



ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-
UND AGRARWESEN

MOLD-MEETING 2005

DER

**ALVA-FACHGRUPPE
MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE**

**„AKTUELLE PROBLEME DER MYKOLOGIE UND
MYKOTOXINFORSCHUNG“**

ALVA-Mitteilungen Heft4/2006

ISSN 1811-7317

© 2006 Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien

ZUSAMMENGESETZT: Dr. Andreas Adler

BEZUGSMÖGLICHKEITEN: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA)
c/o Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien

HERSTELLUNG: RepaCopy Wien DC
Triesterstraße 122
1230 Wien

Vorwort

Am 24. und 25. November 2005 hat in Gars am Kamp das 9. Mold-Meeting der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie & Molekularbiologie mit Präsentationen und Diskussionen zum Thema „Aktuelle Probleme der Mykologie und der Mykotoxinforschung“ stattgefunden.

Dem mikrobiellen Status von landwirtschaftlichen Produkten und von Lebensmitteln wird in einer in zunehmendem Maß an Qualität orientierten Gesellschaft hoher Stellenwert eingeräumt. Schadstoffe in Futter- und Lebensmitteln führen immer wieder zu Diskussionen über die Sicherheit von Nahrungsmitteln. Die Konsumenten müssen aber davon ausgehen können, dass mit dem Genuss von Lebensmitteln das geringste mögliche Risiko verbunden ist. Gesunde, qualitativ hochwertige Nahrungsmittel sind wichtige Voraussetzungen für einen vorbeugenden Verbraucherschutz und eine hohe Lebensmittelsicherheit.

Mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte einer hochwertigen landwirtschaftlichen Qualitätsproduktion sowie einer maximalen Lebensmittel- und Ernährungssicherheit stellen daher zentrale Themen für das „Mold-Meeting“ der Fachgruppe Mikrobiologie dar. Im Rahmen des Fachprogramms 2005 standen unter anderem Beiträge zur genetischen Verankerung der *Fusarium*-Resistenz bei Weizen, der Biosynthese und den toxischen Effekten von Mykotoxinen bis hin zu aktuellen Entwicklungen in der Mykotoxanalytik im Mittelpunkt des Interesses. Weitere Berichte betrafen etwa das Vorkommen von Mykotoxinen sowie den Stand der Regelungen bezüglich Mykotoxingehalte in Futter- und Lebensmitteln.

Multidisziplinarität im Zuge der gesamten Nahrungskette prädestinierte gerade die Fachgruppe Mikrobiologie, im Rahmen des „Mold-Meetings“ kontroverielle Standpunkte zu den Themenbereichen „Mykotoxine - Neuartige Nachweisverfahren“ und „Alternative Vermeidungsstrategien“ zur Minimierung von Fusarienbefall und Mykotoxingehalt in Getreide und Mais in fachlich breit angelegter Diskussion umfassend aufzuarbeiten.

Die nachfolgend publizierten Arbeiten stellen einen Auszug aus dem Fachprogramm des „Mold-Meetings“ der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie und Molekularbiologie bei der Vortragsstagung 2005 in Gars am Kamp dar.

Großer Dank gebührt den Autoren der Fachbeiträge und all denen, die zum Gelingen der Tagung beigetragen haben, insbesondere Herrn Ing. Peter Kiroje und Herrn Franz Glösmann. Dem Präsidenten der ALVA, Herrn Hofrat Univ. Doz. Dr. Gerhard Bedlan, sei für die Publikation dieses Bandes sehr herzlich gedankt.

Dr. Andreas Adler

Vorsitzender der ALVA-Fachgruppe
Mikrobiologie und Molekularbiologie

Vorträge und Poster

M. Lemmens, U. Scholz, Andrea Koutnik, Chiara Dall'Asta, F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Adam, R. Krska, H. Buerstmayr, A. Mesterhazy und P. Ruckebauer

Die Rolle von Desoxygenivalenolresistenz in der Resistenz gegen Ährenfusariose bei Weizen 6

Shamsozoha Abolmaali, Hanna Weindorfer, F. Berthiller, R. Schuhmacher, M. Lemmens, R. Krska, Forough Sanjarian, A. Mousavi and G. Adam

Expression of a yeast acetyltransferase gene (*AYT1*) leads to increased deoxynivalenol (DON) resistance and 3-acetyl-deoxynivalenol (3ADON) formation in transgenic tobacco 9

Doris Lucyshyn, Hanna Weindorfer, Eva Wilhelm, M. Lemmens und G. Adam

Identifizierung neuer DON-Resistenzgene von Weizen durch heterologe Expression von cDNAs in Bäckerhefe 14

Ulrike Werner, F. Berthiller, M. Sulyok, R. Krska, Marie-Theres Hauser und R. Schuhmacher

Effekte von Zearalenon auf *Arabidopsis thaliana* 18

M. Sulyok, F. Berthiller, R. Krska und R. Schuhmacher

Entwicklung einer LC-MS/MS Multi-Toxin Methode mit dem Q-TRAP 4000 System 24

Elvira Welzig und R. Krska

Herstellung von zertifizierten Kalibrationslösungen für die Analytik von Deoxynivalenol und anderen B-Trichotheenen 28

W. Brodacz

Praktische Erfahrungen mit DOM-1 in der GC-Routineanalytik von Trichotheenen 32

G. Häubl, F. Berthiller, R. Schuhmacher und R. Krska

Isotopenverdünnungsmethode zur Bestimmung von Deoxynivalenol ohne Clean-up 36

A. Fellinger, K. Schmitt und K. Johnson	
Trends und Entwicklungen in der Mykotoxin Analytik	40
M. Wuczowski, E. Metzger und H.J. Prillinger	
Mycelpilze und Hefen in Böden verschiedener Naturwaldstandorte	44
Th. Kickinger und H. Würzner	
Aktuelle Regulierungen und Richtwerte für Mykotoxine in Futtermitteln	46
M. Täubel, W.-D. Moll, Elsa Vekiru, A. Frank, A.P. Loibner, R. Braun und G. Schatzmayr	
Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen zur biologischen Inaktivierung von Fumonisin	48
H. Degenhardt	
Einsatz der Gentechnik zur Reduktion von Mycotoxinen in Kulturpflanzen	52
H. Köppl	
Erfahrungen zum Fungizideinsatz zur Bekämpfung von Ährenfusarien	58
Th. Kickinger	
Möglichkeiten der Bindung und Deaktivierung von Mykotoxinen in Futtermitteln	62
R. Öhlinger	
Mykotoxingehalte in Getreide, Futtermitteln und Lebensmitteln (Überblick 2005)	64

Die Rolle der Desoxynivalenol-Resistenz im Ährenfusariose-Resistenzkomplex bei Weizen

The role of resistance to deoxynivalenol in the Fusarium head blight resistance complex in wheat

M. LEMMENS, U. SCHOLZ, Andrea KOUTNIK, Chiara DALL'ASTA, F. BERTHILLER,
R. SCHUHMACHER, G. ADAM, R. KRŠKA, H. BUERSTMAYR, A. MESTERHAZY
and P. RUCKENBAUER¹

Summary

The goal of this work was to gain insight into the role of DON resistance in the FHB resistance complex. To this end we developed a new method to evaluate DON resistance in wheat. We found significant correlations between DON resistance and *Fusarium* resistance data in a segregating double haploid wheat population. Further, in investigating the biochemical mechanism of resistance to DON, we were able to demonstrate that the ability to efficiently detoxify DON into a DON-glucose conjugate co-localizes with a previously identified major FHB resistance QTL (*Qfhs.ndsu-3BS*).

Key words: Fusarium head blight, Type III resistance, Deoxynivalenol, DON-3-Glucoside

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Rolle der Resistenz gegenüber dem Fusarienpilzgift Desoxynivalenol (DON) im Ährenfusariose-Resistenzkomplex zu untersuchen. Es wurde eine neue Methode entwickelt, womit die DON-Resistenz quantifiziert werden kann. Signifikante Korrelationen zwischen den DON-Resistenz- und Ährenfusariose-Resistenzdaten in einer sich spaltenden doppelhaploiden Weizenpopulation wurden gefunden. Darüber hinaus wurde der biochemische Mechanismus der DON-Resistenz untersucht. Wir konnten zeigen, dass in Weizen das DON durch Bildung eines DON-Glukosekonjugates neutralisiert wird. Der QTL für die DON Resistenz und der *Qfhs.ndsu-3BS* mappen auf der gleichen Stelle auf Chromosom 3B.

Treffwörter: Ährenfusariose, Typ III Resistenz, Desoxynivalenol, DON-3-Glukoside

Zwei Weizenpopulationen wurden auf Resistenz gegenüber Desoxynivalenol (DON) und gegenüber Ährenfusariose getestet. Die erste Population umfasste 96 doppelhaploide (DH) Linien, hervorgehend aus einer Kreuzung zwischen 'CM82036' und 'Remus'. Alle vier QTL Klassen, abhängig von der Anwesenheit/Abwesenheit von *Qfhs.ndsu-3BS* und/oder *Qfhs.ifa-5A*, waren vorhanden (24 Linien in jeder Klasse inklusive den Eltern). Eine zweite Population (die SN Population) mit 120 Weizengenotypen wurde ebenfalls getestet. Diese Population umfasste neben den meisten bekannten hochresistenten Weizensorten Zuchtstämme und negative Kontrollen.

Beide Populationen wurden mit drei verschiedenen Methoden auf DON Resistenz getestet: 1) das Auslaufen von Elektrolyten aus Fahnenblattscheibchen, 2) Keimung von Samen und 3) DON Verabreichung in blühenden Ähren. Beide Populationen wurden intensiv während zwei Saisonen und an zwei Orten auf Ährenfusariose-Resistenz getestet. In einer ersten Methode wurde eine Sporensuspension zur Vollblüte auf die Weizenähren gesprüht. Die DH und die SN Populationen wurden mit 8 bzw. 3 Fusarienstämmen getestet. Befallshäufigkeit (Typ I Resistenz oder Resistenz gegen initieller Infektion) und Befallsstärke (Typ I+II Resistenz) wurden erfasst. Die Resistenz gegenüber einer Ausbreitung des Pilzes in die Ähre (Type II Resistenz) wurde nach Einzelährcheninokulation untersucht. Dazu wurden zwei Fusarienstämmen verwendet. In Ähren von ausgewählten Weizenlinien wurden die Konzentrationen an DON, DON-3-Glucosid und anderen Glucosidkonjugaten mit Hilfe der HPLC – Tandem-Massen-Spektrometrie bestimmt. QTL Analysen wurden mit den DON Resistenzdaten der DH Population durchgeführt. DON und Ährenfusariose-Resistenzdaten wurden verglichen (Korrelationsanalysen).

Die wichtigsten Schlussfolgerungen waren:

1) ANOVA Analysen zeigten hochsignifikante Unterschiede zwischen den Genotypen in beiden Populationen für alle drei DON Resistenztestmethoden, 2) DON Resistenz in der Ähre korreliert nicht mit DON Resistenz im Blatt oder Korn, 3) Verabreichen von DON in der Ähre verursacht typische Ährenfusariosesymptome, 4) 'Sumai3', 'Nobeokabozu' und deren Nachkommen zeigten ein hohes DON Resistenzniveau in der Ähre, 5) *Qfhs.ndsu-3BS* steigert die DON Resistenz in der Ähre (AUDPC wurde von 22.4 auf 3.2 AUDPC Einheiten reduziert), 6) *Qfhs.ndsu-3BS* war der einzige QTL für DON Resistenz (Ähre) in der DH Population (LOD = 53, $R^2 = 0.93$), 7) DON Resistenz in der Ähre korrelierte nur mit Typ II Resistenz ($r = 0.74$), 8); das DON-3-Glukosid wurde nach DON Applikation in der Ähre nachgewiesen, und 9) es wurde ein hochsignifikanter positiver Zusammenhang zwischen dem DON-3-Glucosid/DON Konzentrations-Verhältnis und der DON Resistenz in Toxin-behandelten Ähren gefunden ($R^2 = 0.84$). Wir vermuten, dass *Qfhs.ndsu-3BS* entweder für eine Glucosid-Transferase kodiert oder die Expression eines solchen reguliert. Es wurde daraus geschlossen, dass die DON Resistenz eine wichtige Rolle in der Gesamtresistenz gegenüber Ährenfusariose spielt. Für weitere Informationen wird der Leser auf Lemmens et al. (2005) verwiesen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Europäische Union unterstützt (Forschungsprojekt mit dem Titel 'Novel tools for developing Fusarium-resistant and toxin-free wheat for Europe', Kontrakt Nummer QLRT-2001-02044)

Literatur

Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterhazy, A., Krska, R., Ruckebauer, P. (2005) The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol co-localizes with a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *MPMI* 18, 1318-1324.

Autoren: M. LEMMENS*, U. SCHOLZ, Andrea KOUTNIK, H. BUERSTMAYR, P. RUCKENBAUER Universität für Bodenkultur, Wien, Department IFA-Tulln, Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Tulln, Österreich; Chiara DALL'ASTA, F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, R. KRSKA: Universität für Bodenkultur, Wien, Department IFA-Tulln, Analytikzentrum, Tulln, Österreich; G. ADAM: Universität für Bodenkultur, Wien, Department für angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Institut für angewandte Genetik und Zellbiologie, Wien, Österreich; A. MESTERHAZY: Cereal Research non-profit Co., Szeged, Ungarn.

*Korrespondierender Autor: PH: ++43-2272-66280-205, Email: marc.lemmens@boku.ac.at

Expression of a yeast acetyltransferase gene (*AYT1*) leads to increased deoxynivalenol (DON) resistance and 3-acetyl-deoxynivalenol (3ADON) formation in transgenic tobacco

*Expression einer Acetyltransferase aus Hefe (*AYT1*) führt zu erhöhter Resistenz gegen Deoxynivalenol (DON) und Bildung von 3-ADON in transgenem Tabak*

Shamsozoha ABOLMAALI, Hanna WEINDORFER, F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER,
M. LEMMENS, R. KRŠKA, Forough SANJARIAN, A. MOUSAVI and G. ADAM

Zusammenfassung

Ausgehend vom Befund dass die Überexpression der *AYT1* Acetyltransferase die DON Sensitivität einer *pdr5*-Hefemutante supprimieren kann, wurde untersucht ob transgene Pflanzen welche das *AYT1*-Gen überexprimieren, ebenfalls erhöhte Resistenz gegen DON aufweisen. Durch *Agrobacterium*-vermittelter Transformation hergestellte Linien von *AYT1*-transgenem Tabak zeigten erhöhte DON-Resistenz. Nur in diesen, nicht jedoch in Kontrollpflanzen, konnte nach DON Behandlung die Konversion von DON in das erwartete acetylierte Produkt 3-ADON beobachtet werden. Allerdings zeigte Tabak generell eine ausgeprägte Fähigkeit zugeführtes 3-ADON in DON zu hydrolysieren. Die Auswirkungen dieses "futile cycling" auf die Wirksamkeit der Überexpression von Acetyltransferase in transgenen Nutzpflanzen als Strategie zur Erhöhung der *Fusarium*-Resistenz wird diskutiert.

Summary

Based on our finding that overexpression of the yeast acetyltransferase gene (*AYT1*) leads to suppression of the DON sensitivity of yeast *pdr5* mutants, we tested whether overexpression in transgenic plants can also increase toxin resistance. Several transgenic tobacco lines generated by *Agrobacterium*-mediated transformation showed increased DON resistance. In these transgenic lines, but not in control transformants we observed formation of 3-ADON upon DON treatment. Tobacco showed a high intrinsic ability to hydrolyze applied 3-ADON into DON. The consequences of this futile cycling for attempts to increase *Fusarium* resistance in transgenic crop plants by overexpression of acetyltransferases are discussed.

Key words: Deoxynivalenol, 3-Acetyl-Deoxynivalenol, *Tri101*, transgenic wheat

Introduction:

The acetylation of trichothecenes at the C3-hydroxyl group strongly affects its toxicity. It has been shown for animal ribosomes (rabbit reticulocyte lysate in vitro translation system) that 3-acetyl-deoxynivalenol and 3-acetyl T-2 toxin are about 240x and 330x less inhibitory for protein synthesis

than the respective non-acetylated toxins DON and T-2 toxin (Kimura et al., 1998). The 3-O-acetyltransferase encoded by the *Fusarium Tri101* gene contributes to toxin self resistance (Kimura et al., 1999) and is necessary for later steps in trichothecene biosynthesis (McCormick et al., 1999). 3-ADON is activated into the more toxic DON by the *Tri8* gene product (McCormick & Alexander, 2002) which shows sequence similarity to secreted lipases.

The production of the mycotoxin DON is a virulence factor of *Fusarium graminearum* (Bai et al., 2002). One potential strategy to increase *Fusarium* resistance of plants is to convert DON into the less toxic 3-ADON. A *Fusarium* acetyltransferase has been patented by Syngenta (US 6,346,655 B1 „Trichothecene resistant transgenic plants“). The gene was introduced into wheat (Okubara et al., 2002) and field tests with transgenic plants were performed in several countries, for instance in Germany (http://www.biosicherheit.de/pdf/aktuell/weizen_syngenta060404.pdf) in 2003 and 2004.

Interestingly, a gene homologous to the *Fusarium Tri101* gene (45% identity) is also present in the genome of bakers yeast. The *AYT1* gene product has previously been shown to acetylate type A trichothecenes, but for yeast *ayt1* or *pdr5 ayt1* mutants unaltered trichothecene resistance compared to the parental strains was reported previously (Alexander et al., 2002). In contrast, we show here that *AYT1* is important for DON resistance of yeast and can be used to generate transgenic plants with increased DON resistance.

Results

We have overexpressed the *AYT1* gene in *pdr5* mutants of bakers yeast and observed suppression of the DON sensitivity phenotype, indicating that DON is converted into less toxic 3-ADON. We also performed gene disruption experiments. In *PDR5* wild-type strains reduced resistance was observed only at very high DON concentrations. In the *pdr5* mutant background *ayt1* mutants showed about 3-fold reduced resistance.

To test whether *AYT1* can be utilized to generate transgenic plants with increased resistance against the *Fusarium* toxin, we have placed the *AYT1* reading frame between the strong 35S promoter and the *Agrobacterium g7* terminator. The resulting binary plasmid was used to transform the model plant *Nicotiana tabacum* (cultivar Samsun NN). Transgenic plants were regenerated from kanamycin resistant callus and selfed. Homozygous lines were used for DON-resistance testing. Seedlings were germinated and transferred to liquid medium containing 10 mg/l (ppm) DON as described previously (Mitterbauer et al., 2004), and the increase in wet weight was measured. Control plants with an irrelevant transgene (GUS) did not grow and bleached out, in contrast to the *AYT1* transformants (see Figure 1).

We have also investigated whether the resistance phenotype is associated with 3-ADON formation. Cut leaves of *AYT1*-transgenic plants and controls were dipped into 10 mg/l DON and



Figure 1: Growth of seedlings transferred to MS medium containing 10 mg/l DON. Left: *AYT1* overexpressing transgenic plant. Right: control transformant, expressing the irrelevant glucuronidase transgene (GUS)

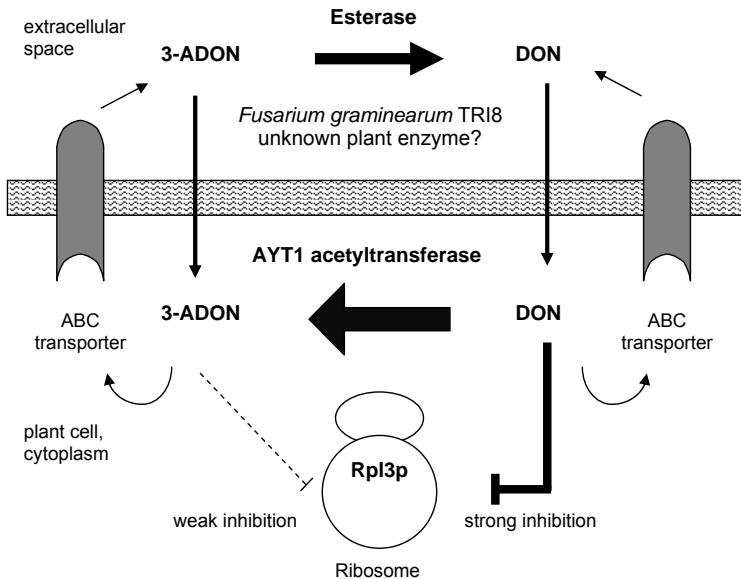


Figure 2: Model of AYT1 mediated protection. See discussion for details (Rpl3p: ribosomal protein L3, the target of trichothecenes).

