chemical and chromatographical properties as the unlabeled ones. The main difference between the labeled and unlabeled mycotoxin is found in a different molecular weight, which can be utilized in mass spectrometric applications.

Romer Labs Diagnostic GmbH produces a variety of isotopic labeled mycotoxins in a high quality (>98 % purity). Hence an overview should be given how such isotopic labeled mycotoxins are produced. Diverse methods exist to make a conversion of ^{12}C to ^{13}C feasible. Romer Labs Diagnostic specialized itself on the production via the biosynthetic pathway of a specific fungus. Therefore the source of glucose a fungal strain needs to produce its' characteristic toxin is replaced by ^{13}C glucose. During the fermentation the fungus builds in the ^{13}C -source in the course of the biosynthesis of the toxin. These implemented ^{13}C -Atoms can be very well distinguished from non-labeled ^{12}C atoms in internal standards using HPLC-MS systems.

Keywords: Stable isotope labeled mycotoxins, Aflatoxins, LC-MS/MS

Zusammenfassung

Die Anwendung von isotoopenmarkierten Mykotoxinen in der Routineanalytik ermöglicht die Kompensation von schweren Matrix-Effekten, welche bei Einsatz von LC-MS/MS Systemen auftreten können. Diese Matrixeffekte führen in weiterer Folge zu Über- oder Unterbefunden, schwachen Wiederfindungen und hoher Messunsicherheit. Stabil-isotoopenmarkierte Mykotoxine zeichnen sich durch dieselben chemischen und chromatographischen Eigenschaften wie das nicht markierte Mykotoxin aus. Die Anwendung einer einfachen HPLC-Analyse würde nicht zwischen markiertem und nicht markiertem Mykotoxin unterscheiden, da Retentionszeit und Spektren ident sind. Der einzige Unterschied liegt in dem Molekulargewicht, welches man sich in massenspektrometrischen Anwendungen zunutze macht.

Romer Labs Diagnostic GmbH produziert eine Vielfalt an hochqualitativen isotoopenmarkierten Mykotoxinen (>98% Reinheit). Hier soll ein Überblick über die Produktion von stabilisotoopenmarkierten Mykotoxinen gegeben werden, wie sie in unserem Laborräumen durchgeführt wird. Dabei spezialisieren sich Romer Labs Diagnostic auf die biosynthetische Produktion durch Zugabe von ^{13}C Glucose im Fermentationsmedium. Während der Fermentation

baut der Pilz die ^{13}C Quelle in das gebildete Toxin ein. Diese implementierten ^{13}C -Atome können durch Einsatz von internen Standards in HPLC-MS Systemen sehr gut differenziert werden.

Schlüsselwörter: isotopenmarkierte Mykotoxine, Aflatoxine, LC-MS/MS

Heutzutage wird in der Routineanalytik vermehrt Augenmerk auf den Einsatz von LC-MS/MS Systemen als bevorzugte Methode zur Mykotoxinbestimmung gelegt. Massenspektrometer stellen hier eine sehr selektive und sensitive Detektionsmethode dar.

Der Einsatz von LC-MS/MS Systemen birgt eine Vielfalt an Vorteilen. Diese Systeme sind adäquat für eine große Auswahl an Analyten und es ist möglich, Multitoxinmethoden für die simultane Detektion von etlichen Substanzen in einem einzigen chromatographischen Lauf zu etablieren. Nichtsdestotrotz kann die Genauigkeit von quantitativen analytischen LC-MS/MS Methoden oft durch Matrixeffekte während des Ionisierungsprozesses stark beeinflusst werden. Dies kann in weiterer Folge zu Über- bzw. Unterbestimmung des Zielanalyten führen (Abbildung 1).

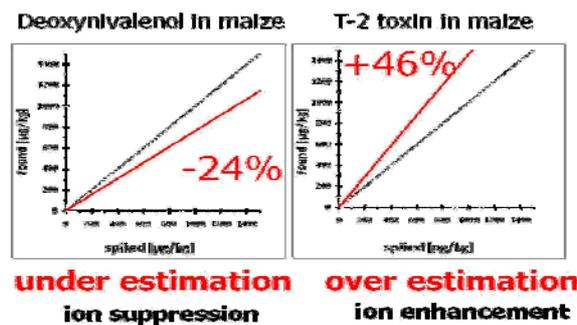


Abbildung 1 Unter- bzw. Überbestimmung durch Matrixeffekte bei Einsatz nichtmarkierter (^{12}C) Mykotoxine am Beispiel von Deoxynivalenol bzw. T-2 Toxin in Mais

Genau hier setzt der Einsatz von stabilisotopenmarkierten Mykotoxinen an. Deren Anwendung ermöglicht es, eine Reihe von Problemen (Über- bzw. Unterbestimmung von Analyten, niedrige Wiederfindungsraten und hohe Messunsicherheiten) in LC-MS/MS Systemen zu umgehen.

Charakteristisch für stabilisotopenmarkierte Mykotoxine ist, dass sie chromatographisches Verhalten und physikochemische Eigenschaften des nicht markierten Toxins aufweisen. Markierte und nicht markierte Toxine haben Gemeinsamkeiten in Retention, Spektren, Extraktion und Derivatisierungsverhalten. Man würde sie anhand einer Analyse mittels HPLC nicht unterscheiden können. Der einzige, für die Identifizierung ausschlaggebende, Unterschied besteht in der Molekülmasse. Jedes Kohlenstoffatom ist durch ein ^{13}C -Atom substituiert, was die Molekülmasse entscheidend verändert. Dies stellt die einzige Möglichkeit dar, markierte und nicht markierte Toxine auseinanderzuhalten und zu detektieren.

Die Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile sind größtenteils ein bekanntes und viel diskutiertes Thema. Deshalb soll die Produktion von ^{13}C markierten Mykotoxinen einmal näher betrachtet werden. Die Fermentation und Aufreinigung von markiertem und nichtmarkiertem Toxin erfolgen meist simultan. Jedoch muss bei der Fermentation des isotonenmarkierten Toxins dafür gesorgt werden, dass der eingesetzte Pilz ^{13}C -Atome in das Toxinmolekül einbaut. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit ist die Einbringung der Stabilisotope durch chemische Umsetzung. Hierfür wird bereits aufgereinigtes, nicht markiertes Toxin eingesetzt. In diesem Fall wird das Toxin nur partiell markiert. Bei der zweiten Variante werden die ^{13}C -Atome mithilfe des natürlichen Biosyntheseweges in das Toxinmolekül implementiert. Dadurch wird eine weitaus höhere Isotopenanreicherung als durch chemische Umsetzung erzielt.

Die Produktion von stabilisotopenmarkierten Mykotoxinen wird hier am Beispiel von Aflatoxinen erklärt.

1. Kultivierung des Pilzes auf Petrischalen:

Der entsprechende Pilz (*Aspergillus flavus var flavus*) aus der Stammsammlung wird auf MEA-Agar (Vollmedium für Aspergilli) ausgestreut und für einige Tage inkubiert.

2. Ein spezielles Flüssigmedium wird hergestellt (für jeden Pilz charakteristisch; angereichert mit diversen Salzen, Zucker und Nährstoffen). Die ^{13}C -Atome werden durch Ersatz von Glukose durch ^{13}C -Glukose im Medium eingebracht. Diese Isotope werden während der Fermentation durch den Pilz in die Toxine eingebaut. Die Flüssigkulturen werden mit einem Agarwürfel der Petrischalenkulturen beimpft und für bestimmte Zeit inkubiert.

3. Die Flüssigkulturen werden mithilfe eines organischen Lösungsmittels extrahiert.

4. Der Rohextrakt wird entweder mittels diverser chromatographischer Methoden oder durch Flüssig/ Flüssig Extraktion bis zur Standardqualität aufgereinigt (Flashchromatographie, Mittel- und Hochdruckchromatographie).

5. Kristallisation und Qualitätskontrolle mittels LC-MS/MS zur Bestimmung der Reinheit, und eventueller „Verunreinigung“ durch die nichtmarkierte Form des Toxins.

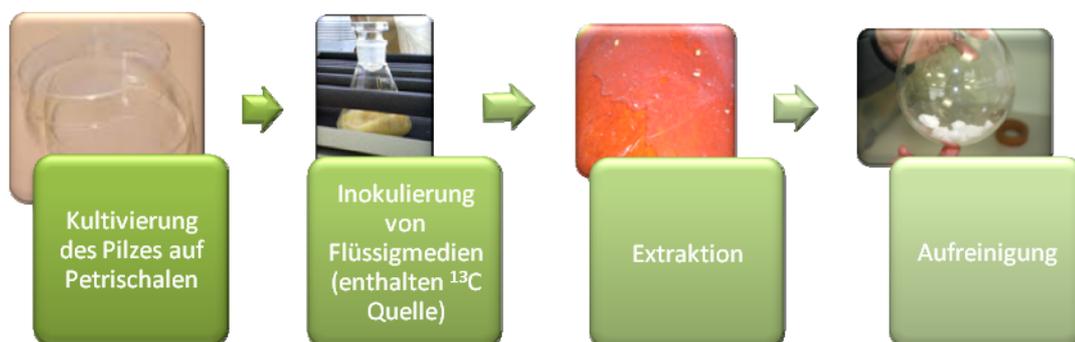


Abbildung 2 Produktionsprozess von ^{13}C markierten Aflatoxinen

Probleme bei der Produktion von ^{13}C markierten Mykotoxinen:

Bei der Fermentation und Aufreinigung stabilisotopenmarkierter Mykotoxine können diverse Probleme auftreten, welchen während des Produktionsprozesses unbedingt entgegengewirkt werden muss. Da im Produktionslabor auch die nichtmarkierten Formen des gelabelten Toxins hergestellt werden, muss sichergestellt sein, dass alle Glasgeräte, Extraktionsgeräte, Rotavaporen, etc. unbedingt sauber und frei von Toxinrückständen sind. Das gilt vor allem für Toxinreste der ungelabelten Form. Die meisten „Verunreinigungen“ passieren während der Aufreinigung durch Einschleppen von nicht gelabeltem Toxin. Diese Verunreinigungen können präparativ nicht mehr aus dem Batch entfernt werden!

Ein weiterer kritischer Punkt bei der Herstellung von ^{13}C Aflatoxinen ist die Tatsache, dass diese Substanzen sehr lichtempfindlich und thermolabil sind und sich daher sehr schnell abbauen. Das erfordert eine sehr zügige Arbeitsweise und Lagerung der Zwischenprodukte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ während Stehzeiten.

Zwischen markiertem und nicht markiertem Toxin variieren die Ausbeuten enorm. Können aus einem Batch nicht markierter Toxine bis zu $1,5\text{ g/ kg}$ gewonnen werden, so können es bei der gelabelten Form bis zu wenigen mg/ kg sein. Schon allein deshalb, abgesehen von der hohen Toxizität der Aflatoxine, ist es notwendig, großes Augenmerk auf die Sorgfalt der Arbeit zu legen. Desweiteren ist die Produktion isotonenmarkierter Toxine sehr kostenintensiv (Rohstoff ^{13}C Glukose).

Conclusio:

^{13}C isotonenmarkierte Mykotoxinstandards stellen eine denkbar bedeutende Angelegenheit in der Routineanalyse für Laboratorien dar, um sichere Produkte für die Nahrungs- und Futtermittelindustrie zu gewährleisten. Der Einsatz als interner Standard kann zur Verbesserung der Messunsicherheit beitragen und zur selben Zeit die Wiederfindung von Analyten in diversen Matrices erhöhen. Deshalb, und aufgrund der immer strikteren Regelungen der erlaubten Grenzwerte in Nahrungs- und Futtermitteln gewinnt dieses zukunftssträchtige Thema immer mehr an Bedeutung.

Autoren:

Anna MITTERAUER, G. HÄUBL, G. JAUNECKER, Romer Labs Diagnostic GmbH,
Analytical Service and Production, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria
anna.mitterauer@romerlabs.com

Evaluierung von automatischer und manueller Probenahme in Ochratoxin A kontaminierten Futtermitteln

Evaluation of automatic and manual sampling in feed contaminated with ochratoxin A

ELISABETH VIKTORIA REITER, P. HÄGGBLOM, P.-A. LINDQVIST, E. RAZZAZI-FAZELI, G. ANDERSSON

Summary

In the present study, automated and manual sampling for ochratoxin A (OTA) in barley grain were applied. In a first step, 10 tonnes of barley were inoculated with *Penicillium verrucosum* and incubated until the OTA concentration reached approximately 20 µg/kg. In a second step, the lot was sampled manually and automatically. A nested experimental design and ANOVA were used to estimate variances components from sampling, sample reduction, subsampling after grinding and analysis, including formation of the analytic sample and HPLC chromatography. While manual sampling resulted in a large uncertainty, by means of automatic sampling the uncertainty arising from nugget effect and the spatial distribution could be eliminated.

Keywords

Sampling, duplicate method, sample reduction, analysis

Zusammenfassung

An Ochratoxin A kontaminierter Gerste wurden sowohl manuelle als auch automatische Probenahme durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Beimpfung von ca. 10 Tonnen Gerste mit *Penicillium verrucosum* und anschließend eine Inkubation bis Ochratoxin A in einer Konzentration von rund 20 µg/kg nachgewiesen werden konnte. Daraufhin erfolgte zuerst die manuelle und dann die automatische Probennahme entsprechend einem „nested Design“. Die Unsicherheit der Probenahme, Probenreduktion, Entnahme der Labor- und Analysenproben sowie HPLC Analyse wurden mittels ANOVA bestimmt. Es zeigte sich, dass bei manueller Probenahme eine große Ergebnisunsicherheit durch die inhomogene Verteilung auftraten, welche bei automatischer Probenahme reduziert werden konnten.

Schlüsselwörter

Probenahme, duplicate method, Probenreduktion, Analyse

Einleitung

Ochratoxin A (OTA) wird von Pilzen der Gattung *Penicillium verrucosum* und *Aspergillus ochraceus* gebildet und ist hauptsächlich in Getreide und Getreideprodukten zu finden. Neben zahlreichen toxischen Eigenschaften ist vor allem die nierenschädliche Wirkung von OTA hervorzuheben [1]. OTA ist, wie die meisten Lagertoxine, inhomogen im Probenmaterial verteilt. Daher variiert die Konzentration in unterschiedlichen Teilen der Gesamtprobe sehr stark, was zur Folge hat, dass die Anzahl an Einzelproben sowie das Gewicht der Sammelproben vom zu untersuchenden Material abhängig sind. Ziel dieser Studie war es, manuelle und automatische Probenahme an OTA kontaminierter Gerste anzuwenden. Gleichzeitig galt es den Einfluß von Methoden der Probenvorbereitung und den Fehler der Probenahme zu evaluieren.

Im Zusammenhang mit dem Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln wird auch immer wieder die Eignung der verwendeten Probenahmeverfahren aufgrund der heterogenen Verteilung diskutiert. Die Probenahme für Mykotoxine in Futtermitteln ist im Rahmen der EU-Verordnung 152/2009 geregelt [2]. Im Rahmen des EU-Projektes BIOTRACER wurden sowohl manuelle als auch automatische Probenahme durchgeführt und die damit verbundene Ergebnisunsicherheit ermittelt.

Methoden

Um auch tatsächlich eine Kontamination mit Ochratoxin A zu gewährleisten, wurden 10 Tonnen Gerste, mit *Penicillium verrucosum* beimpft und anschließend mehrere Wochen gelagert. Während der Lagerung wurde laufend die Bildung von OTA kontrolliert und bei einer Konzentration von rund 20 µg/kg, zuerst manuell und anschließend automatisch beprobt.

Die manuelle Probenahme erfolgte mit Probennahmelanzen, wobei je Sammelprobe (~10 kg) 40 Einzelproben gezogen wurden. Bei der automatische Probenahme hingegen erfolgte die Probenahme mit einem kommerziell erhältlichen Sampler (Tagumatic), welcher in definierten Abständen Einzelproben (~130) von jeweils ca. 30 g entnommen hat. Bei beiden Verfahren, wurden jeweils 8 Sammelproben (in duplicate) gezogen. Die Sammelproben wurden daraufhin mit einer RAS[®] Mill (Romer Analytical Sampling) grob vermahlen (< 2 mm) und zu jeweils 4 Endproben (jeweils rund 500 g) geteilt. Im Anschluss erfolgte die Feinvermahlung der Endproben (< 0.5 mm). Die Entnahme der Analysenproben (à 25 g) erfolgte mittels „fractional shovelling“, um den Fehler der Probenvorbereitung gering zu halten. Die so entnommenen Proben wurden anschließend in Doppelbestimmung auf ihre OTA Konzentrationen untersucht, die Probenaufreinigung erfolgte mittels Immunaffinitätschromatographie, die anschließende Bestimmung mit HPLC-FLD. Im Anschluss erfolgte eine Varianzanalyse mittels „nested ANOVA“.

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie konnte einerseits mit OTA kontaminierte Gerste im großen Maßstab produziert werden, andererseits konnten, durch die Anwendung unterschiedlicher Probenahmeverfahren, große Unterschiede zwischen manueller und automatischer Probenahme festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass im Fall manueller Probenahme, große Unterschiede zwischen den einzelnen Sammelproben (2-80 µg/kg) zu finden sind, während bei automatischer Probennahme vergleichbare Konzentrationen in allen Sammelproben detektiert werden konnten. Auch die Entnahme der analytischen Probe leistet einen wesentlichen Beitrag zum Gesamtfehler des Analysenergebnisses. Bei der automatischen Probennahme zeigte sich sogar, dass der Beitrag der Unsicherheit der Probenvorbereitung zur Gesamtunsicherheit >75% ist (siehe auch Tabelle 1). Die gesamte Ergebnisunsicherheit der automatischen Probenahme ($\pm 13\%$) ist vergleichbar mit der Unsicherheit der Probenreduktion bei der manuellen Probennahme.

Tabelle 1. Ergebnisunsicherheit der Probenahme

Faktor	Relative Unsicherheit ($p=0.05$)	Varianz (%)	
		Beitrag an der Gesamtvarianz v.s. manuell	v.s. automatisch
Manuelle Probennahme – total	120%	100%	
Manuelle Probennahme – Probenahme und Reduktion	110%		
Manuelle Probennahme – Probenreduktion (Einfluss der Probenmasse 4.5kg)	-		
Automatische Probennahme - total	43%		100%
Automatische Probennahme (inklusive Einfluss der Probenmasse)	13%		
Automatisch Probennahme (ohne Effekt der Größe der Probe 4.5 kg)	-		
Probenvorbereitung und Analyse total (nach RAS mill)	42%	11%	76%
Probenvorbereitung	42%	11%	76%
Probenreduktion 1 (nach RAS mill)	34%	7.1%	51%
Subsampling 2 (nach Feinvermahlung)	26%	3.6%	26%
Analyse	1.5%	0.017%	0.12%

Literatur

1. Scudamore, K., Mycotoxins, in Bioactive compounds in foods, J. Gilbert and H. Senyuva, Editors. 2008, Blackwell Publishing West Sussex.
2. European Commission, COMMISSION REGULATION (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Official Journal of the European Union, 2009. L54: p. 1-130.

Autoren

Elisabeth Viktoria REITER, Ebrahim RAZZAZI-FAZELI, Veterinärmedizinische Universität Wien,
Institut für Tierernährung, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Per HÄGGBLOM, Gunnar ANDERSSON, National Veterinary Institute, SE-751 89 Uppsala,
Sweden

Per-Anders LINDQVIST, Svenska Foder, SE- 531 16 Lidköping, Sweden

Entwicklung von Lateral Flow Devices zur semi-quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen in verschiedenen Getreidesorten

Development of Lateral Flow Devices for semi-quantitative Determination of Mycotoxins in different cereals

BARBARA CVAK, ALEXANDRA MOLINELLI, RUDOLF KRŠKA

Zusammenfassung

Durch das ubiquitäre Vorkommen von Mykotoxinen in diversen Getreidesorten ist es wichtig neben komplexen analytischen Labor-Methoden, schnelle und einfache Tests zur Bestimmung dieser Giftstoffe zu haben. Die so genannten Lateral Flow Devices (LFDs) basieren auf einem immunochemischen Prinzip und sind einfache Streifentests die vor Ort eingesetzt werden können. Der Extrakt einer Getreideprobe kann direkt ohne weitere Aufarbeitung im Testsystem eingesetzt werden. Nach einer 3-minütigen Testphase, in welcher der Streifen in die zu testende Lösung getaucht wird, erfolgt ein Trocknungsschritt. Die Intensität der resultierenden farbigen Testlinie wird zur semi-quantitativen Bestimmung mittels reflexionsphotometrischer Messung herangezogen. Im Rahmen dieser Arbeit werden sowohl Einzel-LFDs für Zearalenon, als auch Multi-LFDs zur simultanen Bestimmung von Zearalenon und der Summe von T-2 und HT-2 Toxin, vorgestellt.

Schlüsselworte: Mykotoxine, Zearalenon, T-2/HT-2 Toxin, Schnelltests, LFDs, Mais, Weizen

Summary

Because of the ubiquitous occurrence of mycotoxins in most cereals it is very important having easy and rapid tests for toxin determination besides lab-based analytical methods. The so called Lateral Flow Devices (LFDs) are based on an immunochemical test principle and are simple strip tests which can be used on-site. The extract of a sample can be used without further purification step directly in the test system. After 3 min test time in which the test strip is put into the sample, it is dried with an air-dryer. The intensity of the resulting colored test line is then measured by relative reflectance reading and a semi-quantitative result is received.

Within this work single LFDs for zearalenone, as well as multi-LFDs for the simultaneous determination of zearalenone and the sum of T-2 and HT-2 toxin, will be presented.

Keywords: mycotoxins, zearalenone, T-2/HT-2 toxin, rapid tests, LFDs, cereals, maize, wheat

Einleitung

Mykotoxine sind Sekundärmetaboliten von Schimmelpilzen und zählen zu den wichtigsten Kontaminanten von Getreide und Getreideprodukten, wobei die dadurch entstehenden Belastungen je nach Klimazone, Witterung oder auch Insektenbefall stark variieren können.

Höchstzulässige Mengen von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln wurden in den letzten Jahren in vielen Ländern der Welt durch von Verordnungen und Richtlinien festgelegt. Aufgrund dieser Regelungen müssen sämtliche Getreidesorten überprüft und kontrolliert werden, wodurch eine große Nachfrage an einfachen Schnelltests besteht, da die Anzahl der zu untersuchenden Proben stetig steigt und analytische Methoden im Labor oft langwierig und kostenintensiv sind. Neben Labor-basierten chromatographischen und massenspektrometrischen Multimethoden zur Quantifizierung, Identifizierung und Charakterisierung von Mykotoxinen werden vermehrt Immunotests, wie zum Beispiel ELISA Tests, für den Nachweis eingesetzt.

Eine weitere Entwicklung auf immunologischer Basis stellen Streifentests, so genannte Lateral Flow Devices (LFDs), dar. Diese können direkt vor Ort eingesetzt werden und bieten somit eine einfache und schnelle Alternative zur Bestimmung der Mykotoxine in Getreide.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schnelltests für Zearalenon (ZON) sowie T-2/HT-2 Toxin und ZON gemeinsam (Multi-Streifentests) in Mais und Weizen entwickelt.

Material und Methoden

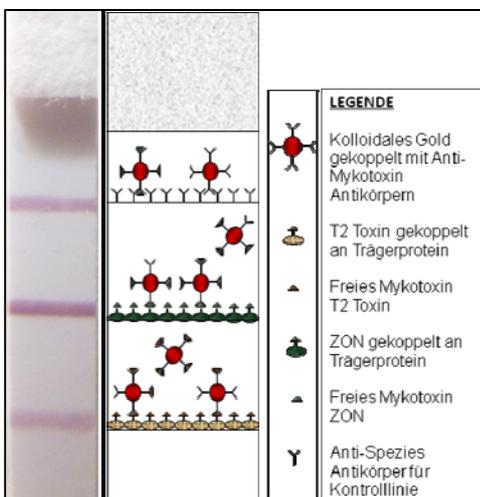


Abb. 1: Testprinzip eines Multi-LFDs

Testprinzip: Wenn Zielanalyten in der Probe vorhanden sind, werden diese von an kolloidales Gold gekoppelten anti-Mykotoxin Antikörpern gebunden. Bei einer negativen Probe bleiben die Gold-gekoppelten anti-Mykotoxin Antikörper frei und können an das auf der Membran immobilisierte Mykotoxin binden. Durch die Konkurrenz zwischen den an die Membran gebundenem und freiem Toxin in der Probe ist in diesem so genannten kompetitiven Testprinzip das Signal indirekt proportional zum Ergebnis. Bei einer negativen Probe ist die Intensität der entstehenden farbigen Testlinie (TL) auf der Membran hoch, je mehr Toxin in der Probe vorhanden ist, desto

heller wird die Linie. Die zweite Linie auf der Membran ist eine Kontrolllinie (KL). Diese muss nach Durchführung eines Tests immer vorhanden sein und gewährleistet somit die korrekte Durchführung. Die Intensität der Linien wird anschließend mit einem Reflexionsphotometer gemessen und kann mit einer externen Kalibration zur semi-quantitativen Bestimmung der Toxinmenge in einer Getreideprobe herangezogen werden. Abbildung 1 zeigt einen Multi-Streifen zur Bestimmung von 2 Toxinen, wofür 2 Testlinien und eine Kontrolllinie aufgetragen werden.

Teststreifen: Auf eine Nitrozellulose-Membran (Whatman, 2,5 cm x 30 cm) werden mittels Kontaktsprüher (Biodot, Irvine, CA) als Testlinie ein Protein-Mykotoxin Konjugat und als Kontrolllinie ein anti-Spezies Antikörper aufgetragen. Um später eventuelle unspezifische Bindungen an die Membran zu verhindern wird diese mit dem Protein BSA (Bovines Serum Albumin) geblockt, bevor sie zur besseren Stabilität auf eine Plastikkarte geklebt wird und Teststreifen zugeschnitten werden können.

Antikörper-Gold Konjugat: Kolloidales Gold wird in einer Größe von etwa 40 nm synthetisiert und dient als farbiges Signalreagenz im Testsystem, wofür die anti-Mykotoxin spezifischen Antikörper an die Goldpartikel gekoppelt werden (Goldkolloid-Antikörper Konjugat).

