ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR- UND AGRARWESEN

MOLD-MEETING 2007

DER

ALVA-FACHGRUPPE MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE

„MYKOTOXINE ENTLANG DER LEBENSMITTELKETTE“

ALVA-Mitteilungen Heft6/2008

ISSN 1811-7317

© 2008, 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 2007: Mykotoxine entlang der Lebensmittelkette

Am 6. und 7. Dezember 2007 fand in der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich in Linz das 11. Mold-Meeting unter dem Generalthema „Mykotoxine entlang der Lebensmittelkette“ statt. Die Fachtagung wurde in einer wiederum sehr gelungenen Kooperation zwischen der ALVA, der AGES-Akademie und der Humboldt-Universität Berlin organisiert. Als Veranstalter freue ich mich über die erfolgreiche Zusammenarbeit mit allen Partnern. Der vordringlichen Aktualität der Mykotoxinproblematik im Sinne hochwertiger Qualitätsproduktion und maximaler Lebensmittelsicherheit verdankte das Mold-Meeting 2007 einen neuerlichen Rekordbesuch von mehr als 100 interessierten Teilnehmern.

Wie ist die Mykotoxinsituation in Österreich? Aktuelle EU-Regelungen? Rahmenbedingungen und Lösungsansätze auf Produktionsebene? Analytischer Nachweis und Möglichkeiten einer effektiven Kontrolle von Mykotoxinen? Die Mykotoxinproblematik wurde in Fachvorträgen aus Sicht der Produktion und der Vermarktung vor allem unter dem Aspekt der Risikominmimierung näher beleuchtet. Mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte einer hochwertigen landwirtschaftlichen Qualitätsproduktion sowie einer maximalen Lebensmittel- und Ernährungssicherheit stellten daher zentrale Themen für das Mold-Meeting dar.

Experten aus Wirtschaft und Wissenschaft präsentierten Erfahrungsberichte und stellten aktuelle Forschungsprojekte vor. Vertreten waren unter anderem die Biologische Bundesanstalt Berlin und die Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, die Humboldt-Universität zu Berlin, sowie die Technische und die Veterinärmedizinische Universität Wien, das IFA Tulln und die Universität für Bodenkultur Wien. Wirtschaftsaspekte und Marktsituation im Bereich der Wertschöpfungskette Getreide, der Maiszüchtung oder im Analytikbereich wurden dabei von Experten aus der Landwirtschaftskammer und aus Fachfirmen abgedeckt.

Die nachfolgend publizierten Arbeiten stellen einen Auszug aus dem Fachprogramm des „Mold-Meetings“ bei der Vortragstagung 2007 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

Susanne Groh
Pioneer Maiszüchtung im Hinblick auf Kolbenfusarium und Mykotoxine 6

G. Wiedner
Bewertung von Trockenschlempe in der Fütterung landwirtschaftlicher Nutztiere 9

O. Martinez, Susanne von Bargen, Monika Goßmann, Anne-Mareen Eisold, H.-U. Humpf und Carmen Büttner
Pathogenität von fumonisinbildenden *Fusarium* spp. an Spargel (*Asparagus officinalis* L.) und Differenzierung zweier essentieller Gene des Fumonisin-Genclusters 14

R. Öhlinger
Aktuelle EU Regelungen und spezifische Ergebnisse 19

A. Raditschnig
Mykotoxingehalte ausgewählter Lebensmittelproben 2007 23

M. Appelt und F. M. Ellner
Mutterkornalkaloide – Bedeutung und erste eigene Ergebnisse zum Vorkommen 2007 27

U. Gueldener, Michaela Peruci, F. Berthiller, Angela Cziferszky, Gerlinde Wiesenberger, C. Erhart, Jasmin Drexler, K. Brunner, R. Schuhmacher, R. Krska, M. Lemmens, R. Mitterbauer und G. Adam
Genomforschung an *F. graminearum*: relevant für zukünftige Bekämpfungsstrategien? 31

F. Berthiller, Michaela Peruci, K.F. Nielsen, G. Adam, R. Krska und R. Schuhmacher
Eine Achillesferse der Pilze? Siderophore von *Fusarium graminearum* 36

Shamsozoha Abolmaali, Michaela Peruci, R. Mitterbauer, Hanna Weindorfer,
Doris Lucyshyn, M. Shams, O. Spadiut, M. Lemmens, G. Ellersdorfer, D. Moll und G. Adam
Genetisch veränderte Bäckerhefe als sensitiver Bioindikator für DON 41

M. Oberforster
Methodik zur Ermittlung von Fusariumbefall und Sortenresistenz bei Getreide 45

H. Felder, G. Dersch, M. Plank und R. Öhlinger
Verringerung der Fusarium- und Mykotoxinbelastung durch Sortenwahl 50

K. Brunner und R. L. Mach
Molekulare Möglichkeiten zur Detektion
von Trichothecen produzierenden *Fusarium* Arten. 57

F. M. Ellner und H. Buschhaus
Wirkung von Thiophanat-methyl auf die Mykotoxinbildung in Getreide 61

W. Brodacz und A. Della Rosa
Isotopenverdünnungs-GC/MS von A-Trichothecenen 65

M. Mayer
Mykotoxin – Monitoring. Einfache Risikoabschätzung im Betrieb. 69

M. Hafner, M. Sulyok, R. Schuhmacher, C. Crews und R. Krska
Stabilität von Mutterkornalkaloiden in verschiedenen Lösungsmitteln 73

Pioneer Maiszüchtung im Hinblick auf Kolbenfusarium und Mykotoxine

Pioneer corn breeding concerning ear mold and mycotoxins

SUSANNE GROH

Summary

Fusarium ear mold can cause significant reductions of grain yield and quality in maize production and lead to the contamination with mycotoxins. Next to cultural practices, breeding for resistance to Fusarium species is an important strategy to reduce ear mold and minimize the contamination with mycotoxins. Thus, breeding for resistance to ear molds, i.e. *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* is an important goal of breeding programs at Pioneer Hi-Bred in Europe and North America. Broad genetic diversity of resistance against Fusarium species exists within Pioneer elite germplasm. Conventional breeding and molecular methods for QTL mapping and marker-assisted selection are employed. Because corn borers create ports of entry for *Fusarium verticillioides*, maize varieties with the Bt gene have proven to be effective to control ear mold and significantly reduce the amount of mycotoxins compared to the base genetic if corn borers are present. The use of antifungal proteins as a potential transgenic strategy is being investigated.

Key words

Ear mold, resistence, *Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides*

Zusammenfassung

Kolbenfusariosen verursachen im Maisanbau erhebliche Ertrags- und Qualitätsverluste und können zu bedenklichen Belastungen mit Mykotoxinen führen. Der Anbau von Maissorten mit ausreichend hoher Resistenz ist neben pflanzenbaulichen Maßnahmen eine wichtige Strategie zur Minimierung von Kolbenfusariosen und Mykotoxinen. Die Züchtung von Resistenzen gegen Kolbenfusariosen, insbesondere *Fusarium graminearum* und *Fusarium verticillioides*, ist integraler Bestandteil der Zuchtstrategie von Pioneer Hi-Bred in Europa und Nordamerika. In dem Elitezuchtmaterial von Pioneer Hi-Bred ist eine breite genotypische Variation für die Züchtung von Resistenzen gegen Kolbenfusariosen vorhanden. Neben konventionellen Selektionsmethoden werden auch molekulare Methoden zur QTL Kartierung und Markergestützten Selektion eingesetzt. *Fusarium vericillioides* tritt oft als sekundäre Infektion nach Maiszünslerbefall auf. Transgene Maissorten mit dem Bt Gen zeigen deutliche Reduktionen des Fumonisingehalts gegenüber konventionellen Sorten bei moderatem bis starkem Maiszünsleraufkommen. Darüber hinaus wird die Nutzung von Proteinen mit antifungaler Wirkung zur transgenen Resistenz untersucht.