3-ADON solutions, respectively. After uptake of 150 µl toxin solution (during 5 hours) the leaves were extracted and the toxins analyzed by LC-MS/MS.

While no 3-ADON was detected in DON treated control plants (vector pBI121), the acetylated derivative was found in low concentrations (5 pg/mg fresh weight) in *AYT1* plants. DON was still present in about 5-fold higher concentrations than 3-ADON. In the control plants treated with 3-ADON about equal amounts of DON and 3-ADON were found, indicating that 3-ADON can be efficiently hydrolyzed by tobacco esterases. In the *AYT1* transformed plants treated with 3-ADON also both toxins were found, but in most samples higher 3-ADON than DON contents were measured.

Discussion:

Our results show that yeast *AYT1* encodes an acetyltransferase capable of converting DON into less toxic 3-ADON. Overexpression of this gene in tobacco leads to increased DON resistance. What is surprising at first glance is that only a small fraction of DON in the treated plants was converted to 3-ADON. We hypothesize that most of the DON recovered from treated leaf material is transported in the vascular system and stays outside of the cells (for a model see Figure 2). Only DON that is passing the plasma membrane of plant cells is reaching its target, the ribosomes, and exerts its toxic effect by inhibiting protein biosynthesis. Both DON and 3-ADON are most likely also actively effluxed by plant *PDR5*-like ABC transporter proteins. The acetyltransferase encoded by *AYT1* supposedly converts nearly all of the intracellular DON into the far less inhibitory 3-ADON and therefore causes the resistance phenotype. Most likely the extracellular DON concentration is much higher than the intracellular one (in control plants) and unaffected by the intracellular acetyltransferase activity in *AYT1* transgenic plants.

Another factor affecting the DON to 3-ADON ratio are (presumably extracellular) plant esterases that rapidly hydrolyze 3-ADON into DON. Theoretically, the antagonistic esterase and acetyltransferase activities could lead to futile cycling, which should severely limit the efficacy of the acetyltransferase approach. The proposed compartmentation would explain why this does not seem to be a major problem. The yeast *AYT1* gene could become an interesting alternative for production of transgenic wheat, for instance by developing countries like Iran, as due to the sequence divergence, *AYT1* is not covered by the *Tri101* patent claim (75% or higher sequence identity). The *AYT1* gene protects also against nivalenol, which is important for countries like Iran, where DON and NIV producing *Fusarium* strains co-occur.

Acknowledgements:

This work was funded by grants from the Austrian Federal Ministry for Education, Science and Culture (GZ 309.007/3-VIII/B/8b/2000), the Iranian presidential Technology Cooperation Office, and the Christian Doppler Society. S.A. is recipient of a ÖAD fellowship (North-South Dialog).

References:

- Alexander NJ, McCormick SP, Hohn TM (2002) The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene AYT1(ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. *Yeast* 19: 1425-1430.
- Bai GH, Desjardins AE, Plattner RD (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98.
- Kimura M, Kaneko I, Komiya M, Takatsuki A, Koshino H, Yoneyama K, Yamaguchi I (1998) Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *J. Biol. Chem.* 273:1654-1661.
- Kimura M, Shingu Y, Yoneyama K, Yamaguchi I (1999) Features of Tri101, the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene, related to the self-defense mechanism in *Fusarium graminearum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1033-1036.
- McCormick SP, Alexander NJ (2002) *Fusarium Tri8* encodes a trichothecene C-3 esterase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2959-2964.
- McCormick SP, Alexander NJ, Trapp SE, Hohn TM (1999) Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5252-5256
- Mitterbauer R, Poppenberger B, Raditschnig A, Lucyshyn D, Lemmens M, Glössl J, Adam G (2004) Toxin-dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.* 2: 329-340
- Okubara PA, Blechl AE, McCormick SP, Alexander NJ, Dill-Macky R, Hohn TM (2002) Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theor. Appl. Genet.* 106: 74-83.

Authors: M. Sc. Shamszoha ABOLMAALI, Hanna WEINDORFER und Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM: Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, 1190 Wien; Dr. Franz BERTHILLER, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA: Analytikzentrum und Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln) , Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln; Ao. Univ. Prof. Dr. Marc LEMMENS: Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Department für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln) , Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln; M.Sc. Forough SANJARIAN, Ass. Prof. Dr. Amir MOUSAVI: National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pajohesh Blvd. Tehran -Karaj Highway, 14155-6343, Tehran, Iran

Identifizierung neuer DON-Resistenzgene von Weizen durch heterologe Expression von cDNAs in Bäckerhefe

Identification of new DON resistance genes from wheat by heterologous expression of cDNAs in bakers yeast

Doris LUCYSHYN, Hanna WEINDORFER, Eva WILHELM, M. LEMMENS und G. ADAM

Summary

The infection with pathogenic fungi of the genus *Fusarium* causes severe diseases on small grain cereals such as wheat or maize. The main problem arising from these infections is the contamination of the harvest with high amounts of mycotoxins bearing a health risk for humans and animals. The *Fusarium* toxins of the class of trichothecenes inhibit eukaryotic protein biosynthesis. The most frequently occurring trichothecene, deoxynivalenol (DON), is a virulence factor of *F. graminearum*, and toxin resistance is an important component of *Fusarium* resistance. In the study presented here new candidate toxin resistance genes from wheat could be identified using yeast as a model system. Several cDNAs conferring resistance when overexpressed in yeast were found, among them three suggesting a prominent role of the ubiquitin-proteasome protein degradation pathway in DON resistance.

Keywords: deoxynivalenol, wheat, resistance, ubiquitin

Zusammenfassung

Infektionen mit pathogenen Pilzen der Gattung *Fusarium* verursachen schwere Erkrankungen von Getreide wie Weizen und Mais. Das größte Problem dabei ist die Kontamination des Erntegutes mit Mykotoxinen, die ein hohes Gesundheitsrisiko für Menschen und Tiere darstellen. *Fusarium graminearum* bildet unter anderem Trichothecene, die sehr wirksam die Proteinbiosynthese hemmen. Eines der häufigsten dieser Mykotoxine, Deoxynivalenol (DON), wird vom Pilz als Virulenzfaktor genutzt, und andererseits ist Toxinresistenz eine wichtige Komponente der *Fusarium*-Resistenz von Weizen. In der hier vorgestellten Arbeit konnten mit Hefe als Modellsystem neue Kandidaten für DON-Resistenzgene aus Weizen identifiziert werden. Mehrere Gene, deren Überexpression in Hefe zu DON-Resistenz führt, deuten darauf hin, dass der Ubiquitin-Proteasom abhängige Proteinabbau eine wichtige Rolle in der DON-Resistenz spielt.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol, Weizen, Resistenz, Ubiquitin

Charakterisierung der selektierten cDNAs

Drei der selektierten cDNAs sind Teil des Ubiquitin-Proteasom System. Dieses System dient zum gezielten und sehr spezifischen Abbau von Proteinen in eukaryotischen Zellen, ein Mechanismus, der für viele grundlegende Vorgänge von großer Bedeutung ist. Zellentwicklung und Differenzierung sind ebenso vom kontrollierten Abbau bestimmter Proteine abhängig wie die Reaktion auf Änderung der Umweltbedingungen oder Stressantwort. In Hefe spielt das Ubiquitin-Proteasom System auch eine Rolle in der Reaktion auf Cycloheximid, einem Toxin, das sehr ähnlich wie DON die Proteinbiosynthese hemmt. Es ist bekannt, dass für Resistenz gegen Cycloheximid die Menge an frei verfügbaren Ubiquitinmonomeren wichtig ist. Die Menge an diesen Monomeren nimmt ab, wenn die Zellen Cycloheximid ausgesetzt werden. Durch Überexpression der Ubiquitinmonomere kann hingegen Resistenz gegen Cycloheximid erreicht werden (Hanna *et al.*, 2003).

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass ein Mangel an freien Ubiquitinmonomeren einen wichtigen Faktor in der Toxizität von Inhibitoren der Translation darstellt. Da DON eine vergleichbare Wirkungsweise zeigt wie Cycloheximid, kann diese Hypothese auch als Grundlage für neue Untersuchungen zur molekularen DON-Resistenz herangezogen werden. Die während des Screens für DON-Resistenz selektierten Transformanten wurden deshalb auch auf Resistenz gegen andere Translationsinhibitoren getestet. Dabei hat sich herausgestellt, dass die cDNAs, die aus dem Ubiquitin System stammen, bei Überexpression auch Kreuzresistenz gegen Cycloheximid verleihen.

Weiterführende Untersuchungen in Pflanzen sind notwendig um zu testen, ob das Ubiquitin-Proteasom System auch in Pflanzen an der zellulären Antwort auf DON und andere *Fusarium* Mykotoxine beteiligt ist, und ob die erzielten Ergebnisse neue Perspektiven für biotechnologische Ansätze zur Verbesserung der *Fusarium*resistenz von Nutzpflanzen eröffnen.

Danksagung

Die Finanzierung dieses Projekts erfolgte durch das Österreichische Genomforschungsprogramm (GEN-AU; GZ 200.051/6-VI/1/2002) und die Europäische Union (EU Projekt QLRT-2000-02044, FUCOMYR).

Literatur

Hanna J, Leggett DS, Finley D (2003) Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol* 23: 9251-9261

Autoren: Dr. Doris LUCYSHYN, Hanna WEINDORFER und Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM

Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, 1190 Wien

Univ. Doz. Dr. Eva WILHELM ARC Seibersdorf research, Biogenetics & Natural Resources, Biotechnology, A-2444 Seibersdorf

Ao. Univ. Prof. Dr. Marc LEMMENS Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Department für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln

Effekte von Zearalenon auf *Arabidopsis thaliana*

Ulrike WERNER, F. BERTHILLER, M. SULYOK, R. KRŠKA, Marie-Theres HAUSER,
R. SCHUHMACHER

Zusammenfassung:

Untersuchungen mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) weisen auf die Wirkungsmechanismen des Mykotoxins Zearalenon (ZON) hin und zeigen seine Metabolisierung in Pflanzen. Kontinuierliche ZON Exposition inhibiert das Wurzelwachstum von *in vitro* kultivierten *Arabidopsis* Keimlingen. Das Ausmaß der Wurzelwachstumshemmung korreliert mit der ZON Konzentration in den sterilen Agarnährböden, wobei primär die Zellstreckung und nicht die Zellteilungsrate inhibiert wird. Der unmittelbare Effekt von ZON auf den Zellstoffwechsel wurde mittels DNA-Microarray Expressionsanalyse durchgeführt, und zeigte die Aktivierung von Detoxifikationsgenen und Genen, die für bestimmte Stress-Reaktionen charakteristisch sind. In Übereinstimmung mit der Langzeitwirkung von ZON auf die Zellstreckung wurden Gene inhibiert, die bei der Zellwandmodifikation eine Rolle spielen. Die Metabolisierung von ZON in *Arabidopsis* wurde nach einmaliger ZON-Zugabe über eine Zeitdauer von 48 Stunden untersucht. ZON wurde innerhalb von 24 Stunden komplett aus dem Flüssigmedium aufgenommen und von *Arabidopsis* zu den schon bekannten Verbindungen, ZON-4-Glukosid (ZON-4-Glc), α -ZOL (Zearalenol), β -ZOL, ZON-4-Sulfat, α -ZOL-Glc, β -ZOL-Glc, sowie den bisher noch nicht beschriebenen Malonylglucosiden ZON-MalGlc, α -ZOL-MalGlc, β -ZOL-MalGlc, verschiedenen Dihexosiden ZON-DiHex, α -ZOL-DiHex, β -ZOL-DiHex, den Hexose-Pentosiden ZON-HexPent, α -ZOL-HexPent, β -ZOL-HexPent sowie einem Trihexosid β -ZOL-TriHex metabolisiert.

Schlüsselwörter: Zearalenon, ZON, *Arabidopsis*, Genexpression, Metabolisierung

Einleitung:

Das Mykotoxin Zearalenon (ZON) wird vor allem von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* (z.B. *F. graminearum*, *F. culmorum*) produziert, die Getreide wie Mais oder Weizen infizieren. Auf Mensch und Tier hat ZON durch seine hohe Affinität zum Östrogenrezeptor eine starke östrogene Wirkung (Kuiper et al., 1998). Die Bedeutung von ZON wurde 2005 durch die EU Verordnung bezüglich Mykotoxin-Höchstwerten in Lebensmitteln unterstrichen, indem maximale ZON-Gehalte z.B. für getreidebasierende Nahrungsmittel/Beikost von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Erwachsene und 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Säuglinge und Kleinkinder festgelegt wurden. Es wird vermutet, dass ZON als Virulenzfaktor die Abwehrmechanismen der *Fusarium* infizierten Pflanzen schwächt, wobei die Wirkung dieses Toxins auf den Pflanzenmetabolismus noch weitgehend unbekannt ist. Ziel unserer Untersuchungen war es, den Wirkungsmechanismus von ZON anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (A-

ckerschmalwand), mit besonderem Augenmerk auf die molekularen Vorgänge, aufzuklären. *Arabidopsis* ist aufgrund ihres kleinen, vollständig sequenzierten Genoms, der leichten Kultivierbarkeit und der kurzen Generationszeit die molekulargenetisch bestanalytisierte Pflanze. Da *Arabidopsis* von *F. graminearum* und *F. culmorum*, zwei wichtigen ZON-Produzenten, infiziert werden kann (Urban et al., 2002), eignet sie sich, um die mögliche Rolle von ZON zu untersuchen. Unsere Analysen zeigten erstmalig, dass auf ZON-hältigem Medium die Wurzelzellstreckung inhibiert wird und diese Inhibierung auch mit einer DNA-Microarray Genexpressionanalyse zu erkennen ist. Weiters konnten wir zeigen, dass ZON durch *Arabidopsis* aufgenommen und zu teilweise noch nicht beschriebenen (Zwischen-) Produkten metabolisiert werden kann.

Durchführung:

Pflanzenkultivierung auf Agarplatten und in Flüssigkultur

Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia, wurden auf sterilen Murashige und Skoog (MS, Sigma) Agarnährböden mit 4.5 % (m/v) Zucker (Agrana) bei 22 °C unter kontinuierlichem Licht (75 µmol/sm²) kultiviert (Hauser et al., 1995). Zehn Tage nach der Keimung wurden die Pflanzen steril in MS Flüssigmedium mit 2.5 % Zucker (m/v) überführt und nach drei Tagen einmalig mit 50 µM ZON behandelt. 10 mM ZON wurde dazu in 10 % DMSO, 0.01 N wässriger KOH-Lösung gelöst und in entsprechenden Mengen zum Agar oder Flüssigmedium zugegeben.

Bestimmung der Zellteilungsrate und der Zelllängen in der Wurzel

Zur Bestimmung der Zellteilungsrate im Wurzelmeristem wurden AtcycB1;1:CDB:GUS Pflanzen auf ZON-hältigen Agarnährböden kultiviert. Die AtcycB1;1:CDB:GUS Reporter-Linie erlaubt die Visualisierung und Quantifizierung von mitotischen Zellen in Wurzelmeristemen (Hauser und Bauer, 2000). Die GUS (Glucuronidase; GUS) Aktivitätsfärbung wurde in Puffer - 100 mM NaH₂PO₄ (Roth), 10 mM EDTA (Roth), 0.5 mM K₃[Fe(CN)₆] (Roth), 0.5 mM K₄[Fe(CN)₆] (Roth), 0.01 % Triton X-100 (Sigma) und 0.5 mg/ml X-Gluc (Roth) gelöst in 10 µl DMF (Fluka) - nach ein und zwei Stunden Inkubation bei 37°C gestoppt, und die blaugefärbten Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Ein Leica TCS SP2 Confocales Laser Scanning Mikroskop (CLSM) mit einem Argon Laser (488 nm) wurde verwendet, um die epidermalen Wurzelzelllängen nach Färbung mit Propidiumiodid (10 µg/ml in Wasser, Sigma) zu messen.

Microarray-Expressionsanalyse

Für die vier Affymetrix ATH1 GeneChips Analysen wurden jeweils 20 *Arabidopsis* Pflanzen mit 50 µM ZON für zwei und 24 Stunden inkubiert. Die gesamte RNA wurde mittels TRI Reagenz (MRC) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Um biologische Variationen auszugleichen, wurde das Experiment dreimal wiederholt und die RNAs zu gleichen Teilen (jeweils 20 µg) vereinigt und mit Biotin markiert. Die Markierung und Hybridisierung sowie die Normalisierung der Daten wurden am

NASC's Transcriptomics Service (Craigon et al., 2004) durchgeführt. Die Daten wurden mit EPCLUST und SOTA (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST/>, <http://ep.ebi.ac.uk/EP/SOTA/>) sowie Access und Excel (Microsoft) analysiert (Clusteranalyse, principal component analysis, etc.). Nur Gene mit mindestens zweifacher Induktion oder Inhibierung durch ZON wurden als signifikant bewertet.

ZON-Metabolisierung

Die Pflanzen wurden in Flüssigkultur für 0,5, 2, 5, 12, 24, 36 und 48 Stunden mit 50 µM ZON behandelt, mit Wasser gespült und mit 75 % wässrigem Acetonitril extrahiert. Spülwasser und Wachstumsmedium wurden vereinigt. ZON und ZON-Metaboliten in Pflanzenextrakten und Medien wurden mittels eines QTrap MS/MS, ausgestattet mit einer Turbo Ionspray (ESI) Ionenquelle, nach Auftrennung über Umkehrphasenchromatographie (Thermo Aquasil, auf einem Agilent 1100 HPLC System) detektiert und charakterisiert.

Ergebnisse und Diskussion:

ZON inhibiert das Wurzelwachstum

Arabidopsis reagiert auf eine kontinuierliche Exposition von 10 - 100 µM ZON mit einer Reduktion des Wurzelwachstums von 11 % bis 75 % (Abb. 1A). Um zu unterscheiden, ob das reduzierte Wurzelwachstum auf einer Inhibierung der Zellteilung und/oder der Zellstreckung beruht, wurde mit Hilfe einer Reporter-Linie (AtcycB;B1:CDB:GUS) die Aktivität des Wurzelmeristems quantifiziert (Abb. 1B). Gleichzeitig wurde die epidermale Zellstreckung im CLSM bestimmt und zeigte, dass das reduzierte Wurzelwachstum primär auf die Inhibierung der Zellstreckung zurückzuführen ist.

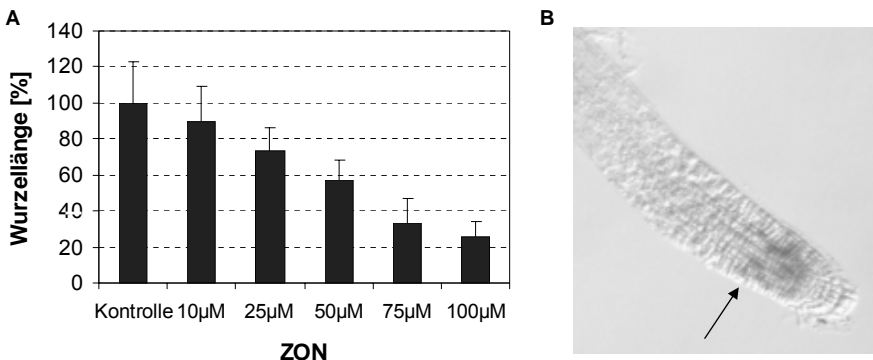


Abbildung 1: A, Wurzellänge von sieben Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen auf Agarnährmedien mit steigenden ZON-Konzentrationen (n=20 bis 40). B, Wurzelmeristem von AtcycB;B1:CDB:GUS Keimlingen mit blau gefärbten mitotischen Zellen (Pfeil).

