



ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-
UND AGRARWESEN

MOLD-MEETING 2006

DER

**ALVA-FACHGRUPPE
MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE**

„MYKOTOXINE ENTLANG DER NAHRUNGSKETTE“

ALVA-Mitteilungen Heft5/2007

ISSN 1811-7317

© 2007, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien

ZUSAMMENGESTELLT: 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

Mold-Meeting 2006: Mykotoxine entlang der Nahrungskette

Am 23. und 24. November 2006 hat in der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich in Linz das 10. Mold-Meeting unter dem Generalthema „Mykotoxine entlang der Nahrungskette“ stattgefunden. Aus Anlass des zehnjährigen Jubiläums wurde das Mold-Meeting in einer, wie sich gezeigt hat, sehr gelungenen Kooperation zwischen der ALVA, der AGES-Akademie und der Humboldt-Universität Berlin, neu organisiert. Als Veranstalter freue ich mich über die erfolgreiche Zusammenarbeit mit den neuen Partnern.

Elementare Bestandteile des EU-Lebensmittelrechts sind das Vorsorgeprinzip und die primäre rechtliche Verantwortung der Futter- und Lebensmittelunternehmer. Dieser neue rechtliche Rahmen zur Schaffung eines hohen Gesundheitsschutzniveaus und zur Sicherung der Interessen der übernehmenden Hand und von Endverbrauchern führte zu einem umfassenden Wandel bei Produktion, Handel und Verwertung von Getreide. Dies ist für alle Betriebe der Wertschöpfungskette Getreide auch hinsichtlich Mykotoxinproblematik zu verfolgen. Im Rahmen der Veranstaltung wurden daraus resultierende Auswirkungen und Probleme aus Sicht der Produzenten, der Futtermittel- und Lebensmittel-Industrie und des Handels von mehreren Referenten dargestellt und Lösungsansätze diskutiert.

Da eine Getreideverarbeitungskette mit völlig mykotoxinfreien Erzeugnissen nicht zu verwirklichen ist, besteht das Ziel darin, das Vorkommen dieser Toxine auf ein Minimum zu reduzieren. Im Veranstaltungsteil „Mykotoxinsituation in der Landwirtschaft“ wurden verschiedene Strategien zur Minimierung von Fusariuminfektion und Mykotoxinbelastung bei Erzeugnissen der landwirtschaftlichen Produktion durch Maßnahmen guter landwirtschaftlicher Praxis vorgestellt und im Kontext mit Risikobewertung und Risikomanagement diskutiert.

Anlässlich des zehnjährigen Jubiläums darf resümiert werden, dass sich das Mold-Meeting in den letzten Jahren zu einem bestens etablierten Podium für fachbezogenen Erfahrungsaustausch und wissenschaftliche Diskussionen entwickelt hat. Gemeinsam mit Kooperationspartnern ist das Mold-Meeting daher auch weiterhin als Katalysator für eine interdisziplinäre Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Mykotoxinforschung und Toxinanalytik prädestiniert. Die nachfolgend publizierten Arbeiten stellen einen Auszug aus dem Fachprogramm des „Mold-Meetings“ bei der Vortragstagung 2006 in Linz 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

R. Großgut	
Beispiele gesundheitlicher Risikobewertungen von Mykotoxinen	8
R. Beck & J. Lepschy	
Vorkommen und Bedeutung toxinbildender Schimmelpilze von der landwirtschaftlichen Produktion bis zur Verarbeitung	11
R. Öhlinger	
Mykotoxine – Aktuelle Regelungen und Vorkommen in Österreich	16
H. Köppl & Ch. Krumhuber	
Ergebnisse des österreichischen Mykotoxinmonitorings 2004 bis 2006 bei Getreide	20
T. Kickinger	
Umsetzung der Mykotoxinrichtwerte in der Futtermittelkontrolle	24
S. Zehetner	
Qualitätssicherungssystem „Genuss - mit Sicherheit!“	26
R. Kuchenbecker	
Mycotoxinmanagement der Nestlé Nutrition	28
A. Fellingner, Sigrid Haas-Lauterbach & K. Schmitt	
Internationale Gesetzgebung, analytische Herausforderungen und wirtschaftliche Auswirkungen im Bereich der Mykotoxine	30
W. Buzina, Dagmar Kanzler, Doris Haas, Astrid Paulitsch & F. Mascher	
Qualitative und quantitative Untersuchung von Pilzen im Trinkwasser	34
Barbara Reithner, N. Stoppacher, M. Omann, Susanne Zeilinger, K. Brunner, R. L. Mach, R. Krska & R. Schumacher	
Peptaibole des Biokontrollorganismus <i>Trichoderma</i> – Fungizide der Zukunft ?	38

K. Brunner, D. Kasper, Krista Köllner, M. Lemmens, G. Adam.& Robert L. Mach Reduzierte Virulenz eines Glukoseoxidase produzierenden <i>Fusarium graminearum</i> Stammes	44
W. Schweiger, F. Berthiller, Brigitte Poppenberger, R. Mitterbauer, M. Lemmens, R. Schumacher, R. Krska, & G. Adam Mykotoxin-Glucosid Bildung durch pflanzliche UDP-Glucosyltransferasen: Genorganisation und Substratspezifität	49
F. Berthiller, K.J. Domig, W. Kneifl, Nathalie Juge, M. Sulyok, R. Schuhmacher, R. Krska & G. Adam Modellstudien zur Hydrolyse von Deoxynivalenol-3-O-Glucosid im Magen-Darm-Trakt	53
W. Schweiger, F. Berthiller, W. Bicker, R. Schumacher, R. Mitterbauer & G. Adam Entwicklung eines auf Hefe basierenden in vivo Testsystems für UDP-Glucuronosyltransferasen hinsichtlich der Fähigkeit zur Detoxifikation von Fusarium-Mykotoxinen	58
Monika Gossmann, Franziska Beran, Astrid Plenk, G. Bedlan, S. Hamedinger, R. Öhlinger, H.-U. Humpf & Carmen Büttner Untersuchungen zu <i>Fusarium</i> spp. und Fumonisin-Kontaminationen an Spargel (<i>Asparagus officinalis</i>)	62
Susanne von Barga, Ines Schadock, O. Martinez, Anne-Mareen Eisold, Monika Goßmann & Carmen Büttner Genetische Differenzierung von <i>Fusarium</i> spp. an Spargel (<i>Asparagus officinalis</i>) und anderen Wirtspflanzen	67
T. Hirschfeld, Muriel Barthelmeus, Monika Gossmann, F. M. Ellner & Carmen Büttner Wirksamkeit von Bodenbearbeitungs- und Fungizidmaßnahmen auf Ährenfusariosen, einschließlich den Mykotoxingehalt in Triticale (<i>Triticum secale</i>)	72
T. Hirschfeld, Monika Gossmann, F. M. Ellner & Carmen Büttner Bewirtschaftungssystemen und deren Einfluss auf Ährenfusariosen und Mykotoxinbildung beim Weizenbau in Gefährdungslagen Thüringens	76
M. Oberforster & R. Öhlinger Verringerung der Fusarium- und Mykotoxinbelastung durch Sortenwahl: Ergebnisse bei Getreide	81

H. Felder, G. Dersch, M. Plank & R. Öhlinger	
Verringerung der Fusarium- und Mycotoxinbelastung durch Sortenwahl: Ergebnisse bei Mais	85
Zdenka Brenn-Struckhova, Margit Cichna-Markl, Christina Böhm & E. Razzazi Fazeli	
Selektive Probenvorbereitung mit Sol-Gel-Immunaффinitätssäulchen zur Bestimmung von Deoxynivalenol	89
W. Brodacz	
Verifizierungsstrategien in der GC-Analytik von Trichothecenen	93
W. Brodacz	
Einsatz eines isotoπenmarkierten internen Standards in der GC/MS-Anlytik von DON	97
Alexandra Monelli, Karina Grossalber, Manuela FührerR, Sabine Baumgartner & R. Krska	
Entwicklung von qualitativen und semi-quantitativen immunodiagnostischen Schnelltests für den Nachweis von T2-Toxin in Weizen und Hafer	101
Eva Wanzenböck, M. Hafner, Zaneta Kubus, M. Freudenschuss, Eva Maria Binder & R. Krska	
Ein fluoreszenzbasierter Schnelltest zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol in Rohgetreide	105
G. Buttinger	
Die Zertifizierung von Aflatoxinkalibranten	109
Barbara Mahringer, A. Raditschnig, R. Öhlinger & T. Eidenberger	
Ochratoxin A in Kaffee, kakaohältigen Lebensmitteln, Tee und Futtermitteln eine analytische Betrachtung	113
M. Hafner, M. Sulyok, R. Schuhmacher & R. Krska	
Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur quantitativen Analyse von Ergotalkaloiden	116
Monika Gossmann, J. Keferböck & Carmen Büttner	
Untersuchungen zum Gefährdungspotential pilzpathogener Ursachen der Fruchtfäule an Melone (<i>Cucumis melo</i>) in Niederösterreich	120
Monika Gossmann, Renate Kadau, Carmen Büttner & Hans-Ulrich Humpf	
Untersuchungen zu <i>Fusarium</i> spp. und Fumonisin-Kontamination in Knoblauch (<i>Allium sativum</i>)	122

Franziska Beran, Monika Goßmann, Astrid Plenk, G. Bedlan, R. Öhlinger, H.-U. Humpf & Carmen Büttner

Untersuchungen zum Befall von Spargelstangen mit *Fusarium proliferatum* und Nachweis von natürlicher FB1-Kontamination hinsichtlich eines negativen Einflusses auf die Produktqualität **125**

B. Schultz, F. M. Ellner, Monika Gossmann & Carmen Büttner

Untersuchungen zur Virulenz und Mykotoxinbildung von *Fusarium sambucinum*- Isolaten in infizierten Kartoffelknollen **127**

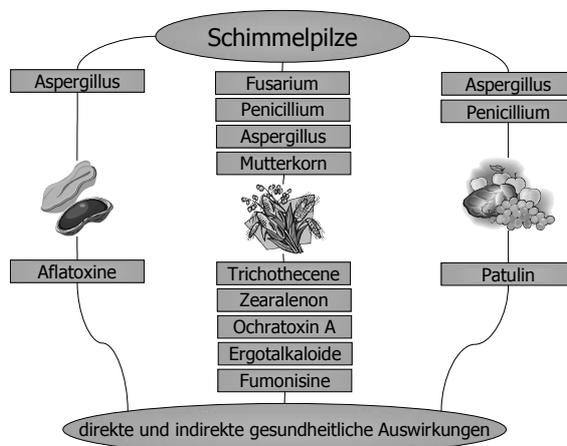
Beispiele gesundheitlicher Risikobewertungen von Mykotoxinen

Examples of health risk assessment of mycotoxines

R. GROSSGUT

Schlüsselwörter: Mykotoxine, Risikobewertung, Patulin, Mehl, Deoxynivalenol

Mykotoxine sind natürliche, sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die bei Mensch oder Tier toxische Wirkungen zeigen können. Derartige Schimmelpilzgifte können einerseits durch so genannte Feldpilze (z.B. Deoxynivalenol (DON), Nivalenol, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Zearalenon, Fumonisine, Patulin, Mutterkornalkaloide) bzw. andererseits durch so genannte Lagerpilze (z.B. Aflatoxine, Ochratoxin A) gebildet werden.



Für einige Mykotoxine sind in bestimmten Lebensmitteln Höchstgehalte in der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 der Kommission vom 8. März 2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln bzw. Folgeverordnungen geregelt. Mit Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln wurde eine konsolidierte und teilweise korrigierte Fassung veröffentlicht, die die Einzelverordnungen ablöst. Folgende Mykotoxine sind in dieser Verordnung in den verschiedensten Lebensmitteln geregelt: Aflatoxine, Ochratoxin A, Patulin, Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin B1, B2, T-2, HT-2.

Auf das Vorkommen von Mykotoxinen wird im Zuge der amtlichen Kontrolle regelmäßig und auch in Schwerpunktsaktionen untersucht, wobei in Einzelfällen Höchstgehaltsüberschreitungen vorkommen können. Diese Höchstgehaltsüberschreitungen müssen toxikologisch bewertet werden.

Dabei bedient man sich des Grundprozesses der Risikobewertung, wobei im angeführten Fall Einzelproben bewertet werden und nicht die Gesamtsituation durch alle möglichen Expositionswege betrachtet wird.

Risikobewertung ist ein Teilprozess der Risikoanalyse und getrennt von Risikomanagement und Risikokommunikation zu sehen.

Bei der Bewertung ist als erste Stufe die Gefahr zu identifizieren. Dies ist im Falle der Höchstgehaltsüberschreitung klar definiert: Ein Mykotoxin tritt im Lebensmittel in einer bestimmten Menge auf. Was bedeutet das für den Konsumenten dieses Produktes?

Der nächste Schritt ist die Charakterisierung der Gefahr. Darunter versteht man im Normalfall die Bewertung toxikologischer Daten von z.B. akuter Toxizität bis hin zur chronischen Toxizität, eventuellen erbgutverändernden Wirkungen bzw. Reproduktionstoxizität sowie toxikokinetischer Eigenschaften. Ziel ist die Erarbeitung toxikologischer Eckpunkte, wie z.B. TDI-Wert (tolerierbare tägliche Aufnahmemenge in mg/kg Körpergewicht und Tag). Diese Werte benötigt man für die abschließende Risikocharakterisierung.

Im Zuge der Expositionsabschätzung wird der gemessene Wert mit Verzehrdaten verknüpft. Die Exposition wird für die diversen Bevölkerungsgruppen, wie Kinder, erwachsene Männer und Frauen, Schwangere und Senioren separat berechnet, da sich die Verzehrsgewohnheiten durchaus unterscheiden können.

Im Zuge der Risikocharakterisierung werden die Ergebnisse der Expositionsabschätzung mit den toxikologischen Eckdaten verglichen und der Ausschöpfungsgrad dieser toxikologischen Werte ermittelt. Ist der Ausschöpfungsgrad deutlich höher als 100 % des TDI-Wertes, können gesundheitliche Auswirkungen nicht mehr gänzlich ausgeschlossen werden.

Liegen keine toxikologischen Eckpunkte vor, insbesondere z.B. bei genotoxischen-karzinogenen Stoffen, muss man sich anderer Ansätze bedienen. Beispiel dafür ist das MOE-Konzept (Margin of Exposure)

Im Gegensatz zur deterministischen Einzelbewertung von Proben betrachtet die Risikobewertung des Gesamtsystems alle Ergebnisse aller Lebensmittel bzw. einer Lebensmittelgruppe und betrachtet natürlich auch Rückstände unterhalb der Höchstgehalten. Der Vorgang der Gefahrencharakterisierung ist der idente wie bei der Einzelfallbetrachtung, jedoch wird bei der Expositionsbeurteilung die Exposition der österreichischen Bevölkerung bzw. die Exposition besonderer Bevölkerungsgruppen bzw. Konsumenten über alle möglichen Expositionsquellen abgeschätzt und den toxikologischen Eckpunkten gegenübergestellt. Nur diese gesamtheitliche Sicht erlaubt eine Bewertung des Risikos für die Bevölkerung bzw. Konsumenten in Österreich.

Beispiel Patulin:

Patulin wird von verschiedenen Schimmelpilzen gebildet. Am häufigsten sind Apfelerzeugnisse kontaminiert. Patulin hat Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt und ist beim derzeitigen Wissensstand nicht mutagen, krebserregend und reproduktionstoxisch. Seitens des SCF wurde 2000 eine vorläufige maximal zulässige Tagesdosis (PMTDI = „provisional maximum tolerable daily intake“) von 0,4 µg/kg Körpergewicht festgelegt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Auslastung des TDI bei Betrachtung der Exposition durch Konsum von Säften, wobei die Daten zeigen, dass eine Überschreitung des TDI nicht gegeben ist.

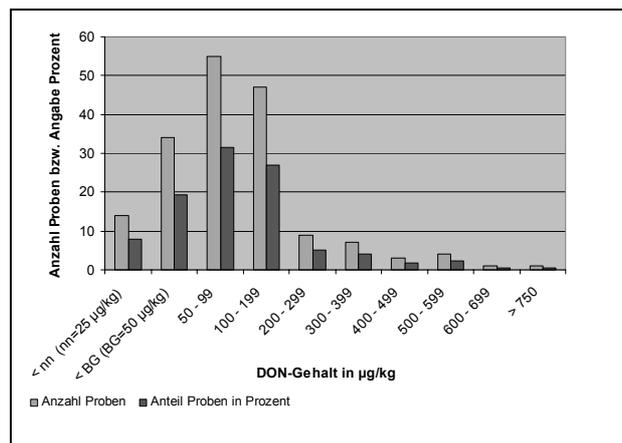
Bevölkerungsgruppe	Aufnahme ng/kg/Tag	% TDI
Kinder, 3 – 6 Jahre, User	80,9	20
Kinder, 7 – 9 Jahre, User	107	27
Erwachsene, User	80	20
Schwangere, User	25	6,3

Beispiel Fusarien-Toxine in Mehl:

Im Zuge einer Schwerpunktsaktion wurden 2005 Weizenmehle auf Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon und Fumonisin B1, B2 sowie T2-/HT-2 Toxin) untersucht.

Für die verschiedenen Toxine existieren derzeit folgende TDI-Werte: DON (1 µg/kg KG/Tag); T-2 und HT-2-Toxin (0,06 µg/kg KG/Tag); Zearalenon (0,2 µg/kg KG/Tag); Fumonisin B1, B2, B3 (2 µg/kg KG/Tag).

In den untersuchten Mehlen war nur Deoxynivalenol nachweisbar, wobei jedoch in ca. 70 % der Proben dieses Mykotoxin quantifiziert werden konnte.



Verteilung der DON-Gehalte in Mehlen 2005

Die Berechnung unter Heranziehung aller untersuchten Mehle ergab jedoch selbst bei worst-case-Betrachtungen keine Überschreitung des TDI-Wertes bei Konsum durch Weizenmehl. Die Ausschöpfung des TDI beträgt bei Betrachtung des 95-Perzentil an DON-Gehalt und Heranziehung eines „Heavy-Users“ (95-Perzentil des Verzehrs einer Person, die täglich Mehl konsumiert) ca. 60 – 80 % des TDI, bei Betrachtung der jeweiligen Mediane (Gehalt bzw. Verzehr) eine Ausschöpfung von unter 5 % des TDI.

Autor:

Dipl.-Ing. Dr. Roland GROSSGUT, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Risikobewertung, Spargelfeldstraße 191, A-1226 WIEN, e-mail: roland.grossgut@ages.at

Vorkommen und Bedeutung toxinbildender Schimmelpilze von der landwirtschaftlichen Produktion bis zur Verarbeitung

Occurrence and importance of toxinproducing fungi from agricultural production to processing

R. BECK & J. LEPSCHY

Zusammenfassung:

Rund ein Dutzend Mykotoxine sind für einen mitteleuropäischen Verbraucher von Bedeutung. Die Hauptbelastung erfolgt dabei über den Konsum von Zerealien. Abgesehen vom, durch Pilze der Gattung *Claviceps* gebildeten Mutterkorn, werden diese Mykotoxine von vier Pilzgattungen gebildet. Auf die Bedeutung der Feldpilze der Gattungen *Fusarium* und *Alternaria* und die der Lagerpilze *Aspergillus* und *Penicillium* wird eingegangen. Unter stabilen, trockenen Lagerbedingungen kann es zu einem deutlichen Rückgang der mikrobiellen Keimzahlen kommen, während unter feuchten Lagerbedingungen (>14% Wassergehalt) eine starke Entwicklung der Lagerpilze zu beobachten ist. Dementsprechend kann man einen Anstieg oder Verlust der Keimfähigkeit des Kornes über die Lagerdauer feststellen. Vor allem in der Vermälzung hat die lagerungsbedingte Ausgangsaktivität der Schimmelpilze einen entscheidenden Einfluss auf die Toxinproduktion während der Keimphase und auf die daraus resultierende Malz- und Bierqualität.

Schlüsselwörter: Zerealien, Feldpilze, Lagerpilze, Mykotoxine

Summary

For a mideuropean consumer about a dozen of mycotoxins are of importance. The main load is due to the consumption of cereals. There are four main genera producing these mycotoxins besides *Claviceps* spec.. The important position of the field fungi *Fusarium* and *Alternaria* and the storage fungi *Aspergillus* and *Penicillium* is pointed out. Under stable, dry storage conditions there may be a distinct decrease of the number of microbial germs, while under humid storage conditions (>14% water content) an increase of the storage fungi can be observed. Correspondingly an increase or a loss of the grain's germination capacity during storage can be observed. During malting the starting activity conditioned by storage has a decisive influence on the development of mould fungi and toxin production during the germination phase and the resulting quality of malt and beer.

keywords: cereals, fieldfungi, storagefungi, mycotoxins

Einleitung

Schimmelpilztoxine gelangen vorwiegend über Zerealien in die Nahrungskette. Die Pilze sind zu jedem Zeitpunkt auf landwirtschaftlichen Produkten zu finden. Sie stammen zumeist aus der Luft oder dem Boden und ein Teil gelangt über die Erntemaschinen an das Material. Werden mikrobiologische Untersuchungen an Getreidekörnern aus Lagerbeständen durchgeführt, so findet man die Vertreter der Gattungen *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Aspergil-*

lus, *Penicillium* und *Wallemia*. Vertreter der drei letztgenannten Gattungen sind im erntefrischen Getreide nicht nachweisbar (Beck et al. 1992). Sie sind an relativ trockenes Substrat sehr gut angepasst und dadurch in der Lage, sich während der Lagerung zu vermehren, während die Keimzahlen der Pilze der anderen Gattungen unter diesen Verhältnissen stagnieren oder zurückgehen. Aufgrund von unterschiedlichen Wassergehaltsansprüchen und nicht auf taxonomische Merkmale basierend, teilt man die Schimmelpilze in Feld- und Lagerpilze ein (Multon1988).

Feldpilze wachsen erst ab Wassergehalten von 22% und der Schaden, für den sie verantwortlich sind, entsteht noch vor der Ernte. Lagerpilze wachsen dagegen schon bei einem Wassergehalt von 13% und schädigen erst während der Lagerung (Christensen und Kaufmann 1974)

Feldpilze der Gattung *Fusarium*

Von den weltweit über 70 bekannten Fusarienarten dominieren in Mitteleuropa lediglich fünf Arten im Getreide- und Maisanbau (vgl. Tab.1).

Tab. 1: Fusarienarten und ihre Toxine in bayerischem Getreide

dominierende Arten		gebildete Toxine
Weizen, Triticale, Hafer	Mais	
<i>F. graminearum</i>	<i>F. graminearum</i>	Deoxynivalenol = DON 15-Acetyl-DON (3-Acetyl-DON) Zearalenon = ZON (Lagerung)
	<i>F. subglutinans</i>	Moniliformin, Beauvericin
	<i>F. verticillioides</i> (<i>F. moniliformine</i>)	Fumonisine
	<i>F. proliferatum</i>	Fumonisine
zusätzlich auftretende Fusarienarten		
<i>F. avenaceum</i>	<i>F. avenaceum</i>	Moniliformin, (Enniatine)
<i>F. poae</i>	<i>F. poae</i>	Nivelenol = NIV (Clamydosporol, Fungerin)
<i>F. tricinctum</i>		
<i>F. culmorum</i>	<i>F. culmorum</i>	DON, 3-Acetyl-DON, ZON
<i>F. crookwellense</i> = <i>F. cerealis</i>		NIV, ZON
<i>F. sporotrichioides</i>		Typ A-Trichothecene (T-2 Toxin)
<i>F. langsethiae</i> = atypischer <i>F. poae</i>		Typ A-Trichothecene

Betrachtet man nur das Getreide so verbleibt *F. graminearum* als einzige dominierende Fusarienart. Überall dort, wo Mais angebaut wird tritt *F. graminearum* verstärkt auf, besonders dann, wenn Mais direkt als Vorfrucht vor Getreide steht. Die Infektion des Getreides mit *F. graminearum* geht in einem entscheidenden Ausmaß von Maisernterückständen auf der Bodenoberfläche aus. Eine

pfluglose Bestellung nach der Vorfrucht Mais ist daher als problematisch anzusehen. Untersuchungen an der Landesanstalt Anfang der Sechziger-Jahre haben gezeigt, dass *F. graminearum* mit dem Maisanbau nach Mitteleuropa gekommen ist und *F. culmorum*, dem die Fähigkeit zur Ascosporenbildung fehlt; immer weiter verdrängt hat. An Mykotoxinen bildet *F. graminearum* das Deoxynivalenol (=DON) sowie je nach Chemotyp das 15- bzw. 3-Acetyl-DON und das östrogen-wirksame Zearalenon (=ZON). Obwohl *F. graminearum* ein typischer Feldpilz ist wurden in erntefrischen Proben lediglich Spuren an ZON nachgewiesen, während höhere ZON-Werte ausschließlich in gelagerten Proben gefunden wurden.

Alle DON-Bildner (und abgeschwächt NIV-Bildner) sind in der Lage, die typischen Symptome der Taubährigkeit mit Welkeerscheinungen hervorzurufen, d.h. in die Spindel der Wirtspflanze einzudringen. Alle anderen Fusarienarten an Weizen bzw. Triticale bleiben auf die primäre Infektionsstelle begrenzt. Zu diesen opportunistischen Schwächeparasiten gehören die Arten *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. tricinctum*. Diese dominieren je nach Witterung in Gebieten, in denen es keinen oder nur geringen Maisanbau gibt.

TypA-Trichothecenbildner wie *F. sporotrichioides* und *F. langsethiae* sind nur im Hafer von Bedeutung, wobei das Mykotoxin hauptsächlich in den Spelzen und weniger im Korn gefunden wird (Verhältnis ~ 8/2).

Bei Mais sind, abhängig vom Klima, neben *F. graminearum* auch die Fusarien der Liseola-Gruppe von Bedeutung. Hier sind vor allem die Fumonisinbildner *F. verticillioides* und *F. proliferatum* zu nennen. Fumonisine werden vor allem in der Maisspindel und weniger in den Körnern gefunden. Die wärmeliebende Art *F. proliferatum* hat sich in den letzten Jahren vor allem in Südösterreich stark verbreitet.

Nach einer mechanischen Beschädigung der Maiskolben durch Zünslerfraß oder Hagelschaden gelangt *F. subglutinans* in die Kolbenanlagen und kann dort große Mengen an Moniliformin und Beauvericin bilden.

Feldpilze der Gattung *Alternaria*

Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* sind als Saprophyten weltweit an Getreide, Früchten und Gemüse zu finden. Nach eigenen Untersuchungen ist *Alternaria* mit einem Anteil von bis zu 80% bestandsbildend im Getreide, vorrangig in der Gerste.

Die bekannteste Art ist *A. alternata*. Von Alternariatoxinen deren Struktur bekannt ist, sind vor allem das Alternariol und die Tenuazonsäure zu nennen.

Alternariol steht im Verdacht fruchtschädigend und cancerogen zu sein und wurde in Fruchtsäften im ppb-Bereich gefunden. Die Tenuazonsäure hat eine hohe akute Toxizität und wird in Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen gebracht. Sie konnte in Tomatenpüree im ppm-Bereich nachgewiesen werden.

Leider existieren nur wenige toxikologische Daten bezüglich der Altenariatoxine. Auch fehlen bisher repräsentative Erhebungen über das Vorkommen und die Verbreitung von Alternariatoxinen in Getreide, sodass in diesem Zusammenhang noch ein großer Forschungsbedarf besteht.

Lagerpilze

Gattung *Aspergillus*

Vertreter der Gattung *Aspergillus* sind weltweit verbreitet und an feucht warme Bedingungen angepasst. Eine Toxinproduktion findet erst ab Temperaturen über 25°C statt. Demzufolge hat die Bildung von *Aspergillus*-Toxinen in unseren Breitengraden nahezu keine Bedeutung, obwohl Arten wie *A.flavus* und *A.ochraceus* auch in Mitteleuropa auf gelagertem Getreide nachgewiesen werden können.

Die bekannten *Aspergillus*-Toxine Aflatoxin, Sterigmatocystin sind ein reines Importproblem und werden ausschließlich in Produkten aus feucht warmen Ländern gefunden.

Gattung *Penicillium*

Entgegen der oben erwähnten Gattung *Aspergillus*, können Vertreter der Gattung *Penicillium* auch bei niedrigen Temperaturen wachsen und Toxine produzieren. Am bekanntesten ist der Ochratoxin A –Produzent *P.verrucosum*. Er wird in Zusammenhang mit der Balkannephropathie gebracht und gilt als Verursacher des primären Nierenkrebs.

Darüberhinaus wird in verschimmelten Früchten und Gemüse das hitzeinstabile Patulin, sowie das Nephrotoxin Citrinin gefunden. Beide Toxine werden von verschiedenen Arten der Gattung *Penicillium* produziert.

Lagerung und Verarbeitung

Lagerungsversuche in Klimakammern mit konstanter Temperatur und Luftfeuchte zeigten, dass bedingt durch das Aufkommen von Lagerpilzen die Keimfähigkeit im Korn rasch abnimmt. Diese wird in einem entscheidenden Maße von der Menge der auf und im Korn vorhandenen Schimmelpilze beeinflusst. Demzufolge nahm in trocken gelagerten Proben gleichzeitig mit dem Rückgang der Schimmelpilzkeimzahlen die Keimfähigkeit des Getreides zu. In trocken und warm gelagerten Proben wurden die Schimmelpilze schneller abgetötet als in trocken und kühl gelagerten Proben und die Keimfähigkeit stieg anfänglich sehr schnell an. Nach 28 Wochen Lagerdauer konnte in den trocken-warm gelagerten Proben ein Rückgang der Keimfähigkeit beobachtet werden der auf eine direkte Schädigung der Körner schließen lässt.

Die Auswertung eines Praxisversuches zum Themenbereich Lagerung, Mälzung und Bierqualität belegt eindeutig die qualitätssichernde Bedeutung einer trockenen Lagerhaltung. Als typischer Feldpilz ist *F.graminearum* an eine hohe Kornfeuchte (>20%) angepasst. Bei geringerem Wassergehalt verliert *F.graminearum* an Vitalität und stirbt ab.

Dieser Sachverhalt hat einen entscheidenden Einfluss auf die DON-Bildung während der Mälzung (vergl. Abbildung 1).

Winterweizen " Kanzler " Einfluss von Vorfrucht und Lagerung

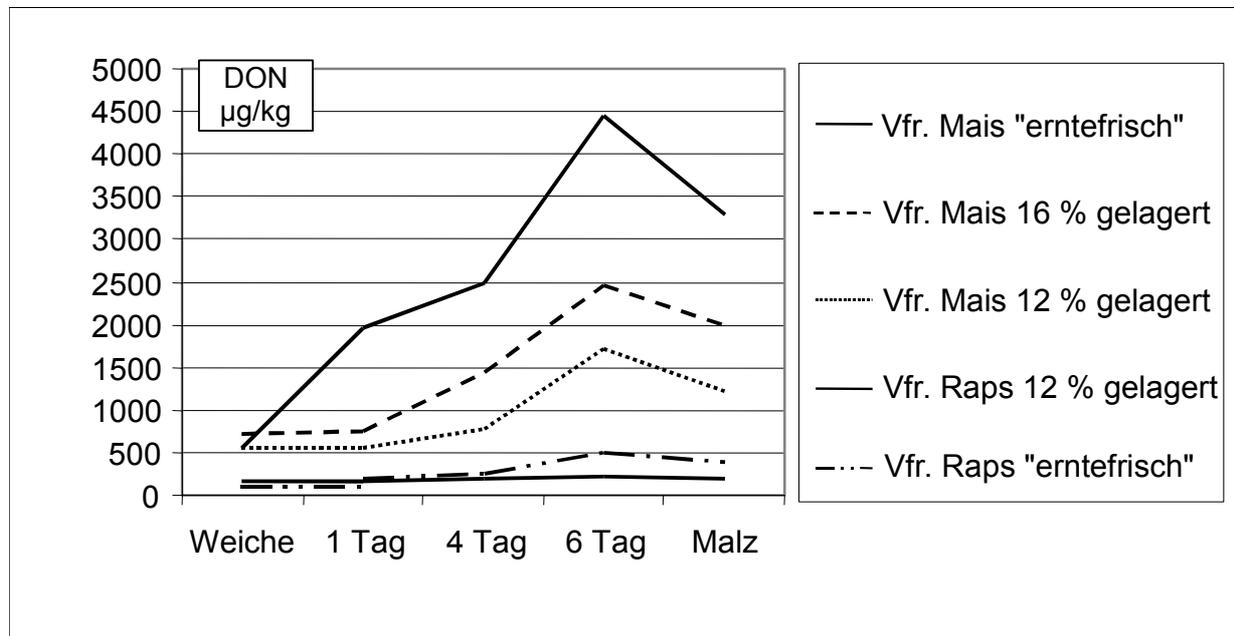


Abb. 1: DON-Entwicklung während der Mälzung

Hier herrschen mit einem Wassergehalt von über 40% ideale Wachstumsbedingungen für alle Schimmelpilze. Im „ernte frischen“ Zustand behält *F.graminearum* nahezu 100% seiner Aktivität, während bei feuchter Lagerung (16% Kornfeuchte) nur noch 50% und bei trockener Lagerung (11-12% Kornfeuchte) 10-20% der Ausgangsaktivität vorhanden sind.

Literatur:

- Beck, R., Süß, A., Lepschy, J. (1992) Untersuchungen zur Kenntnis der Mikrobiologie von Braugerste und Brauweizen: II. Mitteilung: Mikrobiologische Aspekte der Getreidelagerung und die Mikrobiologie der Mälzung. Brauwelt 132, 2388-2403.
- Multon, J. L. (1988) Preservation and storage of grains, seeds and their byproducts. Lavoisier publishing, New York, 244-262.

Autoren:

- Dr. Robert BECK, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Lange Point 4, D-85354 Freising
- Dr. Johann LEPSCHY, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Lange Point 4, D-85354 Freising

Mykotoxine – Aktuelle Regelungen und Vorkommen in Österreich

Mycotoxins – actual regulations and occurrence in Austria

R. ÖHLINGER

Summary

An overview was given about actual EU regulations on mycotoxins in food and feed. The occurrence of different mycotoxins (especially *Fusarium* toxins) in unprocessed austrian cereals was described and discussed with regard to the actual legislation.

Zusammenfassung

Es wird ein Überblick über aktuelle EU Mykotoxinregelungen für Lebensmittel und Futtermittel gegeben. Danach wird über österreichische Erfahrungen hauptsächlich zu Fusariumtoxinen in unverarbeitetem Getreide inkl. Mais berichtet und diese zu den entsprechenden Regelungen in Beziehung gesetzt.

Schlüsselwörter: Mykotoxinregelungen, Deoxynivalenol, Zearalenon, Aflatoxine, Ochratoxin A, Fumonisine

Einleitung

Mykotoxine sind von Pilzen produzierte Stoffe des Sekundärstoffwechsels mit unterschiedlicher Human- und Tiertoxizität. Bisher sind über 400 dieser Stoffe bekannt, wobei allerdings nur ein kleiner Teil aufgrund ihres Vorkommens in Nahrungs- und Futtermitteln von Bedeutung ist. Neben den Pilzgattungen *Aspergillus* und *Penicillium* ist es vor allem die phytopathogene Gattung *Fusarium*, die zu den Toxinbildnern zählen.

Mykotoxin	EU Stellungnahmen und Erhebungen
Aflatoxine	SCF (1994), SCAN (2003)
Ochratoxin A	SCF (1994), EFSA (2006), EFSA (2004), SCOOP (2002), SCOOP (1993), SCAN (2003)
Dexynivalenol	SCF (2002), SCF (2004), SCF (1999), SCOOP (2003), SCAN (2003)
Nivalenol	SCF (2002), SCF (2000), SCOOP (2003)
Zearalenon	SCF (2000), EFSA (2004), SCOOP (2003), SCAN (2003)
Fumonisine	SCF (2000), SCF (2003), SCOOP (2003), SCAN (2003)
T-2 Toxin, HT-2 Toxin	SCF (2001), SCF (2002), SCOOP (2003), SCAN (2003)
Ergotalkaloide	EFSA (2005), SCAN (2003)
Patulin	SCF (1994), SCF (2000), SCOOP (2002)

SCF = wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss (scientific committee on food)

SCAN = wissenschaftlicher Ausschuss über Tierernährung (scientific committee on animal nutrition)

EFSA = europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit

SCOOP = wissenschaftliche Kooperation der Mitgliedstaaten bei der Prüfung von Lebensmittelfragen

Die EU hat besonders in den letzten 7 Jahren sich dieser Problematik angenommen und jeweils vor bestimmten Mykotoxinregelungen diverse Erhebungen und Stellungnahmen zur Lebensmittelsicherheit bzw. Tiergesundheit eingeholt. Die Tabelle gibt einen Überblick wichtiger Stellungnahmen von EU Komitees und Institutionen.

Diese Stellungnahmen und Erhebungen mündeten schließlich nach z.T. langwierigen Diskussionen in diverse EU Regelungen, die Höchstwerte bzw. Richtwerte vorgeben.

Aktuelle EU Regelungen – Lebensmittel

Verordnung (EG) Nr. 1881/2006

Anmerkung: Während der gegenständlichen Mykotoxintagung (November 2006) waren Mykotoxinregelungen noch auf diverse Verordnungen verteilt. Ihre „Basisverordnung“ Nr. 466/2001 zur Festsetzung von Höchstgehalten für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln war zu dieser Zeit bereits mehrfach geändert worden. Zudem lagen auch neuere Informationen über Kontaminanten vor. Die Verordnung (EG) Nr. 466/2001 sollte somit zur Gänze ersetzt werden. Die „Folge“verordnung ist nun die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006, welche am 19.12.2006 veröffentlicht wurde und ab 1.3.2007 gültig ist. Diese Verordnung vereint z.Z. alle Kontaminantenregelungen (inkl. Mykotoxine). Nachstehend wird ein Überblick über die darin enthaltenen Mykotoxinregelungen (Höchstwerte) für bestimmte Lebensmittelkategorien gegeben:

Aflatoxin B1 und Summe aus Aflatoxin B1+B2+G1+G2:

Erdnüsse, Schalenfrüchte, Trockenfrüchte, Getreide und Getreideerzeugnisse, Mais, Gewürze, Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder, diätetische Lebensmittel für Säuglinge

Aflatoxin M1:

Rohmilch, Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung, diätetische Lebensmittel für Säuglinge

Patulin:

Fruchtsäfte und –konzentrate, Spirituosen, Apfelwein, Apfelsaft, feste Apfelerzeugnisse (Apfelpüree, Apfelkompott), andere Beikost als Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder

Ochratoxin A:

Unverarbeitetes Getreide, getrocknete Weintrauben, geröstete Kaffeebohnen, löslicher Kaffee, Wein, Traubensaft, etc.

Deoxynivalenol:

Unverarbeitetes Getreide, unbearbeiteter Mais (ab 1.7.2007), Teigwaren, Mehle, Brot, Snacks, etc.

Fumonisine (ab 1.10.2007):

Unverarbeiteter Mais, Maismehle, etc.

Aktuelle EU Regelungen – Futtermittel

Richtlinie 2003/100/EG, Richtlinie 2002/32/EG und Empfehlung der Kommission 2006/576/EG

In der Richtlinie 2003/100/EG wird **Aflatoxin B1** mit verschiedenen Höchstgehalten geregelt. Davon betroffen sind Futtermittel-Ausgangserzeugnisse, Alleinfuttermittel und Ergänzungsfuttermittel.

In der Richtlinie 2002/32/EG sollen über die geregelte **Mutterkornauslese** (Höchstwert) bei ungemahlenem Getreide indirekt Ergotalkaloide in Futtermitteln minimiert werden.

In der Empfehlung 2006/576/EG werden folgende Mykotoxine mit Richtwerten bedacht:

Deoxynivalenol:

Futtermittel-Ausgangserzeugnisse, Alleinfuttermittel und Ergänzungsfuttermittel (besonders für Schweine, Kälber, Lämmer und Ziegenlämmer).

Zearalenon:

Futtermittel-Ausgangserzeugnisse, Alleinfuttermittel und Ergänzungsfuttermittel (Schweine, Kälber, Milchkühe, Schafe und Ziegen).

Ochratoxin A:

Futtermittel-Ausgangserzeugnisse, Alleinfuttermittel und Ergänzungsfuttermittel (Schweine und Geflügel).

Fumonisine:

Futtermittel-Ausgangserzeugnisse (Mais), Alleinfuttermittel und Ergänzungsfuttermittel (Schweine, Pferde, Kaninchen, Heimtiere, Fische, Geflügel, Kälber, Wiederkäuer, Lämmer und Ziegenlämmer).

Mykotoxine – Vorkommen in Österreich

Aflatoxine und Ochratoxin A: In österreichischem Getreide werden Aflatoxine und Ochratoxin A nur in einem sehr geringen Umfang nachgewiesen. Diese Mykotoxine sind für Österreich in erster Linie z.B. in Produkten wie Nüsse und Schalenfrüchte (Aflatoxine) bzw. getrocknete Weintrauben (Ochratoxin A) bezüglich Importware von Bedeutung.

Deoxynivalenol (DON):

DON war in den letzten 3 Jahren in unverarbeitetem Getreide (exkl. Mais) zwar häufig nachweisbar (im Durchschnitt bei 60% der Proben), jedoch lagen rd. 95% der Gehalte unter dem Lebensmittelhöchstwert von 1250 ppb bzw. 100% unter dem Richtwert für Futtermittel-Ausgangsstoffe (8000 ppb). Der Futtermittelrichtwert für Schweine von 900 ppb wurde z.T. von mehr als 90% der Proben unterschritten.

Die untersuchten Getreidesorten (exkl. Mais) können bezüglich des Auftretens einer quantifizierbaren DON-Kontamination folgendermaßen gereiht werden: Durum > Weizen, Triticale > Gerste, Roggen, Hafer.

In unverarbeitetem Mais (Körner) war DON in den letzten 3 Jahren bei mehr als 95% der Proben nachweisbar. Der beabsichtigte Lebensmittel-Höchstwert von 1750 ppb wird im Durchschnitt von rd. 85% der Körner unterschritten. Während der Richtwert für Futtermittel-Ausgangsstoffe (8000 ppb) nahezu immer unterschritten wird, überschritten unverarbeitete Maiskörner in den letzten 2 Jahren den Futtermittelrichtwert für Schweine von 900 ppb zu rd. 45%.

Zearalenon (ZON)

In unverarbeitetem Getreide (exkl. Mais) war ZON in den letzten 3 Jahren kaum quantifizierbar (meistens lagen mehr als 90% der untersuchten Proben unter der Bestimmungsgrenze von 20 ppb). Erwartungsgemäß wurden der entsprechende Höchstwert (100 ppb für Lebensmittelproduktion) und die Futtermittelrichtwerte in mehr als 95% der Fälle unterschritten.

Unverarbeitete Maiskörner enthielten in den letzten 3 Jahren häufig ZON (bei rd. 90% der Proben nachweisbar). Der vorgesehene Lebensmittelhöchstwert von 200 ppb wurde im Durchschnitt von 25% der Proben überschritten (Anmerkung: österreichischer Mais wird hauptsächlich für die Futtermittelerzeugung produziert). Wären die unverarbeiteten Maiskörner direkt als Alleinfuttermittel für Ferkel und Jungsauen vorgesehen gewesen, so wären im Durchschnitt der letzten 3 Jahre nur rd. 50% geeignet gewesen. Der Richtwert für Futtermittel-Ausgangsstoffe (2000 ppb) wurde hingegen von keiner Probe erreicht.

Fumonisine B1+B2

Fumonisine werden jahrbahngig in sehr unterschiedlichem Maße nachgewiesen. Die Quantifizierungsrate der letzten Jahre liegt zwischen 10 und 30%. Die Gehalte liegen in allen Fällen weit unter vorgesehenen Höchst- bzw. Richtwerten. Mehr als 90% der Proben unterschreiten z.B. 400 ppb (vorgesehener Lebensmittelhöchstwert: 2000 ppb!).

Nivalenol (NIV)

Nivalenol wird z.Z. nicht geregelt. Es besitzt eine ähnliche Toxizität wie DON und wird am häufigsten auf Haferkörner nachgewiesen. Dort kann im Durchschnitt bei 30% der Proben NIV quantifiziert werden (>75 ppb). Der NIV Gehaltsbereich (<NG – 690 ppb) ist jedoch im Vergleich zu DON (<NG - >6000 ppb) deutlich geringer.

Literatur beim Verfasser

Bezüglich aktuelle Regelungen siehe auch homepage: www.ages.at

Autor:

Dr. Richard ÖHLINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz

Ergebnisse des österreichischen Mykotoxinmonitorings 2004 bis 2006 bei Getreide

Results of the Austrian survey on mycotoxins in cereals 2004-2006

H. KÖPPL & CH. KRUMPHUBER

Summary

The results of the three years show that the preceding crop maize and here particularly maize for corn production can lead to higher mycotoxin contaminations. There is a great risk that infections with fusarium head blight take place, if cereals are cultivated particularly after the preceding crop maize in tillage systems, where many harvest delays stay behind on the ground. Altogether, about 96 % of the rehearsals lie under 1,250 μ g/kg DON, which is the EU-limited value for cereal grains. As expected the mycotoxin contamination in more humid regions is higher than in the dryer regions. The year 2006 has shown, however, that at a corresponding weather for the infection with fusarium headblight in combination with preceding crop maize can lead to higher contaminations in so-called "no-risk regions".

Altogether, the Austrian corn production is in good state. The average DON charges are very low, other mycotoxins like ZON play a very subordinate role.

Cereals produced under the directives of organic farming show low main charges.