Schlüsselwörter

Kolbenfusariosen, Resistenz, *Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides*

Kolbenfusariosen sind in ganz Europa verbreitet, wobei in kühleren Gebieten hauptsächlich *Fusarium graminearum*, in wärmeren Gebieten hauptsächlich *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* und *Fusarium subglutinans* vorkommen (Logrieco et al., 2002). Neben Ertragsverlusten sind besonders Qualitätsverluste und die für Mensch und Tier bedenkliche Belastung mit Mykotoxinen von Bedeutung. Der Anbau von Sorten mit ausreichend hoher Resistenz stellt neben pflanzenbaulichen Maßnahmen eine wichtige Methode zur Bekämpfung von Kolbenfusariosen und Minimierung der Mykotoxingehalte dar.

Der Befall mit Kolbenfusariosen und das Auftreten von Mykotoxinen sind stark umweltabhängig und variieren von Jahr zu Jahr aufgrund unterschiedlicher klimatischer Bedingungen. Eine Beurteilung der Resistenz von Linien und Hybriden ist daher mit erheblichem Aufwand über mehrere Jahre verbunden und resultiert in einem langsamen Zuchtfortschritt. Voraussetzung für die erfolgreiche Züchtung ist die Vorhersage des Fusariumbefalls zur optimalen Auswahl von Teststandorten. Die phänotypische Beurteilung des Fusariumbefalls erfolgt anhand einer Befallsbonitur unter natürlichem Befall und künstlicher Inokulierung. Neben der visuellen Bonitur wird der Mykotoxingehalt an ausgewählten Standorten zur genaueren Beurteilung der Resistenz bestimmt.

In dem Elitezuchtmaterial von Pioneer Hi-Bred konnte eine breite genetische Diversität der Fusariumresistenz aufgezeigt werden. Als genetische Faktoren der Resistenz spielen die Länge und Öffnung sowie die Anzahl der Lieschblätter, die Korntextur und Kornmorphologie, die Resistenz gegen Insekten sowie die Stresstoleranz eine Rolle. Dabei wirken sich diese Faktoren unterschiedlich auf die Resistenz gegen verschiedene Fusariumarten aus. Während die Resistenz gegen *Fusarium graminearum* großteils durch kurze, offene Lieschblätter, abknickende Kolben und eine harte Korntextur positiv bestimmt wird, spielt die Resistenz gegen Insekten eine wichtige Rolle in der Resistenz gegen *Fusarium verticillioides*. Als Schutz gegen Insektenfraß haben lange, geschlossene Lieschblätter eine positive Wirkung. Ein effektiver Schutz gegen den Maiszünsler, der Anbau von Bt Sorten, wirkt sich nachweislich durch eine bis zu zehnfach gesenkte Konzentration von Fumonisin bei moderatem Vorkommen der Schadinsekten aus (Munkvold, 2003).

Als Zuchtstrategie steht an erster Stelle die Beurteilung der Resistenz von Linien und Hybriden aufgrund der visuellen Befallsbonitur über Jahre und Umwelten und nachfolgend die Eliminierung von hochanfälligem Zuchtmaterial bzw. Selektion resistenter Genotypen. Molekulare Marker wurden zur Kartierung von QTL in spaltenden Populationen und zur Assoziationskartierung in Elitelinien eingesetzt. So konnten QTL für die Resistenz gegen *Fusarium verticillioides* kartiert und durch Markergestützte Selektion in aktuelle Sorten eingekreuzt werden und dadurch nachweislich

die Resistenz von anfälligen Hybriden verbessern. Diese QTL unterliegen momentan der genetischen und physikalischen Feinkartierung mit dem Ziel der kartengestützten Klonierung. Ein großer Vorteil der Markergestützten Selektion besteht darin, dass sie unabhängig von der Umwelt eingesetzt werden kann und somit einen schnelleren Zuchtfortschritt als die konventionelle Selektion bringen sollte.

Neben dem Anbau von Bt-Sorten und damit verbundener Verringerung des Sekundärbefalls mit *Fusarium verticillioides* sowie der Verminderung der Mykotoxinbelastung werden weitere transgene Methoden untersucht. Mehrere Proteine mit antifungaler Wirkung wurden isoliert und ihre wachstumshemmende Wirkung gegen *Fusarium graminearum* und *Fusarium verticillioides* konnte in vitro nachgewiesen werden. Konventionelle Züchtung, Markergestützte Selektion und transgene Methoden werden von Pioneer Hi-Bred weiterhin untersucht und eingesetzt mit dem Ziel, eine möglichst breite und dauerhafte Resistenz gegen Kolbenfusariosen aufzubauen und zu erhalten.

Literatur

Logrieco, A., G. Mulè, A. Moretti and A. Bottalico. 2002. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology 108: 597-609.

Munkvold, G.P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotxins in maize. Annu. Rev. Phytopathol. 41:99-116.

Autorin

Dr. Susanne GROH, Pioneer Hi-Bred Northern Europe Service Division GmbH, Münstertäler Str. 26, D-79427 Eschbach.

Bewertung von Trockenschlempe in der Fütterung landwirtschaftlicher Nutztiere

Distillers dried grains with solubles in the feeding of farm animals

G. WIEDNER

Trockenschlempen sind Nebenprodukte aus der Herstellung von Bioethanol, der mittels Hefen durch Fermentation von zucker- und stärkehältigen Rohstoffen gewonnen wird. Im neu errichteten Werk Pischelsdorf in Niederösterreich fallen durch die hauptsächliche Verwendung von Weizen primär Weizenschlempen an, die mit der Produktbezeichnung „Actiprot“ getrocknet und pelletiert voraussichtlich ab dem Frühjahr 2008 in den Handel kommen.

Neben den Inhaltsstoffen und den Einsatzmöglichkeiten soll der nachfolgende Beitrag vor allem auch die Erwartungen der Tierhalter zum Ausdruck bringen, die in die Weizentrockenschlempe als neue Eiweißalternative gesetzt werden.

Inhaltstoffe

Übersicht 1:

Nährstoffparameter			Rohnährstoffgehalt je kg Trockenmasse	
			Weizenschlempe [1)]	Sojaschrot 44 [2)]
Trockenmasse (TM)	g/kg FM		924	880
Rohprotein (XP)	g		370	510
Nutzbares XP (nXP – Rind)	g (% v. XP)		265 (72)	308 (60)
Unabgebautes XP (UDP) g (%)			148 (40)	179 (35)
N-Bilanz im Pansen (RNB) g			+ 17	+ 32
Rohfett (XL) g			60	15
Rohfaser (XF) g			64	67
Rohasche (XA) g			58	67
Energie	Milchrind (NEL)	MJ	7,41	8,63
	Mastrind (ME)	MJ	12,20	13,75
	Schwein (ME)	MJ	10,50	13,04

1) FML Rosenau 11/2007

2) DLG Futterwerttabellen (Rinder 1997, Schweine 1991)

Wie die Übersicht 1 zeigt, beinhaltet getrocknete Weizenschlempe im Vergleich zu Sojaextraktionsschrot 44 einen hohen Trockenmassegehalt. Der Rohproteingehalt liegt zwar deutlich unter dem des Soja 44, ist jedoch mit 370 g je kg TM mit Rapsextraktionsschrot gleichwertig und anderen Eiweißalternativen, wie Ölkuchen bzw. auch den Körnerleguminosen Erbse und Ackerbohne deutlich überlegen.