ZON induziert Veränderungen der genomweiten Genaktivität

Die Microarray (GeneChips) Technologie erlaubt die gleichzeitige Quantifizierung der Genexpression von ca. 90 % der Arabidopsis Gene (ca. 23 000), und die Erstellung von Genomaktivitätsprofilen. Um Kurzzeit- (2 Std.) und Langzeiteffekte (24 Std) von ZON auf die Genexpression in *Arabidopsis* zu identifizieren, wurden Affymetrix ATH1 GeneChips verwendet. Nach zweistündiger ZON-Behandlung zeigten 495 Gene eine mindestens zweifache Induktion (219 Gene) oder Repression (276 Gene), wohingegen nach 24 Stunden nur 161 Gene induziert (52 Gene) oder reprimiert (109 Gene) waren. Die Genregulation erfolgte dabei in zwei Stufen, einer Kurzzeit- und einer Langzeit-Reaktion, da kaum Gene zu beiden Zeitpunkten synchron reguliert waren.

Interessanterweise zählt ein Großteil der reprimierten Gene zu Komponenten, die für Zellwandmodifikationen verantwortlich gemacht werden, wie Verstärkung oder Längenwachstum der Zellwand. Auch die Expression von Peroxidasen wurde stark gehemmt, sowie einige Gene, die mit der Abwehr von Pathogenen in Verbindung stehen.

Die Funktionen der induzierten Gene (z. B. Hitzeschock-Proteine, Toxin-Transporter, Cytochrome P450) lassen dagegen auf die Aktivierung von Detoxifikationsmechanismen in der Pflanze schließen, sowie auf die Aktivierung von Stress-Reaktionen, ähnlich der Reaktion auf Hitze, Kälte, hohe Salzkonzentrationen oder oxidativen Stress.

ZON wird in *Arabidopsis* rasch metabolisiert

Zur Untersuchung der Metabolisierung von ZON wurde *Arabidopsis* in Flüssigkultur mit 50 µM ZON behandelt und 0.5 bis 48 Stunden kultiviert. Im Medium konnten ZON, ZON-4-Glc, ZON-4-Sulfat und in geringen Konzentrationen α-ZOL und β-ZOL nachgewiesen werden (Abb. 2A). Im Pflanzenextrakt wurden zusätzlich α-ZOL-Glc, β-ZOL-Glc, ZON-MalGlc, α-ZOL-MalGlc, β-ZOL-MalGlc, ZON-DiHex, α-ZOL-DiHex, β-ZOL-DiHex, ZON-HexPent, α-ZOL-HexPent, β-ZOL-HexPent und β-ZOL-TriHex, insgesamt 17, zum Teil noch nicht beschriebene ZON-Metaboliten identifiziert (Abb. 2B und C). Bei den gefundenen Di- und Trihexosiden handelt es sich vermutlich um Glukoside, bei den Hexose-Pentosiden vermutlich um Glukose-Xyloside. Die Aufklärung der exakten Molekülstruktur der gebildeten Konjugate steht noch aus. Die Ergebnisse zeigen, dass nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden kaum mehr ZON im Medium zu finden ist. Phase I Metabolismus führt zur Bildung von α-ZOL und β-ZOL, die, wie ZON, zu Phase II Metaboliten konjugiert werden. Nach ca. 5 Stunden nimmt die intrazelluläre Konzentration von ZON-4-Glc ab und die Konzentrationen von ZON-DiHex, ZON-MalGlc und ZON-HexPent zu. Die vorgeschlagene Metabolisierung von ZON in *Arabidopsis* mit einem Überblick über alle gefundenen ZON-Metaboliten ist in Abb. 2D dargestellt.

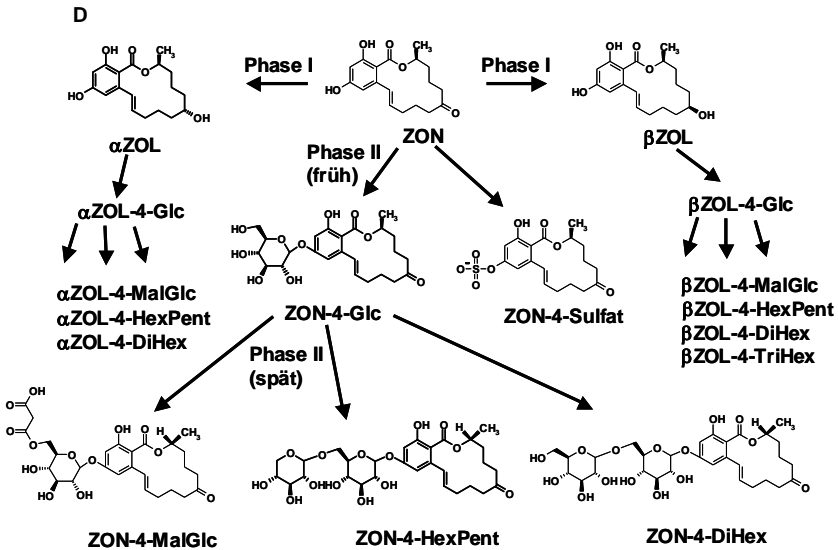
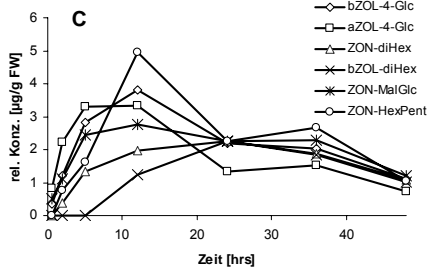
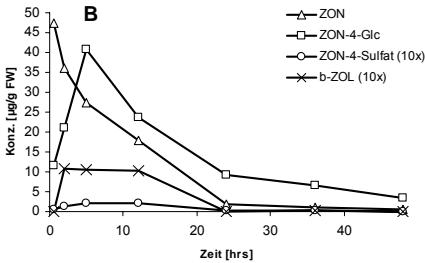
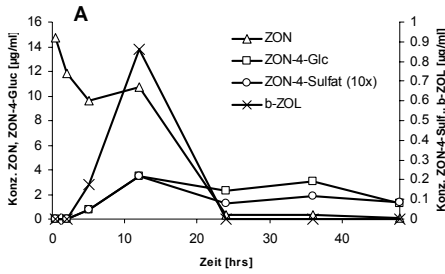


Abbildung 2: A, ZON und ZON-Metaboliten im Wachstumsmedium; B, ZON und quantifizierbare ZON-Metaboliten im Pflanzenextrakt; C, (aufgrund fehlender Standards nur relativ quantifizierbare) ZON-Metaboliten im Pflanzenmedium. D, Überblick über die vorgeschlagene Metabolisierung von ZON in *Arabidopsis*.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei Prof. Dr. Gerhard Adam für die gelungene Koordination des GEN-AU Projektes "Virulence mechanisms of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum* and resistance mechanisms in host plants", sowie beim Österreichischen Genomforschungsprogramm (GEN-AU) des BM:BWK, der Christian Doppler Forschungsgesellschaft, dem FWF (Projekt Nr. 16410) und der Niederösterreichischen Landesregierung (Technopol Tulln) für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Craigon D., James N., Okyere J., Higgins J., Jotham J. & May S., 2004. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res* **32**: D575-7.

Hauser M-T. & Bauer E., 2000. Histochemical analysis of root meristem activity in *Arabidopsis thaliana* using a cyclin:GUS (β -glucuronidase) marker line. *Plant and Soil* **226**: 1-10.

Hauser M-T., Morikami A. & Benfey P., 1995. Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development* **121**: 1237-1252.

Kuiper G., Lemmen J., Carlsson B., Corton J., Safe S., van der Saag P., van der Burg B. & Gustafsson J., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**(10): 4252-63.

Urban M., Daniels S., Mott E. & Hammond-Kosack K., 2002. *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant J* **32**: 961-973.

Autoren: DI Ulrike WERNER und Ao. Univ. Prof. Dr. Marie-Theres HAUSER, Institut für angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien
Mag. Franz BERTHILLER, Dr. Michael SULYOK, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA und Dr. Rainer SCHUHMACHER, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Analytikzentrum, Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Entwicklung einer LC-MS/MS Multi-Toxin Methode mit dem Q-TRAP 4000 System

Development of a LC-MS/MS Multitoxin Method Using the Q-Trap 4000 System

M. SULYOK, F. BERTHILLER, R. KRŠKA und R. SCHUHMACHER

Zusammenfassung / Summary:

Die entwickelte HPLC-MS/MS Methode erlaubt eine schnelle und simultane Bestimmung von 39 Mykotoxinen im µg/kg-Bereich in Lebens- und Futtermitteln. Die enorme Empfindlichkeit und die Robustheit des Systems ermöglicht eine vereinfachte und schnelle Probenvorbereitung.

The developed HPLC-MS/MS method is suitable for a simultaneous determination of 39 mycotoxins in food and feed at the µg/kg-level. Due to the excellent sensitivity and the robustness of the system the sample preparation may be kept very fast and simple.

Schlüsselwörter / Key words: LC-MS/MS; Mykotoxine/mycotoxins; Weizen/wheat;

Einleitung:

Unter dem Begriff „Mykotoxin“ wird eine beträchtliche Anzahl von in ihrer chemischen Struktur sehr unterschiedlichen Sekundärmetaboliten von Schimmelpilzen zusammengefasst. Dies hat dazu geführt, dass in der Literatur eine Vielzahl von Analysemethoden für einzelne Substanzen oder Substanzklassen beschrieben ist. Da in neueren Untersuchungen (Speijers et al.) aber vermehrt synergistische Effekte verschiedener Mykotoxine betreffend ihres Gefahrenpotentials festgestellt wurden, ist das Interesse an Methoden gestiegen, die das gesamte Spektrum an relevanten Substanzen erfassen können. Ein solch umfangreiches Verfahren bringt auch den Vorteil mit sich, dass verschiedenste Fragestellungen in einer Analysensequenz abgearbeitet werden können.

Die besondere Herausforderung bei der Entwicklung einer Multi-Methode besteht in der chemischen Diversität der Analyten, welche sowohl apolaren (Enniatine), sauren (Moniliformin) als auch basischen (Mutterkornalkaloide) Charakter aufweisen können. Aus diesem Grund können die Bedingungen während der Probenaufarbeitung nur einen Kompromiss darstellen. Weiters ist die Anwendung eines generischen, selektiven und sensitiven Detektionsprinzips erforderlich, weswegen in der Literatur ausschließlich die Anwendung von HPLC/MS-basierenden Methoden für die simultane Bestimmung mehrerer Mykotoxin-Klassen beschrieben ist (Sørensen und Elbæk, Cavaliere et al., Berthiller et al.). In dieser Arbeit wurde eine LC-MS/MS basierende Methode entwickelt, die eine simultane Bestimmung aller relevanten Mykotoxine (Trichothecene, Aflatoxine, Zearalenon-Derivate, Ochratoxine, Fumonisine, Beauvericin und Enniatine, Mutterkorn-Alkaloide, Moniliformin und Patulin) in Lebens- und Futtermitteln erlaubt.

Durchführung:

Optimierung der LC-MS/MS Methode:

Durch Infusion von Einzelstandards der Analyten mittels einer Spritzenpumpe wurden zunächst die massenspektrometrischen Parameter (Masse der Mutter- und Tochterionen, Declusteringpotential, Kollisionsenergie, Zellaustrittspotential) aller Analyten optimiert. Die so ermittelten MRM-(multiple reaction monitoring-) Übergänge werden während des chromatographischen Laufes sequentiell für jeweils 25ms pro Reaktion abgetastet. Die Auswahl der stationären Phase bzw. der chromatographischen Parameter erfolgte nach den Kriterien einer möglichst schnellen und vollständigen Trennung aller Analyten, akzeptabler Peakformen der problematischen Substanzen (z.B. Fumonisine) und einer ausreichenden Retention der sehr polaren Mykotoxine wie Moniliformin.

Ermittlung der Kenndaten der Methode:

Zur Überprüfung des linearen Bereichs und zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurde eine 7-Punkt-Kalibration über einen Konzentrationsbereich von 3 Größenordnungen aufgenommen. Die Nachweisgrenze wurde aus dem Signal/Rauschverhältnis der kleinsten detektierbaren Konzentration abgeschätzt ($NWG=3\sigma$). Um den Einfluß der Matrix auf die Detektionsempfindlichkeit zu untersuchen, wurden die Standards 1:1 mit einem verdünnten Weizenextrakt (10g gemahlener Weizen wurden mit 40 ml Acetonitril/Wasser 84/16 extrahiert, 1:10 mit Eluent A verdünnt und filtriert) versetzt und ebenfalls eine Kalibrationskurve aufgenommen. Das jeweilige Verhältnis der beiden Steigungen der Kalibrationskurven mit und ohne Matrix diente als Maß für den Einfluß der Matrix auf die Empfindlichkeit der Endbestimmung.

Ergebnisse und Diskussion:

Es konnten für alle Analyten auswertbare Fragmentierungsreaktionen gefunden werden, wobei im Falle der A-Trichothecene und der Enniatine eine starke Neigung der nativen Analyten zur Adduktbildung mit Natrium festgestellt wurde. Einige dieser Addukte zeigen keine Fragmentionen, weswegen ihre Entstehung durch Zugabe von Ammoniumacetat und der Bildung der entsprechenden Ammoniumaddukte unterdrückt wurden. Bei der Entwicklung der chromatographischen Methode zeigte sich, dass ein saurer pH-Wert absolut notwendig für symmetrische HPLC-Peaks der Fumonisine ist, weswegen beide Eluenten neben 5mM Ammoniumacetat auch 1% Essigsäure enthalten. Als stationäre Phase hat sich die Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5µm) als günstig erwiesen, da sie neben akzeptablen Peakformen für die Fumonisine auch noch die höchste Retention für Moniliformin ($k'=1.3$) zeigte. Der Gradient der mobilen Phase läuft von 10% auf 97% Methanol zwischen Minute 2 und 14, gefolgt von 3 Minuten Verweilzeit bei 97% und 4 Minuten Reequilibrierung bei 10% Methanol. Die relativen Empfindlichkeiten der einzelnen Analysesubstanzen sind für den positiven bzw. den negativen Ionisierungsmodus sehr unterschiedlich,

weswegen 2 LC-MS/MS Bestimmungen pro Probe erforderlich sind, um alle 39 ausgewählten Mykotoxine erfassen zu können (siehe Abb. 1).

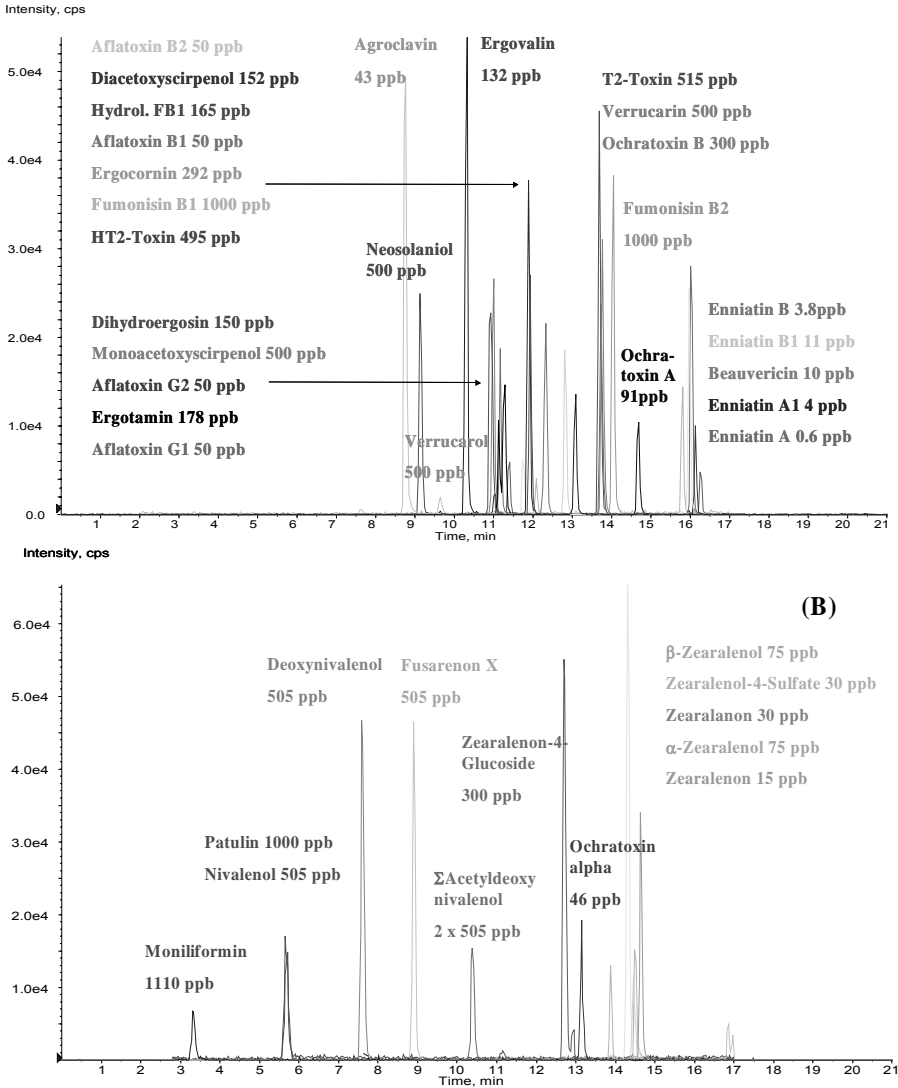


Abbildung 1:
LC-ESI-MS/MS MRM Chromatogramm im positiven (oben) und negativen (unten) Modus

Die Matrix zeigte in der gewählten Verdünnung keinen Einfluß, die relativen Signalintensitäten bezogen auf einen Standard in reinem Lösungsmittel lagen zwischen $100 \pm 10\%$, lediglich Moniliformin, Aflatoxin G2 und HT2-Toxin wiesen Abweichungen von bis zu 20% auf. Die erreichten Nachweisgrenzen lagen je nach Substanzklasse zwischen 0.05 und 5 µg/L in der injizierten Lösung (entspricht 2 - 200 µg/kg Weizen bei der verwendeten Verdünnung), lediglich für Moniliformin, Patulin und Verrucarol war die Empfindlichkeit um eine Größenordnung geringer. Für die meisten Substanzklassen liegen die Nachweisgrenzen bereits unter den entsprechenden von der EU festgelegten Grenzwerten, während für die Aflatoxine noch eine Verbesserung der Empfindlichkeit erzielt werden muß. Dies könnte z.B. durch eine geringere Verdünnung des Rohextrakts erreicht werden.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Land Niederösterreich und der Christian Doppler Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung sowie bei Biopure Referenzsubstanzen GmbH und Dr. Marika Jestoi vom EELA Helsinki, Finnland, für die Bereitstellung von Standardsubstanzen.

Literatur:

Berthiller F., Buttinger G., Schuhmacher R. & Krska R., 2005: Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1062** (2): 209-216.

Cavaliere C., Foglia P., Pastorini E., Saperi R. & Lagana A., 2005. Development of a multiresidue method for analysis of major *Fusarium* mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19** (14): 2085-2093.

Speijers G.J.H. & Speijers M.H.M., 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters* **153** (1): 91-98.

Sørensen L.K. & Elbæk T.H., 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **820**: 183-196.

Autoren: Dr. Michael SULYOK, Mag. Franz BERTHILLER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Herstellung von zertifizierten Kalibrationslösungen für die Analytik von Deoxynivalenol und anderen B-Trichotheceen

Production of certified calibrants for the analysis of deoxynivalenol and other B-trichothecees

Elvira WELZIG, R. KRŠKA

Summary

(Certified) reference materials enable the traceability and comparability of analytical results. For laboratories dealing with mycotoxin analysis, both matrix reference materials as well as certified calibrants are available. Systematic errors resulting from calibration with inconvenient calibrants can be avoided through a regular check by means of certified calibrants. Within the EU-funded project "Feasibility study for the production of certified calibrants for the determination of deoxynivalenol and other B-trichothecees" calibrants for deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) as well as 3-acetyl-deoxynivalenol (3-Ac-DON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15-Ac-DON) were processed and subjected to a thorough purity assessment. Subsequently, calibrants were gravimetrically prepared and the mass concentration was checked. Transport and storage conditions of the calibrants were checked in short term and long term stability studies. The project was concluded with the performance of an interlaboratory study. The calibrants were certified on the basis of their gravimetric preparation and uncertainties were calculated accordingly. This article describes the steps necessary to produce certified calibrants for B-trichothece analysis.