Key words: Austrian survey on mycotoxins, mycotoxin contamination, preceding crop and tillage

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der drei Jahre zeigen, dass die Vorfrucht Mais und hier insbesondere Körnermais zu höheren Mykotoxingehalten führen kann. Wird insbesondere nach der Vorfrucht Körnermais Getreide in Säverfahren angebaut, wo viele Ernterückstände auf dem Boden zurückbleiben, so besteht ein großes Risiko, dass Infektionen mit Ährenfusariosen stattfinden. Insgesamt liegen rund 96 % der Proben unter dem von der EU festlegten Grenzwert von 1.250 μ g/kg DON für unbearbeitetes Getreide.

Erwartungsgemäß liegen in feuchteren Anbaulagen die Mykotoxinwerte etwas höher als im Trockengebiet. Das Jahr 2006 hat jedoch gezeigt, dass bei entsprechender Witterung für die Infektion mit Ährenfusariosen in Kombination mit Vorfrucht Mais auch in sogenannten „Nicht-Risikoregionen“ teilweise überdurchschnittliche Mykotoxinwerte auftreten können.

Insgesamt kann jedoch der österreichischen Getreideproduktion ein sehr gutes Zeugnis ausgestellt werden. Die durchschnittliche DON-Belastung ist sehr gering, andere Mykotoxine wie ZON spielen eine sehr untergeordnete Rolle. Getreide aus der biologischen Landwirtschaft weist eine sehr geringe Grundbelastung auf:

Schlüsselwörter: Österreichisches Mykotoxinmonitoring, Mykotoxingehalt, Vorfrucht und Bodenbearbeitung

1. Problemstellung und Zielsetzung

Seit vielen Jahren wird die Problematik der Mykotoxinbelastung bei Getreide intensiv diskutiert. Auf Anregung und unter Federführung der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich wurde deshalb ein Konzept für ein österreichweites Mykotoxinmonitoring bei Getreide erarbeitet. Es erfolgte eine enge Abstimmung mit der Fachabteilung beim BMLFUW sowie bei den beteiligten Landwirtschaftskammern. Alle Bundesländer mit relevanter Getreideproduktion haben sich in den Jahren 2004-06 daran beteiligt.

2. Durchführung

Insgesamt wurden 652 Proben bei der Ernte auf dem Feld gezogen. Der Schwerpunkt der Probennahme lag bei Weizen (411), gefolgt von Gerste (72), Roggen (50), Triticale (49), Durum-Weizen (39) und Hafer (31). Mittels Probenbegleitblatt wurden die produktionstechnischen Parameter (z.B. Vorfrucht, Bodenbearbeitung, Düngung, Fungizideinsatz, etc.) erhoben.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels HPLC bei der AGES Linz, Cluster Chemie Mykotoxine.

3. Ergebnisse

Untersucht wurden primär die DON-Werte (Deoxynivalenol) und ZON-Werte (Zearalenon) bei jenen Proben wo der DON-Wert über 1000 µg/kg lag. Im Jahr 2004 wurden bei sämtlichen Proben noch die ZON-Werte erhoben, damals hat sich gezeigt, dass der ZON-Wert dann hoch ist, wenn der DON-Wert sich um 1000 µg/kg oder höher bewegt. Von allen untersuchten Proben lagen in diesem Jahr nur fünf Werte über 20 µg/kg ZON. Auch in den Jahren 2005 und 2006 waren die Zearalenon-Werte bei Proben, wo der DON-Wert über 1000 µg/kg lag, über 10 µg/kg. Es hat sich gezeigt, dass die ZON-Gehalte bei Getreide unter österreichischen Verhältnissen fast zu vernachlässigen sind. Von allen 652 Proben lag der ZON-Wert nur bei drei Proben über dem EU-Grenzwert für unbearbeitetes Getreide von 100 µg/kg.

Daneben gab es Analysen für Nivalenol, 3-adon, 15-adon, Fusarenon-X; bei diesen gibt es keine Grenzwerte seitens der EU. In den Untersuchungen gab es bei diesen Werten keine Auffälligkeiten.

Das relevante Mykotoxin ist Deoxynivalenol. Die nachfolgenden Darstellungen beziehen sich daher ausschließlich auf DON.

3.1. DON-Werte des österreichischen Getreidemonitorings nach Bundesländern

Österreich	(Probenzahl	652):	Mittelwert	278/Median	83
OÖ (205):	360/130	NÖ (294):	263/53	Bgl'd (89):	216/90
Kärnten (22):	128/55	Steiermark (42):	186/86		

Die höchsten Durchschnittswerte liegen erwartungsgemäß in den feuchteren Anbaulagen, wobei jedoch gesagt werden muss, dass auch im östlichen Trockengebiet bei günstigen Infektionsbedingungen für Ährenfusarien wie 2006 die Werte doch deutlich über denen des Feuchtgebietes liegen können. Die Streubreite der gefundenen Werte lag von 0 µg/kg (nicht nachweisbar) bis im Extremfall 8.200 µg/kg.

3.2. Probenanzahl geschichtet nach den Vorgaben der neuen EU-Verordnung

0-200 µg/kg: 454 Proben (69,6 %)	201-500 µg/kg: 107 (16,4 %)
501-750 µg/kg: 32 (4,9 %)	751-1250 µg/kg: 35 (5,4 %)
1251-1750 µg/kg: 8 (1,2 %)	> 1750 µg/kg: 16 (2,5 %)

Nahezu 70 % der Proben liegen unter 200 µg/kg DON und lägen damit unter dem EU-Grenzwert für Lebensmittel auf Getreidebasis für Säuglinge und Kleinkinder. Rund 3,7 % der Proben liegen über dem EU-Grenzwert von 1.250 µg/kg für unverarbeitetes Getreide (außer Hafer, Durum und Mais), wobei darunter einige Durum-Proben liegen.

3.3 DON-Werte nach Getreidearten

Die Ergebnisse spiegeln die aus der Literatur bekannten Tendenzen wider. Die höchsten Durchschnittswerte gab es bei Durumweizen (Mittelwert 384/Median 220), gefolgt von Weichweizen (337/120) und Triticale (295/110). Kaum Belastungen gab es bei Gerste (88/0), Roggen (80/0) und Hafer (102/0).

3.4. Einfluss der Vorfrucht auf den DON-Gehalt

Die aus der Literatur und diversen Einzelversuchen bekannten Erkenntnisse haben sich hier bestätigt, Mais (va. Körnermais) als Vorfrucht, führt zu höheren Mykotoxinbelastungen (Mittelwert 566/Median 219). Silomais als Vorfrucht (222/125) hat ein um die Hälfte niedrigeres DON-Niveau als Körnermais. Getreide (117/49), Ölsaaten und Eiweißpflanzen (181/70), Zuckerrübe und Kartoffel (198/65) und die sonstigen Vorfrüchte (291/49) haben im Durchschnitt sehr geringe Werte.

Unter den Begriff „Ölsaaten/Eiweißpflanzen“ fallen Raps, Sonnenblume, Ölkürbis, Mohn, Erbse, Ackerbohne und Soja, unter dem Begriff „Sonstige“ werden alle übrigen Früchte zusammen gefasst (z.B. Klee gras, Luzerne, Brache, etc.).

3.5. Einfluss der Vorfrucht und Bodenbearbeitung bzw. des Säverfahrens auf DON-Wert in µg/kg; aufgrund der ähnlichen Werte wird auf die Darstellung des Medians verzichtet.

Grundaussage ist, dass die Kombination aus reduzierter Bodenbearbeitung und der Vorfrucht Körnermais das Risiko einer Belastung mit Mykotoxinen deutlich steigert. Nach Grubbereinsatz kann in den Jahren unterschiedlich, der Mykotoxingehalt stark schwanken. Andere Vorfrüchte in Kombination mit reduzierten Bodenbearbeitungsverfahren haben ein geringeres Mykotoxinrisiko. Die

„Ausreißer“ bei der Vorfrucht Zuckerrübe in Kombination mit Direktsaat und jene bei den sonstigen Vorfrüchten in Kombination mit Grubber sind a priori nicht erklärbar, eventuell müsste man sich hier die Vorvorfrüchte anschauen. Die Anzahl der Proben ist leider auch sehr gering.

Vorfrucht	Pflug			Grubber			Direktsaat		
	DON-MW	DON-Median	Probenanzahl	DON-MW	DON-Median	Probenanzahl	DON-MW	DON-Median	Probenanzahl
Getreide	105	0	92	141	50	63	36	40	5
Körnermais	371	180	127	969	690	32	1352	280	15
Silomais	193	110	46	552	665	4	-	-	-
Öls./Eiweißpfl.	212	100	73	162	60	80	86	0	5
Zuckerr./Kart.	168	49	37	183	99	37	608	365	4
Sonstige	149	0	26	2040	2040	2	-	-	-

3.6. DON-Gehalt in Abhängigkeit des Fungizideinsatzes sowie der Stickstoffintensität (Auswertung nur in den Jahren 2005 und 2006)

Aus dieser Studie ist keine klare Aussage über die Wirkung eines gezielten Fungizideinsatzes gegen Ährenfusarien möglich. Aus Praxisversuchen ist bekannt, dass bei gezieltem Einsatz gegen die mykotoxinbildenden Fusarienpilze eine Reduktion des DON-Wertes zwischen 50 und 70 % erzielt werden kann. Der Einsatz muss exakt nach Warndienstmodellen (wie z.B. proPlant) erfolgen. Ab einem Stickstoffniveau von 100 kg N/ha bewegen sich die DON-Werte auf gleichem Niveau, im unteren Stickstoffbereich ist der Mykotoxingehalt sehr niedrig. Dies ist dadurch zu erklären, dass bei diesen Werten auch viele Bio-Betriebe dabei sind und Kulturen wie Hafer und Roggen, wo prinzipiell wenig Stickstoff eingesetzt wird.

3.7 DON-Gehalte in Abhängigkeit von der Bewirtschaftungsform (biol./konv., 2005-06)

Biologisch wirtschaftende Betriebe haben einen niedrigeren Mykotoxingehalt (61 Proben; Mittelwert: 104 µg/kg, Median 49 µg/kg) als konventionelle Betriebe (389 Proben; 251/80). Eine Erklärung ist der geringe Anteil von Mais (bio: 18 %; konventionell: 39 %) in der Fruchtfolge, dort gibt es mehr Klee gras und Körnerleguminosen als Vorfrüchte. Generell ist das Düngungsniveau deutlich niedriger als im konventionellen Landbau.

Autoren:

Dipl.-Ing. Hubert KÖPPL und Dipl.-Ing. Christian KRUMPHUBER, Landwirtschaftskammer Oberösterreich, Auf der Gugl 3, 4021 Linz, Tel: 0043-50-6902-1414; e-mail: abt-pfl@lk-ooe.at

Umsetzung der Mykotoxinrichtwerte in der Futtermittelkontrolle

Implementing guidance values for mycotoxines in Austrian feed control

T. KICKINGER

Zusammenfassung / Summary:

In der Empfehlung der Kommission 2006/576/EG finden sich Richtwerte für die Mykotoxine Deoxynivaneol, Zearalenon, Ochratoxin A und Fumonisin B1+B2 in Futtermittel. Diese Richtwerte dienen als Orientierung hinsichtlich der Eignung von Futtermitteln für die Verfütterung. Futtermittelausgangserzeugnisse werden bei Überschreitung der Richtwerte, sowie bei zu erwartenden Überschreitungen im Alleinfutter aufgrund von landesüblichen Rationen, beanstandet.

In the commission recommendation 2006/576/EC there are guidance values for the mycotoxines Deoxynivalenol, Zearalenone, Ochratoxin A and Fumonisin B1+B2 in feeding stuffs. These guidance values support the authority or companies by the decision, if feeding stuffs are suitable for consumption, or not. Contamination in feed materials has to be below the guidance values and below values, which let expect a higher contamination than the guidance value for complete feed.

Schlüsselworte / Key words: Mykotoxine/mycotoxins; Richtwerte/guidance values; Futtermittelkontrolle/feed control

Einleitung:

Zur Regelung der höchstzulässigen Kontamination von Futtermitteln durch Mykotoxine liegen sowohl Grenzwerte als auch Richtwerte vor. In der Richtlinie 2003/100/EG sind Grenzwerte für Aflatoxin B1 festgesetzt, welche ein Verschneidungsverbot implizieren. Zur Bewertung der Mykotoxine Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A und Fumonisin B1+B2 wurden bisher die erarbeiteten ALVA-Richtwerte, bzw. seit dem Vorjahr die Vorschläge zur Empfehlung der Kommission, herangezogen. Seit 17. August 2006 ist die Empfehlung der Kommission 2006/576/EG veröffentlicht und die darin festgelegten Richtwerte werden aktuell zur Beurteilung, ob Futtermittel verkehrsfähig sind oder nicht, herangezogen.

Empfehlung der Kommission 2006/576/EG:

Die Richtwerte der Empfehlung 2006/576/EG wurden, im Rahmen eines Gutachtens des wissenschaftlichen Ausschusses für Kontaminanten in der Nahrungsmittelkette, erarbeitet. Die EFSA (European Food Safety Authority) hat auf Ersuchen der Kommission die Gutachten zu den einzelnen Mykotoxinen (DON, ZEA, Ochratoxin-A, Fumonisine) angenommen. Die Gutachten beinhalten den Schluss, dass toxische Wirkungen der vier Mykotoxine bei mehreren Tierarten zu erwarten sind. Ein Übertrag auf Lebensmittel wird jedoch nur zu sehr geringen Teilen erwartet. Zur Orientierung für die Mitgliedstaaten hinsichtlich der Eignung von Getreide und Getreideerzeugnissen, sowie Mischfuttermittel und zur Vermeidung von Wettbewerbsverzerrungen werden Richtwerte empfoh-

len. Weiters wird festgestellt, dass aufgrund von fehlenden Informationen zu T-2- und HT-2-Toxine hierzu mehr Daten erhoben werden müssen. Es wird darüber hinaus empfohlen, die Proben gleichzeitig auf das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, Fumonisin B1 + B2, T-2- und HT-2-Toxin zu untersuchen, damit das Ausmaß des gleichzeitigen Vorkommens bewertet werden kann. Das Hauptaugenmerk soll vor allem auf das Vorhandensein von Mykotoxinen in zur Fütterung bestimmten Nebenerzeugnissen der Lebensmittelerzeugung liegen.

In der Empfehlung 2006/576/EG wird festgehalten, dass die Richtwerte für Getreide und Getreideerzeugnisse für die Tierart mit der größten Toleranz festgelegt wurden und daher als obere Richtwerte anzusehen sind. Was Futtermittel für empfindlichere Tiere anbelangt, sollen die Mitgliedsstaaten dafür sorgen, dass die Futtermittelhersteller niedrigere Richtwerte für Getreide und Getreideerzeugnisse anwenden, wobei die Empfindlichkeit der Tierart und die Einhaltung der für Mischfuttermittel für diese Tierarten festgelegten Richtwerte zu berücksichtigen sind.

Kontrollpraxis:

Das Überschreiten der Richtwerte hat eine Beanstandung zur Folge, da das Futtermittel nicht unverdorben und von handelsüblicher Beschaffenheit ist (§ 2 FMVO 2000, § 3 FMG 99). Der entstandene Aufwand wird in Höhe des behördlichen Gebührentarifs in Rechnung gestellt.

Angemessene Maßnahmen können auferlegt werden (z.B. Verbot der Inverkehrbringung; Verdünnung des kontaminierten Futtermittels; Verwendung in Mischfuttermittel für weniger empfindliche Tierarten). Die Erledigung der auferlegten Maßnahmen wird von der Behörde überprüft. Liegt das Einzelfuttermittel unter dem Richtwert, aber beim Einsatz in landesüblichen Rezepturen ist eine Überschreitung des Richtwerts zu erwarten, hat dies ebenfalls eine Beanstandung zur Folge, da das Futtermittel nicht uneingeschränkt eingesetzt werden kann und somit nicht von handelsüblicher Beschaffenheit ist (§ 2 FMVO 2000, § 3 FMG 99).

Zusammenfassung:

Prinzipiell ist festzuhalten, dass in der Empfehlung 2006/576/EG Richtwerte festgelegt sind, die der Behörde und den beteiligten Unternehmen in der Futtermittelkette eine Orientierungshilfe sein sollen. Als oberstes Ziel steht die Futtermittel- bzw. Lebensmittel-Sicherheit und demzufolge muss bei jedem Fall eine spezifische Risikobewertung, gestützt auf die Empfehlung 2006/576/EG, durchgeführt werden.

Autor:

Dipl.-Ing. Thomas KICKINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstrasse 165, A-1226 Wien

Qualitätssicherungssystem „Genuss - mit Sicherheit!“

Quality Assurance System „Genuss - mit Sicherheit!“

S. ZEHETNER

Summary

The bakery Resch&Frisch has implanted the traceability system “Genuss - mit Sicherheit!” for raw materials as wheat, rye, spelt and pumpkin seeds. The traceability reaches from the producers fields including seeds to the storages, mills and finally to the Resch&Frisch bakeries. Every step is reglemented by specific “Genuss - mit Sicherheit!” standards. These standards are regularly surveyed by extern acknowledged auditors. Key criteria are the plant production methods of the contracted farmers and the hygienic standards of the storages and mills. Samples are taken over the whole line to test for heavy metals, pesticides, mycotoxines and GMOs. Additionally the baking qualities are examined. This monitoring gives highest security and traceability to the consumers. “Genuss - mit Sicherheit!” standards are continuously extended to other raw materials.

Key words: quality assurance system, bakery, traceability, wheat

Zusammenfassung

Resch&Frisch hat das Qualitätssicherungsprogramm „Genuss – mit Sicherheit!“ für die Rohstoffe Weizen, Roggen, Dinkel und Kürbiskerne implementiert. Die Nachvollziehbarkeit reicht von den Feldern der Vertragslandwirte einschließlich dem verwendeten Saatgut über die Lagerstellen und Mühlen bis zur Backstube. Die Einhaltung der jeweils gültigen „Genuss – mit Sicherheit!“ Auflagen wird regelmäßig durch externe Kontrollstellen überprüft. Wichtige Prüfkriterien sind die pflanzenbaulichen Maßnahmen der Landwirte sowie die Hygienestandards der Lagerstellen und Mühlen. Proben werden während der gesamten Produktionskette genommen und auf Schwermetalle, Pestizide, Mycotoxine und GMOs untersucht. Zusätzlich werden die Back-eigenschaften im Mehllabor analysiert. Mit dem Qualitätssicherungsprogramm „Genuss – mit Sicherheit!“ wird eine hohe Sicherheit und lückenlose Rückverfolgbarkeit für die Konsumenten erreicht. Die Palette an Rohstoffen, die dieses Programm durchlaufen, wird ständig erweitert.

Schlüsselwörter: Qualitätssicherungssystem, Bäckerei, Rückverfolgbarkeit, Weizen

Resch&Frisch hat gemeinsam mit der Saatbau Linz in den letzten Jahren das Qualitätssicherungssystem „Genuss – mit Sicherheit!“ erarbeitet und für die Produkte Weizen, Roggen, Dinkel und Kürbissamen erfolgreich in die Praxis umgesetzt. Durch dieses Projekt soll das Bewusstsein und Verständnis für standardisierte, qualitätssichernde und nachvollziehbare Verarbeitungsschritte beginnend vom Getreideanbau über den Agrarhandel, die Mühlen und den Backwarenproduzenten geschaffen werden.

Eine permanente Weiterentwicklung und Anpassung des „Genuss – mit Sicherheit!“ Qualitätssicherungssystems werden vorangetrieben und sind Bestandteil dieses Projektes. Resch&Frisch will damit den Konsumenten langfristig eine Garantie für qualitativ hochwertige, in einer transpa-

renten Produktionskette hergestellte Backwaren geben und zum Aufbau einer qualitäts-orientierten heimischen Lebensmittelwirtschaft beitragen. Die Abhaltung möglicher Gefahren-momente (Schadstoffe, Mycotoxine, GVO, Pflanzenschutzmittel, etc.) während der gesamten Produktionskette und die Absicherung der beteiligten Partner (Saatzucht, Bauern, Lagerstellen, Mühlen und Backwarenproduzenten) stehen dabei im Vordergrund.

In mehrjähriger Vorbereitungszeit wurde ein umfangreiches Produktionsnetzwerk bestehend aus Saatzucht, Landwirtschaft, Lagerstellen, Mühlen und Resch&Frisch Backwarenproduzenten aufgebaut. Der Anbau erfolgt regional in Oberösterreich, Niederösterreich, dem Burgenland, Kärnten und Steiermark unter Einhaltung von agrarischen, produktionstechnischen und marketingstrategischen Standards.

Für die Ernte 2007 stehen eine Weizenfläche von ca. 2500 ha, eine Roggenfläche von 200 ha und eine Dinkelfläche von 100 ha zur Verfügung, das ergibt eine geschätzte Erntemenge von ca. 15.000 to Getreide. Den Landwirten wird für die Qualitätsproduktion € 18 pro to Getreide mehr bezahlt. Die Zusatzdienstleistungen der Agrarhändler werden mit € 4 pro to abgegolten.

Das Getreideprojekt wurde im Jahr 2001 gestartet. Derzeit gibt es ca. 500 Vertragslandwirte, 11 Lagerstellen, 5 Mühlen und 9 Bäckereien als „Genuss – mit Sicherheit!“ Partnerbetriebe.

Resch&Frisch hat durch dieses Projekt qualitätssichernde Standards entlang der Getreide- und Backwarenproduktionskette eingeführt und möchte diese Vorreiterrolle gemeinsam mit der heimischen Landwirtschaft weiter ausbauen.

Die einzelnen Stufen der Produktion werden vor Ort regelmäßig überprüft. Folgende Kontrollen werden durchgeführt:

- Überprüfung der Feldschläge bei den Landwirten auf Einhaltung der Produktionsrichtlinien durch eine externe akkreditierte Kontrollstelle. Bei Nichteinhaltung der „Genuss – mit Sicherheit! Produktionsbedingungen werden die Flächen aberkannt.
- Überprüfung der Lagerstellen auf Einhaltung der Hygienerichtlinien durch eine externe akkreditierte Kontrollstelle.
- Überprüfung der Mühlen
- Überprüfung und Bewertung des Gesamtsystems „Genuss – mit Sicherheit!“

Ein durchgängiges Probenahmesystem ermöglicht eine lückenlose Untersuchung auf Schwermetalle, Mycotoxine, Pestizide und GVOs . Weiters werden die Getreidequalitäten und Backqualitäten analysiert und ausgewertet. Die Zuteilung der untersuchten, sortenreinen Getreidequalitäten erfolgt nach den Untersuchungsergebnissen. Somit erfolgt über alle Stufen der Produktionskette eine Kontrolle oder bei Notwendigkeit werden Zusatzkontrollen veranlasst.

Autor:

Dipl.-Ing. Siegfried ZEHETNER, Resch&Frisch Franchise GmbH, Schloßstraße 14, A-4600 Wels

Mycotoxinmanagement der Nestlé Nutrition

Mycotoxine management within Nestlé Nutrition

R. KUCHENBECKER

Als Hersteller von Kindernahrung, der strenge europäische Regularien zu erfüllen hat, sind Mycotoxine, die in ihrer chemischen Struktur und in ihren Wirkprinzipien sehr heterogen sind, eine Herausforderung, die nur global in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit spezialisierten Agronomen und Einkaufsorganisationen sowie mit entsprechender analytischer Kompetenz gemeistert werden kann, um ein Optimum für den Verbraucher, insbesondere für den besonders schützenswerten Verbraucher „Kleinkind“, zu erhalten.

Mycotoxine, als sekundäre Metaboliten, können akut toxische krebserzeugende bzw. mutagene oder auch teratogene ja sogar östrogene Wirkspektren ausbilden.

Mycotoxine werden von Schadpilzen aufgrund eines komplexen Ursachenspektrums bestehend aus klimatischen boden- und sortenspezifischer Einflußfaktoren in Schadpilzen gebildet und über die Nahrungsmittelrohstoffe aufgenommen. Die biologische Funktion mag, wenn auch nicht in jedem Fall nachweisbar, in der Arterhaltung der Schadpilze selber liegen, die sich durch pflanzeneigene Abwehrmechanismen des Wirtes gegen den Pilzbefall wehren.

Nestlé Nutrition hat beim Wertschöpfungsprozeß Lebensmittelherstellung die Mycotoxinbelastung in Lebensmittelrohstoffen als CCP definiert, um dem besonders schützenswerten Verbraucher „Kleinkind“, ein Höchstmaß an Verbraucherschutz zu bieten.

Mycotoxine in Lebensmitteln werden neben akuter bzw. chronischer Intoxikation zu einem zunehmend ökonomischen Risiko für global agierende Lebensmittelhersteller.

Seit Einführung der organisierten Landwirtschaft lebt die Menschheit mit dem Problem mycotoxinbelasteter Lebensmittel. Ergotismus ist in vielen historischen Schriften erwähnt (1) Der Niedergang der Etrusker soll durch Ergotismus begründet sein.

Andere pilzbedingte Katastrophen (Der Pilz der J.F. Kennedy zum Präsidenten machte) führten in der Moderne zu europäischen Wanderbewegungen, die wir heutzutage als Triebkraft der amerikanischen Siedlungsgeschichte interpretieren können. Pilzbedingte Intoxikationen sind selbst in der Gegenwart nicht gelöst, siehe (Chinese Festival of the Nine Emperor Gods) Intoxikation durch Aflatoxin belastete Nudeln mit 45 Erkrankten und daraus resultierenden 13 Todesfällen.

Neben der akuten Vergiftungserscheinung ist die permanente Aufnahme mycotoxinbelasteter Nahrungsmittel in subletalen Dosen (Spurenbereich) die Herausforderung, die ein erfolgreicher Lebensmittelhersteller heutzutage zu meistern hat. Nestlé hat über ein weltumspannendes Netz von Laboratorien (NQAC's, National Quality Assurance Center) und Produktentwicklungszentren (PTC's Product Technology Center) die notwendigen Kapazitäten geschaffen, die Herausforderung „Verarbeitung mycotoxinreduzierter Nahrungsmittelrohstoffe“ zu meistern und der besonders schützenswerten Verbrauchergruppe der Kleinkinder (bis zur Altersgruppe 3 Jahre) weltweit einwandfreie Lebensmittel zur Verfügung zu stellen.

Durch den Aufbau eines globalen EDV Netzes "GLOBE" ist es der Nestlé ermöglicht über gemeinsam nutzbare Datenbanken, den schnellen Austausch rückstandsanalytischer Informationen über Rohstoffe aus den jeweiligen Anbaugebieten zu bewerkstelligen, die in Nestlé eigenen Werken der Nestlé Nutrition bzw. bei von Nestlé beauftragten Lohnherstellern verarbeitet werden. Der kontrollierte Vertragsanbau, sowie selektiver Zukauf, begleitet durch intensive Freigabeuntersuchungen unter dem besonderem Focus rückstandsbezogener Fragestellungen, ermöglichen eine geplante Qualität vom Acker bis zur Gabel (Farm to Fork).

Literatur:

(1) Alexandros Yiannikouris^a and Jean-Pierre Jouany^b (2002): Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Anim. Res. 51, 81-99.

^a INRA, URH, Centre de Clermont-Theix, 63122 St-Genès-Champanelle, France

^b Alltech-France, 2-4 avenue du 6 juin 1944, 95190 Goussainville, France

(2) Dixon, Bernard (1998): Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte und andere Geschichten aus der Welt der Mikroorganismen. ISBN: 3-8274-0398-7, Elsevier Verlag.

Autor:

Dr. Ralf KUCHENBECKER, Nestlé Germany, Weiding, Leiter Qualitätsmanagement, Menningerstrasse 1, D-84570 Polling-Weiding

Internationale Gesetzgebung, analytische Herausforderungen und wirtschaftliche Auswirkungen im Bereich der Mykotoxine

International Legislation, analytical challenges and economic impact of mycotoxins

A. FELLINGER, SIGRID HAAS-LAUTERBACH & K. SCHMITT

Summary

A discussion on mycotoxins very often concentrates on specific details and regional aspects. Also the macro economic dimension of mycotoxins is sometimes forgotten. This article will cover the problem of mycotoxins in a wider perspective. Different concepts of mycotoxin related legislation as well as general analytical challenges are discussed. Different regions deal differently with the problem of mycotoxin limits. The range is from strict limits for a large number of foods and for different mycotoxins within the European Union to a few toxins and a limited list of foods in the legislation. In addition there is a difference in the concepts - limits, action levels or guidance levels. Furthermore, the economic impact and loss by mycotoxins is discussed. Different studies by the World Bank, private interest groups and others illustrate the enormous losses that are caused directly or indirectly by mycotoxins. Estimations reach levels in the range of billions of dollars, just for the USA alone.

Keywords Mycotoxins, Legislation, Analysis, Economy

Zusammenfassung

Bei der Diskussion über Mykotoxine konzentriert man sich häufig auf spezifische Details und regionale Gegebenheiten. Außerdem bedenkt man häufig nicht die makroökonomischen Dimensionen von Mykotoxinen. Dieser Beitrag soll das Problem Mykotoxine in einer weiteren Perspektive behandeln. Es werden die verschiedenen Konzepte der mykotoxin-bezogenen Gesetzgebung behandelt sowie generelle Betrachtungen über die analytischen Herausforderungen angestellt. Verschiedene Regionen behandeln das Problem Mykotoxine dabei sehr unterschiedlich. Die Bandbreite reicht von strengen Reglements für eine Vielzahl von Lebensmitteln und die unterschiedlichsten Mykotoxine innerhalb der EU bis zu nur wenigen Toxinen in einer limitierten Liste von Lebensmitteln die in der Gesetzgebung beachtet werden. Dazu kommt noch eine Unterscheidung zwischen Limits, *Action Levels* und *Guidance Levels*. Weiters wird der volkswirtschaftliche Einfluss und Schaden von Mykotoxinen behandelt. Verschiedene Untersuchungen der Weltbank, privater Interessenverbände und anderer verdeutlichen den enormen Schaden der direkt und indirekt durch Mykotoxine verursacht wird. Schätzungen gehen dabei von Schäden im Milliarden Dollar Bereich pro Jahr, alleine für die USA, aus.

Schlüsselwörter Mykotoxine, Gesetzgebung, Analytik, Wirtschaft

Internationale Gesetzgebung

Nach einer Studie der FAO [1] gab es 2003 in 124 Länder der Erde Gesetze über maximal erlaubte Belastungen an Mykotoxinen in Lebens- und/oder Futtermitteln. Dabei gibt es aber, sowohl was die zulässigen Grenzwerte als auch die Art der reglementierten Mykotoxine oder der betroffenen Produkte betrifft massive Unterschiede. Einen sehr guten Überblick über die aktuelle Situation der Limits für Mykotoxine in den einzelnen Ländern findet sich in der Mytoxipedia-Datenbank des britischen Central Science Labs [2]. Dort kann die jeweils gültige Rechtslage nach Land, Mykotoxin und Produkt gesucht werden.

Bei der Regulation werden unterschiedliche Konzepte verfolgt. So werden innerhalb der EU Limits, Probennahmeverfahren, Referenzanalyseverfahren und betroffene Lebensmittel genau definiert während im Gegensatz dazu in den USA das Konzept von *Guidance Levels* und *Action Levels* verfolgt wird. (Bei überschreiten von *Action Levels* kommt es zu regulatorische Maßnahmen für die betroffenen Produkte, falls der *Guidance Level* überschritten wird muss jedoch nur der *Domestic Mycotoxin Monitor* verständigt).

Ein Überblick über die Unterschiede in der Anzahl der reglementierten Mykotoxine sowie die verschiedenen Grenzwerte findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Mykotoxin Grenzwerte in einigen Ländern (in µg/kg, kursiv = *Guidance Levels*)

Land	Mykotoxin							
	Aflatoxine	Afla M ₁	Ochratoxin A	Patulin	DON	Fumonisine	Zearalenon	T-2/HT-2
EU	0,1 – 15,0	0,025 – 0,05	0,5 - 10	10 – 50	200 – 1750	200 – 2000*	200 - 100	-**
USA	20	0,5		50	1000	2000 - 4000		
Japan	10			50	1100			
Argentinien	20	0,5 – 5						
Brasilien	20 - 30	0,5 - 5						
Australien	15							
China	10 - 20							

* in EG/856/2005 vorgeschlagene Werte, die vor dem 1.10.2007 noch festzulegen sind

** bis zum 1.7.2007 wird gegebenenfalls ein Limit festgelegt

Analytische Herausforderungen:

Eine strenge Gesetzgebung mit definierten Grenzwerten bedingt natürlich auch die Notwendigkeit für geeignete analytische Verfahren. Dabei gibt es einige massive Herausforderungen zu bewältigen. Zuerst stellt bereits die korrekte **Probennahme** eine große Herausforderung dar. Eine geeignete, repräsentative Probennahme stellt jedoch die notwendige Basis jeglicher valider Analyseergebnisse dar. Dabei ist auf die Einhaltung eines Probennahmeplans zu achten, der eine repräsentative und homogene Laborprobe ergibt zu achten. Teilweise sind dafür durch die EU entsprechende Verordnungen erlassen [3]. Aber auch die **Gesetzgebung** selbst stellt eine analytische Herausforderung dar. Die darin enthaltenen Vorgaben bezüglich Matrices, Spezifitäten und Sensitivitäten pro Matrix sind dabei zu beachten. Basierend darauf muss die geeignete **Methodik** gewählt werden. Spezifität, Sensitivität, Ort der Durchführung, Einfachheit der Handhabung und natürlich auch die erwachsenden Kosten sind dabei zu berücksichtigen. Nicht zuletzt stellt natürlich die **Matrix** selbst eine große Herausforderung dar. Störende Bestandteile, die Präsentation, ihre Heterogenität, und vieles mehr müssen für die Auswahl des geeigneten Analysenansatzes beachtet werden.

Wirtschaftliche Auswirkungen

Die Abschätzung der wirtschaftlichen Auswirkung von Mykotoxinen ist naturgemäß sehr schwierig. Vorab muss dabei geklärt werden in welcher Form Mykotoxine volkswirtschaftliche Kosten und Schäden verursachen können. Diese Bereiche sind u.a. direkte Ernteverluste durch Pilzbefall bzw. Mykotoxine, direkte Kosten für Mykotoxinanalysen, Kosten für Forschung zur Mykotoxinvermeidung bzw. zum Mykotoxin Management, Handelsverluste bei belasteten Waren, soziale Kosten sowie Kosten für die Volksgesundheit.

Tabelle 2: Wirtschaftliche Schäden durch Mykotoxine (in Millionen US\$) [4]

	5. Perzentil	Median	Mittelwert	95. Perzentil
Kulturpflanzen	418	882	932	1656
Vorbeugungskosten	209	441	466	828
Kosten bei Nutztieren	2	6	6	12
Gesamtkosten	629	1329	1404	2496

Weitere Quellen [5] beziffern die Schäden durch Mykotoxine bei verschiedenen Produkten wie Baumwolle, Erdnüssen, Walnüssen, Mandeln und Getreide alleine in den USA im Bereich von jeweils 2 Millionen bis 1 Milliarde US\$. Andere Untersuchungen über wirtschaftliche Auswirkungen in Südostasien kommen zu einem Betrag von US\$ 900 Millionen an Handelsverlusten, Verlusten bei Nutztieren und Kosten in der Volksgesundheit [6].

Alleine die Veränderung des Grenzwertes für Aflatoxine durch die EU bedeutete für Afrika Handelsverluste von 63% bzw. 670 Millionen US\$ [7,8]. Nicht zu vergessen, dass Aflatoxine als eines der stärksten Mutagen und Karzinogene bekannt sind und ein Zusammenhang zwischen ihnen und Ernährungsmangelerkrankungen spekuliert wird [9,10].

Literatur

- [1] Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, *FAO*, 2004
- [2] Mytoxipedia - The up-to-date on-line source for legislative limits and regulations on mycotoxins, Central Science Laboratory, UK; <http://mycotoxins.csl.gov.uk/>
- [3] Verordnung (EG) Nr. 401/2006 der Kommission vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln
- [4] Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. *Council of Agricultural Science and Technology*, 2003
- [5] Mycotoxins: The Cost of Achieving Food Security and Food Quality, *APSnet Feature*, August 2001.
- [6] Lubulwa at Davis; Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts. In: *Stored Product Protection: Proceedings of the 6th International Conference on Stored-product Protection*. CAB International, Wallingford UK, 1994
- [7] Otsuki, Wilson and Sewadeh; What price precaution? European harmonization of aflatoxin regulations and African groundnut exports. *Eur.Rev.Agric.Econ.* 2001,28
- [8] Otsuki, Wilson and Sewadeh; Saving Two in a Billion: Quantifying the Trade Effect on European Food Safety Standards on African Exports. *Food Policy* 2001,26
- [9] Agriculture food and nutrition for Africa - A resource book for teachers of agriculture, *FAO*, 1997
- [10] Hendrickse, R.G. 1988. Kwashiorkor and aflatoxins. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 7(5): 633-636.

Autoren:

Ing. Alois FELLINGER, Sigrid HAAS-LAUTERBACH und Karl SCHMITT, R-Biopharm AG, Landwehrstrasse 54, D-64293 Darmstadt.

Qualitative und quantitative Untersuchung von Pilzen im Trinkwasser

Qualitative and Quantitative Examination of Fungi in Drinking Water

W. BUZINA, DAGMAR KANZLER, DORIS HAAS, ASTRID PAULITSCH & F. MASCHER

Summary

Fifty-three samples from drinking water, recreational waters, and groundwater were taken and analyzed. Fungi were isolated both by membrane filtration (100 ml) and plating 0,5 ml of the samples and were cultivated. Colony forming units (CFU) of the samples were assessed and the cultivated fungi were identified using routine microscopy techniques as well as molecular methods.

Fungi were isolated in 98,1% of the samples investigated. The mean CFU were 9,1/100 ml for drinking water, 3,4/100 ml for recreational waters, and 5.400/100 ml for groundwater. The taxa which occurred most frequently were *Cladosporium* sp. (69,6%), Basidiomycetes (46,4%) and *Penicillium* sp. (41,1%).

The technique of membrane filtration and incubation at 22°C for seven days proved to be a useful one for mycological investigation and survey of water samples.

Key words: drinking water, fungi, mold, spores

Zusammenfassung

Insgesamt wurden 53 Wasserproben von Trinkwasser, Badewasser und Grundwasser mykologisch untersucht. Pilze wurden entweder durch Membranfiltration (100 ml) oder durch Ausspateln von 0,5 ml Wasser auf Nährmedien isoliert. Es wurden sowohl die Keimzahlen als koloniebildende Einheiten (KBE) erfasst, als auch die einzelnen Pilzarten bzw. -gattungen mikroskopisch oder molekularbiologisch bestimmt.

Pilze konnten in 98,1% der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Keimzahl (in KBE) betrug 9,1/100 ml für Trinkwasser, 3,4/100 ml für Badewasser, und 5.400/100 ml für Grundwasser. Die häufigsten Taxa waren *Cladosporium* sp. (69,6%), Basidiomyceten (46,4%) und *Penicillium* sp. (41,1%).

Die Methode der Membran Filtration und Inkubation bei 22°C für sieben Tage hat sich für mykologische Untersuchungen von Wasserproben als geeignet erwiesen.

Schlüsselwörter: Trinkwasser, Pilze, Schimmel, Sporen

Einleitung

Pilze in der Luft können zu verschiedenen Erkrankungen führen. Diese sind Allergien und andere Hypersensitivitätserkrankungen, Irritationen und Infektionen, die besonders in immungeschwäch-

ten Personen zu lebensbedrohlichen Zuständen führen können. Darüber hinaus können bestimmte Schimmelpilze in Futter- bzw. Nahrungsmitteln hochtoxische Mykotoxine produzieren.

Methode

Am Institut für Hygiene der Medizinischen Universität Graz wurden insgesamt 53 Wasserproben von Trinkwasser, Badewasser (chlorierte Swimmingpools) und Grundwasser (aus Grundwasser-sonden) mykologisch untersucht. Bei der Membranfiltration wurden 100 ml des zu untersuchenden Wassers durch einen 47 mm großen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Danach wurden die Filterscheibchen auf Agarplatten aufgebracht. Bei stärker kontaminierten Wässern wurden jeweils 0,5 ml Wasser durch Ausspateln auf Nährmedien aufgebracht. Als Nährmedien wurden Sabouraud-Glucose Agar bzw. Malzextraktagar verwendet, mit Zusatz von Chloramphenicol und Gentamicin, welche ein Bakterienwachstum unterbinden. Nach der Inkubation für 3 bis 7 Tage bei 22°C wurden die Keimzahlen als koloniebildende Einheiten (KBE) pro 100 ml erfasst. Die einzelnen Pilzarten bzw. -gattungen wurden mikroskopisch oder molekularbiologisch bestimmt. Für die molekulare Untersuchung wurde von den Pilzen DNA isoliert, mit pilzspezifischen Primern die ribosomale DNA amplifiziert und danach sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden mit internationalen Sequenzdatenbanken verglichen, um Übereinstimmungen mit bereits bekannten Pilzarten zu erhalten [1].

Ergebnisse

In allen untersuchten Proben wurden Pilze nachgewiesen. Die mittleren Werte waren für Trinkwasser 9,1 KBE/100 ml, für Badewasser 3,4 KBE/100 ml und hohe 5.400 KBE/100 ml für das Grundwasser. Die häufigsten Pilze waren *Cladosporium* spp., Basidiomyzeten und *Penicillium* spp. Die gesamte Liste ist in Abb. 1 zu sehen.

Diskussion

Unter den identifizierten Pilzen befinden sich sowohl solche, die als Produzenten von Mykotoxinen in Frage kommen als auch Opportunisten, die in Immunsupprimierten invasive Infektionen verursachen können. In der Literatur findet man einige Hinweise auf Pilze im Trinkwasser. Nagy et al. untersuchten 1982 ein Jahr lang Trinkwasser in Kanada und fanden *Penicillium*, *Sporocybe*, *Acronium*, sowie *Paecilomyces* als dominante Gattungen. Die Keimzahlen lagen für chloriertes Wasser bei 18 CFU/100 ml, für nicht chloriertes bei 34 CFU/100 ml [2]. Im Trinkwassersystem von Bratislava haben Frankova et al. 294 Wasserproben auf Pilze untersucht und in 44% der Proben 39 Gattungen und 64 Arten nachgewiesen [3]. Sogar aus Mineralwasser konnten in einer argentinischen Arbeit Pilze isoliert werden: *Cladosporium cladosporioides* in 50%, *Penicillium* in 46% und *Alternaria alternata* in 21% der Proben mit sichtbarem Wachstum [4]. In einer deutschen Studie wurden aus 2657 Wasserproben von 29 verschiedenen Versorgern nur 7,5% positiv bewertet [5]. Das steht in starkem Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es konnten in allen untersuchten Trinkwasserproben Pilze nachgewiesen werden. Dies könnte darauf zurückzuführen

sein, dass Trinkwasser in Österreich, im Gegensatz zu den meisten anderen westlichen Ländern, kaum gechlort wird. Die hohe Keimzahl von 5.400 KBE/100 ml im Grundwasser lässt sich dadurch erklären, dass die Proben aus so genannten Grundwassersonden gezogen wurden, die erfahrungsgemäß oft ein starkes Biofilmwachstum aufweisen. Die hohen Keimzahlen in Biofilmen wurden bereits von Doggett et al. beschrieben [6].

Die medizinische Relevanz von opportunistischen Pilzen im Trinkwasser wurde in mehreren Arbeiten von Anaissie untersucht [7-9]. In diesen Artikeln wurde vor allem die Rolle von Aspergillen und Fusarien als fakultative Pathogene diskutiert. Das höchste Gefahrenpotential scheint bei Immunsupprimierten in der Aerosolbildung von mit Pilzen kontaminiertem Wasser zu liegen.

Conclusio

Regelmäßige Untersuchung von Wasser auf Pilze soll durchgeführt werden:

- In Betrieben, die Lebensmittel herstellen, welche nicht konserviert werden
- In Krankenhäusern bzw. Stationen, in denen immunsupprimierte Patientinnen und Patienten behandelt werden.

Literatur:

- [1] Buzina W, Braun H, Freudenschuss K, Lackner A, Habermann W, Stammberger H. Fungal Biodiversity – as found in nasal mucus. *Medical Mycology* 41: 149-61
- [2] Nagy LA, Olson BH. 1982. The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Can J Microbiol* 28:667-71
- [3] Franková E, Horecká M. 1995. Filamentous soil fungi and unidentified bacteria in drinking water from wells and water mains near. *Microbiol Res* 150: 311-13
- [4] Cabral D, Fernández Pinto VE. 2002. Fungal spoilage of bottled mineral water. *Int J Food Microbiol* 72: 73-76
- [5] Göttlich E et al. 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 205: 269-79
- [6] Doggett MS. 2000. Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 1249-51
- [7] Anaissie EJ et al. 2000. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis* 33: 1871-78
- [8] Anaissie EJ et al. 2002. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clin Infect Dis* 34: 780-89

[9] Anaissie EJ et al. 2003. Pathogenic mold (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinic implication for patients with hematologic malignancies. *Blood* 101: 2542-46

Tabelle 1

Pilzgattung bzw. -art	Häufigkeit	in %	Pilzgattung bzw. -art	Häufigkeit	in %
<i>Cladosporium</i> sp.	29	87,9	<i>Alternaria alternata</i>	1	3,0
Basidiomyceten	22	66,7	Ascomyceten	1	3,0
<i>Penicillium</i> sp.	19	57,6	<i>Beauveria bassiana</i>	1	3,0
<i>Acremonium</i> sp.	10	30,3	<i>Cistella acuum</i>	1	3,0
<i>Leptosphaeria</i> sp.	10	30,3	<i>Cordyceps bassiana</i>	1	3,0
<i>Phialophora malorum</i>	8	24,2	<i>Dactylaria</i> sp.	1	3,0
Nicht identifiziert	7	21,2	<i>Fusarium</i> sp.	1	3,0
<i>Aspergillus</i> sp.	6	18,2	<i>Graphium silanum</i>	1	3,0
<i>Lecythophora hoffmanii</i>	5	15,2	<i>Microdochium</i> sp.	1	3,0
<i>Rhodotorula</i> sp.	4	12,1	<i>Paecilomyces</i> sp.	1	3,0
<i>Phoma glomerata</i>	3	9,1	<i>Paecilomyces variotii</i>	1	3,0
<i>Pleosporales</i>	3	9,1	<i>Phaeosphaeria junco- phila</i>	1	3,0
<i>Aspergillus terreus</i>	2	6,1	<i>Phialophora</i> sp.	1	3,0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2	6,1	<i>Phomopsis</i> sp.	1	3,0
<i>Epicoccum nigrum</i>	2	6,1	<i>Trichoderma</i> sp.	1	3,0
Hefen	2	6,1	<i>Trichoderma viride</i>	1	3,0
<i>Trametes versicolor</i>	2	6,1			

Autoren:

Priv.Doz.Ing.Mag.Dr. Walter BUZINA, Dagmar KANZLER, Doris HAAS, Astrid PAULITSCH, F. MASCHER, Institut für Hygiene, Medizinische Universität Graz, Universitätsplatz 4, 8010 Graz

Peptaibole des Biokontrollorganismus *Trichoderma* – Fungizide der Zukunft ?