Die hohe Pansenbeständigkeit mit einem Anteil von 40 % unabgebautem Protein bewirkt, dass Wiederkäuer das Rohprotein der Weizenschlempe im Dünndarm zu rd. 72 % nutzen können. Bei Sojaextraktionsschrot liegt dieser Anteil bei 60 %.
Weizenschlempen beinhalten deutlich mehr Rohfett als Extraktionsschrote, jedoch wesentlich weniger als Ölkuchen und stellen daher auch bezüglich des limitierten Fetteinsatzes in Wiederkäuerrationen kein Problem dar.

Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

Übersicht 2:

		VQ Weizenschlempe		VQ Sojaextraktionsschrot 44	
		Rind	Schwein	Rind	Schwein
Rohprotein	%	77	66	91	85
Rohfett	%	87	84	68	44
Rohfaser	%	50	41	82	72
N-freie Extraktstoffe	%	78	66	94	94
Org. Substanz	%	76	65	91	87

Mit Ausnahme des Rohfettes sind die Rohnährstoffe der Weizenschlempe für Wiederkäuer und insbesondere auch für Schweine geringer verdaulich als jene des Sojaextraktionsschrotes. Mit diesen unterschiedlichen Verdaulichkeiten kann auch die energetische Überlegenheit des Sojaextraktionsschrotes erklärt werden, die für Schweine naturgemäß noch ausgeprägter ist als für Wiederkäuer.

Strukturkohlenhydrate

Übersicht 3:

Strukturkohlenhydrate		Gehalte an NDF, ADF, ADL je kg TM	
		Weizenschlempe [1)]	Sojaschrot 44 [2)]
Hemizellulose, Zellulose u. Lignin (NDF)	g	501	163
Zellulose u. Lignin (ADF)	g	136	104
Lignin (ADL)	g	60	8

1) FML Rosenau 11/2007

2) ÖAG Info 3/99

Weizenschlempe beinhaltet gegenüber Sojaextrationsschrot einen rel. hohen Gehalt an Strukturkohlenhydraten, der in erster Linie auf den hohen Anteil an Hemizellulose zurückzuführen ist. Getrocknete Weizenschlempe beinhaltet gegenüber Soja auch wesentlich mehr Lignin (vergleichbar

mit dem Ligningehalt spät geschnittener Grassilagen), womit unter anderem die verminderten Nährstoffverdaulichkeiten dieser Eiweißalternative erklärt werden können.

Mineralstoffgehalte

Übersicht 4:

Mengenelement		Mineralstoffgehalte je kg Trockenmasse[1)]	
		Weizenschlempe	Sojaextraktionsschrot 44
Calcium	g	1,3	3,2
Phosphor	g	10,0	7,2
Magnesium	g	3,6	2,8
Kalium	g	14,0	18,0
Natrium	g	4,1	0,2

1) FML Rosenau

Weizenschlempen beinhalten hohe Gehalte an Phosphor und Natrium und sind bezüglich dieser Mineralstoffe dem Sojaextraktionsschrot deutlich überlegen.

Aminosäuregehalte

Übersicht 5:

Aminosäure		Aminosäurengehalte je kg Trockenmasse (je 100 g Rohprotein)			
		Weizenschlempe [1)]		Sojaextraktionsschrot 44 [2)]	
Lysin	g	7,7	(2,1)	33,0	(7,5)
Mehionin + Cystin	g	12,6	(3,4)	15,3	(3,5)
Threonin	g	11,1	(3,0)	20,8	(4,8)
Tryptophan	g	3,5	(0,9)	6,7	(1,5)

1) Agrana Produktinformation

2) Kirchgeßner „Tierernährung“

Der Vergleich zeigt insbesondere bei der Aminosäure Lysin, aber auch bei Threonin und Tryptophan, die bessere Ausstattung von Sojaextraktionsschrot. Bei den schwefelhältigen Aminosäuren Methionin und Cystin ist die getrocknete Weizenschlempe unter Bezugnahme auf die Proteineinheit mit dem Sojaextraktionsschrot gleichwertig.

Neben dem höheren Gehalt an Strukturkohlenydraten (insbesondere Lignin) erklärt auch die schlechtere Aminosäurenausstattung die eingeschränkte Einsatzmöglichkeit von Weizenschlempe in der Fütterung von Schweinen.

Einsatzempfehlungen

Es kann zunächst davon ausgegangen werden, dass getrocknete Weizenschlempen in der Wiederkäuerfütterung hinsichtlich der Eiweißergänzung bedarfsdeckend eingesetzt werden können. Inwieweit dies auch für sehr hoch leistende Milchrinder zutrifft, wird derzeit durch Fütterungsversuche, die an der BVW Wieselburg durchgeführt und vom LFZ Raumberg-Gumpenstein betreut werden, eruiert.

Bei Schweinen sind die Einsatzmöglichkeiten eingeschränkt. Insbesondere in der Ferkelfütterung, aber auch bei Mastschweinen sind weitere Fütterungsversuche erforderlich, um die Einsatzmöglichkeiten der getrockneten Weizenschlempe absichern zu können. Für Zuchtsauen sind max. Anteile von 4 % bei Säugenden und 10 % bei Tragenden möglich.

Fütterungsversuche mit getrockneter Weizenschlempe lassen bei Legehennen einen max. Anteil von 10 % und bei Masthühnern max. Anteile von 5 % zu.

Erwartungen aus Sicht der Tierhalter

Für die praktische Tierhaltung muss die getrocknete Weizenschlempe gut verfügbar sein, das heißt in ausreichender Menge produziert und vom Landesproduktenhandel kontinuierlich angeboten werden. Eine schlechte Verfügbarkeit erfordert häufige Rationsumstellungen, die sich in der Regel sehr nachteilig auf die Leistung auswirken.

Hohe Anforderungen werden auch an die Produktqualität und Lagerfähigkeit gestellt. Die Inhaltsstoffe sollten möglichst konstant sein und nur geringfügig schwanken, damit diese Eiweißalternative auch in Hochleistungsrationen als verlässliche Futterkomponente eingesetzt werden kann.

Weiters vorausgesetzt wird auch eine gute Futterhygiene. Die Gehalte an Bakterien, Schimmelpilz- und Hefekeimen sollten gemäß dem Beurteilungsschema für Pressfutter der VDLUFA (Bucher u. Ma 2003) nicht er- bzw. überhöht sein. Dies betrifft insbesondere die klassischen Lagerpilze Penicillium und Aspergillus, die als verderbanzeigende Pilzflora bereits ab einer Keimzahl von 25×10^3 KBE/g Futter als überhöht eingestuft wird und auf eine Sekundärinfektion (Lagerschäden) rückschließen lässt. Für Verderbanzeiger aus der Gruppe „Mucorales“ liegt dieser Orientierungswert bereits bei 5×10^3 KBE/g.

Futterhygienisch relevant sind auch etwaige Belastungen mit Mykotoxinen. Da Weizen sowie Mais für Kontaminationen mit fusarienspezifischen Pilzgiftstoffen anfällig ist und bei getrockneten Schlempen produktionsbedingt mit einem Konzentrationsfaktor von rd. 2,4 zu rechnen ist, kommt einer Rohstoffkontrolle im Rahmen der Bioethanolproduktion besondere Bedeutung zu. Unter Berücksichtigung, dass die getrocknete Weizenschlempe grundsätzlich auch in der Schweinefütterung einsetzbar ist und diese Tierkategorie auf die genannten Mykotoxine bekannterweise sehr empfindlich reagiert, können aus fütterungstechnischer Sicht gemäß EU-Empfehlung 2006/567/EG max. 0,9 mg Deoxynivalenol (DON) und 0,1 mg Zearalenon (ZON) je kg Futter mit 88 % TM toleriert werden. Die genannten Konzentrationen beziehen sich auf Allein- bzw. Ergänzungsfuttermittel

für Schweine. Die angeführte EU-Verordnung sieht zwar für Getreideerzeugnisse, wie zB Trockenschlempen von Getreide, die wesentlich höheren EU-Richtwerte von 8,0 mg DON und 2,0 mg ZON je kg Futtermittel mit 88 % TM vor, weist jedoch in einer Ergänzung zu den Richtwerten darauf hin, dass die unmittelbare Verfütterung von Futtermittelausgangserzeugnissen nicht dazu führen soll, dass Tiere mit einer höheren Menge an diesen Mykotoxinen belastet werden als bei einer vergleichbaren Tagesration mit Alleinfutter. Mit dieser Ergänzung kann die Forderung auf Einhaltung der strengen Richtwerte auch für die Trockenschlempe als Getreideausgangserzeugnis begründet werden.