Probenvorbereitung: 5 g Probe werden mit 10 mL XBuffer (Romer Labs) durch dreiminütiges Schütteln extrahiert. Nach 10-minütigem Absetzen der Probe kann der Extrakt direkt für den Test verwendet werden.

Testdurchführung: 50 µL Probenextrakt werden mit 50 µL Goldmix (Goldkolloid-Antikörper Konjugat + Puffer) vermischt. Ein Teststreifen wird anschließend für drei Minuten in die Lösung getaucht und eine weitere Minute unter Heißluft getrocknet (XDryer, Romer Labs). Anschließend wird die Intensität der Linien mit einem Reflexionsphotometer (XReader, Romer Labs) semi-quantitativ ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussion

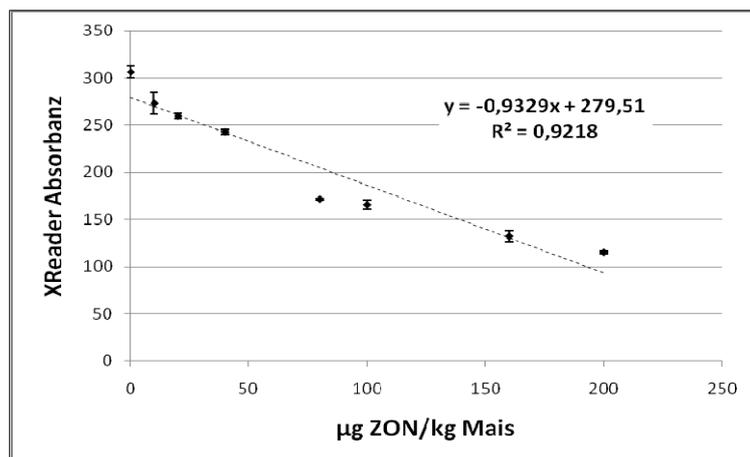


Abb. 2: Kalibration von ZON in Mais (0-200 µg/kg)

Nach der Extraktion von unbelastetem Getreide (Mais und Weizen) wurden die Blindproben mit Mykotoxin-Standards bekannter Konzentration versetzt (ZON-Standard für Einzel-LFDs und ZON + HT-2 Standards für Multi-LFDs) und in geeigneten Schritten verdünnt um einen Kalibrationsbereich von 0-200 µg kg⁻¹ Toxin im Getreide zu erreichen.

Abbildung 2 zeigt eine Kalibrationskurve für ZON in Mais in einem Bereich von 0-200 µg Toxin. Ähnlich gute Ergebnisse konnten für ZON in Weizen erzielt werden, jedoch wird hier der Extrakt nach der Extraktion noch 1:2 mit XBuffer (Romer Labs) verdünnt (Daten werden hier nicht angeführt).

Abbildung 3 zeigt Kalibrationen von Prototyp-Multi-LFDs für ZON und die Summe von T-2/HT-2 Toxin im Bereich von 0-200 µg kg⁻¹.

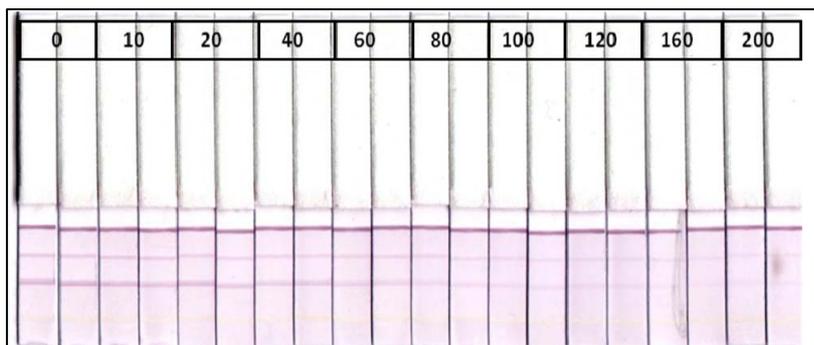


Abb. 3: Abbildung von Multi-LFDs (Kalibration HT-2/T-2 + ZON)

Durch die Verwendung von 2 verschiedenen Antikörper-Gold Konjugaten für die 2 Toxine ist der Hintergrund auf den Streifen sehr dunkel, wodurch es für das Reflexionsphotometer nicht möglich war die höheren Konzentrationen zu bestimmen.

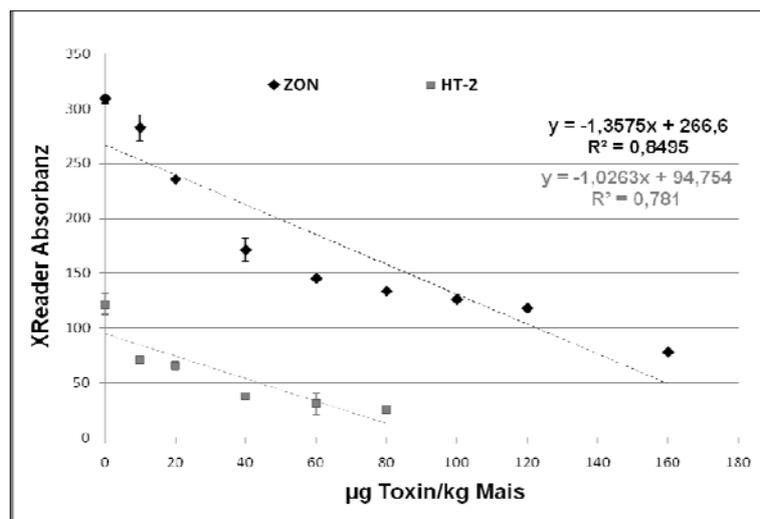


Abb. 4: Kalibration von Multi-LFDs (HT-2/T-2 + ZON)

Darum werden in Abbildung 4 die Kalibrationskurven für T-2/HT-2 nur von 0-80 µg kg⁻¹ und für ZON nur von 0-160 µg kg⁻¹ gezeigt.

Die ersten Ergebnisse mit gespikten Maisproben zeigen lineare Arbeitsbereiche. Nachdem es große Unterschiede zwischen gespikten und natürlich kontaminierten Proben gibt werden weitere Tests mit natürlich kontaminierten Referenzmaterialien durchgeführt.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Land Niederösterreich, der Christian Doppler Gesellschaft, FEMtech, Bmvit und Romer Labs Division Holding GmbH für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

Molinelli A., Grossalber K., Krska R. *Anal Bioanal Chem.* **2009**, 395, 1309–1316

Magan N. *Mycopathologia.* **2006**, 162, 245–253

Turkevitch J., Stevenson P.C., Hillier J. *Discuss Faraday Soc.* **1951**, 11, 55-75

Autoren

Barbara CVAK*, Alexandra MOLINELLI*, Rudolf KRSKA⁺

*Romer Labs Division Holding, Technopark 1, 3034 Tulln; ⁺Universität für Bodenkultur Wien, IFA Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

Vorkommen von *Fusarium* spp. und Mykotoxinen in Mais aus Kosovo

Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in maize from Kosovo

VITORE SHALA-MAYRHOFER, R. MARJAKAJ, F. BERTHILLER, M. LEMMENS

Summary

Maize (*Zea mays* L.) with a total acreage of 60.000-70.000 ha is an important cereal crop in Kosovo and a major component of animal feeds. The purpose of this study was to analyse the incidence and identity of the *Fusarium* species isolated from naturally infected maize kernels in Kosovo as well as mycotoxin contamination. The results of 2009 showed that the incidence of Fusarium ear rot (from 1 - 40% diseased ears) and mycotoxin contamination on maize in Kosovo is high. The most frequently *Fusarium* spp. identified on maize kernels were *Fusarium subglutinans* (73%), *F. verticillioides*/*F. proliferatum* (14%), *F. graminearum* (7%) , *F. poae* (2%), *F. avenaceum* (<1%), *F. sporotrichoides* (<1%), and *F. equiseti* (< 1%). Maize kernel samples were contaminated with deoxynivalenol (DON), DON-3-glucoside, 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON, zearalenone, zearalenone-4-sulfate, moniliformin, fumonisin B₁ and fumonisin B₂.

This is the first report on the incidence and identification of *Fusarium* species isolated from naturally infected maize in Kosovo.

Keywords: *Fusarium* species, Fusarium ear rot, *Zea mays*, Kosovo

Zusammenfassung

Mais (*Zea mays* L.) mit einer gesamten Anbaufläche von 60.000-70.000 ha stellt eine der wichtigsten Getreidearten in Kosovo da und ist die Hauptkomponente der Tierernährung. Das Ziel dieser Arbeit war es die Befallshäufigkeit durch *Fusarium*, die Fusarienspecies, sowie die Mykotoxin-Kontamination in Mais aus Kosovo zu untersuchen. Die Ergebnisse der Ernte von 2009 haben gezeigt, dass die Häufigkeit von Kolbenfusariose (1 – 40 % befallene Kolben) und die Mykotoxin-Kontamination hoch ist. Die meist identifizierten *Fusarium* spp. bei Maiskörnern waren *Fusarium subglutinans* (73%), *F. verticillioides*/*F. proliferatum* (14%), *F. graminearum* (7%), *F. poae* (2%), *F. avenaceum* (<1%), *F. sporotrichoides* (<1%), und *F. equiseti* (< 1%). Die Maisproben waren mit deoxynivalenol (DON), DON-3-Glucosid, 3-Acetyl-DON, 15-Acetyl-DON, Zearalenon, Zearalenon-4-Sulfat, Moniliformin, Fumonisin B₁ und Fumonisin B₂ kontaminiert.

Dies ist der erste Bericht über die Häufigkeit und Identifizierung von *Fusarium* species in natürlich kontaminiertem Mais aus Kosovo.

Schlüsselworte: *Fusarium* species, Kolbenfusariose, *Zea mays*, Kosovo

Material and methods

The research took place during the vegetative period in 2009 at six locations within two regions of Kosovo. The first region was rrafshi i Kosoves (Skenderaj and Viti: altitude around 550 meters, mean annual temperature 16.5 °C, soil type: vertisol and chernozem), while the second region was rrafshi i Dukagjinit (Istog, Peja, Gjakove and Prizren: altitude around 370 meters, mean annual temperature 17.5 °C, soil type: alluvial, brown, alluvium / pseudogley and pelosol, continental climate). The preceding crop in 2008 was winter wheat. At the locations Istog, Gjakove and Prizren we had plots with and without irrigation, whereas at the location Skenderaj, Viti and Peje no irrigation was employed. The fields were selected from local farmers (except Institute of Peje) and were located in the main maize growing region in Kosovo. The maize hybrids were: PR 36R10 (at Skenderaj), Colombo P10 (at Viti), Columbia Pionier and Nigro FAO-600 (at Gjakove), 640 (at Istog), Calciu and 551 (at Prizren). The area of the plots were 0,75 ha in Skenderaj, 0,4 ha in Viti, 0,4 and 0,8 ha in Gjakove, 0,3 ha in Istog and 0,6 and 0,7 ha at the location Prizren. The number of replications was four at all locations. The other 16 hybrids were grown at the Institute of Peje: DKC 6574, DKC 5143, DKC 6677, ZPSC 505, OS 515, OS 430, NS 444, NS 640, A-11, A-12, A 13, OS 430, ST 444, ST 640, A5 Arius and A6 Alinnea. The area of those plots were 0,2 ha and the number of replicates was three. As a standard in Kosovo fertilization was done with N:P:K 120:80:80 kg ha⁻¹. Extra organic fertilization (10 – 15 t / ha) was additionally applied. To control weeds the herbicides Stomp, Gardian, Agrosan, Mister, and Glyfosat have been used.

Disease assessment occurred through maize ratings after ripening before the harvest directly on the field (in the two middle rows of each replication). The main ear of 100 maize plants was analysed visually for infection with *Fusarium* spp. The analysis consisted of the following parameters: disease incidence (DI = percentage of diseased ears), percentage of diseased area of the ear (PDA = disease severity) and percentage of diseased kernels (PDK = PDA*DI/100 = disease intensity) (LEMMENS, 1999). To isolate *Fusarium* species, kernels with visible symptoms were collected directly during the visual analysis from the maize ears. A total of 814 kernels collected from maize were surface-sterilised in 80% ethanol for two minutes, air dried and transferred on to Synthetic Nutrient Agar supplemented with antibiotics. Morphological identification of the individual *Fusarium* species was done according to (NELSON et al., 1983). Detection and quantification of the mycotoxins in maize was carried out by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The kernel samples were taken from the harvest, after threshing with a plot combiner and were milled. A multimycotoxin method for maize (SULYOK et al., 2006), enhanced to cover a total of 186 mycotoxins and other fungal and bacterial metabolites, was used to analyze the samples.

Results and discussion

Table 1. Disease parameters for *Fusarium* ear rot in the maize experiments and mycotoxin contamination ($\mu\text{g} / \text{kg}$) on maize meal in Kosovo in 2009. Data from different locations and different hybrids with irrigation (+ IR) and without irrigation (– IR).

LOCATION , HYBRID	DI	PDK	PDA	MON	DON	D3G	3ADON	Z4S	ZON	15ADON	FB1	FB2
Skenderaj, 36 R10 (-IR)	17	3,1	3									
Istog, 640 (+IR)	20	4,05	5,8	314	<u>7200</u>	1730	74	30,8	<u>391</u>	1500		
Gjakove, Columbia Pionier (- IR)	12,3	1,04	0,2								225	63
Gjakove, Nigro FAO 600 (+IR)	24	1,22	0,42	22,9	809	144	3,9	8,2	213	858		
Prizren, 551 (+IR)	17,3	1,2	0,27	315							58,3	
Prizren , Calciu (-IR)	<u>40,3</u>	4,55	<u>12,6</u>								623	134
Viti, Colombo (P10) (-IR)	10,8	2,43	1,15								583	149
Inst. Peje, DKC 6574	7	0,87	0,1									
Inst. Peje, DKC 5143	2,3	0,8	0,03									
Inst. Peje, DKC 6677	7,7	1,3	0,2		525	12,8		8,99	198			
Inst. Peje, ZPSC 505	0,5	0,1	0,08					1,38				
Inst. Peje, Arius	9	2,8	3,3									
Inst. Peje, Alinnea	16	1,2	0,7									
Inst. Peje, OS 515	3,3	0,7	0,04									
Inst. Peje, OS 430	6,3	1,1	0,3									
Inst. Peje, NS 444	2,3	2	0,5									
Inst. Peje, NS 640	5,7	0,8	0,1									
Inst. Peje, A13	7	5,7	10,1								134	37,1

Abbreviations: DI, disease incidence = percentage of diseased ears; PDK, percentage of diseased kernels = disease intensity; PDA, percentage of diseased ear area = disease severity; MON, moniliformin; DON, deoxynivalenol; D3G, deoxynivalenol-3-glucoside; 3ADON, 3-acetyl-deoxynivalenol; Z4S, zearalenone-4-sulfate; ZON, zearalenone; 15ADON, 15-acetyl-deoxynivalenol; FB1, fumonisin B₁ and FB2, fumonisin B₂.

In general, the results presented in the Tab. 1 shows that the percentage of diseased ears (40,3 %) and percentage of diseased ear area (12,6 %) of *Fusarium* spp. at the location Prizren, hybrid 551, with irrigation, was clearly higher as in the other locations in Kosovo. No big differences regarding of percentage of diseased kernels could be established. Based on morphological characters, the most frequently *Fusarium* spp. identified on maize kernels were

Fusarium subglutinans (73%), *F. verticillioides*/*F. proliferatum* (14%), *F. graminearum* (7%). Less frequently isolated species included *F. poae* (2%), *F. avenaceum* (<1%), *F. sporotrichoides* (<1%), and *F. equiseti* (< 1%). Table 1 also summarizes the concentrations of the detected mycotoxins. The highest contaminated sample was taken from location Istog. The measured 7,2 mg/kg DON and 0,39 mg/kg ZON are above the corresponding maximum levels for unprocessed maize according to European legislation (EC 1881/2006). In addition, about 1,73 mg/kg D3G, 1,5 mg/kg 15ADON and 0,31 mg/kg MON were measured in the same sample. 9 out of 18 samples were completely uncontaminated, showing no detectable amounts of the investigated 186 mycotoxins. Fumonisin were also detected in 5 samples, although the concentrations were well below the maximum allowed levels in maize. Interestingly, also three *Penicillium* mycotoxins were detected in several samples, namely mycophenolic acid and in minor concentrations also griseofulvin and penicillic acid. These toxigenic *Fusarium* species isolated from maize and the mycotoxins we detected are in accordance with previous research in other countries in Europe (LOGRIECO et al., 2002, LEMMENS, 2008). The level of incidence and the composition of *Fusarium* species are highly dependent on the year, location, hybrid and weather conditions. Based on the results, further research should be done for at least an additional season in Kosovo and mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone should be analysed to control food and feed quality.

References

- LEMMENS, M. (1999): Boniturschema für die Einschätzung des Befalls mit *Fusarium* spp. von Maiskolben. Persönliche Mitteilung. IFA – Tulln.
- LEMMENS, M. (2008): Toxicological aspects of beauvericin and deoxynivalenol produced by *Fusarium* spp. on maize and wheat. Master thesis. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna. Department of IFA - Tulln.
- LOGRIECO, A. MULÈ, G. MORETTI, A. and BOTTALICO, A. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597 – 609.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN T. A. and MARASAS, W. F. O. (1983): *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
- SULYOK, M., BERTHILLER, F., KRŠKA, R., SCHUMACHER, R. (2006): Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun, Mass Spectrom.* 20: 2649-2659.

Authors:

Vitore SHALA-MAYRHOFER¹, Robert MARJAKAJ², Franz BERTHILLER¹, Marc LEMMENS¹

¹BOKU - University Vienna, DAPP and IFA-Tulln

²University of Prishtina, Faculty of Agriculture

Einfluss von Lauch als Mischkulturpartner und arbuskulärer Mykorrhiza auf Fusariumbefall und Wurzelexsudation der Tomate

The effect of leek as intercropping partner and arbuscular mycorrhizal fungi on Fusarium infection and root exudation of tomato

KARIN HAGE-AHMED, V. CHOBOT, A. VOGLGRUBER, F. HADACEK, SIEGRID STEINKELLNER

Summary

In this work a model system was created consisting of the soilborne tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) and the symbiotic arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (AMF) in an intercropping system consisting of tomato and leek. The FOL infection rate was not reduced by AMF, whereas the AMF colonisation rate was significantly reduced by FOL. The spore germination rate of FOL in exudates of this model system was significantly reduced in all AMF treatments.

Key words: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Glomus mosseae*, root exudates, arbuscular mycorrhizal fungi

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Modellsystem bestehend aus dem bodenbürtigen Tomatenpathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) und dem symbiontischen Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* (AMF) in einem Mischkultursystem von Tomate und Lauch getestet. Die FOL-Befallshäufigkeit konnte durch den Einsatz von AMF nicht reduziert werden, jedoch wurde die Wurzelkolonisierungsrate von AMF durch FOL signifikant reduziert. Die Sporenkeimung von FOL in Exsudaten aus dem Modellsystem wurde in allen AMF Varianten signifikant reduziert.

Schlüsselwörter: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Glomus mosseae*, Wurzelexsudate, arbuskuläre Mykorrhiza

Einleitung

Bodenbürtige pilzliche Schaderreger verursachen weltweit aufgrund der eingeschränkten Gegenmaßnahmen massive Ertrags- und Qualitätsverluste an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Gerade die Rhizosphäre, der unmittelbar von der Pflanze beeinflusste Bereich im Boden, wo viele Interaktionen zwischen Pflanze und Mikroorganismen stattfinden (Nelson, 1990), bietet einen herausfordernden Ansatzpunkt für die Untersuchung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen. Das wachsende Verständnis für diese komplexen Zusammenhänge bildet eine wesentliche Grundlage für die Entwicklung neuer ökologisch orientierter Bekämpfungsmaßnahmen.

In einem Modellsystem wurden daher die Interaktionen zwischen einem bodenbürtigen Pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), und einem symbiontischen arbuskulären Mykorrhizapilz, *Glomus mosseae* (AMF), in einem Mischkultursystem von Tomate und Lauch untersucht wurden.

Material und Methoden

3 Wochen alte Tomatenpflanzen (Sorte „Tiny Tim“) wurden gemeinsam mit 9 Wochen alten Lauchpflanzen (Sorte „Golem“) in einem Gemisch aus Aussaaterde:Leca:Sand (1:1:1, V/V/V) in Töpfe pikiert. Folgende Ansätze mit jeweils 15 Töpfen wurden verwendet: Kontrolle, FOL, AMF, AMF + FOL. Die Inokulation mit FOL erfolgte mit einer Sporensuspension (1×10^5 Mikrokonidien/ml), während für die AMF Inokulation ein kommerziell erhältliches Inokulum verwendet wurde (Biorize/Agrauxine, Quimper, Frankreich).

Nach 10 Wochen wurden die Wurzeln der Tomatenpflanzen (BBCH 51-72) ausgewaschen und in einer Acetatpufferlösung (pH=5,5) für 6 h eingetaucht. Danach wurden die Frischgewichte der Pflanzen bestimmt, die gewonnenen Exsudate auf eine Konzentration von 1g Wurzelmasse/10 ml Exsudat eingestellt und sterilfiltriert. FOL Infektionen wurden nach der Skala von Wellman (1939) bestimmt. AMF Kolonisierungsgrad wurde nach der Methode von Vierheilig et. al (1998) und Giovanetti und Mosse (1980) ermittelt.

Weiters wurden Sporenkeimtests von FOL in den gewonnenen Wurzelexsudaten durchgeführt. Dazu wurden 100 µl Mikrokonidiensuspension (1×10^7 Sporen/ml) in 500 µl Exsudat für 20 h inkubiert und die Sporenkeimrate bestimmt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die niedrigsten Wurzelgewichte im Bereich von 5,39 und 6,17 g weisen die Varianten Kontrolle, FOL und AMF+FOL auf (Tabelle 1). Die Variante AMF liegt mit 9,73 g signifikant höher als die anderen Varianten. Der positive Einfluss auf das Wurzelgewicht durch AMF konnte in der Mischvariante AMF+FOL nicht beobachtet werden. Bei den Kolonisierungsgraden lässt sich eine höhere Kolonisierung in der reinen AMF Variante gegenüber der Mischvariante AMF+FOL feststellen. Der Korrelationskoeffizient mit 0,583 für den Zusammenhang zwischen AMF Kolonisierungsgrad und Wurzelfrischgewicht deutet allerdings nur auf einen mittleren Einfluss der AMF Kolonisierung auf das Wurzelfrischgewicht hin. Dies impliziert, dass es noch andere Einflussgrößen der arbuskulären Mykorrhiza gibt, die sich nicht im Kolonisierungsgrad widerspiegeln bzw. durch den generell niedrigen Kolonisierungsgrad dieser Effekt nicht festgestellt werden konnte.

Der Befall mit FOL im Tomate-Lauch-System wurde durch eine Mischanwendung von FOL und AMF nicht reduziert. Diese Situation steht im Widerspruch zu Untersuchungen mit anderen AMF Arten bzw. Stämme (Akköprü und Demir, 2005).

In Abbildung 1 ist die Sporenkeimrate von FOL in jeweils 5 Exsudaten der einzelnen Varianten dargestellt. Die Sporenkeimraten in den Varianten AMF und AMF+FOL liegen mit 62,5 bzw. 61,7 % signifikant niedriger als die Varianten Kontrolle und FOL (77,7 bzw. 79,7). Dies deutet auf einen Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza über die Exsudation der Pflanze auf die Sporenkeimrate von FOL nach 20 h hin.

Tabelle 1. Wurzelgewichte, AMF Kolonisierungsgrade (Mittelwert \pm Standardabweichung) und FOL Befall in den unterschiedlichen Behandlungen. Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte bedeuten signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-Test ($p=0,05$).

Behandlungen	Wurzelfrischgewichte in g	AMF Kolonisierungsgrad in %	Befallshäufigkeit FOL in %
Kontrolle	6,15 \pm 1,78 a	0,00 a	0,00
FOL	6,17 \pm 2,91 a	0,00 a	60,0
AMF	9,73 \pm 2,22 b	10,93 \pm 7,36 c	0,00
AMF+FOL	5,39 \pm 3,99 a	2,08 \pm 2,99 b	73,30

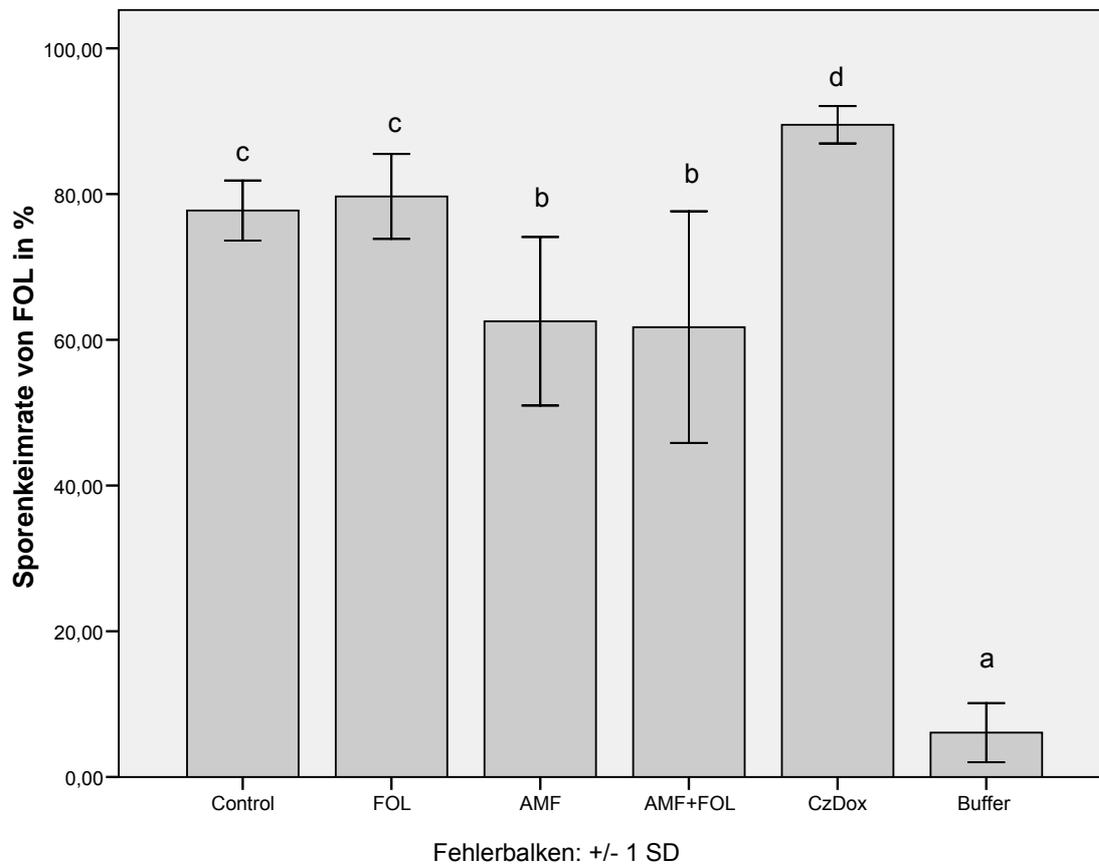


Abbildung 1. Sporenkeimrate von FOL in den Wurzelexsudaten der unterschiedlichen Behandlungen nach 20 h. CzDox=Czapek Dox Medium (+Kontrolle), Buffer=Acetatpuffer (pH=5,5, - Kontrolle). Mittelwerte mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-Test ($p=0,05$).