Peptaibols of the biocontrol organism Trichoderma – fungicides of the future?

BARBARA REITHNER, N. STOPPACHER, M. OMANN, SUSANNE ZEILINGER, K. BRUNNER,
R. L. MACH, R. KRŠKA & R. SCHUMACHER

Summary:

The filamentous fungus *Trichoderma* becomes increasingly interesting as biocontrol organism in agriculture. Its ability to produce various antifungal substances such as peptaibols is thought to contribute to successful mycoparasitic interaction with phytopathogenic fungi. In this study, peptaibols, a characteristic group of peptides, were analyzed by HPLC-MS/MS in *Trichoderma atroviride* fungal culture samples. We found sixteen different peptaibols of the trichorzianine family. Semi-quantitative determination of the individual trichorzianines resulted in patterns being typical for the investigated fungal strains and the applied culture conditions. The findings are interesting aspects for a possible use of peptaibols as biofungicides of the future.

Keywords:

Trichoderma atroviride, peptaibols, mycoparasitism, HPLC, mass spectrometry, sequencing, trichorzianines, culture conditions, biofungicides

Zusammenfassung:

Filamentöse Pilze der Gattung *Trichoderma* gewinnen als Biokontrollorganismen in der Landwirtschaft zunehmend an Bedeutung. Ein wichtiger Faktor bei der mykoparasitischen Wechselwirkung mit pflanzenpathogenen Pilzen ist die Produktion antifungaler Substanzen, wie z.B. Peptaibolen. In dieser Studie wurden *Trichoderma atroviride* Pilzkulturproben mittels HPLC-MS/MS auf die Bildung von Peptaibolen untersucht. Dabei konnten sechzehn verschiedene Peptaibole aus der Gruppe der Trichorzianine gefunden werden. Eine semiquantitative Bestimmung der Trichorzianine ergab typische Peptaibol-Muster für die untersuchten Pilzstämme sowie für die getesteten Kulturbedingungen. Die Ergebnisse stellen einen interessanten Aspekt dar für eine mögliche zukünftige Verwendung der Peptaibole als Biofungizide.

Einleitung:

Durch Pilze verursachte Krankheiten an Nutzpflanzen führen weltweit alljährlich zu einem enormen Verlust an Ertrag und Qualität der Ernte im landwirtschaftlichen Bereich. Als Alternative zu den bisher üblicherweise eingesetzten chemischen Fungiziden rückt die Kontrolle dieser Pflanzenschädlinge auf natürlichem Weg immer weiter in den Vordergrund.

Hierfür erweisen sich unter anderem mykoparasitische Pilze der Gattung *Trichoderma* als besonders geeignet. Die Interaktion zwischen *Trichoderma* und Schadpilzen wie *Botrytis cinerea* (Erre-

ger des Grauschimmels auf Beeren- und Kernobst), *Fusarium* spp. (problematisch wegen der Produktion von Mykotoxinen im Zusammenhang mit dem Befall von Getreide), sowie *Alternaria* spp., *Ustilago avenae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Pythium ultimum* (z. B. Lorito et al., 1994; Lorito et al., 1993), ist unter dem Begriff Mykoparasitismus zusammengefasst und beinhaltet

- 1) gerichtetes Wachstum,
- 2) die Erkennung des Wirtspilzes,
- 3) die Veränderung der Hyphenform durch Ausbildung von Angriffsstrukturen (Abbildung 1) und
- 4) die Produktion und Sekretion von lytischen Enzymen und antifungalen Metaboliten zur Penetration und zum Abbau der Wirtszellwand (Chet, 1990) (Abbildung 2).



Abb. 1: Hyphen von *Trichoderma* (Pfeile) wickeln sich um den Schadpilz (dicker dunkler Schlauch). (Benhamou et al., 1997)

Durch Deletion von Genen, die für Signaltransduktionskomponenten kodieren, wurde die Bedeutung der Genprodukte (Proteine, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen) für die Mykoparasitismus-bezogenen Eigenschaften von *T. atroviride* untersucht (Reithner et al., 2005; Zeilinger et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass jedes dieser Proteine an einzelnen Schritten der mykoparasitischen Antwort von *T. atroviride* beteiligt ist, wobei besonders die Produktion von Sekundärmetaboliten und extrazellulären Chitinasen, sowie die direkte mykoparasitische Aktivität von der Signalübertragung der in diesen Arbeiten beschriebenen Proteine beeinflusst wird. Zu den Sekundärmetaboliten zählen beispielsweise 6-Pentyl-alpha-Pyron oder Peptaibole. Peptaibole sind lineare Peptide mit einer Länge von 5 bis 20 Aminosäuren und einem hohen Anteil an besonderen Aminosäuren wie z.B. alpha-Aminoisobuttersäure (Aib) oder Isovalin. Sie wirken antibiotisch, u. a. durch Bildung von Ionenkanälen in der Zellmembran des Schadpilzes, wodurch die Permeabilität der Zellmembran und die intrazelluläre Ionenbilanz beeinflusst wird.

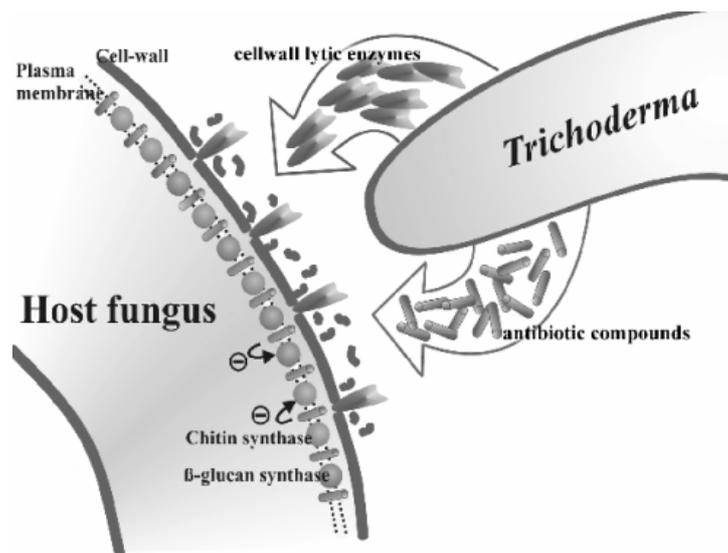


Abb. 2: Sekretion von lytischen Enzymen und antifungalen Metaboliten bei der Wechselwirkung zwischen *Trichoderma* und Wirtspilz (Kubicek et al., 2001)

Aufgabenstellung:

Für verschiedene *Trichoderma*-Stämme sollte die Produktion von Peptaibolen im flüssigen Nährmedium verglichen und durch massenspektrometrische Untersuchungen deren Identität geklärt werden. Weiters wurde geprüft, ob es relative Unterschiede in der Peptaibol-Expression zwischen den Stämmen gibt.

Durchführung:

T. atroviride Wildtyp und drei Signaltransduktionsmutanten wurden in jeweils drei Ansätzen wie in Reithner et al., 2007 (zur Publikation eingereicht beim Journal „Fungal Genetics and Biology“) beschrieben kultiviert und durch Filtration geerntet. Je 10ml der *Trichoderma*-Kulturfiltrate wurden mit 5ml Methanol gemischt, über C₁₈-SPE-Säulen aufgereinigt und die Eluate mit Stickstoffgas zur Trockene abgeblasen. 5µl der in 500µl Lösung mit 50% Acetonitril (v/v) und 5mM Ammoniumacetat aufgenommenen Rückstände wurden bei 0,6 ml/min Flussrate auf einer BDS Hypersil C₁₈-HPLC-Säule (150 x 2.1mm, 5µm, Thermo) an einer Agilent Serie 1100 HPLC-Anlage mittels Acetonitril, Wasser und 5mM Ammoniumacetat enthaltenden Eluenten chromatographiert. Zur Detektion dienten ein QTrap 4000 LC-MS/MS System (Applied Biosystems) mit Electrospray (ESI) -Quelle, und MS/MS-Produktionenscans (EPI) zur Strukturaufklärung und „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) zum simultanen und semiquantitativen Nachweis mehrerer Substanzen. Standardmischungen mit TA- (9 Peptaibole) bzw. TB-Trichorzianinen (7 Peptaibole) dienten als Standardlösungen und wurden zur eindeutigen Identifizierung und Charakterisierung der in den Proben enthaltenen Peptaibole herangezogen.

Bildet man das Verhältnis der Konzentrationen von sieben zufällig ausgewählten Trichorzianinen in den Mutanten relativ zu den Konzentrationen der gleichen Substanzen im Wildtyp, wird ersichtlich, dass alle Mutanten die Peptaibole in höheren Konzentrationen als der Wildtyp produzieren.

Je nach Kulturbedingungen bilden die Mutante C bzw. Mutante A (Abbildung 4, links bzw. rechts) die größten Mengen an Trichorzianinen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Produktion der antifungal wirksamen Peptaibole durch *T. atroviride* unmittelbar mit Signaltransduktionsprozessen verknüpft ist. In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, ob die Deletionsmutanten in der Lage sind, weitere bisher unbekannte Peptaibole zu produzieren.

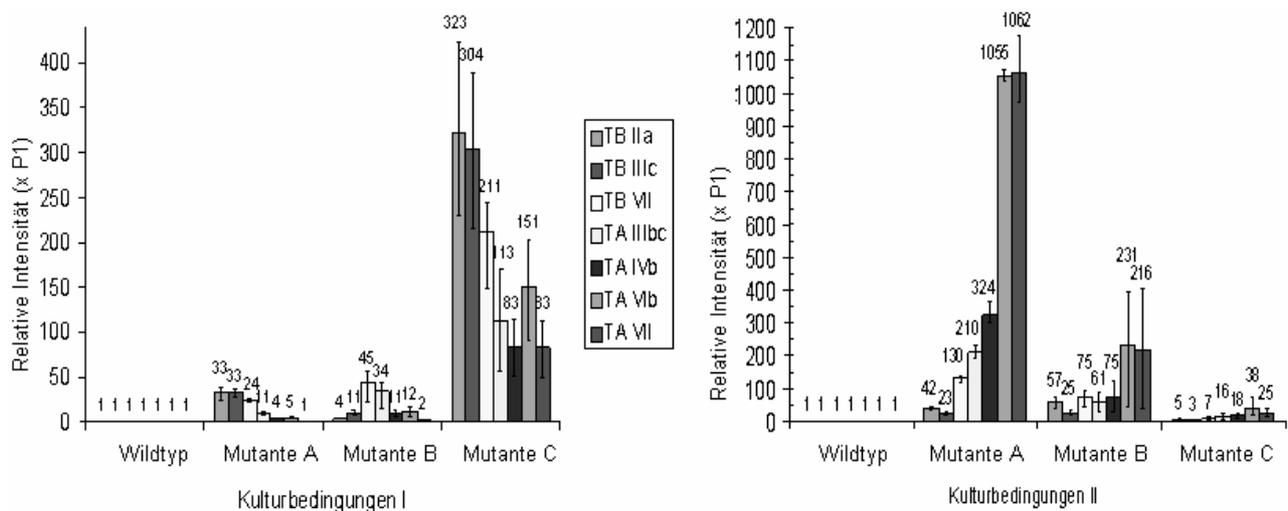


Abb. 4: Relative Konzentrationen von sieben ausgewählten Trichorzianinen, bezogen auf den *T. atroviride* Wildtyp

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei Prof. Sylvie Rebuffat (Naturhistorisches Museum Paris) für die Trichorzianin-Standards, bei der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, dem Fonds für wissenschaftliche Forschung und dem Land Niederösterreich für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

- Lorito M., Peterbauer C.K., Hayes C.K., Harman G.E., 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140, 623-629
- Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M., Tronsmo A., Woo S.L., Di Pietro A., 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83, 302-307

- Chet I., 1990. Mycoparasitism – recognition, physiology and ecology, *In* R. R. Baker and P. E. Dunn (ed.), *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Alan Liss, New York, p. 725-733
- Benhamou N., Chet I., 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. and Envir. Microb.* 63 (5): 2095-2099
- Reithner B., Brunner K., Schuhmacher R., Peissl I., Seidl V., Krska R., Zeilinger S., 2005. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42, 749-760
- Zeilinger S., Reithner B., Scala V., Peissl I., Lorito M., Mach R.L., 2005. Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1591-1597
- Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., Lorito M., 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* 83: 11-23
- Reithner B., Schuhmacher R., Stoppacher N., Mach R.L., Zeilinger S., 2007. Signaling via the *Trichoderma atroviride* Mitogen-activated Protein Kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fung. Gen. and Biol.*, eingereicht zur Publikation.
- Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vagvölgyi C., 2005. Peptaibols and related Peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. *Acta Microb. Immun. Hung.* 52(2), 137-168
- El Hajji M., Rebuffat S., Lecommandeur D., Bodo B., 1987. Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 29, 207-215
- Rebuffat S., El Hajji M., Hennig P., Davoust D., Bodo B., 1989. Isolation, sequence, and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 34, 200-210

Autoren:

Dipl. Ing. Barbara REITHNER, Dipl. Ing. Markus OMANN, Dr. Susanne ZEILINGER, Dr. Kurt BRUNNER, Ao. Univ. Prof. Dr. Robert L. MACH, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/166/5/2, A-1060 Wien

Mag. Norbert STOPPACHER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA, Univ. Ass. Dr. Rainer SCHUHMACHER, Analytikzentrum, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad-Lorenz-Strasse 20, A-3430 Tulln

Reduzierte Virulenz eines Glukoseoxidase produzierenden

Fusarium graminearum Stammes

Reduced Virulence of a Glucose Oxidase Producing Strain of Fusarium graminearum

K. BRUNNER, D. KASPER, KRISTA KÖLLNER, M. LEMMENS, G. ADAM.& ROBERT L. MACH

Zusammenfassung:

Wasserstoffperoxid ist wie auch andere reaktive Sauerstoffverbindungen ein wichtiger Botenstoff bei der Induktion von Pathogenresistenz in der Pflanze. Das Enzym Glukoseoxidase produziert Wasserstoffperoxyd als Nebenprodukt bei der Umwandlung von Glukose zu Glukonsäure. Ein Transgener *Fusarium graminearum* Stamm, der das Glukoseoxidasegen aus *Aspergillus niger* unter Kontrolle eines Xylanase Promotors aus *Trichoderma reesei* trägt, zeigte bei künstlicher Inokulation von Weizen praktisch keine Infektionssymptome mehr.

Abstract:

Hydrogen peroxide is like other reactive oxygen species involved in the resistance of plants to pathogens. The enzyme glucose oxidase produces hydrogen peroxide as a by-product while oxidising glucose to gluconic acid. A *Fusarium graminearum* strain has been transformed with the *Aspergillus niger* glucose oxidase encoding gene under control of a *Trichoderma reesei* xylanase gene promoter. The transgenic strains showed significantly reduced virulence upon artificial inoculation of wheat.

Einleitung

Das Enzym Glukoseoxidase oxidiert Glukose als Substrat zu D-glucono-1,5-lacton, und in wässriger Umgebung wird aus dem Lacton die Glukonsäure gebildet. Als Nebenprodukt entsteht Wasserstoffperoxid. *Fusarium* bildet unter normalen Laborbedingungen (Wachstum auf synthetischen und komplexen Medien oder auf Pflanzenmaterial) keine Glukoseoxidase.

Wasserstoffperoxid und verwandte reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) stehen in engem Zusammenhang mit der Antwort der Pflanze auf eine erfolgte Pathogenattacke und spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr:

- sie sind in den sogenannten "oxidative burst" involviert,
- lösen hypersensitive Reaktion (HR) aus und die Pflanze stirbt direkt an der Infektionsstelle ab,
- sie zeigen direkte antibiotische Wirkung,
- sie sind das Signal zur Aktivierung einiger Gene des Pathogen-Abwehrsystems (Immunsystem der Pflanze),
- sie bewirken eine Verdickung und Festigung der Pflanzenzellwand als mechanische Barriere gegen den Eindringling.

Zhou et al. (1) zeigten durch 2D-Gelelektrophorese von Weizenproteinen, dass *Fusarium*-resistente und nicht resistente Sorten während der Infektion ein unterschiedliches Enzymspektrum

bilden. Zahlreiche der differentiell gebildeten Proteine sind in die Regulation des Peroxidhaushaltes der Pflanze involviert.

Schon in früheren Untersuchungen wurde versucht, mittels Glukoseoxidaseproduktion direkt auf das Resistenzverhalten von Pflanzen Einfluss zu nehmen. Kartoffeln, die Glukoseoxidase aus *Aspergillus* in ihren Knollen produzieren, zeigen erhöhte Resistenz gegen das Bakterium *Erwinia carotovora* und den Pilz *Phytophthora infestans* (2). Ein Glukoseoxidase produzierender *Trichoderma* Stamm kann systemische Resistenz in Bohnen induzieren und so die Resistenz gegen pathogene Pilze aus dem Boden (*Rhizoctonia* und *Pythium*) und gegen Luftkeime (*Botrytis*) steigern (3). Durch diese *Trichoderma* basierte System wurde gezeigt, dass Glukoseoxidase nicht nur bei Expression direkt in der Pflanze wirksam ist, sondern dass eine Übertragung dieser bioaktiven Substanz durch den Pilz in die Pflanze reicht, um verstärkte Resistenz gegen Pathogene zu induzieren.

Ein Glukoseoxidase produzierender *Fusarium* Stamm

Das Expressionssystem. Es soll getestet werden, ob *F. graminearum*, der Glukoseoxidase aus *A. niger* produziert, auf Weizen weiterhin virulent ist, oder ob es dem Pilz gelingt, der Pflanze eine Resistenz gegen den Befall zu vermitteln. Die Sekretion der Glukoseoxidase muss sehr genau reguliert werden, da einerseits kontinuierliche oder frühzeitige Produktion eine unerwünschte Stresssituation für den Pilz darstellen kann, andererseits aber die Wirkung dieses Enzyms gleichzeitig mit dem Infektionsprozess voll entfaltet werden muss. Der Promotor (regulatorische Sequenz) der Xylanase 1 (XYN1) aus dem Zelluloseabbauer *Trichoderma reesei* sollte für diese Zwecke besonders geeignet sein. Xylanasen sind in den Abbau von Pflanzenzellwänden involviert und die Regulation der Xylanase 1 wurde besonders genau studiert: unter nicht-induzierenden Bedingungen ist dieses Enzym nicht nachweisbar, *xyn1* kann jedoch durch Xylan- oder Xylosezugabe besonders stark induziert werden (4). Die regulatorische Sequenz des *xyn1* Gens aus *T. reesei* wurde vor das Glukoseoxidasegen und dessen Terminator aus *A. niger* kloniert und dieses Konstrukt soll in weiterer Folge als infektionsreguliertes Expressionssystem dienen. Als Selektionsmarker wurde mit einem Plasmid kotransformiert, das Resistenz gegen das Toxin Hygromycin vermittelt.



Abbildung 1: Expressionssystem zur Regulation der Glukoseoxidasebildung während der Infektion von Weizen durch *Fusarium*. *pxyn1* ist die regulatorische Sequenz von *xyn1* aus *T. reesei*, *goxA* bezeichnet das Glukoseoxidase kodierende Gen aus *A. niger* und *tgoxA* ist dessen Terminator.

Selektion von positiven Transformanten für weitere Experimente: In einem Schnelltest wurden die Transformanten auf Produktion von Glukoseoxidase in xylosehaltigem Medium gescreent. Die

Kulturüberstände von zwei der acht Stämme zeigten deutliche Enzymaktivität und die Integration einer Kopie des *goxA* Gens konnte im Southern Experiment nachgewiesen werden.

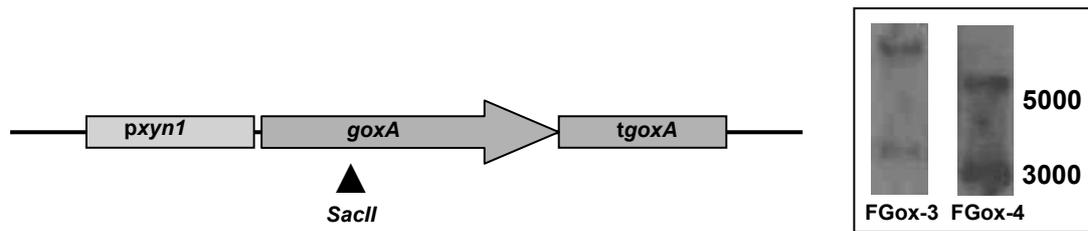


Abbildung 2: Southern Analyse der beiden Stämme, die positiv auf Glukoseoxidaseproduktion getestet wurden. Beide Stämme zeigen die Integration einer Kopie (2 Banden) des Expressionsvektors in ihr Genom.

Enzymproduktion unter verschiedenen Kulturbedingungen: Synthetisches Flüssigmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde mit Sporen beimpft und für 36 h im Schüttler vorkultiviert, dann auf Medium mit Glukose, Xylose, Glukose und Xylose und mit gemahlene Weizenähren transferiert. Nach 24 h wurde die Glukoseoxidaseaktivität im Kulturüberstand vermessen.

	WT [mU/ml]	FGox-3 [mU/ml]	FGox-4 [mU/ml]
G	ND	ND	ND
X	ND	30.1	38.4
G/X	ND	26.4	29.0
Weizenähren	75.5	122.3	109.9

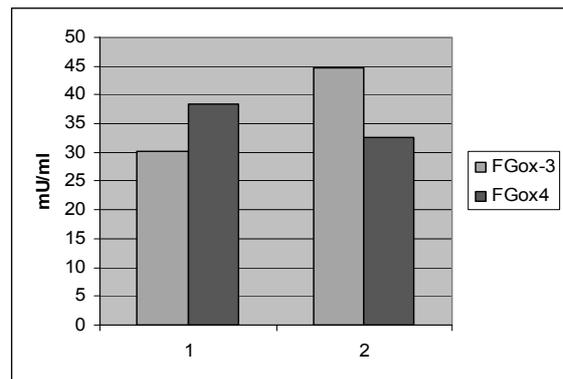


Abbildung 3: Die Tabelle zeigt die Glukoseoxidaseaktivitäten der Stämme WT (Wildtyp), FGox-3 und FGox-4 (Transformanten) auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen, wobei G Glukose, X Xylose und G/X die Kombination aus Glukose und Xylose ist. Die scheinbare Aktivität des Wildtyps auf Weizen stammt aus den Ähren selbst, da dieses Messverfahren oft unspezifische Signale detektiert. Weizenähren in Flüssigkeit ohne *Fusarium* zeigten eine Aktivität von 77,6 U/ml. Das Balkendiagramm rechts zeigt, dass die Enzymsekretion auf Ähren mit der auf Xylose vergleichbar ist. Die Werte auf Weizen sind abzüglich des Ährenleerwertes (77,6U/ml) angegeben.

Um sicher zu gehen, dass das Wachstum von *Fusarium* durch die Ausscheidung von Glukoseoxidase beziehungsweise durch anschließende Bildung von Wasserstoffperoxid nicht beeinträchtigt wird, wurden Wachstumsversuche auf Platten aus sythetischem Medium durchgeführt. Als Kohlenstoffquellen dienten dieselben vier, die auch für die Enzymmessungen in Flüssigkulturen verwendet wurden.

	WT	FGox-3	FGox-4
G	6.9	4.6	5.3
X	4.9	4.4	4.6
G/X	5.1	4.5	4.9
Weizen	6.3	5.9	5.8

Tabelle 1: Durchmesser der Kolonien nach drei Tagen Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Weder die Produktion von Glukoseoxidase noch die folgende Bildung von Wasserstoffperoxid (auf G/X und Weizenähren) konnten die transgenen Stämme signifikant inhibieren.

Künstliche Infektion von Weizen: Weizenähren wurden während der Blüte in mittlerer Höhe mit einer Suspension aus *Fusarium* Konidien inokuliert. Eine optische Bonitur zeigte keine Befallssymptome an Pflanzen, die mit den modifizierten Stämmen infiziert wurden. Um eine empfindlichere Aussage über den Infektionsverlauf der Glukoseoxidase produzierenden Stämme treffen zu können, muss die schwere des Befalls mittels real-time PCR quantifiziert werden. Reischer et al. (5) entwickelten ein TaqMan basiertes Verfahren zur Abschätzung der *Fusarium* Biomasse direkt aus den infizierten Pflanzen. Dieses Verfahren macht deutlich, dass die sich die Transformanten nicht auf den Ähren etablieren können, da die gemessene Biomasse nur der Menge der Inokulation entsprach.

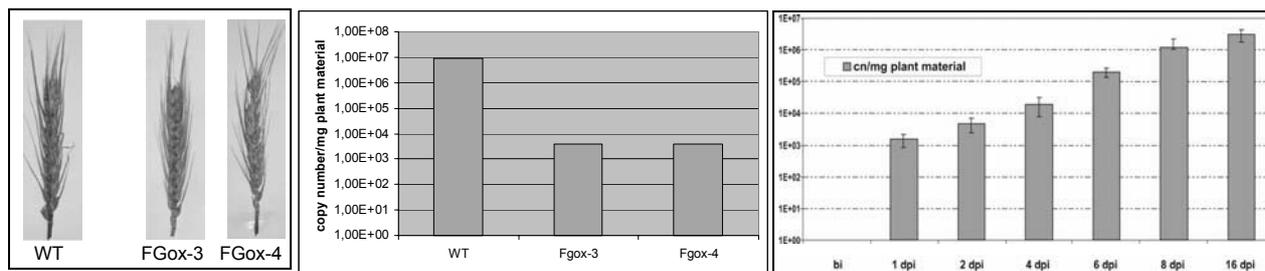


Abbildung 4: Künstlich infizierte Weizenähren. Links: Der Wildtyp verursacht deutliche Krankheitssymptome während die transgenen Stämme sich nicht sichtbar über die Ähre ausbreiten können. Mitte: Die Anzahl der gefundenen Kopien von *Fusarium* DNA in den infizierten Pflanzen. Die Menge der Transformanten DNA entspricht etwa der primären Inokulationsmenge (zum Vergleich: Das Diagramm rechts zeigt die Kopienanzahl von *Fusarium* DNA beim Infektionsverlauf durch den Wildtyp).

Die transgenen Stämme konnten in der Pflanze eine Resistenz induzieren. Um zu testen ob diese induzierte Resistenz lokaler oder systemischer Natur ist, wurden Ähren mit den Glukoseoxidaseproduzenten vorinokuliert (primäre Inokulation) und nach einer Stunde beziehungsweise zwei Tagen (sekundäre Inokulation) mit dem Wildtyp infiziert. In beiden Fällen konnte der Wildtyp problemlos über die gesamte Ähre ausbreiten.

Conclusio

Es ist gelungen, ein Expressionssystem für *F. graminearum* zu entwickeln, das die Expression von Genen bei Kontakt mit pflanzlichen Zellwänden (z.B. bei Infektion) erlaubt. Der Glukoseoxidase

positive Stamm zeigte deutliche Enzymaktivitäten bei Kultivierung in Medium mit Weizenähren und trotz produziertem Wasserstoffperoxid war sein Wachstum nicht signifikant reduziert. Dieser Stamm konnte sich bei künstlicher Inokulation nicht mehr über Weizenähren ausbreiten.

Referenzen

1. Zhou W, Kolb FL, Riechers DE. Identification of proteins induced or upregulated by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*. 2005 Oct;48(5):770-80.
2. Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*. 1995 Sep;7(9):1357-68.
3. Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, Woo SL, Lorito M, Kubicek CP, Mach RL. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jul;71(7):3959-65.
4. Rauscher R, Wurleitner E, Wacenovskiy C, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, Kubicek CP, Penttila M, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*. 2006 Mar;5(3):447-56.
5. Reischer GH, Lemmens M, Farnleitner A, Adler A, Mach RL. Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe. *J Microbiol Methods*. 2004 Oct;59(1):141-6. Erratum in: *J Microbiol Methods*. 2004 Dec;59(3):437.

Autoren:

Dr. Kurt BRUNNER, D. KASPER, Krista KÖLLNER und Dr. Robert L. MACH, Gene Technology Group, Research Area Gene Technology and Applied Biochemistry, Institute of Chemical Engineering, Vienna University of Technology.

Ao.Univ.Prof. Dr Marc LEMMENS, Biotechnology in Plant Production, Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.

Ao.Univ.Prof.DI Dr. Gerhard ADAM, Institute of Applied Genetics and Cell Biology, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, BOKU – University of Natural Resources and Applied Plant Sciences Vienna.

**Mykotoxin-Glucosid Bildung durch pflanzliche UDP-Glucosyltransferasen:
Genorganisation und Substratspezifität**

Formation of mycotoxin-glucosides by plant UDP-glucosyltransferases: gene organisation and substrate specificity

W. SCHWEIGER, F. BERTHILLER, BRIGITTE POPPENBERGER, R. MITTERBAUER, M. LEMMENS, R. SCHUMACHER, R. KRŠKA, & G. ADAM

Summary:

Plant pathogenic fungi of the genus *Fusarium* produce toxic metabolites (mycotoxins) that are potentially harmful for humans and animals consuming contaminated grain. Yet, the likely primary function of these substances is to play a role as fungal virulence factors that are phytotoxic or act more subtle to suppress the plant's defense responses. Plants can cope with this challenge and inactivate the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) by forming glucose-conjugates. We have cloned genes from the model plant *Arabidopsis thaliana* that encode UDP-glucosyltransferases (UGTs) with the ability to detoxify DON and ZON to the respective glucosides. The cloned genes are highly similar in sequence, yet heterologous expression in yeast indicated contrasting substrate specificity. To learn more about specificity determinants we have constructed and analyzed the products of hybrid genes. The implications of the genome organisation and the potential role of UGTs in plant pathogen interaction and plant breeding are discussed.

Keywords: deoxynivalenol-3-O-glucoside, zearalenone-4-O-glucoside

Zusammenfassung:

Pflanzenpathogene Pilze der Gattung *Fusarium* produzieren toxische Metaboliten (Mykotoxine), die für Tier und Mensch bei Verzehr von kontaminiertem Getreide ein Gesundheitsrisiko darstellen. Es ist anzunehmen, dass diese Substanzen Virulenzfaktoren des Pilzes sind, die entweder offensichtlich phytotoxisch wirken oder auf subtilere Weise die Pathogenabwehr der Pflanze negativ beeinflussen. Pflanzen können auf diese Herausforderung reagieren, indem sie die *Fusarium*-Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) durch Bildung von Glucose-Konjugaten inaktivieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte Gene der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* klonieren, die für UDP-Glucosyltransferasen (UGTs) kodieren, welche die enzymatische Bildung von DON-Glucosid bzw. ZON-Glucosid katalysieren können. Die klonierten Gene sind sehr ähnlich in ihrer Sequenz, die in Hefe exprimierten Proteine weisen dennoch stark unterschiedliche Substratspezifität auf. Um mehr über die für die Substratspezifitätsdeterminanten herauszufinden, wurden Hybridgene hergestellt und die Eigenschaften der resultierenden Proteine analysiert. Die Schlussfolgerungen über die mögliche Rolle der UGTs in der Pflanze-Pathogen Interaktion und Relevanz für die Pflanzenzüchtung werden diskutiert.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol-3-O-Glucosid, Zearalenon-4-O-Glucosid

Einleitung:

Die Glucoside von DON und ZON kommen in natürlich durch *Fusarium* infiziertem Getreide und Mais neben den jeweiligen Toxinen vor (Berthiller et al., 2005; Schneewis et al., 2002). Gegenwärtig finden sich zwar nur relativ geringe Mengen an Glucosiden in den Pflanzen (etwa 10-20 % des Mykotoxins, selten auch mehr), dies könnte sich jedoch durch pflanzenzüchterische Maßnahmen ändern. Die Glucosekonjugate werden im Verdauungstrakt von Mensch und Tier höchstwahrscheinlich hydrolysiert und damit die Mykotoxine reaktiviert. Diese "maskierten Mykotoxine" werden durch konventionelle analytische Methoden nicht erfasst, sind aber möglicherweise gesundheitlich relevant (siehe Betrag Berthiller et al. in diesem Heft). Aus der Sicht der Pflanze ist beispielsweise die Bildung von DON-3-O-Glucosid (D3G) eine Neutralisierung des Virulenzfaktors DON, da D3G nicht mehr am Ribosom angreifen und somit die Proteinbiosynthese nicht mehr blockieren kann (Poppenberger et al, 2003). Es zeigte sich, dass der Chromosomenabschnitt in Weizen, der den stärksten bisher gefundenen Resistenz-Beitrag liefert (QTL: Qfhs.ndsu-3BS aus Sumai 3) mit der Eigenschaft zusammenfällt, in hohem Ausmaß DON in D3G umwandeln zu können. Dieser QTL wird von Züchtern derzeit stark verwendet, und es ist anzunehmen, dass resistenterere Sorten mit diesem QTL (nach viel stärkerem Infektionsdruck) bei gleich hohem DON Gehalt zusätzlich einen höheren D3G Gehalt aufweisen. Bei ZON ist die Rolle als Virulenzfaktor weniger klar, jedoch deutet die genomweite Expressionsanalyse in *Arabidopsis* (mittels Affymetrix-Gen Chip) darauf hin, dass ZON einen reprimierenden Einfluss auf Gene der Zellwandbiosynthese hat (Werner, 2005). *Arabidopsis* ist jedoch in der Lage ZON rasch zu Glucosiden und weiteren Konjugaten zu metabolisieren (Berthiller et al., 2006). Wir konnten *Arabidopsis* Gene identifizieren, die für DON und ZON inaktivierende Glucosyltransferasen kodieren (Poppenberger et al., 2003; Poppenberger et al., 2006).

Ergebnisse und Diskussion:

Die identifizierten DON und ZON inaktivierenden UGTs sind Mitglieder einer sehr großen Genfamilie. Im *Arabidopsis* Genom kommen mehr als 100 Gene vor, die für Enzyme weitgehend unbekannter Substratspezifität kodieren (zur Übersicht siehe: Bowles et al., 2006). Von uns wurden geclustert vorliegenden Gene der Gruppe UGT73C analysiert, indem die entsprechenden Proteine in Hefe exprimiert wurden.

Dieser Gencluster ist vermutlich durch Duplikationen entstanden, in Abb. 1 ist eine schematische Darstellung des auf Sequenzähnlichkeit beruhenden Stammbaumes zu finden. Trotz der hohen Ähnlichkeit weisen die einzelnen Enzyme teilweise überlappende jedoch unterschiedliche Substratspezifität bzw. Affinität gegen die Mykotoxine DON und ZON auf. Das ursprünglich als DON-Resistenzgen isolierte UGT73C5 (*DOG1*, Poppenberger et al., 2003) kann sowohl DON als auch ZON in hoher Affinität konjugieren. Während UGT73C4 noch stärker DON Resistenz als C5 vermittelt, kann C4 bei Konzentrationen > 4 µg/l ZON nicht mehr vollständig glucosylieren und somit die Bindung von ZON an den Östrogenrezeptor verhindern (Poppenberger et al, 2006), während umgekehrt C6 mit DON inaktiv und mit ZON sehr aktiv ist (Abb. 1).

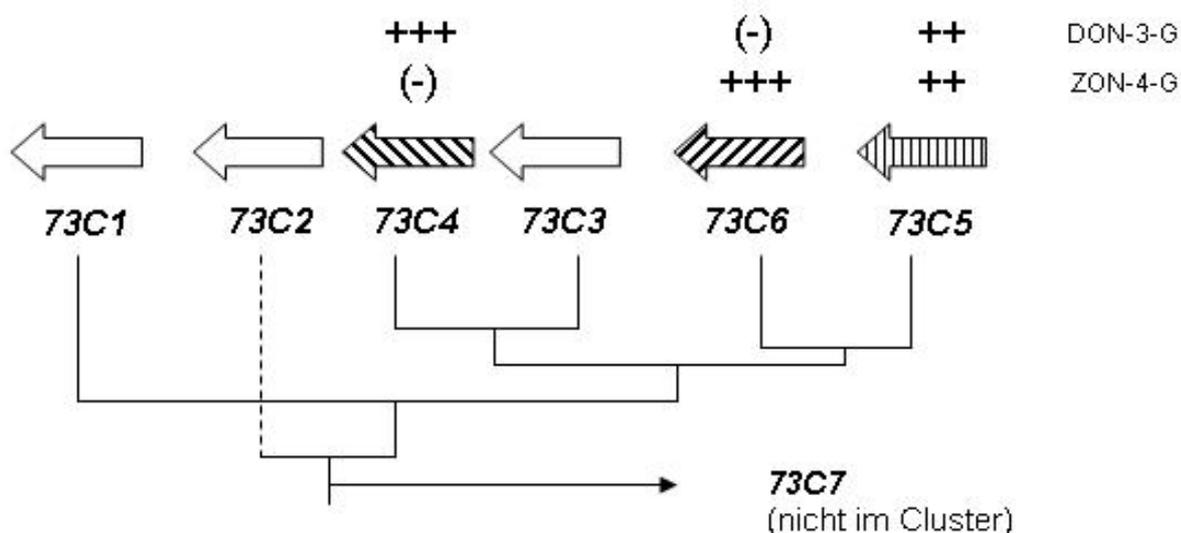


Abbildung 1: Schematische Darstellung der UGT73C Gene im Gencluster und der aus den Sequenzunterschieden abgeleitete Stammbaum. Oberhalb der Gene ist die Fähigkeit der von den Genen kodierten UGTs angegeben, aus DON und ZON die Glucoside DON-3-O-Glucosid bzw. ZON-4-O-Glucosid zu bilden.

Um herauszufinden welche Aminosäureunterschiede in den sehr ähnlichen Proteinen für die Unterschiede in der Substratspezifität verantwortlich sind, wurden Hybridproteine zwischen UGT73C4 und UGT73C6 hergestellt, insbesondere solche, die sich im jeweiligen Anteil der N-terminalen Bereiche unterscheiden (Diplomarbeit Schweiger). Die biochemische Charakterisierung dieser Proteine ist noch nicht abgeschlossen. Die bisherigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die N-terminale Hälfte weitgehend für die Substratspezifität verantwortlich ist, es jedoch in den Hybridproteinen häufig zu einem Verlust an Affinität und auch Spezifität kommt. Manche Hybride sind beispielsweise zwar bei hohen ZON-Konzentrationen (ppm Bereich) aktiv, bilden jedoch neben ZON-4-O-Glucosid auch ein anderes Glucosid als Nebenreaktion (Struktur noch nicht verifiziert). Insgesamt drängt sich die Vermutung auf, dass UGTs in Pflanzen nicht nur eine Rolle bei der Konjugation endogener Metaboliten haben, sondern durchaus rasch durch Genamplifikation, Mutation und diversifizierende Selektion und möglicherweise auch durch Rekombination zwischen verschiedenen UGT Genen, neue Detoxifikationsfunktionen gegenüber Xenobiotika (z.B. Pilzgifte) entwickeln können. Es ist daher anzunehmen, dass Glucosyltransferasen wichtig für die Pflanze-Pathogen Interaktion sind und UGTs somit als Kandidatengene relevant für die Pflanzenzüchtung sind.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Österreichischen Genomforschungsprogramm (GEN-AU) des BM:BWK, der Akademie der Wissenschaften (DOC Stipendium B.P.) und der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

- Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R (2005) Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3421-3425.
- Berthiller F, Werner U, Sulyok M, Krska R, Hauser MT, Schuhmacher R (2006) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit. Contam.* **23**: 1194-1200.
- Bowles D, Lim EK, Poppenberger B, Vaistij FE (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu Rev Plant Biol.* **57**: 567-597.
- Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Adam G, Buerstmayr H, Mesterhazy A, Krska R, Ruckenbauer P (2005) The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 1318-1324.
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glossl J, Luschnig C, Adam G (2003) Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**: 47905-47914.
- Poppenberger B, Berthiller F, Bachmann H, Lucyshyn D, Peterbauer C, Mitterbauer R, Schuhmacher R, Krska R, Glossl J, Adam G (2006) Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4404-4410.
- Schneweis I, Meyer K, Engelhardt G, Bauer J. (2002) Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat. *J Agric Food Chem.* **50**: 1736-1738.
- Werner, U. (2005) characterization of the effect of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation Universität für Bodenkultur, Wien.

Autoren:

Wolfgang SCHWEIGER, Dr. Brigitte POPPENBERGER*, Dr. Rudolf MITTERBAUER 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, A-1190 Wien (*Max F. Perutz Laboratories, Univ. Wien, Dr. Bohrgasse 9, A-1030 Wien)

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

Ao. Univ. Prof. Dr. Marc LEMMENS; Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion; Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Modellstudien zur Hydrolyse von Deoxynivalenol-3-O-Glucosid im Magen-Darm-Trakt

Model studies regarding the hydrolysis of deoxynivalenol-3-O-glucoside in the gastrointestinal tract

F. BERTHILLER, K.J. DOMIG, W. KNEIFL, NATHALIE JUGE, M. SULYOK, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA &
G. ADAM

Summary:

Mycotoxin glucosides formed by plants escape routine detection and have the potential to be reactivated in the digestive tract of animals and humans. The aim of our preliminary studies was to test whether deoxynivalenol-3-O-glucoside (D3G) is a "masked mycotoxin" by determination of its hydrolysis susceptibility to acidic pH, hydrolytic enzymes and intestinal bacteria. D3G, as also observed for zearalenone-4-O-glucoside (Z4G), showed high stability to acidic conditions down to a pH value of 0.7. The hydrolysis of those substances in the stomach of mammals is therefore unlikely. Although the human and plant α -glucosidases had no hydrolytic effect, cellulase could partially hydrolyse D3G. In addition, several bacterial strains such as *Enterococcus durans*, *E. mundtii* and *Lactobacillus plantarum* showed the capacity to hydrolyse D3G to deoxynivalenol (DON). We conclude that D3G should be regarded as a potential masked mycotoxin, and animal feeding studies should be undertaken to determine the exact physiological relevance.

Keywords: deoxynivalenol-3-O-glucoside, deoxynivalenol, hydrolysis, digestion

Zusammenfassung:

In Pflanzen gebildete Mykotoxin-Glucoside werden durch gängige Analysemethoden nicht erfasst, werden jedoch möglicherweise im Magen-Darmtrakt von Mensch und Tier gespalten und die Mykotoxine somit reaktiviert. Ziel dieser vorläufigen Untersuchungen war es zu testen, ob Deoxynivalenol-3-O-Glucosid (D3G) ein „maskiertes Mykotoxin“ ist. Modellversuche sollten die Hydrolysierbarkeit von D3G durch Säuren, hydrolytische Enzyme und Darmbakterien klären. Wie auch Zearalenon-4-O-Glucosid (Z4G) zeigt D3G sehr hohe Stabilität gegenüber sauren Bedingungen bis pH 0.7, wodurch eine Hydrolyse der Substanzen zu den freien Mykotoxinen im Magen von Säugetieren unwahrscheinlich ist. Die eingesetzten menschlichen und pflanzlichen α -Glucosidasen konnten D3G nicht spalten, allerdings zeigte Cellulase eine partielle hydrolytische Wirkung. Einige Bakterienstämme, wie z.B. *Enterococcus durans*, *E. mundtii* oder *Lactobacillus plantarum* sind imstande D3G zu Deoxynivalenol (DON) zu hydrolysieren. D3G sollte daher als potentiell maskiertes Mykotoxin betrachtet werden, dessen physiologische Relevanz jedoch im Tierversuch zu testen sein wird.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol-3-O-Glucosid, Deoxynivalenol, Hydrolyse, Verdauung

Einleitung:

D3G wird durch pflanzliche UDP-Glucosyltransferasen aus DON gebildet und ist wenigstens für Pflanzen weit weniger toxisch als DON (Poppenberger et al., 2003). Dieser Umstand führt auch dazu, dass Weizensorten, welche in der Lage sind DON in erhöhtem Ausmaß zu glucosylieren, resistenter gegen Fusarienpilze sind als andere Sorten (Lemmens et al., 2005). In allen bisher von uns auf DON und D3G untersuchten Weizen- und Maisproben konnten bei entsprechend hohen DON-Konzentrationen von >100 µg/kg auch D3G nachgewiesen werden (Berthiller et al., 2005). Es konnten hierbei D3G-Werte von bis zu 12% des DON-Gehaltes in Weizen und bis zu 50% des DON-Gehaltes in Mais bestimmt werden. Ein anderes konjugiertes Mykotoxin, Z4G, wird bei der Verdauung von Schweinen vollständig zum freien Zearalenon (ZON) gespalten (Gareis et al., 1990). In den nachfolgend beschriebenen Versuchen sollte geklärt werden, in wie weit D3G gegenüber saurer, enzymatischer und bakterieller Hydrolyse zugänglich ist.