Literatur

DLG (1997): Futterwerttabellen – Wiederkäuer. DLG-Verlag, Frankfurt a. M.

Wiedner, G., 2007: Analysenergebnisse von getrockneten Weizenschlempen. FML Rosenau NÖ LLK.

Spiekers, H., Urdl, M., Preißinger, W. und Gruber, L. (2006): Bewertung und Einsatz von Getreideschlempen beim Wiederkäuer. 5. BOKU-Symposium Tierernährung, 25 – 34

Urdl, M., Gruber, L., Häusler, J., Maierhofer, G. und Schauer, A. (2006): Untersuchungen zum Einsatz von getrockneter Weizen- und Maisschlempe (Starprot) bei Wiederkäuern. 33 Viehwirtschaftliche Fachtagung der HBLFA Raumberg-Gumpenstein, 51 – 62

Damme, K., und Peganova Svetlana (2006): Einsatz von getrockneter Weizenschlempe in der Legehennenfütterung, DGS Magazin 18/2006, 23 – 30

Richter, G., und Bargholz, J (2005).: Broileraufzucht – Trockenschlempe nur vorsichtig verwenden, DGS Magazin 31/2005, 27 – 30

Weber, M., Stenzel Petra, Chudaske Christine und Kleine Klausing (2006), H.: Einsatz von Trockenschlempe aus der Bioethanolherstellung (Weizenbasis) in der Ferkelfütterung, Forum angewandte Forschung 05./06.04.2006, 163 – 166

Autor

DI Günther WIEDNER, Leiter Futtermittellabor Rosenau und NÖ Fütterungsreferent,
NÖ Landwirtschaftskammer, Wiener Str. 64, 3100 St. Pölten

Pathogenität von fumonisinbildenden *Fusarium* spp. an Spargel (*Asparagus officinalis* L.) und Differenzierung zweier essentieller Gene des Fumonisin-Genclusters

Pathogenicity of fumonisin-producing Fusarium spp. *on asparagus (Asparagus officinalis* L.*) and differentiation of two essential genes of the Fumonisin gene cluster.*

O. MARTINEZ, SUSANNE VON BARGEN, MONIKA GOßMANN, ANNE-MAREEN EISOLD, H.-U. HUMPF & CARMEN BÜTTNER

Zusammenfassung

Fünf *Fusarium* spp.-Isolate der Arten *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. redolens* wurden in einem Pathogenitätstest an Spargeljungpflanzen der Sorte ‚RAMOS' getestet. Die Isolate von *F. proliferatum* und *F. redolens* erwiesen sich als hochvirulente Fäulniserreger, während *F. oxysporum* eine insgesamt schwächere Virulenz zeigte. In Mischproben aus Wurzel- und Kronenbereichen infizierter Jungpflanzen waren Fumonisin B-Toxine nachweisbar. Untersuchungen mittels linearer Korrelationsanalyse wiesen Zusammenhänge zwischen den *ad planta* ermittelten Fumonisin B_1- bzw. B_3-Gehalten und erhobenen Parametern zur Beurteilung der Virulenz nach. Essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese (*fum1* [Polyketidsynthase] und *fum8* [Aminoacyltransferase]) waren in allen Pathogenitätstest-Stämmen nachweisbar. Zur Ermittlung der intra- und interspezifischen Heterogenität dieser Gene wurden entsprechende Fragmente aus weiteren *Fusarium* spp.-Isolaten aus Spargel und anderen Nutzpflanzenherkünften differenziert. Dabei waren Abweichungen bezüglich der phylogenetischen Beziehungen nachweisbar, die nach *multi-locus* Sequenzanalysen zur Implementierung von phylogenetischen Artkomplexen geführt haben. Eine Diagnose fumonisinbildender Arten der Gattung *Fusarium* und die Einschätzung der davon ausgehenden Infektionspotentiale sollte deshalb auf Basis kombinierter Untersuchungen speziesrelevanter Genabschnitte wie z.B. *tef1α* mit Abschnitten der zur Fumonisin-Biosynthese essentiellen Gene *fum1* und *fum8* erfolgen.

Schlüsselwörter

Spargel, *F. oxysporum, F. proliferatum, F. redolens*, Fumonisine, Pathogenität, Polyketidsynthase, Aminoacyltransferase

Summary

We tested five Isolates of the *Fusarium* species *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* in a pathogenicity assay on asparagus seedlings of the cultivar 'RAMOS' in regard to pathogenicity and virulence. It turned out, that the Isolates of *F. proliferatum* and *F. redolens* are highly virulent putrefactive agents, whereas *F. oxysporum* overall exhibit a lower virulence. We detected fumonisin B toxins in all mixed samples of root and crown parts of infected seedlings. Linear correlation analyses revealed an interrelation of fumonisin B_1 and B_3 concentrations determined *ad*

planta and investigated virulence parameters. In all isolates of the pathogenicity assay fumonisin biosynthesis genes (*fum1* [polyketide-synthase] and *fum8* [aminoacyltransferase]) could be detected. Intra- and interspecific variability of these genes were determined including corresponding sequences from further *Fusarium* spp. isolates from asparagus and other crops. We found similar clustering by means of phylogenetic analyses of *fum* genes. However, derived phylogenetic relations were inconsistent to species complexes, established by multi locus sequence analysis of other marker genes. Discrimination of fumonisin producing *Fusarium* spp. in conjunction with the assessment of possible damages and risks should therefore include combined analyses of species relevant genes like *tef1α* and the essential genes of the fumonisin biosynthesis *fum1* and *fum8*.

Keywords

Asparagus, *F. oxysporum, F. proliferatum, F. redolens*, Fumonisins, Pathogenicity, Polyketide-synthase, Aminoacyltransferase

Einführung

Zahlreiche Pilze der Gattung *Fusarium,* darunter die als Hauptverursacher der Wurzel-, Stängel-, und Kronenfäule des Spargels (*Asparagus officinalis* L.) geltenden Arten *Fusarium oxysporum* SCHLECHT., *F. proliferatum* (MATSUSHIMA) NIRENBERG sowie *F. redolens* WOLLENW. sind in der Lage, Mykotoxine aus der Klasse der Typ B Fumonisine zu bilden und damit neben einer Ertragsminderung auch eine qualitative Beeinträchtigung des Erntegutes zu verursachen. Deshalb werden *Fusarium* spp. neben ihren phytopathogenen Eigenschaften verstärkt auch als potentielle Toxinkontaminanten von Spargelstangen diskutiert (LOGRIECO et al., 1998; SEEFELDER et al., 2002). Eine eradikative Bekämpfung bodenbürtiger *Fusarium* spp. ist in der Anbaupraxis nicht möglich (ELMER, 2004). Zudem stehen bislang keine *Fusarium*-resistenten Spargelsorten zur Verfügung (PONTAROLI et al., 2000). Daher ist die rechtzeitige Erkennung einer *Fusarium* spp.-Infektion sowohl zur objektiven Befalls- und Risikoeinschätzung, als auch zur Vermeidung von *Fusarium* spp.-Risikopotentialen in betroffenen Anlagen, ebenso wie in für eine Spargelproduktion vorgesehenen Böden und Jungpflanzen von großer Bedeutung. Hierzu ist neben der Entwicklung von einfachen molekularen Nachweisverfahren auch eine Einschätzung der durch die verschiedenen *Fusarium*-Arten und -Stämme ausgehenden Schad- und Kontaminationspotentiale nötig. Dieses ermöglicht es, die Wirkung dieser Pilz-Infektionen auf Ertrags- und Qualitätsparameter als Grundlage für eine Risikoabschätzung und ein Risikomanagement zu nutzen.