Keywords

Reference material, calibrant, deoxynivalenol, trichothece

Zusammenfassung

(Zertifizierte) Referenzmaterialien ermöglichen die Rückführbarkeit und Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen. Für Laboratorien, die Mykotoxinanalytik betreiben, stehen sowohl Matrixreferenzmaterialien als auch zertifizierte Kalibrationslösungen zur Verfügung. Diese helfen, systematische Fehler, die durch Kalibrierung mit ungeeigneten Kalibranten entstehen, zu verhindern. Im Zuge des EU-Projektes „Machbarkeitsstudie für die Herstellung von zertifizierten Kalibrationslösungen für die Bestimmung von Deoxynivalenol und anderen B-trichotheceen“ (Feasibility study for the production of certified calibrants for the determination of deoxynivalenol and other B-trichothecees) wurden Kalibrationslösungen für Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV) als auch 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-Ac-DON) und 15-Acetyl-Deoxynivalenol (15-Ac-DON) hergestellt und einer sorgfältigen Reinheitsbestimmung unterzogen.

Die Homogenität der Lösungen als auch die nötigen Transportbedingungen und ihre Lagerfähigkeit wurden durch entsprechende Studien gewährleistet. Ein internationaler Laborvergleichstest rundete das Projekt ab, aufgrund der hohen Ausreißerquote wurden die Kalibrationslösungen für DON

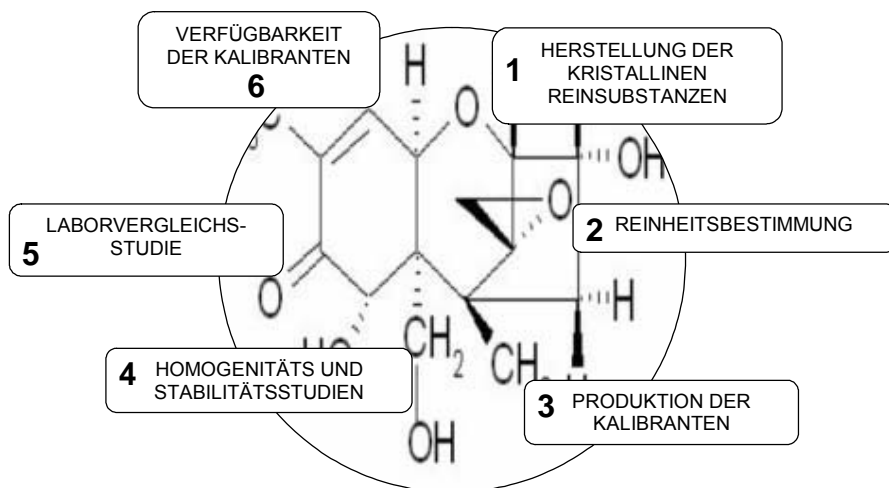
und NIV aber auf der Basis ihrer gravimetrischen Herstellung zertifiziert und die Messunsicherheit wurde entsprechend ermittelt. Dieser Artikel beschreibt den Prozess der Entwicklung zertifizierter Kalibrationslösungen für die B-Trichotheceanalytik.

Schlüsselwörter

Referenzmaterial, Kalibrant, Deoxynivalenol, Trichothece

Einleitung

Die Herstellung von zertifizierten Referenzmaterialien ist ein langwieriger Prozess. Im Rahmen des EU-Projekts GRD1-2002-70018 wurden 2 Jahre für die Herstellung von Kalibrationslösungen für die B-Trichotheceanalytik veranschlagt. Fünf Hauptpartner und weitere 7 europäische Laboratorien nahmen am Projekt und am abschließenden Ringversuch teil. Die wichtigsten Schritte für die Herstellung einer zertifizierten Kalibrationslösung sind die Herstellung der kristallinen Reinsubstanzen in entsprechend hoher Reinheit (mindestens >97%), eine Reinheitsbestimmung mit Hilfe der geeigneter instrumenteller Analytik, Homogenitäts- und Stabilitätsstudien und ein Laborvergleichstest. Der Prozess ist in Grafik 1 schematisch dargestellt.



Grafik 1. Schematische Darstellung der Produktion zertifizierter Kalibrationslösungen.

Herstellung der kristallinen Reinsubstanzen

Für die Herstellung der kristallinen Reinsubstanzen wurde *Fusarium graminearum* DSMO 4528 in Reiskulturen kultiviert. Der anschließenden Isolierung der Substanzen Deoxynivalenol (DON), Ni-

valenol (NIV) als auch 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-Ac-DON) und 15-Acetyl-Deoxynivalenol (15-Ac-DON) folgte eine Aufreinigung mittels MPLC und sukzessivem Umkristallisieren.

Reinheitsbestimmung

Die Identität der hergestellten Trichothecene wurde mittels ¹H und ¹³C NMR und FTIR/ATR und dem Vergleich mit bekannten Spektren aus der Literatur überprüft. Die Reinheit bzw. der Grad an Verunreinigungen und ihre Identität wurden mittels UV-Spektroskopie, Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD), Flammenionisationsdetektor (GC-FID) und massenspektrometrischem Detektor (GC-MS) also auch mittels HPLC-UV, HPLC-MS/MS, Ionenchromatographie und dynamischer Differentialkalorimetrie (DSC) durchgeführt. Anschließend wurden die durchschnittlichen Reinheiten mit entsprechender Messunsicherheit von 97.8±2.1% für NIV, 98.4±1.4% für 15-Ac-DON, 99.2±0.8/-1.1% für 3-Ac-DON und 99.0±1.0% für DON berechnet [1].

Produktion der Kalibranten

Die Kalibranten wurden gravimetrisch in Acetonitril hergestellt und mittels einer ROTA R910/PA Ampulliermaschine (Wehr/Baden, DE) automatisch ampulliert. Anschließend wurden die Ampullen auf Defekte überprüft.

Homogenitäts- und Stabilitätsstudien

Grundsätzlich werden zweierlei Stabilitätsstudien durchgeführt: Kurzzeitstudien sind erforderlich, um Transportbedingungen zu definieren und Langzeitstudien, um die Lagerfähigkeit zu bestimmen. Dazu werden Ampullen zu gewissen Zeitpunkten (z.B. 0, 3, 6 und 12 Monate) tiefgefroren und schließlich gemeinsam analysiert. Die Stabilität aller Toxine bis 40 °C über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten wurde durch die Studien bestätigt. Als Transportbedingung ist Raumtemperatur ausreichend. Zusätzlich konnte in den Homogenitätsstudien hinlängliche Homogenität und keinerlei Trend bezüglich Herstellungs- und Abfüllreihenfolge beobachtet werden.

Ringversuch

In der Regel wird ein Referenzmaterial auf der Basis eines internationalen Ringversuches evaluiert und zertifiziert. Zu diesem Zweck wurden die hergestellten Kalibrationslösungen und speziell angefertigte Proben zur Analyse versandt. Im Ringversuch dieses Projekts wurden die Kalibrationslösungen dann mit anderen, von den Teilnehmern selbst hergestellten Lösungen verglichen. Es war klar erkennbar, dass sich die Variationkoeffizienten bei der Verwendung des versandten Kalibranten deutlich verringerten CV (8.2 ± 3.1)% im Gegensatz zu (12.8 ± 4.1)% für denselben Typen von Kalibrationslösung. Aufgrund der hohen Quote an Ausreißern speziell im Bereich der GC-Analytik [2] wurde jedoch nicht der Ringversuch, sondern die gravimetrische Herstellung zur Zertifizierung und Berechnung der Messunsicherheit herangezogen.

Verfügbarkeit der Kalibranten

Die im Rahmen des Projektes hergestellten Ampullen sind ab Anfang 2006 am IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, JRC-IRMM, Geel, Belgien) erhältlich. Eine vollständige Liste aller im Bereich Mykotoxine erhältlichen und im Herstellungsprozess befindlichen Referenzmaterialien ist auf der [CORDIS-Homepage](http://cordis.europa.eu) zusammengestellt und findet sich auch auf der [Homepage des IRMM \(www.irmm.jrc.be\)](http://www.irmm.jrc.be), der [IAEA \(www.iaea.org\)](http://www.iaea.org), und des [NIST \(http://patapsco.nist.gov/srmcatalog/about/proram_info.htm\)](http://www.nist.gov). Eine solche Liste ist selbstverständlich auch über die internationale Datenbank für Referenzmaterialien, [COMAR \(www.comar.bam.de\)](http://www.comar.bam.de), weltweit der umfassendste Katalog erhältlicher Referenzmaterialien, abrufbar.

Literatur

- [1] R. Krska, R.C. Schothorst, H.P. van Egmond, R.D. Josephs, J. Lepschy, H. Pettersson, D. Chan, F. Berthiller, R. Schuhmacher, W. Kandler, A. Parich, E. Welzig (2005) Processing and Purity Assessment of Standards for the Analysis of Type-B Trichothecene Mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, 1848-1858
- [2] E. Welzig, E. Drs, R. D. Josephs, R. C. Schothorst, H. P. van Egmond, H. Pettersson, D.Chan, R. Krska (2005) Type-B Trichothecene calibrants: Comparison of HPLC and GC-results within an intercomparison study. *Mycotoxin Research*, im Druck

Autoren: Elvira Welzig, Rudolf Krska: Analytikzentrum, Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln, Österreich

Praktische Erfahrungen mit DOM-1 in der GC-Routineanalytik von Trichothecenen

Practical experience using DOM-1 for routine analysis of trichothecens

W. BRODACZ

Zusammenfassung

Es wurde die Tauglichkeit von DOM-1 als interner Standard für die Routineanalytik von Trichothecenen mittels GC-ECD anhand von rund 1000 Realproben und 32 Validierungsproben geprüft. Eine uneingeschränkte Eignung dafür konnte nicht festgestellt werden. Abgesehen von der Kostenfrage wäre eine Verwendung von DOM-1 als Surrogate mit Dotierung unmittelbar nach der Extraktion wünschenswert.

Schlüsselwörter: DOM-1 Trichothecene GC Interner Standard Surrogate

Die Verwendungen eines internen Standards bzw. Surrogate zählt zu den wesentlichen Verbesserungs- bzw. Qualitätssicherungsmaßnahmen einer Analysenmethode, da sie bei jeder einzelnen Probe greift. Surrogates und interne Standards (IStd) müssen sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr ähnlich verhalten wie die Zielanalyten (1). Die Anforderungen an einen IStd sind dabei jedoch wesentlich höher angesiedelt, sodass nahezu völlig idente Eigenschaften vorausgesetzt werden. Meist können nur Substanzen sehr ähnlicher Struktur (Stellungsisomere etc.) diese Ansprüche erfüllen. Der ideale interne Standard ist die isotope markierte Zielkomponente selbst. Sie besitzt praktisch gleiche chemische und physikalische Eigenschaften und verhält sich folglich bei allen Aufarbeitungsschritten ident mit der nativen Ausgangsverbindung. Der Probe vor der Analyse zugegeben, stellt sie einen zuverlässigen internen Standard dar, mit dem präzise Auswertungen möglich sind (Isotopen-verdünnungsanalyse). Besonders bei Analyten, die vor der GC-Bestimmung derivatisiert werden müssen, ist eine isotope markierte Variante als interner Standard von besonderem Vorteil (z.B. Drogenanalytik, Trichothecene). Damit kann die durch die Derivatisierung verursachte Verschlechterung der Reproduzierbarkeit von Quantifizierungen bei jeder Probe individuell ausgeglichen werden. Leider sind isotope markierte Verbindungen noch für wenige Applikationen verfügbar, bzw. mit entsprechenden Kosten verbunden. Verhält sich ein potentieller IStd nicht in allen Aspekten ausreichend gleichwertig wie der Zielanalyt, kann er gegebenenfalls als Surrogate eingesetzt werden. D.h. er dient mit seinen weitreichend ähnlichen Eigenschaften als Stellvertreter. Nach externer Standardauswertung steht seine Rückgewinnung zur Beurteilung bzw. Dokumentation der Quantifizierung der Zielanalyten bei jeder Probe zur Verfügung.

Mit der kommerziellen Verfügbarkeit von DOM-1 (Deepoxy-Deoxinivalenol; Fa. Biopure) schien ein geeigneter IStd für die (B-) Trichothecenen-Analytik gefunden zu sein. Die sehr ähnliche Struktur, die geringe Toxizität und hohe Reinheit bei moderaten Kosten rechtfertigten einen umfangreichen Praxistest. Die Einbindung von DOM-1 in die aufwendig optimierten GC-Chromatogramme sind aufgrund dessen frühen Elution ohne wesentliche Änderungen möglich. Dies gilt sowohl für die

perfluoracylierten A-Trichothecene (Abb.1), als auch für die silylierten B-Trichothecene (Abb.2). Während auf der langen unpolaren Säule ausreichend Abstand zwischen DOM-1 und den früheluerenden Matrixpeaks vorhanden ist, kommt HFBI-derivatisiertes DOM-1 bei der kurzen polaren Kapillare schon in den Ausläufern des Matrixpeakbereichs.

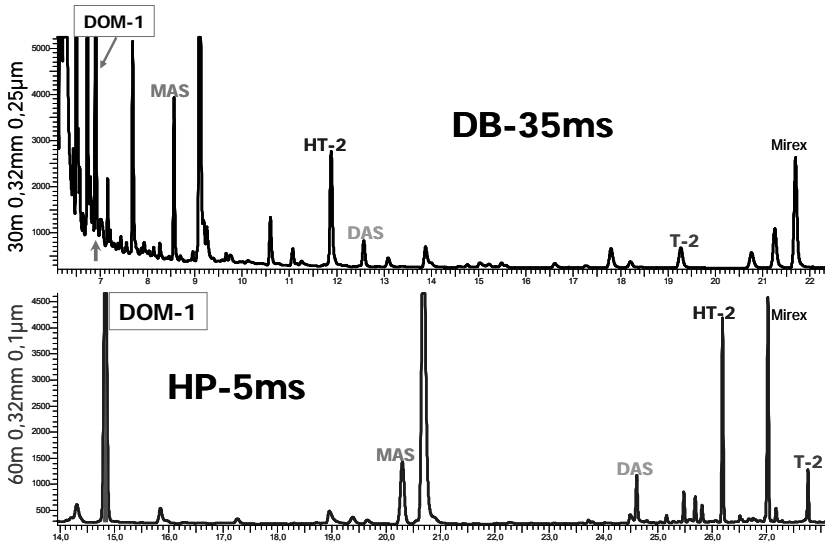


Abb. 1: ECD-Chromatogramme von DOM-1 mit 4 A-Trichothecenen (je ca. 0,7 mg/kg Mais) als HFB-Derivate auf 2 unterschiedlich polaren GC-Phasen

Die Zugabe einer definierten Menge DOM-1 direkt zur Einwaage wäre aus analytischer Sicht die optimalste Variante, ist aus Kostengründen jedoch nicht realisierbar. Die Dotierung zu einem definierten Rohextraktaliquot als zweitbeste Möglichkeit ist infolge der zusätzlichen Manipulation und der noch immer relativ hohen Kosten nur schwer vertretbar, obwohl der Informationsgewinn, d.h. der Grad der Gesamtkontrolle über das Verfahren bei diesen Varianten am höchsten wäre. Eventuelle Unregelmäßigkeiten bzw. Verluste bei Aliquotierungen und Einengungen, beim clean up und bei der Derivatisierung könnten lückenlos überwacht werden. Eine Dotierung nach dem MycoSep - clean up ist kostenseitig akzeptabel, lässt allerdings keinerlei Rückschluss auf diesen wichtigen Verfahrensschritt zu. Die wirtschaftlichste Variante entspricht der DOM-1-Zugabe direkt zur Derivatisierung. Daher sollte in einem Praxistest mit über 1000 Realproben (Zerealien) die Verwendbarkeit von DOM-1 als Istd zur Kontrolle von Derivatisierung und anschließender Gaschromatographie geprüft werden. Bei jeder Sequenz wurden je 6 - 9 Kalibrierstandards (mit den 5 B- bzw. 4 A-Trichothecenen) ebenso wie die Proben kurz vor der Derivatisierung mit DOM-1 dotiert. Die damit quantifizierten Rückgewinnungen (externe Standardauswertung) von DOM-1 sind in Tab.1 nach Derivatisierungsverfahren getrennt angeführt.

Während bei Kontrollanalysen ohne Matrix (wie z.B. Blindwerte) erwartungsgemäß rund 100 % Recovery verzeichnet wurden, kommt es sowohl bei der Silylierung, als auch bei der Perfluoracylierung in Gegenwart von Matrix zu leicht erhöhten Rückgewinnungsraten von DOM-1.

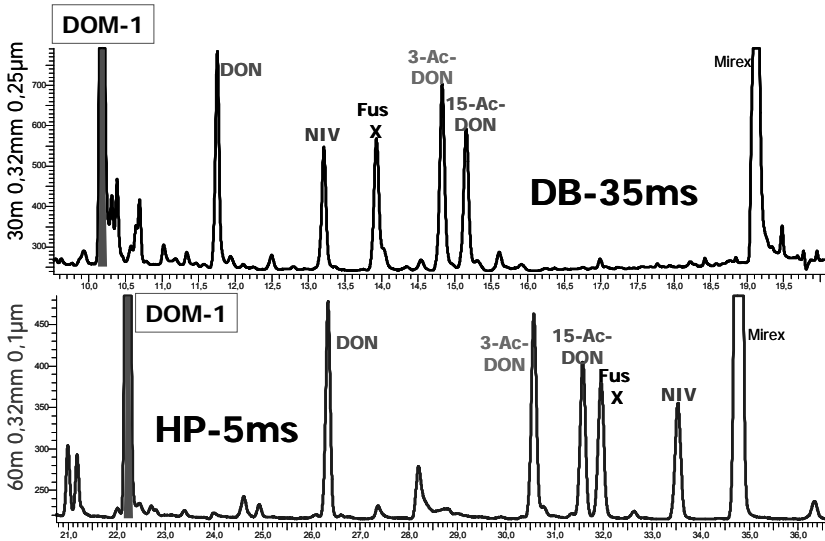


Abb. 2: ECD-Chromatogramme von DOM-1 mit 5 B-Trichothenenen (je ca. 0,25 mg/kg Weizengrieß) als TMS-Derivate auf 2 unterschiedlich polaren GC-Phasen

Rec-% DOM-1	Silylierung (Tri-Sil TBT) ohne Matrix B-Trichothezene	Silylierung (Tri-Sil TBT) MIT Matrix B-Trichothezene	Per-F-Acylierung (HFBI) ohne Matrix A-Trichothezene	Per-F-Acylierung (HFBI) MIT Matrix A-Trichothezene
MW=	100 %	120 %	104 %	134 %
Var-Koeff. =	14,1%	13,2%	10,2%	19,0%
n=	38	945	7	210
min=	59 %	79 %	93 %	73 %
max=	130 %	195 %	124 %	260 %
Median=	103 %	117 %	102 %	130 %
zeigt:	Derivatisierungs- Reproduzierbarkeit ohne Matrix	Einfluss der Matrix	Derivatisierungs- Reproduzierbarkeit ohne Matrix	Einfluss der Matrix

Tab. 1: Rückgewinnung von DOM-1 bei Dotierung vor der Derivatisierung von Routineproben

Ob der Einfluss der Matrix auf DOM-1 primär bei der Derivatisierung und/oder bei der GC-Messung („matrix induced response entrancement“) (2) zum Tragen kommt, oder ob ein anderer Effekt dafür verantwortlich ist, wurde nicht verifiziert. Einen Hinweis darauf, ob nur DOM-1 oder auch die anderen B-Trichothezene betroffen sind, sollten 32 Validierungsproben (Weizen und Mais) mit bekannten Toxingehalten bringen. Die Ergebnisse in Tab. 2 zeigen, dass mit externer

Standardauswertung zufrieden stellende Rückgewinnungen erreicht wurden. Eine korrespondierende Auswertung derselben Analysen mit DOM-1 als IStd führt zwar zu einer Reduktion der Variationskoeffizienten um ca. $\frac{1}{4}$, die Rückgewinnungen der 5 B-Trichothecene würden sich aber um rund 15 % verringern. Aufgrund weiterer Hinweise muss ein unterschiedliches Verhalten von DOM-1 im Vergleich zu den Trichothecenen angenommen werden. Dieser Trend wird auch durch periodische Überprüfungen der Methode mit zertifizierten Referenzmaterialien (CRM-378 und CRM-379) bestätigt (3). Eine Auswertung über DOM-1 als IStd würde bei den zertifizierten Referenzmaterialien folglich zu Untergehalten führen.