Durchführung:

Saure Hydrolyse von konjugierten Mykotoxinen

Jeweils 25 µg D3G und Z4G sowie DON, ZON und reines Wasser als Kontrollen wurden in je 3 Wiederholungen bei 37°C für 3 h bzw. über Nacht bei konstantem Überkopf-Schütteln (30 rpm) inkubiert. Folgende Ansätze wurden hierbei verwendet: 1a) Wasser (Kontrolle, pH-Wert ca. 7.0), 1b) künstlicher Magensaft mit Pepsin (pH-Wert ca. 1.7), 1c) 0.02N HCl (pH-Wert ca. 1.7) und 1d) 0.2N HCl (pH-Wert ca. 0.7). Wie auch bei den folgenden Experimenten erfolgte die Analyse von DON und D3G (Berthiller et al., 2005) bzw. von ZON und Z4G (Berthiller et al., 2006) mittels LC-MS/MS nach Zugabe von einem Aliquot Methanol/Wasser (1/1, v/v). Die Freisetzung von DON bzw. ZON aus den glucosylierten Verbindungen wurde zur Bestimmung der Hydrolyserate herangezogen.

Enzymatische Hydrolyse von konjugierten Mykotoxinen

Jeweils 25 µg D3G und Z4G sowie DON, ZON und reines Wasser als Kontrollen wurden in je 3 Wiederholungen bei 37°C für 3h bzw. über Nacht bei konstantem Überkopf-Schütteln (30 rpm) inkubiert. Folgende Ansätze wurden hierbei verwendet: 2a) Wasser (Kontrolle), 2b) künstlicher Darmsaft mit Pankreatin (4000 U Lipase, 2500 U Protease, 160 U Amylase, pH-Wert 8.0), 2c) β-Glucosidase aus Mandeln (10 U, pH-Wert 5.0), 2d) β-Glucuronidase aus Weinbergschnecken (100 U, pH-Wert 5.0) und 2e) Cellulase aus *Trichoderma* (10 U, pH-Wert 5.0).

Hydrolyse von D3G durch humane β-Glucosidase

Rekombinante humane cytosolische β-Glucosidase (1 mU, pH-Wert 6.0) wurde in 3 Wiederholungen zu 23 µg D3G sowie DON und reinem Wasser als Negativkontrollen gegeben. Sofort

nach Zugabe, bzw. nach 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 Minuten und über Nacht wurde die Reaktion nach Zugabe von einem Aliquot Methanol/Wasser (1/1, v/v) durch Einfrieren der Ansätze gestoppt.

Bakterielle Hydrolyse von D3G

Zu 0.375 µg D3G in 15 µl SM Puffer wurden 135 µl Suspensionen der folgenden Bakterienstämme (OD₆₀₀ etwa 2.0) hinzugefügt und für 4h, 8h und über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Verwendet wurden Typstämme und Isolate von *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus mundtii*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*. Nach dem Abzentrifugieren wurde 1 Aliquot Überstand zu 2 Aliquoten Ethanol gegeben und eingefroren. Vor der Analyse mit LC-MS/MS wurde die ethanoli-sche Lösung mit Stickstoff abgeblasen und in reinem Wasser aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion:

Saure Hydrolyse von konjugierten Mykotoxinen

Im nüchternen menschlichen Magen herrschen pH-Werte von etwa 1.7 bis 2.3, im vollen Magen etwa von pH 3.0-4.0. Es wurden mit dem künstlichen Magensaft sowie mit der 0.02 N HCl (pH 1.7) Bedingungen geschaffen, die im Extremfall auch natürlich vorliegen. Mit 0.2 N HCl (pH 0.7) wurde absichtlich eine 10x höhere Konzentration gewählt als natürlich vorliegt. Weder nach 3 h noch über Nacht konnte bei 37°C Abbau von D3G oder Z4G festgestellt werden (<0.2%). Es ist also äußerst unwahrscheinlich, dass unter natürlichen Bedingungen im Magen von Säugetieren DON (bzw. ZON) aus den glucosylierten Formen freigesetzt werden kann.

Enzymatische Hydrolyse von konjugierten Mykotoxinen

Der künstliche Darmsaft und die α -Glucosidase aus Mandeln zeigten keinen Effekt auf D3G. Durch α -Glucuronidase im hohen Überschuss konnten geringe Mengen (einige Prozent) an DON freigesetzt werden. Dies lässt sich mit einer gewissen Nebenaktivität der Enzympräparation gegenüber Glucosiden gut erklären, hat aber keine Relevanz für die Lebensmittelsicherheit von Säugetieren. Die höchste Ausbeute an DON (bis zu 15% des eingesetzten D3G) konnte nach Behandlung mit Cellulase festgestellt werden. Es ist unklar, ob diese Aktivität durch Verunreinigungen mit anderen β -Glucosidasen von *Trichoderma* hervorgerufen wird oder von Cellulase selbst. Ist letzteres der Fall könnte man vermuten, dass D3G von Cellulose-verwertenden Wiederkäuern leichter in DON gespalten werden könnte.

Z4G wurde besser gespalten als D3G. Während sogar schon im künstlichen Darmsaft geringe Aktivität (einige Prozent) festgestellt werden konnten (Kreuzreaktivität von Amylase?), wurden bis zu 30% ZON nach Behandlung durch Mandel α -Glucosidase gefunden. Unter den hier angewen-

deten experimentelle Bedingungen spalteten sowohl β -Glucuronidase Präparationen aus *Helix pomatia* als auch Cellulase Z4G vollständig.

Hydrolyse von D3G durch humane β -Glucosidase

Humane cytosolische β -Glucosidase (hCBG) kommt in menschlicher Leber, Niere, Milz und im Darm vor (Berrin et al., 2002). hCBG spielt eine wesentliche Rolle bei der Hydrolyse von pflanzlichen Glucosiden, wie Isoflavonen, Flavonolen, Flavonen, Flavanonen oder cyanogenen Glycosiden wie Amygdalin. Daneben gibt es auch eine Reihe von Glucosiden, die nicht durch hCBG gespalten werden können. Vor allem die Glucosylierungsstelle spielt hier eine entscheidende Rolle, da z.B. Quercetin-3-Glucosid im Gegensatz zu Quercetin-7-Glucosid nicht gespalten wird. Bei D3G konnte ebenfalls keine Aktivität von rekombinanter, in *Pichia pastoris* exprimierter, hCBG festgestellt werden. Es scheint also, dass der Mensch selbst keine Enzyme bilden kann, die in der Lage wären, die Hydrolyse von D3G zu DON zu katalysieren.

Bakterielle Hydrolyse von D3G

Verschiedene Isolate von darmrelevanten Keimen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur D3G Hydrolyse untersucht. *B. bifidum*, *B. longum*, *C. freundii*, *E. avium*, *E. coli*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* zeigten keine Hydrolyseaktivität gegenüber D3G. *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, setzten nur geringe Mengen an DON (einige Prozent) aus D3G frei. Vor allem *E. cloacae*, *E. durans*, *E. faecium* und *E. mundtii*, aber auch *L. plantarum* und *B. adolescentis*, waren in der Lage D3G partiell (bis zu 50% über Nacht) zu DON zu spalten.

Einige im (menschlichen) Darm vorkommende Bakterien können also D3G zu DON hydrolysieren. Unter Laborbedingungen gelang selbst bei langen Verweilzeiten (20 h) nur partielle Hydrolyse, allerdings kann man daraus nur schwer abschätzen, wie viel DON der jeweilige Säuger freisetzen kann. Die Dichte der Keime im Darm ist wesentlich höher als in den *in vitro* Tests, allerdings liegen dort komplexe Mischungen und Matrixeinflüsse vor. Die Spezies-spezifische oder individuelle Mikroflora des Darms könnte somit für die Toxizität von D3G (nach Hydrolyse zu DON) höchst relevant sein. Zur Klärung der physiologischen Relevanz sollten daher Tierversuche über die Bioverfügbarkeit und die potentielle Hydrolyse von D3G durchgeführt werden.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Österreichischen Genomforschungsprogramm (GEN-AU) des BM:BWK, dem FWF, der Christian Doppler Forschungsgesellschaft und der Niederösterreichischen Landesregierung (Technopol Tulln) für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Berrin J.G., McLauchlan R., Needs P., Williamson G., Puigserver A., Kroon P. & Juge N., 2002. Functional expression of human liver cytosolic α -glucosidase in *Pichia pastoris*: Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides, *Eur J Biochem* **269**, 249-258.

Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G. & Krska R., 2005. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* **53**, 3421-3425.

Berthiller F., Werner U., Sulyok M., Krska R., Hauser M.T., Schuhmacher R., 2006. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit Contam* **23** (11), 1194-1200.

Gareis M., Bauer J., Thiem J., Plank G., Grabley S. & Gedek B., 1990. Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *J Vet Med* **37**, 236-240.

Lemmens M., Scholz U., Berthiller F., Koutnik A., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Adam G., Mesterhazy A., Krska R., Buerstmayr H. & Ruckenbauer P., 2005. A major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat is correlated with the ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1318-1324.

Poppenberger B., Berthiller F., Lucyshyn D., Sieberer T., Schuhmacher R., Krska R., Kuchler K., Glössl J., Luschnig C. & Adam G., 2003. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278** (48), 47905-47914.

Autoren:

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

Dr. Konrad J. DOMIG und Univ. Prof. Dr. Wolfgang KNEIFEL, Abteilung für Lebensmittel-mikrobiologie und -hygiene, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Universität für Bodenkultur Wien, Gregor Mendel Straße 33, A-1180 Wien

Dr. Nathalie JUGE, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney Lane, NR4 7UA, UK

Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien

Entwicklung eines auf Hefe basierenden in vivo Testsystems für UDP-Glucuronosyltransferasen hinsichtlich der Fähigkeit zur Detoxifikation von *Fusarium*-Mykotoxinen

Development of a yeast based expression system to test detoxification properties of mammalian UDP-glucuronosyl transferases with respect to Fusarium mycotoxins

W. SCHWEIGER, F. BERTHILLER, W. BICKER, R. SCHUMACHER, R. MITTERBAUER
& G. ADAM

Summary:

During the infection of small grain cereals and maize the fungus *Fusarium graminearum* produces the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON). The ingested mycotoxins can be inactivated in animals and humans by formation of mycotoxin-conjugates and subsequently excreted via urine. In mammals the formation of glucuronides is the main detoxification mechanism. It is unknown, which of the large number of genes encoding mammalian UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are relevant for DON and ZON detoxification. Here we report first results of our attempts to express human UGTs and to engineer the pathway for production of the co-substrate UDP-glucuronic acid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in order to develop a tool to functionally test the properties of individual UGT genes with respect to *Fusarium* mycotoxin detoxification.

Keywords: zearalenone (ZON), UDP-glucuronic acid, UDP-glucuronosyltransferase (UGT)

Zusammenfassung:

Während des Befalls von Getreide und Mais produziert der Pilz *Fusarium graminearum* die Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON). Die mit der Nahrung bzw. mit dem Futter aufgenommenen Mykotoxine können in Mensch und Tier durch die Bildung von Konjugaten inaktiviert und über den Urin ausgeschieden werden. In Säugern ist die Bildung von Glucuroniden der wesentlichste Entgiftungsmechanismus. Es ist gegenwärtig unbekannt welche der Gene, die für die vielen verschiedenen Formen von UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) kodieren, für die Detoxifikation von DON und ZON relevant sind. In dieser Arbeit werden die ersten Ergebnisse unserer Versuche berichtet, durch Expression von UGT-Genen und Hinzufügen des Biosyntheseweges für UDP-Glucuronsäure in Hefe ein Werkzeug für funktionelle Tests der Detoxifikationseigenschaften zu entwickeln.

Schlüsselwörter: Zearalenon (ZON), UDP-Glucuronsäure, UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)

Einleitung:

UDP-Glucuronosyltransferasen sind Enzyme, die mit Hilfe des aktivierten Co-Substrates UDP-Glucuronsäure ein Konjugat zwischen Glucuronsäure und einer OH-Gruppe des Substrates katalysieren (UDP-Glucuronat + Acceptor => UDP + beta-D-Glucuronosid). Im Gegensatz zu den löslichen, im Cytosol von Pflanzen vorkommenden UDP-Glucosyltransferasen, welche die Bildung von Glucose-Konjugaten bewirken, sind die tierischen UDP-Glucuronosyltransferasen mit einer C-terminalen Transmembran-Domäne ausgestattet. Der katalytisch aktive N-Terminus befindet sich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums.

Aufgrund der Sequenzierung des menschlichen Genoms hat man heute einen guten Überblick über die Genfamilie der UDP-Glucuronosyltransferasen. Die bekannten 33 humanen Glucuronosyltransferasen teilen sich in zwei Gruppen, welche sich evolutionär unterschiedlich entwickelt haben (Zur Übersicht siehe: Bock, 2003). Die UGT1 Familie besteht aus 10 Genen, die sich alle auf einem 200 Kilobasen langen DNA-Abschnitt auf Chromosom 2q37 befinden. Der C-terminale Teil der verschiedenen UGT1 Proteine ist bei allen Enzymen gleich und wird durch die gemeinsamen Exons 2-5 am 3' Ende des Abschnitts kodiert. Die unterschiedlichen Exons 1 kodieren die N-terminalen Bereiche und stehen unter der Kontrolle individueller Promotoren, die von verschiedenen Substanzen unterschiedlich induzierbar sind. Die Exons 1 sind hintereinander angeordnet und werden bei der Transkription durch alternatives Splicing mit den C-terminalen Exons verbunden. Diese Abschnitte der UGTs sind für die Erkennung verschiedener Substrate verantwortlich. Sie sind stark evolutionären Prozessen unterworfen und zwischen Mensch und Tieren recht unterschiedlich. Im Gegensatz dazu sind die Gene der UGT2 Familie als Ganzes amplifiziert (haben jeweils eigene C-terminale Exons). Auch die UGT2 Gene liegen weitgehend in Genclustern vor.

Die UGTs sind wesentlich für den chemischen Rüstungswettlauf zwischen Pflanzenfressern und Pflanzen. Für den Fraßfeind toxische Pflanzeninhaltsstoffe können mit Hilfe der UGTs entgiftet werden. Da Mykotoxin-Glucuronide als Metaboliten bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass Unterschiede in der DNA-Sequenz oder in der Expressionshöhe für unterschiedliche Resistenzen zwischen verschiedenen menschlichen Individuen, Tierarten und Nutztierassen verantwortlich sind.

Projektziel, Ergebnisse und Diskussion:

Ziel des Projektes ist es, menschliche bzw. tierische UGT-Gene in Hefe funktionell zu testen. Im Idealfall sollte ein in Hefe exprimiertes UGT Gen beispielsweise zur Detoxifikation von Deoxynivalenol (DON) führen, was sich durch unterschiedliche Resistenz gegen Wachstums-Hemmung durch DON phänotypisch äußert. Hefe wurde deshalb gewählt, weil dieser Organismus molekularbiologisch leicht manipulierbar ist und selbst keine Detoxifikationsgene besitzt (bzw. diese, wie im Fall der Acetyltransferase *AYT1* durch Gendisruption entfernt wurden).

Allerdings ist unser Expressionswirt, die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht imstande das UGT Co-substrat UDP-Glucuronsäure zu bilden. Der erste Teil dieses Projekts befasst sich also damit, den Biosyntheseweg dafür in Hefe neu einzuführen. Dazu wurde eine humane UDP-Glucose-Dehydrogenase (UGDH) cDNA exprimiert, die unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promoters steht. Erste Ergebnisse mittels LC-MS zeigten, dass einen Großteil der in der Hefe vorkommenden UDP-Glucose in UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcUA) metabolisiert wird. Die verbleibenden 10 bis 20 Prozent des UDP-Glucose Pools sind jedoch offensichtlich noch hinreichend für normales Hefewachstum.

Der nächste Schritt ist nun, in einem Hefestamm der das Co-substrat bildet auch eine UGT zu exprimieren, die imstande ist Mykotoxinkonjugate zu bilden. Als Vorversuche zur Auswahl eines geeigneten Gens wurden daher *in vitro* Experimente mit einer kommerziell erhältlichen UGT Präparation von UGT1A7 durchgeführt. Das Enzym metabolisiert im Reagenzglas bis zu 12 Prozent der zugegebenen 10 ppm ZON in den fünf Stunden Inkubationszeit. Längere Inkubationszeiten führten nicht zu weiterer Akkumulation des Glycosids, erneute Zugabe von Enzym oder UDP-GlcUA konnte die Produktbildung um bis zu 60 Prozent steigern. Die Bildung von DON-Glucuronid konnte in einem analogen Versuchsaufbau mit DON und UGT1A7 nicht festgestellt werden.

In vitro Tests mit einer Palette von UGTs und verschiedene Substraten wiesen UGT1A7 und UGT1A10 als die aktivsten Enzyme aus (Basu *et al*, 2004). In einem ersten Schritt sollten daher erst diese beiden Gene kloniert werden. Ein cDNA Klon von UGT1A10 diente zu Klonierung der gemeinsamen C-terminalen Exons 2-5. Mit Hilfe einer stillen Mutation am 5' Ende von Exon 2 wurde eine *HindIII* Restriktionsschnittstelle eingefügt, die für die Insertion der unterschiedlichen N-terminalen Teile verwendet werden kann. Diese wurden aus human genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Die vollständigen cDNAs der Gene wurden dann in einen Hefeexpressionsvektor transferiert.

Unser nächster Schritt ist nun beiden Gene, UGDH und eine der UGTs, in Hefe zu exprimieren. Werden diese neuen Stämme mit ZON gefüttert, sollte das zur Bildung von ZON-Glucuronid führen. Probleme könnte dabei der Transport des Co-substrats UDP-Glucuronsäure in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums machen. Bisläng ist unbekannt, ob die Substanz in ausreichenden Mengen aus dem Cytosol eingeschleust werden kann. Möglicherweise benötigt ein voll funktionsfähiges System noch ein drittes heterolog exprimiertes Gen, welches für den entsprechenden Transporter kodiert.

Das Hefe-Expressionssystem soll zukünftig dabei helfen, das Potential von UGTs und ihrer allelischen Formen zur Entgiftung von Mykotoxinen zu bestimmen. Darüberhinaus könnte sich, ähnlich wie bei der Expression von pflanzlichen Glucosyltransferasen (Poppenberger *et al*, 2006)

ein zusätzlicher Nutzen ergeben, falls die modifizierten Hefen effizient Mykotoxin-Glucuronide produzieren, die als Standards bisher nicht verfügbar sind.

Literatur:

Basu NK, Ciotti M, Hwang MS, Kole L, Mitra PS, Cho JW, Owens IS (2004) Differential and special properties of the major human UGT1-encoded gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferases enhance potential to control chemical uptake. *J Biol Chem.* **279**: 1429-1441

Bock KW (2003) Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 691-696

Poppenberger B, Berthiller F, Bachmann H, Lucyshyn D, Peterbauer C, Mitterbauer R, Schuhmacher R, Krska R, Glossl J, Adam G. (2006) Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4404-10.

Danksagung:

Diese Arbeiten wurden mit Mitteln des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF Translational Research L255-B11) und der Christian Doppler Gesellschaft durchgeführt.

Autoren:

Wolfgang SCHWEIGER und Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Muthgasse 18, A-1190 Wien;

Dr. Franz BERTHILLER, Dr. Wolfgang BICKER, und Dr. Rainer SCHUHMACHER Analytikzentrum und Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Untersuchungen zu *Fusarium* spp. und Fumonisin-Kontaminationen an Spargel (*Asparagus officinalis*)

*Occurrence of Fusarium proliferatum and contamination with Fumonisin B₁ in asparagus spears
concerning the product quality*

MONIKA GOSSMANN, FRANZISKA BERAN, ASTRID PLENK, G. BEDLAN, ST. HAMEDINGER,
R. ÖHLINGER, H.-U. HUMPF & CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

2003 und 2004 wurden in fünf österreichischen Ertragsanlagen zur Haupterntezeit ca. 800 Spargelstangen auf Pilzkontaminationen, insbesondere mit *Fusarium* spp. untersucht. Die Befallshäufigkeit in den untersuchten Gewebestücken aus den Spargelstangen mit *Fusarium* spp. variierte stark in Abhängigkeit von Standort und Zeitpunkt der Probennahme. Dominierende *Fusarium*-Art bei der endophytischen Besiedlung der Spargelstangen war *Fusarium oxysporum*. Weitere, häufig auftretende Arten waren *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. equiseti*. Die Befallshäufigkeit (BH) mit *F. proliferatum* lag bei drei von fünf Standorten bei weniger als 10%. Auf den beiden anderen Standorten wurde *F. proliferatum* in BH von 20% bis zu 40% der untersuchten Stangen gefunden. 110 *Fusarium proliferatum*-infizierte Spargelstangen wurden mittels IAS-HPLC bzw. LC-ESI-MS auf den Gehalt an Fumonisin B₁ detektiert. Der Befund geringer FB₁-Werte, zwischen 10 und 50 µg/kg pro Trockengewicht Einzelstange in den untersuchten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen, sowohl in 2003, als auch in 2004, lässt keine eindeutige Erklärung zu. Ebenso Untersuchungen zur Wirt-Pathogen-Interaktion und den möglichen phänotypischen bzw. genotypischen Einflussfaktoren müssen weiter verfolgt werden, um die Bedeutung der Toxinbildung in der Pathogenese von *F. proliferatum* bei Spargel zu verstehen.

Schlüsselwörter: Spargel, *Fusarium* spp., Fumonisin B₁

Einleitung

Die Gesunderhaltung von Spargelpflanzen und die Sicherung der Erntequalität ist ein wichtiger Aspekt beim Anbau dieser mehrjährigen Gemüsebaukultur. Infektionen mit bodenbürtigen *Fusarium* spp., darunter *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. redolens* und *F. subglutinans*, führen an Spargel weltweit zu wirtschaftlich bedeutsamen Schädigungen im Wurzel-, Kronen- und Stängelbereich [1]. Dies bestätigten auch eigene 2001er Untersuchungen in Jung- und Ertragsanlagen Deutschlands bzw. Österreichs [2]. Es ist zu berücksichtigen, dass *Fusarium proliferatum* neben Spargel auch an zahlreichen anderen Kulturpflanzen, vor allem in tropischen Anbaugebieten, darunter bei Mais, Weizen, Sorghum, Reis u.a.m. diverse Fäuleerkrankungen hervorruft. Da diese *Fusarium*- Art ebenso wie *F. verticillioides* zu den Hauptbildnern von Fumonisinen zählt [3], stellt sein Befall bei Gemüsepflanzen, wie dem Spargel, ein potentiell hohes Gefahrenrisiko für die menschliche Ernährung dar. Darum ist es von Interesse, ob die zum Verzehr verwendeten Stangenteile mit diesem Pilz infiziert sind bzw. von einer Kontamination mit Fumonisinen betroffen sein können. Erstmals wurde 1998 in Italien in *F. proliferatum* infizierten Spargelpflanzen Fumoni-

sin B₁ (FB₁) und B₂ (FB₂) nachgewiesen [4]. 2002 gelang auch in Deutschland erstmals der Nachweis von FB₁ in *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen.

In 9 von 10 mit *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen wurde das Fumonisin B₁ (FB₁) gefunden [5]. Die Stangen wurden nach der Ernteperiode, Ende Juli 2000, von Pflanzen aus mehrjährigen Anlagen mit starken Wuchsdepressionen entnommen. In den Stangen wurde neben *F. proliferatum*, auch eine natürliche Kontamination mit *F. sambucinum* und *F. oxysporum* festgestellt. Mittels HPLC-ESI-MS wurde in diesen Stangen eine FB₁-Konzentration von 36,4 bis 4513,7 µg/kg basierend auf dem Einzelstangentrockengewicht gemessen. Auf diesen Befunden aufbauend, sollte durch die 2003/04er Untersuchungen in Ertragsanlagen Österreichs geprüft werden, inwieweit Spargelstangen während der Stechperiode mit *Fusarium* spp., insbesondere mit *F. proliferatum* kontaminiert bzw. inwieweit und in welcher Höhe in diesen Stangen Fumonisine nachzuweisen sind.

Material und Methoden

Probennahme der Spargelstangen

In den Jahren 2003 und 2004 wurden insgesamt fünf mehrjährige Ertragsanlagen in Österreich zur Haupterntezeit im Mai und Juni beprobt. Drei der untersuchten Standorte waren im Anbaugebiet Niederösterreich lokalisiert. Die anderen beprobten Felder befanden sich im Burgenland und in Oberösterreich. Der Entwicklungsverlauf der Pilzinfektion an Einzelpflanzen wurde über einen zweijährigen Versuchszeitraum beobachtet. Hierfür erfolgte die Probennahme der Erntestangen je Standort in beiden Jahren nach einem festgelegten Boniturschema. An 25 Probennahmepunkten auf der Spargelfläche, im Abstand von bis zu 50 bzw. 75m wurden maximal zwei Stangen bis zu einer Länge von 35cm, also möglichst kronennah entnommen und luftdurchlässig verpackt. Der Transport und die Lagerung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte in gekühlten Behältern. Zwischen Probennahme und Aufbereitung im Labor lagen ca. 1-4 Tage.

Untersuchung der Spargelstangen auf endophytische Pilzbesiedlung

Für die mykologischen Untersuchungen im Labor wurden die Spargelstangen zunächst mit Leitungswasser abgespült. Nachdem die gesamte Stange für 2min in 2% Natriumhypochlorid (NaOCl) oberflächlich desinfiziert und anschließend dreimal mit sterilem Aqua dest. gespült wurde, erfolgte die Entnahme von ca. 2mm dünnen Scheiben mit einem Skalpell aus dem oberen, bei 20 cm, dem mittlerem Stangenbereich, bei 25cm, und aus der Basis der Stange, bei ca. 35cm. Die Scheiben wurden einzeln auf SNA (slight nutrient agar) ausgelegt und bei 20°C, 14h UV-Licht und 10h Dunkelphase 10 Tage inkubiert. Danach wurde der endophytische Pilzauswuchs lichtmikroskopisch bonitiert. Die *Fusarium*-Arten wurden anhand morphologischer Merkmale charakterisiert. Nach der Entnahme der mykologisch zu untersuchenden Gewebestücke wurde das übrige Stangenmaterial im Untersuchungsjahr 2003 kurzfristig bei -20°C eingefroren. Im Jahr 2004 wurde das restliche Stangenmaterial in ca. 1cm³ große Stücke zerkleinert, luftdicht verpackt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Mykotoxinanalysen wurde das Probenmaterial gefriergetrocknet und pulverisiert luftdicht gelagert.

FB₁- Bestimmung

Im Untersuchungsjahr 2003 wurden die *Fusarium proliferatum*-infizierten und kurzfristig eingefrorenen Spargelstangen mittels HPLC untersucht. 2004 wurden das gefriergetrocknete und mit *F. proliferatum*-infizierte Stangenmaterial mittels Hochleistungsflüssig-chromatographie in Kombination mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) nach SEEFELDER et al. (2002) auf den Gehalt an Fumonisin B₁ untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

An fünf Standorten in Österreich wurden 2003 und 2004 zu zwei Probennahmeterminen in der Haupterntezeit insgesamt 790 Spargelstangen kronennah gestochen und im Labor auf endophytische Pilzkontaminationen, insbesondere mit *Fusarium* spp. untersucht. Die Befallshäufigkeit (BH) in den untersuchten Gewebestücken aus den Spargelstangen mit *Fusarium* spp. variierte stark in Abhängigkeit vom Standort (Tab. 1). So betrug die BH der Erntestangen mit *Fusarium oxysporum* an zwei Standorten bis zu 80%, während ansonsten ein Befall von 20% bis 67% der Stangen zu verzeichnen war. An allen beprobten Standorten ist *Fusarium oxysporum*, die an der endophytischen Besiedlung der Spargelstangen beteiligte, dominierende *Fusarium*-Art. Am zweithäufigsten wurde *F. proliferatum* nachgewiesen. Die BH mit *F. proliferatum* lag bei drei Standorten bei weniger als 10% der untersuchten Stangen. Auf zwei Standorten wurde *F. proliferatum* in BH von 20% bis 37% der untersuchten Stangen gefunden. Meist standortabhängig wurden noch *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. equiseti* bei den Spargelstangenkontaminationen determiniert.

Tab.1: Prozentuale Befallshäufigkeit von nachgewiesenen *Fusarium* spp. in den untersuchten Spargelstangen (n= 790) zur Ernte 2003 und 2004

<i>Fusarium</i> spp.*	Befallshäufigkeit (%) in den Spargelstangen (n=790)				
	Standort 1 (n = 153)	Standort 2 (n = 189)	Standort 3 (n = 184)	Standort 4 (n = 150)	Standort 5 (n = 114)
<i>F. oxysporum</i>	20	21	82	80	67
<i>F. proliferatum</i>	7	7	37	20	5
<i>F. culmorum</i> o. <i>F. sambucinum</i>	0	6	0	11	9
<i>F. avenaceum</i>	7	0	0	0	0
<i>F. spp.</i>	10	6	9	0	0

*Mischinfektionen möglich

Tab. 2: Mittels HPLC ermittelte Fumonisin B₁-Werte in den *Fusarium proliferatum*-infizierten Spargelstangen 2003

Standort	Probenahme Mai 2003		Probenahme Juni 2003	
	Anzahl Stangen(n)	Mittelwert FB ₁ [µg/kg]*	Anzahl Stangen(n)	Mittelwert FB ₁ [µg/kg]*
1	3	11	0	-
2	1	11	4	37
3	14	19	21	16
4	8	13	10	16
5	1	10	2	13
Insgesamt	27		37	

*bezogen auf das Trockengewicht pro Einzelstange

Fusarium proliferatum-infizierte Spargelstangen wurden 2003 mittels IAS-HPLC bzw. 2004 mittels LC-ESI-MS auf den Gehalt an Fumonisin B₁ detektiert. Die Befunde wiesen in beiden Jahren mit 10 und 50 µg/kg pro Trockengewicht Einzelstange relativ geringer FB₁-Werte, in den untersuchten *F. proliferatum*-infizierten Spargelstangen auf. Nur in einzelnen Stangen waren erhöhte FB₁-Werte bis max. 308 µg/kg feststellbar (Tab. 2 und Tab. 3).

Tab. 3: Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Fumonisin B₁-Werte in den *Fusarium proliferatum*-infizierten Spargelstangen 2004

Standort	Probenahme Mai 2004		Probenahme Juni 2004	
	Anzahl Stangen(n)	Mittelwert FB ₁ [µg/kg]*	Anzahl Stangen(n)	Mittelwert FB ₁ [µg/kg]*
1	2	11 und 308	2	0
2	3	20	1	0
3	11	24	16	a*
4	3	1	8	b*
5	1	23	0	0
Insgesamt	20		27	

*bezogen auf das Trockengewicht pro Einzelstange

a* nur 4 von 16 Stangen FB₁-Gehalte von 3 bis 213 µg/kg

b* nur 2 von 8 Stangen FB₁-Gehalte von 2 und 14 µg/kg

Literatur

- [1] ELMER, W. H.; JOHNSON, D. A. and MINK, G. I. (1996): Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. *Plant Disease* 80: 117 - 125.
- [2] GOßMANN, M., BÜTTNER, C., BEDLAN, G. (2001): Untersuchungen zum Spargel (*Asparagus officinalis* L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland u. Österreich auf Infektionen mit *Fusarium*- Arten. *Pflanzenschutzberichte* 59 (2), 45–54.
- [3] NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. (1992): Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 985-989.
- [4] LOGRIECO, A., B. DAKO, A. MORETTI, S. FRISULLO and A. VISCONTI 1998: Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in *Fusarium proliferatum* infected Asparagus Plants. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5201-5204.
- [5] SEEFELDER, W., GOßMANN, M., HUMPF, H.-U. (2002): Analysis of fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum*- infected asparagus spears and garlic tubers from Germany by liquid chromatography-elektrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (10), 2778–2781.

Autoren

Dr. Monika GOSSMANN, Dipl.-Biol. Franziska BERAN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität zu Berlin, Landw.-Gärtnerische Fakultät, Inst. für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin; Email: monika.gossmann@agr.ar.hu-berlin.de;

Mag. Astrid PLENK und Dr. Gerhard BEDLAN: AGES GmbH, Institut für Pflanzengesundheit, Spargelfeldstr. 191, A-1226 Wien;

Stefan HAMEDINGER: Verband Obst- und Gemüse-produzenten Oberösterreich, Eferding;

Dr. Richard ÖHLINGER: AGES GmbH, CC Cluster Chemie, Wieningerstr. 8, A- 4020 Linz;

Prof. Dr. Hans-Ulrich HUMPF: Westfälische Wilhelms-Universität, Institut Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, 48149 Münster.

Genetische Differenzierung von *Fusarium* spp. an Spargel (*Asparagus officinalis*) und anderen Wirtspflanzen

Genetic differentiation of Fusarium spp. infecting asparagus (Asparagus officinalis) and other host plants

SUSANNE VON BARGEN, INES SCHADOCK, O. MARTINEZ, ANNE-MAREEN EISOLD,
MONIKA GOßMANN & CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

Die *Fingerprint*-Analyse von fünfundvierzig *Fusarium proliferatum* Reinkulturen aus Spargelstangen österreichischer Herkunft zeigte eine Heterogenität innerhalb des Genoms dieser Isolate, die sich in vierzehn genetische Gruppen differenzieren ließen. Eine Korrelation zwischen *Fingerprint*-Gruppierung und geographischer Herkunft bzw. Spargelsorte bestand nicht. Essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese (*fum1* und *fum8*) waren in allen untersuchten *F. proliferatum* Isolaten nachweisbar sowie in einzelnen Isolaten von *F. oxysporum*, *F. redolens* und *F. subglutinans* aus Spargel sowie aus weiteren Wirtspflanzen wie Mais, Kartoffel, Miscanthus, Raps und anderen stammten. Diese Isolate gelten somit als potentielle Fumonisin-Bildner. DNA-Polymorphismen innerhalb der amplifizierten *fum1*- bzw. *fum8*-Fragmente von *F. proliferatum* Isolaten aus Spargel konnten durch RFLP-Analyse jedoch nicht gezeigt werden.

Schlüsselwörter

Fumonisin-Bildner, DNA-Polymorphismus, Polyketidsynthase, Aminoacyl-Transferase

Summary

Fingerprint analysis of 45 cultured *Fusarium proliferatum* isolated from asparagus spears in Austria revealed genetic diversity of genomes within this species. Isolates were differentiated into fourteen genetic clusters, but a correlation between geographic origin or asparagus cultivar was not detectable. In all investigated *F. proliferatum* isolates originating from asparagus or corn, essential genes of the fumonisin-biosynthesis cluster were detectable. Furthermore, several isolates identified as *F. oxysporum*, *F. redolens* and *F. subglutinans*, which were also isolated from potato plants, Miscanthus, rape and other plants, are also putative fumonisin-producers, due to the presence of *fum1* and *fum8* respectively. However, DNA-polymorphisms within the amplified *fum*-fragments from *F. proliferatum* originating from asparagus plants were not detected by RFLP.

Keywords

Fumonisin-producer, DNA-polymorphism, Polyketide-synthase, Aminacyl-transferase

Einführung

Fusarium oxysporum Schlecht., *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg sowie *F. redolens* Wollenw., sind Hauptverursacher der Wurzel-, Stängel-, und Kronenfäule des Spargels (*Asparagus officinalis* L.), die als potentielle Fumonisin-Bildner gelten. Untersuchungen zum Vorkommen von Fumonisin-Biosynthese-Genen und Bildungspotential von Fumonisinen in verschiedenen Isolaten von *F. subglutinans* (Wollenw. & Reink.) Nelson et al. ergaben widersprüchliche Ergebnisse (in Desjardins 2006). Insofern ist es von Interesse, auch die Bedeutung dieser Art bei der Fumonisin-Bildung an Spargel zu untersuchen. *F. proliferatum* zählt neben *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, der im Spargelanbau jedoch keine Rolle spielt, zu den bedeutendsten Fumonisin-Produzenten, da er nicht nur hohe Mengen dieser Mykotoxine bildet (Rheeder et al. 2002), sondern eine weite geographische Verbreitung besitzt (Leslie et al. 1992), in zunehmendem Maße in mitteleuropäischen Anbaugebieten von Spargel auftritt (Wong and Jeffries, 2006, Weber et al. 2006, Gossmann et al. 2001) und auch häufig aus latent infizierten Spargelrhizomen isoliert werden kann (Xu et al. 2006). Die Menge der produzierten Fumonisine ist jedoch innerhalb der *F. proliferatum* Isolate unterschiedlich und kann sowohl von geographischer Herkunft, Wirtspflanze bzw. Umweltbedingungen (Leslie et al. 1992, Moretti et al. 1997) als auch von der genetischen Variabilität der Fum-Gene abhängig sein.

Zur Ermittlung der genetischen Grundlagen wurden fünfundvierzig *F. proliferatum* Isolate mittels RAPD- und DAF-PCR (random amplification of polymorphic DNA- bzw. DNA amplification fingerprinting-polymerase-chain-reaction) auf DNA-Polymorphismen untersucht. Die Isolate stammten aus Spargelstangen unterschiedlicher Sorten, die in mehrjährigen Ertragsanlagen an fünf unterschiedlichen Standorten in Österreich kultiviert wurden (vergleiche Goßmann et al. in dieser Ausgabe). Weiterhin wurden die initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese (*fum1* = Polyketid-Synthase und *fum8* = Aminoacyl-Transferase) in Isolaten unterschiedlicher an Spargel relevanter *Fusarium*-Arten (*F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. subglutinans*) mittels Gen-spezifischer PCR nachgewiesen und mit Referenz-Amplikons aus *F. verticillioides* verglichen. Von Waalwijk et al. (2004) bzw. Proctor et al. (2003) ist bekannt, dass Fum1 (2607 aa) bzw. Fum8 (839 aa) von *F. verticillioides* und *F. proliferatum* eine vergleichsweise geringe Identität von 85% bzw. 77% auf Protein-Ebene aufweisen. Die genetische Heterogenität der amplifizierten Genabschnitte wurde mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (PCR-RFLP) untersucht.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Aus Reinkulturen von fünfundvierzig *F. proliferatum* Isolaten wurde Gesamt-DNA isoliert. Durch RAPD-PCR mit zwei unterschiedlichen Primern (Q1, Q6 Firma Roth) sowie durch DAF-PCR mit drei verschiedenen Primer-Kombinationen (Q11+Q20, Q2+Q6, Q2+Q20, Firma Roth) ließen sich insgesamt vierzehn genetische Gruppen differenzieren. Eine Korrelation zwischen *Fingerprint*-Gruppierung und geographischer Herkunft bzw. Spargelsorte bestand jedoch nicht. Die Mehrheit

der Isolate war drei Hauptgruppen zuzuordnen (Gruppe A n=10; B n=8; C n=8), so dass eine Prävalenz von Genotypen innerhalb der *F. proliferatum* Isolate, die Spargelpflanzen infizieren, zu vermuten ist.

Zehn ausgewählte *F. proliferatum* Isolate aus unterschiedlichen *Fingerprint*-Gruppen wurden ebenso wie 41 weitere Isolate unterschiedlicher *Fusarium*-Arten, die aus verschiedenen Wirtspflanzen isoliert worden waren, auf Nachweisbarkeit essentieller Gene des Fumonisin- Stoffwechsels (*fum1* bzw. *fum8*) untersucht.

Tabelle 1: Nachweis essentieller Fumonisin-Biosynthesegene (*fum1*, Polyketidsynthase und *fum8*, Aminoacyl-Transferase) in Isolaten unterschiedlicher *Fusarium*-Arten aus Spargel und anderen Wirtspflanzen

Fusarium-Art	Wirtspflanze	untersuchte Isolate [n]	Nachweis Fumonisin- Biosynthese Gen [n]	
			fum1	fum8
<i>F. proliferatum</i>	Spargel	23	23	23
	Mais	2	2	2
	Σ	25	25	25
<i>F. oxysporum</i>	Spargel	4	0	0
	Raps	2	1	1
	Lupine	1	1	0
	Miscanthus	1	1	1
	Σ	8	3	2
<i>F. redolens</i>	Spargel	2	1	0
	Kartoffeln	3	1	1
	Erbse	2	1	1
	Σ	7	3	2
<i>F. subglutinans</i>	Spargel	1	1	1
	Sorghum	1	0	0
	Rübe	1	1	0
	Mais	2	1	1
	Miscanthus	1	1	1
	Σ	6	4	3
<i>F. verticillioides</i>	Sorghum	3	1	0
	Mais	2	1	2
	Σ	5	2	2
Gesamtsumme		51	37	34

Mit spezifischen Primern (*fum1*for 5' GAGCAATATAGGCTGTTACG , *fum1*rev 5' TCCATCCGAATTTGAAGATGT; *fum8*for 5' TCTCCTGTTGTCTGCTTTCCA, *fum8*rev 5' GTAGTGAGAGCATCATAGTATG) wurden Gen-Fragmente (*fum1* = 525 bp; *fum8* = 801 bp) aus Gesamt-DNA Präparationen durch PCR amplifiziert. Der Nachweis der *fum*-Gene gelang in Isolaten aller untersuchten *Fusarium*-Arten (siehe Tabelle 1).

Gene, die in die Biosynthese von Mykotoxinen involviert sind, gelten als Basis für einen genauen, empfindlichen und spezifischen Nachweis von Stämmen mit Mykotoxin-Bildungspotential (Konietzny & Greiner, 2003). In mehr als 50 % der untersuchten Isolate war sowohl *fum1* als auch *fum8* nachweisbar. In Übereinstimmung mit Literatur-Befunden sind innerhalb der Species *F. proliferatum* offenbar alle Isolate zur Fumonisin-Bildung fähig (Rheeder et al. 2002, Proctor et al. 2002). In den anderen untersuchten Arten, darunter auch *F. subglutinans*, weisen dagegen lediglich einzelne Isolate diese Eigenschaft auf (Desjardins 2003, 2006). Damit gehören diese *Fusarium*-Isolate alle zu den potentiellen Fumonisin-Bildnern.

Ob eine genetische Variabilität auch innerhalb dieser essentiellen Fumonisin-Biosynthesegene vorliegt, wurde durch PCR-RFLP untersucht. Es wurden Restriktionsenzyme verwendet, die unterschiedliche Bandenmuster von Referenzsequenzen der Datenbanken erzeugten (*fum1*: *F. verticillioides* Acc. AY495601, *F. proliferatum* Acc. AY577458, *F. oxysporum* Acc. AY577457; *fum8*: *F. verticillioides* Acc. AF155773, *F. proliferatum* Acc. AY577451, *F. oxysporum* Acc. AY577450). Die Restriktionsanalyse von Isolaten unterschiedlicher *Fusarium* spp. ergab erwartungsgemäß verschiedene Bandenmuster, jedoch waren diese nicht artspezifisch.

Die Restriktion des *fum1*-Fragmentes von vierzehn *F. proliferatum* Isolaten aus Spargel und Mais mit Bsp143I, und RsaI generierte einheitliche Restriktionsmuster, durch den Verdau mit AluI wurde ein Mais-Isolat als genetisch heterogen identifiziert. Durch Behandlung der *fum8* PCR-Fragmente von neun *F. proliferatum* Isolaten aus Spargel mit AluI, Bsp143I, BamHI bzw. RsaI konnte keine genetische Variabilität detektiert werden, so dass eventuell vorhandene Polymorphismen der *Fum*-Gene innerhalb dieser *Fusarium*-Art nachfolgend durch Sequenzierung untersucht werden sollen.

Literatur

Desjardins AE (2003) *Giberella* from *A(venaceae* to *Z(eae)*. Ann. Rev. Phytopathol. **41**, 177-198

Desjardins (2006) *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, Minnesota, USA

Gossmann M, Büttner C, Bedlan G (2001) Untersuchungen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland und Österreich auf Infektion mit *Fusarium*-Arten. Pflanzenschutzberichte **59**, 45-54

Konietzny U, Greiner R (2003) The Application Of PCR In The Detection Of Mycotoxigenic Fungi In Foods. Brazilian Journal of Microbiology **34**, 283-300

Leslie JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klittich CJR (1992) Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (Fusarium section *Liseola*). *Phytopathology* **82**, 341-345

Moretti A, Logrieco A, Doko B, Frisullo S, Visconti A, Bottalico A (1997) *Fusarium proliferatum* from asparagus in Italy: Occurrence, fertility and toxigenicity. *Cereal Research Communications* **25**, 785-786

Proctor RH, Desjardins AE, McCormick SP, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *Europ. J. Plant Pathol.* **108**, 691-698

Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins A (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 237-249

Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF (2002) Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2101-2105

Waalwijk C, van der Lee T, de Vries I, Hesselink T, Arts J, Kema GHJ (2004) Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *Europ. J Plant Pathol.* **110**, 533-544

Weber Z., KostECKI M, von BARGEN S, GOSSMANN M, WASKIEWICZ A, KNAFLEWSKI M, BÜTTNER C, GOLINSKI P (2006): *Fusarium* Species Colonizing Spears and Forming Mykotoxins in Field Samples of Asparagus from Germany and Poland. *Journal of Phytopathology* **154**, 209-216

Wong JY, Jeffries P (2006) Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathology* **55**, 331-342

Xu W, GOSSMANN M, He XF, Liu XL, KOFOT A. (2006) Systemic infection of asparagus crowns by *Fusarium* spp. in symptomless plants in China. *Australasian Plant Pathology* *submitted*

Autoren:

Dr. Susanne VON BARGEN*, Ines SCHADOCK, Oliver MARTINEZ, Anne-Mareen EISOLD, Dr. Monika GOSSMANN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER. Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

* korrespondierender Autor: susanne.von.bargen@agr.ar.hu-berlin.de

Wirksamkeit von Bodenbearbeitungs- und Fungizidmaßnahmen auf Ährenfusariosen, einschließlich den Mykotoxingehalt in Triticale (*Triticum secale*)

Influence of soil tillage and fungicide treatments on scab and the mycotoxin contamination in triticale

T. HIRSCHFELD, MURIEL BARTHELMEUS, MONIKA GOSSMANN, F. M. ELLNER & CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

In den Jahren 2002 und 2003 wurden in einer Versuchsanlage am Standort Berge (Land Brandenburg) Untersuchungen zur Wirksamkeit von Bodenbearbeitungs- und Fungizidmaßnahmen auf Ährenfusariosen und Mykotoxinkontaminationen des Erntegutes bei Triticale durchgeführt. Im Jahr 2002 zeigten sich bei den geernteten Triticalekörnern der Sorte LAMBERTO die höchsten Konzentrationen von 1,44 mg/kg Deoxinivalenol (DON) in den Proben der unbehandelten Kontrolle Varianten kombiniert mit einer minimalen Bodenbearbeitung durch den Grubber. Die Variante mit minimaler Bodenbearbeitung und zweier Fungizidapplikationen war mit 0,9 mg/kg DON im Durchschnitt höher kontaminiert als die Variante mit einer wendenden Bodenbearbeitung in der unbehandelten Kontrolle mit 0,63 mg/kg DON. Die mit 0,16 mg/kg geringste DON-Belastung wurde in der Variante mit zweimaliger Fungizidbehandlung und der Bodenbearbeitung durch den Pflug ermittelt. Sowohl 2002, als auch 2003 wurden die Triticalekörner mittels Agartest im Direktnachweis auf den Befall mit *Fusarium* spp. untersucht. 2002 dominierte *Fusarium graminearum* mit 64,1%, gefolgt von *F. avenaceum* (29,5%). In jeweils weniger als 5% der untersuchten Körner war noch *F. sambucinum*, *F. arthrosporioides*, *F. semitectum* und *F. oxysporum* nachweisbar. Während 2002 der *Fusarium*-Befall mit dem DON-Gehalt positiv korrelierte, war 2003 nur ein sehr geringer *Fusarium*-Befall feststellbar, der sich auch in nur geringen DON- und ZEA-Gehalten niederschlug.