Danksagung

Dieses Projekt wird durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) gefördert.

Literatur

Akköprü, A. & Demir, S. 2005: Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Phytopathology* 153: 544-550.

Giovanetti, M. & Mosse, B. 1980: An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.

Nelson, E. B. 1990: Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil* 129:61-73.

Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U. & Piché, Y. 1998: Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5004-5007.

Wellman, F. L. 1939: A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato Fusarium wilt. *Phytopathology.* 29:945-956.

Autoren

Karin HAGE-AHMED und Siegrid STEINKELLNER, Institut für Pflanzenschutz, DAPP, Universität für Bodenkultur Wien, Peter Jordan-Straße 82, 1190 Wien.

Vladimir CHOBOT, Andreas VOGLGRUBER und Franz HADACEK, Department für Chemische Ökologie und Ökosystemforschung, Universität Wien, Althanstraße 14, 1090 Wien.

***Fusarium* spp.- Befall an Zwiebeln (*Allium cepa* L.) und Nachweis entsprechender Fumonisin-Kontaminationen**

Occurrence of Fusarium spp. in onion bulbs (Allium cepae L.) and determination of the corresponding fumonisin contamination

MONIKA GOßMANN, UTE GÄRBER, RITA GROSCH, FRANK ELLNER, CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

Untersuchungen von 300 Zwiebeln aus Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg ergaben, dass ca. 10 % mit *Fusarium* spp. latent infiziert waren. *F. oxysporum* und *F. proliferatum* waren die dominierenden *Fusarium*-Arten, die meist in Mischkontamination mit *Penicillium* spp. vorlagen. Insgesamt war die natürliche Fumonisin-Kontamination in den untersuchten Counterparts mit Gehalten an FB₁ bis zu 23 µg/kg sehr gering. Die mit Isolaten von *F. oxysporum* und *F. proliferatum* ermittelten Infektionsergebnisse auf Zwiebelhälften zeigten, dass diese Pilze auf der Zwiebel zunächst sich etablieren, ohne dass sichtbare Symptome innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 14 Tagen ausgebildet wurden. Vor allem die Isolate von *F. proliferatum* waren in der Lage hohe Konzentrationen an FB₁ mit bis zu 700 µg/kg zu bilden.

Schlüsselwörter

Allium cepa, Wurzel- und Basaldfäule, *Fusarium* spp. , Fumonisine

Summary

300 onion bulbs were collected in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg during the growing season in 2008 and analysed for *Fusarium* contamination. 10% of the bulb halves used for *Fusarium* determination were *Fusarium* positive with *F. oxysporum* and *F. proliferatum* being the dominant species. Infestation by *Penicillium* spp. was much higher with almost 97 % positive samples.

Fumonisins could be detected in the majority of the *Fusarium* infested bulbs but in relative low concentrations with 23 µg/kg bulb tissue for FB₁ as the maximum. Two varieties of *Allium cepa* were inoculated with different isolates of *F. oxysporum* and *F. proliferatum* selected from the field samples. Onion tissue served as a very good growth substrate for the fungi tested without any visible disease symptoms within the cultivation period of two weeks. In contrast to *F. oxysporum*, isolates of *F. proliferatum* produced high amounts of Fumonisins in both onion varieties with 701 µg/kg tissue for FB₁ as the maximum.

Keywords

Allium cepa, root and basal rot, *Fusarium* spp., fumonisins

Einführung

Zwiebelbasalfäule, hauptsächlich verursacht durch *Fusarium oxysporum*, ist weltweit eine wichtige bodenbürtige Krankheit der Zwiebel [1]. Auch *F. proliferatum* kann die Basalplatte von Zwiebeln befallen [2, 3] und zählt zu den wichtigsten Produzenten von Fumonisinen in Nahrungs- und Futtermitteln. Diese Mykotoxine können für die Gesundheit der Verbraucher von relevanter Bedeutung sein. Bei Untersuchungen in Serbien waren 6 von 11 aus Zwiebeln isolierte *F. proliferatum*- Isolate in der Lage Fumonisine in Konzentrationen von 25 - 3000 µg/g Substrat zu bilden [3]. In Deutschland wurde in *F. proliferatum*- infizierten Knoblauchknollen FB₁ in Höhe von 26 - 95 ng/g nachgewiesen [4].

Zielstellung vorliegender Untersuchungen war, natürliche Infektionen mit *Fusarium* spp. bei Zwiebeln festzustellen und bei positiven Befunden die Werte der natürlichen Fumonisinkontaminationen zu erfassen. Weiterhin stellte sich die Frage, ob diese *Fusarium*- Arten in der Lage sind auf Zwiebelgewebe zu wachsen und relevante Mengen an Toxinen zu produzieren.

Material und Methoden

Die Probenahme von 300 Zwiebeln der Sorten 'Marimba', 'Red Baron', 'Takstar', 'Centurion' und 'Corrado' von Herkünften aus Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg, erfolgte im Juli 2008. Für die Untersuchungen auf Pilzbefall wurden die Zwiebeln zuerst grob gereinigt, das Laub, die äußere Schale und der Wurzelbart wurden entfernt und die Zwiebeln längsgeteilt. Eine Hälfte wurde für die Fumonisin-Untersuchungen bei -21°C eingelagert und aus dem Counterpart wurde aus dem basalen Teil das Zwiebelherz, ein Gewebestück mit Durchmesser von 2,0 cm, herausgeschnitten, das für 3 min mit 1% NaOCl oberflächendesinfiziert wurde. Daraus erfolgte die Heraustrennung wiederum von drei kleineren, ca. 0,5 cm großen Gewebestückchen und die Auslegung auf SNA (Speziellen Nährstoffarmen Agar). Es folgte eine zehntägige Inkubation bei Wechsel- UV, d.h. 14 h UV- Beleuchtung und 10 h Dunkelheit. Mittels Lichtmikroskopie wurde die Befallshäufigkeit der ausgelegten Zwiebelstückchen mit *Fusarium* spp. festgestellt. Die Artendeterminierung erfolgte anhand morphologischer Eigenschaften. Die Fumonisine wurden aus den Zwiebelhälften extrahiert, derivatisiert und mittels HPLC nachgewiesen.

In weiterführenden Experimenten wurden Zwiebelhälften der Sorten 'Galatea' und 'Hykeeper' an der Basalplatte mit einer Sporensuspension von aus den Feldproben gewonnene zwei *Fusarium oxysporum*- und vier *F. proliferatum*-Isolaten inokuliert. Die Inkubation erfolgte 14 Tage bei 15°C und hoher Luftfeuchtigkeit. Danach wurden die Fumonisine B₁ und B₂ durch HPLC bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Von den insgesamt 300 untersuchten Zwiebelhälften waren ca. 10 % mit *Fusarium* spp. infiziert. Nur 3 % der Proben wiesen keinen Pilzbefall auf. *Penicillium* spp. war in 97 % der Proben nachweisbar (Tab. 1).

Tabelle 1: Ergebnis der Untersuchungen der Zwiebelhälften (n= 300) dreier Herkünfte aus Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg

Herkunft	Sorte	Anzahl Zwiebeln [n]	Befallshäufigkeit [%]		
			<i>Fusarium</i> spp.*	<i>Penicillium</i> spp.	Befallsfrei
1	Marimba	51	12	94	4
	Red Baron	2	50	0	50
	Takstar	20	25	100	0
2	Marimba	100	3	99	4
3	Marimba	28	18	96	4
	Centurion	50	14	98	2
	Corrado	49	6	94	6
Summe		300	10	97	3

*Mischinfektionen mit *Penicillium* spp. möglich

Das *Fusarium*-Spektrum setzt sich aus insgesamt 8 Arten zusammen, die in unterschiedlicher Häufigkeit vorkamen: *F. arthrosporioides*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. redolens*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* und *F. tricinctum*. Die dominierenden Arten waren *F. oxysporum* und *F. proliferatum*, die entweder allein oder gemeinsam mit den anderen *Fusarium*-Arten und/oder mit *Penicillium* spp. in den meist symptomlosen Zwiebelhälften nachgewiesen werden konnten.

Die Fumonisin-Untersuchungen der Zwiebelhälften, die vor den Pilzuntersuchungen bei -21 °C eingelagert worden waren und deren andere Hälfte eine Kontamination mit *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Penicillium* spp., entweder allein oder zusammen aufwiesen, ergaben überwiegend positive Nachweise. Aber auch Zwiebelhälften, in deren Counterpart keine der nachgewiesenen *Fusarium* spp. festgestellt worden waren enthielten mitunter Fumonisine. Insgesamt war die Fumonisin-Kontamination aber sehr gering, mit Gehalten an FB₁ bis zu 23 µg/kg.

Die mit einer Sporensuspension von *F. oxysporum* und *F. proliferatum*-Isolaten inokulierten Zwiebeln der Sorten 'Galatea' und 'Hykeeper' bildeten nach einer 14-tägigen Inkubation bei 15°C und hoher Luftfeuchtigkeit, auf den inokulierten Gewebeflächen (Zwiebelhälfte oder Basalplatte) ein Myzel aus, ohne das zunächst Symptome sichtbar waren. Die zwei Isolate von *F. oxysporum* produzierten nur geringe Mengen an Fumonisinen (Tab. 2). Der Mittelwert unterschied sich mit 28,0 und 14,2 µg FB₁/kg in 'Galatea' und 'Hykeeper' nicht signifikant von den Kontrollen (13,7 und 8,6 µg FB₁/kg). Wesentlich anders war die Situation bei vier *F. proliferatum*-Isolaten (Tab. 2). In allen damit infizierten Zwiebelhälften waren signifikant höhere Konzentrationen an FB₁ und FB₂ nachweisbar, mit deutlichen Unterschieden zwischen den einzelnen Isolaten und der verwendeten

Zwiebelsorte. In 'Galatea' produzierten alle *F. proliferatum*- Isolate höhere Mykotoxinkonzentrationen mit Maximalwerten von 700,6 und 79,5 µg/kg für FB₁ und FB₂ während in 'Hykeeper' nur Konzentrationen von 142,0 bzw. 19,9 µg/kg für FB₁ und FB₂ nachweisbar waren.

Tabelle 2: Produktion von Fumonisin B₁ und B₂ in mit *F. oxysporum*- und *F. proliferatum*-infizierten Zwiebelhälften von 'Galatea' und 'Hykeeper 14dpi

Zwiebelprobe	'Galatea'		'Hykeeper'	
	FB ₁ [mg/kg]	FB ₂ [µg/kg]	FB ₁ [µg/kg]	FB ₂ [µg/kg]
UK t ₀	0	0	2,3	0,3
UK	13,7	2,9	8,6	3,5
<i>F. prol.</i> , Isolat 1	700,6	79,5	39,9	6,6
<i>F. prol.</i> , Isolat 2	403,6	45,0	50,9	7,6
<i>F. prol.</i> , Isolat 3	437,5	44,0	72,4	12,5
<i>F. prol.</i> , Isolat 4	685,6	87,0	142,0	19,9
<i>F. oxy.</i> , Isolat 1	28,0	5,0	14,2	4,4
<i>F. oxy.</i> , Isolat 2	7,0	23,0	9,9	2,8

Literatur

- [1] BRAYFORD D (1996): *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Mycopathologia 133: 39-40
- [2] DU TOIT LJ, INGLIS DA, PELTER GQ (2003): *Fusarium proliferatum* Pathogenic on Onion Bulbs in Washington. Plant Disease 87, 750
- [3] STANKOVIC S, LEVIC J, PETROVIC T, MORETTI A (2007): Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. Eur J Plant Pathol 118: 165-172
- [4] SEEFELDER W, GOßMANN M, HUMPF HU (2002): Analysis of Fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Journal of Agric. and Food Chem. 50: 2778-2781

Autoren

MONIKA GOßMANN, CARMEN BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerischer Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Julius Kühn-Institut, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin.

UTE GÄRBER, Julius Kühn- Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow.

RITA GROSCHE, Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren.

F. M. ELLNER, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin.

The effect of farming system and year on microfungi occurrence on wheat grain

Einfluss von Wirtschaftsweise und Jahrgang auf das Vorkommen von mikroskopischen Pilzen an Weizen

BOHUMILA VOŽENÍLKOVÁ, BRONISLAVA HORTOVÁ, J. MOUDRÝ, HANA KUCHYNKOVÁ, LENKA ŠTOČKOVÁ,
Z. ŠTĚRBA, B. ČERMÁK

Summary:

In years 2008 – 2009 in Lukavec location (a private farm) small-parcel experiments were established to study natural occurrence of pathogenic fungi on wheat grain within the organic and conventional farming systems. Wheat seed material of varieties Ebi and Meritto had been sown into ground naturally contaminated with the mentioned / *Fusarium* genus / fungi and consequently health condition of the plants was monitored during the vegetation season.

Within the time of this experimental study following results were recorded. The most frequent occurrence of microfungi affecting wheat grain storability fall on / *Fusarium poae* / species. Presence of other species / *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* / and / *F. tricinctum* / was recorded to a lesser extent. Further in conditions / in vitro / was monitored occurrence of / *Alternaria* / and / *Penicillium* / species.

Within the period of this study grain analyses for DON (deoxynivalenol) content did not proved excessive values. Surface microbial analyses of grains after winter wheat harvest were carried out by methodology of experimentalist from the microbiological institute in Linz (LEW 1995).

Key words: winter wheat; species; *Fusarium* spp.; *Alternaria* spp; *Penicillium* spp

The study was supported by the following projects: MSM 6007665806, MZE0002700604 and NAZV QH 81060.

Introduction

The aim of this study has been to observe natural occurrence of pathogenic fungi, above all fungi of the *Fusarium* genus, within the organic and conventional farming systems. In site Lukavec (on a private farm) small parcel experiments were established for this purpose. *Fusarium* genus fungi belong to important pathogens affecting most of crops which make them dangerous. They can attack stalk feet, leaves and even spikes, which usually results in yield decrease. In favourable conditions these yield losses can reach up to 50%. An epidemic affection is usually caused by high rates of cereals in crop rotation, excessive nitrogen fertilizers application, high plant density and improper agronomical practices, imperfect crop residues embedding above all. This can cause yield loss of up to 10%. An epidemic can reduce harvest by 50 – 70 % (ADLER, 1993).

Microfungi negatively affect grain germination capacity and baking quality as well. Their harmfulness is intensified by production of mycotoxins that are produced as secondary metabolites. When grain contaminated with fungi of *Fusarium* genus should be presented within the food chain it might cause very bad toxicological troubles impacting human and animal health.

In recent years the values of mycotoxins content in production have been strictly monitored and the max limits have been given by the law.

Material and Methods

In years 2008 - 2009 16 samples of winter wheat, varieties EBI and MERITO, grown *in vitro* were analyzed. The samples were assorted according to forgoing crop, row spacing and cultivation method. At the same time content of DON in grain was quantified and consequently the cultivation method was assessed as some of the samples were cultivated within organic farming conditions whereas the others were grown conventionally.

The surface microflora was determined using the PDA nutrient medium. Before seeding into the nutrient medium the grain was surface-sterilised and treated using 1% sodium hypochlorite solution (Savo agent) and rinsed with distilled water afterwards. 100 grains from each sample were placed into Petri dishes (25 grains) with 4 times repeated cultivation.

The samples in Petri dishes were incubated for 7 - 10 days in the dark and temperature 21°C. Afterward the macro and microscopic determination of fungi occurrence, the *Fusarium* spp. genus above all, was carried out and the occurrence frequency recorded.

Subsequently the developed fungi colonies were revaccinated into PDA nutrient medium and wort agar for cultivation. Final and precise determination of particular fungi species of the *Fusarium* genus was carried out in the Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyne (RNDr. J. Hýsek, CSc.).

Results and Discussion

This study was aimed to evaluate natural occurrence of phytopathogenic fungi on winter wheat grain (Ebi and Merito varieties). Predominantly species of the *Fusarium* genus were concerned as their occurrence frequency reached highest numbers. Within the experiment yield parameters were assessed as well. Particular samples were grown in Lukavec site, where some of them were established in organic farming conditions whereas the others were cultivated conventionally using common chemical treatment. The laboratory analyses were carried out in years 2008 and 2009.

The most frequent occurrence of spike fusaria is recorded on winter and spring wheat (CHRPOVÁ, 2007). The analysis of surface microflora focused on *Fusarium* genus proved more frequent occurrence of this fungi genus on samples cultivated organically and reached 41,6% in year 2008 and 29,6% in year 2009. The occurrence of *Fusarium* genus on conventionally cultivated samples reached lower frequency (35,2% in year 2008 and 24,3% in year 2009) as shown in Tab. 1 and 2. ZIMOLKA at al. (2005) states that the occurrence of fusaria rises with rising elevation and rainfall under the condition of sufficient temperature needed for their growth and development. According to VÁŇOVÁ, TVARŮŽEK and HRABALOVÁ (2005) temperature and rainfall are the most important factors for the frequency of fusaria occurrence. Fusaria occur more frequently between the phase of early flowering and harvesting in localities with higher humidity or wet seasons.

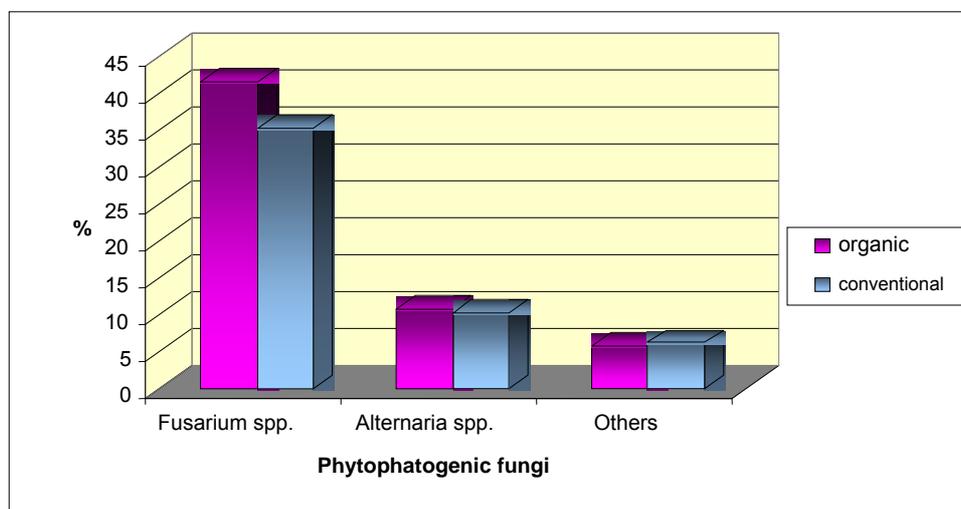
Determination of particular phytopathogenic fungi was carried out within the monitoring of surface microflora. PROKINOVÁ (1999) proved higher frequency and species diversity of phytopathogenic genera within organic farming systems. MATUŠINSKÝ (2007) presumes explanation of this fact in mutual competition between mycocenoses colonising the same environments that are not treated using herbicides controlling particular species. In years 2008 and 2009 wide range of fungi pathogens was found on both cultivation media. In most cases occurred *Fusarium* species.

The comparison between organic and conventional farming systems on winter wheat cultivation proved following results. The occurrence percentage of fungi *Fusarium* species within the organic farming system in year 2008 (41,6%) and 2009 (29,6%) was higher compared to conventional farming system in both years 2008 (35,2%) and 2009 (24,6%), see Diag. 1 and 2.

Tab. 1 Occurrence of fungi *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.* species on wheat grain cultivated within conditions of organic and conventional farming systems

Year 2008	Cultivation medium PDA		
Farming system	<i>Fusarium spp.</i> (%)	<i>Alternaria spp.</i> (%)	Others (%)
organic	41,6	10,8	5,8
conventional	35,2	10,2	6,2

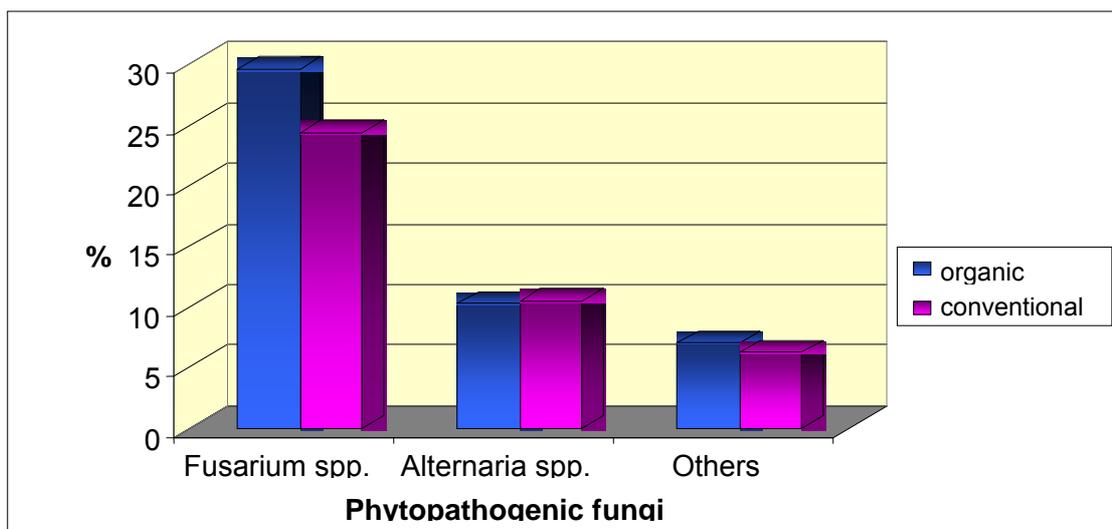
Diag. 1 Occurrence of phytopathogenic fungi (%) on wheat grain in relation to farming system in year 2008.



Tab. 2 Occurrence of *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.* species on wheat grain cultivated within conditions of organic and conventional farming systems

Year 2009	Cultivation medium PDA		
Farming system	<i>Fusarium spp.</i> (%)	<i>Alternaria spp.</i> (%)	Others
organic	29,6	10,2	7
conventional	24,3	10,4	6,2

Diag. 2 Occurrence of phytopathogenic fungi (%) on wheat grain in relation to farming system in year 2009.



Bibliography

1. ADLER A., 1993: Fusarien auf heimischen Feldfrüchten. In: Mykotoxine in der landwirtschaftlichen Produktion (II), Linz, 21: 43 - 51.
2. CHRPOVÁ J., ŠÍP V., SÝKOROVÁ S., SYCHROVÁ E., 2007: The possibilities of spike fusaria attack elimination on cereal crops, Research Institute of Crop Production, Prg: 24 s.
3. LEW H., 1995: Mykotoxinbelastung von Getreide und Konsequenzen für seine Verarbeitung. Getreide Mehl und Brot, 49, 1: 16-19.
4. MATUŠINSKY P., 2007: Conventional and organic farming systems in terms of crop protection, Obilnářské listy, 3/2007: 78-79 s.
5. ZIMOLKA J., 2005: Wheat – cultivation, grain classification and use, Profi Press, Praha: 180 s.

Internet sources:

1. VÁŇOVÁ M., TVARŮŽEK L., HRABALOVÁ H., 2000: Fusaria in winter wheat spikes and their prevention, available on URL: <Agrokrom [online]. 2009 [cit. 2010-04-04]. Obilnarske_listy. Dostupné <http://www.agrokrom.cz/texty/Obilnarske_listy/Vanova_Tvaruzek_Hrabalova_Fuzaria_20005.pdf>.

Authors:

Bohumila VOŽENÍLKOVÁ¹, Bronislava HORTOVÁ¹, Jan MOUDRÝ¹, Hana KUCHYNKOVÁ¹, Lenka ŠTOČKOVÁ², Zdenek ŠTĚRBA¹, Bohuslav ČERMÁK¹

¹ University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture
(Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta)

² Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyne
(Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha – Ruzyně)

The mycotoxicological quality of oats

Die mykotoxikologische Qualität von Hafer

HANA KUCHYNKOVÁ, KATERINA VOLFOVÁ, Z. ŠTĚRBA

Summary:

Demand for high-quality foods is recently increasing. We were focused on grain growing, especially the oat type, because its popularity among healthy nutrition supporters is rising. Our research run on the small experimental areas of University of South Bohemia in České Budějovice and Kroměříž in years 2008-2010. We were growing 6 glume and 4 naked oat varieties on small parcels (2,5m²-side). Each parcel was harvested separately and most of tests of qualitative and quantitative signs were made on the plant material. Among the most important quantitative signs were involved 1000 seed weight and seed volume weight measurement.

The signs were compared in both of two mentioned oats varieties. There was approved significant relation with low value variability between 1000 seed weight, glume presence and plant genotype. The dependence of year was not statistically evident, while the relation between grain glume presence and seed volume weight was very significant. Comparison of grain yield between naked grain and glume grain varieties shown significant difference, the grain yield of a glume grain variety was markedly higher. With references to qualitative signs we carried out the health condition analyses of individual oat varieties, especially the mycotoxin analysis, because of the mycotoxins bad influence on supplies.