Rückgewinnung %		DON	NIV	3AcDON	15AcDON	Fus X	DOM-1
Externer Standard	MW =	97%	66%	103%	107%	102%	115%
	Var-Koeff. =	11,8%	18,4%	11,7%	6,9%	8,8%	10,4%
Interner Std= DOM-1	MW =	85%	58%	90%	94%	89%	
	Var-Koeff. =	7,3%	13,0%	5,3%	8,4%	7,5%	

Tab. 2: Vergleich der Rückgewinnungen von B-Trichothecenen mit und ohne DOM-1 als IStd (Dotierung vor der Silylierung)

Ein Peakhöhen-Vergleich der Kalibrierstandards von DOM-1 und aller B-Trichothecene im Zeitverlauf über ein Jahr zeigt zwar meist einigermaßen parallel verlaufende Schwankungen, die Response-Verhältnisse zwischen DOM-1 und der jeweiligen Zielanalyten sind jedoch nicht ausreichend stabil für eine automatische Korrektur über DOM-1 als interner Standard.

Der Verwendung als Surrogate stehen diese Abweichungen nicht zwingend entgegen, insbesondere wenn DOM-1 schon von dem clean up zugegeben werden könnte und die allgemeine Wiederfindungs-Überhöhung berücksichtigt wird. Abgesehen von der Kostenproblematik könnte das Gesamtverfahren bei jeder einzelnen Probe mit DOM-1 auf gravierende Aufarbeitungsfehler (falsche Aliquotierungen, Übertragungsverluste, Dosierfehler etc.) überprüft werden.

Literatur:

- (1) W. Brodacz, „Interne Standards und Referenzsubstanzen in der GC“, LABO, Leitartikel, S8-14, Oktober 1997
- (2) H. Pettersson, W. Langseth “Intercomparison of Trichothecene Analysis and Feasibility to Produce Certified Calibrants and Reference Material - Method Studies”, European Commission EUR20285/1 EN, BCR Information, 2002
- (3) W. Brodacz, „Mykotoxinanalytik - Kalibrierstandards und zertifizierte Referenzmaterialien“, LABO, S 22 - 26, Februar 2005

Autor: Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ, AGES Kompetenzzentrum "Cluster Chemie Linz"

Isotopenverdünnungsmethode zur Bestimmung von Deoxynivalenol ohne Clean-up

G. HÄUBL, F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA

Zusammenfassung:

Quantitative analytische Methoden zur Bestimmung von Mykotoxinen mittels LC/MS sind in vielen Fällen durch das Auftreten von Matrixeffekten im Ionisationsprozess der MS-Ionenquelle stark limitiert. stabil-isotopen-markierte Standards können diese Matrixeffekte bestens ausgleichen und korrigieren und somit sowohl die Präzision als auch die Richtigkeit der LC-MS-Methoden verbessern. Diese Arbeit beschreibt die erfolgreiche Verwendung von vollkommen ^{13}C -substituierten Deoxynivalenol ($[\text{}^{13}\text{C}_{15}\text{-DON}]$) als interner Standard (IS) für die Quantifizierung von Deoxynivalenol (DON) in Mais und Weizen mittels HPLC Electrospray (ESI) MS/MS. Um das volle Potential des $[\text{}^{13}\text{C}_{15}\text{-DON}]$ zu zeigen, wurden die Mais- und Weizenextrakte ohne weitere Aufreinigung direkt HPLC-MS/MS gemessen. Die interne Kalibration wurde einer externen Standardkalibration gegenübergestellt und verglichen.

Keywords:

Isotopenverdünnung, Deoxynivalenol, Massenspektrometrie

Einleitung:

Eine moderne und in Zukunft immer wichtiger werdende Analysetechnik stellt die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) dar. Sie ist breit einsetzbar, hat eine sehr hohe Genauigkeit und sehr niedrige Nachweisgrenzen. Unterschiede in der Ionisation und somit in der Signalintensität zwischen Standardsubstanzen und Analyten, die durch Interferenzen mit Matrix beeinflusst werden, setzen dieser Technik Grenzen. Diesem Problem kann man mit unterschiedlichen Methoden entgegenwirken: Eine Möglichkeit besteht darin, für jede Matrix eine externe Matrixkalibration durchzuführen. Das ist aber sehr zeitaufwändig und in der Routineanalytik nicht sehr effizient. Eine elegantere Methode ist der Einsatz eines internen Standards. Er wird der Probe zugesetzt und soll sich in jeden Schritt des Analysenverfahrens wie der Analyt verhalten. Dadurch werden Verluste bei der Probenvorbereitung, der Aufreinigung und durch die Ionensuppression in der Ionenquelle des Massenspektrometers korrigiert. Der beste interne Standard für die LC-MS stellen isotope-markierte Standards dar. Sie unterscheiden sich vom Analyten nur dadurch, dass ein oder mehrere Atome durch stabile (nicht radioaktive) Isotope desselben Elements ausgetauscht worden sind. Der große Vorteil ist daher, dass sie sich während der Probenaufarbeitung und in der Ionenquelle des Massenspektrometers völlig ident mit dem Analyten verhalten, aber durch ihre unterschiedliche Masse im Massenspektrometer unterschieden und detektiert werden können.

Material und Methoden:

Reagenzien: DON und der interne Standard [$^{13}\text{C}_{15}$]-DON wurden in Form von Flüssigstandards (25 mg/L) in Acetonitril von Biopure Referenz Substanzen GmbH erhalten. Methanol und Acetonitril wurden von J. T. Baker bezogen. Das Wasser für die Herstellung der Extraktionslösungen und der LC-Laufmittel wurde mittels eines Milli-Q plus System von Millipore aufbereitet.

Reinheitskontrolle des [$^{13}\text{C}_{15}$]-DON mittels HPLC-UV: Die Reinheit des internen Standards wurde durch Aufnahme von UV-Chromatogrammen mittels eines Diodenarraydetektors bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt (200, 210, 218, 230, 280 nm). Die Separation erfolgte auf einem Agilent Technologies 1100 HPLC System unter Verwendung einer Phenomenex Luna 5 μ C18(2) Chromatographiesäule (250 x 3 mm). Es wurden 100 μ l einer Lösung mit 80 mg/L [$^{13}\text{C}_{15}$]-DON injiziert. Flussrate: 0.5 mL/min, Säulentemperatur 25°C. Es wurde folgender Gradient gefahren: Nach 5 min bei Acetonitril/Wasser 10+90 (v+v) wurde innerhalb 25 min auf 100% Acetonitril erhöht. Nach weiteren 5 min wurde wieder auf Startgradienten gewechselt und 10 min equilibriert.

HPLC-MS/MS: Für die Chromatographie wurde ein Agilent 1100 LC System verwendet. Die Separation erfolgte auf einer Aquasil RP-18 Säule (3 μ m, 50 x 2.1 mm) von Thermo Electron. Injektionsvolumen: 10 μ L, Flussrate: 0.3 mL/min, Temperatur: 25°C. Der Lauf startet bei Methanol/Wasser 15+85 (v+v). Nach 2,5 min wurde der Gradient innerhalb von 1,5 min auf 100% Methanol erhöht und 3,5 min gehalten. Danach wurde in 1,5 min zurück auf Methanol/Wasser 15+85 (v+v) gewechselt und 6 min equilibriert. Als Detektor für die Stabil-Isotopen-Verdünnungsanalyse und für die MS/MS Charakterisation von DON und dem IS diente eine QTrap Triple Quadrupol Linear-Ionenfalle-MS/MS-Gerät der Firma Applied Biosystems mit Turbo Ionenspray (ESI) Interface. Für die Bestimmung von DON wurden die MRM (multi reaction monitoring) Übergänge des deprotonierten Moleküliions $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 295,1$ zu den Fragmenten $m/z = 265,1$ (Kollisionsenergie (CE): -12 eV) und $m/z = 138,0$ (CE: -26 eV) herangezogen. Für [$^{13}\text{C}_{15}$]-DON wurden entsprechend die Übergänge vom Moleküliion $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 310,1$ zu $m/z = 279,1$ (-12 eV) und zu $m/z = 145,0$ (CE: -26 eV) verwendet. Wobei die Übergänge $m/z = 291,1$ zu $m/z = 265,1$ und $m/z = 310,1$ zu $m/z = 279,1$ zur quantitativen Auswertung herangezogen wurden und die Übergänge $m/z = 291,1$ zu $m/z = 138,0$ und $m/z = 310,1$ zu $m/z = 145,0$ zur Bestätigung (Qualifier) dienen.

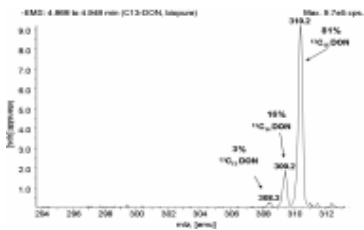
Matrixkalibration: 50 g nicht-kontaminierter Mais wurde mit 200 mL Acetonitril/Wasser 84+16 (v+v) versetzt und auf einem Horizontalrotationsschüttler 90 min extrahiert. Nach der Filtration über

ein Faltenfilter wurden jeweils 4 mL des Rohextrakts mit 250 µL eines 1,0 mg/L [¹³C₁₅]-DON-Standards versetzt. Diese präparierten Extrakte wurden mit einer Lösung von 2,0 mg/L DON dotiert, sodass sie letztendlich eine Konzentration von 0, 30, 50, 100, 300, 500, 1000 µg DON / kg Mais enthielten.

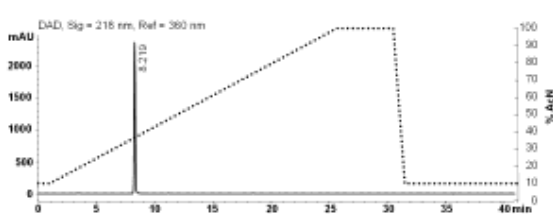
Präparation des Referenzmaterials: Pro Referenzmaterial wurden 7 Proben zu je 10,00±0,01 g mit 2,5 µg IS versetzt indem 100 µL einer 25 mg/L Lösung von [¹³C₁₅]-DON in Acetonitril zugesetzt wurden. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit 40,0 mL Acetonitril/Wasser 84+16 (v+v) am Horizontalschüttler 90 min extrahiert. Die Extrakte wurden filtriert (595½, Schleicher & Schuell) und Aliquote von 4 mL des Filtrats wurden unter einem leichten Stickstoffstrom bei 50°C abgedampft und jeweils mit 1 mL Wasser wieder aufgenommen. Nach 1 min vortexen wurden die Proben über ein Millex-GV 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter (Millipore) in HPLC Vials filtriert und mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Ergebnisse und Diskussion:

Die unverdünnte Lösung (25 mg/L) des IS wurde mittels LC/MS auf Anwesenheit von normalen ¹²C₁₅-DON überprüft. Es konnte kein ¹³C-unmarkiertes DON gefunden werden. Die Lösung eignet sich somit ausgezeichnet als IS. Figur 1 zeigt einen Ausschnitt eines Full-Scan-Massenspektrums im Bereich 294 – 311 amu in dem man gut das Isotopenmuster des IS erkennt. Der IS beinhaltet 3% [¹³C₁₃]-DON, 16% [¹³C₁₄]-DON und 81% [¹³C₁₅]-DON. Das ergibt eine Isotopenanreicherung von 98,6% ¹³C.



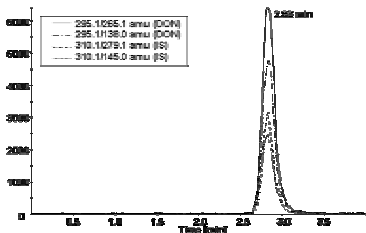
Figur 1: Massenspektrum des [¹³C₁₅]-DON mit Isotopenmuster



Figur 2: UV-Chromatogramm des IS bei 218 nm. Die punktierte Linie zeigt den Laufmittelgradienten.

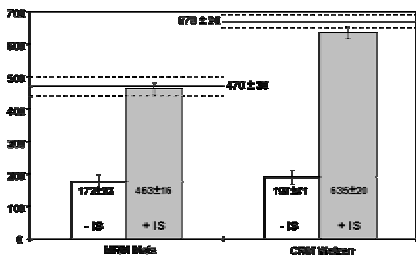
Zusätzlich wurde mittels HPLC-DAD auf sonstige Verunreinigungen geprüft. Dabei wurden UV-Chromatogramme bei 5 verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. Auch hier konnten keine nennenswerten Verunreinigungen (< 0,1%) festgestellt werden (Figur 2).

Figur 3 zeigt alle 4 MRM-Chromatogramme für eine Kalibrationslösung die 500 µg/L DON und 250 µg/L IS enthält. Die Retentionszeit für DON und IS sind absolut identisch (2,82 min.). Der IS zeigt keinen Isotopeneffekt und verhält sich in der Chromatographie absolut gleich dem Analyten. Die Signalintensitäten spiegeln ebenfalls das Konzentrationsverhältnis von IS zu Analyten wider.



Figur 3: MRM Chromatogramm einer 500µg/L DON Lösung, dotiert mit 250µg/mL IS. Beide wurden bei 2 MS-Übergängen detektiert.

Die Isotopenverdünnungsanalyse wurde mit zwei Getreidearten durchgeführt. Zum einen wurde als Referenzmaterial kontaminierter Mais zum anderen wurde zertifiziertes Weizen-Referenzmaterial verwendet. DON und der IS wurden nach einer etablierten und validierten Methode mit Acetonitril/Wasser 84+16 aus den Referenzmaterialien extrahiert. Es wurden 7 von einander unabhängige, mit 250 µg/kg IS dotierte Proben extrahiert, aufkonzentriert und ohne weiteres Clean-Up auf ihren DON-Gehalt mittels LC-MS/MS gemessen. Dabei wurden die Ergebnisse sowohl mit der Methode mit externer Standardkalibration als auch mit IS evaluiert (Figur 4).



Figur 4: DON Konzentrationen der Matrixreferenzmaterialien. Ergebnisse wurden mit externer (weiße Balken) und interner Kalibration (graue Balken) ermittelt. Die horizontalen Linien zeigen den zertifizierten Wert.

Ohne die Anwendung des IS wurde für das Mais-Referenzmaterial (spezifizierte Konzentration: 470±30 µg/kg DON) nur 176±22 µg/kg DON gefunden. Das entspricht einer Wiederfindung von 37%. Unter Einbeziehung des IS konnten 463±16 µg/kg DON gefunden und somit die Wiederfindung auf 99% erhöht werden. Beim Weizen betrug der zertifizierte Wert 670±20 µg/kg. Mittels externer Standardkalibration lag der Wert für DON bei einer Wiederfindung von 29% nur bei 191±41 µg/kg. Die Quantifizierung mittels IS ergab 635±20 µg/kg DON, das heißt 95% Wiederfindung.

Publiziert in: G. Häubl, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher, Suitability of a fully ¹³C isotope labeled internal standard for the determination of the mycotoxin deoxynivalenol by LC-MS/MS without clean-up Analytical and Bioanalytical Chemistry, online.

Trends und Entwicklungen in der Mykotoxin Analytik

Trends and Developments in Mycotoxin Analysis

A. FELLINGER, K. SCHMITT und K. JOHNSON

Summary:

The global trends and needs in mycotoxin analysis such as on-site testing, uniform sample preparation procedures, reduction of labor (automation), multi-analyte testing, cost reduction, outsourcing and miniaturization lead to the development of new analysis systems, novel approaches and improvement of existing systems. New resins (Molecular Imprint Technology, recombinant antibodies) are discussed and multi-residue systems evaluated. New technological approaches, not only instrument-based as LC-MS with ESI, APCI or MALDI-TOF, but also immunology-based systems like ELISA Arrays and Multi-Residue Immunoaffinity Columns and technologies utilizing both, e.g. Biosensors, are investigated. Realizing the potential, the European Union with its Myco-Globe projects invests to further these developments. All this will revolutionize the situation in mycotoxin analysis, leading to faster, easier, more accurate, cost-effective and more widely used tools.

Key words: mycotoxins, new technologies, lateral flow, array, biosensor

Zusammenfassung:

Die globalen Trends und Anforderungen in der Mykotoxinanalytik, wie Testdurchführung vor Ort, gemeinsame Probenaufbereitung, Reduktion des Arbeitsaufwandes, Testen auf mehrere Analyte gleichzeitig, Kostenreduktion, Auslagerung von Aufgaben und Miniaturisierung führen zur Entwicklung neuer Analysensysteme sowie zu neuen Ansätzen und Verbesserung bei existierenden Systemen. Neue Materialien (Molecular Imprint Technology, rekombinante Antikörper) werden erforscht und Multi-Residue Systeme evaluiert. Neue technologische Ansätze, nicht nur instrumenteller Natur wie LC-MS mit ESI, APCI oder MALDI-TOF sondern auch Systeme auf immunologischer Basis wie ELISA Arrays und Multi-Residue Immunaffinitätsäulen und Systeme die beide Ansätze vereinen, z.B. Biosensoren, werden verfolgt. In Erkenntnis dieser Entwicklungen investiert auch die Europäische Union, u.a. mit dem Myco-Globe Projekt, in diesem Bereich. All diese Entwicklungen werden die Mykotoxinanalytik voran bringen und zu schnelleren, einfacheren, genaueren, ökonomischeren und weiter verbreiteten Werkzeugen führen.

Schlüsselwörter: Mykotoxine, neue Technologien, Lateral Flow, Array, Biosensor

1. Status Quo

Abbildung 1 zeigt eine subjektive Einschätzung der Situation in der Mykotoxin Analytik heute. Die Bandbreite reicht von raschen und relativ günstigen *Lateral Flow* Lösungen, über mehr zeitaufwendigen ELISA und noch länger dauernder Dünnschichtchromatographie (TLC), die aber beide ebenfalls noch recht kostengünstig sind, über Kartentests, Fluoreszenzpolarisation (FP), Säulen (*Solid Phase Extraction* (SPE) und Immunaffinitäts Säulen (IAC)), Lumineszenztests und Biosensoren bis den teureren instrumentellen Lösungen.

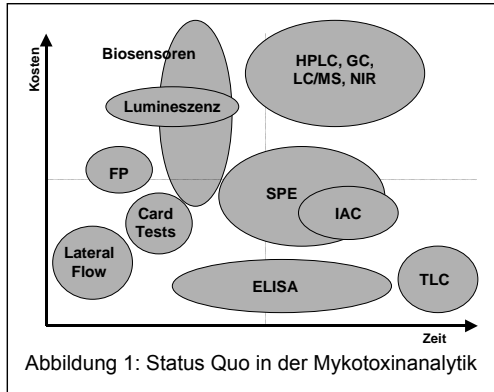


Abbildung 1: Status Quo in der Mykotoxinanalytik

An neue Analysensysteme und –technologien werden dabei vor allem folgende Anforderungen gestellt. Einerseits soll dem Bedarf nach mehr Flexibilität, d.h. Analytik vor Ort, vereinheitlichte Probenaufbereitung für verschiedene Mykotoxine und Matrices und gleichzeitige Analyse mehrerer Mykotoxine, Rechnung getragen werden, andererseits wirtschaftliche Aspekte wie geringe Kosten, Aspekte der Auslagerung der Analytik, weniger Bedarf für hochqualifizierte Mitarbeiter, berücksichtigt und darüber hinaus Aspekte wie Präzision und Sensitivität nicht vergessen werden. Voraussichtlich wird es nie eine einzelne Methode geben, die alle diese Anforderungen erfüllt, viele Projekte arbeiten jedoch an einer Verbesserung in einem oder mehreren Teilbereichen.