Material und Methoden

In einem 81-tägigen Gewächshausversuch wurden ausgewählte Isolate der im *Fusarium* spp.-Komplex der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule an *Asparagus officinalis* L. häufig vorkommenden Arten *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. redolens* auf ihre Pathogenität an Spargeljungpflanzen getestet. Hierzu wurden Parameter wie Frisch- und Trockenmasse der unter- wie oberirdischen Pflanzenorgane sowie Bonitur und Quantifizierung von Symptomen der Wurzel- und Kronenbereiche in Form von Befallsgraden erhoben und unter Einsatz statistischer Verfahren zur Ermittlung der Pathogenität und Virulenz herangezogen. Weiterhin erfasst wurde das Fumonisin-Bildungsvermögen dieser Isolate *ad planta,* lineare Korrelationen zwischen Fumonisin-Gehalten und Virulenz und das Vorhandensein zweier initialer, essentieller Gene (*fum1* [Polyketidsynthase] *und fum8* [Aminoacyltransferase]) des Fumonisin-Biosyntheseweges. Um die Möglichkeiten einer Artdifferenzierung von Fumonisinbildnern anhand von definierten Abschnitten dieser Gene zu evaluieren, erfolgte die Ermittlung der inter- und intraspezifischen Sequenzvariabilitäten der untersuchten Genabschnitte von *fum1* (~525 bp) und *fum8* (~800 bp) einschließlich weiterer *Fusarium* spp.-Isolate, die aus Spargel und anderen Nutzpflanzen isoliert worden waren, mittels direktem Sequenzvergleich sowie *bootstrap*-gestützten *maximum parsimony*-Analysen. Zusätzlich zu den Sequenzen aus eigener Arbeit wurden alle verfügbaren Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank NCBI in die Untersuchungen mit einbezogen.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die Isolate von *F. proliferatum* und *F. redolens* erwiesen sich an den Versuchspflanzen insbesondere hinsichtlich der ermittelten Befallsgrade und realisierten Frisch- und Trockenmassen zum Versuchsabschluss als hochvirulente Fäulniserreger, während *F. oxysporum* hierbei eine insgesamt schwächere Virulenz zeigte. Ebenso waren in den Wurzel- und Kronenbereichen aller infizierten Jungpflanzen Fumonisin B-Toxine (FB_1, FB_2, FB_3) nachweisbar (Abb.1). Die Ergebnisse nach linearer Korrelationsanalyse zeigten Zusammenhänge zwischen den *ad planta* ermittelten Fumonisin B_1- bzw. B_3-Gehalten und erhobenen Parametern zur Beurteilung der Virulenz auf. In allen fünf Isolaten waren artübergreifend beide zur Fumonisin-Biosynthese essentiellen Gene nachweisbar. Erstmalig konnten Bereiche dieser Fumonisin-Gene aus *F. redolens* sequenziert werden. Gene, die in die Biosynthese von Mykotoxinen involviert sind, gelten als Basis für einen genauen, empfindlichen und spezifischen Nachweis von toxigenen Stämmen (KONIETZNY & GREINER, 2003). Der Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Fumonisinbildung *ad planta* und dem kumulativem Nachweis der *fum1-* und *fum8*-Gene in den Pathogenitätstest-Stämmen bestätigt den methodischen Wert dieses Verfahrens zum Nachweis potenzieller FB-Produzenten.

Die Untersuchungen der *fum1-* und *fum8*-Fragmente zeigten Abweichungen bezüglich der phylogenetischen Beziehungen betreffender *Fusarium*-Arten, die nach *multi-locus*

Sequenzanalysen (ß-Tubulin, mtSSU rDNA, 28S rDNA; O'DONNELL et al., 1998), zur Implementierung von phylogenetischen Artkomplexen geführt haben (O'DONNELL et al, 1998; PROCTOR et al., 2004). Arten des *Gibberella fujikuroi species complex* 2 und 3 wurden anhand der *fum1*- bzw. *fum8*-Sequenzen in zwei deutlich divergierende Cluster aufgetrennt, während Sequenzen aus Isolaten des *Gibberella fujikuroi* Artkomplexes 1 und *F. oxysporum* beiden Gruppen zugeordnet wurden (Abb.2). Fumonisinbildende Arten der Gattung *Fusarium* können aufgrund der untersuchten *fum1*- bzw. *fum8*- Sequenzabschnitte nur eingeschränkt differenziert bzw. identifiziert werden. Eine Diagnose fumonisinbildender Arten der Gattung *Fusarium* und die Einschätzung der davon ausgehenden Schad- und Kontaminationspotentiale sollte deshalb auf Basis kombinierter Untersuchungen speziesrelevanter Genabschnitte wie z.B. *tef1α* (GEISER et al., 2004) mit Abschnitten der essentiellen Gene *fum1* und *fum8* des Fumonisin-Genclusters erfolgen.

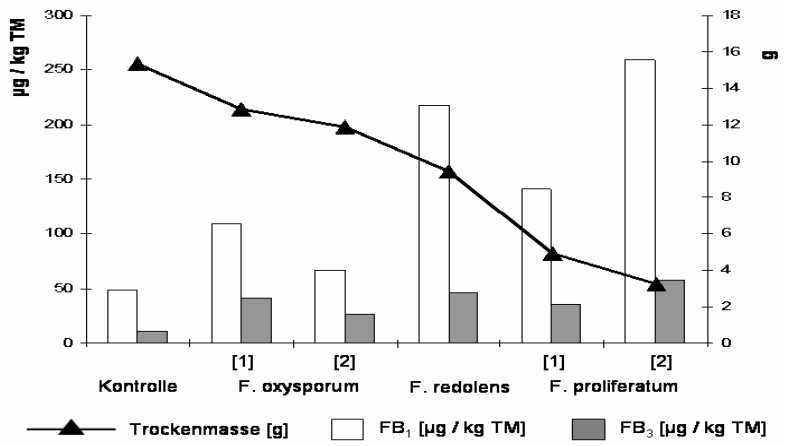


Abbildung 1: Durchschnittliche Trockenmassen der Versuchspflanzen 81 dpi und ermittelte Fumonisin B_1- und B_3-Gehalte in Wurzel- und Kronenmischproben der einzelnen Varianten.