Key words: Microscopic fungi, varieties of oats, quality.

The study was supported by the following projects: NAZV QH 81060.

Introduction

In the case of agricultural commodities are the major problem of mycotoxins, produced as secondary metabolites of microscopic fungi. Mycotoxins can have a significant adverse acute and chronic effects on organisms and may also cause carcinogenic, immunogenic, organ-specific, teratogenic and mutagenic. The main way that should significantly reduce the levels of mycotoxins, research programs are aimed at breeding and genetic engineering of varieties to increase resistance to fungal pathogens (Cleveland et al. 2003).

Material and Methods

We compared the two yield components (TGW and OH) on different varieties of oats. It was about 10 varieties that were planted at two locations in the Czech Budejovice and Kromeriz in two replications. These varieties were followed by three different preceding crop - corn, canola and cereal. Oats were grown in conditions of organic farming and from these samples, collected at the end of the vegetation, were studied mycotoxins. The task was the determination of fusarium mycotoxins in cereals (content DON and T-2 toxin), which reduce the quality of the grains and determination the sensitivity of different varieties of the fungus Fusarium, and the main parameters affecting the resulting yield elements of mycotoxins.

The results were processed using the method of Factorial ANOVA program Statistics 9.0.

Results and Discussion

Our main aim is to see whether it can be shown to influence each previous crop varieties for yield components (weight of thousand grains and volume weight). A comparison the sensitivity of the varieties of mycotoxins and their effect on yield components. And other aim is compare the sites.

The basic hypothesis in assessing the yield of the two elements was that there is no difference between the varieties. The statistical comparing data from Ceske Budejovice showed that the effect of previous crop, we can prove, even though we probably have chosen a few repetitions ($df_{\text{proc.crop}} = 2$, $F = 7.3317$, $p_{\text{proc.crop}} = 0.0017$). However, the varieties differ from each other in terms TGW ($df_{\text{var}} = 9$, $F_{\text{var}} = 41.7236$, $p_{\text{var}} = 0.0000$).

As concerns the evaluation of OH, then the difference between the previous crop can not be demonstrated statistically ($df_{\text{proc.crop}} = 2$, $F_{\text{proc.crop}} = 2.5839$, $p_{\text{proc.crop}} = 0.0859$) and there was evidence of a difference between varieties ($df_{\text{var}} = 9$, $F_{\text{var}} = 1.6935$, $p_{\text{var}} = 0.1167$).

The statistical processing of data from Kromeriz showed that the effect of previous crop assessment is proven TGW ($df_{\text{proc.crop}} = 2$, $F_{\text{proc.crop}} = 11.7072$, $p_{\text{proc.crop}} = 0.00007$) and the varieties are different ($df_{\text{var}} = 9$, $F_{\text{var}} = 60.0084$, $p_{\text{var}} = 0.000$). By comparing of OH showed that the effect of previous crop in the evaluation of OH is detectable ($df_{\text{proc.crop}} = 2$, $F_{\text{proc.crop}} = 122.0425$, $p_{\text{proc.crop}} = 0.000$), differed between the varieties ($df_{\text{var}} = 9$, $F_{\text{var}} = 74.9144$, $p_{\text{var}} = 0.000$).

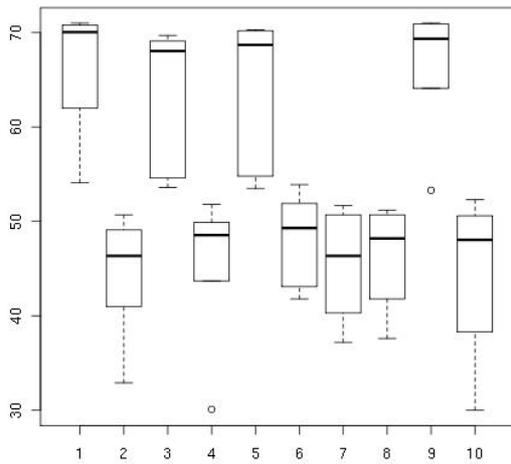


Fig. 1 Effect of variety on the volume weight (Kromeriz)
 $(Df_{odr} = 9, F_{odr} = 74.9144, p_{odr} = 0.000)$ The supporting differences between varieties

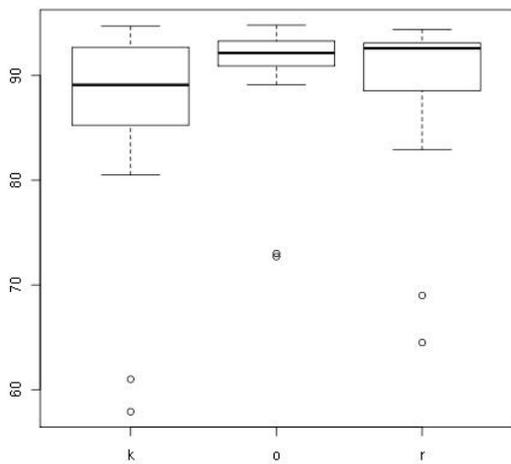


Fig. 2 Effect of previous crop volume weight (Czech Budejovice)
 $(df_{předpl} = 2, F_{předpl} = 2.5839, p_{předpl} = 0.0859)$
 difference is not statistically proven.

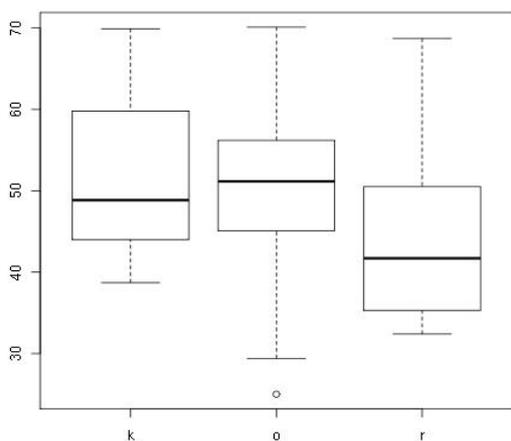


Fig. 3 Effect of previous crop on the weight of thousand grains (Kromeriz)
 $(df_{předpl} = 2, F_{předpl} = 11.7072, p_{předpl} = 0.00007)$,
 statistically demonstrable difference.

The results and graphs show that in the evaluation weight per thousand grains in both areas, varieties differed among themselves, it means that the sensitivity of the varieties to attack of *Fusarium* is different. The most susceptible varieties were Pogon and Atego, as is evident from our chart. In the evaluation of volume weight were seen only in Czech Budejovice, the varieties differed among themselves. This could be due to the weather seems to contain mycotoxins, which is one of the most important influencing factors (Polišenská et al., 2010).

The ultimate analysis, we need to compare content of mycotoxins in yield compared with the individual elements. This evaluation is part of further research.

Bibliography

Cleveland, T.E., Down, P.F., Desjardins, A.E., Bhatnagar, D., Cotty, P.J.: United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Manag. Sci.* 59: 2003, 629-642.

Polišenská, I., Jirsa, O., Salava, J., Matušinsky, P., Prokeš, J. (2010): Fuzáriové mykotoxiny a patogeny *Fusarium* v obilovinách sklizně 2009. *Obilnářské listy* 1, 2010, 12-13.

Authors:

Hana KUCHYNKOVÁ, Zdeněk ŠTĚRBA: Department of plants production, The University of South Bohemia, Agricultural faculty, Studentská 13, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

Katerina VOLFOVÁ: Department of special zootechnics, The University of South Bohemia, Agricultural faculty, Studentská 13, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

Vorerntemonitoring DON in Bayern im Rahmen der Qualitätssicherung Winterweizen

Monitoring of deoxynivalenol before harvest in Bavarian winter wheat in the context of a HACCP scheme

P. EIBLMEIER, J. RAMPL

Zusammenfassung:

Auf Grund der EU-Verordnung 1881/2007 ist der Bedarf an zuverlässigen Informationen zur aktuellen Deoxynivalenol(DON)-Belastung in Winterweizen gestiegen. Im Rahmen des Vorerntemonitoring DON in Bayern wird eine saisonale Einschätzung bereits vor der Ernte vorgenommen. Durch die Integration der Partner der Wertschöpfungskette in Winterweizen in diesem Verbundprojekt wird eine qualitätsgerechte Verwertung von Winterweizen entsprechend der EU-Verordnung 1881/2007 unterstützt. Das Vorerntemonitoring Fusarium stellt damit einen wertvollen Baustein des HACCP-Konzeptes zur Risikominimierung von DON dar.

Summary:

Due to regulation (EC) No 1881/2006 demand on reliable information concerning actual DON contamination has increased. With the monitoring of DON prior to harvest in Bavaria a seasonal assessment of DON is done. Partners of value chain of winter wheat are integrated within this project to assist achievement of legal limits according to regulation (EC) No 1881/2006. The joint project pre harvest monitoring of DON therefore makes a valuable component within an HACCP concept to minimize risk of DON contamination.

Keywords: mycotoxins, fusarium, risk assessment, HACCP

Mit der Einführung der EU-Verordnung Nr. 1881/2007 die - unter anderem - Grenzwerte für das derzeit relevanteste Leitmykotoxin Deoxynivalenol (DON) festlegt, haben das Thema Fusarien und das Mykotoxin DON im europäischen Wirtschaftsraum weiter an Bedeutung gewonnen. Eine frühzeitige Einschätzung der späteren Belastung mit diesen Mykotoxinen ist erstrebenswert, um qualitätssichernde Maßnahmen einleiten zu können und eine qualitätsgerechte Verwertung entsprechend der EU-Verordnung sicherzustellen. Derzeit ist jedoch vorab eine zuverlässige saisonale und regionale Beurteilung der später zu erwartenden Mykotoxinbelastung nur eingeschränkt möglich.

Für die saisonale und regionale Vorhersage der zu erwartenden mittleren DON-Belastung sind Fusarienbonituren und Prognosemodelle in ihrem derzeitigen Entwicklungsstand nur sehr begrenzt einsetzbar. Mitunter werden damit Prognosen vorgenommen, die sich in den Messwerten des wichtigsten Leittoxins DON nach der Ernte nicht bestätigen lassen.

Das Verbundprojekt DON-Vorerntemonitoring kann jedoch mit einer flächendeckenden Anzahl von Ährenbeprobungen, Repräsentativität vorausgesetzt, eine relativ treffsichere Prognose der saisonalen mittleren Belastung erzielen. In den Jahren 2007-2009 konnten die Ergebnisse des Vorerntemonitorings durch ein unabhängiges Erntemonitoring bestätigt werden (Abb. 1).

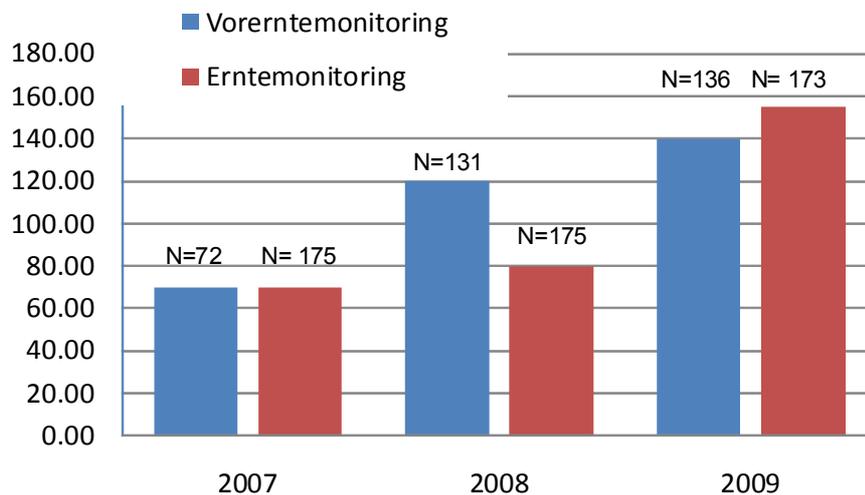


Abbildung 1: Relativer Median-DON-Wert (%) aus dem Vorerntemonitoring Fusarien und dem unabhängigem Erntemonitoring in 2007-2009

Durch die Kooperation über die Erzeugungs- und Verarbeitungsstufe der Wertschöpfungskette können die vorhandenen Möglichkeiten der Risikominimierung zu DON kommuniziert werden und das Vorerntemonitoring stellt damit einen wichtigen Baustein im Rahmen des HACCP Konzeptes dar (Abb. 2).

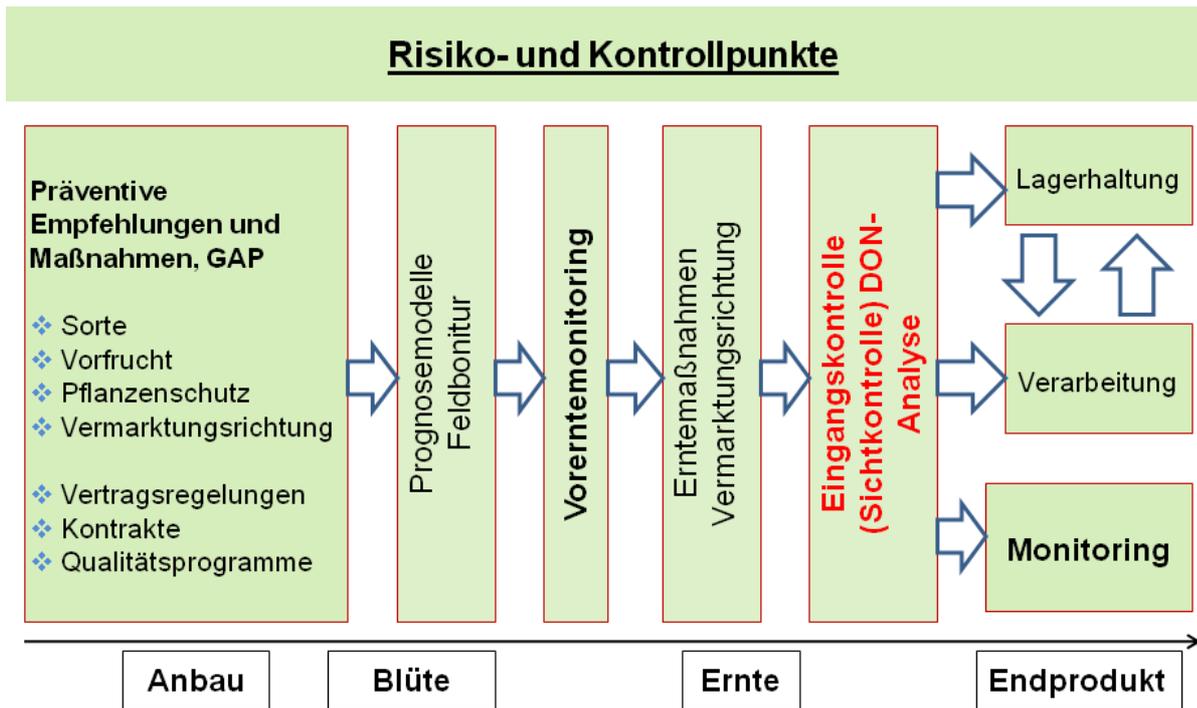


Abbildung 2: Risiko- und Kontrollpunkte des HACCP Konzeptes zu Deoxynivalenol

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei den Mitarbeitern des Labors der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft für die DON-Analysen und beim Cluster Ernährung des bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, dem Bayerischen Müllerbund e.V., der BAYWA AG, dem Verband Deutscher Mühlen sowie der Fachgruppe Landhandel im Verband der Agrargewerblichen Wirtschaft e.V. für die finanzielle Unterstützung.

Autoren:

Peter EIBLMEIER, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz, Lange Point 10, 85354 Freising.

Dr. Josef RAMPL, Bayerischer Müllerbund e.V., Landesverband Bayerischer Mühlen, Karolinenplatz 5a, 80333 München.

Simultane Quantifizierung von Mykotoxinen

Testmessungen mit vier aktuellen Triple-Quadrupol-Systemen

Simultaneous Quantification of Mycotoxins
- Test measurements with four state-of-the-art Triple Quadrupole Systems

W. BRODACZ

Summary

Four state-of-the-art triple quadrupole systems has been tested for the simultaneous quantification of 17 mycotoxins. Results of the comparison are the basis of the purchase decision.

The main criterions of the test-measurements were sensitivity and robustness against matrix-effects.

Key words

Triple Quadrupole; Sensitivity; Matrix-effects; Simultaneous quantification; Mycotoxins

Zusammenfassung

Vergleich von vier aktuellen QqQ-Massenspektrometern für die simultane Quantifizierung von 17 Mykotoxinen als Entscheidungsgrundlage für den Ankauf eines LC-MS/MS. Hauptkriterien der Testmessungen waren Nachweisempfindlichkeit und Robustheit gegen Matrixeffekte.

Schlüsselwörter

Triple-Quadrupol; Nachweisempfindlichkeit; Matrixeffekte; simultane Quantifizierung; Mykotoxine

Einführung und Zielsetzung

Die Neuentwicklungen der vier renommiertesten Hersteller von Triple-Quad-Systemen wurden 2009 bei Testmessungen mit 17 ausgewählten Mykotoxinen miteinander verglichen (alphabetische Reihung):

- Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole
- AB Sciex QTRAP 5500
- Thermo Fisher Scientific TSQ Vantage
- Waters Xevo TQ MS

Sie wurden ausgewählt, da sie dzt. die höchste Sensitivitätsstufe dieser Geräteklasse darstellen und sehr schnelles „Polarity Switching“ erlauben. Denn bei vielen Substanzklassen wie Pestiziden und Mykotoxinen können nicht alle Zielanalyten ausschließlich im positiven bzw. negativen Ionenmodus erfolgreich gemessen werden. Um Doppelanalysen, d.h. eigene Läufe im positiven und negativen Modus zu vermeiden, haben die Hersteller bei den aktuellen Systemen die Polaritätswechsel durch leistungsfähigere Elektronik beschleunigt. So benötigen die getesteten Systeme von Agilent und Thermo je 100 msec, AB Sciex kommt bei der neuesten Gerätegeneration mit nur 50 msec aus und Waters schaltet mit 20 msec am schnellsten.

Neben der Evaluierung der Nachweisempfindlichkeit war die Robustheit der ESI-Ionenquelle gegen Matrix-Effekte das zweite wichtige Kriterium. Daher wurde der sog. „Dilute and shoot“-Ansatz mit relativ hoher Matrixbelastung (125 mg/ml; Multiplier = 8) gewählt.

Um die Vergleichbarkeit sicherzustellen wurden folgende Einflussgrößen in Anlehnung an Sulyok et al. (1) strikt vorgegeben.

HPLC: Phasentyp, Säulendimension (4,6 * 150 mm; 5 µm), Flussrate (1 ml/min), Injektionsvolumen (5 µl), Laufmittelzusammensetzung mit 5 mM Ammoniumacetat und Gradient.

MS: Precursor-Ionen.

Um kein System zu benachteiligen, wurden die Ionenübergänge als präferierte Vorschläge definiert. D.h. die Vorläuferionen waren vorgegeben, hinsichtlich der 2 notwendigen Produktionen bestanden Variationsmöglichkeiten zu intensiveren Signalen bzw. besseren S/N-Verhältnissen. Die Quantifizierung musste mit einem spezifischen SRM durchgeführt werden.

Die Analytenzahl wurde auf folgende 17 Mykotoxine eingeschränkt (in Elutionsreihenfolge): Nivalenol, Deoxynivalenol, Fusarenon-X, 15-Acetyldeoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, Monoacetoxyscirpenol, Aflatoxin G2, Aflatoxin G1, Aflatoxin B2, Diacetoxyscirpenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1, HT-2 Toxin, T-2 Toxin, Fumonisin B2, Zearalenon, Ochratoxin A.

Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Matrixeffekt

Eine ausreichend konzentrierte Standardlösung (Mischung aller 17 Zielanalyten mit 1 – 20 µg/ml, je nach Analyt) wurde in Acetonitril bereitgestellt. Damit sollten durch entsprechende 1 : 5 - Verdünnung Kalibrierstandards hergestellt werden, deren Konzentrationen sich jeweils so oft auf ein Fünftel des vorherigen Levels reduzieren, bis kein qualifiziertes Signal (bestätigt durch Qualifier) mehr erzielt wird (LOQ). Daraus resultiert die Kalibrierkurve der sogenannten LM-Kalibrierung (ohne Matrixeinfluss). Eine ebenfalls mitgelieferte Rohextraktmischung von ausgewählten Toxin-freien Matrizes (Mischung aus Maisgrieß, Cornflakes und Mischfuttermittel) stellte die durchschnittliche Routinematrix dar. Sie wurde als Blank vermessen und diente zur Verdünnung des o.g. Mischstandards. Analog zur LM-Kalibrierung sollte damit unter Matrixeinfluss die sog. Matrix-Kalibrierkurve mit den korrespondierenden Levels gleicher Konzentration erstellt werden. Zusätzlich mussten noch 3 unterschiedlich dotierte Rohextrakte mit Maisgrieß, Cornflakes und Mischfuttermittel direkt gegen die LM-Kalibrierung vermessen werden.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mussten abschließend alle Messungen noch einmal wiederholt (WH-Inj.) werden, sodass sich folgende Sequenz mit nur ca. 32 - 35 Injektionen ergab:

1. LM-Kalibrierungs-Standards
2. Matrix-Kalibrierungs-Standards
3. Drei unbekannte, dotierte Rohextrakte
4. WH-Inj. der LM-Kalibrierungs-Standards
5. WH-Inj. der Matrix-Kalibrierungs-Standards
6. WH-Inj. der drei dotierten Rohextrakte

Die relevanten Messdaten aller Übergänge wurden von den Demo-Labors in vordefinierte Excel-Listen exportiert und vom Autor zentral ausgewertet. Für die S/N-Berechnungen wurde die „Peak-to-Peak“-Methode vorgeschrieben und der jeweilige Signalbereich gekennzeichnet.

Ergebnisse

Trotz des sehr Ressourcen-schonenden Konzepts können für jedes Gerät bei jedem Mykotoxin folgende Informationen gewonnen werden:

- Bestimmungsgrenze mit und ohne Matrix (S/N=10)
- Linearität mit und ohne Matrix
- Steigung der Kalibriergeraden mit und ohne Matrix
- Matrixeffekt (Quotient der Steigerungen)
- Reproduzierbarkeit (aus der Wiederholung aller Kenngrößen)

Nach Ermittlung der Bestimmungsgrenze (BG) aller Analyten wurden zur Beurteilung der Gesamtsensitivität jedes Gerätes zwei Ansätze gewählt.

Bei der Normierung auf Standardnormalverteilung wird bei jedem einzelnen Analyten ein BG-Mittelwert von 0 und eine Varianz von 1 über alle 4 Geräte angestrebt. Die Summe der einzelnen Analyt-BGs jedes Herstellers sind in Abb. 1 gegenübergestellt. Je weiter ein Gerät nach unten (links; Minusbereich) vom Hersteller-Mittelwert abweicht, desto nachweisstärker ist es.

Der zweite Ansatz zur Beurteilung berechnet das Verhältnis der einzelnen BGs zu den dzt. niedrigsten Grenzwerten (zB Säuglinge/Kleinkinder) bzw. Richtwerten. Darüber hinaus berücksichtigt eine Gewichtung von 1 bis 10 die „Wichtigkeit“ der einzelnen Mykotoxine hinsichtlich gesetzlicher Regelungen und Vorkommen. Die resultierenden gewichteten Substanz-Kennzahlen wurden für jedes System summiert und in Tabelle 1 auf das jeweils schwächste Gerät (Kennzahl 1) bezogen.

Die Tabellenwerte geben so direkt an, dass zB das Modell „A“ ohne Matrix rund die 20-fache bzw. unter Matrix-Belastung die ca. 19-fache Nachweisstärke gegenüber dem jeweils unempfindlichsten Gerät aufweist. Wie stark sich die Matrix durch Reduktion der durchschnittlichen Empfindlichkeit auswirkt, zeigt die 3. Zeile.

Durch unterschiedliche Kalibriergeraden–Steigungen (Abb.2) erkannte Matrix-Effekte (>10%) sind in Tab. 2 aufgelistet.

Im Streben nach steigender Sensitivität ist eine ständige Verbesserung der Selektivität notwendig, um gerade bei hochempfindlicher Betriebsweise die Vielzahl von Störsignalen erfolgreich zu unterdrücken. Verschiedene technische Ansätze wie „MRM³“, „FAIMS“ und „H-SRM“ sollen dieses wichtige Zielkriterium steigern helfen. Bei den Testmessungen wurde den Herstellern freigestellt, die Leistungsfähigkeit dieser stark propagierten Hilfsmitteln - in eigenen, parallelen Messserien - für die Mykotoxinanalytik unter Beweis zu stellen. Es wurden jedoch keine Messdaten für einen Vergleich retourniert.

Hinweis: Die Ergebnisse der Geräte sind anonymisiert dargestellt – für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an den Autor.