2. Neue Entwicklungen

2.1. Neue Materialien

Im Rahmen verschiedener Projekte werden neue Materialien als Ausgangspunkt für neue analytische Ansätze, nicht nur bei Mykotoxinen, erforscht. Ein Beispiel stellt die *Molecular Imprint Technology* dar. Dabei wird ein Molekül als eine Art Schablone verwendet um in einem Polymer, dass darum gebaut wird aktive Bindungsstellen zu erzeugen. Die Schablone wird danach entfernt und im Idealfall erhält man ein Polymer mit aktiven, hochaffinen Bindungsstellen. Dieser Ansatz wurde z.B. von der EU im Projekt „OTA PREV: Prevention of Ochratoxin A in cereals (QLK1-CT-1999-00433)“ gefördert. Leider liefern die heutigen Ansätze noch zuwenig aktive Bindungsstellen. Ein weiterer Ansatz sind die sogenannten *rekombinanten Antikörper*, dabei wird in einer *Phage Library* nach DNA-Sequenzen gesucht, die bindende Strukturen (hier Mykotoxin-bindende

Strukturen) exprimieren, um so antikörperähnliche Bindungsmoleküle zu erhalten. Auch diese Technologie fand noch nicht Eingang in stabile, verbreitete Systeme.

2.2. Multi Residue / Arrays

Bereits realisiert, wenn auch noch nicht in der Routineanalytik verwendet, sind Multi Residue Systeme in der instrumentellen Analytik. Dabei erlaubt eine einzelne Analyse die Aussage über mehrere Mykotoxine. Es handelt sich dabei um LC-MS bzw. LC-MS/MS Systeme mit verschiedenen Modifikationen bzw. Erweiterungen, wie *Electrospray Ionisation* (ESI), *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI), *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF), etc. Weitere Möglichkeiten zeigt z.B. die *Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy* (OWLS) auf, die im Rahmen eines weiteren EU Projekts (MYCOSENS (CRAFT): *Development of a novel test kit for rapid on-site determination of mycotoxins in food* (QLK1-CT-2001-70556)) entwickelt wurde. Dabei erlaubt eine spezielle Oberflächen- und Lichtführungstechnologie Messungen in ELISA ähnlichen Systemen ohne ungebundene Moleküle zu entfernen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt auch die *Planar Waveguide Technology* anderer Entwickler. Auch die klassischen ELISA's werden auf Verwendbarkeit als Arrays weiterentwickelt. Nicht zuletzt werden auch Biosensoren, denen man ja seit Jahren das Potential für eine Revolution im Bereich der Lebensmittelanalytik vorhersagt, auf ihre Anwendbarkeit für Mykotoxine untersucht. Einzelne Projekte, wie ein Biosensor für Aflatoxin M₁, eine gemeinsame Entwicklung von R-Biopharm und Sensortec, befinden sich in der Evaluierungsphase und dürften bald kommerziell erhältlich werden. Die Technologie dieses Sensors ist auch für andere Analyte, auch Mykotoxine anwendbar.

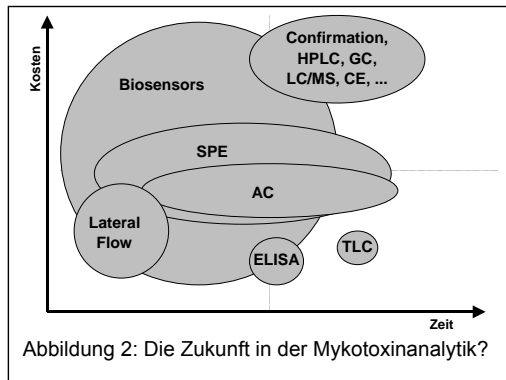
2.3. Lateral Flow

Am fortgeschrittensten ist die Lateral Flow Technologie. Auch wenn es dabei noch keine Lösungen im Sinne von Multi Residues gibt, erfüllt sie die Wünsche nach Einfachheit, Flexibilität und geringen Kosten. Verschiedene Hersteller bieten dabei Systeme sowohl zur optischen als auch instrumentellen Auswertung an. Eine deutliche Verbesserung in Richtung einfacherer optischer Auswertung könnte eine neue, von R-Biopharm weiterentwickelte Technologie darstellen, bei dem das bisherige System des Verschwindens einer Bande im Falle eines positiven Ergebnisses insoweit verändert wird, dass trotz kompetitiven Systems bei positiven Proben die Bande erscheint und somit leichter beurteilbar ist.

3. Perspektiven

Nach momentaner Sicht der Dinge zeichnen sich in näherer Zukunft folgende Entwicklungen ab. Es werden weitere, spezifischere instrumentelle Methoden entwickelt, die sich jedoch auf gut ausgerüstete und erfahrenen (Referenz-) Labors beschränken werden. Die Bedeutung von Probenaufbereitungssäulen, *Solid Phase Extraction* und Immunaффinität, nimmt zu, da immer sensitivere Methoden immer höhere Ansprüche an das Extrakt als Ausgangsmaterial stellen. In der Säulentecnologie werden auch neue Materialien am ehesten Eingang finden. Die Entwicklung bei den Biosensoren wird massiv weiter getrieben und verschiedene Technologien werden mittelfristig die Immunoassays massiv konkurrieren. Am schnellsten werden jedoch *Lateral Flow* Tests vermehrt Einzug in die Mykotoxinanalytik halten oder haben das teilweise schon getan.

Abschließend ist zu sagen, dass neben immer sensitiveren und präziseren Methoden in der Forschung und in Referenzlaboratorien, der Trend eher in Richtung einfacher, robuster und kostengünstiger Anwendungen im Bereich der industriellen und der Feld-Anwendung gehen wird. So könnte die subjektive Einschätzung der Mykotoxinanalytik-Situation in einigen Jahren sich wie folgt darstellen.



Autoren: Alois FELLINGER und Karl SCHMITT, R-Biopharm AG, Landwehrstrasse 54, D-64293 Darmstadt, Kurt JOHNSON, R-Biopharm Inc., 7950 Old US 27 South, Marshall, MI 49068, USA; <http://www.r-biopharm.com>

Mycelpilze und Hefen in Böden verschiedener Naturwaldstandorte

Michael WUCZKOWSKI, Ernst METZGER, Hansjörg PRILLINGER

Wälder werden hinsichtlich des Artenreichtums an Mikropilzen als „hot spots“ innerhalb agrikulturner Landschaften angesehen (Hågvar, 1998), in Österreich gibt es jedoch nur sehr wenige und weit zurückliegende Studien zu dieser Thematik. Aus diesem Grund haben wir mehrere Naturwaldstandorte und zum Vergleich zwei landwirtschaftliche Flächen untersucht.

Vier der beprobten Standorte liegen im Nationalpark Donauauen in der gedämmten (bei Groß Enzersdorf, sehr selten überflutet) und der offenen Au (in der Nähe von Mannswörth, saisonal überflutet), jeweils mit Pappel- bzw. Weidenbewuchs. Bei den weiteren Standorten handelt es sich ebenfalls um einen Auwald (Müllerboden, Burgenland), um einen sauren Birkenwald bei Saubrunn (Niederösterreich) und um einen Fichten-Tannen-Birkenwald (Rotwald, Niederösterreich). Außerdem wurde eine konventionelle und eine ökologische Landbaufläche untersucht, beide in der Nähe von Groß Enzersdorf. Die Probenahmen erfolgten in 0-5, 10-15 und 30-35 cm Bodentiefe und in der Streuschicht. Aus den Bodenproben wurden die Pilze mittels Bodenwaschmethode isoliert, um nur aktiven Mycelien zu erfassen, die Streuschichtproben wurden mit Ringerlösung geschüttelt und ausplattiert. Dafür wurden drei verschiedene Medien verwendet, die gereinigten Stämme wurden in der Stammsammlung des ACBR konserviert. Insgesamt wurden 1271 Mycelpilze und 211 Hefestämme isoliert (Metzger et al., 2006, Wuczkowski et al., 2003b). Die Mitglieder der erstgenannten Gruppe wurden morphologisch und teilweise molekular bestimmt, innerhalb der Hefen liefern nur molekulare Methoden verlässliche Ergebnisse, dafür wurden PCR fingerprinting und die Sequenzierung geeigneter DNA Abschnitte verwendet (Wuczkowski und Prillinger, 2004).

Die am häufigsten isolierten Mycelpilzgattungen waren *Acremonium* und *Penicillium*, ca. ein Drittel der Isolate gehört diesen Gattungen an. Ebenfalls oft wurden Mitglieder der Gattungen *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Paecilomyces* und *Trichoderma* gefunden. Die Isolate der letztgenannten Gattung wurden molekular bestimmt, neben anderen interessanten Ergebnissen wurden zwei unbekannte und zwei erstmalig in Europa registrierte Arten gefunden (Wuczkowski et al., 2003a).

Cirka zwei Drittel der isolierten Hefen gehören zur Abteilung der Basidiomyceten, die am häufigsten vertretene Gattung war *Cryptococcus*. Die Anzahl der unbekanntenen Hefen im Boden ist relativ hoch, nur knapp die Hälfte der Isolate konnte einwandfrei identifiziert werden, eine neue Art (*Geotrichum vulgare*) wurde vor Kurzem beschrieben (Wuczkowski et al., 2006).

Die Diversität der Mycelpilze und Hefen war auf den Auwaldstandorten am höchsten, eine Ausnahme bildeten die Hefen auf den landwirtschaftlichen Standorten, deren Auftreten ähnlich dem in den angrenzenden Auwäldern war. Generell nimmt die Anzahl der Pilze mit der Bodentiefe ab. Die

Resultate zeigen, daß der Anteil der unbekanntem Mycelpilze und Hefen im Ökosystem Boden noch immer relativ groß ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

Literatur:

HÄGVAR, S. (1998): The relevance of the Rio-Convention on biodiversity to conserving the biodiversity of soils. *Applied Soil Ecology* 9, 1-7.

METZGER E., WUCZKOWSKI M., PRILLINGER H. (2006): Diversity of yeasts isolated from litter and soil of different natural forest soils in Austria. *Austrian J Agricult Res*, submitted.

WUCZKOWSKI M., DRUZHININA I., GHERBAWY Y., KLUG B., PRILLINGER H., KUBICEK C. P. (2003a): Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval flood-plain-forest. *Microb Res* 158 (2), 125-133.

WUCZKOWSKI M., STERFLINGER K., KRAUS G. F., KLUG B., PRILLINGER H. (2003b): Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). *Austrian J Agricult Res* 54 (2), 109-117.

WUCZKOWSKI M., PRILLINGER H. (2004): Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria"). *Microb Res* 159 (3), 263-275.

WUCZKOWSKI M., BOND C., PRILLINGER H. (2006): *Geotrichum vulgare*, a novel asexual arthroconidial yeast. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 301-303.

Autoren: Dr. Michael WUCZKOWSKI*, DI Ernst METZGER, Prof. Dr. Hansjörg PRILLINGER: Österreichisches Zentrum für Biologische Ressourcen und Angewandte Mykologie (ACBR), Universität für Bodenkultur, Nußdorfer Lände 11, 1190 Vienna, Austria.

*mwuczkw@edv1.boku.ac.at

Aktuelle Regulierungen und Richtwerte für Mykotoxine in Futtermitteln

T. KICKINGER, H. WÜRZNER

Die Kontamination von Futtermittel durch Mykotoxine stellt in der Tierernährung ein großes Problem dar. Viele Krankheiten (von Durchfall über Fruchtbarkeitsstörungen bis hin zu Organschäden) resultieren aus der Aufnahme von belasteten Futtermitteln und bilden eine Gefahr für das Tier sowie den wirtschaftlichen Erfolg eines Betriebs. Aus diesem Grund war der Gesetzgeber gefordert ein Regulativ zu schaffen, um somit Landwirt bzw. Konsument zu schützen.

Gesetzliche Grenzwerte in der EU und somit auch in Österreich gibt es jedoch lediglich für Aflatoxin B1, die im Jahr 2003 mit der RL 2003/100/EG geändert wurden:

Richtlinie 2003/100 EG Aflatoxin B1 (mg/kg AF mit 88 % TS)

Alle Futtermittel-Ausgangserzeugnisse	0,02
Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen, ausgenommen:	0,02
- Alleinfuttermittel für Milchvieh	0,005
- Alleinfuttermittel für Kälber und Lämmer	0,01
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	0,02
Andere Alleinfuttermittel	0,01
Ergänzungsfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen (ausgenommen Ergänzungsfuttermittel für Milchvieh, Kälber und Lämmer)	0,02
Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	0,02
Andere Ergänzungsfuttermittel	0,005

Bei anderen Mykotoxinen liegen keine gesetzlichen Grenzwerte vor. Für Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZON) und Ochratoxin A wurde jedoch vom Expertenausschuss für Unerwünschte Stoffe in Brüssel im Herbst 2005 ein Entwurf für Richtwerte vorgelegt.

Richtwerte für Deoxynivalenol (DON) in Futtermitteln

Futtermittel	ppm (88 % TS)
Futtermittelausgangserzeugnisse Getreide/-erzeugnisse	8,0
Allein- und Ergänzungsfutter	5,0
Allein- und Ergänzungsfutter für Schweine	0,9
Allein- und Ergänzungsfutter für Kälber (< 4 Monate)	2,0
Allein- und Ergänzungsfutter für Lämmer bzw. Jungziegen	2,0

Richtwerte für Zearalenon (ZON) in Futtermitteln

Futtermittel	ppm (88 % TS)
Futtermittelausgangserzeugnisse Getreide, -erzeugnisse	2,0
Allein- und Ergänzungsfutter für Ferkel	0,1
Allein- und Ergänzungsfutter für Zuchtsauen und Mastschweine	0,25
Allein- und Ergänzungsfutter für Kälber und Milchkühe	0,5
Allein- und Ergänzungsfutter für Schafe (inkl. Lämmer) und Ziegen (inkl. Jungziegen)	0,5

Richtwerte für Ochratoxin A in Futtermitteln

Futtermittel	ppm (88 % TS)
Futtermittelausgangserzeugnisse Getreide, -erzeugnisse	0,25
Allein- und Ergänzungsfutter für Schweine	0,05
Allein- und Ergänzungsfutter für Geflügel	0,1

Wie aus den obigen Tabellen ersichtlich, sind die Richtwerte, im speziellen für Futtermittelausgangserzeugnisse, sehr hoch ausgefallen. Der Expertenausschuss weist jedoch darauf hin, dass bei den einzelnen Tierkategorien differente Akzeptanzen gegenüber den jeweiligen Mykotoxinen vorliegen und dies beim Einsatz berücksichtigt werden muss. Höher belastete Futtermittel könnten also z.B. im Wiederkäuerfutter eingemischt werden. Zusätzlich wird vermerkt, dass bei direkter Verfütterung, die angegebenen Werte, sowohl in der täglichen Ration als auch im Allein- bzw. Ergänzungsfuttermittel nicht überschritten werden dürfen, damit keine hoch kontaminierten Produkte an Nutztiere verfüttert werden.

Die Empfehlung der Kommission für ein Koordiniertes Kontrollprogramm im Futtermittelbereich enthält auch für das Jahr 2006 die Untersuchung von Futtermitteln auf folgende Mykotoxine:

Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Zearalenon, Deoxynivalenol, Fumonisin (B1, B2, B3 zusammen), T2 und HT2 (zusammen)

Dieser Empfehlung wird die Amtliche Futtermittelkontrolle wie bisher versuchen, nachzukommen.

Autoren: DI Thomas KICKINGER, Univ. Doz. Dr. Herbert WÜRZNER, Österr. Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen zur biologischen Inaktivierung von Fumonisin

M. TÄUBEL, W.-D. MOLL, ELSA VEKIRU, A. FRANK,
A.P. LOIBNER, R. BRAUN UND G. SCHATZMAYR

Einleitung:

Die Fumonisine sind eine Familie von krebserregenden Mykotoxinen, die vorwiegend von *Fusarium verticillioides* gebildet werden. Neben den klassischen durch Fumonisine verursachten Mykotoxikosen, nämlich Leukoencephalomalazie bei Pferden und Lungenödeme bei Schweinen, wurde auch hepatotoxische, cardiotoxische und kanzerogene Wirkung von FB₁, dem wichtigsten Vertreter der Fumonisine (Fig. 1), auf Ratten festgestellt [1]. Der molekulare Wirkungsmechanismus der Fumonisine beruht auf der Hemmung des Enzyms Ceramid-synthase, wodurch der Sphingolipid-Metabolismus eukaryotischer Zellen gestört wird [2]. Da *Fusarium verticillioides* ein nahezu ubiquitär verbreiteter Pathogen ist, ist die Kontamination von Mais mit Fumonisinen weltweit sehr häufig und verursacht neben der Gefährdung für die menschliche Gesundheit vor allem Probleme in der Tierhaltung [3]. Da mit chemisch-thermischen Methoden oder Adsorption nur unzureichende Entgiftung erzielt werden kann, verfolgen wir die alternative und innovative Strategie, Fumonisine im Verdauungstrakt von Tieren mit Hilfe spezifischer Mikroorganismen abzubauen. Mit diesem Ziel haben wir aus Umweltproben Mikroorganismen isoliert, die FB₁ metabolisieren können. Nach den bisherigen Untersuchungen mit diesen Stämmen scheint die Entwicklung eines biologisch aktiven Futtermittelzusatzes möglich.

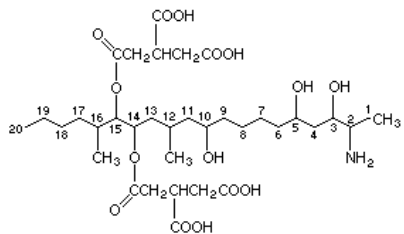


Fig. 1: Struktur von Fumonisin B₁.

Material und Methoden:

Die Isolierung von fumonisinabbauenden Mikroorganismen wurde aus den Inhalten von Schweinedarmabschnitten und aus Pansensaft von Rindern (anaerobes screening), sowie aus Bodenproben und fumonisin kontaminiertem Mais (aerobes screening) versucht. Um eine möglichst große Bandbreite an Mikroorganismen anzüchten zu können, wurden verschiedene, gängige Kulturmedien verwendet. Aus Mischkulturen, die FB₁-abbauende Aktivität zeigten, wurden Reinkulturen isoliert, und die Stämme wurden individuell auf ihre Kompetenz zum FB₁-Abbau geprüft. Zur taxonomischen Zuordnung der interessantesten Stämme wurden 16S rDNA Teilsequenzen ermittelt. Für diese Stämme wurden zur Abschätzung der technologischen Anwendbarkeit auch die FB₁-Abbaugeschwindigkeit und der Abbau unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht.

Ergebnisse:

In den anaeroben Mischkulturen konnte keine reproduzierbare fumonisintransformierende Aktivität festgestellt werden. Aus FB₁-abbauenden, aeroben Mischkulturen wurden insgesamt 350 Stämme reingezüchtet. Fünfzehn Stämme davon konnten Fumonisin B₁ abbauen. Nach Ausschluss von redundanten wurden die neun interessantesten davon durch Ermittlung von 16S rDNA Teilsequenzen taxonomisch zugeordnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Taxonomische Zuordnung von neun isolierten und reingezüchteten fumonisinabbauenden Stämmen aufgrund von 16 S rDNA Teilsequenzen.

Isolat # 144 gehörte zu den Stämmen, die FB₁ am raschesten metabolisieren konnten. Dieser Stamm konnte auch sehr hohe FumonisinKonzentrationen noch abbauen (Fig. 2). Als Zwischenprodukt des Abbaus wurde hydrolysiertes FB₁ (HFB₁) detektiert, das jedoch weiter metabolisiert wurde (Fig. 3).

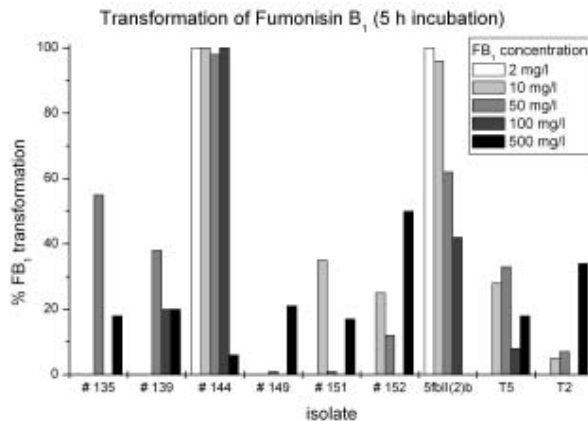


Fig. 2: Untersuchung des Abbaus von Fumonisin B₁ im Konzentrationsbereich von 2 bis 500 mg/l durch neun mikrobielle Isolate.