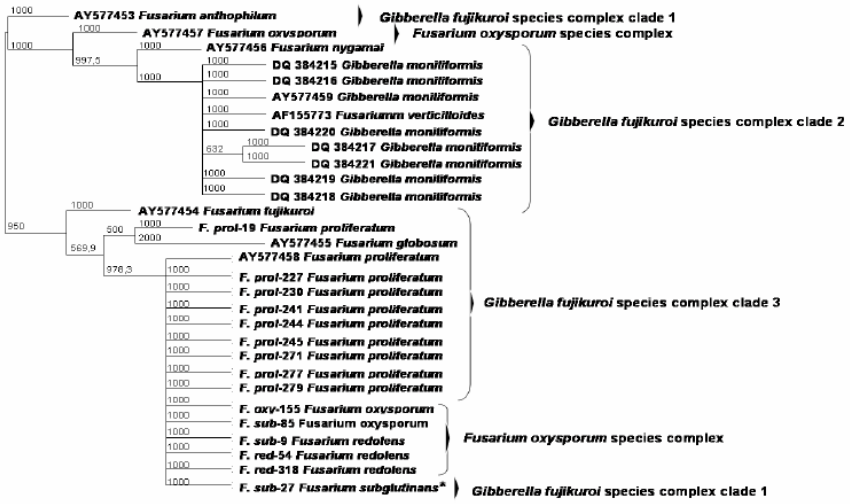


Abbildung 2: Phylogramm der *fum1*-DNA-Fragmente (491 bp) nach *maximum parsimony*-Analyse (*bootstrap*-Einstellung, n = 1000).

Literatur

ELMER W.H. (2004) Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress fusarium crown rot of asparagus in replanted fields. Plant Path. Vol. 53, p. 751 - 758.

GEISER D.M., DEL MAR JIMENEZ-GASCO M., KANG S., MAKALOWSKA I., VEERARAGHA VAN N., WARD T.J., ZHANG N., KULDAU G.A., O'DONNELL K. (2004) *Fusarium*-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Europ. J. Plant Pathology Vol. 110, p. 473 – 479.

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

LOGRIECO A., DAKO B., MORETTI A., FRISSULLO S., VISCONTI A. (1998) Occurence of fumonisin B1 and B2 in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. J. Agric. Food Chem. Vol 46, p. 5201 - 5204.

O'DONNELL K., CIGELNIK E., NIRENBERG H.I. (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia Vol. 9, No. 3, p. 465 - 493.

PONTAROLI A.C., CAMADRO E.L., BABINEC F.J., RIDAO A. (2000) Responses of *Asparagus officinalis* pollen to the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. Scientia Horticulturae 84, p. 349 - 356.

PROCTOR R.H., PLATTNER R.D., BROWN D.W., SEO J.-A., LEE Y.-W. (2004) Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycol. Res. Vol. 108, p. 815 – 822.

SEEFELDER W., GOSSMANN M., HUMPF H.-U. (2002) Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. Vol. 50, p. 2778 - 2781.

Autoren

Oliver MARTINEZ*, Dr. Susanne von BARGEN, Dr. Monika GOßMANN, Anne-Mareen EISOLD, Prof. Dr. Hans-Ulrich HUMPF, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER. Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

* korrespondierender Autor: oliver.martinez@gmx.de

Aktuelle EU Regelungen und spezifische Ergebnisse

Actual EC regulations and specific results

R. ÖHLINGER

Summary

An overview was given about new 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 neue aktuelle EU Mykotoxinregelungen für Lebensmittel und Futtermittel gegeben. Danach wird über österreichische Erfahrungen hauptsächlich zu Fusariumtoxinen in unverarbeitetem Getreide inkl. Mais und in Futtermitteln berichtet und diese zu den entsprechenden Regelungen in Beziehung gesetzt.

Schlüsselwörter: Mykotoxinregelungen, Deoxynivalenol, Zearalenon, T-2/HT-2 Toxin, 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.

Nach Kuiper-Goodman (1998 und 2004) stehen bei chronischen, lebensmittelbedingten Gesundheitsrisiken die Mykotoxine an erster Stelle. Die akute Gefahr durch die Aufnahme von mykotoxinkontaminierten Lebensmitteln wird für den Menschen als „mittleres Risiko“ eingestuft.

AKUTE	CHRONIC
High risk	**High risk**
Microbiological	MYCOTOXINS
Phycotoxins	Anthropogenic contaminants
Some phytotoxins	Some phytotoxins
MYCOTOXINS	Unbalanced diet
Anthropogenic contaminants	Phycotoxins
Pesticide residues	Food additives
Food additives	Pesticide residues
	Microbiological
Low risk	**Low risk**

Einteilung der lebensmittelbedingten Gesundheitsrisiken (Kuiper-Goodman, 1998 und 2004)

Neue aktuelle EU Regelungen – Lebensmittel

Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28.9.2007 zur Änderung der VO (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen:

In dieser VO werden die Fusarientoxine Deoxynivalenol, Zearalenon und die Summe der Fumonisine B1 und B2 in unverarbeitetem Getreide inkl. Mais und in bestimmten Lebensmitteln mit Höchstwerten geregelt. Die VO ist (rückwirkend) ab 1.7.2007 gültig.

Neben den wichtigen Höchstwertregelungen war die Kommission u.a. auch mit der Adaptierung der Entscheidung 2006/504/EG über Sondervorschriften für aus bestimmten Drittländern eingeführte bestimmte Lebensmittel wegen des Risikos einer Aflatoxin-Kontamination dieser Erzeugnisse mehrfach befasst (z.B. Mandeln aus den USA, Erdnüsse aus Brasilien).

Neue aktuelle EU Regelungen – Futtermittel

Im Jahre 2007 wurden keine neuen Mykotoxinregelungen für Futtermitttel veröffentlicht. Gültig sind die z.Z. bestehenden, nämlich die Richtlinien 2003/100/EG und 2002/32/EG sowie die Empfehlung 2006/576/EG.

Auswahl wichtiger EU Vorhaben hinsichtlich Mykotoxine für 2008

Prüfung des Datenmaterials über T-2/HT-2 Toxin und Diskussion über eine ev. Regelung.

EU Aflatoxinregelung im Spannungsfeld der Codex-Diskussionen.

Arbeitsgruppe über die Probenahme bei größeren Chargen.

Neuauflage der Leitlinie für zuständige Behörden bezüglich der amtlichen Kontrolle der Aflatoxinkontamination in Lebensmitteln.

Fusarientoxine – Vorkommen in Österreich

Deoxynivalenol (DON):

DON war in den letzten 4 Jahren in unverarbeitetem Getreide (exkl. Mais) zwar häufig nachweisbar (im Durchschnitt bei 60% der Proben), jedoch lagen meistens mehr als 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.

In unverarbeitetem Mais (Körner) war DON in den letzten 4 Jahren bei rd. 95% der Proben nachweisbar. Der Lebensmittel-Höchstwert von 1750 ppb wird im Durchschnitt von ca. 88% der Körner unterschritten. Während der Richtwert für Futtermittel-Ausgangsstoffe (8000 ppb) nahezu immer unterschritten wird, schwankten die Überschreitungen des Futtermittelrichtwertes für

Schweine von 900 ppb bei den unverarbeiteten Maiskörnern in den letzten 3 Jahren zwischen 50 (2005) und 20% (voraussichtlich 2007).