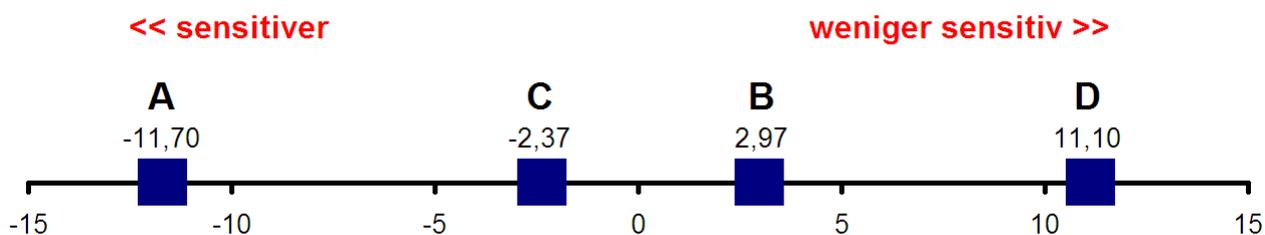
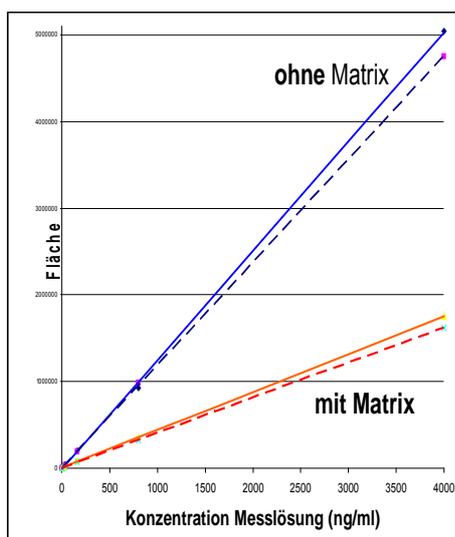


Abb.1: Vergleich der Nachweisempfindlichkeiten der 4 Systeme nach Normierung auf Standardnormalverteilung

Tab.1: Sensitivitätskennzahlen

	A	B	C	D	Hinweis
ohne Matrix	20,2	3,2	1,6	1,0	größer = besser
mit Matrix	19,3	2,5	1,0	1,3	größer = besser
Sensitivitätsverlust durch Matrix	19%	32%	48%	-7%	0 = ideal

(bezogen auf Grenzwerte; gewichtet; summiert; normiert auf den Unempfindlichsten)



	A	B	C	D			
starke ME (>30 %)	NIV	-65	Afla G2	-32	Fumo B2	100	keine Daten
	ZON	-25	Afla G1	-26	OTA	-19	
mittlere ME (10 - 30%)	Fus X	-13	HT-2	-26	Afla G1	-19	
			ZON	-25	Fus X	-18	
			Afla B2	-24	HT-2	-17	
			Afla B1	-11	T-2	-14	
					Fumo B1	-12	
					3AcDON	-12	

Tab.2: Matrix-Effekte verschiedener ESI-Quellen (in %)

Abb.2: Kalibrierkurven von Nivalenol zeigen gute Reproduzierbarkeit und einen ausgeprägten Matrixeffekt („Ion Suppression“)

Literatur

1) Michael Sulyok, Franz Berthiller, Rudolf Krska and Rainer Schuhmacher: „Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize,“; Rapid Communications in Mass Spectrometry 20: 2649–2659; 2006

Autor:

Wolfgang BRODACZ, AGES Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz; Wieningerstraße 8, A4020 Linz; Email: wolfgang.brodacz@ages.at

T-2 Toxin und HT-2 Toxin in ausgewählten Lebensmitteln

T-2 Toxin and HT-2 Toxin in Foodstuffs

W. BRODACZ

Summary

The contamination of austrian foodstuffs with T-2 toxin and HT-2 toxin is shown for the years 2009 and 2010. Special importance is given to foodstuffs based on oat.

Key words

T-2 Toxin; HT-2 Toxin; Foodstuffs; Isotope dilution analysis;

Zusammenfassung

Es wird die Belastungssituation von österreichischen Lebensmitteln der Jahre 2009 und 2010 mit T-2 Toxin und HT-2 Toxin dargestellt. Besondere Bedeutung haben dabei Haferprodukte.

Schlüsselwörter

T-2 Toxin; HT-2 Toxin; Lebensmittel; Isotopenverdünnungsanalytik

Einführung

T-2 Toxin und HT-2 Toxin sind Mykotoxine der Gruppe Trichothecene (Typ A) und zählen zu den Fusarientoxinen mit den höchsten toxikologischen Gefahrenpotentialen.

Hauptsächlich von *Fusarium langsethiae*, *F. sporotrichoides* bzw. *F. poe* gebildet, kommen sie bevorzugt in Hafer, aber auch in Gerste vor. Weizen, Durum und Mais sind meist deutlich geringer kontaminiert. Während bei Hafer die Wintervariante höher belastet ist als Sommerhafer, zeigt die Sommergerste meist höhere Gehalte als Wintergerste. Die oft sehr hohen Kontaminationen von Hafer können durch Entspelzen um ca. 70 – 95% reduziert werden.

Obwohl die EU noch keine gesetzlichen Höchstwerte beschlossen hat, ist die regelmäßige Kontrolle von T-2 - und HT-2 Toxin in Lebensmitteln von besonderer Wichtigkeit. Daher wurde im AGES Kompetenzzentrum Cluster Chemie eine selektive und sensitive MS-Methode entwickelt und in den Jahren 2009 und 2010 ausgewählte österreichische Lebensmittel (Mehle, Müslis, Dauerbackwaren und Biere) auch auf diese gefährlichen Mykotoxine untersucht. Im Rahmen der Schwerpunktaktion (A-034-09) „T-2/HT-2 Toxin in Hafer und Haferprodukten“ wurde zusätzlich mittels 106 Proben (60% konventioneller Anbau; 40% biologischer Anbau) eine Aufnahmeabschätzung von der AGES durchgeführt. (Schlussbericht: R. Kapeller und S. Narath; AGES).

Methode (Isotopenverdünnungs-GC/MS)

Um für den zu erwartenden niedrigen EU-Summengrenzwert gerüstet zu sein, wurde 2007 eine nachweisempfindliche GC/MS-Methode für T-2 Toxine und HT-2 Toxine entwickelt. Das Verfahren wurde so gestaltet, dass bei der Extraktion und dem ersten clean up - Schritt (SPE) auch die Gruppe der B-Trichothecene erfasst wird. Sie werden mit einer kostengünstigen GC-Methode vermessen. Zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit und Steigerung der Selektivität werden die A-Trichothecene zusätzlich über eine sogenannte Immunoaffinitätssäule (IAC) hochspezifisch gereinigt. Nach Silylierung mit MSTFA erfolgt die GC/MS-Bestimmung (Abb.1).

Für eine möglichst robuste und sensitive Quantifizierung wurde die Stabilisotopenverdünnungs-GC/MS gewählt („Königsklasse der Quantifizierung“).

Isotopenmarkierte Zielanalyten sind die idealen internen Standards in der massenspektrometrischen Mykotoxinanalytik. Besonders die jeweils vollständig ¹³C-markierten Toxine zeichnen sich durch praktisch gleiche physikalisch/chemische Eigenschaften, verglichen mit den nativen Toxinen, aus. Als deren ideale interne Standards sofort nach der Extraktion eingesetzt, kompensieren sie zuverlässig alle Schwankungen und Verluste der gesamten Analysenmethode. Die selektive Messung von je 3 diagnostischen Ionen/Zielanalyten erfüllt die EU-Richtlinie und resultiert in einer Bestimmungsgrenze von rund 4 µg/kg für T-2 Toxin bzw. HT-2 Toxin (Nachweisgrenze: 1,5 µg/kg). Abbildung 2 zeigt die hohe Selektivität und Sensitivität der Isotopenverdünnungsmethode am Beispiel einer natürlich kontaminierten Gerste.

Ergebnisse

Da Gerste bei Routineuntersuchungen immer wieder als kontaminiert auffällt, wurde die Analysenmethode für Bier adaptiert (Nachweisgrenze: 1 bzw. Bestimmungsgrenze: 3,3 µg/kg). Mit 26 Bier-Proben aus verschiedensten Sorten (Alkoholfrei; Leichtbier; Märzen; Lager; Pils; Bio; Zwickel; Spezial; Weizenbier hell / dunkel / klar / trüb; Doppel-Malz etc.) und Marken wurden die wichtigsten Produkte am Markt abgedeckt. Es konnten keine Belastungen quantifiziert werden.

Die Summenbelastungen von Mehl, Müsli, Dauerbackwaren, sonstigen Lebensmitteln und Braumalz mit den Häufigkeitsklassen „<1,5“ (nicht nachweisbar); „1,5 – 4,5“ (NG - BG); „4,5 – 10“; „10 - 20“ und „>20“ µg/kg“ sind in Tab. 1 reinen Haferprodukten gegenübergestellt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese Warengruppen im Vergleich zu Hafer sehr gering belastet sind, wobei Müslis vermutlich aufgrund des Haferflockenanteils etwas höhere Gehalte zeigen.

Die Auswertung der Hafer-Schwerpunktaktion lässt folgende Schlüsse zu:

- Haferprodukte am österreichischen Markt sind deutlich mit T-2 - und HT-2 Toxinen belastet. Die Gegenüberstellung in Abb. 3 zeigt neben den Gehaltsbereichen auch ein relativ konstantes Verhältnis von ca. 3 zwischen HT-2 und T-2.

- Das männliche User-Kollektiv (männlich, 70 kg, median 50 g/d) schöpft die tolerierte Tagesdosis (TDI) zu 23% aus. Bei Vorschülern (20 kg, median 10 g/d) besteht eine TDI-Ausschöpfung von 16 %.
- Es zeigt sich eine deutliche Belastungssituation alleine von Haferprodukten.
- Produkte aus biologischem Anbau weisen trotz ähnlich hoher Spitzenwerte eine signifikant geringere mittlere Belastung auf.
- Regelmäßige Kontrolluntersuchungen werden als notwendig erachtet.

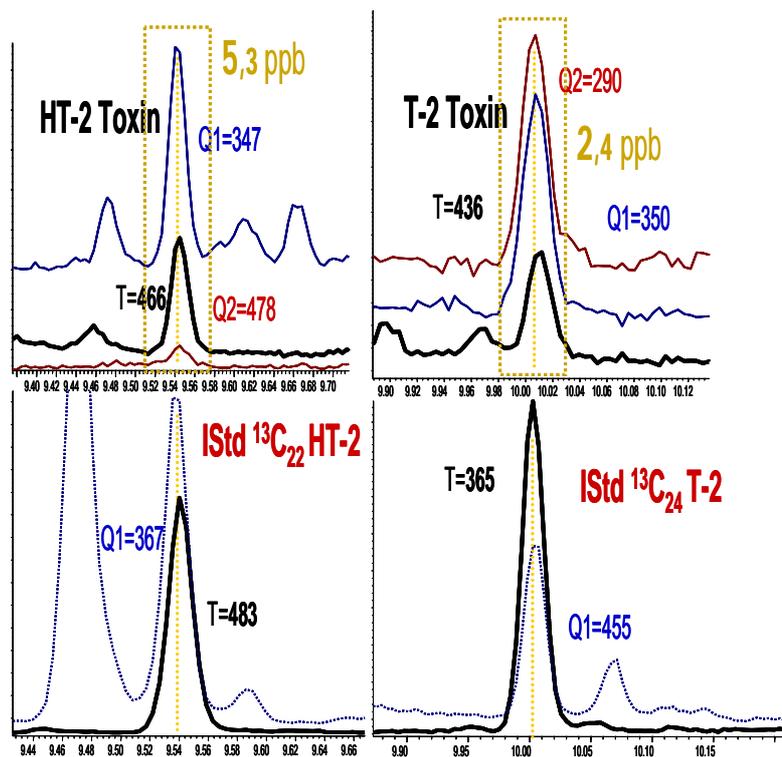
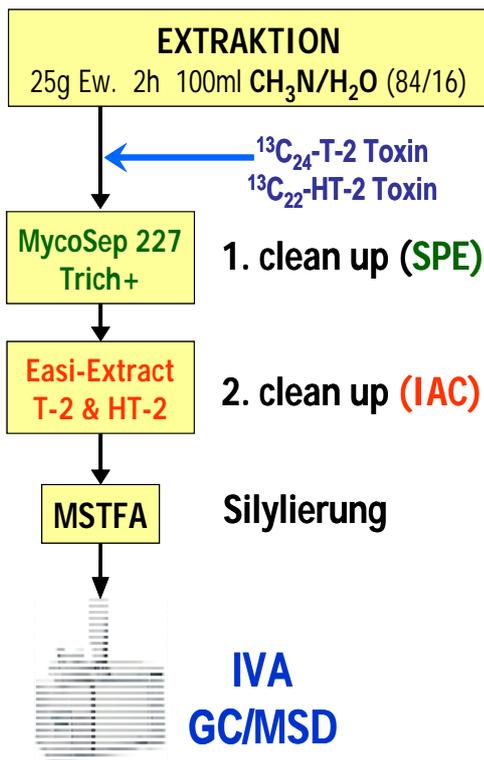


Abb. 1: Methodenschema

Abb. 2: SIM-Chromatogramme (Gerste)

	Anzahl Proben	Klasseneinteilung (µg/kg)					Maximal-Wert (µg/kg)
		nicht nachweisbar < 1,5 (NG)	NG - BG 1,5 - 4,5	4,5 - 10	10 - 20	> 20	
Braumalz	10	40%	20%	40%			6,6
Dauerbackwaren	103	84%	12%	3%	1%		11,4
Mehl	12	84%	8%	8%			6,9
Müsli	10	30%	30%	20%	20%		14,7
sonst. Lebensmittel	4	75%		25%			5,0
Haferprodukte	124	6%	11%	17%	27%	39%	56,8

Tab. 1: Belastung von Braumalz u. Lebensmitteln (Summe T-2 – u. HT-2 Toxin; Stand: Okt. 2010)

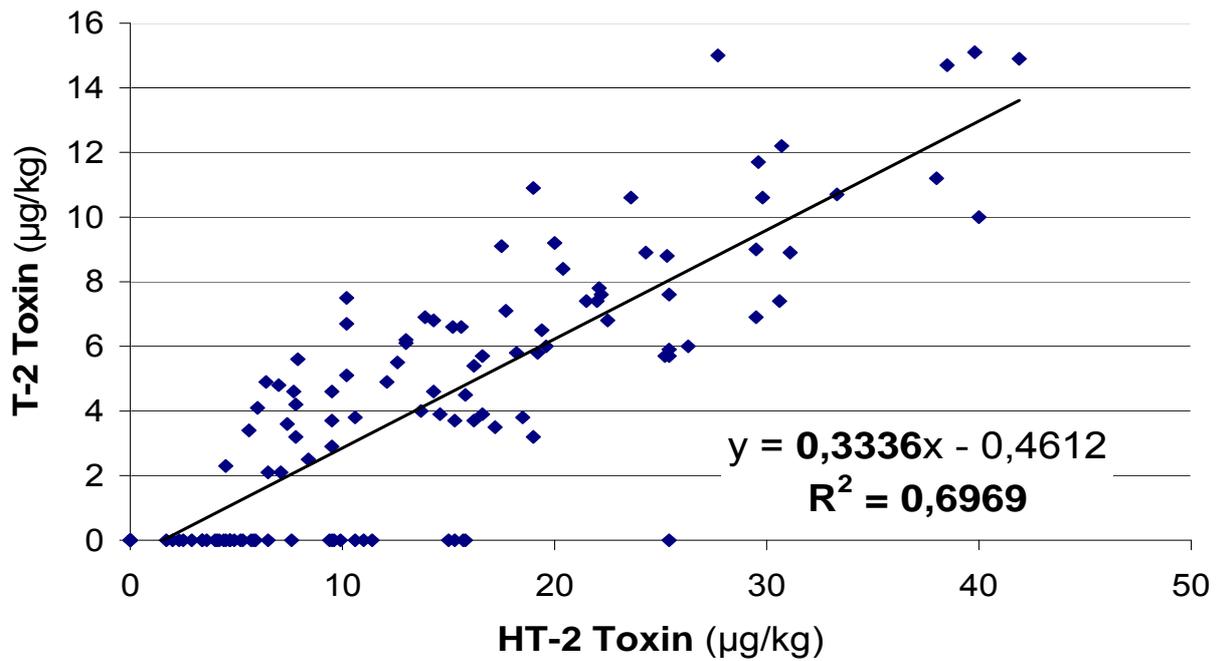


Abb. 3: T-2 Toxin u. HT-2 Toxine in Haferprodukten (n=124)

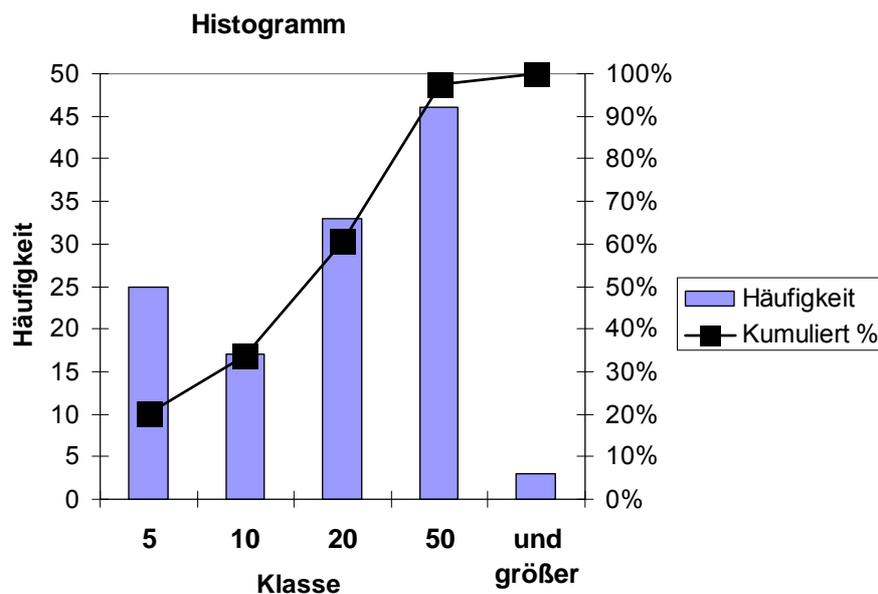


Abb. 4: Verteilung der Summenbelastung von T-2 Toxin u. HT-2 Toxin in Haferprodukten (n=124)

Literatur

R. Kapeller, S. Narath; „Schwerpunktaktion A-034-09 T-2/HT-2 Toxin in Hafer und Haferprodukten – Monitoring“; AGES-Bericht Feb. 2010

Autor:

Wolfgang BRODACZ, AGES Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz; Wieningerstraße 8, A4020 Linz ; Email: wolfgang.brodacz@ages.at

Das Auftreten von Mykotoxinen in europäischen Futtermittelproben im Jahr 2010

Occurrence of mycotoxins in European feed samples in 2010

CLAUDIA UNBEKANNT, KARIN NAEHRER

Summary

Mycotoxins emerge in diverse agricultural commodities from different areas of the world and are considered as one of the most dangerous contaminants of food and feed. In spite of the implementation of preventive strategies it is not always possible to avoid mycotoxin contamination of crops and forages. Thus regular control of mycotoxins in feed is essential to prevent severe health problems in animals. Within the BIOMIN *Mycotoxin Survey Program 2010* the occurrence of mycotoxins in different feedstuffs was investigated. The mycotoxins deoxynivalenol (DON), fumonisins (FUM), ochratoxin A (OTA), aflatoxins (Afla) and zeralenone (ZON) were detected in 55%, 31%, 26%, 18% and 15% of all analyzed samples, respectively. The average contamination with Afla (1 µg/kg) and OTA (34 µg/kg) was quite low, whereas high levels of the *Fusarium*-toxins ZON (average 109 µg/kg), DON (average 962 µg/kg) and FUM (average 2894 µg/kg) were determined. Mycotoxin contamination of the analysed samples varied among geographical regions (Northern, Central and Southern Europe). The frequent occurrence of mycotoxins in the surveyed samples shows the necessity of mycotoxin-control in feed in order to protect animal health.

Keywords: Mycotoxins, Europe, occurrence

Zusammenfassung

Mykotoxine treten in den verschiedensten landwirtschaftlichen Produkten aus unterschiedlichen Regionen der Welt auf und zählen zu den gefährlichsten Gifte in Futter- und Lebensmitteln. Trotz der Anwendung von präventiven Methoden ist es nicht immer möglich eine Kontamination von Anbaupflanzen und Futter mit Mykotoxinen zu verhindern. Die regelmäßige Kontrolle von Mykotoxinen im Futtermittel ist daher essentiell, um gesundheitliche Probleme der Tiere zu vermeiden. Im Rahmen des BIOMIN *Mycotoxin Survey Program 2010* wurde das Auftreten von Mykotoxinen in unterschiedlichen Rohstoffen und Futtermitteln untersucht. Die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON), Fumonisine (FUM), Ochratoxin A (OTA), Aflatoxine (Afla) und Zeralenon (ZON) wurden in 55%, 31%, 26%, 18% bzw. 15% aller analysierten Proben detektiert. Während die durchschnittlichen Afla- und OTA-Konzentrationen mit 1 µg/kg bzw. 34 µg/kg eher gering waren, war die durchschnittliche Belastung mit den *Fusarien*-Toxinen ZON (109 µg/kg), DON (962 µg/kg) und FUM (2894 µg/kg) sehr hoch. Die Kontamination mit Mykotoxinen unterlag dabei regionalen Schwankungen (Nord-, Zentral- und Südeuropa). Die Häufigkeit der Mykotoxine in den analysierten Proben zeigt die Notwendigkeit Futtermittel regelmäßig auf das Vorhandensein von Mykotoxinen zu überprüfen, um die Gesundheit der Tiere zu schützen.

Schlüsselwörter: Mykotoxine, Europa, Vorkommen

Einleitung

Mykotoxine sind toxische, sekundäre Stoffwechselendprodukte, welche von Pilzen beim Befall von Getreidepflanzen und Futter gebildet werden. Aufgrund unterschiedlicher Strukturen sind diese Pilztoxine fähig diverse akute Symptome und auch schwerwiegende Krankheiten beim Tier hervorzurufen. Dies führt zu einer Verringerung der Produktivität und zu immensen ökonomischen Verlusten. Obwohl bereits Methoden zur Prävention von Schimmelpilzwachstum und der Bildung von Mykotoxinen entwickelt wurden, sind Mykotoxinkontaminationen noch weit verbreitet.

Ziel der vorliegenden Studie ist es das Vorkommen von Mykotoxinen in europäischen Futtermittelrohstoffen und Produkten aus dem Jahr 2010 näher zu untersuchen.

Material und Methoden

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden von Jänner bis Juni 2010 insgesamt 326 verschiedene Proben (Gerste, Mais, Soja, Futter, Silage, etc.) auf die für die Landwirtschaft relevantesten Mykotoxine getestet. Die Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bzw. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde in Kooperation mit Romer Labs Diagnostic GmbH durchgeführt. Für die Datenauswertung waren folgende Nachweisgrenzen der Testmethoden für die einzelnen Mykotoxine zu beachten:

Aflatoxine < 0.5 µg/kg (HPLC) bzw. < 1 µg/kg (ELISA); Zearalenon < 10 µg/kg (HPLC) bzw. < 40 µg/kg (ELISA); Deoxynivalenol < 50 µg/kg (HPLC) bzw. < 250 µg/kg (ELISA); Fumonisine < 25 µg/kg (HPLC) bzw. < 250 µg/kg (ELISA); Ochratoxin A < 1 µg/kg (HPLC) bzw. 2 < µg/kg (ELISA).

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Mykotoxinanalysen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. 47% der getesteten Proben waren mit zumindest einem Mykotoxin kontaminiert. Die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON), Fumonisine (FUM), Ochratoxin A (OTA), Aflatoxine (Afla) und Zeralenon (ZON) wurden in 55%, 31%, 26%, 18% bzw. 15% aller analysierten Proben nachgewiesen. Während die durchschnittlichen Afla- und OTA-Konzentrationen mit 1 µg/kg bzw. 34 µg/kg eher gering waren, war die durchschnittliche Belastung mit den *Fusarien*-Toxinen ZON (109 µg/kg), DON (962 µg/kg) und FUM (2894 µg/kg) sehr hoch. Bei den mit DON und FUM kontaminierten Proben konnten Höchstwerte von 26121 µg/kg bzw. 7260 µg/kg detektiert werden.

Der Vergleich der Ergebnisse der Proben aus den unterschiedlichen Regionen (Zentraleuropa, Nordeuropa und Südeuropa) zeigte, dass die Zusammensetzung der in den getesteten Proben vorkommenden Mykotoxine je nach Herkunft der Proben variierte. DON war in allen europäischen Regionen das am häufigsten auftretende Mykotoxin. In Nordeuropa konnte DON in 68% aller Fälle detektiert werden, während nur 5% bzw. 14% der Proben mit ZON bzw. OTA kontaminiert waren. 76% aller Proben stammten aus Zentraleuropa. Neben DON traten hier vermehrt Kontaminationen mit FUM (29% positive Proben) und ZON (16% positive Proben) auf.

OTA konnte bei 29% aller Proben nachgewiesen werden, lag jedoch nur in geringen Konzentrationen (durchschnittliche Konzentration 45 µg/kg) vor. Das größte Problem in Südeuropa waren Kontaminationen mit DON und FUM mit 47% bzw. 38% positive Proben. Die Häufigkeit von Aflatoxin-kontaminierten Proben war hier am höchsten, wobei die vorliegenden Konzentrationen sehr niedrig waren.

Tabelle 1: Ergebnisse der Mykotoxinanalyse

Europa gesamt	Afla [ug/kg]	ZON [ug/kg]	DON [ug/kg]	FUM [ug/kg]	OTA [ug/kg]
Gesamtanzahl getesteter Proben	28	241	313	42	42
Positive Proben	5	36	173	13	11
% Positive	18	15	55	31	26
Mittelwert positive Proben (µg/kg)	7	109	962	2894	34
Maximum(µg/kg)	18	655	26121	7260	331
Nordeuropa	Afla [ug/kg]	ZON [ug/kg]	DON [ug/kg]	FUM [ug/kg]	OTA [ug/kg]
Gesamtanzahl getesteter Proben	3	42	40	0	7
% Positive	0	5	68	-	14
Mittelwert positive Proben (µg/kg)	-	50	704	-	6
Zentraleuropa	Afla [ug/kg]	ZON [ug/kg]	DON [ug/kg]	FUM [ug/kg]	OTA [ug/kg]
Gesamtanzahl getesteter Proben	17	176	239	34	28
% Positive	12	16	54	29	29
Mittelwert positive Proben (µg/kg)	1	120	1049	2449	45
Südeuropa	Afla [ug/kg]	ZON [ug/kg]	DON [ug/kg]	FUM [ug/kg]	OTA [ug/kg]
Gesamtanzahl getesteter Proben	8	23	34	8	7
% Positive	38	26	47	38	29
Mittelwert positive Proben (µg/kg)	11	80	687	4379	1

Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie über das Auftreten von Mykotoxinen in Futtermittelrohstoffen und Produkten zeigte, dass das Risiko einer Kontamination mit Mykotoxinen allgegenwärtig ist. Das *Fusarium*-Mykotoxin DON war das am häufigsten auftretende Mykotoxin. Es konnten Konzentrationen bis zu einem Höchstwert von 26121 µg/kg detektiert werden. Weiters konnten auch beträchtliche Mengen an FUM (Mittelwert 2894 µg/kg) und ZON (Mittelwert 109 µg/kg) festgestellt werden. Dahingegen spielt die Kontamination mit OTA und Afla in Europa nur eine minimale Rolle. Nur geringe Konzentrationen wurden in den Proben nachgewiesen.