Schlüsselwörter: Triticale, Ährenfusariosen, Mykotoxine, Bodenbearbeitung, Fungizide

Einleitung

Triticale galt lange Zeit als nicht besonders anfällig gegenüber Pilzkrankungen und erfreute sich auf Grund dieser günstigen Eigenschaften seit Einführung der praktischen Nutzung in Deutschland Mitte der 80er Jahre einer zunehmenden Anbaubeliebtheit insbesondere auf sandigen und nährstoffärmeren Böden. So stieg die Anbaufläche für Triticale im Land Brandenburg zwischen 1990 und 2000 von 8,8 Tha auf 71,2 Tha. Deutschlandweit wurde im Jahr 2000 auf etwas über einer Million Hektar Triticale angebaut, was 7,6 % der gesamten Getreideanbaufläche entspricht [1]. Für die Zunahme des Anbauumfanges sind nicht zuletzt die hochwertigen Futtereigenschaften des Triticales und seine daraus resultierende Absatzmöglichkeit verantwortlich, durch die er mit stetig steigenden Anteilen als Mischkomponente in industriell hergestellten Futtermitteln Verwendung fand. Der größere Anbauumfang zog jedoch auch ein verstärktes Auftreten spezifischer Krank-

heitserreger in den Triticalebeständen nach sich. So stellten Untersuchungen in Brandenburg zwischen 1997 und 1999 neben einer Etablierung pilzlicher Blattkrankheiten [2] auch ein vermehrtes Auftreten von Halm- und Ährenerkrankungen an Triticale fest [3].

Material und Methoden

Am Standort Berge im Land Brandenburg wurde 2002 und 2003 in einer Versuchsanlage der Einfluß von Bodenbearbeitungs- und Fungizidmaßnahmen sowie der Sorteneinfluß auf den Kornbefall und den Mykotoxingehalt in einer zweijährigen Untersuchung geprüft. Getestet wurden die drei Triticalesorten MAGNAT, KITARO und LAMBERTO in den Varianten mit wendender Bodenbearbeitung durch den Pflug oder nicht-wendend durch den Grubber jeweils in Kombination mit einer unbehandelten Kontrolle, einer einmaligen Fungizidbehandlung zum frühen Zeitpunkt des Schossens (BBCH 32) mit Pronto Plus sowie einer zweimaligen Fungizidapplikation ebenfalls zur BBCH 32 und einer zusätzlichen Ährenbehandlung zur Blüte (BBCH 61-65) mit Folicur. Jede Variante wurde in vier Wiederholungen in einer Streifenspaltanlage angelegt. Als Vorfrucht diente Mais. Die Stickstoffdüngung erfolgte auf normaler Intensität mit 120 kg Stickstoff je Hektar in zwei Gaben zu 50 und 70 kg. Die Probenahme zur Mykotoxinuntersuchung im Jahr 2002 beschränkte sich auf die Varianten der Sorte LAMBERTO mit wendender und nicht-wendender Bodenbearbeitung sowie ohne und mit einer zweimaligen Fungizidbehandlung (BBCH 32 plus BBCH 61-65). Die Proben von je 500 g wurden aus den homogen gemischten Gesamterträgen der Varianten mit einer Kornfeuchte von 13% entnommen. Die Proben wurden auf eine Korngröße von 0,5 mm vermahlen und bis zum Nachweis von Deoxynivalenol (DON) mittels eines kompetitiven ELISA-Testes (r-biopharm) bei -21 °C eingefrosten.

Im Jahr 2003 wurden die Varianten aller drei Triticalesorten KITARO, LAMBERTO und MAGNAT beprobt. Die Probenmenge betrug 100 g je Variante. Nach der Lagerung bei 4° C wurden die Proben der unbehandelten Kontrollen auf eine Korngröße von 0,5 mm vermahlen und für den Nachweis von DON, 3- und 15-Acetyl-DON, Nivalenol (NIV), Zearalenon (ZEA) sowie α - und β -Zearalenol durch die hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC) aufbereitet.

Vor der Untersuchung auf eine Kontamination mit Mykotoxinen wurden in beiden Jahren insgesamt 60 Körner je Variante mittels Agartest im Direktnachweis auf den Befall mit *Fusarium* spp. untersucht. Durch eine lichtmikroskopische Auswertung erfolgte die Bonitur des Pilzwachstums bzw. die Artendeterminierung auf morphologischer Basis.

Ergebnisse

Die mittleren DON-Gehalte in den Proben des geernteten Triticales der Sorte LAMBERTO waren sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in der Variante mit einer zweimaligen Fungizidbehandlung zur BBCH 32 sowie BBCH 61-65 bei wendender Bodenbearbeitung mit dem Pflug deutlich geringer im Vergleich zu den Varianten mit einer nicht-wendenden Bodenbearbeitung durch

den Grubber. So zeigten sich die höchsten Konzentrationen von 1,44 mg/kg DON in den Proben der unbehandelten Kontrolle kombiniert mit einer Bodenbearbeitung durch den Grubber. Dabei war die Variante der nicht-wendenden Bodenbearbeitung und den zwei Fungizidapplikationen mit etwa 0,90 mg DON/kg im Durchschnitt höher kontaminiert als die mit 0,63 mg DON/kg belastete Variante mit wendender Bodenbearbeitung in der unbehandelten Kontrolle. Die mit 0,16 mg/kg geringste DON-Kontamination wurde in den Proben der Variante mit zweimaliger Fungizidbehandlung und der Bodenbearbeitung durch den Pflug ermittelt. Beim Vergleich zwischen der unbehandelten Kontrolle und der zweimaligen Fungizidapplikation lag der Wirkungsgrad der Fungizidanwendung hinsichtlich der DON-Reduzierung in den Varianten mit nicht-wendender Bodenbearbeitung bei etwa 40%, wohingegen sie in den Varianten mit wendender Bodenbearbeitung cirka 75% erreichte. Weiterhin deutete sich an, dass die Bodenbearbeitung im Untersuchungsjahr offensichtlich keinen Effekt auf den Kornertrag besaß, der Einsatz von Fungiziden jedoch zu deutlichen Ertragssteigerungen führte. In dem ermittelten *Fusarium*-Spektrum an den Körnern aller Varianten insgesamt war *F. graminearum* mit 64,1% die dominierende *Fusarium*-Art gefolgt von *F. avenaceum* (29,5%). In 3,5% der Körner wurde *F. sambucinum* und in jeweils 0,2% der Körner *F. arthrosporioides*, *F. semitectum* und *F. oxysporum* festgestellt. In 2% der Fälle wurden nicht näher spezifizierte *Fusarium*-Arten nachgewiesen. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ergab in 99% der Fälle einen Zusammenhang der Wertentwicklung zwischen dem prozentualen Anteil *Fusarium*-befallener Körner und dem DON-Gehalt. In den Direktnachweisen mittels Agartest wurde nur vereinzelt *Fusarium* spp. in den Varianten der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. Bei nicht-wendender Bodenbearbeitung fand sich an neun der insgesamt 180 untersuchten Körner aller drei Triticalesorten *Fusarium* spp.. In den Varianten mit wendender Bodenbearbeitung konnte lediglich an drei Körnern bei der gleichen Grundgesamtheit ein Befall mit *Fusarium* spp. ermittelt werden. Es waren keine Sortenunterschiede festzustellen. Es konnten die *Fusarium*-Arten *F. tricinctum*, *F. avenaceum* und *F. graminearum* nachgewiesen werden. Bei den Mykotoxinuntersuchungen mittels HPLC wurde ebenfalls in nur zwei von zwölf Proben aus den vier Wiederholungen je Triticalesorte eine schwache Kontamination mit DON und ZEA festgestellt. Beide Proben stammten aus den vier Wiederholungen der Sorte LAMBERTO und enthielten zum einen 0,266 mg/kg DON und zum anderen 0,019 mg/kg ZEA.

Fazit

Die Ergebnisse aus dem Jahr 2002 deuten an, dass sich mit Hilfe von Bodenbearbeitungs- sowie Fungizidmaßnahmen das Risiko eines *Fusarium*-Befalls und damit einer Kontamination mit Mykotoxinen in geerntetem Getreide minimieren lässt. Das Jahr 2003 zeigte jedoch durch seine Ergebnisse auch, dass ein *Fusarium*-Befall sowie die damit unter Umständen verbundene Bildung von Mykotoxinen weitgehend von den Witterungsverhältnissen abhängen, die im Gegensatz zum Vorjahr für eine Ähreninfektion mit *Fusarium* spp. scheinbar nicht optimal genug waren. Im Jahr 2002

waren die Niederschläge zwischen dem Ährenschieben (BBCH 55) und dem Ende der Blüte (BBCH 69) deutlich zahlreicher als im Jahr 2003. Außerdem war die Zeitspanne zwischen diesen Entwicklungsstadien 2002 um vier Tage länger, was bedeutet, daß das Zeitfenster für eine Infektion der Ähren mit *Fusarium* spp. um die entsprechende Zeit größer war. Des Weiteren kam es im Jahr 2003 erst sehr spät zu stärkeren Niederschlägen, als der Hauptteil der Antheren schon abgefallen war, was eine Infektion der Kornanlagen erschwert haben könnte. Das vergleichsweise trockene Jahr 2003 zeigte, dass einer der wesentlichsten Faktoren für einen Befall mit *Fusarium* spp. die Witterung und dabei insbesondere der Faktor Niederschlag zur Blüte zu sein scheint. Das deutet darauf hin, dass es auch nach dem Anbau von Risikovorfrüchten wie Mais bei einem erhöhten Infektionspotential nicht zu einem Befall kommen kann, wenn die entsprechenden Witterungsvoraussetzungen nicht erfüllt werden.

Literatur

- [1] HARTMANN, F. (2002): Triticale – Züchtung / Qualität von Triticale und Einsatz als Futtermittel, 12. Fachtagung Pflanzenbau, Landesanstalt für Landwirtschaft des Landes Brandenburg, Abteilung Acker- und Pflanzenbau, S. 5-9.
- [2] EICHSTAEDT, G. (2000): Triticale – Krankheiten, Umfang und Bedeutung im Land Brandenburg, 52. Deutsche Pflanzenschutztagung, Freising-Weihenstephan, Mitteilung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, H. 376, S.336-337.
- [3] BARTHELMEUS, M. et al. (2004): Untersuchungen zur Wirksamkeit von Bodenbearbeitungs- und Fungizidmaßnahmen auf Halm- und Ährenfusariosen bei Triticale, 54. Deutsche Pflanzenschutztagung in Hamburg, Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, H. 396, S. 404.
- [4] GOßMANN, M., BARTHELMEUS, M. (2000): Triticale – Veränderung der Krankheitsanfälligkeit, 12. Fachtagung Pflanzenbau, Landesanstalt für Landwirtschaft des Landes Brandenburg, Abteilung Acker- und Pflanzenbau, S. 23-27.

Autoren:

Dipl.-Ing. Tim HIRSCHFELD, Dipl.-Ing. Muriel BARTHELMEUS, Dr. Monika GOSSMANN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin;

Dr. Frank M. ELLNER, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin.

Bewirtschaftungssystemen und deren Einfluss auf Ährenfusariosen und Mykotoxinbildung beim Weizenbau in Gefährdungslagen Thüringens

Agriculture-systems and its influence on the infection with Fusarium spp. and the contamination with mycotoxins in wheat-cultivation in farming sites with higher risk of scab in Thuringia.

T. HIRSCHFELD, MONIKA GOSSMANN, F. M. ELLNER & CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

An zwei bereits bestehenden Versuchsanlagen im Bundesland Thüringen / Landkreis Sömmerda wurden im Jahr 2004 die Einflüsse ackerbaulicher Maßnahmen wie Bodenbearbeitung, Weizensorten und Fruchtfolgeeffekte sowie chemischer Maßnahmen durch Anwendung verschiedener Fungizide vorwiegend aus den Wirkstoffgruppen Azole und Strobilurine zu unterschiedlichen Terminen auf den Befall des Weizens mit *Fusarium* spp. und den Mykotoxingehalt getestet. Hierzu wurden sowohl die Blattscheiden zum Ende des Ährenschiebens (BBCH 59) auf ihr epidemiologisches Potential an Inokulum-Material von *Fusarium* spp. als auch die geernteten Weizenkörner auf den *Fusarium*-Befall mittels Agartest im Direktnachweis untersucht und die Mykotoxinkonzentrationen von Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), 3- und 15-Acetyl-Deoxynivalenol (3- & 15-AcDON), Zearalenon (ZEA) sowie α - und β - Zearalenole der Weizenkörner in der hochauflösenden Flüssigchromatographie (HPLC) ermittelt.

Am Standort 1 deutete sich in den Varianten, in denen der Wirkstoff Azoxystrobin aus der Gruppe der Strobilurine zwischen dem späten Schossen (BBCH 39) und dem Beginn des Ährenschiebens appliziert wurde, ein erhöhter *Fusarium*-Befall sowie eine höhere DON-Belastung in den geernteten Weizenkörnern an.

Am Standort 2 zeigte sich hinsichtlich des Befalls mit *Fusarium* spp. und der Kontamination mit Mykotoxinen im Untersuchungsjahr kein Unterschied zwischen der wendenden und der nichtwendenden Bodenbearbeitung bei der Vorfrucht Weizen. Weiterhin hatte auch der Anbau in Weizenmonokultur oder in der viergliedrigen Fruchtfolge Winterweizen-Winterweizen-Wintergerste-Zuckerrübe keinen Einfluss auf den *Fusarium*-Befall und die Mykotoxinbelastung. Eine Anwendung des Azol-haltigen Fungizids Input zur Blüte (BBCH 61-65) erreichte in den Varianten mit nichtwendender Bodenbearbeitung in Bezug auf den DON-Gehalt der Weizenkörner Wirkungsgrade zwischen 40 und 75%.

Schlüsselwörter: Weizen, Ährenfusariosen, Mykotoxine, Azole, Strobilurine, Bodenbearbeitung, Fruchtfolge

Versuchsanlage und Ergebnisse am Standort 1 in Schallenburg

An der Versuchsanlage wurde der Einfluss verschiedener Fungizide aus den Wirkstoffgruppen Azole und Strobilurine einzeln und in Kombination zu unterschiedlichen Applikationsterminen auf den Ährenbefall der Weizensorten MAXI und EMPIRE mit *Fusarium* spp. geprüft (Tab.1).

Tab. 1: Untersuchte Varianten am Standort 1 in Schallenburg mit Angaben der Entwicklungsstadien (BBCH) des Weizens zur Fungizidapplikation, den eingesetzten Fungiziden und den enthaltenen Wirkstoffen

Varianten-Bezeichnung	BBCH-Stadium	Eingesetzte Fungizide	Enthaltene Wirkstoffe**
UK	32	-	
	49-51	-	
	59-61	-	
SA(2)	32	-	
	49-51	Amistar + Gladio	(Azoxystrobin) + (Propiconazol + Tebuconazol + Fenpropidin)
	59-61	-	
A(1)-SA(2)-A(3)	32	Unix(AP)+Gladio+Bravo(CIT)*	(Cyprodinil) + (Propiconazol + Tebuconazol + Fenpropidin) + (Chlorthalonil)
	39-51	Amistar + Gladio	(Azoxystrobin) + (Propiconazol + Tebuconazol + Fenpropidin)
	59-61	Caramba + Folicur	(Metaconazol) + (Tebuconazol)
S(1)-SA(2)-A(3)	32	Fandango	Fluoxastrobin + Prothioconazol
	39-51	Twist + Input	(Trifloxystrobin) + (Spiroxamine + Prothioconazol)
	59-61	Input	Spiroxamine + Prothioconazol
A(3)	32	-	
	49-51	-	
	59-61	Input	Spiroxamine + Prothioconazol
SA(1)-A(3)	32	Amistar + Gladio	(Azoxystrobin) + (Propiconazol + Tebuconazol + Fenpropidin)
	49-51		
	59-61	Proline	Prothioconazol

Bei den Untersuchungen der Blattscheiden von Fahnenblättern zum späten Ährenschieben mittels Agartest im Direktnachweis konnte in allen Varianten nur ein schwacher Befall mit *Fusarium* spp.

festgestellt werden. Die dominierende *Fusarium*-Art war *Fusarium graminearum*. Daneben konnte auch ein Befall mit *Fusarium avenaceum* sowie *Fusarium culmorum* nachgewiesen werden.

An den geernteten Weizenkörnern zeigten sich im Direktnachweis Unterschiede im *Fusarium*-Befall der Varianten (Abb. 1). Die Variante SA(2), in der Azoxystrobin in Kombination mit Tebuconazol zwischen dem Schossen und dem Ährenschieben appliziert wurde, war bei der Sorte SW MAXI signifikant stärker mit *Fusarium* spp. befallen. Auch die Variante A(1)-SA(2)-A(3), die ebenfalls mit Azoxystrobin und Tebuconazol zwischen dem Schossen und dem Ährenschieben behandelt wurde, ergab ähnlich wie die unbehandelte Kontrolle höhere *Fusarium*-Befallszahlen, die aber gegenüber den anderen Varianten nicht signifikant erhöht waren. Die Sorte EMPIRE folgte zwar dieser Tendenz, besaß aber keine signifikanten Unterschiede im *Fusarium*-Befall der Weizenkörner.

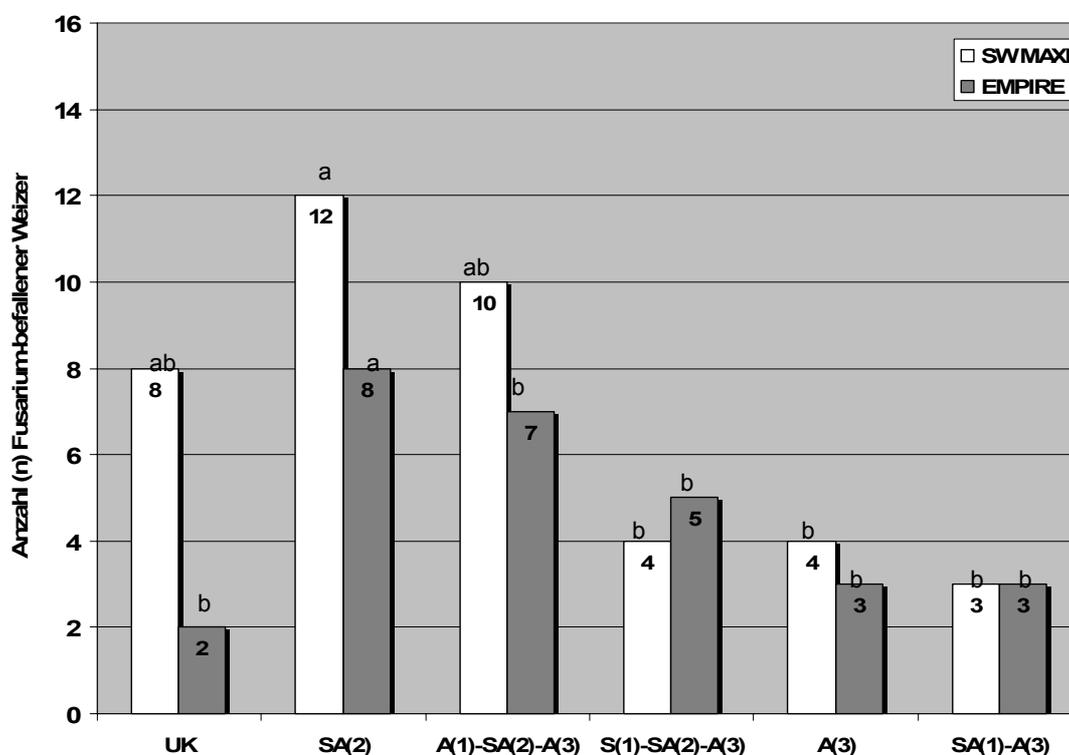


Abb. 1: Anzahl der in den Direktnachweisen mittels Agartest mit *Fusarium* spp. befallenen Körner der Weizensorten SW MAXI und EMPIRE in den Varianten am Standort 1 ($n_{\text{gesamt}} = 50$ Körner je Variante).

An den Weizenkörnern trat vorwiegend *F. graminearum* auf. An zweiter Stelle folgte *F. tricinctum*. *F. avenaceum* sowie *F. culmorum* konnten ebenfalls nachgewiesen werden.

Im Mykotoxinnachweis mit der HPLC wurde nur DON in relativ geringen Konzentrationen ermittelt. Die Variante SA(2) zeigte mit 558 µg/kg bei der Sorte SW MAXI und 325 µg/kg bei der Sorte EMPIRE die höchste Kontamination mit DON. Ansonsten wurden für die Varianten der Sorte SW MAXI DON-Konzentrationen um die 100 µg/kg ermittelt. Lediglich in der Variante A(3) mit einer einmaligen Applikation des Azol-haltigen Präparates Input zur Blüte konnte kein DON nachgewiesen

werden. Die Varianten der Sorte EMPIRE waren mit Konzentrationen von 100 bis 250 µg/kg DON belastet. Nach dem Korrelationskoeffizienten von Pearson ergab sich zwischen dem prozentualen Anteil *Fusarium*-befallener Körner und dem DON-Gehalt in 70% der Fälle eine Übereinstimmung der Wertentwicklung.

Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Blattbehandlung zwischen dem Schossen und dem Ährenschieben mit dem Wirkstoff Azoxystrobin sich auch in Kombination mit einem Azol-haltigen Fungizid fördernd auf den *Fusarium*-Befall und den DON-Gehalt auswirken kann. Außerdem war ohne vorherigen Einsatz von Azoxystrobin-haltigen Präparaten nach einer Blütenbehandlung mit Azolen der *Fusarium*-Befall der geernteten Körner bei der Sorte SW MAXI um 50-60% geringer.

Versuchsanlage und Ergebnisse am Standort 2

Die Versuchsanlage am Standort 2 in Ottenhausen bestand bereits seit zehn Jahren. Hier sollte an den Sorten SW MAXI und EMPIRE unter anderem der Einfluss der wendenden gegenüber der nicht-wendenden Bodenbearbeitung bei der Vorfrucht Weizen untersucht werden. Weiterhin sollte die Versuchsanlage mögliche Rückschlüsse auf den Einfluss des Anbaus in Weizenmonokultur und in der viergliedrigen Fruchtfolge Winterweizen-Winterweizen-Wintergerste-Zuckerrübe auf die Befallssituation mit *Fusarium* spp. geben. Darüber hinaus konnte die Wirksamkeit einer Fungizidapplikation zur Blüte mit dem Azol-haltigen Fungizid Input gegenüber einem Befall mit Ährenfusariosen im Vergleich mit unbehandelten Varianten untersucht werden.

Für die Varianten wurden zur weiteren Darstellung Abkürzungen verwendet. Dabei stehen die ersten Buchstaben in der Variantenbezeichnung „W“ bzw. „NW“ für die wendende bzw. die nicht-wendende Bodenbearbeitung, die zweiten Buchstaben „M“ oder „F“ für Monokultur bzw. Fruchtfolge und bei den Ziffern am Ende steht eine „0“ für unbehandelt und eine „1“ für eine Fungizidapplikation mit Input zur Blüte.

Der Einfluss der Fungizidbehandlung mit Input zur Blüte (BBCH 61-65) führte außer in den Varianten mit wendender Bodenbearbeitung bei der Sorte EMPIRE zu signifikant geringeren Befallszahlen der Blattscheiden von Fahnenblättern mit *Fusarium* spp. (Abb. 2). Dies weist allerdings auch darauf hin, dass entweder die Fungizidapplikation etwas früher als angegeben oder die Probenahme etwas später stattfand. Allgemein war die Befallssituation als gering einzustufen.

Im *Fusarium*-Artenspektrum war auch am Standort 2 in Ottenhausen *F. graminearum* die dominierende *Fusarium*-Art. Daneben kamen auch *F. avenaceum* und *F. tricinctum* an den befallenen Blattscheiden von Fahnenblättern zum Ährenschieben vor.

Der deutliche Einfluss der Fungizidbehandlung auf den Befall der Blattscheiden von Fahnenblättern zum Ährenschieben mit *Fusarium* spp. ließ sich an den geernteten Weizenkörnern nicht wieder finden. Alle Varianten zeigten einen schwachen *Fusarium*-Befall.

Im Artenspektrum traten überwiegend *F. tricinctum* und *F. graminearum* auf. Weiterhin konnte *F. avenaceum* und *F. culmorum* nachgewiesen werden.

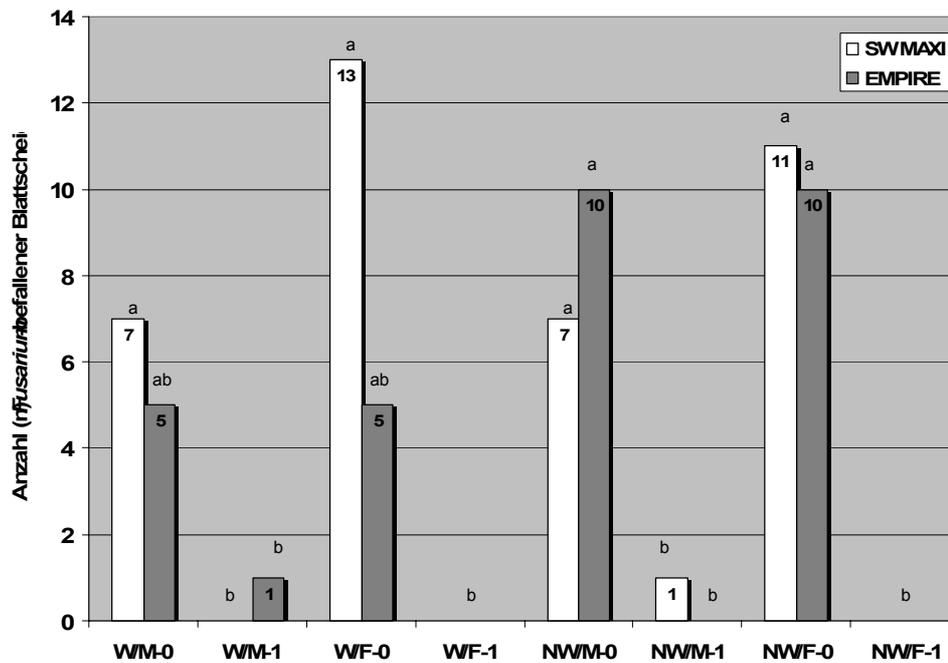


Abb. 2: Anzahl der in den Direktnachweisen mittels Agar-Test mit *Fusarium* spp. befallenen Blattscheiden von Fahnenblättern der Weizensorten SW MAXI und EMPIRE zum Ende des Ährenschiebens (BBCH 59) am Standort 2 ($n_{\text{gesamt}} = 25$ Blattscheiden/Variante).

Im Mykotoxinnachweis mittels HPLC wurde nur DON in relativ geringen Konzentrationen bis zu 215 µg/kg nachgewiesen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass die wendende Bodenbearbeitung bei Vorrucht Weizen gegenüber der nicht-wendenden Bodenbearbeitung im Untersuchungsjahr keinen Vorteil in Bezug auf den *Fusarium*-Befall sowohl der Blattscheiden von Fahnenblättern zum Ährenschieben als auch der geernteten Weizenkörner erbrachte. Außerdem zeigte der Anbau des Weizens in Monokultur sowie in viergliedriger Fruchtfolge im Versuchsjahr ebenfalls keinen Einfluss auf den *Fusarium*-Befall und den DON-Gehalt. Zudem wiesen die Varianten beider Sorten mit einer Applikation des Azol-haltigen Fungizids Input zur Blüte gegenüber den unbehandelten Varianten bei nicht-wendender Bodenbearbeitung um 40-75% geringere DON-Gehalte in den Weizenkörnern auf.

Autoren

Dipl.-Ing. Tim HIRSCHFELD, Dr. Monika GOSSMANN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin;

Dr. Frank M. ELLNER, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin

Verringerung der *Fusarium*- und Mykotoxinbelastung durch Sortenwahl: Ergebnisse bei Getreide

Reduction of fusarium and mycotoxins by different varieties: results in cereals

M. OBERFORSTER & R. ÖHLINGER

Summary

The VCU-testing on winter wheat of the years 2004 (5 trials, 15 varieties) and 2006 (3 trials, 14 varieties) were analysed. The infestation by *fusarium* is mostly well reproducible in different environments, the variety-ranking of the deoxynivalenol content vary more intensely. Only in 4 of 8 trials a significant intervarietal correlation ($r = 0,53^*$ to $r = 0,91^{**}$) between *fusarium* head blight and DON-exposure was found. However, the data base is still too low for further statements. Variety choice contributes to the decrease of mycotoxin exposure, but should not be overestimated in its importance.

Zusammenfassung

Es wurden Winterweizen-Wertprüfungen der Jahre 2004 (5 Versuche, 15 Sorten) und 2006 (3 Versuche, 14 Sorten) untersucht. Der Fusariumbefall ist über die Umwelten meist gut reproduzierbar, die Sortenrangfolgen beim Gehalt an Deoxynivalenol variieren stärker. Lediglich in 4 von 8 Versuchen war intervarietal ein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,53^*$ bis $r = 0,91^{**}$) zwischen Ährenfusarium (Bonitur) und DON-Belastung gegeben. Für weitergehende Aussagen ist die Datenbasis allerdings noch zu gering. Sortenwahl trägt zur Senkung der Mykotoxinbelastung bei, soll in ihrer Bedeutung aber nicht überschätzt werden.

Schlüsselwörter: Ährenfusarium / *fusarium* head blight, Deoxynivalenol / DON, Weizensorten / wheat varieties

Einleitung

Der Befall des Weizens und anderer Getreidearten durch Ährenfusarium (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum*) und die daraus resultierende Toxinbelastung des Korngutes hat große Aktualität erlangt. Das Gefährdungsrisiko ist infolge reduzierter Bodenbearbeitung gestiegen. Dem hat die EU-Kommission im Jahr 2005 durch Festlegung von Höchstgehalten für Mykotoxine Rechnung getragen (1250 µg/kg für unverarbeiteten Weizen). Fungizide wie Folicur (Tebuconazole), Caramba (Metconazol), Pronto plus (Tebuconazole, Spiroxamine) oder Input Set (Prothioconazole, Spiroxamine) entfalten nur eine begrenzte Wirkung. Wesentliche Bedeutung kommt den Vorbeugemaßnahmen Fruchtfolge, Förderung der Strohhrotte, wendende Bodenbearbeitung nach Vorfrucht Mais sowie der Wahl wenig anfälliger Sorten zu (Meier 2003, Anonymus 2006).

Material und Methoden

Wertprüfungsversuche von Winterweizen (3 bis 4 Wiederholungen, Parzellenfläche 9,6 bis 13,5 m²) im Seewinkel (Albrechtsfeld), im Bezirk Bruck/Leitha (Gerhaus), im Bezirk Tulln (Staasdorf), im Alpenvorland (Pultendorf bei St. Pölten, Ritzlhof bei Linz) und im Südburgenland (Eltendorf im Bez. Jennersdorf) bilden die Grundlage. Vorfrüchte waren Körner- bzw. Silomais, Winter- raps und Zuckerrübe. Im Feuchtgebiet wurden die Versuche nach einer Herbstfurche angelegt, in Trockenlagen erfolgte die Grundbodenbearbeitung mittels Scheibenegge oder Grubber. Häufigkeit und Stärke des natürlich aufgetretenen Fusariumbefalls wurden nach dem Schema 1 bis 9 (Visuelle Schätzung ausgebleichter Ährenanteile, 1 = kein Befall, ... 9 = sehr starker Befall) in einer Note zusammengefasst. Von 16 bzw. 14 Genotypen wurde der Gehalt an Deoxynivalenol (µg/kg lufttrockene Erntegut-Mischprobe) nach dem HPLC-Verfahren bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Witterung, Anfälligkeit des Weizens und Inokulumpotenzial bestimmen den Infektionsdruck, der einen Ährenbefall verursachen kann. Vorfrucht und Bodenbearbeitung beeinflussen direkt die Höhe des Inokulumpotenzials (Rodemann und Bartels 2003). Besonders sensitiv für Infektionen ist der Weizen während der Blüte. Der Fusariumbefall ist über die Umwelten meist gut reproduzierbar. Allerdings dürften die Boniturdaten teilweise von Symptomen des Nichttoxinbildners *Microdochium nivale*, welche makroskopisch jenen von *Fusarium graminearum* gleichen, beeinflusst sein. Dies könnte die in einigen Versuchen (Ritzlhof1, Ritzlhof 2) trotz massiver Schadbilder geringen Toxin- gehalte erklären.

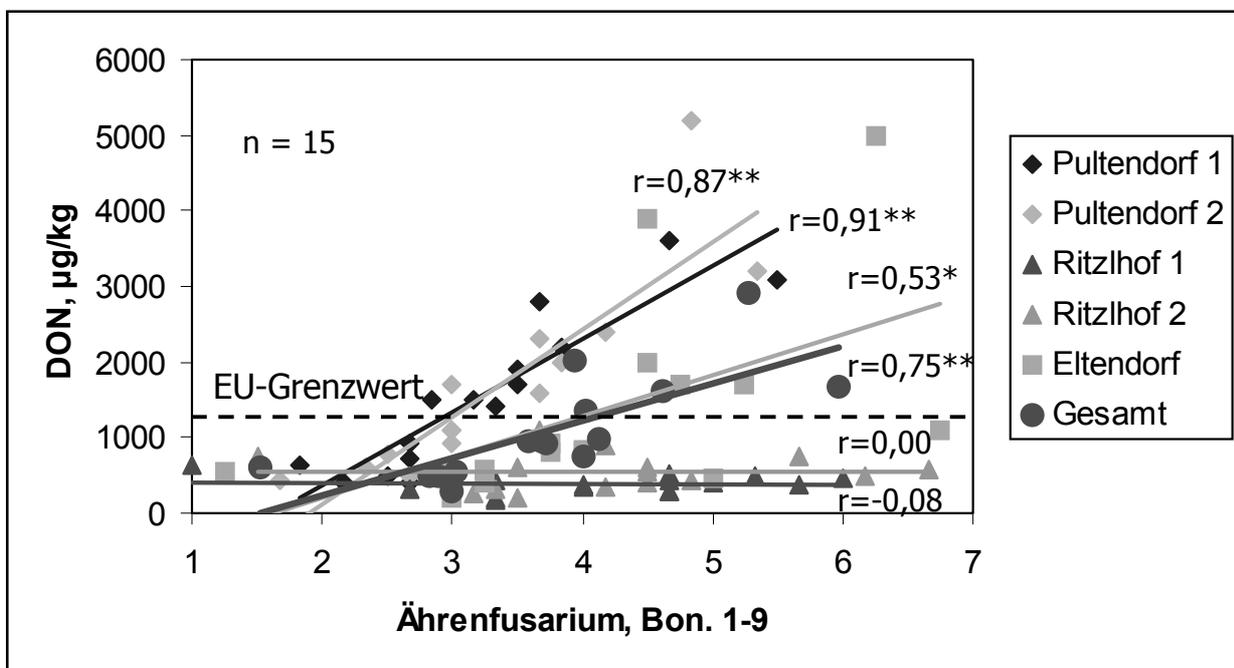


Abbildung 1: Winterweizen Feuchtlagen – Intervarietale Beziehung zwischen Ährenfusarium (visuelle Bonitur) und DON-Gehalt (5 Versuche 2004, 15 Sorten)

Formen der genetisch-physiologischen Fusariumresistenz

Verschiedene Resistenztypen (Eindringresistenz, Ausbreitungsresistenz usw.) sind in der Literatur beschrieben (Rodemann und Bartels 2003). Diese wirken sich auf die Beziehung zwischen Symptom und Toxingehalt aus. Annähernd normal ausgebildete Körner können mitunter höhere Toxinwerte aufweisen, als Schrumpfkörner. Wenn ein Ährenanteil durch Unterbrechen der Leitbündel rasch abstirbt, kann sich der Pilz nicht mehr weiterentwickeln, die Toxinbildung unterbleibt.

Morphologische Faktoren und Fusariumresistenz

Im kurzhalmigen Sortiment findet sich eine Häufung von Genotypen mit hoher Anfälligkeit, die Beziehung ist aber nicht eng. Beispielsweise sind die Kurzstrohweizen Chevalier, Philipp, Plutos, Renan und Toras in der österreichischen Sortenliste mit Noten 3 (gering anfällig für Fusarium) oder 4 (gering bis mittel anfällig) eingestuft. Auch die Länge des obersten Internodiums, die Ährendichte (Zahl der Ährchen bezogen auf die Spindellänge) und die Stellung des Fahnenblattes (überhängend oder aufrecht) dürften Einfluss nehmen.

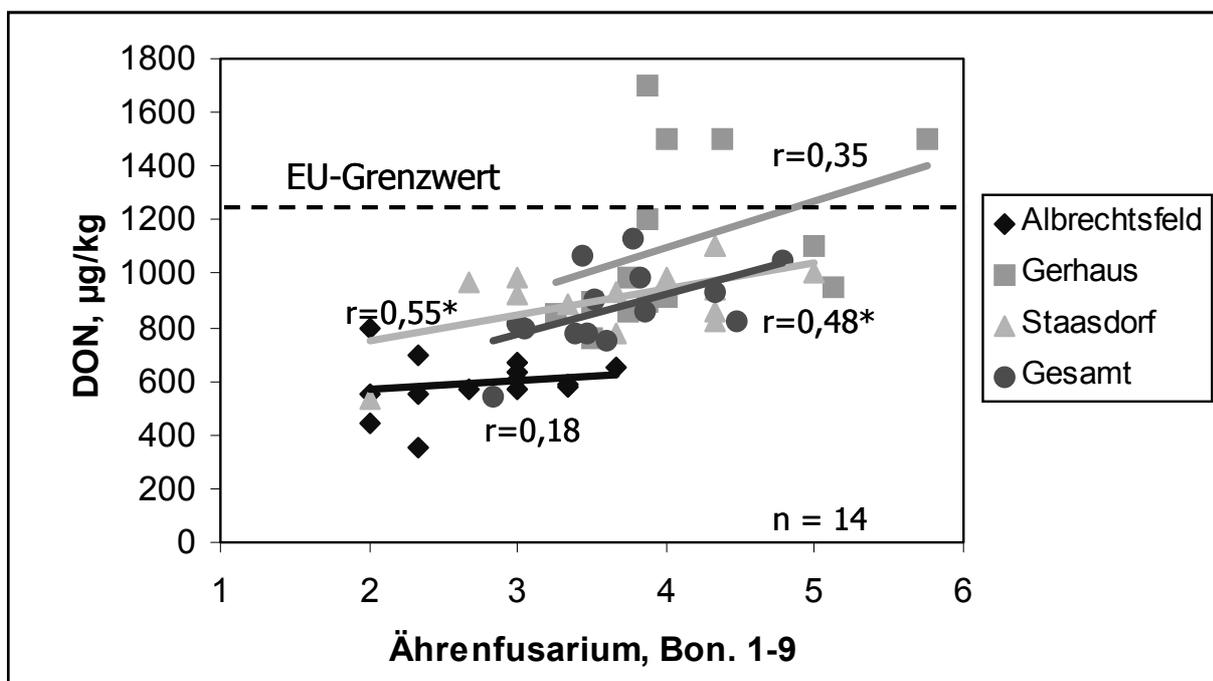


Abbildung 2: Winterweizen Trockengebiet – Intervarietale Beziehung zwischen Ährenfusarium (visuelle Bonitur) und DON-Gehalt (3 Versuche 2006, 14 Sorten)

Fusariumbefall und DON-Gehalt

Wosnitza et al. (2000), Zimmermann (2003) und Spanakakis (2003) geben eine enge Beziehung zwischen (relativem) Fusariumbefall und Toxinbelastung an, bei Hermann et al. (1998) und Hecker et al. (2004) ist nur ein loser Zusammenhang gegeben.

In der Versuchsserie 2004 (Feuchtlagen, Abb. 1) traten mehrfache Überschreitungen des DON-Grenzwertes (Maximum 5200 µg/kg) auf. Im Mittel variierte der Befall von Note 1,5 bis 6,0 und die

DON-Werte von 296 bis 2916 µg/kg (n = 5). Lediglich in Pultendorf1 (ohne Fungizideinsatz), Pultendorf2 (Einsatz eines Strobilurinfungizids) und Eltendorf war mit $r = 0,53^*$ bis $r = 0,91^{**}$ eine signifikante Beziehung gegeben. Die höchsten DON-Gehalte zeigten Tulsa, Globus, Winnetou, Manhattan und Kerubino. Niedrige Werte wurden bei Antonius, Capo, Erla Kolben, Astaro und Vitus gemessen. In der Serie 2006 (Trockengebiet, Abb. 2), mit einem gegenüber 2004 abweichenden Sortiment, war die Spannweite der Symptome kleiner und die DON-Belastung schwächer (Maximum 2500 µg/kg). Die intervarietale Korrelation zwischen Schadbild und Toxinkonzentration ist mit $r = 0,18$ n.s. bis $r = 0,55^*$ unbefriedigend. Überdurchschnittliche Gehalte wurden bei SW Maxi, Element, Capo und Manhattan festgestellt. Erla Kolben zeigte den geringsten Fusariumbefall und die niedrigste DON-Kontamination (n = 3).

Literatur

- Anonymus, 2006: Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 zur Prävention und Reduzierung von Fusarientoxinen in Getreide und Getreideprodukten (2006/583/EG). Amtsblatt der Europäischen Union L 234, 35-40.
- Hecker A., I. Bänziger, E. Jenny, H.-R. Forrer und S. Vogelsang, 2004: Weniger Fusarien-Toxin durch geeignete Sortenwahl? Agrarforschung 11 (9), 384-389.
- Hermann W., E. Kübler und W. Aufhammer, 1998: Ährenbefall mit Fusarien und Toxingehalt im Korngut bei verschiedenen Wintergetreidearten. Pflanzenbauwissenschaften 2 (3), 97-107.
- Meier A., 2003: Zur Bedeutung von Umweltbedingungen und pflanzenbaulichen Maßnahmen auf den *Fusarium*-Befall und die Mykotoxinbelastung von Weizen. Diss., Bonn.
- Rodemann B. und G. Bartels, 2003: Sortenwahl contra Ährenfusariosen. Getreidemagazin 8 (3), 152-156.
- Spanakakis A., 2003: Stand der Resistenzzüchtung gegen Fusarien bei Winterweizen. Gesunde Pflanzen 55 (5), 144-150.
- Wosnitza A., G. Zimmermann, J. Habermeyer und V. Zinkernagel, 2000: Methoden zur Bestimmung sortenunterschiedlicher Anfälligkeiten des Weizens gegen *Fusarium spp.* 52. Deutsche Pflanzenschutztagung, Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch. 376, 67.
- Zimmermann G., 2003: Zusammenhang zwischen *Fusarium*-Ährenbefall und Mykotoxingehalt bei Weizen. Mühle + Mischfutter 140 (15), 451.

Autoren:

Dipl.-Ing. Michael OBERFORSTER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Sortenwesen, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

Dr. Richard ÖHLINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz

Verringerung der *Fusarium*- und Mycotoxinbelastung durch Sortenwahl: Ergebnisse bei Mais

H. FELDER, G. DERSCH, M. PLANK & R. ÖHLINGER

In Grabenegg bei Melk und Gleisdorf wurden 2005 alle Maissorten des zweiten Wertprüfungsjahres inklusive aller Vergleichssorten in jeweils zweifacher Wiederholung in Parzellen mit etwa 100 Pflanzen angebaut. Diese 90 Hybriden wurden jeweils sowohl unter natürlicher als auch künstlicher Infektion auf Mycotoxinbelastung untersucht.

Zum Zweck der künstlichen Infektion wurde 1 ml einer definierten Erregersuspension aus zwei maisvirulenten *Fusarium*arten (*Fusarium gaminearum*, *Fusarium subglutinans*) mit einer Spritze im mittleren Kolbenbereich in den Bereich zwischen Lieschblätter und Kolben injiziert. Die Infektion erfolgte nach der Befruchtung im Zeitraum von der beginnenden Kornbildung bis zur frühen Milchreife. Für das gesamte Sortiment von Reifezahl 200 bis 440 wurden fünf Infektionstermine mit einer Woche Abstand gewählt. Entsprechend erfolgte die zeitlich versetzte Bonitur und Ernte der Kolben für die Laboruntersuchung. Beurteilt wurde die Ausbreitungsresistenz mittels Schätzung der verpilzten Fläche jedes Kolbens. Das geschieht durch Zählung der befallenen Körner und Umschlüsselung auf die gesamte Kolbenoberfläche. Die vom Maiszünsler „befallene“ Fläche wird herausgerechnet. Zu diesem Zweck werden die Lieschen auf Bohrlöcher untersucht.