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

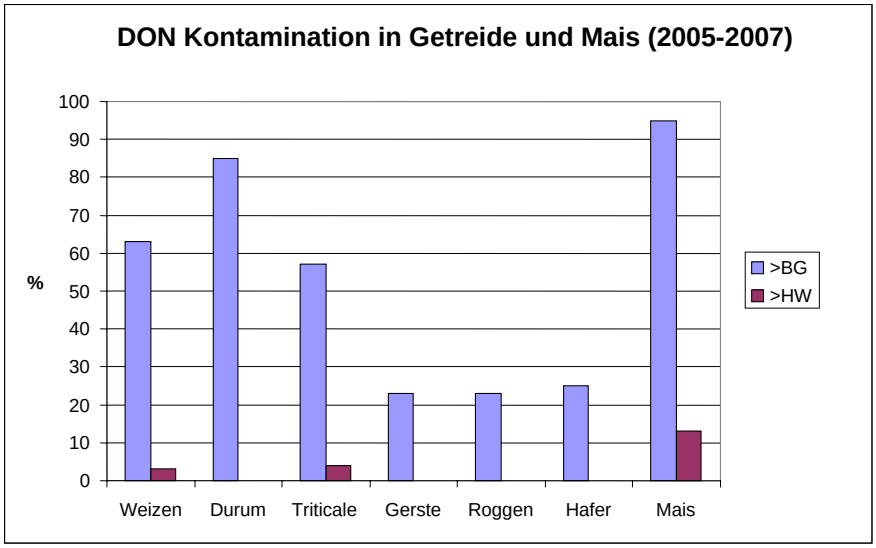


Abbildung: Auftreten der DON Kontamination in Getreide und Mais (BG = Bestimmungsgrenze, HW = Höchstwert für unverarbeitetes Getreide oder Mais für die Lebensmittelproduktion)

In Futtermitteln auf Getreidebasis ist DON ca. zu 80% quantifizierbar (>BG). Nahezu 100% der Gehalte liegen <2000 ppb und ca. 85% liegen unter 900 ppb (Richtwert für Schweine). Mischfuttermittel sind im Allgemeinen etwas weniger kontaminiert als Einzelfuttermittel.

Zearalenon (ZON)

In unverarbeitetem Getreide (exkl. Mais) war ZON in den letzten 4 Jahren kaum quantifizierbar (meistens lagen mehr als 90% der untersuchten Proben unter der Bestimmungsgrenze von 20 ppb). Erwartungsgemäß wurde der entsprechende Höchstwert (100 ppb für Lebensmittelproduktion) in mehr als 95% der Fälle unterschritten.

Unverarbeitete Maiskörner enthielten in den letzten 3 Jahren (2004-2006) häufig ZON (bei rd. 90% der Proben nachweisbar). Der neue Lebensmittelhöchstwert von 350 ppb wurde im Durchschnitt von rd. 10% der Proben überschritten (Anmerkung: österreichischer Mais wird hauptsächlich für die Futtermittelerzeugung produziert). Wären die unverarbeiteten Maiskörner direkt als Alleinfuttermittel für Ferkel und Jungsauen (Richtwert: 100 ppb) 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.

ZON wird in getreidehältigen Futtermitteln mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von etwa 50% quantifiziert. Der Großteil der Gehalte (rd. 98%) liegt unterhalb von 500 ppb bzw. ca. 90% unterschreiten 100 ppb.

Fumonisine B1+B2

Fumonisine werden jahrabhängig in sehr unterschiedlichem Maße nachgewiesen. Die Quantifizierungsrate der letzten Jahre liegt zwischen 10 und 25%. Die Gehalte liegen in allen Fällen weit unter Höchst- bzw. Richtwerten für unverarbeiteten Mais.

Fumonisine sind in Futtermitteln in etwa bei 15% der Proben quantifizierbar. Die Gehalte schwanken zwischen <NG und 3370 ppb. Ein anzuwendender Richtwert wird nicht überschritten.

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 50% der Proben NIV quantifiziert werden (>75 ppb). Der NIV Gehaltsbereich (<NG – 690 ppb) ist jedoch im Vergleich zu DON (<NG - >6000 ppb) deutlich geringer.

In Futtermitteln auf Getreidebasis ist NIV ca. zu 15% quantifizierbar (>BG).

T-2 Toxin und HT-2 Toxin

Zukünftig wird diesen 2 Fusarientoxinen (Typ der A-Trichothecene) größeres Augenmerk geschenkt. In den letzten Jahren ist meistens eine gesicherte Quantifizierung durch das Fehlen einer geeigneten Bestimmungsmethode gescheitert. Durch Einführung einer Isotopenverdünnungs-GC/MS-Methode können nun gesichert Gehalte ab 4 ppb bestimmt werden. Wie aus der Literatur bekannt treten diese 2 Toxine hauptsächlich bei Hafer auf (*Fusarium langsethiae, Fusarium sporotrichioides*). Vorläufige Ergebnisse aus 2007 zeigen auch eine T-2 / HT-2 Kontamination von unverarbeiteten Haferkörnern von über 90% (rd. 45% der Summen aus T-2 und HT-2 lagen >100 ppb) und in getreidehältigen Futtermitteln war T-2 / HT-2 in rd. 25% der Proben bestimmbar.

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

Mykotoxingehalte ausgewählter Lebensmittelproben 2007

Occurrence of mycotoxins in food samples 2007

A. RADITSCHNIG

Summary

An overview was given about the occurence of several mycotoxins in baby food, breakfast cereals, maize-products, dried fruits and raisins.

Zusammenfassung

Es wird ein Überblick über das Vorkommen von verschiedenen Mykotoxinen in Kindernährmittel, Frühstückscerealien, Maisprodukte, Trockenobst und Rosinen gegeben.

Schlüsselwörter: Mykotoxingehalte, Schwerpunktaktion, Kindernährmittel, Frühstückscerealien, Maisprodukte, Rosinen, Trockenobst

Einleitung:

Zur Beurteilung des Gefährdungspotenzials der österreichischen Bevölkerung durch Mykotoxinkontaminierte Lebensmittel, werden jährlich Probenziehungsprogramme (Schwerpunktaktionen) vom Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend veranlasst.
Im Jahre 2007 waren Kindernährmittel auf Getreidebasis, Frühstückscerealien, Maisprodukte, Trockenobst und getrocknete Weintrauben im Untersuchungsumfang.

Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZON), Aflatoxine in Kindernährmittel auf Getreidebasis:

In den untersuchten Proben konnten die Mykotoxine DON, ZON und Aflatoxine kaum nachgewiesen werden. Lediglich 3% der Proben erreichten DON-Gehalte knapp über der Bestimmungsgrenze (50 µg/kg), blieben aber deutlich unter dem gesetzlichen Höchstwert von 200 µg/kg. Bei 2 weiteren Proben lagen die Werte knapp über der Nachweisgrenze (25 µg/kg). Bei ZON und den Aflatoxinen lagen die Werte jeweils zu 100% unter den Nachweisgrenzen (10 µg/kg bei ZON bzw. 0,02 µg/kg bei den Aflatoxinen).

DON, ZON, Ochratoxin A (OTA), Aflatoxine in Frühstückscerealien (Müsli, Corn Flakes, etc):

Wie in Abb.1 zu sehen ist, war keine der Proben über den gesetzlichen Höchstwert von 500 µg/kg für DON. ZON war in 98% der Proben unter der Nachweisgrenze (10 µg/kg). Bei einer Probe lag der Wert über der Bestimmungsgrenze, aber noch deutlich unter dem gesetzlichen Höchstwert von 50 µg/kg. OTA konnte in 48% der Proben nachgewiesen werden (LOD=0,05 µg/kg), was auf die breite Verwendung von Rosinen als Zutat in Müslis zurückzuführen ist (Abb.2).

Der höchste gefundene Wert für OTA betrug 1,7 µg/kg. Bei den Aflatoxinen gab es eine Höchstwertüberschreitung (6,1 µg/kg Aflatoxin B1; Müsli mit Nuss), sonst lagen die Werte zu mehr als 80% unter der Nachweisgrenze (0,02 µg/kg).