Die Proben aus den verschiedenen Regionen Europas (Zentraleuropa, Nordeuropa und Südeuropa) wiesen eine unterschiedliche Zusammensetzung an Mykotoxinen auf. Während zum Beispiel in Nordeuropa hauptsächlich Kontaminationen mit DON auftraten, wurden in Südeuropa neben DON vermehrt Aflatoxine in den Proben detektiert. Diese regionalen Schwankungen sind auf unterschiedliche Witterungsbedingungen und somit unterschiedliche Wachstumsbedingungen für Schimmelpilze zurückzuführen. Die Häufigkeit der verschiedenen Mykotoxine in Rohstoffen sowie Produkten zeigt die Notwendigkeit Futtermitteln regelmäßig zu kontrollieren um das Risiko einer Intoxikation der Tiere zu vermindern.

Autoren:

Claudia UNBEKANNT, BIOMIN Research Center, Technopark 1, 3430 A-Tulln und

Karin NAEHRER, BIOMIN Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 A-Herzogenburg

Schimmelpilzbestimmung in einem Weinkeller vor und nach Sandabstrahlung

Mould Identification in a Wine cellar before and after Sandblasting

KARIN MANDL, DANIELA SCHATTAUER, H. SCHÖDL

Keywords: sandblasting, wine cellar, fungi
Sandabstrahlung, Weinkeller, Pilze

Zusammenfassung:

Um festzustellen, ob die Schimmelbelastung in einem Weinkeller mittels Sandabstrahlung vermindert werden kann, wurden in einem Versuchskeller vor und nach der Sanierung Luftkeimsammlungen durchgeführt. Dabei wurden die im Keller vorkommenden Schimmelpilzgattungen bestimmt und deren Auftreten verglichen. Dabei zeigte sich, dass nach der Sandabstrahlung die Gesamtkeimzahl der Luft deutlich angestiegen ist, was auf das Aufwirbeln der Luft und die Stressreaktionen der Schimmelpilze zurückzuführen ist. Die dominierende Gattung im Weinkeller ist *Penicillium*. Auch konnte eine deutliche Verschiebung in der Artenvielfalt festgestellt werden. So waren vor der Sanierung deutlich mehr verschiedene Schimmelpilzgattungen in der Luft feststellbar als nach der Sanierung.

Summary:

In an experimental-cellar air-samples were taken to show the effect of sandblasting. In this trial we looked at the amount of fungal colonies by taking air samples to see if the air quantity changed. The samples were collected before and after renovation to detect the appearance of different kinds of mould.

After sandblasting the bioburden was considerable higher than before, which may have been caused by the increase in dust and stress of the fungi through sandblasting. Both before and after renovation, the dominate species of mould was *Penicillium* spp. The results of the trial show that sandblasting a cellar causes an adjustment in the biodiversity of mould species. Before manipulation we observed more species in the air than after sanitation.

Einleitung:

Die Pilzbelastung in Weinkellern wird ein immer größeres Thema. Da die Kellerräume oftmals vom Winzer als Verkostungsräume bzw. für Veranstaltungen verwendet werden möchten, wird auch hier angestrebt, den Bewuchs mit Schimmel (z.B.: Kellertuch) dauerhaft zu reduzieren.

Um feststellen zu können ob es möglich ist den Keller zu sanieren, ohne dabei das für die Weinproduktion optimale Kellerklima (Luftfeuchtigkeit, Temperatur) stark zu verändern, wurden in einem Versuchskeller Luftkeimsammlungen vor und nach der Sanierung durchgeführt.

Dies soll zeigen, ob es tatsächlich zu einem verminderten Auftreten von Schimmel kommt, oder ob bautechnische Veränderungen sowie Sandstrahlen keine Veränderungen der Schimmelbelastung mit sich bringen

Material und Methode:

Keller

Um den Versuchskeller zu sanieren, wurden die Kellerwände durch Sandstrahlung von der Schimmelpilzdecke gereinigt. Am Ende des Kellers wurde ein Sickerschacht angelegt durch den die Kellerluft in regelmäßigen Abständen abgepumpt wird. Um den Schimmelpilz auch auf Dauer von den Wänden fern zu halten, werden die Wände regelmäßig mit Vorlauf abgesprüht.

Probenahme:

Die Keimbelastung innerhalb des Weinkellers wurde mittels eines nach Impaktionsprinzip funktionierenden Luftkeimsammlers (MAS-100Eco; Merck KGaA) ermittelt. Für die Sammlung der Proben wurden Agarplatten mit Malzextraktagar nach Weidenböner 1 verwendet.

Das Probenvolumen betrug pro Luftkeimsammlung 20L und 50L mit jeweils einer Wiederholung. Um die Keimbelastung im Keller optimal zu erfassen wurden die Proben im hinteren (Probencode K2) sowie im vorderen (Probencode K1) Bereich des Kellers gesammelt. Der Luftkeimsammler wurde dabei in einer Höhe von 125cm im Keller platziert. Die erste Probenahme wurde vor der Sanierung im Juni 2008 durchgeführt, die zweite Probenahme im November 2008 nach der Sanierung. Nach einer 3tägigen Bebrütungsdauer bei Raumtemperatur wurden die Platten quantitativ ausgewertet

Anzucht und Isolierung der Luftkeimproben:

Nach Auszählung der Platten wurden einzelne Isolate aus den Pilzkolonien entnommen und auf Malzextraktagar nach Weidenböner angezüchtet. Nach einem Wachstum von 3-5 Tagen (je nach Stärke des Koloniewachstums) bei Zimmertemperatur, wurden sie mehrmals isoliert, bis eine Reinkultur gegeben war.

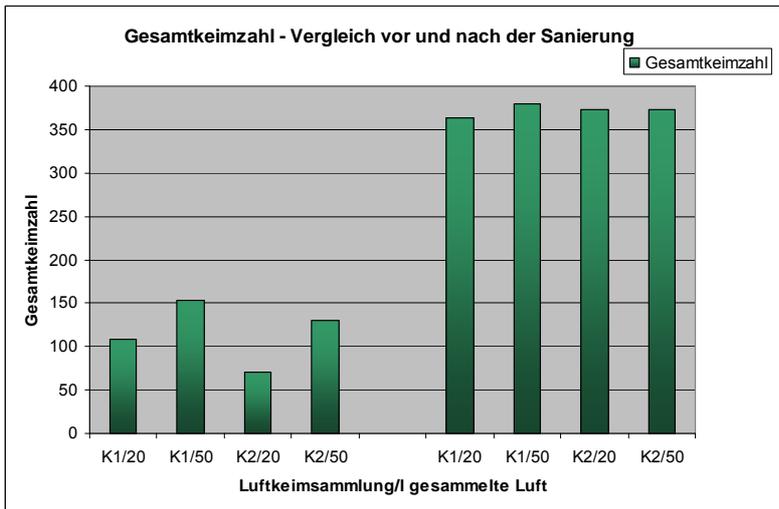


Diagramm1: Gesamtkeimzahl der Luftkeimsammlung, vor (li.) und nach (re.) der Sanierung
 K1= Kellerbereich vorne, K2= Kellerbereich hinten

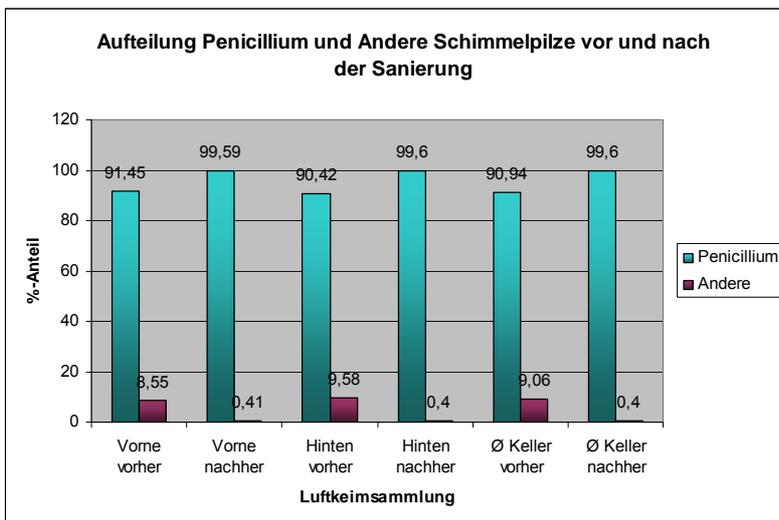


Diagramm2: %-Anteil (Gesamtkeimzahl) von *Penicillium* und anderen Gattungen vor und nach der Sanierung
 K1= Kellerbereich vorne, K2= Kellerbereich hinten

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Luftkeimsammlung vor und nach der Sanierung des Weinkellers zeigten, dass es zu einer drastischen Erhöhung der Gesamtkeimzahl in der Luft gekommen war. Ein Anstieg von bis zu 250% konnte verzeichnet werden. Siehe **Diagramm 1**.

Die Erhöhung der Luftkeimzahl kann damit erklärt werden, dass es während der Sanierung zu vermehrten Aufwirbelungen gekommen ist. Zusätzlich gerieten die Schimmelpilze im Weinkeller in eine durch die Klimaänderung und durch das Desinfizieren der Wände mit Alkohol hervorgerufenen Stress, was zur Folge hat, dass diese vermehrt Sporen bilden um die Art zu erhalten.

Auch beim Auftreten der unterschiedlichen Mikroorganismen konnte eine starke Veränderung festgestellt werden. Anhand von **Diagramm 2** ist ersichtlich, dass die vorherrschende Pilzgattung, vor wie nach der Sanierung, *Penicillium* ist. Während vor der Sanierung auch viele andere Pilzgattungen und auch Hefen auftraten, war nach der Sanierung eine geringere Gattungsvielfalt zu verzeichnen.

Literatur

1 „Lexikon der Lebensmittelmykologie“, M. Weidenböcker;2000; S.:96

2 Benson`s Microbiological Applications, Alfred Brown, 3. Auflage 2007, S.167 – 169

3 Journal of Clinical Mikrobiology, Sept. 1986, S. 460-461

4„Kellerwirtschaft“, Robert Steidl, 2001

Airborne fungal microflora of selected types of wine cellars in Austria, Clemenz A., Sterflinger K., Kneifel W., Mandl K., Mitteilungen Klosterneuburg 58, 2008; S.17 -22

Autoren

Karin MANDL, Daniela SCHATTAUER, H. SCHÖDL

LFZ für Wein- und Obstbau, Klosterneuburg

Ansprechpartner: Dr. Karin MANDL Karin.Mandl@weinobst.at

Suche nach neuen natürlichen Substanzen gegen *Fusarium graminearum*

Finding novel natural compounds against Fusarium graminearum

S. M. LEHNER, A. PARICH, A. KOUTNIK, R. KRŠKA, M. LEMMENS, R. SCHUHMACHER

Summary

Fusarium head blight disease (FHB) is a severe fungal infection on wheat. It can be caused by *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*), resulting in mycotoxin contamination and grain yield reduction. Mycotoxin contamination cannot be reliably reduced by the application of chemical fungicides. Therefore, it is of special interest to discover novel natural compounds with a specific effect to protect wheat plants against pathogen infection and mycotoxin contamination.

Microorganisms were isolated from their natural habitats, cultivated and tested for their biological activity (growth inhibition) against *F. graminearum*. Following a bioassay guided approach (using HPLC) and LC-HR-MS analysis, the study aims at the identification and characterization of active compounds against *F. graminearum* which might be used for the development of novel plant protection agents in the future.

Keywords: *Fusarium graminearum*, Fusarium Head Blight, biological activity, Orbitrap

Zusammenfassung

Ährenfusariose ("Fusarium Head Blight", FHB) ist eine Pflanzenkrankheit auf Getreide, v.a. Weizen, welche von *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*) verursacht wird und zur Kontamination des Getreides mit Mykotoxinen und einem reduziertem Ernteertrag führt. Die Belastung mit Mykotoxinen kann nicht verlässlich durch den Einsatz kommerzieller Pestizide reduziert werden. Daher ist es von Interesse neue, natürliche Substanzen zu entdecken, die die Weizenpflanze vor Pathogenbefall und damit einhergehender Mykotoxinbelastung schützen.

Dazu wurden Mikroorganismen von ihren natürlichen Habitaten isoliert, kultiviert und auf Aktivität (Wachstumshemmung) gegen *F. graminearum* getestet. Das Ziel des Projektes ist es, anhand eines Bioassay-geleiteten Ansatzes (mittels HPLC) und LC-HR-MS Analyse, aktive Substanzen mit Wirksamkeit gegen *Fusarium graminearum* zu identifizieren und zu charakterisieren, welche in Zukunft als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden können.

Schlüsselwörter: *Fusarium graminearum*, Ährenfusariose, biologische Aktivität, Orbitrap

Experimentielles

Im Zuge des Projektes wurden Mikroorganismen aus unterschiedlichen Lebensräumen (z.B. Weizenpflanzenteile, Boden...) isoliert und deren Kulturüberstände auf die biologische Aktivität gegen *Fusarium graminearum* getestet und bei Aktivität die Mikroorganismenart bestimmt. Dafür wurde ein Bioassay entwickelt, der zur Austestung der biologischen Aktivität aller Proben herangezogen wurde. Hierbei kommt ein *Fusarium graminearum*-Stamm zur Anwendung der konstitutiv GFP (green fluorescent protein) bildet, welches bei einer Anregungswellenlänge von

488 nm und einer Emissionswellenlänge von 526 nm mittels Fluoreszenzmessung (Typhoon Trio, GE Healthcare Life Sciences) bestimmt werden kann. Die Mikroorganismen wurden bei 25°C für 9 Tage und Schütteln (120 rpm) kultiviert. Die Lichtzufuhr wurde variiert: 24 Stunden Dunkelheit, natürlicher Tag/Nacht-Zyklus (ca. 14 Stunden Licht zum Kultivierungszeitraum) oder 24 Stunden Bestrahlung mit langwelligem UV (366 nm). Aktive, sterilfiltrierte Kulturfiltrate wurden entweder direkt mittels LC-MS analysiert oder zuvor mittels RP (reversed phase)-HPLC fraktioniert und nochmals auf Aktivität untersucht.

Fraktionierung mittels HPLC

Aufkonzentrierte (1 ml abgedampft (unter Stickstoffzufuhr bei 40°C), aufgenommen in 300 µl Methanol/Wasser (2/8)) Kulturfiltrate wurden mittels HPLC-UV-System inklusive Fraktionskollektor (Agilent 1200 Series) über eine RP-HPLC Säule (Hypersil Gold 50 x 2,1 mm, 1,9 µm; Gradient mit Wasser (A) und Methanol (B); Start mit 10 % B, linearer Gradient 40 Minuten auf 100 % B, halten bis Minute 42, Rückspülen auf 10 % B bis Minute 43 und halten bis Minute 60; 0,3 ml/min; 20 µl Injektionsvolumen) fraktioniert (zeitbasierende Fraktionierung, 180 Fraktionen zu je 0,25 Minuten). Pro Probe wurden 5 Injektionen in zwei 96-well Platten sowohl für die Aktivitätsbestimmung als auch für die Analyse mittels LC-MS gesammelt.

Messung mittels LC-MS

Sowohl die aktiven, sterilfiltrierten, unfraktionierten Kulturfiltrate als auch die aktiven RP-HPLC-Fraktionen (gelöst mit 300 µl Methanol/Wasser (2/8) je Kavität, geschüttelt bei 60 U/min für 2 Stunden) wurden auf einem ESI (Electrospray)-LTQ Orbitrap XL-System (Thermo Electron Corporation) gekoppelt an eine Accela HPLC (Thermo Electron Corporation) analysiert (Hypersil Gold HPLC Säule, 50 x 2,1 mm, 1,9 µm; Gradient mit Wasser (A) und Methanol (B), jeweils 0,1 % Ameisensäure; Start mit 10 % B, halten bis Minute 1, linearer Gradient bis Minute 11 auf 100 % B, halten bis Minute 12, Rückspülen auf 10 % B bis Minute 12,1 und halten bis Minute 15; 0,3 ml/min; 5 µl Probenschleife). MS-Parameter: positiver Modus, Sheath Gas 40 arbitrary units (arb), Aux Gas 5 arb, Sweep Gas 0 arb, Kapillartemperatur 300°C, Quellspannung 4 kV, Tube Lens 95 V, Full Scan, m/z 200-2000, max. Füllzeit 500 ms, AGC Zielwert $5 \cdot 10^5$.

Dabei wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen wurde, um bereits bekannte Metabolite aufzufinden, eine Datenbankabfrage (Laatsch, 2007) nach Mikroorganismen durchgeführt. Anschließend wurde nach den protonierten Molekülen der Datenbank-Treffer in den LC-MS-Chromatogrammen der unfraktionierten Kulturfiltrate gesucht. Dabei galten folgende Kriterien:

- EIC (Extracted Ion Current) Peak vorhanden (exakte Masse m/z $[M+H]^+ \pm 5\text{ppm}$).
- $[M+H]^+$ verifiziert durch mindestens ein Addukt (z.B. $[M+Na]^+$).
- EIC Peak im aktiven Kulturfiltrat zumindest um einen Faktor 10 intensiver als im inaktiven Kulturfiltrat.

Zum anderen wurden, zum Auffinden möglicher bislang unbekannter Metabolite, HPLC Fraktionen mittels LC-MS analysiert. Anschließend wurden aktive Fraktionen der Kulturfiltrate mit nicht-aktiven Fraktionen der Kulturfiltrate bzw. fraktioniertem Kulturmedium verglichen. Dafür kam die frei zugängliche Software xcms (Smith et al., 2006) zur automatisierten Auswertung der Rohdaten unter Verwendung des Peak-Detektions-Algorithmus *centWave* (Tautenhahn et al., 2008) zur Anwendung. Differentiell auftretende *m/z* Verhältnisse hatten folgende Kriterien zu erfüllen:

- $[M+H]^+$ verifiziert durch mindestens ein Addukt (z.B. $[M+Na]^+$).
- Intensität des $[M+H]^+$ größer 106 counts.

Da bei Massen größer 300 Da selbst eine Massengenauigkeit von 1 ppm nicht ausreicht um nur eine einzige Summenformel berechnen zu können (Kind und Fiehn, 2006), wurde zum Berechnen möglicher Summenformeln die „Seven Golden Rules“-Software verwendet (Kind und Fiehn, 2007), die sowohl Isotopenverhältnisse der ^{13}C Peaks relativ zum monoisotopischen Massenpeak, als auch weitere, heuristische, Regeln zur Anwendung kommen lässt. Ein Überblick des Analysenschemas ist in Abbildung 1 dargestellt.

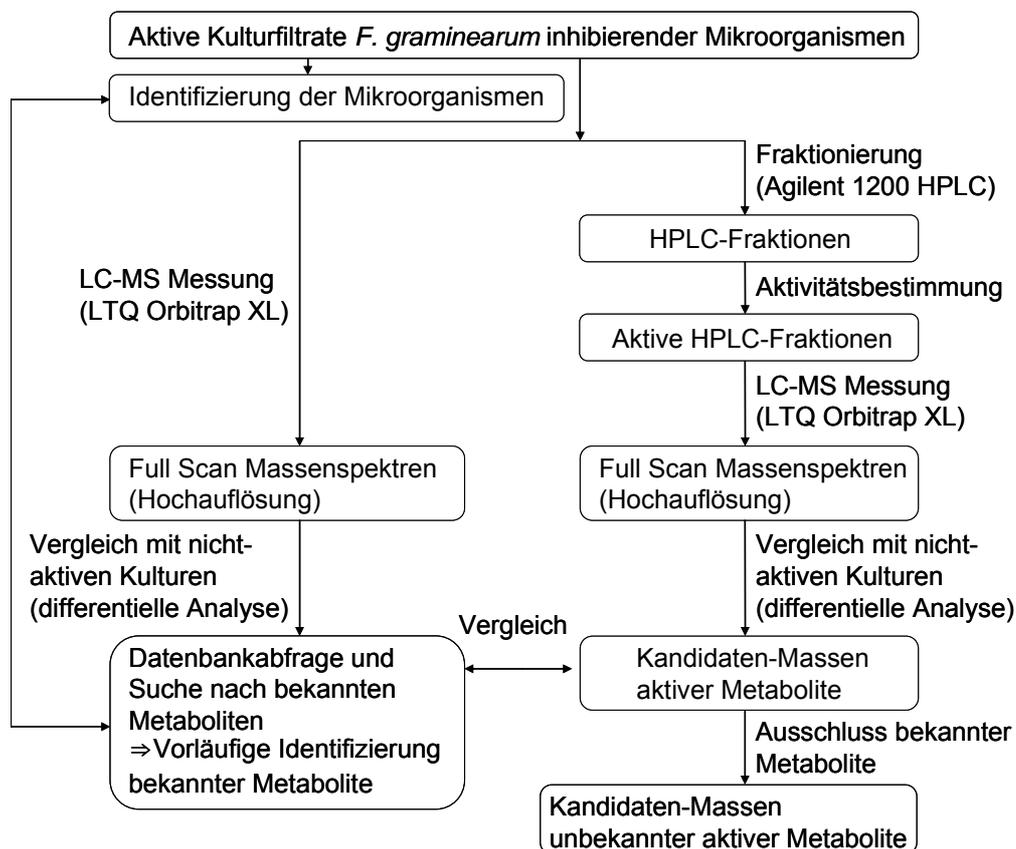


Abbildung 1. Analysenschema zum Auffinden neuer, aktiver Metabolite gegen *Fusarium graminearum*.

Anwendung des Analysenschemas zur Charakterisierung mikrobieller Kulturfiltrate

Mikroorganismen wurden, wie im experimentiellen Teil beschrieben, von ihren natürlichen Habitaten isoliert. Dabei zeigte ein aus 50 m tiefem Waldboden kultivierter Organismus hohe Aktivität gegen *F. graminearum*. Dieser wurde als *Penicillium brevicompactum* bestimmt.

Abbildung 2 zeigt den Vergleich zweier TIC (Total Ion Current)-Chromatogramme von Kulturfiltraten von *P. brevicompactum*. Die aktive Kultur wurde 24 Stunden UV-Beleuchtung ausgesetzt, während die nicht-aktive Kultur mit Tag/Nacht-Zyklus kultiviert wurde.

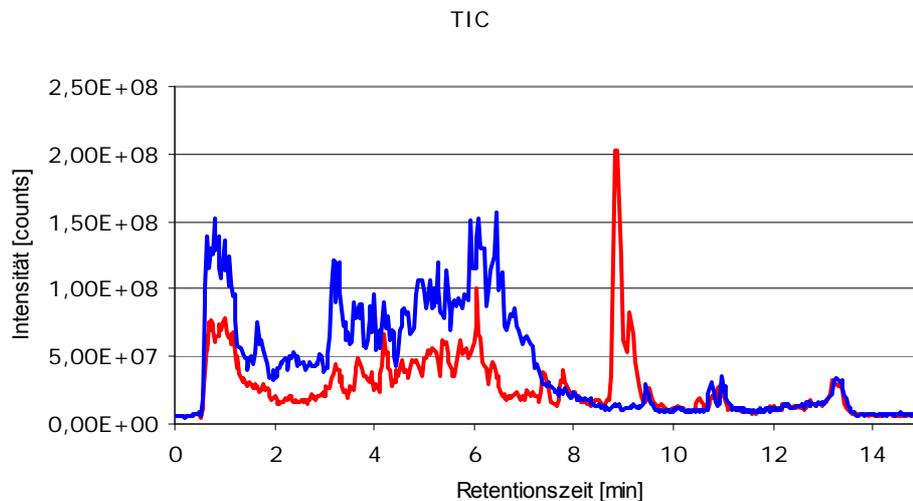


Abbildung 2. Vergleich der TIC (Total Ion Current)-Chromatogramme einer aktiven (Kultivierung bei 24 h UV-Bestrahlung) und einer nicht-aktiven Probe (Kultivierung mit Tag/Nacht-Zyklus) des selben Mikroorganismus.

Über das Verfolgen der ersten Strategie, dem Suchen nach Datenbank-Treffern im aktiven, unfraktionierten Kulturfiltrat, war es möglich folgende Substanzen nachzuweisen: 2,4-Dihydroxy-6-(1-hydroxyacetyl)benzoesäure, Brevigellin, N-Benzoyl-L-phenylalaninol, Mycophenolsäurediolacton, Mycochromensäure, N-Benzoylphenylalanin, Brevinamid E, (+)-Brevion D, Mycophenolsäure, Mycophenolsäureethylester, Brevicompanin C, (+)-Brevion C, Macrophorin A, (+)-Brevion A, (+)-Brevion B und Deacetylpebrolid (geordnet nach Retentionszeit).

Über die zweite verwendete Strategie, der Analyse aktiver HPLC-Fractionen, konnten einige der über die erste Strategie gefundenen Substanzen bestätigt werden. Darüber hinaus konnten differentiell auftretenden Massenspuren, die nicht durch bekannte Metabolite erklärt werden können, mögliche Summenformeln zugeordnet werden.

Ausblick

Das dargestellte Analysenschema zum Auffinden neuer, gegen *Fusarium graminearum* aktiver Substanzen soll weiter verfolgt und verbessert werden. Dabei soll auch über gezielte MS/MS Experimente weiter an der Aufklärung möglicher Wirkstoffkandidaten gearbeitet werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Land Niederösterreich und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) der Europäischen Union für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

Kind und Fiehn, 2006: Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, 7:234.

Kind und Fiehn, 2007: Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8:105.

Laatsch Hartmut, 2007: *Antibase 2007: The Natural Product Identifier*. Wiley-VCH Verlag GmbH, **ISBN-13:** 9783527319756, **ISBN-10:** 3527319751.

Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan, R., Siuzdak G., 2006: XCMS: processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779-787.

Tauthenhahn R., Böttcher C., Neumann S., 2008: Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* 9:504.

Autoren:

Sylvia M. LEHNER, Alexandra PARICH, Rudolf KRSKA, Rainer SCHUHMACHER, Analytikzentrum, Andrea KOUTNIK, Marc LEMMENS, Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

Bestimmung von Fumonisin und deren Hydrolyseprodukten in Schweinen –

Teil 1: Gewebeprobe

Determination of fumonisins and their hydrolysis products in pigs –

part 1: tissue samples

IRENE SCHÖNER, B. GRENIER, R. KRŠKA, G. SCHATZMAYR, ISABELLE P. OSWALD, W.-D. MOLL,

HEIDI SCHWARTZ

Summary

Fumonisin are toxic fungal metabolites poorly absorbed from the gastro intestinal tract. The aim of the work was to determine the concentrations of fumonisin B1 and its hydrolysis products in tissue samples (liver, kidney, lung) of pigs administered high concentrations of 2 mg FB1/kg body weight and to find out if the presence of fumonisins in tissues can be used as biomarker for fumonisin absorption into the animal body.

To this end, a method for determination of FB1 and HFB1 in tissue samples of piglets was developed, validated and applied to analysis of tissue samples collected in the course of a fumonisin feeding trial. The method included homogenisation of tissue samples, precipitation of proteins, concentration of the supernatant and analysis by RP-HPLC-MS.

Apparent recoveries of FB1 and HFB1 in tissue samples were between 66-79%. The limits of detection (LODs) in samples were 9 ng/g for FB1 and 5 ng/g for HFB1, limits of quantitation (LOQs) were 28 ng/g for FB1 and 23 ng/g for HFB1. Concentrations of FB1 in liver and kidney samples of 6 piglets fed 2 mg FB1/kg body weight by gavage for two weeks were mostly between the LOD and the LOQ. FB1 concentrations in lung were below the LOD in 5 piglets. Concentrations of HFB1 were below the LOD in all tissues of 5 pigs. However, one pig capable of hydrolysing FB1 in the GI tract to greater extent than the other pigs had greater tissue concentrations of FB1 and HFB1, ranging up to 43 ng/g FB1 and 55 ng/g HFB1 in liver. Still, use of tissue concentrations of FB1 and HFB1 as biomarker for fumonisin uptake is little promising, especially in the case of low dietary fumonisin concentrations.

Keywords: fumonisin B1, hydrolysed fumonisins, biomarkers, tissue samples, pigs

Zusammenfassung

Fumonisine sind toxische Sekundärmetabolite von Pilzen, welche nur schlecht aus dem Verdauungstrakt absorbiert werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Konzentrationen von Fumonisin B1 (FB1) und seinem Hydrolyseprodukt HFB1 in Gewebeprobe (Leber, Niere, Lunge) von mit 2 mg FB1/kg Körpergewicht behandelten Schweinen zu bestimmen und herauszufinden, ob die Gegenwart von Fumonisin in Geweben als Biomarker für die Absorption von Fumonisin in den Tierkörper verwendet werden kann.

Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur Bestimmung von FB1 und HFB1 in Gewebeproben von Schweinen entwickelt, validiert und zur Analyse von Gewebeproben, die im Laufe eines Fumonisin-Fütterungsversuches gesammelt wurden, angewandt. Diese Methode bestand aus Homogenisierung der Gewebeproben, Ausfällung der Proteine, Aufkonzentrierung des Überstandes und Analyse mittels RP-HPLC-MS.

Die scheinbaren Wiederfindungen in Gewebeproben lagen dabei zwischen 60 und 79% für FB1 und HFB1. Die Nachweisgrenze in den Proben betrug 9 ng/g für FB1 und 5 ng/g für HFB1, die Bestimmungsgrenze war 28 ng/g für FB1 und 23 ng/g für HFB1. Konzentrationen von FB1 in Leber und Niere von 6 Schweinen, welche oral mit 2 mg FB1/kg Körpergewicht für zwei Wochen gefüttert wurden, lagen meist zwischen der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. FB1-Konzentrationen in Lunge und HFB1-Konzentrationen in allen Geweben waren unter der Nachweisgrenze in 5 von 6 Schweinen. Allerdings gab es ein Schwein, das FB1 in größerem Ausmaß im Gastrointestinaltrakt hydrolysieren konnte als die anderen Schweine. Dieses hatte höhere Gewebekonzentrationen an FB1 und HFB1, die bis zu 43 ng/g FB1 and 55 ng/g HFB1 in Leber reichten. Dennoch ist die Verwendung von Gewebekonzentrationen an FB1 und HFB1 als Biomarker für Absorption von Fumonisinen besonders bei geringen Konzentrationen an Fumonisinen in der Nahrung wenig erfolgsversprechend.

Schlüsselwörter: Fumonisin B1, hydrolysierte Fumonisine, Biomarker, Gewebeproben, Schweine

Introduction

Fumonisins are toxic fungal metabolites produced by a number of *Fusarium* species. They were first described and characterized in 1998 (Bezuidenhout and Gelderblom, 1998). The most frequently occurring fumonisins are FB1, FB2 and FB3, FB1 being the most prevalent (Wild and Gong, 2010). Fumonisins are water soluble (Bennett and Klich, 2003) and poorly absorbed from the gastro intestinal tract. Partially and fully hydrolyzed forms of FB1 may be generated by hydrolytic action in the GI-tract (Fodor et al., 2007). Hence, the presence of FB1 and its hydrolysis products in faeces is an evidence for the exposure to fumonisins. However, it but does not give information about their absorption. Therefore, the concentrations of fumonisins and their hydrolysis products in plasma, tissue and urine samples are of interest. Because of the challenge in collecting urine samples from pigs, the expected low concentrations in plasma and the limited availability of plasma samples, tissue samples should be analysed for the presence of fumonisins and the suitability of fumonisin concentrations in tissue samples as biomarker for absorption of fumonisins should be evaluated.

The aim of this work was to develop and validate a method for determination of FB1 and HFB1 in tissue samples of piglets and to apply the developed method to analysis of tissue samples collected in the course of a fumonisin feeding trial with piglets.

Materials and Methods

Samples: Tissue samples (kidney, liver and lung) were collected at the end of a feeding trial with piglets (control group of six piglets fed basal diet; FB1 group of six piglets receiving 2 mg FB1, 0.8 mg FB2 and 0.2 mg FB3/kg body weight by gavage in addition to basal diet for two weeks), frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C.

Analytical method: Sample preparation methods described in the literature included homogenisation of tissue samples, extraction of fumonisins and purification/concentration of the supernatants (Riley and Voss, 2006). In this work, several parameters (sample size, volume of solvent, concentration procedure) were optimized in order to achieve high recoveries and low limits of detection. The optimized sample preparation and analysis method was as follows: Approximately 1 g of tissue was homogenized using an Ultra-Turrax in the fourfold amount of 50 mM K₂HPO₄-buffer solution. Subsequently, two 0.4 ml aliquots of the homogenate were extracted with 1.2 ml methanol/acetonitrile (50/50, v/v) in separate vials on a horizontal shaker for 30 minutes. After centrifugation of the mixture and washing of the pellets with 0.3 ml methanol/water (80/20, v/v), the supernatants were pooled. Subsequently, the extract was evaporated to dryness, taken up in 150 µl of acetonitrile/water (30/70, v/v) containing 13C-FB1 as internal standard and analysed by RP-HPLC-MS in gradient elution mode with mobile phases containing different percentages of methanol/water and 0.1% acetic acid. Mass spectrometric analysis was performed on a QTrap instrument after electrospray ionization in the positive Q1 multiple ions (selected ion monitoring) mode. Quantitative analysis was carried out on the basis of external calibration functions and included correction of the obtained tissue concentrations by the recovery. Validation of the method included determination of the limit of detection, limit of quantitation, apparent recovery, matrix effects and the recovery of the extraction step as described by Sulyok et al. (2007).

Results and Discussion

Validation of the method: The results of the validation are shown in **Table 1**. Recoveries of extraction ranged from 65 to 85% for FB1 and from 48 to 59% for HFB1. Due to mass spectrometric signal enhancement in the case of HFB1, apparent recoveries of HFB1 were between 60 and 75%.

Table 1: Validation of the sample preparation and analysis method

	Kidney		Liver		Lung	
	FB1	HFB1	FB1	HFB1	FB1	HFB1
Apparent recovery [%]	79	75	66	60	78	67
Recovery of extraction [%]	83	59	65	48	85	50
Signal suppression/enhancement [%]	96	127	101	126	92	133

Limits of detection in standard solutions were 0.01 mg/l for FB1 and 0.005 mg/l for HFB1, limits of quantitation were 0.03 mg/l for FB1 and 0.025 mg/l for HFB1. The resulting limits of detection in samples were 9 ng/g for FB1 and 5 ng/g for HFB1. Limits of quantitation in samples were 28 ng/g for FB1 and 23 ng/g for HFB1.

Concentrations in tissue samples: Concentrations of FB1 and HFB1 in tissue samples were in the low ng/g range. Concentrations of FB1 in liver and kidney samples were mostly between the LOD and the LOQ. FB1 concentrations in lung were below the LOD in 5 piglets. Concentrations of HFB1 were below the LOD in all tissues of 5 pigs. However, one pig capable of hydrolysing FB1 in the GI tract to greater extent than the other pigs (see Greitbauer et al. in these proceedings) had greater tissue concentrations of FB1 and HFB1, ranging up to 43 ng/g FB1 and 55 ng/g HFB1 in liver. Partially hydrolysed fumonisins could also be detected in liver of this special pig (see **Figure 1**). In **Table 2** the number of pigs containing fumonisin concentrations below the LOD; between the LOD and LOQ and greater than the LOQ is given.

Table 2: Number of pigs containing FB1 and HFB1 concentrations below the LOD; between LOD and LOQ; and greater than the LOQ

	Liver		Kidney		Lung	
	FB1	HFB1	FB1	HFB1	FB1	HFB1
c < LOD	1	5	2	5	5	5
c between LOD and LOQ	4	0	4	1	1	1
c > LOQ	1 (43 ng/g)	1 (55 ng/g)	0	0	0	0

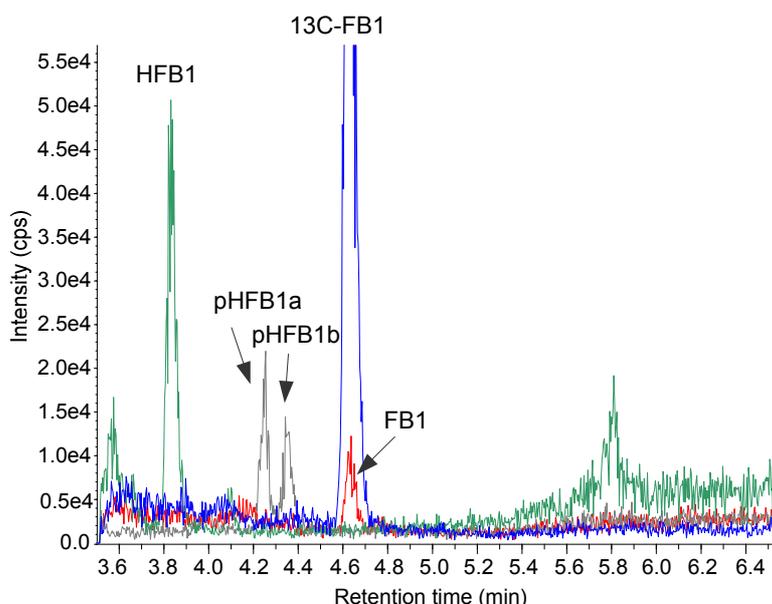


Figure 1: Chromatogram of a liver extract of one pig capable of hydrolysing FB1 in the GI-tract to greater extent than the other pigs

Conclusion

The measured concentrations of FB1 and HFB1 in tissue samples were in the low ng/g range. Considering the great elevation of the sphinganine/sphingosine ratio in tissues (see Schwartz et al. in these proceedings) the FB1 concentrations in tissue samples were surprisingly low. Therefore, the use of tissue concentrations of FB1 and HFB1 as biomarker for fumonisin absorption requires highly sensitive methods and equipment, especially when dietary fumonisin concentrations are near the legal limit of 5 mg/kg in feed.

References

- Bennett J.W., Klich M. 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16:497-516.
- Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman C.P., Horak R.M., Marasas W.F.O., Spiteller G., Vleggaar R., 1998. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. 11:743-745.
- Fodor J., Meyer K., Gottschalk C., Mamet R., Kametler L., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. 2007. In vitro microbial metabolism of fumonisin B₁. Food Addit. Contam. 24:416-420.
- Riley R.T., Voss K.A. 2006. Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. Toxicol. Sci. 92: 335-345.
- Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. Anal. Bioanal. Chem. 389:1505-1523.
- Wild C.P., Gong Y.Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. Carcinogenesis 31:71-82.

Authors

Irene SCHÖNER, Rudolf KRŠKA, Heidi SCHWARTZ, Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, Austria

Bertrand GRENIER, Isabelle P. OSWALD, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66, INRA, 31931 Toulouse, France

Gerd SCHATZMAYR, Wulf-Dieter MOLL, Biomin Research Center, Technopark 1, 3430 Tulln, Austria

Bestimmung von Fumonisin und deren Hydrolyseprodukten in Schweinen –

Teil 2: Kotproben

*Determination of fumonisins and their hydrolysis products in pigs –
part 2: faeces samples*

O. GREITBAUER, IRENE SCHÖNER, B. GRENIER, R. KRŠKA, G. SCHATZMAYR,
ISABELLE. P. OSWALD, W.-D. MOLL, HEIDI SCHWARTZ

Summary

Fumonisin are toxic secondary metabolites produced by different species of *Fusarium* fungus. In this work a method to determine the concentrations of Fumonisin B1 (FB1) and its hydrolysis products [partially hydrolysed fumonisin B1 (pHFB1a and b) and hydrolysed fumonisin B1 (HFB1)] in faeces samples was developed, optimized and validated. Subsequently, the method was applied to analysis of faeces samples collected during a feeding trial with piglets (2 mg FB1/kg body weight; duration: 2 weeks, No. of pigs: 6). Average concentrations of FB1; pHFB1a; pHFB1b and HFB1 in samples of 5 pigs taken at the end of the feeding trial were 122.3; 10.1; 7.2 and 0.6 µg/g freeze dried sample. One pig showing greater hydrolysis of FB1 in the GI tract than all other pigs excreted 10 µg/g FB1, 190 and 132 µg/g pHFB1a and b and 144 µg/g HFB1.

Keywords

FB1, partially hydrolysed Fumonisin B1, *Fusarium*, pigs, faeces samples, biomarker

Zusammenfassung

Fumonisine sind giftige Sekundärmetabolite, die von verschiedenen *Fusarium*-Arten gebildet werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Bestimmung von Fumonisin B1 und dessen Hydrolyseprodukten [partiell hydrolysierte Fumonisin B1 (pHFB1a und b) und hydrolysiertes Fumonisin B1 (HFB1)] in Kotproben von Schweinen entwickelt, optimiert und validiert. Anschließend wurde die Methode auf Kotproben angewandt, die im Zuge eines Fütterungsversuchs mit Schweinen gesammelt worden waren (2 mg FB1/Körpergewicht; Dauer: 2 Wochen, Anzahl an Schweinen: 6). Durchschnittliche Konzentrationen an FB1; pHFB1a; pHFB1b und HFB1 in am Ende des Fütterungsversuchs gesammelten Kotproben waren 122.3; 10.1; 7.2 und 0.6 µg/g gefriergetrocknete Probe. Ein Schwein, das FB1 im Gastrointestinaltrakt in größerem Ausmaß hydrolysierte als die anderen Schweine, schied 10 µg/g FB1, 190 und 132 µg/g pHFB1a und b und 144 µg/g HFB1 aus.

Schlüsselwörter

FB1, partiell hydrolysiertes Fumonisin B1, *Fusarium*, Schweine, Kotproben, Biomarker

Einleitung

Fumonisine sind weit verbreitete Mykotoxine, die als Sekundärmetabolite verschiedener *Fusarium*-Arten gebildet werden und häufig in Mais zu finden sind. Der häufigste Vertreter der Fumonisine ist Fumonisin B1. Fumonisine sind wasserlöslich und werden vom Körper in nur geringem Maße absorbiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass sie im Gastrointestinaltrakt teilweise hydrolysiert werden (Fodor et al., 2008). Ihre Toxizität beruht unter anderem auf der Hemmung der Ceramid Biosynthese, sodass das Verhältnis von Sphinganin zu Sphingosin als Biomarker für den Konsum von Fumonisinen herangezogen werden kann (Merrill et al., 1993, Shephard et al., 2007). Dies funktioniert gut bei hohen FB1-Konzentrationen, bei geringen Konzentrationen im Bereich des Grenzwertes (5 mg/kg in Futter) ist aber bei kurzer Exposition von weniger als 2 Wochen die Analyse eines zweiten Biomarkers anzuraten (siehe Schwartz et al. in diesem Tagungsband). Neben der Bestimmung von FB1 und seinen Hydrolyseprodukten in Geweben (siehe Schöner et al. in diesem Tagungsband), Plasma und Urin, was sehr empfindliche Analysemethoden und Geräte erfordert, bietet sich der Nachweis von Fumonisinen in Kotproben an.

Ziel dieser Arbeit war es, eine HPLC-MS Methode zur Bestimmung von Fumonisinen und deren Hydrolyseprodukten in Kotproben zu entwickeln, und diese Methode zur Analyse von im Zuge eines Fumonisin Fütterungsversuches mit Schweinen gesammelten Kotproben anzuwenden.

Material und Methoden

Fütterungsversuch: Die Probenahme erfolgte im Zuge eines Fütterungsversuches am INRA Toulouse über einen Zeitraum von 2 Wochen. Hierbei wurden 6 heranwachsenden Schweinen zusätzlich zu nicht kontaminiertem Futter 2 mg/kg Körpergewicht FB1 oral verabreicht. Eine Kontrollgruppe erhielt eine Fumonisin-freie Basisdiät. Kotprobenahmen von den einzelnen Schweinen erfolgten am Tag 0 (vor Beginn des Fütterungsversuchs – Probenahme 1), am Tag 7 (Probenahme 2) und am Tag 14 (Probenahme 3). Die Proben wurden nach den Probenahmen gefriergetrocknet.

Aufarbeitung: Nach Optimierung verschiedener Extraktionsparameter (Extraktionsmittel, -dauer, -volumen, Anzahl der Extraktionsschritte, Probeneinwaage, Inkubation am Schüttler/im US-Bad, Abdampfen unter Pressluft/N₂) mit gespikten Kontrollproben der Probenahme 1 wurde folgende Methode zur Aufarbeitung der Kotproben herangezogen: Nach Homogenisierung der gefriergetrockneten Proben wurden Aliquote von 0.3 g im Triplikat eingewogen. Diese wurden in 3 Schritten mit Acetonitril:Wasser:Ameisensäure (74:25:1, v/v/v) als Extraktionsmittel extrahiert. Im ersten Schritt wurde 10 mL Extraktionsmittel zugegeben, gevortext, und für 30 Minuten auf einem Horizontalplattenschüttler inkubiert. Die weiteren Extraktionsschritte verliefen analog mit 10 bzw. 5 mL Extraktionsmittel und 20 bzw. 10 Minuten Inkubationszeit.

Nach dem Schütteln wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände in 25 mL Messkolben gesammelt. Nach dem 3. Extraktionsschritt wurden die Kolben bis zur Marke mit dem

Extraktionsmittel aufgefüllt, geschüttelt, Aliquote von 150 µL entnommen und unter Pressluft zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in 150 µL 30% ACN (enthält 0.15 mg/L C13-FB1 als internen Standard) aufgenommen und für die Analyse in HPLC-Vials überführt. Die Messung erfolgte mittels RP-HPLC-MS.

Chromatographische Analyse: Es kam eine C18 Gemini Säule (150 x 4.6 mm, 5 µm) der Firma Phenomenex mit einer Vorsäule der selben stationären Phase zum Einsatz. Die Flussrate betrug 0.8 mL/min bei einer Temperatur von 30°C. Das Injektionsvolumen war 10 µL, als Laufmittel wurden Methanol/Wasser Mischungen (LM A: 40% MeOH, LM B: 90% MeOH) verwendet, die 0.1% Essigsäure enthielten. Von 0-2.5 min stieg der Gradient linear von 0 auf 90% Laufmittel B an, danach wurde 6.9 min isokratisch mit 90% LM B eluiert. Zwischen 6.9 und 7.0 min wurde linear auf 0% B abgesenkt und bis 9.0 min isokratisch bei 0% B reäquilibriert. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mittels ESI im positiven Q1 multiple ions Modus (Isolation von $[M+H]^+$).

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierfunktionen. Für FB1 wurden Standards verwendet, die aus einer Stocklösung der Firma Biopure hergestellt wurden, die Stocklösungen für HFB1 sowie pHFB1 a und b wurden nach enzymatischem Umsatz von FB1 mittels präparativer HPLC selbst hergestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Validierung der Methode: Die Gesamtausbeute betrug zwischen 92% für pHFB1b und 112% für HFB1, die Ausbeuten des Extraktionsschritts waren zwischen 93% (pHFB1b) und 100% (FB1 und pHFB1a). Die Signalunterdrückung durch Matrixeffekte betrug weniger als 6% für FB1 und pHFB1 a und b, bei HFB1 konnte eine Signalverstärkung um 14% beobachtet werden. Die Nachweisgrenzen in den gefriergetrockneten Proben lag zwischen 0.4 µg/g für HFB1 und 0.8 µg/g für FB1, die Bestimmungsgrenzen waren zwischen 1.3 µg/g für HFB1 und 2.1 µg/g für FB1. Die relativen Standardabweichungen der Probenaufarbeitung und -analyse im Triplikate betragen weniger als 10%.

Analyse der Kotproben: Die mittleren Konzentrationen an FB1, pHFB1a, b und HFB1 in den Kotproben sind in **Tabelle 1** angegeben.

Tabelle 1: Mittelwerte der Konzentrationen von FB1, pHFB1a, pHFB1b und HFB1 in Kotproben (µg/g gefriergetrocknete Probe; n = 5 Schweine)

Probenahme	FB1	pHFB1a	pHFB1b	HFB1
2	82.1	4.4	3.4	0.4
3	122.3	10.1	7.2	0.6

Die Konzentrationen in den Proben der einzelnen Schweine variierten stark (siehe **Abbildung 1**). Die Werte von Schwein 18 wurden beim Mittelwert nicht berücksichtigt, da sich dieses Schwein

aufgrund seiner Fähigkeit, FB1 in hohem Ausmaß zu pHFB1 a und b sowie zu HFB1 abzubauen, von allen anderen Schweinen der Versuchsreihe unterschied (siehe **Abbildung 1**).

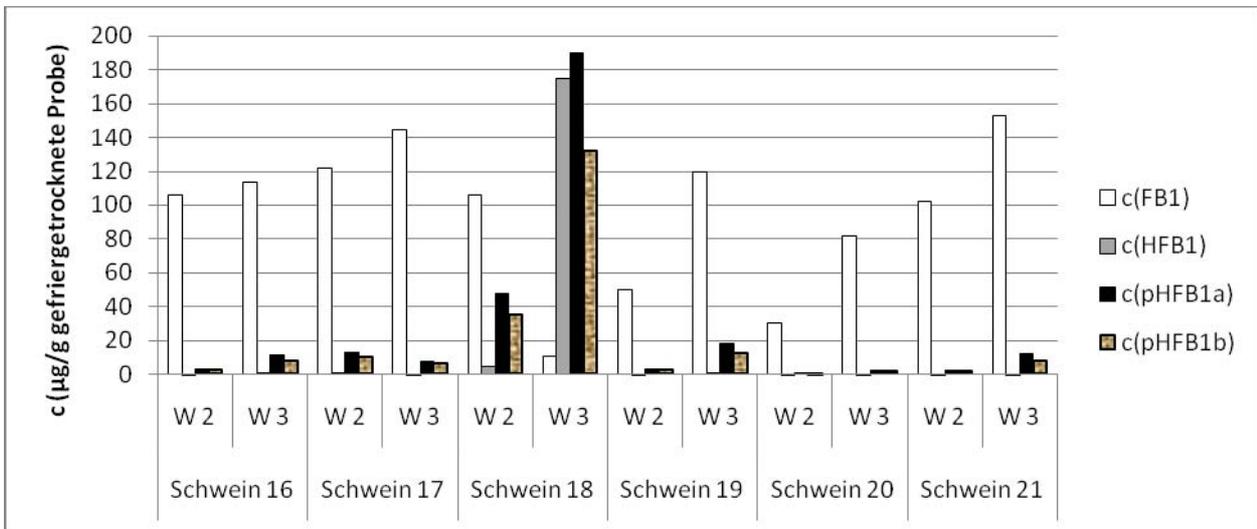


Abbildung 1: Analytkonzentrationen in den gefriergetrockneten Proben aller Probeschweine, Probenahme 2 und 3

Die Fumonisin-konzentrationen in den Proben der Kontrollgruppe und der ersten Probenahme waren unter der Nachweisgrenze von 0.8 µg/g FB1 bzw. 0.4 µg/g HFB1. **Abbildung 2** zeigt ein typisches Chromatogramm eines Kotprobenextraktes eines Schweins der FB1-gruppe.