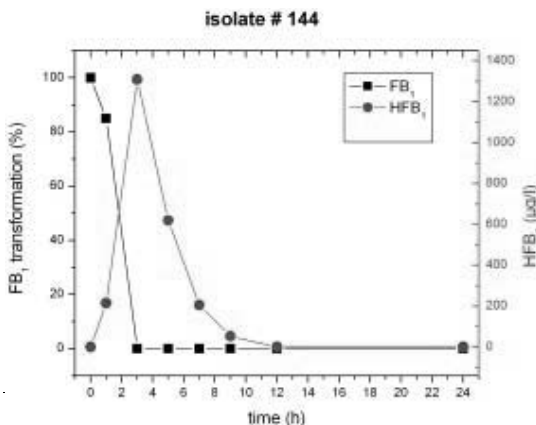


Fig. 3: Abbau von FB₁ durch Mikroorganismus # 144. 10 mg/l FB₁ wurden mit frischer Biomasse mit einer Keimzahl von 10⁸/ml, was einer 33-fachen Verdünnung der Kultur entspricht, in Mineralsalzpuffer versetzt und aerob bei 25°C inkubiert. Nach drei Stunden waren FB₁ und nach zwölf Stunden

auch hydrolysiertes Fumonisin B1 (HFB₁) vollständig abgebaut.

Die Endprodukte des Fumonisinabbaus durch Isolat #144 wurden einem Phytotoxizitätstest mit *Lemna minor* unterzogen. Während FB₁ und HFB₁ toxische Wirkung zeigten, konnte nach der Umsetzung mit Isolat # 144 keine Toxizität mehr festgestellt werden (Fig. 4).

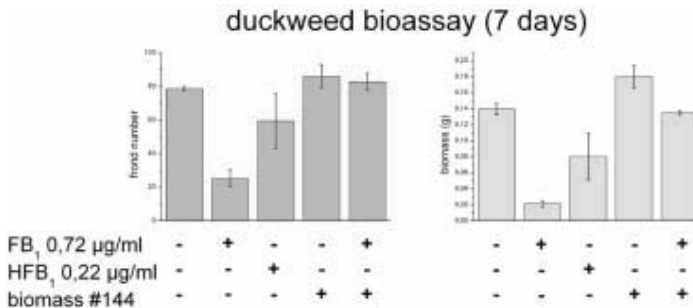


Fig. 4: Phytotoxizitätstest mit *Lemna minor*. FB₁, HFB₁ und mit Mikroorganismus # 144 (*Sphingomonas* sp.) abgebautes FB₁ wurden zu gleichen Kulturen von *Lemna minor* zugesetzt, und nach einer Woche wurden die Blättchenzahl und die Biomasse bestimmt. FB₁ und HFB₁, nicht aber mit # 144 transformiertes FB₁, hemmten das Wachstum von *Lemna minor*.

Die neun ausgewählten Stämme wurden auch auf ihre Fähigkeit zum Fumonisinabbau bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten, sowie unter anoxischen und anaeroben Bedingungen untersucht. Besonders Isolat # 144 erwies sich als robust und konnte auch bei höheren Temperaturen, pH-Werten und in sauerstofffreiem Milieu noch entgiften. Dieser und andere Stämme bauten auch in komplexen Medien wie Maisgrieß, Weizengrieß oder autoklaviertem Bier Fumonisin noch vollständig ab.

Diskussion:

Für die technologische Verwendbarkeit der beschriebenen, neu isolierten Mikroorganismen als Futtermittelzusatz ist entscheidend, daß Fumonisin im Verdauungstrakt von Tieren auch in relativ niedriger Konzentration noch vollständig und rasch in ungiftige Metaboliten übergeführt werden kann. Im Gegensatz zu früher beschriebenen, fumonisinmetabolisierenden Stämmen von *Exophiala spinifera*, konnten einige der neuen bakteriellen Stämme auch in komplexem Medium entgiften. Diese Stämme produzierten als erstes Zwischenprodukt des Abbaus ebenso wie die beschriebenen *Exophiala*-Stämme hydrolysiertes FB₁ [4]. Der weitere Abbauweg der neuen Stämme wurde noch nicht analysiert, aber die Endprodukte zeigten keine Phytotoxizität. Aufgrund der Fähigkeit, FB₁ über einen weiten Konzentrationsbereich rasch, vollständig, und unter Bedingungen ähnlich

wie im tierischen Verdauungstrakt entgiften zu können, scheint die Entwicklung eines mikrobiologischen Futtermittelzusatzes mit den neuen Stämmen, insbesondere mit Isolat #144, möglich zu sein.

Literatur:

1. Marasas, W. F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspectives* **109**, 239-243.
2. Desai, K., Sullards, M. C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E. M., Hartl, M., Humpf, H. U., Liotta, D. C., Peng, Q. & Merrill, A. H., Jr. (2002). Fumonisins and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 188-192.
3. Shephard, G. S., Thiel, P. G., Stockenstrom, S. & Sydenham, E. W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal Of AOAC International* **79**, 671-687.
4. Blackwell, B. A., Gilliam, J. T., Savard, M. E., David Miller, J. & Duvick, J. P. (1999). Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B₁ (AP₁) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Natural Toxins* **7**, 31-38.

Diese Arbeit wurde von der österreichischen Forschungsförderungsgesellschaft unterstützt.

Autoren: Martin TÄUBEL*, Wulf-Dieter MOLL** und Gerd SCHATZMAYR: Biomin GmbH, Industriestraße 21, 3130 Herzogenburg; Elsa VEKIRU, Alexander FRANK: Analytikzentrum und Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Andreas P. LOIBNER und Rudolf BRAUN: Institut für Umweltbiotechnologie, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien.

* derzeitige Adresse: University of Kuopio, Finland.

** korrespondierender Autor, dieter.moll@biomin.net

Einsatz der Gentechnik zur Reduktion von Mycotoxinen in Kulturpflanzen

H. DEGENHARDT

Key words:

mycotoxins, fusarium, fumonisin, deoxynivalenol (DON), zearalenon, transgenic corn, bt-corn, fungy resistance, plant breeding, genetically modified, corn, wheat, cereals, vine

Viele bedeutende Kulturpflanzen, darunter Mais, Weizen und Wein werden von Pilzkrankheiten befallen, die zu erheblichen Ertragsbeeinträchtigungen führen können. Zu den am häufigsten vorkommenden Schadpilzen zählen *Fusarien*arten und die *Gibberella* Kolbenfäulen. Diese Pilze bilden toxische Stoffwechselprodukte, die Mykotoxine. Allein bei den ca. 10 *Fusarium* Arten sind 100 verschiedene Mycotoxine bekannt die in 3 Hauptgruppen unterteilt werden, die Gruppe der Trichothecene, Zearalenone und die Fumonisine. Zu den bedeutendsten gehört das Trichothecen Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA). Während *Fusarien*toxine in ganz Europa vorkommen können, ihren Schwerpunkt jedoch in den wärmeren Regionen haben und dort häufig Fumonisine hervorbringen, sind in unseren Breiten vor allem die Toxine der *Gibberella* Pilze (DON und ZEA) verbreitet (MUNKVOLD *et al.*, 1999). Bei hohen Temperaturen können Pilze der Gruppe *Aspergillus* die toxischen Aflatoxine bilden.

Je nach Art und Menge können Mykotoxine zu chronischen und akuten Vergiftungserscheinungen führen, wie Leistungsabfall, Durchfall, Fruchtbarkeitsstörungen bis hin zu Nieren- und Leberschädigungen. Milchproduzenten geben Deoxynivalenol (DON) als eine Ursache für Tiergesundheit und verminderte tierische Leistung an (SEGLAR, 1999). DON ist in Maissilagen stark verbreitet (z.B. WILKINSON, 1999). HANSCHMANN und KRIEG (2004) wiesen jährlich in 20 bis 90 % der untersuchten Maisroben die *Fusarien*toxine (DON, ZEA) mit Maximalwerten für DON von 2500 bzw. 4600µg/kg nach. OLDENBURG und HÖPPNER (2003) kommen wie auch MAGG *et al.* (2002) zu dem Ergebnis, dass DON in deutschen Maissilagen häufiger und in höheren Konzentrationen vorkommt, als ZEA. SCHOLLENBERGER *et al.* (2004) weisen in 106 Futter- und Lebensmittelproben aus Mais der Jahre 2000-2001 alle 14 untersuchten *Fusarien*toxine nach. Toxingehalte der Futtermittel waren im Vergleich zu denen der Lebensmittel deutlich höher. MASTEL (2004) fand zudem Unterschiede zwischen Maissorten und geht davon aus, dass die Schadpilze nicht allein mit Hilfe von ackerbaulichen Maßnahmen oder geeigneten Sorten ausreichend kontrolliert werden können.

Die Bekämpfung der Schimmelpilze durch Pflanzenresistenzzüchtung, Anbaumanagement, indirekt durch die Verminderung von Pflanzenverletzungen oder durch gentechnische Methoden kann helfen die Mykotoxinbelastung an Pflanzen zu reduzieren (MUNKVOLD UND DESJARDINS, 1997, DUVICK 2003).

Bei Mais finden sich oft hohe Mykotoxinbelastungen in Beständen, die durch den Fraßschädling Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) geschädigt wurden. An den Fraßstellen, die der Schädling an den Pflanzen verursacht, siedeln sich verstärkt Schimmelpilze an. Ein Zünslerschutz durch die gentechnisch Veränderung zur Ausbildung eines Bt-Endotoxins (Cry1Ab von *Bacillus thuringiensis*) bietet einen entscheidenden Vorteil, (z.B. DEGENHARDT et al. 2003, PINSON et al. 2003). BAKAN et al. 2002) weisen über den Gehalt an Ergosterol, ein spezifischer Bestandteil von Pilzmembranen, einen 4 – 18-fach reduzierten Pilzbefall von transgenem Bt-Mais im Vergleich mit den isogenen Sorten nach. An den Kornproben aus Spanien und Frankreich war insbesondere der Gehalt von Fumonisin B in den transgenen Sorten mit 0,05 bis 0,3 ppm gegenüber 0,4 bis 9 ppm für die isogenen deutlich reduziert. Diese Ergebnisse wurden von MASOERO et al. 2004) in Italien bzw. in den USA von MUNKVOLD et al. (1999 und 2003) für die Jahre 1995 bis 1997 und HAMMOND et al. (2004) an 107 Standorten in den Jahren 2000-2002 in den USA vollumfänglich bestätigt.

PAPST et al. (2005) weisen für DON und Fumonisin deutliche Effekte von Bt-Mais - Bt176 und Mon810 - in Deutschland nach, finden aber nicht für alle untersuchten Mykotoxine eine Abhängigkeit vom Fraßschaden. Während die Effekte auf den DON-Gehalt von Mais in Untersuchungen von MAGG et al. (2002 und 2003) nicht eindeutig waren, wurde bei Moniliformin eine signifikante Reduktion durch die transgenen Sorten gefunden. SCHAAFSMA et al. (2002) fanden in Kanada eine signifikante Reduktion des DON-Gehaltes und eine deutliche Abhängigkeit vom Insektenfraß und

Beispiele für mikrobielle Toxine, Resistenzgene und resultierende transgene Eigenschaften

Toxin	Pathogen	Krankheit	Herkunft Resistenzgen	Trans-gen	Quelle
Tob-toxin	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tobaci</i>	Wildfire of tobacco	Acetyl transferase #7, <i>P. s. pv. tobaci</i>	Tobacco	Yonejima & Suzuki, 1991
Fusaric acid	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomato wilt	Unknown gene, <i>Gliocladium</i> sp.	no	Ursumi et al., 1991
HC-toxin	<i>Cochliobolus carbonum</i> Race I	Leaf spot of maize	HC-toxin reductase (HRI), <i>Zea mays</i>	(Native gene)	John & Briggs, 1992
Brefedlin A	<i>Alternaria carboni</i>	Safflower leaf blight	Esterase, <i>A. subtilis</i>	no	Kocouel et al., 1994
Beexynivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	Wheat scab, maize ear rot	Resistant L3 ribosome, <i>Oryza sativa</i>	Tobacco callus	Harris & Gleddie, 1999
Ahlicidin	<i>Xanthomonas albilineans</i>	Sugarcane leaf scald	Esterase, <i>Pantoea</i> sp.	Sugarcane	Zhang et al., 1999
Oxalic acid	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sunflower white mold	Oxalate oxidase, <i>Triticum aestivum</i>	Sun-flower	Seehong et al., 2000
Beexynivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	Wheat scab, maize ear rot	Trichothecene efflux pump, <i>Fusarium sporotrichoides</i>	Yeast	Alexander et al., 1999

Quelle: DUVICK 2000

den Pflanzen. Alle Autoren finden deutliche Jahres- und Ortseffekte. Wu et al. (2004) schätzen die ökonomischen Auswirkungen von Bt-Mais in den USA allein für Fumonisin und Deoxinivalenol auf 17 Millionen Dollar jährlich.

Die Auswirkungen von transgenem Bt-Mais und den zugehörigen nahisogenen Sorten in der Fütterung wurde von vielen Autoren, mit vergleichbaren Ergebnissen, untersucht. Stellvertretend soll eine Studie Rossi et al. (2005) an Masthähnchen vorgestellt werden. Während der Fumonisingehalt des Bt-Mais signifikant geringer war, waren die festgestellten Tageszunahmen und Mastendgewichte in einer 42-tägigen Fütterungsperiode im transgenen Mais zwar niedriger, aber nicht signifikant.

In vielen Forschungsprojekten wird weltweit versucht mit Methoden der konventionellen Pflanzenzüchtung und Unterstützung der Gentechnik Resistenzmechanismen gegen das Wachstum von Schadpilzen auf der Pflanze oder der Inaktivierung schädlicher Mykotoxine zu finden (DUVICK 2001, MIEDANER, 2004, NICHOLSON et al. 2004)

Gentechnische Möglichkeiten der Pilzbekämpfung:

- Erhöhung der hypersensitiven Reaktion. Viele Pflanzen stoßen das von den Pilzen befallene Zellgewebe ab und verhindern so eine Vermehrung der Erreger. Dieser Mechanismus wird gentechnisch verstärkt. Der Weg wurde bei Kartoffeln beschritten, um sie weniger anfällig gegen den Erreger der berüchtigten Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans*) zu machen.
- Einschleusen von Genen für bestimmte Proteine, die von Pflanzen zur Abwehr von Pilzen gebildet werden
- Übertragung pflanzlicher oder bakterieller Gene für Substanzen, die Pilze zerstören, z.B. Chitinase oder Glukanase

Chitin ist ein Mehrfachzucker in den Zellwänden von Hefen, Pilzen und Algen. Er übt eine Stützfunktionen aus (vergl. Cellulose bei Pflanzen) bei einigen wirbellosen Tieren (z.B. Insekten, Spinnen). Mit Hilfe des Enzyms Chitinase wird Chitin, der Zellwandbaustein der meisten Pilze abgebaut. Sie greifen die in die Pflanzenzelle eindringende Pilzhyphe an und hemmen das Wachstum des Pilzes. Chitinasegene wurden z.B. aus Gerste und einem Bodenbakterium isoliert (JACH et al. 1995). Chitinase-Gene lassen sich in das Genom von Pflanzen übertragen und lösen dort Pilzresistenz aus (Abtöten krankheitserregender Pilze). Dies wird etwa bei Riesling-Weinreben zur Verbesserung der Widerstandsfähigkeit gegen Mehltau oder Grauschimmel z.B. am Standort Siebeldingen (Deutschland) erprobt. In diesem Fall wurden zwei neue Gene in das Erbgut eingeschleust. Eines sorgt dafür, dass die Reben die Zellwand zerstörende Chitinase produzieren. Ein weiteres Gen führt zu einer Blockierung des Zellstoffwechsels der Pilze und soll dessen Wachstum unterdrücken.

Ein ähnliches Prinzip liegt auch der gentechnisch induzierten Glukanase zu Grunde. Pilzresistenzen, die auf dieser Strategie beruhen, werden bei Weintrauben, Weizen oder Gerste entwickelt. Verwendet werden meist Gene für β -1,3-Glukanasen. Diese Enzyme greifen an speziellen Bindungsstellen innerhalb des großen Glukan-Moleküls an.

Glukane sind wichtige Stützsubstanzen aus Kohlehydraten in den Zellwänden der Pilze, die aus Einfachzucker (wie Stärke) bestehen, jedoch besondere Bindungsformen innerhalb der Moleküle besitzen. Das Enzym Glukanase baut Glukane ab, die viele Mikroorganismen als Nährstoffe verwenden. Glukanasen finden großtechnische Anwendung beim Bierbrauen zur Unterstützung der Bierhefen beim Glukanabbau aus Gerste (wegen Reinheitsgebot in Deutschland nicht zugelassen).

In der Resistenzzüchtung gibt es gentechnische Ansätze durch Ribosomen-inhibierende Proteine (RiPs), die durch Inaktivierung der zuständigen Ribosomen die Bildung von bestimmten Eiweißen bei Pilzen verhindern, zur Abwehr von pflanzlichen Pilzen einsetzen. Werden sie in transgenen Pflanzen gebildet, hemmen sie die Proteinsynthese eindringender Pilze und verhindern dadurch weiteres Pilzwachstum. Pflanzeigene Ribosomen werden nicht angegriffen.

Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass sich mit Hilfe der Stilllegung von RNA in Pilzen die Bildung von Mykotoxinen verhindern lässt (McDONALD et al. 2005).

Literatur

- BAKAN B., MELCION D., RICHARD – MOLARD D. AND CAHAGNIER B. (2002): Fungal Growth and Fusarium Mycotoxin Content in Isogenic Traditional Maize and Genetically Modified Maize Grown in France and Spain. *J. Agricultural and Food Chemistry* **50**: 728-731.
- DEGENHARDT, H.; HORTSTMANN, F.; MÜLLEDER, N. (2003): Bt Mais in Deutschland. Erfahrungen mit dem Praxisanbau von von 1998 bis 2002. *MAIS* **31** (2/2003) 75–77.
- DUVICK J. (2001): Prospects for Reducing Fumonisin Contamination of Maize through Genetic Modification. *Environmental Health Perspectives* **109**(2) : 337-342.
- DUVICK, J. (2003): Transgenic crops for enhanced disease resistance and food safety. *Plant biotechnology 2002 and beyond. Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, Orlando, Florida, USA, 23-28 June, 2002*: 111-114.
- HAMMOND, B. (2004): A review of the food/feed safety and benefits of *Bacillus thuringiensis* protein containing insect-protected crops. *Agricultural Biotechnology: Challenges and Prospects*. **866**: 103-123.
- HAMMOND, B. G., CAMPBELL, K. W., PILCHER, C.D., DEGOOYER, T.A., ROBINSON, A.E., MCMILLEN, B.L., SPANGLER, S.M., RIORDAN, S.G., RICE, L.G. AND RICHARD, J.L. (2004): Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(5): 1390-1397.
- HANSCHMANN, G. UND KRIEG, D. (2004): Grundfutterqualität in Sachsen: Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen an Silomais der Jahre 1998-2003. 26. Mycotoxin-Workshop 17.-19.Mai 2004. *LfL Schriftenreihe 3 / 2004* : 68. ISSN 1611-4159.