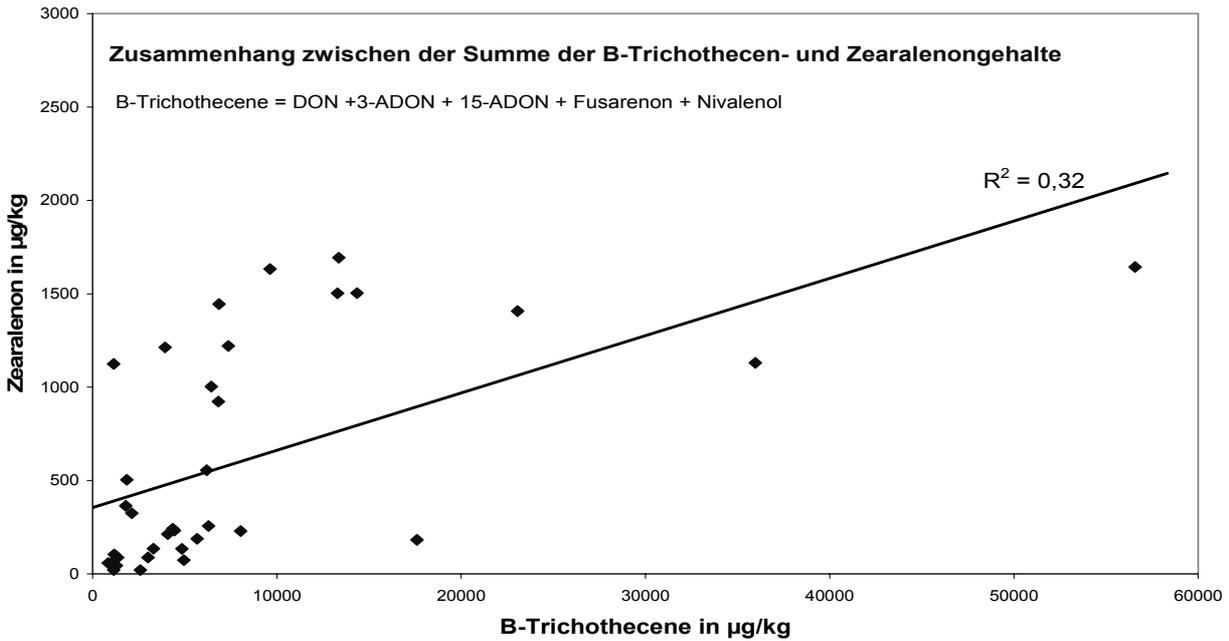
Von den beiden Wiederholungen wurde von jeder Sorte eine Mischprobe von ca. 1 kg schonend getrocknet, kühl gelagert und für die Laboruntersuchungen bereitgestellt. Auch aus allen vier Reifegruppen von mehreren Wertprüfungsstandorten des Sortenzulassungsverfahrens wurden Mischproben aus den jeweils drei Wiederholungen pro Standort gezogen. Eine zeitaufwendige visuelle Beurteilung fand hier nicht statt.

DON-Gehalte der Sorten

Bei natürlicher Infektion wurde der Grenzwert für Futtermittel-Ausgangserzeugnisse von 8000 µg/kg (grau, fett) in allen Proben deutlich unterschritten; maximal wurden bei einer Sorte 61% des erlaubten Gehaltes ermittelt. Bei 9 % der untersuchten Proben trat eine Überschreitung des geplanten Lebensmittel-Grenzwertes von 1750 µg/kg auf (fett). 80% der Proben erfüllen die Kriterien für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine (bis 900 µg/kg).

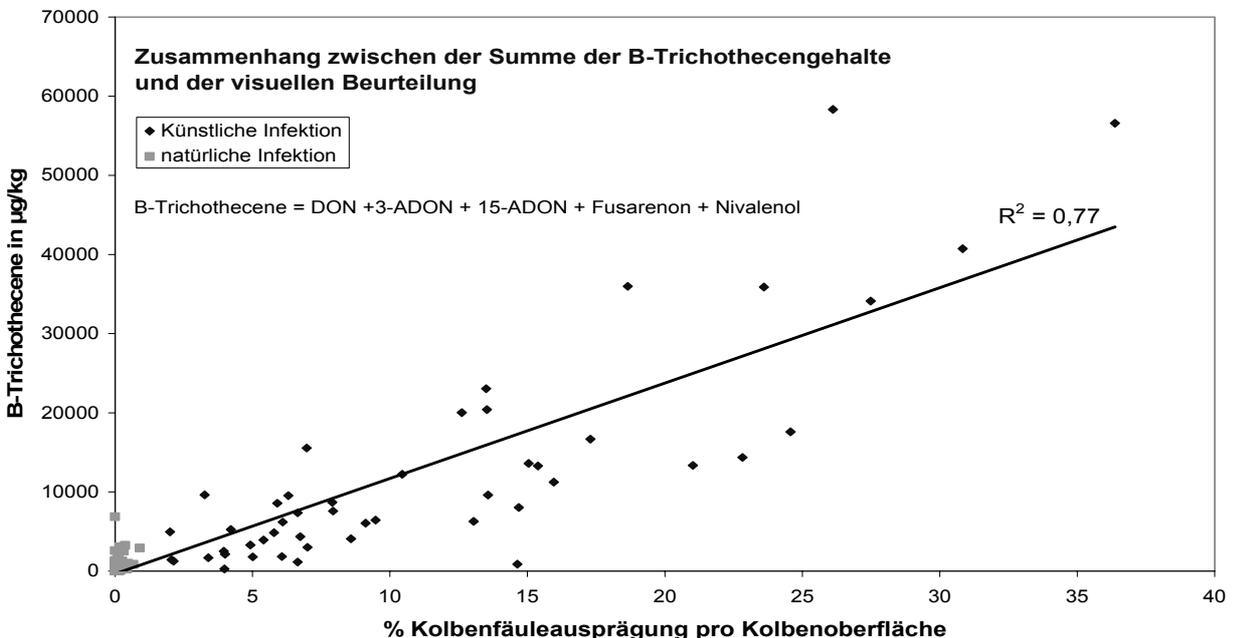
Die künstliche Infektion weist deutlich überhöhte Werte auf.

Zusammenhang zwischen den B-Trichothece- und ZON-Gehalten



Höhere Zusammenhänge als zwischen den DON- und ZON-Gehalten wurden zwischen der Summe der B-Trichothece- und den ZON-Gehalten gefunden. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,32, das für DON- und ZON-Gehalte 0,15. Die eher zufällige Verteilung der Werte zeigt, dass man auf eine Zearalenon-Analyse nicht verzichten kann.

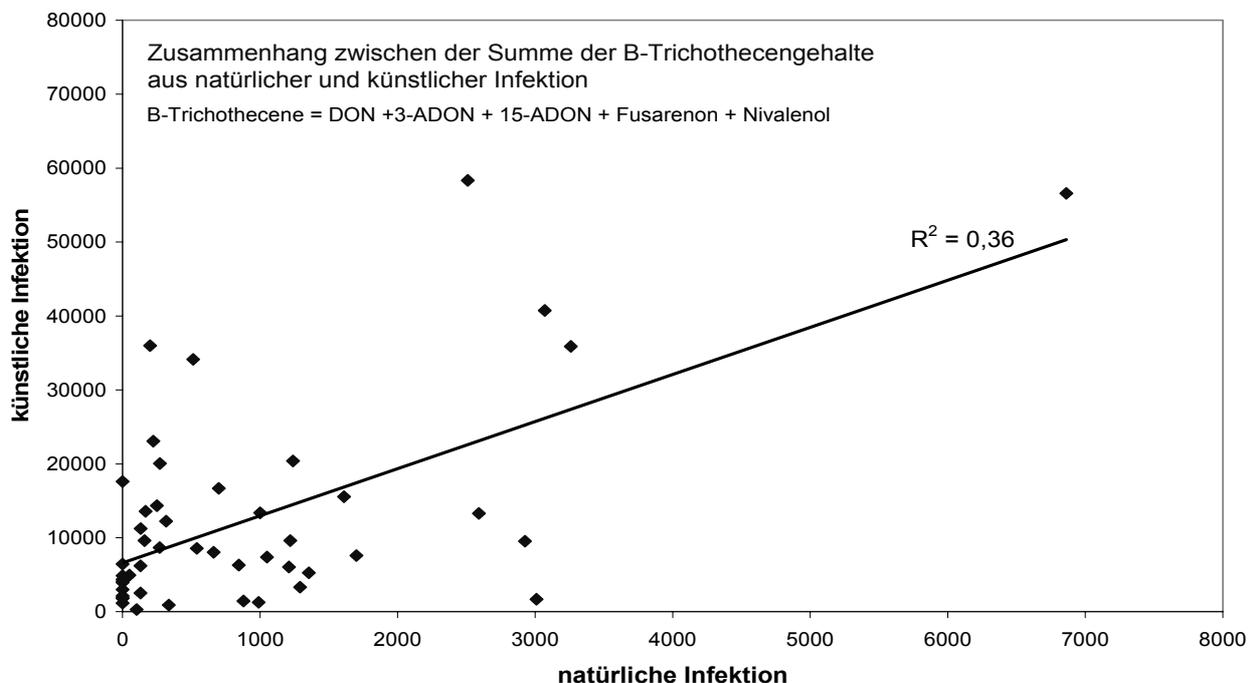
Zusammenhang zwischen den Analysenwerten und der visuellen Bonitur



Eine hohe Korrelation von $r = 0,88$ zwischen der visuellen Beurteilung der Befallsfläche am Feld nach dem Öffnen der Lieschblätter und den Laborgehalten der B-Trichothece bestätigt für das Beobachtungsjahr 2005 die Sinnhaftigkeit der Beurteilung der Befallsfläche der einzelnen Kolben. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,77.

Schließt man die praxisfremden hohen Befallswerte der künstlichen Infektion und mögliche Verzerrungen hieraus in der Betrachtung aus und stellt nur durchschnittliche Befallswerte bis 10 % der Kolbenoberfläche den entsprechenden Gehalten an B-Trichotheceinen gegenüber, zeigt sich immer noch eine deutliche Abhängigkeit zur visuellen Bonitur. Das Bestimmtheitsmaß beträgt immer noch 0,49.

Zusammenhang zwischen natürlicher und künstlicher Infektion



Der Vergleich der Summe der B-Trichotheceine-Gehalte aus der natürlichen und der künstlichen Infektion zeigt, daß Sorten mit höherer Anfälligkeit im Beobachtungsjahr nur in wenigen Fällen bereits über das Befallsausmaß unter natürlichen Bedingungen erkannt werden können. Die ca. 25 % der Proben, die unter natürlichen Bedingungen keine nachweisbaren Infektionen aufweisen, zeigen auch unter künstlicher Infektion die niedrigsten Werte.

Zusammenfassend läßt sich nach einem Beobachtungsjahr feststellen, daß sich durch eine entsprechende Sortenwahl das Risiko erhöhter Toxingehalte der Maiskörner vermindern läßt. Besonders einzelne Sorten erweisen sich als überdurchschnittlich anfällig bzw. resistent.

Autoren:

Dipl.-Ing. Hans FELDER, Dipl.-Ing. Dr. Georg DERSCH, Ing. Martin PLANK, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien
Dr. Richard ÖHLINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz

Selektive Probenvorbereitung mit Sol-Gel-Immunoaffinitätssäulen zur Bestimmung von Deoxynivalenol

Selective sample preparation with sol-gel immunoaffinity columns for the analysis of deoxynivalenol

ZDENKA BRENN-STRUCKHOFOVA, MARGIT CICHNA-MARKL, CHRISTINA BÖHM & E. RAZZAZI FAZELI

Summary:

A new sample preparation method based on sol-gel immunoaffinity chromatography was developed for the analysis of DON in food and feed samples. In applying the method for the analysis of maize, wheat, and spaghetti samples, it offers detection limits (LOD, $s/n=3$) of 240, 200, and 207 ng/g and recoveries of 83, 99, and 97%, respectively.

Key words: deoxynivalenol, immunoaffinity chromatography, sol-gel technology, sample preparation

Zusammenfassung:

Es wurde eine neue Probenvorbereitungsmethode, basierend auf der Sol-Gel Immunoaffinitätschromatographie, für die Bestimmung von Deoxynivalenol in Lebens- und Futtermitteln entwickelt. Diese wurde an Weizen- Mais- und Spaghettiprobe getestet. Die Wiederfindungen lagen bei 83% für Mais, 99% für Weizen und 97% für Spaghetti. Die Nachweisgrenzen für die einzelnen Matrices betragen 204 ng/g (Mais), 200 ng/g (Weizen) und 207 ng/g (Spaghetti).

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol, Immunoaffinitätschromatographie, Sol-Gel-Technologie, Probenvorbereitung

Einleitung

Deoxynivalenol (DON) gehört zur Gruppe der Mykotoxine und wird von den Schimmelpilzen *F. culmorum* und *F. graminearum*, produziert, die in einer Vielzahl von Getreidearten vorkommen (z.B. in Weizen, Mais, Gerste, Hafer und Roggen). DON ist der häufigste Vertreter der Klasse der B-Trichothecene und gleichzeitig auch das am häufigsten vorkommende Mykotoxin in Europa und Nord Amerika [1]. Um den DON-Gehalt in Lebensmittelproben analysieren zu können, muss eine geeignete Probenvorbereitungsmethode angewendet werden. Zu den am häufigsten verwendeten Probenvorbereitungsmethoden in der DON-Analytik gehören die Flüssig/Flüssig Extraktion, die Festphasenextraktion und die Immunoaffinitätschromatographie [2].

In der Immunoaffinitätschromatographie werden Säulchen verwendet, in denen analytspezifische Antikörper in einer Matrix immobilisiert sind.

Die Immobilisierung von Antikörpern ist ein kritischer Schritt, da dadurch die Eigenschaften der Proteine beeinflusst werden können. In kommerziellen DON-Immunoaffinitätssäulen sind die Anti-

körper kovalent an ein Trägermaterial, meistens Sepharose, gekoppelt. Die kovalente Bindung von Biomolekülen kann jedoch zu einer Änderung der Proteinkonformation führen, die ihrerseits wieder die Bindungseigenschaften des Proteins beeinträchtigt.

Dieser Nachteil kann weitgehend verhindert werden, wenn die Biomoleküle physikalisch in eine poröse Matrix eingeschlossen werden. Eine Methode, mit der Proteine unter sehr milden Bedingungen bei Raumtemperatur physikalisch eingeschlossen werden können, ist die Sol-Gel Methode.

Das Prinzip der Immobilisierung der Antikörper mittels der Sol-Gel Methode beruht auf dem Einschluss der Antikörper in ein Silikatgerüst. In der Vorbereitungsphase wird ein Silikathydrolysat (Sol) mittels saurer Hydrolyse hergestellt. Diesem Hydrolysat wird in weiterer Folge die Antikörperlösung zugesetzt und das Hydrolysat polymerisiert zu einem Gel aus. Während der Polymerisation verändert sich die Größe der Poren, in denen die Antikörper eingeschlossen sind, das bedeutet, dass die Porengröße über die Polymerisationsdauer gesteuert werden kann.

Ziel der Arbeit

Es sollten DON-Immunaффinitätssäulen mittels der Sol-Gel Methode hergestellt, charakterisiert und ihre Anwendbarkeit zur Aufarbeitung von Realproben (Weizen, Mais und Spaghetti) geprüft werden. Weiters sollten die Stabilität und Wiederverwendbarkeit von Sol-Gel Säulen mit denen einer kommerziellen Immunaффinitätssäule verglichen werden.

Material und Methoden

Herstellung der Sol-Gel Säulen

Die Methode zur Herstellung der Säulen wurde bereits in einer früheren Arbeit publiziert [3]. Zur Herstellung der Säulen wurden monoklonale DON-Antikörper verwendet.

Probenauffreinigung mit Sol-Gel Säulen

Die Sol-Gel Säule wurde mit 5 ml des Probenfiltrats beladen, mit 10 ml 1% MeOH gewaschen und DON mit einer 40%igen wässrigen ACN Lösung von der Säule eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Eluat mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt. 100 µl des Eluats wurden in das HPLC-System injiziert.

Probenauffreinigung mit DONPREP Säulen

Die DONPREP Säulen (R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) wurden gemäß den Instruktionen des Herstellers verwendet.

Ergebnisse

Entwicklung der Methode

Im ersten Teil der Studie wurden die Sol-Gel Säulen mit DON-Standardlösungen charakterisiert und die Methode im Hinblick auf eine möglichst hohe Effizienz und Wiederverwendbarkeit der Säulen optimiert. Nach der Bestimmung der Bindungskapazität der immobilisierten Antikörper wurden folgende Parameter optimiert. pH-Wert und Konzentration an organischem Lösungsmittel im Aufgabemedium, ACN-Konzentration im Elutionsmittel, benötigtes Elutionsvolumen und Fließgeschwindigkeiten in den einzelnen Schritten.

Aufarbeiten von Realproben

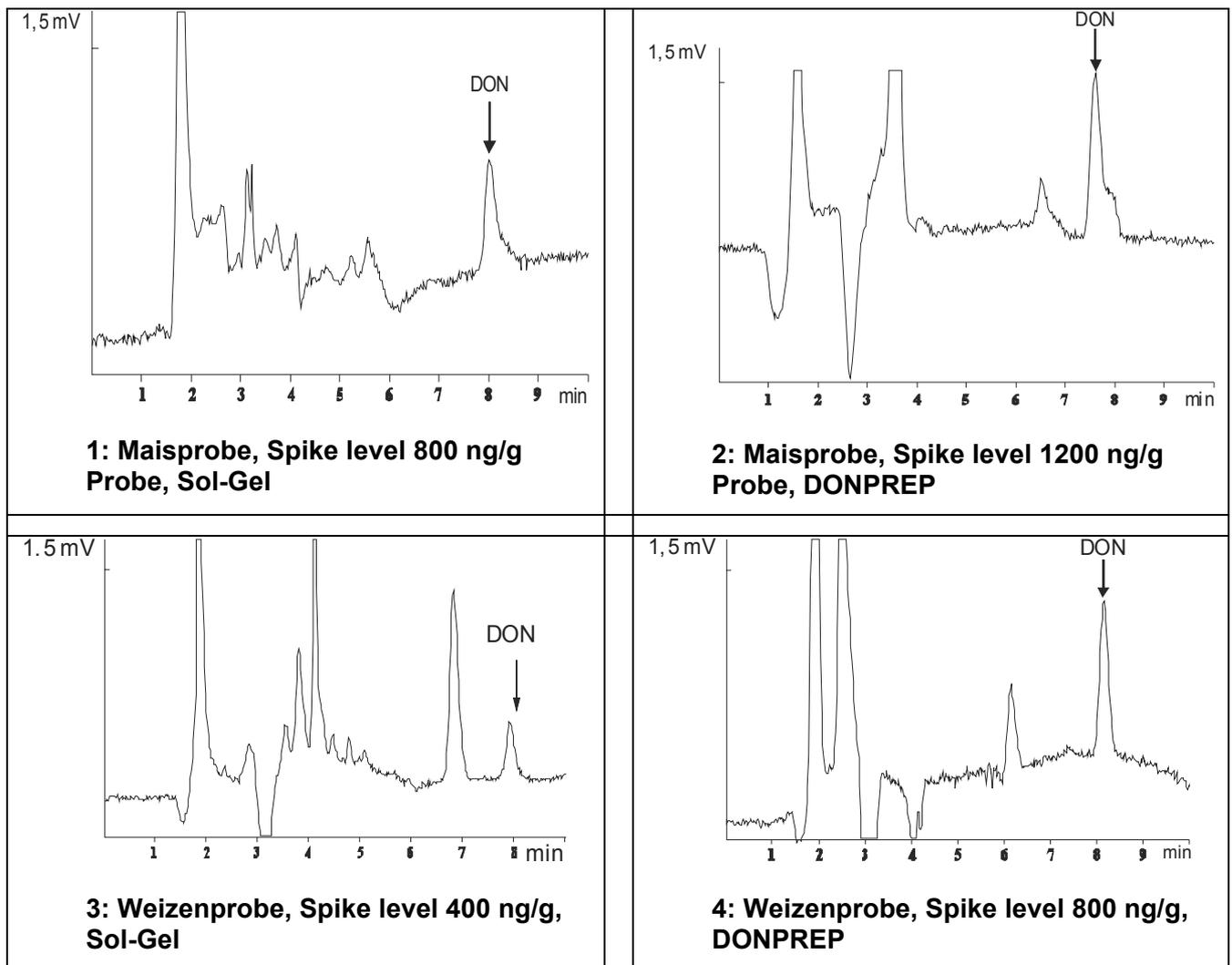
Aus den ersten Versuchen mit Realproben ist ersichtlich geworden, dass die Anwesenheit von Probenmatrixbestandteilen die Bindungskapazität der Säulen herabsetzt. Weiters war es notwendig, die Aufgabegeschwindigkeit zu reduzieren. Aus dem Vergleich der Chromatogramme, die nach der Probenaufarbeitung mit Sol-Gel Säulen und mit DONPREP erhalten wurden, wurde deutlich, dass auch der Waschschrift noch optimiert werden musste. Diverse Waschlösungen [4] (Zusatz von Detergentien oder organischen Lösungsmitteln) wurden getestet, die optimierte Methode ist im experimentellen Teil angeführt.

Die Wiederfindung der Methode wurde mittels der Standardaddition (4 Spikelevels) bestimmt. Die Wiederfindungen und die Nachweisgrenzen ($s/n=3$) für die untersuchten Probenmatrizes sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: DON-Wiederfindung und Nachweisgrenzen (LOD) für die untersuchten Matrizes

Probe	Ausbeute [%]	Standardabweichung [%]	LOD[ng/g] ($s/n=3$)
Mais	83,2	2,3	240
Weizen	99,0	2,1	200
Spaghetti	96,6	3,4	207

Mit der entwickelten Methode wurden die Chromatogramme in den Abbildungen 1 und 3 erhalten. Zum Vergleich sind in den Abbildungen 2 und 4 Chromatogramme dargestellt, die nach Aufarbeitung mit der DONPREP Säule erhalten wurden. Man sieht, dass die Sol-Gel Säulen in der Effizienz der Matrixabtrennung mit den kommerziell erhältlichen DONPREP Säulen vergleichbar sind.



Die Sol-Gel Säulen erwiesen sich als äußerst stabil, sie konnten nach dem Gebrauch regeneriert und bis zu 25 mal wieder verwendet werden. Außerdem können sie sowohl bei 4°C als auch bei Raumtemperatur gelagert werden und das in einem Zeitraum über mehrere Monate ohne Zusatz eines Bakterioantikums. Die detaillierten Ergebnisse dieser Studie werden in der Zeitschrift Analytical Chemistry veröffentlicht, die Arbeit befindet sich im Druck.

Literatur

- [1] Canady R.A.; Coker R.D.; Egan S.K.; Krska R.; Kuiper-Goodman T.; Olsen M.; Pestka J.; Resnik S.; Schlatter J. FAO Food and Nutrition Paper (2001), 74, 419-555.
- [2] Krska R., Baumgartner S., Josephs S. Fresenius J. Anal. Chem (2001) 371, 285-299.
- [3] Braunrath R.; Cichna M. J. Chromatogr. A (2005), 1062, 189-98.
- [4] Cichna M, Markl P., Knopp D., Niessner R., Chem. Mater (1997), 9, 2640-2646.

Autoren:

Zdenka BRENN-STRUCKHOFOVA, Dr. Margit CICHNA-MARKL, Institut für Analyt.Chemie und Lebensmittelchemie, Währingerstrasse 38, A-1090 Wien

Mag. Christina BÖHM, Vet. Med. Univ. Inst. f. Ernährung, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Ao.Prof.Dr. Ebrahim RAZZAZI, Vet. Med. Univ. Inst. f. Ernährung, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Verifizierungsstrategien in der GC-Analytik von Trichothecenen

Strategies of verification in GC analysis of trichothecenes

W. BRODACZ

Zusammenfassung: Die Erhöhung der Selektivität ist der Schlüssel zu Verifizierung von Ergebnissen. Effizient und routinetauglich sind vor allem Selektivitätsverbesserungen bei der Gaschromatographie in Form von verbesserten Trennungen und/oder selektiver bzw. spezifischer Detektion. Für B-Trichothecene eignet sich die EC-Detektion mit unterschiedlich polaren GC-Phasen bzw. die GC/MS, welche besonders für Typ A-Trichothecene vorteilhaft ist.

Schlüsselwörter: Trichothecene, Selektivität, Optimierung, Zwei-Säulenteknik, GC/MS

Der zweifelsfreien Identifizierung von Mykotoxinen muss bei der Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln höchste Priorität eingeräumt werden. Bei rechtlich relevanten Ergebnissen ist auch die quantitative Absicherung von zentraler Bedeutung. Für die qualitative und quantitative Absicherung ist eine Erhöhung der Selektivität von Methoden erforderlich. Diese kann unterteilt werden in Selektivitätsverbesserungen vor bzw. bei der GC-Messung. Vor der GC-Analytik kann die Selektivität durch zusätzliche Reinigungsverfahren (Immunoaffinitätssäulen IAC) oder unterschiedliche parallele Derivatisierungsverfahren erhöht werden. Während IACs meist nur für einen (oder zwei) Analyten selektiv reinigen und nicht nur Verunreinigungen, sondern auch andere Mykotoxine aussondern, erhöhen unterschiedliche Derivate zwar den Informationsgewinn, reduzieren allerdings nicht die oft störende Matrixbelastung. Gemeinsam ist ihnen jedoch der zusätzliche personelle und materielle Aufwand.

Unterschiedliche Phasenpolaritäten

Selektive und empfindliche Detektion ist neben einer guten chromatographischen Trennung die Voraussetzung für quantitative Bestimmungen. Im Falle der B-Trichothecene ist der kostengünstige Elektron-Capture-Detektor (ECD) aufgrund der Carbonyl-Gruppe (C8) sowohl selektiv als auch sehr empfindlich (1). Mit Hilfe der computergestützten Optimierung und der GC-Simulation können effiziente Separationen erzielt werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei die parallele Chromatographie auf zwei möglichst unterschiedlichen GC-Phasentypen (2). Dies wird auch in einer EU-Richtlinie gefordert, wenn nichtspektroskopische Detektoren verwendet werden (3). Nach den langjährigen rückstandsanalytischen Erfahrungen des Autors sind Polaritätsunterschiede von nur 5% Phenylanteil (100% vs 95% Methyl-Polysiloxan) dafür meist nicht ausreichend (4). Ein Beispiel aus der Kontrollpraxis von Futtermitteln zeigt anhand einer Schweinemastfutterprobe in Abb. 1 die Notwendigkeit von zwei Kapillaren mit großer Polaritätsdifferenz. Während auf der polaren Phase Fusarenon X scheinbar exakt zur erwarteten Retentionszeit auftaucht, wird auf

der unpolaren Säule (unten) zur FusX-Zeit kein Peak registriert. Genau umgekehrt verhält es sich mit 3-Acetyl-DON. Würde man, wie in vielen Publikationen vorgeschlagen, nur mit der unpolaren Phase analysieren, käme ein Fehlgehalt von über 700 µg/kg 3-Acetyl-DON, bei alleiniger Verwendung der polaren Variante ein Fehlgehalt von 11.000 µg/kg Fusarenon X zustande. In der Praxis gilt für den Autor eine Substanz erst dann als nachgewiesen, wenn der Retentionszeit-Referenzpeak (Mirex) im erwarteten Bereich liegt (Aktualisierung der minimierten Erkennungsfenster für die Zielanalyten; „RT-Feinanpassung“) und der Zielanalyt auf beiden Säulen im jeweiligen Zentrum seines Identifizierungsfensters aufscheint.

Der doppelte Aufwand der Zwei-Säulentechnik wird aber nicht nur durch die gesteigerte Identifizierung gerechtfertigt, sondern auch durch den zusätzlichen Vorteil einer verbesserten Quantifizierung. Zwei unabhängige Kalibrierungen und Auswertungen lassen gerätespezifische Probleme schon im Ansatz erkennen.

Selektivität durch Massenspektrometrie

Der wichtigste Schlüssel für effiziente Verifizierungen lautet „Selektivität bei der Detektion“, und die effektivste Technik dafür ist die GC/MS. Selbst strukturverwandte Trichothecene zeigen deutliche Unterschiede in ihren EI-Spektren. Am Beispiel der Absicherung einer ungewöhnlichen Kontamination von Mais mit Fusarenon X zeigt sich der Selektivitätsgewinn mit der GC/MS-Technik. Bei hohen Belastungen steht mit aktuellen MS-Detektoren meist ausreichend Nachweisempfindlichkeit zur Verfügung, um Vollspektren aufnehmen zu können. Bei Übereinstimmung der Retentionszeiten (chromatographische Dimension) bestätigt der Vergleich mit Referenzspektren, die Identität des Zielanalyten zusätzlich in der spektroskopischen Dimension. Für die Absicherung von geringen Konzentrationen mittels GC/MS bedient man sich der deutlich empfindlicheren „Selected Ion Monitoring“-Methode (SIM). Anstelle großer Spektrenbereiche werden pro Zielanalyten zeitgesteuert drei charakteristische Ionen aufgezeichnet (4). Die Quantifizierung basiert meist auf dem aussagekräftigsten Ion (im Idealfall dem Molekularion), während die anderen Ionen als „Qualifier“ die Identität bestätigen (5). Deren Auswahl orientiert sich (je nach Signalstärke) am oberen Spektrenbereich. So sollten vom Molekularion ausgehend jene Fragmente gewählt werden, die sich durch charakteristische Abspaltungen direkt davon ableiten lassen und gute Signal/Rausch-Verhältnisse zeigen. Mit der SIM-GC/MS stehen durch die Selektivitätssteigerung auch bei sehr matrixbelasteten Messlösungen gut auswertbare und störungsfreie Chromatogramme zur Verfügung (Abb. 2).

Die Identität einer Verbindung gilt dabei als gesichert, wenn

- alle charakteristischen SIM-Ionen deckungsgleich im Zentrum des erwarteten Retentionsfensters vorhanden sind
- und die Flächenverhältnisse der SIM-Peaks denen des Vergleichsstandards entsprechen (Abb. 3).

Der Einsatz von isotopenmarkierten internen Standards ist ein weiterer wichtiger Beitrag zur Verbesserung der Quantifizierung mittels GC/MS.

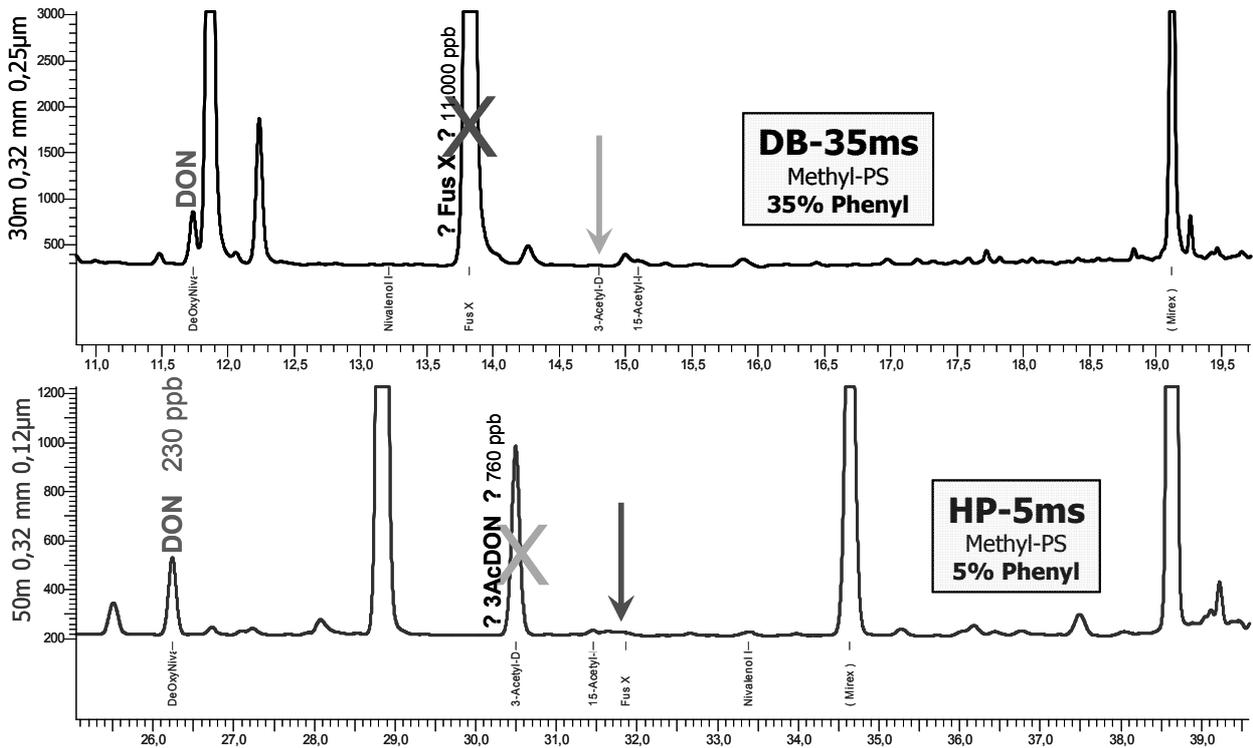


Abb. 1: ECD-Chromatogramme eines Schweinemastfutters auf 2 unterschiedlichen Phasenpolaritäten

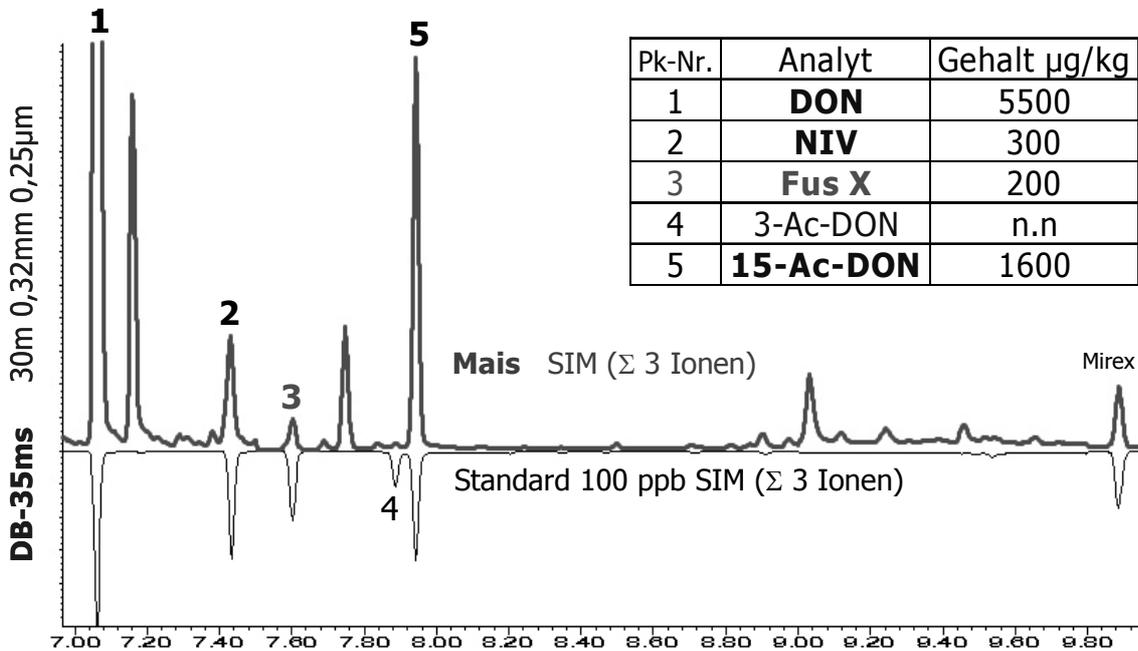


Abb. 2: Gegenüberstellung der GC/MS-Chromatogramme von Realprobe und Kalibrierstandard

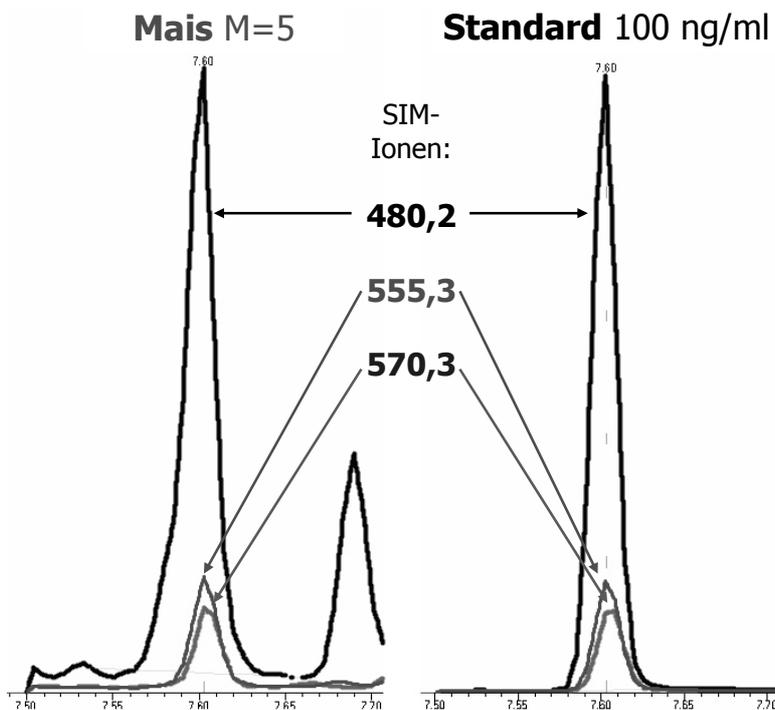


Abb. 3: Exakte Übereinstimmung der Retentionszeiten und der SIM-Ionenverhältnisse von Fusarenon X zwischen einer Maisprobe und dem Kalibrierstandard

Literatur:

- (1) Krska R., Baumgartner S., Josephs R.; „The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals“; Fresenius J. Anal Chem; 371; 285-299; 2001
- (2) W. Brodacz, „Auswahl von GC-Phasen und Optimierung von Trichothecen-Trennungen mittels Computersimulation“, Mycotoxin Research Vo. 21, No. 1, S11-14, 2005
- (3) Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen; (2002/657/EG)
- (4) W. Brodacz, „Vergleich und Kombination von GC-Phasen“, LaborPraxis LP 4, S 48 – 53; April 2004
- (5) W. Brodacz, „Verifizierungsstrategien in der GC-Rückstandsanalytik“, LaborPraxis LP3, S 36 - 39; März 2003

Autor:

Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ, AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum "Cluster Chemie Linz", A-4020 Linz Wieningerstrasse 8, Email: wolfgang.brodacz@ages.at

Einsatz eines isotopenmarkierten internen Standards in der GC/MS-Analytik von DON

Use of an isotope labeled internal standard for GC/MS analysis of DON

W. BRODACZ

Zusammenfassung:

Eine isotopenmarkierte Substanz ist aufgrund praktisch gleicher physikalisch/chemischer Eigenschaften der ideale interne Standard für dessen nativen Analyten.

Der Einsatz der Isotopenverdünnungsanalytik ist daher ein wichtiger Beitrag zur Verbesserung der Quantifizierung mittels GC/MS. Für die Analytik von Deoxynivalenol wurde ein vollständig ¹³C-markiertes DON als interner Standard praktisch erprobt und bei einem FAPAS-Profiency test mit sehr gutem Erfolg eingesetzt.

Schlüsselwörter: Trichothecene, isotopenmarkierter interner Standard, GC/MS, Isotopenverdünnungsanalytik

Interne Standards

Interne Standards (IStd) sind Referenzsubstanzen, die der Messlösung (vor der GC-Bestimmung) bzw. der Probe (vor/bei der Aufarbeitung) in definierten Mengen zugesetzt werden. In ihrer Hauptfunktion dienen sie zur Quantifizierung nach der klassischen internen Standardauswertung, zusätzlich eignen sie sich auch noch als Retentionszeit-Referenzen. Im Zuge der Kalibrierung wird das Verhältnis der Peakflächen von Zielanalyten und internem Standard ermittelt und in Beziehung zur Konzentration der Zielanalyten gesetzt.

Da das Flächenverhältnis maßgeblich für die Umrechnung in Konzentrationsergebnisse ist, verursachen schwankende Injektionsvolumina zwischen Kalibrierlösung und Probenlösung keine Quantifizierungsfehler. Durch eine präzise Zugabe gleicher Mengen des internen Standards sowohl zu den Kalibrierlösungen als auch zu den Proben, vor oder während der Aufarbeitung, können Unregelmäßigkeiten bei volumetrischen Manipulationen, welche die Quantifizierung beeinflussen würden, ausgeglichen werden. Letztlich dabei sollten die Messlösungen und Kalibrierlösungen gleiche Konzentrationen des internen Standards aufweisen (1).

Isotopenverdünnungsanalytik

Voraussetzung für die Eignung als interner Standard ist ein möglichst identes physikalisch/chemisches Verhalten von internem Standard und Zielanalyten. Dieser Forderung werden isotopenmarkierte Zielanalyten am ehesten gerecht. Sie verhalten sich bei Aufarbeitung, Derivatisierung und im GC gleich, werden aber bei der MS-Detektion durch die unterschiedlichen Molekulargewichte differenziert. Selbst der bei der Trichothecen-Analytik unter bestimmten Umständen

auftretende sog. „matrix induced response enhancement“-Effekt kann damit kompensiert werden (2).

Zur Markierung (d.h. dem Einbau schwererer stabiler Isotope) bieten sich ^{13}C -Atome und die Deuterierung an. Während unter ungünstigen Umständen ein Deuteriumaustausch bei manchen Probenmatrizes stattfinden kann, liegt der Nachteil bei der ^{13}C -Markierung lediglich auf der Kostenseite. Ein für die massenspektrometrische Bestimmung von Deoxynivalenol (DON) und weiterer Trichothecene dringend notwendiger interner Standard ist nun mit dem vollständig ^{13}C -markierten DON kommerziell bei der Fa. Biopure erhältlich.

EI-MS und SIM-Auswahl

Je höher der Markierungsgrad, desto größer sind üblicherweise die nutzbaren Unterschiede der Massenspektren zwischen nativen und markierten Analyten. Durch die Markierung aller C-Atome im DON wird ein Massen-shift von 15 erreicht (Abb. 1 und 2).

Dieser entspricht allerdings auch einer CH_3 -Abspaltung, sodass für das „selected ion monitoring“ (SIM) das Molekularion 512 des nativen silylierten DON nicht mehr genutzt werden kann.

Ähnlich verhält sich die Situation beim bisherigen primären Qualifier-Signal bei 422 dalton.

Für SIM sollten aufgrund ihrer geringeren Störanfälligkeit die intensiveren Signale im oberen Massenbereich ausgewählt werden. Sie treten bei DON (als TMS-Derivat) aber meist nicht ausreichend dominant auf und/oder werden vom markierten internen Standard interferiert.

Lediglich 497 (um CH_3 reduzierte DON-Molekülmasse) kann als wichtigster Qualifier überlagerungsfrei nahe dem M^+ mit gutem Signal/Rauschverhältnis genutzt werden (QI-1).

Die Massenspur bei 295 dalton zeigt (auch in Proben) ein kräftiges und störungsfreies Signal und wird daher als Quantifizierungsignale für DON eingesetzt (Qn) (Abb. 3 und 4).

Das hohe Signal 235 kann als zusätzlicher Qualifier beibehalten werden (QI-2).

Umgekehrt konnte mit dem Ion 437 (iQn) ein dominantes SIM-Signal für $^{13}\text{C}_{15}$ -DON-TMS gefunden werden, das im nativen DON-Spektrum praktisch nicht vorkommt.

Die praktische Anwendung des $^{13}\text{C}_{15}$ -DON-Istd bei einem FAPAS-Profiency test anhand einer Futtermittelprobe zeigte mit nur 1,2% Abweichung vom Mittelwert neben der hohen Zuverlässigkeit der GC/MS-Isotopenverdünnungsanalytik auch eine sehr gute Übereinstimmung mit der konventionellen akkreditierten GC-Routinemethode mit 2-Säulenteknik und EC-Detektion.