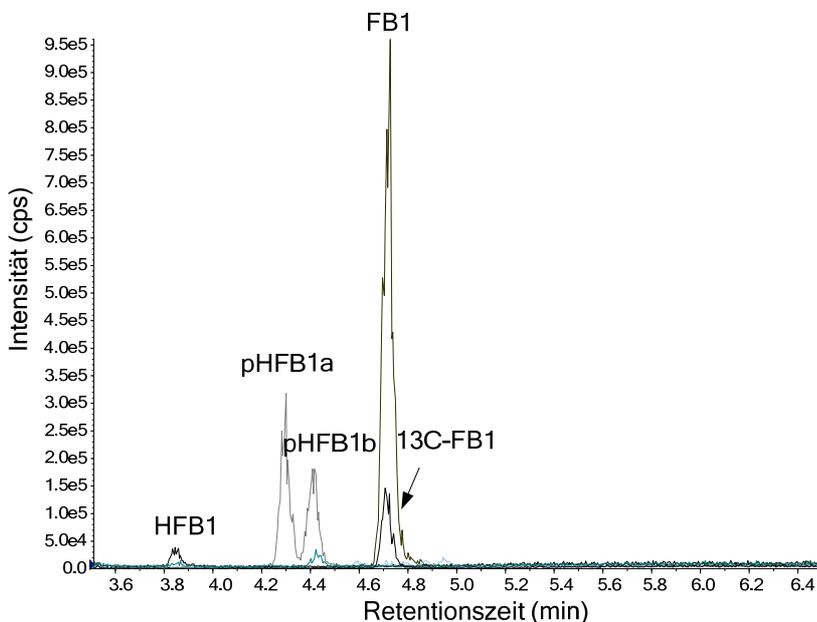


Abbildung 2: Chromatogramm eines Kotprobenextraktes

Vergleich der FB1-Konzentrationen in Kotproben dieser Arbeit mit Werten, die von Fodor et al. (2008) erhalten wurden, liefert Ergebnisse in der gleichen Größenordnung. Im Versuch von Fodor et al. (2008) nahmen Schweine durchschnittlich 2.2 mg FB1/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 10 Tagen zu sich. Zwischen dem 5. und dem 10. Tag konnten in frischen Kotproben ca. 55 µg/g FB1 und 6 µg/g HFB1 nachgewiesen werden. Dies deutet auf höhere FB1-Hydrolyseraten im GI-Trakt von Schweinen der Gruppe von Fodor et al. (2008) hin.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Gegenwart von Fumonisinen in Kotproben ein einfach zu bestimmender Biomarker für die Exposition zu Fumonisinen ist, da die hohen Konzentrationen in Kotproben die Verwendung einer einfachen Extraktionsmethode mit hohen Ausbeuten zulassen und eine Aufkonzentrierung wie bei Gewebeprobe(n) (siehe Schöner et al. in diesem Tagungsband) nicht nötig ist.

Literatur

Merrill A.H. Jr., Wang E., Gilchrist D.G., Riley R.T. 1993. Fumonisin and other inhibitors of *de novo* sphingolipid biosynthesis. *Adv. Lipid Res.* 26: 215-234.

Shephard G.S., van der Westhuizen L., Sewram V. 2007. Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: A review. *Food Add. Contam.* 24: 1196-1201.

Fodor J., Balogh K., Weber M., Mézes M., Kametler L., Pósa R., Mamet R., Bauer J., Horn P., Kovács F., Kovács M. 2008. Absorption, distribution and elimination of fumonisin B₁ metabolites in weaned piglets. *Food Add. Contam.* 25: 88-96.

Autoren

Oliver GREITBAUER, Irene SCHÖNER, Rudolf KRŠKA, Heidi SCHWARTZ, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln, Österreich

Bertrand GRENIER, Isabelle P. OSWALD, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66, INRA, 31931 Toulouse, Frankreich

Gerd SCHATZMAYR, Wulf-Dieter MOLL, Biomin Research Center, Technopark 1, 3430 Tulln, Österreich

Ergotalkaloide in der Routineanalytik?

Ergot Alkaloids in Routine Analysis?

A. SCHIESSL, BARBARA DAXNER, MARION SCHANDL, ELISABETH PICHLER

Summary

When cereal plants are infected with *Claviceps purpurea* a sklerotia is formed. These contain a number of ergot alkaloids which can be detected by HPLC-FLD. However, current methods of analysis are complex and time consuming, which is why sklerotia are usually detected visually and removed manually from grains. Following analytical needs, an HPLC-FLD method with easy and rapid solid phase extraction sample preparation was developed. This method identifies nine important ergot alkaloids simultaneously and due to its easiness this method can be an attractive approach for the routine analysis of ergot alkaloids.

Keywords

Ergot alkaloids, routine analysis, sklerotia, HPLC-FLD, solid phase extraction

Zusammenfassung

Wird Getreide mit *Claviceps purpurea* infiziert, so können sich sogenannte Sklerotien (Mutterkörner) ausbilden. Diese enthalten eine Vielzahl von Ergotalkaloide welche mittels HPLC-FLD detektiert werden können. Jedoch sind die bestehenden Analysenmethoden aufwendig und zeitkonsumierend, weshalb die Sklerotien meist visuell detektiert und aus dem Getreide entfernt werden. Den analytischen Bedürfnissen folgend, wurde eine HPLC-FLD Methode mit einfacher und rascher Festphasenaufreinigung entwickelt. Diese Methode identifiziert neun wichtige Vertreter der Ergotalkaloide gleichzeitig und kann aufgrund ihrer Einfachheit die Analyse von Ergotalkaloiden in der Routineanalytik attraktiver gestalten.

Schlüsselwörter

Ergotalkaloide, Mutterkornalkaloide, Routineanalytik, Sklerotium, HPLC-FLD, Festphasenaufreinigung

Einleitung

Ergotalkaloide werden von Pilzen der Gattung *Claviceps*, meist vom Hauptvertreter *Claviceps purpurea*, gebildet. Diese Pilze entwickeln sich häufig auf Roggen, Weizen und Triticale wobei sie dabei eine Überwinterungsform, sogenannte Sklerotien (Mutterkörner), ausbilden können. Diese Sklerotien enthalten eine Vielzahl verschiedener Ergotalkaloide, mit Ergometrin, Ergotamin, Ergosin, Ergokristin, Ergokryptin, Ergokornin und ihre korrespondierenden epimerischen Inine als Hauptvertreter. Menge und Verteilung dieser Alkaloide sind



Figure 1. *Claviceps purpurea* Sklerotien

stark von der Pilzspezies, der Wirtspflanze und der geografischen Region abhängig. Der Verzehr dieser Ergotalkaloide verursacht in allen Tierarten Vergiftungen, welche meist durch Symptome wie Fressstörungen, Schwindelgefühl und Fehlgeburten erkannt werden. Beim Menschen wird die bereits im Mittelalter erkannte Krankheit Ergotismus ausgelöst. Um sicherzustellen, dass Getreide und Futtermittel frei von Ergotalkaloiden sind, wird häufig die relativ unaufwendige visuelle Detektion und anschließendes Entfernen von Sklerotien angewandt. Um den analytischen Bedürfnissen zu folgen, wurde nun von Romer Labs® eine einfache und rasche HPLC-Methode mit One-Step-Festphasenaufreinigung validiert, die zehn der zwölf Hauptanalyten

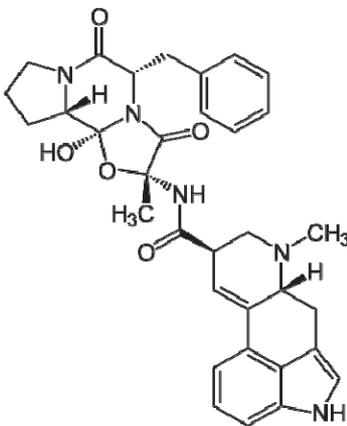


Figure 2. Ergotamin simultan quantifiziert.

Material und Methoden

Für die Probenaufreinigung zur Analyse von Ergotalkaloiden wurde eine Festphasensäule, die MycoSep®150, entwickelt. Die nachfolgende Analyse des Extrakts wird mit einer ebenfalls neu entwickelten HPLC Methode mit Fluoreszenzdetektion

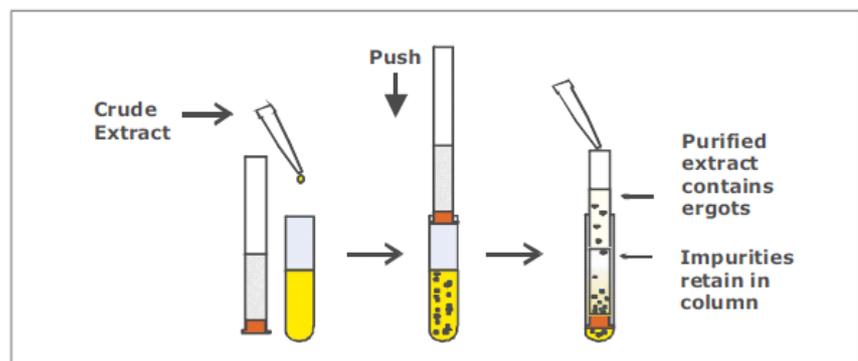


Figure 3. Ergot MycoSep® 150 - Funktionsweise

durchgeführt. Zur Validierung dieser Methode wurden „dried down“ Ergotalkaloid- Flüssigstandards verwendet. Zwölf verschiedenen Ergotalkaloid-Flüssigstandards sind nun unter der Marke Biopure® erhältlich. Die Standards wurden zu den Roggenproben in drei bekannten Konzentrationsstufen (100, 750 und 2500 µg/kg) beigegeben und mit sechsfacher Wiederholung von unterschiedlichem Personal wiederbestimmt. Mittels dieser Daten wurde die neue Methode für

die Ergotalkaloidanalytik auf Präzision, Linearität und Robustheit erfolgreich validiert. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Ergebnisse, wurde das Ergotalkaloid-Roggen-Matrixreferenzmaterial von Romer Labs® verwendet. Dieses natürlich kontaminierte Material wurde von fünf unabhängigen Labors charakterisiert, um den Status eines Referenzmaterials zu erhalten und einen korrekten Kontaminationslevel zu gewährleisten.

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Methodvalidierung für Roggen, Weizen, Gerste, Silage, DDGs, Hirse, Hühner- und Schweinefutter zeigten exzellente Wiederfindungsraten mit sehr sensitivem Detektionslimit von 15 µg/kg. Das Quantifizierungslimit von zehn verschiedenen Ergotalkaloiden in Roggen wurde mit 40 µg/kg festgelegt. Die Methode ist zuverlässig und einfach in die Routineanalytik von Ergotamin, Ergosin, Ergokristin, Alpha-Ergokryptin, Ergokornin, Ergometrin, Ergotaminin, Ergokorninin, Ergokryptinin und Ergocristinin anzuwenden. Romer Labs® bietet nun im Umfang seines analytischen Serviceprogramms diese ISO17025 akkreditierte Methode für die Analytik von Ergotalkaloiden an.

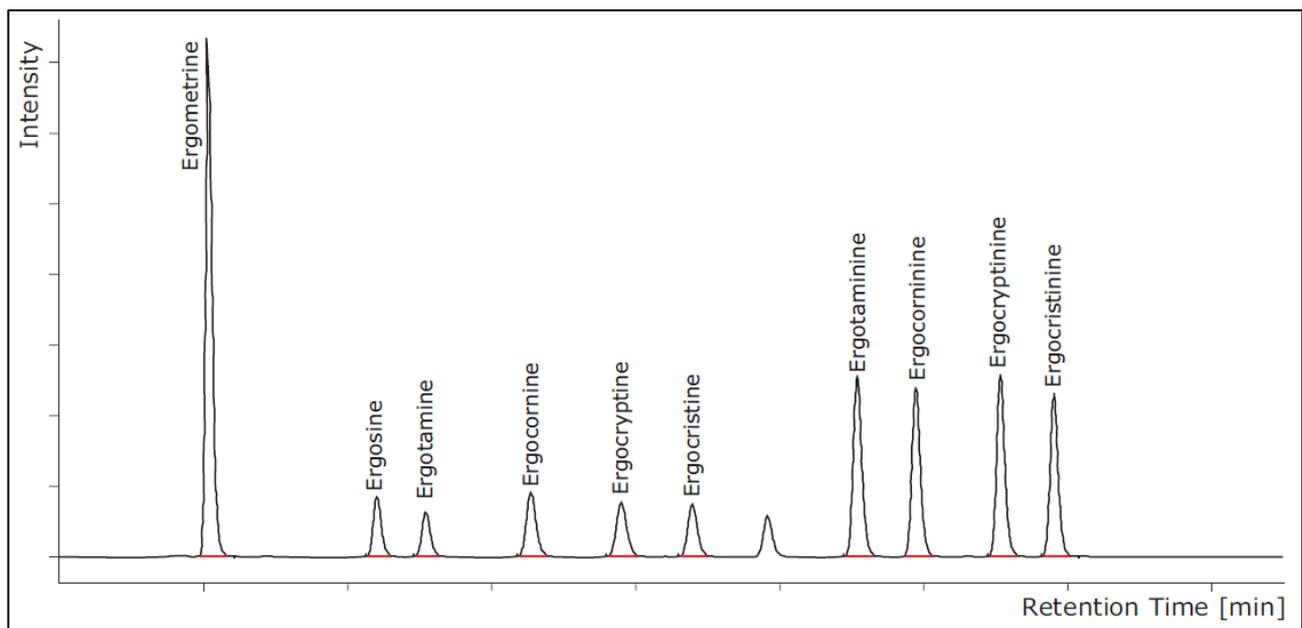


Figure 4. HPLC-FLD Chromatogramm mit 10 Ergotalkaloiden

Autoren:

A. SCHIESSL¹, Barbara DAXNER², Marion SCHANDL², Elisabeth PICHLER²

¹Romer Labs Division Holding GmbH, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

²Romer Labs Diagnostic GmbH, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

Nutzung der Genomsequenz des Modellgrases *Brachypodium distachyon* zum Studium der UDP-Glukosyltransferase Genfamilie von Getreide

The genome sequence of the grass model Brachypodium distachyon as a tool to study the UDP-glucosyltransferases gene family of cereals

W. SCHWEIGER, PAULA KOVALSKY, J. BODDU, S. SHIN, G. MUEHLBAUER, K. MAYER, F. BERTHILLER, G. ADAM

Summary: With the release of the genome sequence of *Brachypodium distachyon* a powerful tool for comparative analysis with wheat and other grass crop species has become available. *Brachypodium* as well as wheat and barley are capable of transforming the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) into a gluco-conjugate. This conjugation reaction mediated by UDP-glucosyltransferases (UGT) had been shown to contribute to resistance *Fusarium* head blight. The evolutionary relatedness of *Brachypodium* to wheat and its comparably small genome have made *Brachypodium* an ideal candidate to investigate the UGT genes in cereals and their potential activity towards DON.

Key words: Deoxynivalenol, UDP-glucosyltransferases, wheat, *Brachypodium distachyon*

Zusammenfassung: *Brachypodium distachyon* ist ein mit Weizen und Gerste nahe verwandtes Grass. Das erst vor kurzem sequenzierte Genom von *Brachypodium* ermöglicht es, von den daraus gewonnenen Informationen auf ähnliche, orthologe Gene in Weizen oder auch Gerste zu schließen. *Brachypodium* wie auch *Fusarium* resistenter Weizen können das *Fusarium*-Toxin Deoxynivalenol (DON) mit Hilfe von UDP-Glukosyltransferasen (UGT) in ein nicht-toxisches Glukosid überführen. Dieser Detoxifikationsmechanismus trägt zur Resistenz gegen *Fusarium* bei. Das evolutionäre Naheverhältnis von Weizen und *Brachypodium* und dessen vergleichsweise sehr kleines Genom machen *Brachypodium* zum idealen Kandidaten um die Entwicklung der sehr großen Genfamilie der UGTs von Getreide zu studieren und die Eigenschaften von Kandidatengenen hinsichtlich ihrer potentieller Aktivität als DON-Detoxifikationsgene zu testen.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol, UDP-Glukosyltransferasen, Weizen, *Brachypodium distachyon*

Einleitung: Der Befall von Mais und Weizen durch *Fusarium graminearum* führt nicht nur zu erheblichen Ernteaussfällen, sondern kontaminiert Getreide mit erheblichen Mengen an Mykotoxinen, wie Deoxynivalenol (DON). DON blockiert die Proteinbiosynthese und ist ein für die Ausbreitung des Pilzes entscheidender Virulenzfaktor. Um DON zu detoxifizieren haben Pflanzen eine Reihe von Strategien entwickelt. Den größten Anteil an der Metabolisierung von DON haben UDP-Glukosyltransferasen (UGT), die DON in ein ungiftiges DON-Glukosid überführen. UGTs spielen auch eine entscheidende Rolle in der Konjugation von unzähligen anderen endo- und exogenen Substanzen, derzeit ist noch sehr wenig über deren Substratspezifität bekannt. Entsprechend groß ist die UGT-Genfamilie: Mehr als 100 Gene wurden in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* beschrieben, um die 150 sind es in Reis. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits vor einigen Jahren eine DON-inaktivierende UDP-Glukosyltransferase von *Arabidopsis*

identifizieren (Poppenberger *et al*, 2003). Erst vor kurzem ist uns die Charakterisierung der ersten DON-inaktivierenden UGT, HvUGT13248, aus einer Nutzpflanze, Gerste, gelungen (Schweiger *et al*, 2010). Trotz dieser Erfolge, ist die Identifizierung solcher Gene langwierig und arbeitsintensiv. Gerade für den hexaploiden Weizen, für den auch keine genomische Sequenz vorliegt, braucht es nahe verwandte, einfache Modellorganismen um davon auf entsprechende Gene im Weizen rückschließen zu können.

Brachypodium distachyon gehört zur Familie der Poaceae und ist evolutionär wesentlich näher zu Weizen, Gerste und Hafer verwandt als die zweikeimblättrige Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* aber auch als Reis oder Hirse, für die es bereits vollständige Genomsequenzen gibt. Mehrere Faktoren sprechen für die Verwendung von *Brachypodium* als Modell für Weizen: Im Vergleich zum Weizengenom (mit 16.000 Megabasenpaaren) ist das diploide *Brachypodium*-Genom mit nur 192 Mb sehr klein, der Gengehalt vermutlich extrem ähnlich und auch die Abfolge am Chromosom stark konserviert. Die kurze Generationszeit und der kleine Wuchs machen *Brachypodium distachyon* zu einer gut handhabbaren Laborpflanze. Mit der Veröffentlichung der kompletten Genomsequenz, ist es uns nun möglich sämtliche darin kodierende UGT-Gene zu bestimmen und deren evolutionäre Zusammenhänge zu untersuchen. Aus dem Vergleich mit Fusarium/DON induzierten Kandidatengen aus Gerste oder Weizen lassen sich orthologe Gene identifizieren, klonieren und diese auf ihre Substratspezifität untersuchen.

Ergebnisse und Diskussion: Alle UGT-Gene beinhalten ein hochkonserviertes Sequenzmotiv, das für die Interaktion mit dem UDP-Zucker kodiert. Eine Suche nach dieser gemeinsamen Signatur (WAPQVEVLAHPAVGCFVTHCGWNSTLESISAGVPMVAWPFFADQ; Vogt and Jones 2000) im Genom von *Brachypodium* führte zu 135 putativen UGT-Genen. Ein hoher Prozentsatz dieser Gene beinhaltet kein oder nur ein Intron. Insgesamt teilen die UGTs eine Übereinstimmung der Aminosäuren-Sequenz von 40 bis 96 %. Viele der Gene sind in Clustern von wenigen Genen bis zu 7 Mitgliedern organisiert. Ein auf Basis der Proteinsequenz erstellter phylogenetischer Baum (erstellt mit dem ClustalW-Programm, Grafik 1) teilt die UGTs in 18 Untergruppen.

Ein Vergleich mit der zuvor publizierten Phylogenie der UGTs aus *Arabidopsis thaliana* (Ross *et al*, 2001) zeigt, dass eine gleichartige Differenzierung mit vergleichbar große Gruppen orthologer Gene. Die hohe Ähnlichkeit in beiden entfernt verwandten Pflanzen lässt darauf schließen, dass für UGTs von nahe stehenden Spezies wie Gerste oder Weizen mindestens ebenso gute Vergleichbarkeit herrscht. Wir haben die Proteinsequenzen von allen in unserem Labor in Hefeexpressions-Assays getesteten UGTs aus Reis (2), Weizen (2), Gerste (5) und *Arabidopsis* (1) in unser Alignment eingegliedert.

Alle werden unter DON-Stress induziert, jedoch nur zwei kodieren tatsächlich für Proteine mit der Fähigkeit zur Inaktivierung von DON. Eingefügt in unsere *Brachypodium*-Phylogenie (Grafik 1) zeigt sich, dass bis auf eine Gruppe alle UGT-Gene aus verschiedenen Clustern kommen, die sich evolutionär unterschiedlich entwickelt haben.



Grafik 1: Phylogenetische Analyse von 135 UDP-Glukosyltransferasen aus *Brachypodium distachyon*. Verbindungen mit weniger als 65 % Wahrscheinlichkeit sind mit Diamant-Symbolen gekennzeichnet. Kandidatengene anderer Spezies sind fett hervorgehoben.

Die Gene TaUGT3 (Weizen, inaktiv gegen DON), HvUGT5876 (Gerste, inaktiv), Os1g0176000 bzw. Os1g0176100 (beide Reis, inaktiv) und AtUGT73C5 (Arabidopsis, aktiv) finden sich in Cluster C5 wieder und scheinen Mitglieder der gleichen orthologen Cluster ihrer Spezies zu sein. Ihre unterschiedliche Substratspezifität gegenüber DON zeigt aber auch, dass innerhalb paraloger Gruppen einer Spezies sehr hohe Unterschiede in der Substratspezifität möglich sind (siehe auch Schweiger *et al.*, 2010). Die DON-inaktivierende UGT aus Gerste, HvUGT13248, findet sich im Untereinheit L1 wieder, mit einer Gruppe von sechs *Brachypodium* Genen, wovon die UGTs Bradi5g03300 und Bradi5g03390 mit 73,3 % und 74,3 % die höchste Übereinstimmung in der Proteinsequenz haben. Unsere Arbeitshypothese ist, dass Mitglieder dieser orthologen genetischen Familie ebenfalls für die Inaktivierung von DON kodieren. Die erfolgreiche Identifizierung einer DON-inaktivierenden UGT in dieser genetischen Familie aus *Brachypodium* würde nahelegen, dass bereits die gemeinsame Vorläufer-Spezies ein solches Gen besaß und die darin kodierende Eigenschaft erhalten blieb. Die gleichen Gene könnten auch in daraus hervorgegangenen Getreide-Spezies vorhanden sein.

Die Klonierung der sechs mit HvUGT13248 sequenzähnlichen *Brachypodium*-Gene und folgende funktionelle Tests über Expression in toxin-sensitiven Hefestämmen gestaltete sich schwierig: Für UGTs unüblich beinhaltet jedes der Gene mehrere Introns. Der Versuch diese Gene aus cDNA von DON behandelten *Brachypodium*-Zöglingen zu gewinnen war nur begrenzt erfolgreich, da nur drei der Gene exprimiert wurden. Letzlich wurden alle Mitglieder des *Brachypodium*-Clusters chemisch synthetisiert um auch hohe Expressionsraten in Hefe zu gewährleisten. Funktionelle Tests auf DON-Spezifität sind jedoch noch ausständig.

Literatur:

- Poppenberger, B. et al. Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem* 278, 47905-47914 (2003).
- Ross, J., Li, Y., Lim, E., Bowles, D.J. Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* 2, REVIEWS3004 (2001).
- Schweiger, W. et al. Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol. Plant Microbe Interact* 23, 977-986 (2010).
- Vogt, T., Jones, P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* 5, 380-386 (2000).

Autoren:

Wolfgang SCHWEIGER, Paula KOVALSKY, Gerhard ADAM: Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur, Wien; Franz BERTHILLER: Analytikzentrum des Interuniversitären Departments für Agrobiotechnologie, IFA, Tulln; Jayanand. BODDU, Sanghyun. SHIN, Gary J. MUEHLBAUER: Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA; Klaus F. X. MAYER: Helmholtz Institut, München

Autorenverzeichnis

Adam G.	46, 51,55, 134
Andersson, G.	69
Bargen, von S.	38
Berthiller, F.	46, 51, 55, 77, 134
Boddu, J.	134
Böhm, J.	25
Brodacz, W.	100, 104
Bürstmayr, H.	34
Bürstmayr, M.	34
Büttner, C.	38, 85
Čermák, B.	89
Chobot, V.	81
Clemenz, A.	21
Corradini, R.	55
Cvak, B.	73
Daxner, B.	62
Eiblmeier, P.	97
Ellner, F.	85
Gärber, U.	85
Gardiner, St.	46
Goßmann, M.	38, 85
Greitbauer, O.	126
Grenier, B.	29, 121, 126
Grosch R.	85
Grossgut, R.	17
Hadacek ,F.	81
Hage-Ahmed, K.	81
Hägglom, P.	69
Hametner, W.	46
Häubl, G.	65
Hortová, B.	89
Huber, K.	34
Hübner, M.	59
Jaunecker, G.	65
Kaul, H.-P.	42
Kmiecik, P.	51
Kneifel, W.	21
Koutnik, A.	116
Kovalsky, P.	134
Krska, R.	29, 51, 55, 73, 116, 121,126
Kuchynková H.	89, 93
Lehner, S.	116
Lemmens, M.	42, 77, 116
Lindqvist, P.-A.	69
Mandl, K.	21, 112
Manner, K.	8
Marjakaj, R.	77
Mayer, K.	134

Mischek, D.	8
Mitterauer, A.	65
Mitterbauer, R.	55
Molinelli, A.	73
Moll W.-D.	29, 121, 126
Moudrý J.	89
Muehlbauer G.	46, 134
Münzing, K.	12
Naehrer, K.	108
Öhlinger, R.	16
Oswald I. P.	29, 121, 126
Parich A.	116
Plate, J.-K.	38
Rampl, J.	97
Rauscher-Gabernig, E.	17
Razzazi-Fazeli, E.	69
Reiter, E. V.	69
Schattauer, D.	112
Schatzmayr, G.	29, 121, 126
Schiessl, A.	131
Scholz, A.	38
Schöner, I.	29, 121, 126
Schuhmacher R.	55, 116
Schwake-Anduschus, Ch.	12
Schwartz, H.	29, 121, 126
Schweiger W.	134
Shala-Mayrhofer, V.	42, 77
Shams, M.	51, 55
Shin, S.	134
Steinkellner, S.	81
Štěrba Z.	89, 93
Sterflinger, K.	21
Štočková, L.	89
Stüger, H. P.	8
Torres Acosta, J. A.	51
Unbekannt, C.	108
Voglgruber, A.	81
Volfová, K.	93
Voženílková, B.	89
Wiesenberger, G	51