- MAGG T., MELCHINGER E., KLEIN D. AND BOHN M. (2002): Relationship Between European Corn Borer Resistance and Concentration of Mycotoxins Produced by *Fusarium* spp. in Grains of Transgenic Bt Maize Hybrids, their Isogenic Counterparts, and Commercial Varieties. *Plant Breeding* **121** : 146-154.
- MAGG, T., BOHN, M., KLEIN, D., MERDITAJ, V. AND MELCHINGER, A. E. (2003): Concentration of moniliformin produced by *Fusarium* species in grains of transgenic Bt maize hybrids compared to their isogenic counterparts and commercial varieties under European corn borer pressure. *Plant Breeding* **122**(4): 322-327.
- MASOERO F., MOSCHINI M., ROSSI F., PRANDINI A., AND PIETRI A. (1999): Nutritive Value, Mycotoxin Contamination and in Vitro Rumen Fermentation Of Normal and Genetically Modified Corn (CRY1A(B)) Grown in Northern Italy. *Maydica* **44**: 205-209.
- MASTEL, K. (2002): Wie anfällig ist Mais gegen *Fusarium*? LAP Forchheim Infodienst.
- MCDONALD, T., BROWN, D. KELLER, N. P. AND HAMMOND T. M. (2005): RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**(6): 539-545.
- MIEDANER, T. (2004): Plant breeding as a tool for reducing mycotoxins in cereals. Meeting the mycotoxin menace: Proceedings of the 2nd World Mycotoxin Forum held in Nordwijk, the Netherlands, 17-18 February 2003.: 89-111.
- MUNKVOLD, G. P. AND DESJARDINS, A. E.. (1997): Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* **81**(6): 556-565.
- MUNKVOLD, G. P., HELLMICH, R. L., AND RICE, L. G. (1999): Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Dis.* **83**: 130-138.
- MUNKVOLD G., (2003): Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:99–116.
- NICHOLSON, P., GOSMAN, N., DRAEGER, R. AND STEED, A. (2004): Control of *Fusarium* and *Aspergillus* species and associated mycotoxins on wheat and maize. Meeting the mycotoxin menace: Proceedings of the 2nd World Mycotoxin Forum held in Nordwijk, the Netherlands, 17-18 February 2003.: 113-132.
- NIESING, B. (2004): Pilzresistenter Weizen. *Fraunhofer Magazin* 2004/4 14 - 15. Interview mit: Peschen, D. Fraunhofer-Institut f. Molekularbiologie und Angewandte Ökologie.
- OKUBARA, P. A., BLECHL, A. E., MCCORMICK, S. P., ALEXANDER, N.J., DILL-MACKY, R., HOHN, T.M. (2002): Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theoret.+Applied Genet.* **106**(1): 74-83.
- OLDENBURG, E. UND HÖPPNER, F. (2003): *Fusarium* Mycotoxins in Forage Maize – Occurrence, Risk Assessment, Minimization. Gesellschaft für Mycotoxinforschung e.V. (GMF). 25. Mykotoxin-Workshop 19.-21.Mai 2003 Giessen. 5 – 8.
- PAPST, C.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E.; EDER, J.; MAGG, T.; KLEIN, D.; BOHN, M.: (2005): Mycotoxins Produced by *Fusarium* spp. in Isogenic Bt vs. non-Bt Maize Hybrids under European Corn Borer Pressure. *Agron. J.* **97**:219–224 (2005).
- PINSON, L., PLANCKE, M. P., RICHARD-FORGET, F. FLEURAT-LESSART, F.(2003): *Fusarium* mycotoxins in isogenic and Bt maize varieties grown in different geographic areas in France. Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection, York, UK, 22-26 July 2002: 511-516.

- ROSSI, F., MORLACCHINI, M., FUSCONI, G., PIETRI, A., MAZZA, R. PIVA, G. (2005): Effect of Bt corn on broiler growth performance and fate of feed-derived DNA in the digestive tract. *Poultry Science* **84**(7): 1022-1030.
- SCHAAFSMA, A. W., HOOKER, D. C., BAUTE, T.S., ILLINIC-TAMBURIC, L. (2002): Effect of Bt-corn hybrids on deoxynivalenol content in grain at harvest. *Plant Disease* **86**(10): 1123-1126.
- SCHOLLENBERGER, M.; MÜLLER, H. M.; DROCHNER, W. (2004): Fusarientoxingehalte in Mais und Produkten auf Maisbasis. 26. Mycotoxin-Workshop 17.-19.Mai 2004. LfL Schriftenreihe 3 / 2004 : 93. ISSN 1611-4159.
- SEGLAR B. (1998): Mycotoxins in grains and forages: Dairy health implications. Southwest Dairy Herd Management Conf. Macon, Georgia - November 9, 1998. PIONEER Nutritional Insights.
- SEGLAR B. (1999): The bovine proceedings. 32: 54-60.
- WU, F., MILLER, J. D. AND CASMAN, E.A. (2004): The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* **23**(2-3): 397-424.

Autor: Dr. Heinz DEGENHARDT, PIONEER Hi-Bred Northern Europe Sales Division GmbH, Apensener Str. 198, D – 21614 Buxtehude, Phone +49 4161-7370; email: heinz.degenhardt@pioneer.com

Erfahrungen zum Fungizideinsatz zur Bekämpfung von Ährenfusarien

Field Experiments with fungicides against fusarium head blight in cereals

H. KÖPPL

Summary:

In order to control fusarium head blight and decrease the risk of contamination with mycotoxins it is necessary to combine preventive and direct measures. The specific application of effective fungicides (containing azols) to control the fungus must take place during the blossom of the cereals and must be based on the weather criteria (3-5 mm rain, temperature above 16°C). The reductions of mycotoxins to a margin of 70 (80) % is possible.

Key words: fusarium head blight, application of fungicides, reduction of mycotoxins

Zusammenfassung:

Zur Bekämpfung von Ährenfusarien sind vorbeugende und direkte Maßnahmen aufeinander abzustimmen. Der gezielte Fungizideinsatz zur Bekämpfung der Pilze und zu einer Reduktion der Mykotoxinbelastung muss in der Blüte des Getreides nach 3-5 mm Niederschlägen und Temperaturen über 16°C mittels wirksamer (azolhaltiger) Fungizide erfolgen. Eine Verminderung der Belastung mit Mykotoxinen bis zu max. 70 (80) % ist möglich.

Schlüsselwörter: Ährenfusarien, Fungizideinsatz, Mykotoxinreduktion

Die Landwirtschaftskammer Oberösterreich hat sich in den letzten Jahren mit Praxisfungizidversuchen zur Bekämpfung von Ährenfusarien in Getreide und zur Reduktion des Mykotoxingehaltes im Erntegut beschäftigt. Darüber hinaus gibt es ein österreichweites Mykotoxinmonitoring bei ca. 200 bis 250 Getreideproben. Alle Untersuchungen zeigen, dass vorbeugende Maßnahmen teilweise eine größere Wirkung haben als direkte chemische Behandlungen. Das heißt, eine sorgfältige Einarbeitung der Ernterückstände v.a. bei der Vorfrucht Mais aber auch die Sortenwahl verhindern den Befall maßgeblich. Trotzdem soll der Einsatz von Fungiziden nicht außer Acht gelassen werden.

Unter welchen Voraussetzungen sollte man eine direkte Behandlung von Ährenfusarien in Betrachtung ziehen?

- bei Vorfrucht Körnermais (eventuell Silomais) und nicht wendender Bodenbearbeitung
- bei großen Mengen an Ernterückständen der oben genannten Vorfrüchte an der Oberfläche (zur Blüte des Getreides)
- bei wechselfeuchter, warmer Witterung (Tagesdurchschnittstemperatur über 16-18° C, mindestens 3-5 mm Niederschlag und 24 Stunden Ährenfeuchte) im Zeitraum um oder in der Blüte („herabhängende Staubbeutel“) des Getreides

- beim Anbau anfälliger Sorten (zB. Komfort, Grandios) besteht auch bei Pflugfurche eine gewisse Gefahr bei Maisvorfrucht.

Wann und womit sollte behandelt werden?

Der optimale Einsatztermin ist wie oben beschrieben in der Blüte bei heraushängenden Staubbeutel nach einem Niederschlag. Das Einsatzfenster der Produkte reicht von 1 Tag vorbeugender Wirkung und 2 bis 3 Tage heilender Wirkung – die Zeit vor/nach dem infektiösauslösenden Niederschlag ist also relativ kurz. Die „gezielte Ährenfusariumbehandlung“ erfolgt am besten unter Zuhilfenahme z.B. des Prognosemodells pro_Plant (Gratisversion abrufbar unter der Adresse www.weizen-expert.at). Mit eigener Wetter- und Bestandesbeobachtung und der pro_Plant-Empfehlung kann in den meisten Fällen der optimale Behandlungstermin gefunden werden. Für die breite Praxis gibt es Informationen über den Warndienst der Landwirtschaftskammern.

Die Ausbringung muss bei Tagestemperaturen über 25° C in den Abendstunden oder am frühen Morgen erfolgen, sofern keine Gefahr des Abtropfens durch zu starken Tau besteht.

Die zu behandelnde Zielfläche ist die Ähre, d.h. der Spritzbalken muss dementsprechend hochstellbar sein. Wichtig ist eine gute Anlagerung der Tröpfchen auf den Ähren, die Wassermenge soll je nach Düsengröße nicht unter 200 besser 250 l/ha liegen. Zur Ausbringung können auch abdriftreduzierende Düsen verwendet werden (im optimalen Druckbereich fahren); aus Deutschland werden gute Erfolge mit Doppelfachstrahl-Injektordüsen berichtet, wo die Ähre von zwei Seiten benetzt werden kann. Termine deutlich vor der Blüte bringen nicht den gewünschten Erfolg. Es ist sogar möglich, dass v.a. beim Einsatz von strobilurinhaltigen Produkten, ein leichter Anstieg der Mykotoxinwerte möglich ist.

Zugelassene Fungizide

Der Wirkungsgrad liegt auch bei zugelassenen Produkten bei max. 70-80 %. Registriert sind die azolhaltigen Produkte Folicur (1 l/ha, Wirkstoff: Tebuconazol) und Caramba (1,5 l/ha, Wirkstoff: Metconazol) sowie Pronto plus (1,5 l/ha; besteht aus Folicur plus dem Mehлтаuprodukt Impulse). Neu auf dem Markt ist die Produktkombination Input-Set (0,6 l/ha Proline (Wirkstoff: Prothioconazol) + 0,6 l/ha Impulse).

Der Vorteil besteht in einer sehr guten Mykotoxinreduktion und einer besseren vorbeugenden Wirkung (2 bis 3 Tage vor dem Infektionsereignis). Die angegebenen Aufwandmengen sollen nicht unterschritten werden. Weiters besitzen die Kombinationsprodukte aus einem strobilurinhaltigen und einem azolhaltigen Produkte wie Juwel top und Fandango eine Zulassung in Deutschland gegen Fusariumpilze. In der Beratung werden diese jedoch nicht empfohlen. Ab 2006 ist der Strobilur

rinwirkstoff Dimoxystrobin im Produkt Swing Gold (zusätzlich mit Epxiconazol) im Handel, der eine Wirkung gegen Fusariumpilze besitzt.

Versuche

In Summe kann gesagt werden, dass eine doppelte Fungizidbehandlung, die bei einer gezielten Bekämpfung der Ährenfusarien im Feuchtgebiet notwendig ist, nicht immer wirtschaftlich sein wird. Die erste Behandlung gegen Blattkrankheiten wie Mehltau, Braunrost, Blattseptoria, DTR erfolgt je nach Infektionslage im BBCH-Stadium 32-49, die gezielte Fusarium-Behandlung im BBCH-Stadium 61-69. Bei richtigem Einsatz zum optimalen Termin ist jedoch immer eine deutliche Reduktion des Mykotoxingehaltes erzielbar (siehe auch Tabelle 1). Die Vorfrucht Mais schnitt v.a. bei reduzierter Bodenbearbeitung schlechter ab als andere Vorfrüchte.

Tab. 1: Winterweizen-Praxisfungizidversuche 1998-2000 (unwiederholt); Bodenbearbeitung, Vorfrüchte und Mykotoxine; DON-Werte in µg/kg

Bodenbearbeitung	reduziert ¹⁾	Pflug	reduziert ¹⁾	Pflug
Vorfrucht	Körnermais	Körnermais	Nicht-Mais ²⁾	Nicht-Mais ³⁾
Anzahl d. Versuche	5	4	3	3
<i>Variante</i>				
unbehandelt	4730	1130	150	160
gezielte Ährenfusariumbehandlung ⁴⁾	1870	220	170	80
einmalige Behandlung ⁵⁾	5080	1180	220	170

Legende:

1) Mulchsaat oder Direktsaat

2) Zuckerrübe, Erbse

3) Raps, Sonnenblume

4) in den Blattbereich ca. EC 37/39 Gladio oder Tilt 250 EC

in die Ähre gezielt ca. EC 63 (Blüte, Regen > 5 mm, Temp. > 16° C) Folicur oder Caramba

5) ca. EC 49/51 Strobilurin + Azol-Kombination (Amistar + Pronto plus oder Folicur)

In den Jahren 2002 bis 2004 wurden an einem Standort die Fungizidversuche weitergeführt. Auf einem maisintensiven Betrieb (mit Pflugfurche bei Anbau von Weizen nach Mais) haben sich die bereits gewonnenen Erkenntnisse bestätigt (Tabelle 2), die Ertragszuwächse waren jedoch durch die gezielte Behandlung nicht rentabel.

Tab.2: Winterweizen-Praxisfungizidversuche 2002-2005; Vorfrucht, optimaler Behandlungs-termin; DON-Werte in µg/kg, Ertrag in dt/ha

Vorfrucht Sorte Standort: Betrieb im Bezirk Wels	2002 Raps Komfort Pflug	2003 Körnermais Komfort Pflug	2004 Körnermais Grandios Pflug	2005 Körnermais Winnetou Pflug	Durchschnitt	rel. %
DON in µg/kg						
unbehandelt	180	1500	870	360	730	100,0
gezielte Ährenfusariumbehandlung ¹⁾	100	220	540	120	250	34,2
einmalige Behandlung ²⁾	300	1290	1080	470	790	108,2
Ertrag in dt/ha						
unbehandelt	77,1	66,6	82,0	62,3	72,0	100,0
gezielte Ährenfusariumbehandlung ¹⁾	82,2	67,8	84,5	73,8	77,1	107,1
einmalige Behandlung ²⁾	82,8	73,3	87,6	73,8	79,4	110,3
1) in den Blattbereich ca. EC 37/39 Gladio in die Ähre gezielt ca. EC 61-69 (Blüte, Regen>5 mm, Temp. >16° C) nach pro. Plant-Prognose: Folicur, Caramba oder Input-Set (2004, 2005) 2) ca. EC 49/51 Strobilurin + Azol-Kombination (4-7 verschiedene)						

Für Triticale stimmen nach unseren Versuchen die Ergebnisse mit denen bei Weizen überein, teilweise gibt es eine noch deutlichere Anfälligkeit gegen Fusariumpilze.

Autor: DI Hubert KÖPPL, Pflanzenschutzreferent, Landwirtschaftskammer Oberösterreich, Auf der Gugl 3,
4021 Linz, Tel. 0732/6902-1412, Hubert.Koepl@lk-ooe.at

Möglichkeiten der Bindung und Deaktivierung von Mykotoxinen in Futtermitteln

T. KICKINGER

Eine Zulassung für Toxindeaktivatoren liegt in der EU nicht vor. In Österreich sind solche Produkte bzw. deren Auslobung erlaubt, bei welchen aufgrund von wissenschaftlichen Versuchen die Wirkung nachgewiesen werden konnte. Der Großteil dieser Produkte fällt unter die Kategorien Ergänzungsfuttermittel oder Vormischungen, welche in ihrer Zusammensetzung Tonminerale, Hefen, usw., aufweisen.

Eine mögliche Zusammensetzung eines Produkts (ob als Toxindeaktivator ausgelobt oder nicht), welches zur Deaktivierung von Mykotoxinen in der Tierernährung eingesetzt wird, enthält eine oder mehrere der folgenden Bestandteile:

- Mineralische Binder
- Vitamin E
- Hefebestandteile
- freie Nukleotide (als Hefebestandteile)
- Enzyme und Mikroorganismen

Mineralische Binder:

Als Mineralische Binder werden Produkte mit großer Oberfläche, wie z.B. Tonminerale, Bentonite oder Silikate eingesetzt. Die Mykotoxine (z.B.: Aflatoxine) bleiben an der mineralischen Komponente haften und werden nicht resorbiert, sondern über den Kot ausgeschieden. Es werden jedoch nicht alle Mykotoxine fest genug adsorbiert, wie z.B. Fusarientoxine (Trichothecene, Zearaleon,....), und die Wirkung ist daher oft stark beeinträchtigt.

Vitamin-E:

Sehr oft ist bei Mykotoxinbindern Vitamin E zugesetzt, da neben der gewollten Bindung von Mykotoxinen und Schadstoffen, auch die Gefahr der Bindung von Vitamin E besteht. Zusätzlich hat Vitamin E eine wichtige Funktion in der Leber inne, die als wichtiges Stoffwechselorgan gerade durch die Anwesenheit von Mykotoxinen großen Belastungen ausgesetzt ist.

Hefebestandteile:

Laut Angaben von Herstellern von „Mykotoxindeaktivatoren“ besitzen Hefebestandteile aufgrund des hohen Gehalts an β -Glucanen und β -Mannanen einen immunstimulierenden, sowie prebiotischen Effekt. Durch die Anwesenheit von alpha- und iso-Humulonen aus dem Bierhopfen kann darüber hinaus noch eine bakterizide Wirkung erzielt werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass derartige „gesundheitsbezogene“ Angaben laut Futtermittelgesetz nicht zulässig sind.

Freie Nukleotide (als Hefebestandteile):

Freie Nukleotide werden aufgrund von positiven Wirkungen auf das Immunsystem, die Proteinsynthese, die Verdauung und die Leberfunktion in „Mykotoxindeaktivatoren“ eingesetzt. Auch hier wird die Grenze von legalen zu nicht legalen Aussagen laut Futtermittelrecht oft überschritten.

Enzyme und Mikroorganismen:

Selektiv mittels spezifischer Moleküle können genau jene Teile der Mykotoxine inaktiviert werden, die für die Toxizität verantwortlich sind. Die somit entstehenden Metaboliten sind für das Tier weitgehend unbedenklich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass zur Zeit in der EU eine Zulassung für einen Mykotoxindeaktivator nicht vorliegt. In Österreich ist eine derartige Auslobung von Futtermitteln nur nach wissenschaftlichen Versuchen, welche eine toxindeaktivierende Wirksamkeit bestätigen, gestattet. Alle in der Zusammensetzung befindlichen Stoffe müssen zugelassen sein und „gesundheitsbezogene“ Aussagen sind laut Futtermittelrecht unzulässig.

Autor: DI Thomas KICKINGER, Österr. Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

Mykotoxingehalte in Getreide, Futtermitteln und Lebensmitteln (Überblick 2005)

R. ÖHLINGER

Im Beobachtungsjahr 2005 wurde wiederum eine Vielzahl von Mykotoxinanalysen bei verschiedenen Matrices durchgeführt. Große Bedeutung kommt dabei der Erhebung des Mykotoxinaufkommens in heimischem Getreide zu, welches als Ausgangsmaterial für die Futtermittel- bzw. Lebensmittelproduktion dient. Nachfolgend werden zusammenfassend Ergebnisse über Fusarientoxine in Lebensmitteln und Futtermitteln bezogen auf aktuelle und kommende Richt- und Höchstwerte angeführt.

Lebensmittel

Bewertungsgrundlage: VO EG 856/05 (Höchstwerte gültig ab 1.7.2006 bzw. 1.7.2007)

Deoxynivalenol

Matrix	<750 ppb	<1250 ppb	<1750 ppb
Rohgetreide (n=217): Weizen, Gerste, Roggen, Triticale		98,2%	
Rohgetreide (n=28): Hafer, Durum			100 %
Maiskörner (n=98)			82,7%
Weizenmehle (n=175)	99,4%		

Zearalenon

Matrix	<75 ppb	<100 ppb	<200 ppb
Rohgetreide (n=58): Weizen, Gerste, Roggen, Triticale, Hafer, Durum		96,6%	
Maiskörner (n=98)			64,3%
Weizenmehle (n=175)	100%		

Futtermittel

Bewertungsgrundlage: EU Diskussionswerte (Richtwerte-Auswahl), Stand 1.3.2006

Deoxynivalenol

Matrix	<900 ppb	<8000 ppb
Rohgetreide (n=245): Weizen, Gerste, Roggen, Triticale, Hafer, Durum	(97,1%)	100%
Maiskörner (n=98)	(50%)	100%
Futtermittel (n=525)	86,2%	

Zearalenon

Matrix	<100 ppb	<2000 ppb
Rohgetreide (n=58): Weizen, Gerste, Roggen, Triticale, Hafer, Durum	(96,5%)	100%
Maiskörner (n=98)	(37,8%)	100%
Futtermittel (n=486)	93,2	

Autor: Dr. Richard ÖHLINGER, AGES Kompetenzzentrum "Cluster Chemie Linz"

Wieningerstrasse 8, 4020 - Linz; e-mail: richard.oehlinger@ages.at