Ausblick

Nach Aufrüstung des bestehenden GC/MS auf ein Modell mit verbesserter Empfindlichkeit ist zu prüfen, ob sich $^{13}\text{C}_{15}$ -DON auch für weitere B-Trichothecene wie z.B. 3-AcDON, 15-AcDON, Fusarenon X und mit Einschränkungen eventuell auch für das polarere Nivalenol als interner Standard eignet. Aufgrund der hohen Toxizität der A-Trichothecene und deren geringen ECD-Selektivität nach HFBI-Derivatisierung ist die MS-Detektion von besonderer Bedeutung. Mit dem

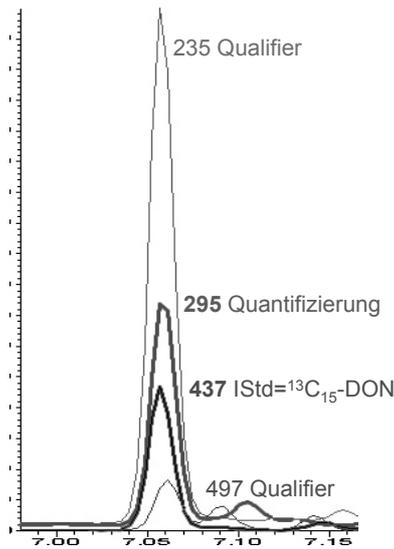


Abb. 3: Ionenspuren des DON-Peaks der FAPAS-Probe

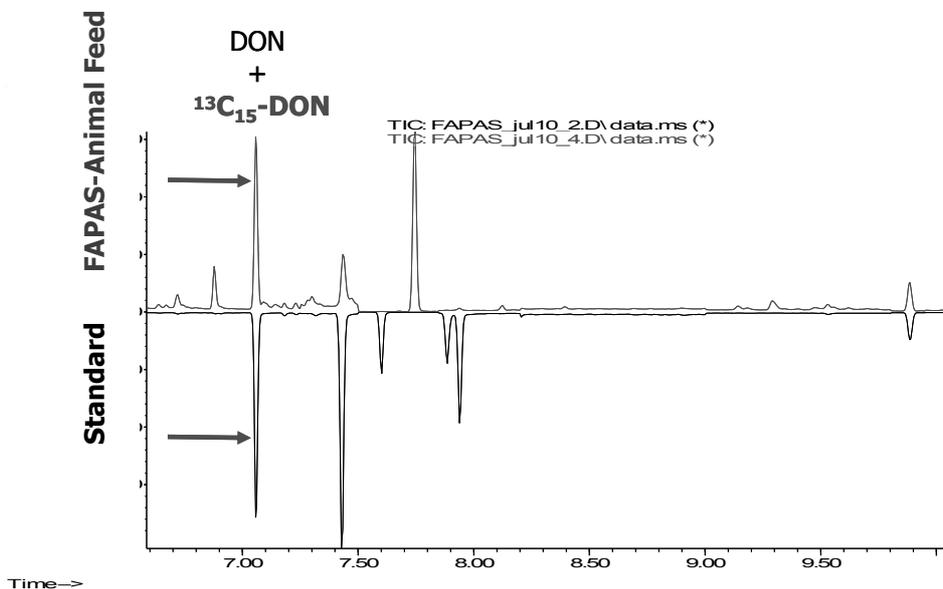


Abb. 4: SIM-Chromatogramme (Summe von je 3 Ionen) von Kalibrierstandard und FM-Probe im Vergleich (jeweils mit $^{13}\text{C}_{15}$ -DON als isotopenmarkierter IStd)

Literatur:

- (6) BRODACZ, W., „Interne Standards und Referenzsubstanzen in der GC“, LABO, Leitartikel, S8-14, Heft 10, Oktober 1997
- (7) PETTERSSON, H., „Intercomparison of Trichothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference material“ (Progress report) EU Report EN 18214, BCR Information 1-164; 1998

Autor:

Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ, AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum "Cluster Chemie Linz", A-4020 Linz Wieningerstrasse 8, Email: wolfgang.brodacz@ages.at

Entwicklung von qualitativen und semi-quantitativen immunodiagnostischen Schnelltests für den Nachweis von T2-Toxin in Weizen und Hafer

Development of rapid qualitative and semi-quantitative immunodiagnostic strip tests for the determination of T-2 toxin in wheat and oat

ALEXANDRA MONELLI, KARINA GROSSALBER, MANUELA FÜHRERR, SABINE BAUMGARTNER & R. KRŠKA

Zusammenfassung

Immunodiagnostische Schnelltests wurden für den qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von T-2 Toxin in Weizen und Hafer entwickelt. In Form von kompetitiven Assay-Systemen wurden monoklonale anti-T-2 Toxin-Antikörper verwendet, die an 40 nm kolloidales Gold gekoppelt wurden. Die Auswertung erfolgte im Test mit einem cutoff Wert von 100 ppb visuell nach 4 Minuten durch die Beobachtung der Entwicklung von gefärbten Banden. Die Proben wurden 3 min extrahiert und der Extrakt direkt ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Weiteres wurde ein semi-quantitativer T-2 Toxin Streifentest entwickelt, der mittels reflexionsphotometrischer Messung der Banden eine semi-quantitative Auswertung mit einem Arbeitsbereich zwischen 5-500 ppb T-2 ermöglichte.

Schlüsselwörter: Mykotoxine, T-2 Toxin, Weizen, Hafer, Schnelltests, Streifentests, Immunodiagnostik, Screening

Summary

Qualitative and semi-quantitative lateral flow devices were developed for rapid on-site screening of cereal commodities such as wheat and oat for the determination of the presence of T-2 toxin. Since no clean-up steps were necessary, the strip tests allowed a fast determination of T-2 toxin with the raw extract being directly used after shaking for 3 min. A positive (two lines) or negative (one line) result is seen after 4 min through the development of red indicator lines with a cutoff at 100 ppb T-2 toxin. Anti-T-2 toxin antibodies coupled to colloidal gold were used as selective colour reagent in a competitive assay format. A further T-2 toxin strip test was developed for using with a bench-top sized reflectance photometric reader for fast semi-quantitative screening.

Key words: Mycotoxins, T-2 toxin, Wheat, Oat, Strip tests, Immunodiagnostics, Screening

Einleitung

Mykotoxine zählen zu den wichtigsten natürlichen Kontaminanten von Getreide. Die Belastungen durch diese Pilz-Sekundärmetaboliten können stark schwanken je nach den gegebenen Bedingungen wie z.B. Witterung, Insektenbefall, und Anfälligkeit. Das T-2 Toxin gehört zur Gruppe der A-Trichothecene, welche von *Fusarium* spp. gebildet werden. Es inhibiert die DNA- und RNA-

Synthese und über die Peptidyltransferase auch die Proteinsynthese und gilt als Ursache hämorrhagischer Syndrome bei Nutztieren und der Alimentären Toxischen Aleukie (ATA) des Menschen. Die Aufstellung von Qualitätssicherungssystemen erfordert geeignete Testmethoden, mit denen die Kontrollen der Rohstoffe durchgeführt werden können. Neben chromatographischen und massenspektrometrischen Multimethoden zur Charakterisierung, Identifizierung, und Quantifizierung von Mykotoxinen, werden Immunoassays für den Nachweis angewendet. Eine weitere Entwicklung auf immunologischer Basis stellen schnelle, leicht handhabbare Teststreifen dar. Immunodiagnostische Schnelltests im Teststreifenformat (LFDs – lateral flow devices) wurden zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von T-2 Toxin auf Weizen und Hafer entwickelt.

Prinzip

Monoklonale anti-T-2 Toxin Antikörper (T2-B1 mAb) wurden entwickelt und in Form von kompetitiven Assaysystemen verwendet. Die charakterisierten T2-B1 Antikörper wiesen eine Inhibitionskonstante bei 50% Inhibierung (IC50) von 7 µg/L in einem optimierten indirekt kompetitiven Immunoassay auf (ELISA). Durch die geringe Kreuzreaktivität zu HT-2 (5.43%) konnte somit ein Schnelltest spezifisch für das T-2 Toxin entwickelt werden. Die Antikörper-Antigen Bindungen werden mit Hilfe von kolloidalem Gold mit Partikeldurchmesser um 40 nm durch die rötliche Färbung sichtbar gemacht. Für den Test wurde als Testlinie BSA-T2 Konjugat (0.125 mg/mL) mit 0.5 µL/cm auf Nitrocellulose (Whatman AE100, 2.5 cm x 30 cm) auf einer Höhe von 1.6 cm aufgetragen. Für den semi-quantitativen Test wurde als Test-Linie BSA-T2 Konjugat (0.75 mg/mL) mit 0.75 µL/cm aufgetragen. Als Kontroll-Linie im Abstand von 0.5 cm wurde anti-Maus IgG (0.75 mg/mL) mit 1 µL/cm aufgetragen. Nach dem Sprühen der Reagenzien wurde die Membran mit 1% BSA geblockt, um unspezifische Bindungen an die Membran zu verhindern.

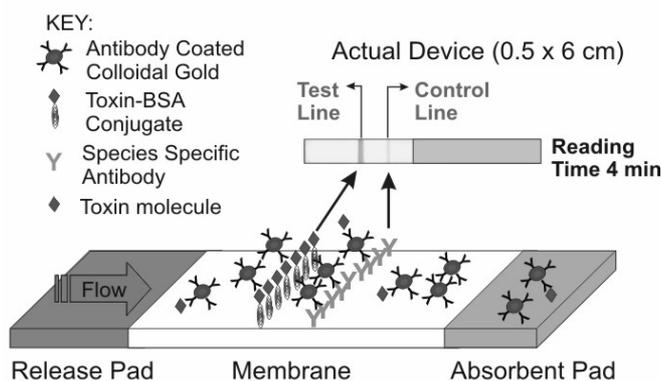


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prinzips der immunodiagnostischen Streifentests.

Freie Goldkolloid-Antikörper Konjugate binden spezifisch die als Testlinie immobilisierten T-2 Toxine (BSA-T2 Konjugate). Das Goldkonjugat wird auch unspezifisch durch die immobilisierten anti-spezies Antikörper (Kontroll-Linie) gebunden. Die Kontroll-Linie bestätigt die richtige Testentwicklung und sollte immer vorhanden sein, ansonsten ist der Test ungültig.

Durchführung

Zur Test Durchführung werden 5 g Probe mit Methanol: Wasser, 70:30, v/v, im Verhältnis 1:4 (w/v) extrahiert indem 3 min geschüttelt wird. Der Extrakt wird dann mit 0.05 M PBS Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt und kann direkt verwendet werden. 50 µL Probenextrakt werden mit 25 µL Testlösung (Goldkolloid-mAb Konjugat in PBS Puffer und Tween 20 Lösung) vermischt und darin wird das Probenfeld des Teststreifens eingetaucht. Die Auswertung erfolgt nach 4 min. Die Testbande ist bei Abwesenheit des Mykotoxins in der Probe sichtbar und bei Gehalten gleich oder höher als der cutoff Wert nicht vorhanden.

Ergebnisse

Der T-2 Toxin Streifentest wurde mit gespikten Matrixextrakten (Weizen, Mais, Hafer, und Gerste) und mit natürlich kontaminierten Weizen und Hafer Proben charakterisiert. Die angereicherten und natürlich kontaminierten Proben sowie die Extraktionsausbeuten wurden mit einer LC-MS-MS Referenzmethode gemessen (M. Sulyok et al.). Die Extraktionsausbeute für natürlich kontaminierte Proben, die mit Methanol: Wasser (70:30, v/v) im Verhältnis 1:4 (w/v) extrahiert wurden, beträgt ca. 50% bei Weizen und ca. 40% bei Hafer. Acetonitril musste wegen der Inkompatibilität mit den monoklonalen Antikörpern vermieden werden. Der Cutoff der entwickelten LFDs lag bei 80 ppb für natürlich kontaminierten Weizen und bei 100 ppb für natürlich kontaminierten Hafer. Der Cutoff Wert wird in weiterer Folge auf die von der EU festgelegten Grenzwerte abgestimmt (EC 856/2005, Frist Juli 2007 für T2-Toxin).

Ein kompaktes Reflexionsphotometer (BioDot, Irvine, CA, USA) wurde für eine semi-quantitative Auswertung der Teststreifen herangezogen.

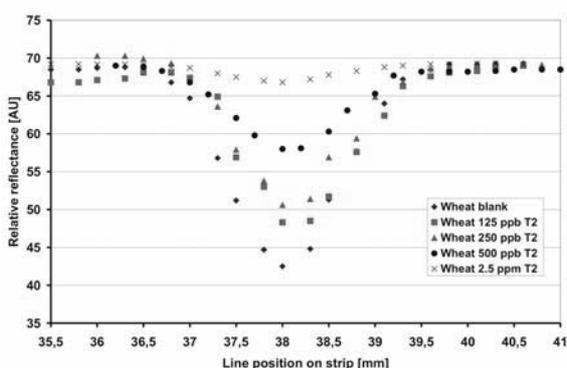


Abbildung 2: Die relative Reflexion nimmt mit zunehmender T-2 Toxin Konzentration ab.

Damit werden die Teststreifen nach der Testdurchführung auf einem beweglichen Schlitten fixiert, der unter den Messkopf gezogen wird, und die Linien nacheinander gemessen (siehe Abbildung 2). Letzteres ermöglichte die Erstellung von Kalibrationskurven und dadurch die standardisierte Auswertung einzelner Teststreifen. Der Test ermöglichte eine semi-quantitative Auswertung mittels

reflexionsphotometrischer Messung der Testbande mit einem Arbeitsbereich zwischen 5 und 500 ppb T-2 Toxin.

Die entwickelten qualitativen und semi-quantitativen Streifentests erfassen einzelne Mykotoxine wie das T-2 Toxin. Sensitivität, Spezifität und schnelle Signalbildung ermöglichen eine Aussage innerhalb von weniger als 5 min, wodurch LFDs im Monitoring-Bereich Anwendung finden. Mit immunodiagnostischen Schnelltests können somit Mykotoxine in Getreide schnell und ohne apparativen Aufwand für einen Einsatz am Ort qualitativ oder semi-quantitativ nachgewiesen werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Land Niederösterreich und der Christian Doppler Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung sowie beim europäischen BioCop Forschungsprojekt (New Technologies to Screen Multiple Chemical Contaminants in Foods, FOOD-CT-2005-006988) im Rahmen dessen die T2-B1 monoklonalen Antikörper produziert worden sind.

Literatur

Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R. (2006) Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 2649-2659.

Autoren:

Dr. Alexandra MOLINELLI, DI (FH) Karina GROSSALBER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

Ing. Manuela FÜHRER, Dr. Sabine BAUMGARTNER, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

Ein fluoreszenzbasierter Schnelltest zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol in Rohgetreide

Rapid fluorometric test for the quantitative determination of DON in raw cereals

EVA WANZENBÖCK, M. HAFNER, ZANETA KUBUS, M. FREUDENSCHUSS,
EVA MARIA BINDER & R. KRŠKA

Schlüsselworte: Deoxynivalenol, Mykotoxin, Analyse

EINLEITUNG

Pilzgifte in Nahrungs- und Futtermitteln stellen eine Gefahr für die Gesundheit der Konsumenten dar. Aus diesem Grund werden immer mehr Grenzwerte für Mykotoxine in verschiedensten Matrices festgesetzt, wie zum Beispiel in der Verordnung der Kommission 856/2005 für Fusariumtoxine. In dieser Verordnung werden Höchstgehalte unter anderem für Deoxynivalenol (Vomitoxin, DON) in Getreide und Getreideprodukten festgelegt. Diese Höchstwerte sind ab 1. Juli 2006 gültig. Für die Messung werden keine bestimmten Methoden vorgeschrieben, allerdings wurden von der Europäischen Kommission zu erfüllende Parameter festgelegt. So darf für DON-Kontaminationen über 0,5 µg/g die Standardabweichung nicht höher als 20% sein, die Wiederfindung muss zwischen 70 und 110% liegen (Richtlinie der Kommission 2005/38/EG).

Deoxynivalenol ist das am häufigsten vorkommende Mykotoxin der B-Trichothecene. DON ist immunsuppressiv und führt bei chronischer Exposition unter anderem zu Appetitlosigkeit. Bei akuter Vergiftung kommt es zu Unwohlsein, Übelkeit, Kopf- und Bauchschmerzen, in schweren Fällen zu Durchfällen und Gewebenekrosen.

Das in diesem Artikel vorgestellte analytische System bestimmt Deoxynivalenol in Weizen, Gerste und Mais. Das Ziel des Projektes war es, einen einfachen und robusten quantitativen Test zu entwickeln, der von Personen mit geringer chemischer Erfahrung angewendet werden kann. Der apparative Aufwand sollte ebenfalls gering gehalten werden um die Anwendbarkeit in Mühlen, Getreideverladestationen oder Brauereien sicherzustellen.

TESTPRINZIP

Dieser Test basiert auf dem Prinzip der Fluoreszenz. Dabei wird Licht einer bestimmten Frequenz absorbiert und ein Elektron auf ein höheres Energieniveau befördert (Anregung). Ein Teil der aufgenommenen Energie geht verloren (Relaxation), bevor dieses Elektron wieder in seinen Grundzustand unter Emission eines Photons zurückfällt. Diese Photonen werden gemessen. Aufgrund der verlorenen Energie hat das emittierte Photon eine höhere Wellenlänge als das anregende Lichtquant. Dieser Zyklus dauert nur kurze Zeit und kann sehr oft wiederholt werden, weil der Komplex dabei nicht zerstört wird.

Die Intensität des emittierten Lichts ist direkt proportional zur Konzentration des fluoreszenten Moleküls. Deoxynivalenol ist selbst nicht fluoreszent und wird deswegen mit zwei Reagenzien derivatisiert. Dabei entsteht ein metallorganischer Komplex, welcher fluorometrisch bestimmt werden kann.

PROTOKOLL

Eine repräsentative Probe aus 50 g gemahlenem Getreide wird in einem Blender mit 100mL Acetonitril/Wasser (80+20) gemischt und der entstandene Extrakt filtriert.

4 mL des Rohextraktes werden in eine Eprovette transferiert. Eine kombinierte Aufreinigungs/-Trocknungssäule entfernt sowohl interferierende Matrixkomponenten als auch Wasser während eines einzigen Schrittes. 1 mL des gereinigten und wasserfreien Extraktes wird in eine Messeprovette überführt und jeweils 150 µl der beiden Reagenzien hinzugefügt und anschließend für 8 Minuten bei 70°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit kommt die Eprovette für 90 Sekunden in ein Wasserbad um sie auf Raumtemperatur abzukühlen und wird anschließend in einem Fluorometer gemessen.

ERGEBNISSE

Die vorläufige interne Validierung wurde mit sechs natürlich kontaminiertem Weizenproben und einer unkontaminierten Probe durchgeführt. Die in Tabelle 1 gezeigten Werte sind das Ergebnis von 15 Messungen.

Tabelle 1: Ergebnisse natürlich kontaminierter Weizenproben

DON-Kontamination HPLC [mg/kg]	Testergebnis [mg/kg]	Wiederfindung [%]	relative Standardabweichung [%] (n=15)
0,00	0,01	-	-
0,35	0,33	94 %	14 %
0,38	0,33	87 %	15 %
0,44	0,46	105 %	19 %
1,1	1,1	100 %	10 %
1,3	1,5	115 %	10 %
4,3	4,0	93 %	7 %
Detektionslimit		0,07 mg/kg	
Quantifizierungslimit		0,20 mg/kg	

Alle Kontaminationslevel erfüllten die Kriterien der Europäischen Kommission in Bezug auf Wiederfindung und relativer Standardabweichung, das Detektionslimit lag bei 0,07 ppm

(Durchschnitt der unkontaminierten Probe plus dessen dreimaliger Standardabweichung), das Quantifizierungslimit (Durchschnitt der unkontaminierten Probe plus dessen zehnmaliger Standardabweichung) bei 0,20 ppm.

Für Gerste wurden bis jetzt nur dotierte Proben bestimmt (Tabelle 2). Auch diese Ergebnisse erfüllten die Vorgaben der Europäischen Union.

Für Weizen und Gerste konnte dieselbe kombinierte Aufreinigungs-/Trocknungssäule verwendet werden. Für Mais und Malzgerste war es jedoch erforderlich, eine neue Säule zu entwickeln, welche mehr Adsorbens enthält um interferierende Matrixkomponenten zu entfernen und so das Leerwertsignal zu reduzieren. Auch für Mais erfüllten die gemessenen Werte die EU-Anforderungen (Tabelle 3).

Tabelle 2: Ergebnisse für dotierte Gerstenproben

dotierte DON-Konzentration [mg/kg]	Testergebnis [mg/kg]	Wiederfindung [%]	relative Standardabweichung [%] (n=12)
0,00	0,04	-	69 %
0,25	0,3	120 %	15 %
0,5	0,5	100 %	12 %
5,0	4,9	98 %	4 %
Detektionslimit		0,13 mg/kg	
Quantifizierungslimit		0,33 mg/kg	

Tabelle 3: Ergebnisse für dotierte Maisproben

dotierte DON-Konzentration [mg/kg]	Testergebnis [mg/kg]	Wiederfindung [%]	relative Standardabweichung [%] (n=10)
0,00	0,00	-	-
0,25	0,26	104 %	9 %
0,5	0,5	100 %	14 %
5,0	5,2	104 %	8 %
Detektionslimit		0,08 mg/kg	
Quantifizierungslimit		0,20 mg/kg	

Die Gerstenergebnisse in Tabelle 2 basieren auf 12 Wiederholungen an zwei Tagen, die Maisergebnisse auf 10 Wiederholungen an zwei Tagen. Für die Messung von Mais wurde das Fluorometer noch mit Matrixproben kalibriert, während für Weizen und Gerste bereits die wiederverwendbaren Kalibrationslösungen verwendet wurden.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das beschriebene Testsystem für Deoxynivalenol in Weizen, Gerste und Mais erfüllte sowohl die Anforderungen der Europäischen Union als auch die des „Department for Agriculture/Grain Inspectors and Stockyard Administration“ (USDA/GIPSA) für Mykotoxinschnelltests. Das System ist quantitativ, genau und benötigt von der Extraktion bis zum Ergebnis weniger als 15 Minuten.

Die Wiederfindungsrate von DON in natürlich kontaminiertem Weizen lag verglichen mit HPLC-UV als Referenz bei 86 bis 115%, die Standardabweichung lag bei unter 20%. Der Messbereich lag zwischen 0,2 ppm und 5,0 ppm und das Detektionslimit bei 0,07 ppm.

Der Fokus war zunächst auf Weizen, Gerste und Mais gerichtet. Die Anwendung der Methode auf weitere Matrices wie zum Beispiel Malzgerste findet sich in der Planungsphase.

Autoren:

Martin HAFNER, Zaneta KUBUS, Rudolf KRŠKA, Christian DOPPLER Labor für Mykotoxinfor-
schung, IFA Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20,
A-3430 Tulln

Martin FREUDENSCHUSS, Biopure Referenzsubstanzen GmbH Technopark 1, A-3430 Tulln

Eva WANZENBÖCK, Eva Maria BINDER, RomerLabs Diagnostic GmbH, Technopark 1,
A-3430 Tulln

Die Zertifizierung von Aflatoxinkalibranten

The Certification of Aflatoxin Calibrants

G. BUTTINGER

Summary

The Institute for Reference Materials and Measurements produced certified calibrants for Aflatoxins B1, B2, G1 and G2. Therefore crystalline aflatoxins were purchased and their identity proven by ^1H NMR, elemental analysis and LC-MS/MS. The purity was assessed by using ^1H NMR, LC-DAD, LC-MS/MS, TLC and DSC. Afterwards, the calibrants were prepared gravimetrically and the concentration was confirmed by two laboratories employing UV – spectrometry. In an additional study the homogeneity of the calibrants was demonstrated and the stability of the calibrants was assessed in a 12 month isochronous study.

The certified values ($\sim 3 \mu\text{g/g}$) are based on the gravimetric preparation of the calibrants corrected by the purity of the toxins. The uncertainty ($< 3.5 \%$, $k = 2$) of these values comprises contributions of the purity assessment, the gravimetric preparation as well as possible instability.

Keywords

certified calibrants, aflatoxins, reference material

Zusammenfassung

Das Institut für Referenzmaterialien und Messungen (IRMM) hat für die Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 zertifizierte Kalibranten hergestellt. Dazu wurden die Aflatoxine in kristalliner Form aus dem Handel bezogen und die Identität der Aflatoxine wurde mit ^1H NMR, Elementaranalyse und LC-MS/MS überprüft, die Reinheit der Substanzen wurde mit ^1H NMR, LC-DAD, LC-MS/MS, TLC sowie mit DSC untersucht. Die Kalibranten wurden gravimetrisch hergestellt und die Konzentration von zwei Laboratorien mittels UV - Spektrometrie bestätigt. In einer weiteren Studie wurde die Homogenität der Kalibranten demonstriert und die Stabilität der Kalibranten wurde in einer 12 monatigen isochronen Studie ermittelt.

Die zertifizierten Werte ($\sim 3 \mu\text{g/g}$) basierten auf der gravimetrischen Präparation der Kalibranten korrigiert um die Reinheit des Toxins. Die Unsicherheit ($< 3,5 \%$, $k = 2$) dieser Werte beinhaltet Beiträge von der Reinheitsbestimmung, der gravimetrischen Präparation sowie einer mögliche Instabilität.

Schlüsselwörter

Zertifizierte Kalibranten, Aflatoxine, Referenzmaterialien

Einleitung

Die Notwendigkeit vergleichbarer Analysenergebnisse ergibt sich nicht nur aus den immer höher werdenden Ansprüchen im Bereich der Lebensmittelsicherheit sondern auch durch den internationalen Handel. So erlauben vergleichbare Analysenergebnisse einerseits Handelsbarrieren zu senken und sind andererseits die Basis für eine funktionierende Lebensmittelüberwachung.

Zertifizierte Referenzmaterialien (CRM) sind ein Mittel der Wahl um die Qualität einer analytischen Methode sicherzustellen. Eine Untergruppe der CRMs stellen die zertifizierten Kalibranten dar. Sie erlauben einerseits eine Kalibration des Messgeräts ohne systematische Messabweichung und andererseits erlauben sie die Rückführbarkeit des Ergebnisses zu einem gemeinsamen Standard.

Durch die Einführung von Grenzwerten für Mykotoxine in Futter und Lebensmitteln in der Europäischen Union ist eine Überwachung dieser Grenzwerte nötig.

Der jährliche Bericht des Schnellwarnsystems für Lebens und Futtermittel (RASFF) 2005 [1] zeigt, dass 40 % der Informationsmeldungen Mykotoxinkontaminationen betrafen, davon waren rund 95 % Aflatoxin Kontaminationen.

Daher hat das IRMM für die Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 zertifizierte Kalibranten hergestellt.

Produktion

Kristallines Aflatoxin B1, B2, G1 und G2 wurden von Sigma-Aldrich (Gillingham, UK) bezogen. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril (HPLC grade S) von Rathburn (Walkerburn, UK) verwendet.

Die vier Kalibranten wurden gravimetrisch hergestellt und danach in braune Glasampullen abgefüllt. Die Ampullen wurden vor dem Befüllen mit einer Argon/Helium Mischung (10 % Helium) gespült. Die Dichtheit der befüllten Ampullen wurde mittels eines Heliumlecktestgeräts überprüft und zur späteren Kontrolle wurde das individuelle Bruttogewicht auf die Etiketten gedruckt.

Reinheitsbestimmung

Die für die Herstellung der Kalibranten verwendeten Rohstoffe wurden eingehend auf ihre Identität und Reinheit untersucht. Die Identität der Aflatoxine wurde mittels Kernmagnetresonanzspektrometrie und Elementaranalyse bestätigt. Diese Ergebnisse konnten zusätzlich mit Schmelzpunktbestimmung und Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektroskopie untermauert werden.

Für die Reinheitsbestimmung wurden folgende Methoden verwendet: Dünnschichtchromatographie (TLC), Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit einem Diodenarraydetektor (HPLC-DAD) oder Tandemmassenspektrometer (HPLC-MS/MS), Kernmagnetresonanzspektrometrie (NMR), und Differenzial-Scanning-Kalorimetrie (DSC).

Die Reinheitsbestimmung von Aflatoxin B1 und G1 mittels DSC war nicht möglich da kurz nach Erreichen des Schmelzpunktes eine Dekomposition einsetzt. Die mit DSC ermittelte Reinheit von Aflatoxin B2 war 98,9 mol % und für Aflatoxin G2 99,1 mol %.

Mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS konnten keine Verunreinigungen detektiert werden. Die NMR Daten zeigten eine Verunreinigung von Aflatoxin G1 mit Schliff fett im Ausmaß von ca. 1,8 %. Die TLC Messungen zeigten Verunreinigungen von 1 % für Aflatoxin B2, G1 und G2 sowie von 2 % für Aflatoxin B1. Die Reinheit der Toxine wurde wie folgt bewertet: Aflatoxin B1 98,5 %, Aflatoxin B2 und G2 99,0 % und Aflatoxin G1 98,0%.

Zur Abschätzung der Unsicherheit der Reinheitswerte wurde eine Toleranz von $\pm 0,5$ % gewählt, welches unter der konservativen Annahme einer Rechtecksverteilung einer Unsicherheit von 0,3 % entspricht.

Homogenitäts- und Stabilitätsstudien

Die Homogenität der Kalibranten wurde überprüft indem ca. 1,7 % der produzierten Ampullen nach einem geschichteten Probennahmeplan entnommen wurden und mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und Fluoreszenzdetektion gemessen wurden. Es konnte keine Heterogenität festgestellt werden. Die maximale, durch Messwiederholbarkeit versteckte Heterogenität wurde nach Linsinger et. al. [2] ermittelt. Die sich daraus ergebene Unsicherheit für die Homogenität war in allen vier Fällen $\leq 1,0$ %.

Diese Unsicherheit wurde als vernachlässigbar eingestuft da Aflatoxine in Acetonitrile eine wahre Lösung darstellen und wahre Lösungen völlig homogen sein können.

Die Stabilität der Kalibranten wurde in zwei Studien untersucht. Eine vier Wochen lange isochrone Studie bei Lagertemperaturen von 4 °C, 18 °C und 60 °C sowie einer Referenztemperatur von -30 °C diente der Bewertung der Stabilität der Kalibranten während des Versands und zur Aufklärung der Frage ob ein gekühlter Transport nötig ist.

Eine zweite 12 Monate lange isochrone Studie bei Lagertemperaturen von 4 °C und -20 °C und einer Referenztemperatur von -30 °C diente zur Bewertung der Lagerstabilität.

Die Auswertung des ersten Lagerversuchs ergab, dass keine besonderen Vorkehrungen bezüglich des Transports zu treffen sind und ein normaler Transport die Kalibranten nicht beeinflusst.

Die Langzeitstudie zeigte, dass eine Lagerung der Kalibranten bei 4 °C ausreichend ist um die Stabilität zu gewährleisten. Der mit der Lagerung verbundene Beitrag zur Gesamtunsicherheit des zertifizierten Wertes wurde für eine Lagerung von 12 Monaten und einer Lagertemperatur von 4 °C ermittelt. Die Beiträge zur Unsicherheit betragen zwischen 0,9 % und 1,7 %.

Zertifizierung und Bestimmung der Unsicherheit

Der Massenanteil der Kalibranten ist zertifiziert auf Basis der gravimetrischen Herstellung sowie der ermittelten Reinheit der Ausgangsstoffe. Die Konzentration wurden durch Messung der Absorbanz bei einer Wellenlänge von ca. 355 nm bestätigt. Für die Umrechnung der Absorbanze in Konzentrationen nach dem Lambert – Beer'schen Gesetz wurden die in S. Nesheim et. al. [3] publizierten Extinktionskoeffizienten verwendet. Diese Messungen wurden von zwei Laboratorien durchgeführt.

Die kombinierte Unsicherheit des zertifizierten Wertes setzt sich aus Beiträgen der Reinheitsbestimmung, der gravimetrischen Präparation sowie der Lagerung zusammen. Aus dieser kombinierten Unsicherheit wurde unter Verwendung eines Erweiterungsfaktors von $k = 2$ eine erweiterte Unsicherheit berechnet. Diese erweiterte Unsicherheit entspricht etwa einem Vertrauensbereich von 95%.

In nachfolgender Tabelle sind die zertifizierten Werte mit ihren Unsicherheiten zusammengefasst.

	Code	Zertifizierter Massenanteil [µg/g]	Erweiterte Unsicherheit (k = 2) [µg/g]
Aflatoxin B1 in acetonitrile	ERM-AC057	3,79	0,11
Aflatoxin B2 in acetonitrile	ERM-AC058	3,80	0,08
Aflatoxin G1 in acetonitrile	ERM-AC059	3,78	0,13
Aflatoxin G2 in acetonitrile	ERM-AC060	3,80	0,07

Literatur

- 1 http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005_en.pdf
- 2 T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. M. H. Van der Veen, H. Schimmel, A. Lamberty, Accred. Qual. Assur., 6, 20-25, (2001)
- 3 S. Nesheim, M. W. Trucksess, S. W. Page, Journal of AOAC International, 82, 251-258, (1999)

Autor:

Gerhard BUTTINGER, Europäische Kommission, Generaldirektion Gemeinsame Forschungsstelle, Institut für Referenzmaterialien und Messungen, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgien

Ochratoxin A in Kaffee, kakaohältigen Lebensmitteln, Tee und Futtermitteln eine analytische Betrachtung

BARBARA MAHRINGER, A. RADITSCHNIG, R. ÖHLINGER & T. EIDENBERGER

Einleitung

Mykotoxine sind natürliche, sekundäre Stoffwechsel-Endprodukte von Schimmelpilzen, die beim Wachstum auf nährstoffreichen Substraten, Lebens- und Futtermitteln gebildet werden und bei Menschen und Tieren eine toxische Wirkung zeigen.

Eines der wichtigsten Mykotoxine ist Ochratoxin A (OTA), das von verschiedenen Aspergillus- und Penicilliumarten gebildet wird und in einer weitreichenden Palette an Lebensmitteln wie z.B. Getreideprodukte, Gewürze, Säfte, Kaffee, Kakao, Bier und Wein vorkommt. OTA wirkt leber- und nierenschädigend und wird wegen seiner krebserregenden Wirkung bei Versuchstieren als eine für den Menschen krebserregende Substanz eingestuft.

Problemstellung

Für die Bestimmung von Ochratoxin A sieht die ÖNORM EN 14132 für Gerste eine Extraktion mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch 60/40 (v/v) und für Röstkaffee ein Gemisch aus Methanol/NaHCO₃-Lösung 3% (1:1), mit anschließender Immunoaffinitätssäulen-Reinigung und Bestimmung mittels HPLC-FLD, vor. Die Methode für Gerste fand bislang am Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz auch für alle Futtermittel Anwendung.

Bei Matrices mit erhöhtem Mais und Grünpflanzenanteil traten durch Störpeaks gelegentlich Probleme bei der Auswertung der Chromatogramme auf. Im Zuge einer vom Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz in Auftrag gegebenen Diplomarbeit der Fachhochschule Wels wurde eine Validierung und Optimierung einer HPLC-Methode für die Analyse von Ochratoxin A in Kaffee, Kakao, Schokolade und Tee in Anlehnung an ÖNORM EN 14132 (Bestimmung von Röstkaffee) durchgeführt. Außerdem wurde die Methode bei diversen Supermarktproben getestet. In weiterführenden Untersuchungen wurde die Tauglichkeit der Methode für Futtermittel mit hohem Mais und/oder Grünpflanzenanteil überprüft, um die oben genannten Probleme in den Griff zu bekommen.

Experimenteller Teil (Extraktion, Aufreinigung und Bestimmung)

Ochratoxin A wird aus der homogenisierten Probe mit einem Gemisch aus Methanol/NaHCO₃-Lösung 3% (1:1) extrahiert. Der Extrakt wird über Festphasenextraktionssäulen (SPE; BAKER-BOND speTM Phenyl) vorgereinigt, das Ochratoxin A von der Säule eluiert und in einem 2. Reinigungsschritt auf einer Immunoaffinitätssäule nachgereinigt. Nach Aufnahme in einem geeigneten Eluenten wird die Messlösung mittels HPLC-FLD analysiert.

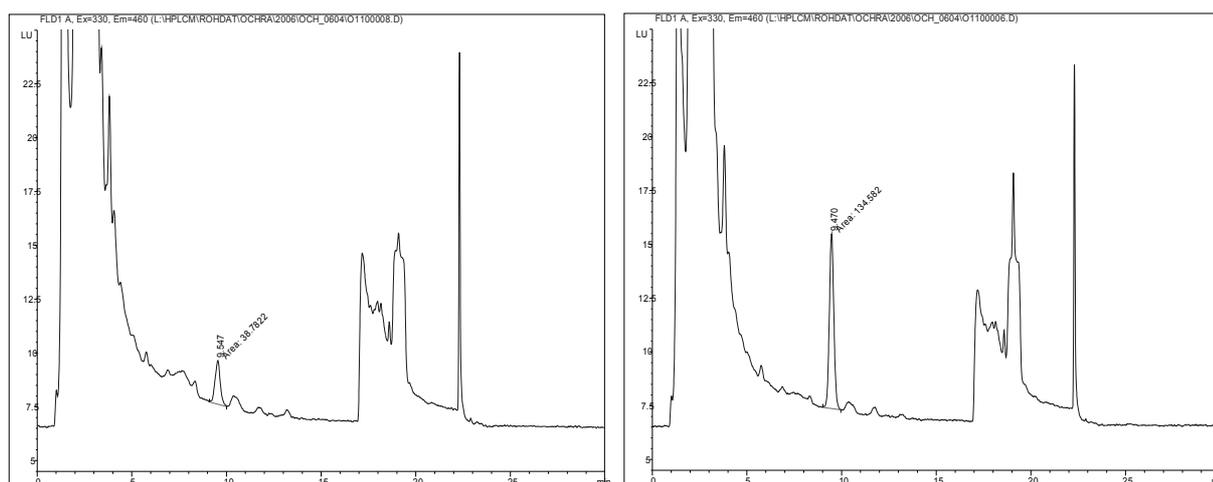
Ergebnisse der Validierung

	Kaffee	Kakao	Schokolade	Tee	Mais	Silage
Wiederfindung	85 %	85 %	90 %	80 %	85 %	80 %
RSD _r %	10 %	15 %	10 %	8 %	17 %	13 %
Erweiterte - Messunsicherheit (V%×2) mit P=95%	20 %	30 %	20 %	20 %	30 %	30 %

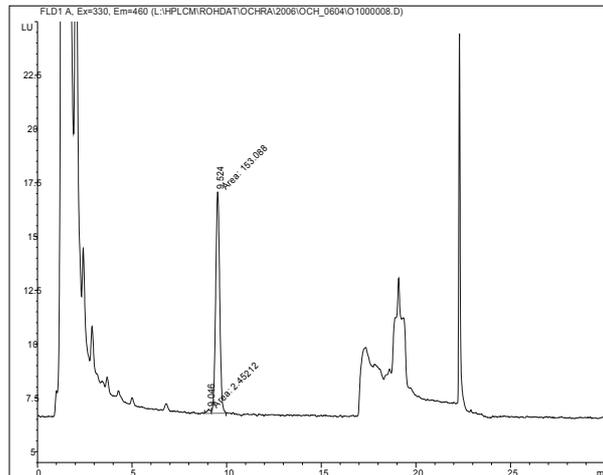
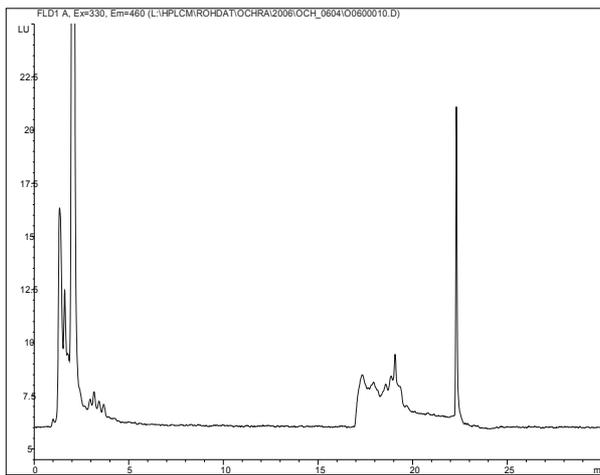
Weiterführende Versuche (Bestimmung von Mais, Grünfuttermitteln und Silagen mittels Kaffeemethode)

Viele Futtermittel weisen ähnliche Matrixeigenschaften bezüglich der Chromatographieergebnisse auf, wie z.B. Tee. Außerdem wirkt sich der relativ niedrige pH-Wert von fermentierten Futtermittelprodukten (Maissilagen, Grünmaissilagen etc.) negativ auf die Extraktionseigenschaften von Immunoaffinitätssäulen aus. Der niedrige pH-Wert der Matrix wird bei Anwendung der Kaffeemethode durch die Zugabe der NaHCO₃-Lösung bei der Extraktion abgepuffert. Störende Begleitpeaks, die die Auswertung der Chromatogramme stören, konnten durch die Phenylsäulen, die der Immunoaffinitätssäule vorgeschaltet waren, entfernt werden. Zusätzlich konnten Verfärbungen der Messlösungen, die bei der herkömmlichen Methode zu beobachten waren, ohne wesentliche Abstriche bei den Wiederfindungsraten beseitigt werden. Der bessere Reinigungseffekt war oftmals schon visuell in der Messlösung sichtbar und wird in den Chromatogrammen (siehe unten) deutlich. Versuche, ohne Phenylsilansäule das Clean-up durchzuführen, erzielten keine zufriedenstellende Resultate. Die Validierung der Methode wurde auf Mais und Grünmaissilage ausgedehnt.

Mais ohne Zusatz und mit Zusatz 1,785 µg/kg (herkömmliche Methode):



Mais ohne Zusatz und mit Zusatz 1,785 µg/kg (Kaffeemethode mit Phenylsilansäule):



Zusammenfassung und Ausblick

Die Validierung der Methode Ochratoxin A in Kaffee ergab durchschnittliche Wiederfindungsraten von > 80 % und entspricht damit den Anforderungen bezüglich der Leistungskriterien, die von der EU-Verordnung Nr.401/2006 vorgegeben werden.

Die Verwendung eines zusätzlichen Reinigungsschrittes im Clean-up verursacht einen geringfügig höheren Zeit- und Materialaufwand, bietet aber den Vorteil einer höheren Analysen- und Auswertesicherheit, wenn man nicht über die Möglichkeit einer massenspektrometrischen Detektion verfügt. Die Methode eignet sich auch für Matrices mit schwieriger Zusammensetzung, wie z.B. Futtermitteln mit hohem Mais- und/oder Grünpflanzenanteil, sowie Silagen. Weiterführende Untersuchungen über die Eignung der Methode für andere Matrices sind in Arbeit.

Danksagung

Besonderer Dank gilt allen beteiligten Labormitarbeitern des Kompetenzzentrums Cluster Chemie Linz: Sarah Maringer, Manuela Höfler, Petra Haiböck, Susanne Knoll

Autoren:

Barbara MAHRINGER, Dipl. Ing. Dr. Thomas EIDENBERGER, Fachhochschule Wels, Stelzhammerstraße 23, A-4600 Wels

Dipl.Ing. Armin RADITSCHNIG, Dr. Richard ÖHLINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz, Wieningerstrasse 8, A-4020 Linz

Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur quantitativen Analyse von Ergotalkaloiden

Development of an LC-MS/MS Method for the quantitative Analysis of Ergot Alkaloids

M. HAFNER, M. SULYOK, R. SCHUHMACHER & R. KRŠKA

Summary:

Ergot alkaloids are mostly produced by *Claviceps purpurea* in middle Europe. Members of this toxin family cause two disease types in humans and livestock, chronic ergotism and acute ergotism. Our detection method is based on HPLC with subsequent tandem mass spectrometry to detect members of three ergot alkaloid subclasses. The level of detection was estimated at 0.1 ng toxin per millilitre measurement solution based on the signal to noise-ratio.

Keywords:

Ergot alkaloids, ergot, *Claviceps purpurea*, HPLC, Mass spectrometry

Zusammenfassung:

Mutterkornalkaloide (Ergotalkaloide) werden in Mitteleuropa vor allem von *Claviceps purpurea* gebildet. Die Mitglieder dieser Toxinfamilie verursachen nach Konsum durch Menschen oder Nutztiere zwei Symptombilder, chronischen Ergotismus oder akuten Ergotismus.

Unsere Detektionsmethode verwendet HPLC mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie zur Detektion von Ergotalkaloiden aus drei Subklassen. Eine Signal/Rauschen-Abschätzung ergab Detektionslimits im Bereich von 0.1 ng Toxin pro Milliliter Meßlösung.

Stichworte:

Ergotalkaloide, Mutterkorn, *Claviceps purpurea*, HPLC, Massenspektrometrie

Einleitung:

Ergotalkaloide, im deutschen Sprachraum als Mutterkornalkaloide bekannt, sind Angehörige einer Mykotoxingruppe, die als gemeinsame Struktur den Ergolinring (Abbildung 1) aufweisen. Eine weitere Unterteilung lässt sich anhand der Substituenten des Grundgerüsts durchführen. Wichtige Subklassen sind die Clavine, einfache Lysergsäurederivate und Peptidergotalkaloide (Abbildung 2a und 2b). Lysergsäurederivate und Peptidergotalkaloide können in zwei Formen vorliegen, welche durch Epimerisierung am C-8-Atom entstehen und durch die Suffixe –in (R-Form) und –inin (S-Form) im Namen unterschieden werden. Da nur die R-Form biologisch aktiv ist (1), ist eine getrennte Erfassung der beiden Epimere sinnvoll. Ergotalkaloide werden von vielen Pilzen gebildet, wobei die komplexeren Peptidalkaloide vor allem von Pilzen der Spezies *Claviceps*, die einfacheren Clavine auch von *Aspergillus ssp* oder *Penicillium spp.* produziert werden können. In Europa ist der häufigste ergotalkaloidproduzierende Pilz *Claviceps purpurea*, welcher vor allem auf

Roggen wächst.

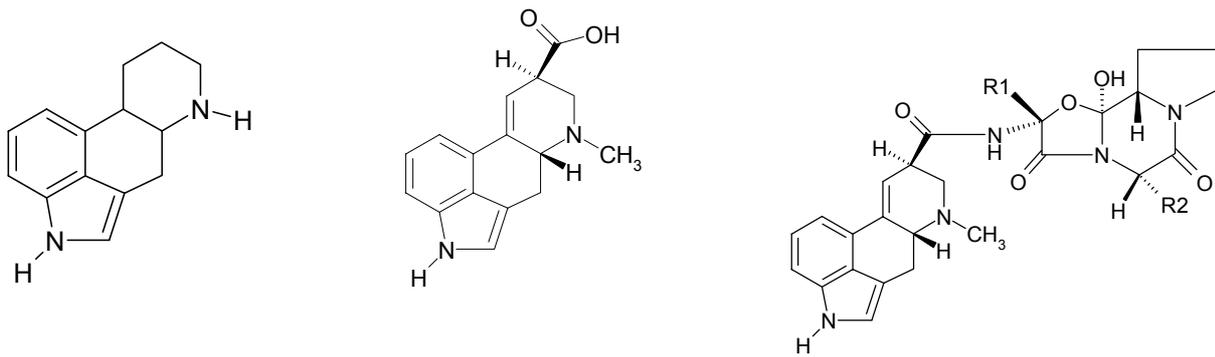


Abb.1: Ergolinsystem

Abb.2a Lysergsäure

Abb. 2b: Peptidergotalkaloide -
allgemeine Grundstruktur

Der Konsum von kontaminiertem Getreide kann zwei Krankheitsbilder hervorrufen, akuten oder chronischen Ergotismus. Bei akutem Ergotismus leiden die Betroffenen unter Halluzinationen und krampfhaften Zuckungen, bei chronischem Ergotismus unter einem Brennen in den Gliedmaßen, welches durch die gefäßverengende Wirkung der Toxine verursacht wird. In schweren Fällen führt dieser Effekt zum trockenen Wundbrand, bei dem Gliedmaßen ohne Blutverlust abfallen (Antoniusfeuer). Diese Krankheitsbilder sind seit dem Mittelalter in Europa bekannt (2).

Toxin	Retentionszeit [Minuten]	Toxin	Retentionszeit [Minuten]
Dihydrolysergsäure	2.1	Methysergid	9.9
Lysergsäure	2.1	Ergosin	11.9
Elymoclavin monofructosid	6.9	Dihydroergosin	12.0
Ox-elymoclavin	7.4	Ergotamin	12.2
Ox-luol	7.5	Dihydroergotamin	12.3
Ergin	7.6	Agroclavin	12.6
Dihydroergin	7.6	Ergocornin	13.0
Ergometrin	7.9	Festuclavin	13.3
Elymoclavin	8.7	Ergocryptin	13.5
Lysergol	8.8	Ergocristin	13.7
Chanoclavin	8.8	Ergosinin	14.1
Isodihydrolysergol	8.8	Ergotaminin	14.6
Erginin	9.4	Ergocorninin	15.0
Dihydrolysergol	9.5	Ergocryptinin	15.6
Ergometrinin	9.7	Ergocristinin	15.9

Tabelle 1: Liste der Ergotalkaloide mit detektierten Ionen und Retentionszeit

Claviceps-Pilze infizieren das Getreide am Feld und bilden an der Ähre einen Überwinterungskörper (Sklerotium), welcher mitgeerntet wird. Diese Sklerotien lassen sich vor dem Mahlen durch Sieben abtrennen und werden so in der Praxis größtenteils entfernt.

Zurzeit (November 2006) sind die Grenzwerte über höchstzulässige Mengen an Mutterkornsklerotien pro Kilogramm Getreide definiert, allerdings ist auf EU-Ebene bereits die Diskussion um regulierungswürdige (weil häufige) Toxine und toxinspezifische Grenzwerte im Gange (3).

Bedingt durch ihr gemeinsames Strukturelement (Ergolintetrazyklus) absorbieren alle Ergotalkaloide UV-Licht und sind fluoreszent. Diese Eigenschaften werden für ihre Analytik sowohl bei Dünnschichtchromatographie als auch HPLC-Analytik zur Detektion genutzt. Abhängig von den verwendeten chromatographischen Bedingungen können auch die Epimere aufgetrennt werden. Gaschromatographie wird wegen der geringen Flüchtigkeit und Hitzelabilität der Ergotalkaloide kaum verwendet, ist nach einem Derivatisierungsschritt allerdings anwendbar (4).

Unsere Methode basiert auf einem basischen Laufmittelsystem mit einer C-18 Reversed-Phase-HPLC-Säule und einem Massenspektrometer als Detektor. Diese Instrumente ermöglichen die Detektion von Ergotalkaloiden aus verschiedenen Klassen, weil durch die Verwendung eines Tandem-Massenspektrometers der HPLC-Lauf kurz gehalten werden kann und koeluiierende Substanzen durch Verwendung des Multireaction-Monitoring unterschieden werden können.

Methode:

Der HPLC-Teil besteht aus einem Agilent 1100 System mit einer Phenomenex Gemini Säule (5 μ ; 150x4,6 mm). Die mobile Phase wird online gemischt aus Laufmittel A (200mg Ammoniumkarbonat pro Liter Wasser (MilliQ), pH 9 und Laufmittel B (reines Acetonitril) mit einer Flußrate von 1 Milliliter pro Minute. Der Gradient verläuft von 17% B bis zu 80% B.

Der HPLC-Eluent gelangt direkt per Elektrospray-Interface in das Applied Biosystems QTRap 4000 Massenspektrometer. Für jedes Toxin in Tabelle 1 wurden die Massenspektrometerparameter optimiert, um von jedem Vorläuferion [Molekül+H]⁺ zwei Fragmentationen zu erhalten. Jeder Analyt kann dadurch mittels Retentionszeit, Vorläuferion und zwei Fragmentationen identifiziert werden. Der chromatographische Lauf ist außerdem in sieben Scanperioden für das Massenspektrometer unterteilt, und die Detektionszeit pro Analyt zu erhöhen.

Vier verschiedene Lösungsmittel wurden als Extraktionsmittel getestet: Acetonitril/Wasser 50+50 und 80+20, alkalischer Puffer (200 mg Ammoniumcarbonat pro L Wasser)/Acetonitril 20+80 und Acetonitril/Essigsäure/Wasser 79+1+20. Ein Getreide:Lösungsmittel-Verhältnis von 1:4 wurde verwendet und die Proben nach Dotieren mit Ergotalkaloidstandards für 90 Minuten am Rotationsschüttler bei 180 U/min geschüttelt. Die Rohextrakte wurden nach dem Filtrieren 1:1 mit Acetonitril verdünnt und davon 5 μ L injiziert.

Ergebnisse:

Die verwendeten alkalischen Bedingungen während der Chromatographie ermöglichten eine gute Trennung (Retentionszeitdiffenz circa zwei Minuten) der Epimerformen von Lysergsäure-basierten Toxinen, allerdings eluieren Lyserg- und Dihydrolysergsäure knapp nach dem Säulentotvolumen.

Bei der Anwendung der vier Extraktionsmethoden auf mit R-Epimeren dotierten Roggen zeigte nur das saure Medium starke Epimerisierung, da die Zunahme der S-Form von einer korrespondierenden Abnahme der R-Form begleitet wurde. Dieser Effekt trat bei den beiden neutralen und dem alkalischen Medium nicht auf. Die Extraktionsmittel werden noch mit natürlich kontaminiertem Material getestet um die Extraktionseffizienz zu vergleichen.

Das Detektionslimit wurde nach einer Signal/Rauschverhältnisabschätzung als 0.1 ng Toxin pro Milliliter Meßlösung bestimmt, das entspricht bei den oben genannten Extraktionsbedingungen 0.4ng Toxin pro Gramm Getreide.

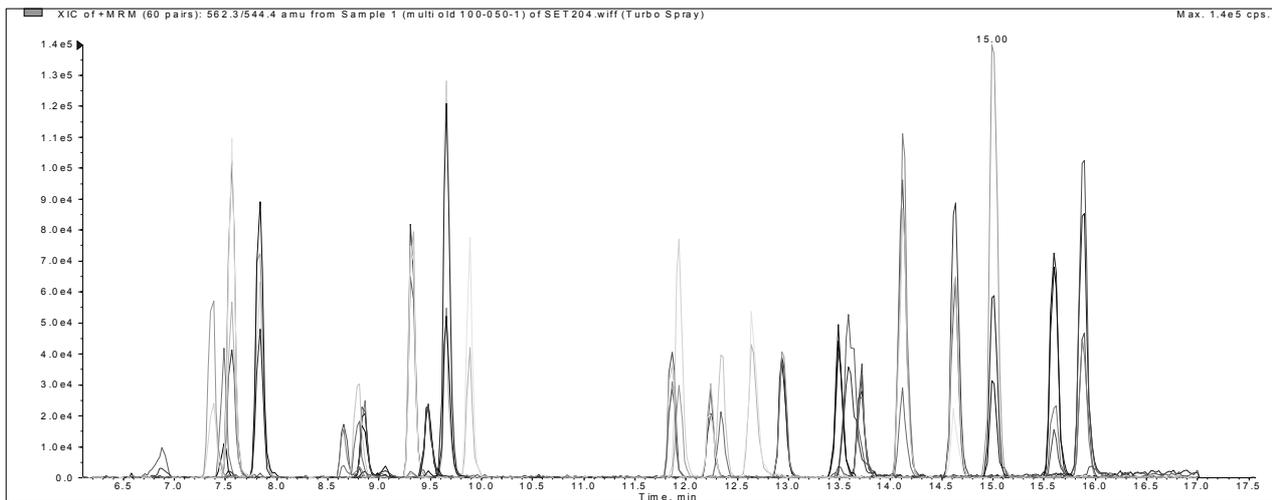


Abb.3: Chromatogramm aller Ionenspurten; dargestelltes Retentionszeitfenster 6,0 bis 17,5 min.

Ausblick:

Das Ziel ist die Validierung und Anwendung der Methode für verschiedene Getreidesorten (Roggen, Weizen, Mais) sowie die Einbindung weiterer Toxine, wie zum Beispiel Ergovalin.

Literatur:

- 1 Flieger, M. *et al.*, Folia Microbiol (1997), **42**, 3-30
- 2 Hofmann, A. Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1964) 8 ff.
- 3 N.N., Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ergot as undesirable substance in animal feed, The EFSA Journal (2005) 225, 1 - 27
- 4 Komarova, E.L. und Tolkachev, O.N. Pharmaceutical Chemistry Journal (2001), **35**, 18-24

Autoren:

Mag. Martin HAFNER, Dr. Michael SULYOK, Dr. Rainer SCHUHMACHER und Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA, Christian-Doppler-Labor für Mykotoxinforschung, Universität für Bodenkultur Wien, Department IFA-Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Untersuchungen zum Gefährdungspotential pilzpathogener Ursachen der Fruchtfäule an Melone (*Cucumis melo*) in Niederösterreich

Monika Gossmann, J. Keferböck & Carmen BÜTTNER

Zusammenfassung

Bei Untersuchungen von Melonenfrüchten eines niederösterreichischen Standortes im August 2002 wurden im Pilzdirektnachweis folgende *Fusarium*-Arten ermittelt, die allein oder vergesellschaftet in den untersuchten Myzel- und Gewebeproben gefunden wurden und als Verursacher der Fruchtfäule bei Melonen in Frage kommen: *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* und *F. tricinctum*.

Schlüsselwörter: Melonen, Fruchtfäule, *Fusarium* spp.

Einleitung

Fusarium spp. verursachen an reifen Melonenfrüchten eine Fruchtfäule, die durch gelbbraune Flecke auf der Melonenschale ausgeprägt ist. In der darunterliegenden Schicht ist meist ein weißliches Myzel ausgebildet. Auf einem Praxisstandort in Niederösterreich traten sowohl zur Ernteperiode 2001, als auch 2002 beträchtliche Fruchtfäuleschäden auf. Die erkrankten Melonenfrüchte wiesen meist ca. 1cm tiefe und bis zu 8cm lange Rissen in der Fruchtschale bzw. am Stielansatz auf, daran entwickelte sich ein weißes bis cremfarbenes Myzel. Das darunter liegende Fruchtfleisch war bis zu einer Tiefe von 4cm, matschig bzw. faulig. In den Hohlräumen zeigte sich ein weißes bzw. rosa, z.T. auch dunkelrot gefärbtes, dichtes Myzelpolster. Im August 2002 wurden sechs erkrankte Früchte zur Untersuchung der pilzparasitären Ursache in das Labor des Fachgebietes Phytomedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin eingesandt. Das Ziel der Untersuchungen war, das Gefährdungspotential hinsichtlich mykotoxinbildender *Fusarium* spp. einzuschätzen, da es praxisüblich war, die nicht mehr marktfähigen Früchten an Schweine zu verfüttern. Eine Gesundheitsgefährdung der Schweine sollte vermieden werden.

Durchführung

Das an bzw. um die Faulstellen herum ausgebildete Pilzmyzel wurde entnommen und unter dem Lichtmikroskop auf Konidienbildung untersucht. Zum anderen wurden aus dem Fruchtfleisch, das die Faulstellen unmittelbar umgab, kleine Gewebeproben herausgeschnitten und auf ein Nährmedium abgeimpft und bei 20°C, 7 Tage im Brutschrank unter UV-Licht im Wechsel mit einer Hell- und Dunkelphase (14h/10h) inkubiert. Die Pilzentwicklung wurde lichtmikroskopisch bonitiert und auf der Basis morphologischer Kriterien eine Gattungs- bzw. Artenbestimmung vorgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Der Pilzdirektnachweis ergab bei den untersuchten Gewebe- und Myzelproben aus insgesamt sechs erkrankten Melonen hauptsächlich den Nachweis von Pilzarten der Gattung *Fusarium*. Bei der Hälfte der untersuchten Melonen waren sowohl die an den Faulstellen sichtbaren Myzelien, als auch die sich aus den Gewebeproben entwickelnde Pilzarten fast ausschließlich *Fusarium acuminatum*, vergesellschaftet mit *F. avenaceum* und *F. tricinctum*, zuzuordnen. Bei der anderen Hälfte der untersuchten Melonen waren die Myzel- und Gewebeproben von *Fusarium poae* bzw. *F. sporotrichioides* durchwachsen. Auch hier kamen die nachgewiesenen *Fusarium*-Arten mehr oder weniger stark vergesellschaftet miteinander in den untersuchten Melonen mit Fäulesymptomen vor. Jeder dieser fünf nachgewiesenen *Fusarium*-Arten bei Melonen mit Fruchtfäulesymptomen sind wichtige Krankheitserreger an zahlreichen Kulturpflanzen. So verursachen z.B. *F. sporotrichioides* und *F. tricinctum* sowohl Auflaufschäden, als auch Fuß- und Wurzelfäulen an Getreide, Erbsen bzw. Lupinen. Bei Äpfeln sind beide dieser *Fusarium*-Arten wichtige Fruchtfäuleerreger bzw. bei Nelken verursachen sie eine Knospenfäule. *F. tricinctum* und *F. poae* sind bei Mais als Stängel- und Kolbenfäuleerreger bekannt. *F. acuminatum* kann bei Mais eine Stängelfäule bzw. bei Leguminosen Fuß- und Wurzelfäule verursachen. Auch *F. avenaceum* gilt allgemein als ein Auflaufschaderreger bzw. Verursacher von Wurzel- und Stängelfäulen bei Getreide, Mais, Erbsen u.a. Kulturpflanzen. Aufgrund dessen, daß alle der fünf nachgewiesenen *Fusarium*-Arten sehr häufig und massiv in den Gewebe- und Myzelproben der untersuchten Melonen des niederösterreichischen Standortes im August 2002 gefunden wurden, kann man davon ausgehen, dass diese die beobachteten Fäulesymptome maßgeblich verursacht haben, auch wenn entsprechende Pathogenitätsuntersuchungen mit den gewonnenen Isolaten der *Fusarium*-Arten nicht durchgeführt wurden.

Alle nachgewiesenen fünf *Fusarium*-Arten sind darüber hinaus starke, potentielle Mykotoxinbildner, darunter Moniliformin, T-2-, HT-2 und Nivalenol. Das Wirkungsspektrum dieser Toxine wird als nekrotisierend, immunsuppressiv, haut- und brechreizend angegeben. Obwohl keine Untersuchungen zur Mykotoxinkontamination angestellt wurden, war von einer Verfütterung der faulen und dadurch nicht mehr marktfähigen Melonenfrüchte an Schweine abzuraten.

Als phytosanitäre Maßnahme wurde empfohlen, die infizierten Ernterückstände möglichst zu zerkleinern und tief unterzupflügen. Ein Fruchtwechsel wurde angeraten, wobei Mais bzw. Getreide als Nachfrüchte nicht zu empfehlen sind, da Infektionen mit den nachgewiesenen *Fusarium* spp. bei diesen Kulturpflanzen zu Auflaufschäden, Fußkrankungen bzw. Kolbenfäulen oder Ährenfusariosen führen können, wenn die faulen Melonenfrüchte auf dem Feld verbleiben.

Autoren:

Dr. Monika GOSSMANN* und Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Inst. für Gartenbauwissenschaften, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin; DI Josef KEFERBÖCK: Niederöstr. Landwirtschaftskammer, Referat Gemüse und Gartenbau, Wienerstr. 64, 3100 St. Pölten. *Email: monika.gossmann@agrar.hu-berlin.de

Untersuchungen zu *Fusarium* spp. und Fumonisin-Kontamination in Knoblauch (*Allium sativum*)

MONIKA GOSSMANN, RENATE KADAU, CARMEN BÜTTNER & HANS-ULRICH HUMPF

Zusammenfassung

In den Gewebeproben untersuchter Knoblauchzehen einer kommerziellen Herkunft aus Frankreich wurde neben *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, auch erstmals *F. proliferatum* nachgewiesen. In einem Freilandgefäßversuch mit *F. proliferatum* durchmischter Erde wurde nach fünfmonatiger Kultivierung von Knoblauchpflanzen der Nachweis erbracht, dass eine Infektion der sich entwickelnden Knoblauchknollen mit *F. proliferatum* erfolgte, da Rückisolierungen von Gewebeproben aus den ausgereiften Knollen mit positivem Befund waren. Zum anderen wurde erstmalig bewiesen, dass *F. proliferatum* ein Potenzial zur natürlichen Kontamination von Knoblauch mit Fumonisinen besitzt. Das Fumonisin B₁ (FB₁) wurde mit Gehalten von 26 bis 95 ng/g je Knolle nachgewiesen. Auch FB₂ und FB₃ konnte gefunden werden.

Schlüsselwörter: Knoblauch, *Fusarium* spp., Fumonisine B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) und B₃ (FB₃)

Einleitung

An Fäulen bei Knoblauch, vor allem im Lager, sind neben *Penicillium* sp. auch häufig Pilzarten der Gattung *Fusarium* beteiligt [1], darunter *F. oxysporum* und *F. solani* [2]. Ein Befall mit diesen parasitären *Fusarium* spp. verursacht u.a. im Lager eine Fäule, bei der die einzelnen Knoblauchzehen vernichtet werden können [3]. Anfang 2000 erhaltenen Knoblauchknollen einer kommerziellen Herkunft aus Frankreich zeigten auf bzw. unter der Knollenschale, im Zehengewebe, kleine, runde bzw. gestrichelte, hellbraune Flecke. Eine tiefgreifendere Fäule der Knoblauchzehen war aber zu diesem Beobachtungszeitpunkt noch nicht entwickelt. Es galt zu prüfen, ob pilzparasitäre Ursachen für die Ausbildung der vorgefundenen braunen Flecke auf den Knoblauchknollen vorliegen. Das daran beteiligte Artenspektrum sollte festgestellt und in einem Infektionsversuch überprüft werden.

Methodisches Vorgehen

Pilznachweis in den Knollen

Die auf pilzparasitären Befall zu untersuchenden Knoblauchknollen wurden mit 2% NaOCl für 2min oberflächendesinfiziert. Danach erfolgte die Entnahme von 0,2 x 0,2 cm großen Knollenstücken bzw. Gewebeproben. Diese wurden auf Nährmedium ausgelegt. Die Inkubation erfolgte für 10 Tage bei 20°C, unter UV-Licht im Wechsel bei einer Hell- und Dunkelphase (14h / 10h). Die Pilzentwicklung bzw. Artendeterminierung erfolgte dann mittels Lichtmikroskopie auf der Basis morphologischer Kriterien.

Knolleninfektion mittels Substratinokulation

Von April bis August 2000 wurde mit den aus Knoblauch im Januar gewonnenen Isolaten von *F. proliferatum*, ein Pathogenitätsversuch durchgeführt. Dieser Freilandgefäßversuch erfolgte mit Landerde und Knoblauchjungpflanzen. Die Pilzisolat wurden auf einem Weizenkornsubstrat angezogen und der Erde in den Gefäßen vor der Auspflanzung beigemischt. Fünf Monate nach dem Versuchsansatz erfolgte die Rückisolierung von *F. proliferatum* aus den infizierten Knollen.

Fumonisin-Nachweis in den infizierten Knollen

Vier der mit *F. proliferatum*- infizierten Knoblauchknollen wurden nach Abschluß des durchgeführten Pathogenitätstests (s.o.) mittels Hochleistungsflüssigchromatographie in Kombination mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) auf die Kontamination mit Fumonisin B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) und B₃ (FB₃) untersucht [4].

Ergebnisse und Diskussion

Pilzkontamination

Bei den insgesamt 18 untersuchten Knollenstücken bzw. Gewebeproben wurde am häufigsten *Fusarium* spp. nachgewiesen. Dominierende *Fusarium* sp. war mit ca. 30% *F. proliferatum*. Mit ca. 22% war *F. oxysporum* die zweithäufigste *Fusarium*-Art. *F. subglutinans* und *F. solani* waren nur in 11% bzw. 6% der Proben nachweisbar (Abb. 1).

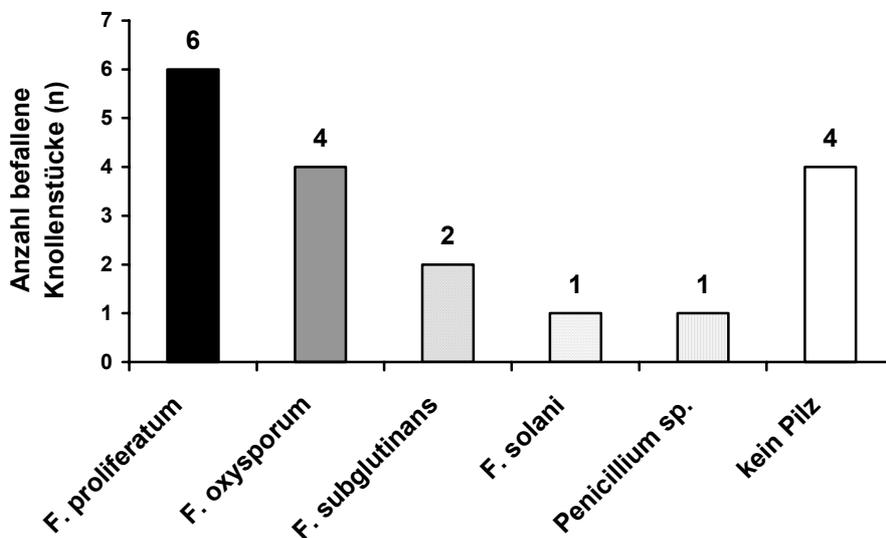


Abb. 1: Spektrum der *Fusarium*- Arten in den untersuchten Gewebestücken der Knolle bzw. Zehen (n= 18)

Fumonisin-Kontamination

Von den vier untersuchten *F. proliferatum*- infizierten Knoblauchknollen ist in allen eine Kontamination mit dem Fumonisin B₁ (FB₁) von 26 bis 95 ng/g je Knolle nachweisbar (Abb. 2). Auch FB₂ und FB₃ konnte gefunden werden (Abb. 2).

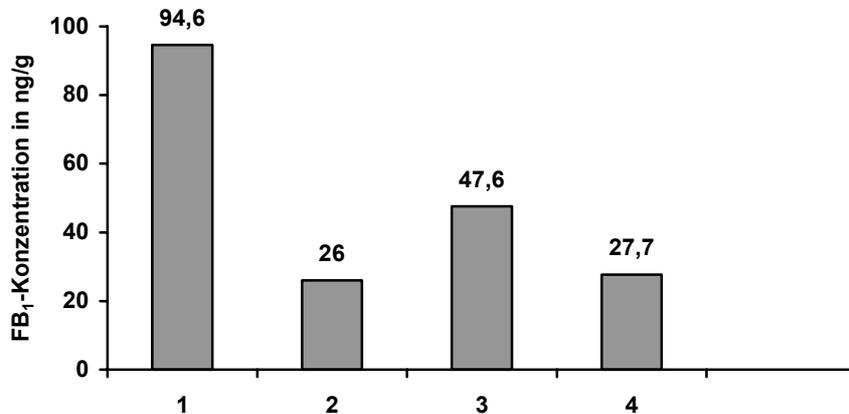


Abb. 2: Konzentration von Fumonisin B₁ (FB₁) in *F. proliferatum*- infizierten Knoblauchknollen (n= 4) mittels LC-ESI-MS

Literatur

- [1] BÖTTCHER, H. & POHLE, K. (1993): Die Entwicklung verschiedener Fäuleerreger während des Lagerns von Knoblauch (*Allium sativum*). Arch. Phytopathol. Pfl.-schutz 28, 213 – 214.
- [2] WU, W. S. (1977): Preliminary studies on garlic dry rot in Taiwan. NTU, Phytopathologist & Entomologist, 49, 70 – 76.
- [3] BEDLAN, G. (1999): Gemüsekrankheiten. Österreichischer Agrarverlag, Klosterneuburg
- [4] SEEFELDER, W.; GOßMANN, M. and HUMPF, H.-U. (2002): Analysis of fumonisin FB₁ in *Fusarium proliferatum* infected asparagus and garlic tuber from germany by liquid Chromatography/elektrospray ionisation-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (10), 2778 – 2781.

Autoren

Dr. Monika GOSSMANN*, Dr. Renate KADAU und Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin;

Prof. Dr. Hans-Ulrich HUMPF: Westfälische Wilhelms-Universität, Institut Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, 48149 Münster.

*Email: monika.gossmann@agrar.hu-berlin.de

Untersuchungen zum Befall von Spargelstangen mit *Fusarium proliferatum* und Nachweis von natürlicher FB₁-Kontamination hinsichtlich eines negativen Einflusses auf die Produktqualität

*Occurrence of *Fusarium proliferatum* and contamination with Fumonisin B₁ in asparagus spears concerning the product quality*

FRANZISKA BERAN, MONIKA GOßMANN, ASTRID PLENK, G. BEDLAN, R. ÖHLINGER,
H.-U. HUMPF & CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

Der Mykotoxinbildner *Fusarium proliferatum* ist neben *F. oxysporum* ein wichtiger Erreger der Wurzel- und Kronenfäule am Spargel. Diese *Fusarium*-Art gehört weiterhin zu den Hauptbildnern des als karzinogen eingestuften Fumonisin B₁. Bei Mykotoxin-Untersuchungen von Spargelstangen in Deutschland und China wurde bereits eine natürliche Kontamination mit Fumonisin B₁ nachgewiesen (Seefelder et al., 2002, Liu et al., 2005).

In den Jahren 2003 und 2004 wurden während der Hauptstechperiode in Österreich fünf Ertragsanlagen beprobt und hinsichtlich Infektionshäufigkeit und *Fusarium*-Spektrum untersucht. Dabei konnten an zwei Standorten vergleichsweise hohe *F. proliferatum*-Kontaminationen in 20 % bis 37 % der untersuchten Stangen festgestellt werden. Das Stangenmaterial von Proben mit positivem *F. proliferatum*-Nachweis, wurde anschließend einer Fumonisin-Bestimmung unterzogen. Im Jahr 2003 wurden mittels IAS-HPLC in 63 von 64 untersuchten Stangen FB₁-Konzentration zwischen 22,5 und 628,8 µg/kg Frischgewicht detektiert. Der Nachweis von FB₁ in den Spargelproben von 2004 erfolgte mittels LC-ESI-MS. Die Analyse von 19 Stangen der Probennahme im Mai ergab in 17 Stangen FB₁-Gehalte von 3 bis 308 µg/kg Trockengewicht. Im Juni konnte nur in 6 von 27 Proben FB₁ im Bereich von 2 bis 213 µg/kg nachgewiesen werden.

Schlüsselworte: Spargel, *Fusarium proliferatum*, Fumonisin B₁

Summary

Fusarium proliferatum and *Fusarium oxysporum* are the most important causal agents of root and crown disease of asparagus. *F. proliferatum* produces mycotoxins such as fumonisins, which have cancerogenic potential. Analyses of *F. proliferatum*-infected asparagus spears from Germany and China by LC-ESI-MS provided evidence for the contamination with FB₁ and FB₂ (Seefelder et al., 2002, Liu et al., 2005).

During the main harvest in May and June of 2003 and 2004 samples were taken from five commercial multiyear plantings in Austria. The mycological examinations of the samples revealed a high frequency of contamination of asparagus spears with *Fusarium proliferatum* of 20 % to 37 % in two locations.

Samples in which *F. proliferatum* was detected were analysed for Fumonisin B₁. In 2003 a total of 64 asparagus spears were examined by IAS-HPLC. The concentrations in 63 samples ranged between a minimum of 22,5 and a maximum of 628,8 µg FB₁/kg fresh weight. For the Fumonisin B₁ investigations in 2004 a number of 46 *F. proliferatum*-infected spears were measured by LC-ESI-MS. Among these 19 were collected in early May in which levels from 3 to 308 µg/kg dry weight could be detected. Only six of 72 spears from June 2004 were contaminated with FB₁ at low levels of 2 to 213 µg/kg.

Keywords: asparagus, *Fusarium proliferatum*, fumonisin B₁

Literatur

Seefelder, W.; Goßmann, M.; Humpf, H.-U. (2002): Analysis of Fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum*-Infected Asparagus Spears and Garlic Bulbs from Germany by LC-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2778-2781

Liu, C.; Liu, F.; Xu, W.; Kofoet, A.; Humpf, H.-U.; Jiang S. (2005): Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in asparagus from Shandong province, PR China. *Food Addit. Contam.* 2005 Jul; 22(7):673-676

Autoren

Dipl.-Biol. Franziska BERAN, Dr. Monika GOßMANN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER - Humboldt Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Inst. für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de;

Mag. Astrid PLENK, Dr. Gerhard BEDLAN - AGES GmbH, Institut für Pflanzengesundheit, Spargelfeldstr. 191, A-1226 Wien;

Dr. Richard ÖHLINGER - AGES GmbH, CC Cluster Chemie, Wieningerstr. 8, A- 4020 Linz;

Prof. Dr. Hans-Ulrich HUMPF - Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, D-48149 Münster.

**Untersuchungen zur Virulenz und Mykotoxinbildung
von *Fusarium sambucinum*- Isolaten in infizierten Kartoffelknollen**

Investigations of pathogenicity and mycotoxins

*with different *Fusarium sambucinum* strains at infected potatoes*

B. SCHULTZ, F. M. ELLNER, MONIKA GOSSMANN & CARMEN BÜTTNER

Summary

Potato tubers of two different varieties were infected by 11 strains of *Fusarium sambucinum* isolated from tubers of three different locations. All the isolates being tested produced diacetoxyscripenol but two of them produced T-2 and HT-2 toxins. The mycotoxin concentration in diseased tissue was dependent from the virulence of the strain and the variety. The amount of diacetoxyscripenol was positively correlated with the virulence of the *F. sambucinum* strains and the susceptibility of the potato variety as well.

Key words: potato tubers, *Fusarium sambucinum*, diacetoxyscripenol (DAS), virulence

Zusammenfassung

Es wurden Kartoffelknollen von zwei unterschiedlichen Sorten künstlich mit 11 *F. sambucinum*-Isolaten infiziert. Die Isolate stammen von drei unterschiedlichen Standorten. Alle getesteten Isolate bildeten Diacetoxyscripenol (DAS), bei zwei konnten zusätzlich T-2 und HT-2-Toxin nachgewiesen werden. Die DAS-Konzentration war abhängig vom Isolat und der Sorte. Es konnte eine enge Korrelation zwischen Fäuleausprägung und DAS-Kontamination nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Kartoffelknollen, *F. sambucinum*, Diacetoxyscripenol (DAS), Virulenz

Einleitung

Eine der wichtigsten Lagerkrankheiten der Kartoffel, neben der Nassfäule (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* [van Hall] Dye, der Braunfäule (*Phytophthora infestans*) [Mont.] de Bary und der bakteriellen Ringfäule (*Clavibacter michiganense* ssp. *septonicum* (Spiek. Et Kotth.), ist die Trockenfäule, die unter anderen von folgenden *Fusarium*-Arten verursacht wird: *F. sambucinum* Fuckel [1,3], *F. solani* (Mart.) Sacc. [1,2] und *F. coeruleum* (Lib.) ex Sacc. [1,2,6]. Pilzarten der Gattung *Fusarium* sind als Mykotoxinbildner von Bedeutung. *F. sambucinum* ist als potentieller Trichothecen-Bildner von Diacetoxyscripenol (DAS) [1,4,5,6] Monoacetoxyscripenol [4], T-2 Toxin [4], HT-2-Toxin [1,5] sowie Nivalenol [4] und Deoxynivalenol [4], bekannt.

Material und Methoden

Das Vorkommen von *F. sambucinum* wurde in trockenfaulen Kartoffelknollen verschiedener Sorten zu zwei Probenahmen (Ende Januar und Anfang März 2004) aus drei Betrieben in Sachsen-Anhalt und Brandenburg untersucht. Es wurden je Sorte und je Probenahme 20 Kartoffelknollen mit Trockenfäulesymptomen ausgewählt.

Für die Pathogenitätsuntersuchungen wurden insgesamt 11 *F. sambucinum*-Isolate unterschiedlicher Herkunft ausgewählt. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 10°C und 20°C. Für jede Variante wurden 20 Knollen in der oben beschriebenen Weise infiziert. Nach einer Inkubationszeit von vier Wochen wurden die Knollen in der Mitte der Faulstelle durchgeschnitten, die Fäulnisbreite- und tiefe vermessen und nach folgender Formel der Fäuleindex (FI) bestimmt:
$$FI = \sqrt{ab} \text{ [cm]}.$$

Für die Mykotoxinbestimmung wurden ausschließlich Knollen verwendet, die durchschnittlich große Trockenfäulesymptome zeigten und bei 10 °C inkubiert wurden. Aufbereitet wurde nur das Gewebe, welches Symptome aufzeigte. Die Bestimmung erfolgte mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie).

Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zum Vorkommen von *Fusarium* spp. an den beprobten trockenfaulen Kartoffeln erwies sich *F. sambucinum* als die am häufigsten nachgewiesene *Fusarium*-Art. Auch *F. cerealis* (Cooke) Sacc. und *F. toruloseum* (Berk. & Curt.) Nirenberg comb. nov (*F. sambucinum* Fuckel var. *coeruleum* Wollenw.) waren in den untersuchten Kartoffelgewebestücken oft nachzuweisen.

Insgesamt wurde die Pathogenität von 11 *F. sambucinum*-Isolaten an zwei Sorten überprüft. Sowohl bei der Sorte 'Sieglinde' als auch bei der Sorte 'Berber' wurden deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Symptome der Fäulnis der einzelnen Isolate sichtbar, diese erwiesen sich als statistisch signifikant. Es traten sowohl schwach (FI < 1 cm), als auch stark (FI > 1,5 cm) virulente Isolate bei beiden Sorten bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C auf (Abb. 1, Abb. 2). Der Fäuleindex (FI) war bei der Sorte 'Berber' signifikant höher als bei der Sorte 'Sieglinde'.

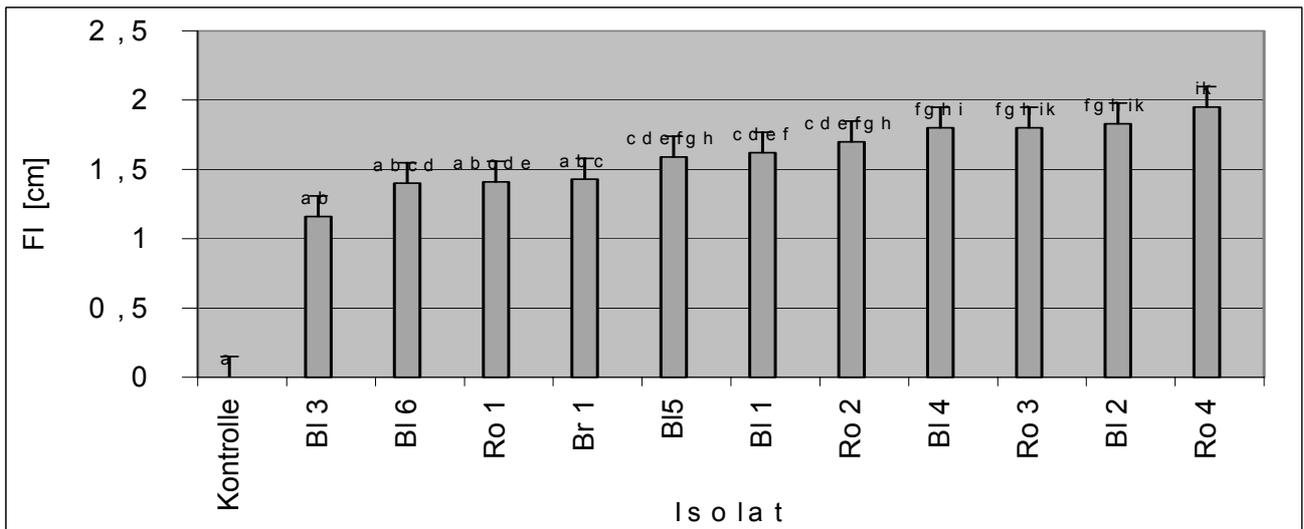


Abbildung 1: Mittelwerte und Standardabweichungen des Fäuleindex der Sorte 'Sieglinde' bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C

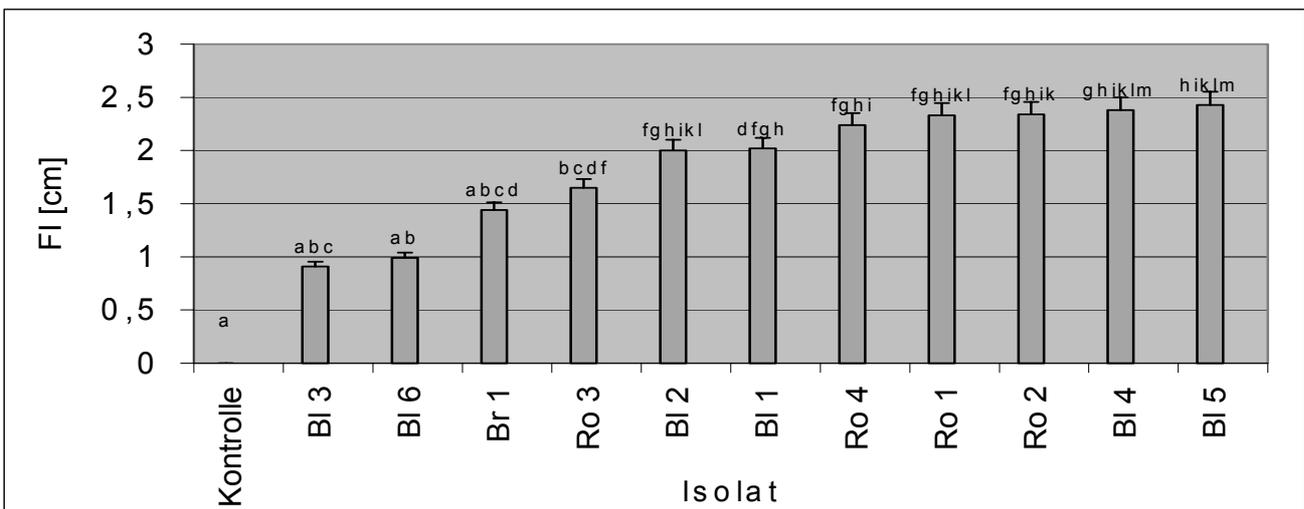


Abbildung 2: Mittelwerte und Standardabweichungen des Fäuleindex der Sorte 'Berber' bei einer Lagerungstemperatur von 10°C

Neben DAS wurden von einzelnen Isolaten auch T-2 und HT-2 Toxin gebildet, die Werte lagen zwischen 0,02 bis 25,9 µg/g und bei HT-2 zwischen 0,04 bis 209 µg/g. Einzelne Isolate traten somit als Mehrfachbildner auf. Bei der Sorte 'Sieglinde' lagen die DAS-Konzentrationen bei 40 bis 120 µg/g Faulstelle und waren bei der Sorte 'Berber' mit 500 bis 3000 µg/g Faulstelle um ein Zehnfaches höher. Im Gegensatz zur Sorte 'Berber' konnte bei der Sorte 'Sieglinde' eine enge Korrelation zwischen Fäuleausprägung und DAS-Kontamination festgestellt werden (Abb. 3).

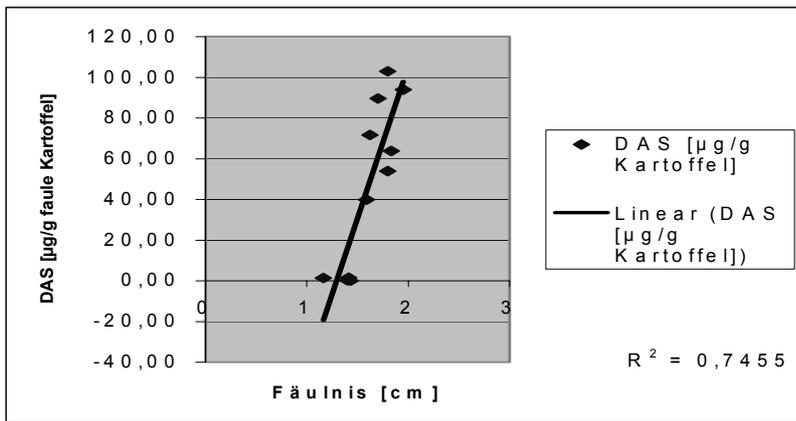


Abbildung 3: Beziehung zwischen Virulenz und DAS-Produktion von unterschiedlichen *F. sambucinum*-Isolaten in künstlich infizierten Kartoffelknollen

Literatur

- [1] LATUS-ZIETKIEWICZ, D; PERKOWSKI, J & CHELKOWSKI, J (1995) Mycotoxins Production, Pathogenicity and Toxicity of *Fusarium* Species isolated from potato tubers with dry rot injuries. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 13: 87-100.
- [2] LANGERFELD, E (1978) *Fusarium coeruleum* (Lib) Sacc. als Ursache von Lagerfäulen an Kartoffeln. *Mitteilungen aus der BBA*, Heft 184.
- [3] SEPPÄNEN, E (1981) *Fusariums* of the potato in Finland I. On the *Fusarium* species causing dry rot in potatoes. *Annales Agriculturae Fenniae* 20:156-160.
- [4] DESJARDINS, A E & PLATTNER, R D (1989) Trichothecene toxin production by strains of *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) in liquid culture and potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* 37: 388-392.
- [5] EL-BANNA, A A; SCOTT, P M; LAU, P-Y; SAKUMA, T.; PLATT, W A & CAMPBELL, V (1984) Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (5): 1169-1171.
- [6] KIM, J -C & LEE, Y -W (1994) Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers, *Applied an Environment Microbiology* 60 (12): 4380-4386.

Autoren

Dipl.-Ing. agrar. Boris SCHULTZ; Dr. Monika GOSSMANN; Prof. Dr. Carmen BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzealle 55/57, D-14195 Berlin.

Dr. Frank M. ELLNER, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin.

Autorenverzeichnis

ADAM, G.	44, 49, 53, 58
BARTHELMEUS, MURIEL	72
BAUMGARTNER, SABINE.....	101
BEDLAN, G.	62, 125
BECK, R.	11
BERAN, FRANZISKA.....	62, 125
BERTHILLER, F.	49, 53, 58
BICKER, W.	58
BINDER, EVA MARIA.....	105
BÖHM, CHRISTINA.....	89
BRENN-STRUCKHOFOVA, ZDENKA	89
BRODACZ, W.	93, 97
BRUNNER, K.....	38, 44
BÜTTNER, CARMEN.....	62, 67, 72, 76, 120, 122, 125, 127
BUTTINGER, G.	109
BUZINA, W.....	34
CICHNA-MARKL, MARGIT.....	89
DERSCH, G.	85
DOMIG, K.J.....	53
EIDENBERGER, T.	113
EISOLD, ANNE-MAREEN	67
ELLNER, F. M.	72, 76, 127
FELDER, H.....	85
FELLINGER, A.	30
FREUDENSCHUSS M.,	105

FÜHRER, MANUELA.....	101
GOSSMANN, MONIKA	62, 67, 72, 76, 120, 122, 127
GROSSALBER, KARINA.....	101
GROSSGUT, R.	8
HAAS, DORIS.....	34
HAAS-LAUTERBACH, SIGRID.....	30
HAFNER, M.....	105, 116
HAMEDINGER, S.	62
HIRSCHFELD, T.....	72, 76
HUMPF, H.-U.....	62, 122, 125
JUGE, NATHALIE	53
KADAU, RENATE	122
KANZLER, DAGMAR.....	34
KASPER, D.	44
KEFERBÖCK, J.....	120
KICKINGER, T.	24
KNEIFL, W.	53
KÖLLNER, KRISTA.....	44
KÖPPL, H.	20
KRSKA, R.	38. 49, 53, 101, 105, 116
KRUMPHUBER, CH.	20
KUBUS, ZANETA.....	105
KUCHENBECKER, R.....	28
LEMMENS, M.	44. 49
LEPSCHY, J.	11
MACH, R. L.....	38, 44
MASCHER, F.....	34

MITTERBAUER, R.	49, 58
MAHRINGER, BARBARA	113
MARTINEZ, O.	67
MONELLI, ALEXANDRA	101
OBERFORSTER, M.	81
ÖHLINGER, R.	16, 62, 81, 85, 113, 125
OMANN, M.	38
PAULITSCH, ASTRID	34
PLANK, M.	85
PLENK, ASTRID	62, 125
POPPENBERGER, BRIGITTE	49
RADITSCHNIG, A.	113
RAZZAZI FAZELI, E.	89
REITHNER, BARBARA	38
SCHADOCK, INES	67
SCHMITT, K.	30
SCHULTZ B.	127
SCHUMACHER, R.	38, 49, 53, 58, 116
SCHWEIGER, W.	49, 58
STOPPACHER, N.	38
SULYOK, M.	53, 116
VON BARGEN, SUSANNE	67
WANZENBÖCK, EVA	105
ZEHETNER, S.	26
ZEILINGER, SUSANNE	38