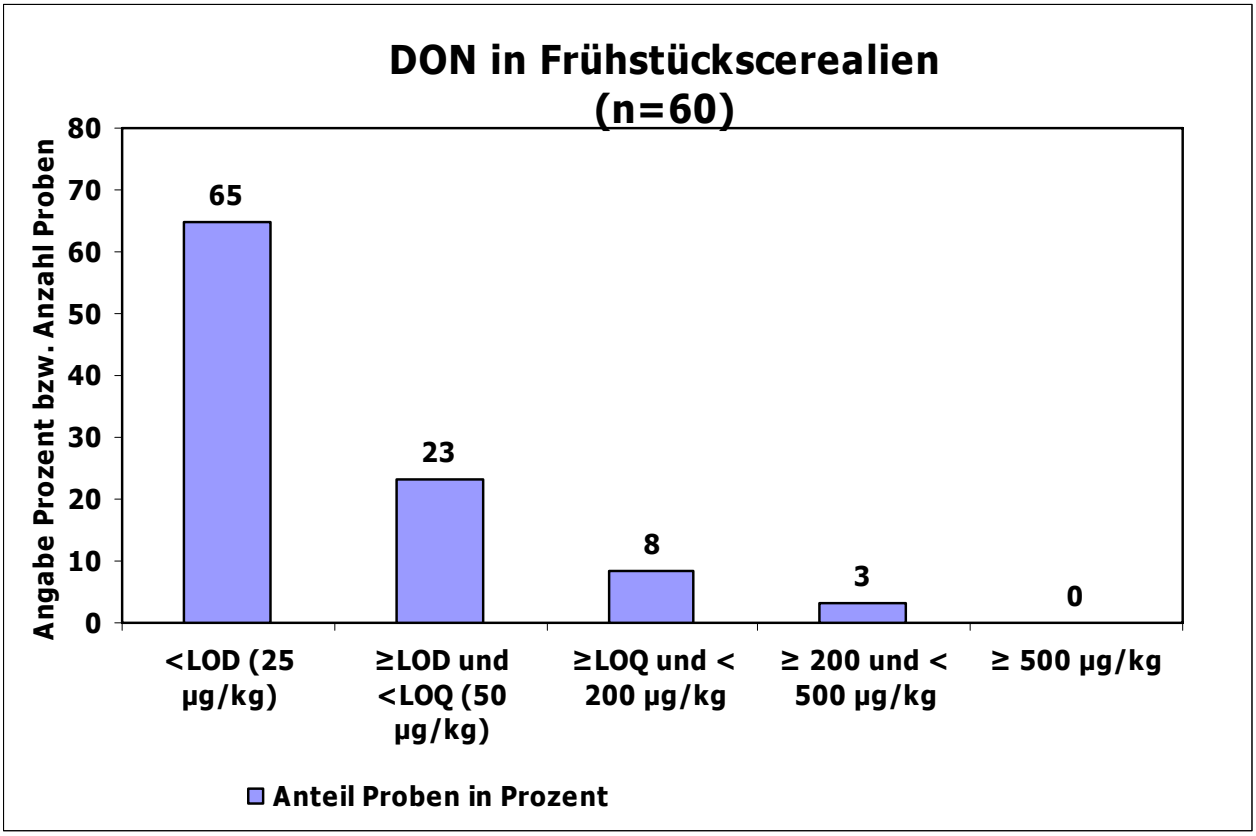


Abb.1 DON-Gehalte in Frühstückscerealien (LOD=Nachweisgrenze; LOQ=Bestimmungsgrenze)

DON, ZON, Fumonisine B1 und B2 in Maisprodukten (Polenta, Popcorn, Corn Flakes etc.):
In mehr als 60 % der Proben konnte DON über der Bestimmungsgrenze (50 µg/kg) gemessen werden. Es gab 2 Höchstwertüberschreitungen (Popcorn; 1000 bzw. 2000 µg/kg DON); (Abb.3.)
Die Proben waren hingegen mit ZON (86%<LOD 10 µg/kg) und Fumonisinen (70%<LOD 20 µg/kg) vergleichsweise wenig belastet.

Ochratoxin A in Trockenobst (getrocknete Datteln, Feigen, Marillen, Pflaumen, Bananen, etc. (keine Weintrauben)):
87% der Proben waren unter der Nachweisgrenze (0,05 µg/kg). Der höchste gefundene Wert betrug 2,2 µg/kg (getrocknete Aprikosen)

Ochratoxin A in getrockneten Weintrauben (Rosinen, Korinthen, Sultaninen, etc.):
In 76 % der Proben war Ochratoxin A nachweisbar (LOD = 0,05 µg/kg). Jedoch gab es keine Höchstwertüberschreitung des explicit für getrocknete Weintrauben festgelegten Höchstwertes von 10 µg/kg (Abb.4).

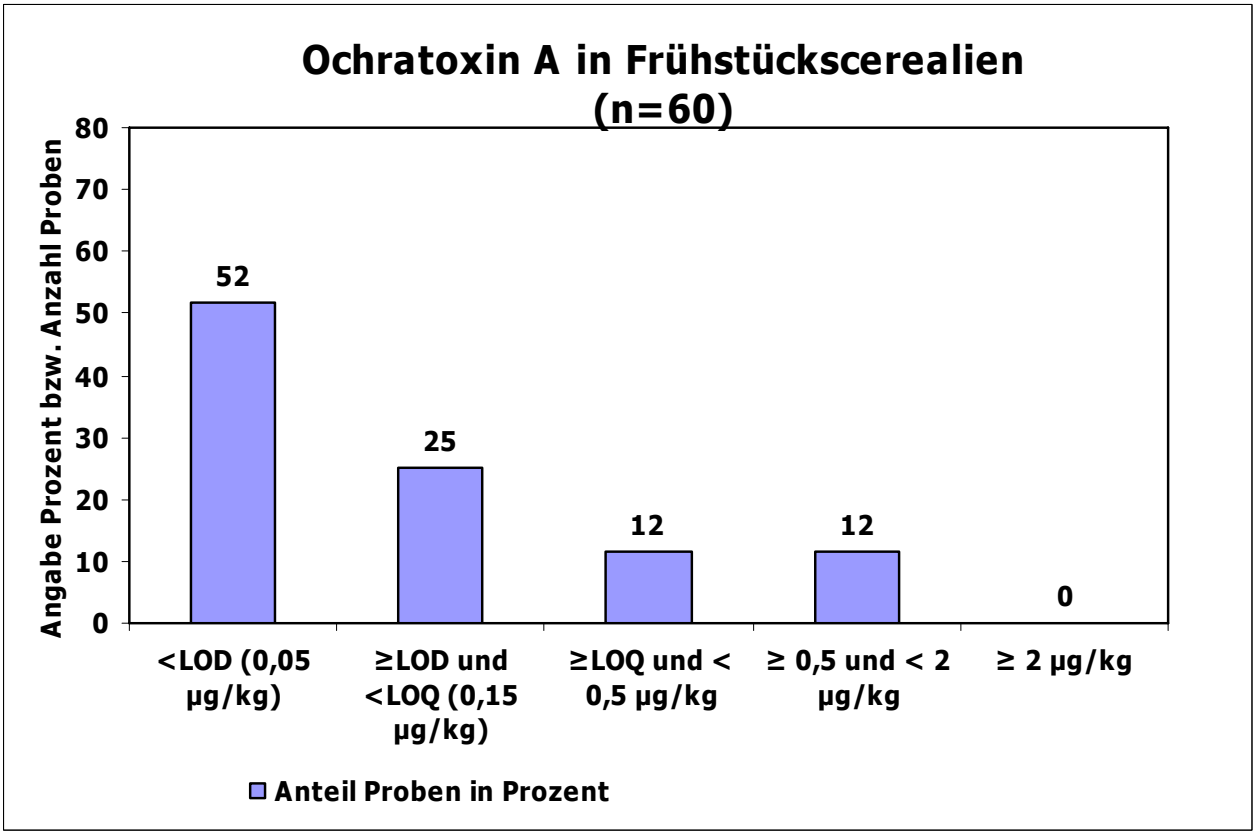


Abb.2 Ochratoxin A in Frühstückscerealien

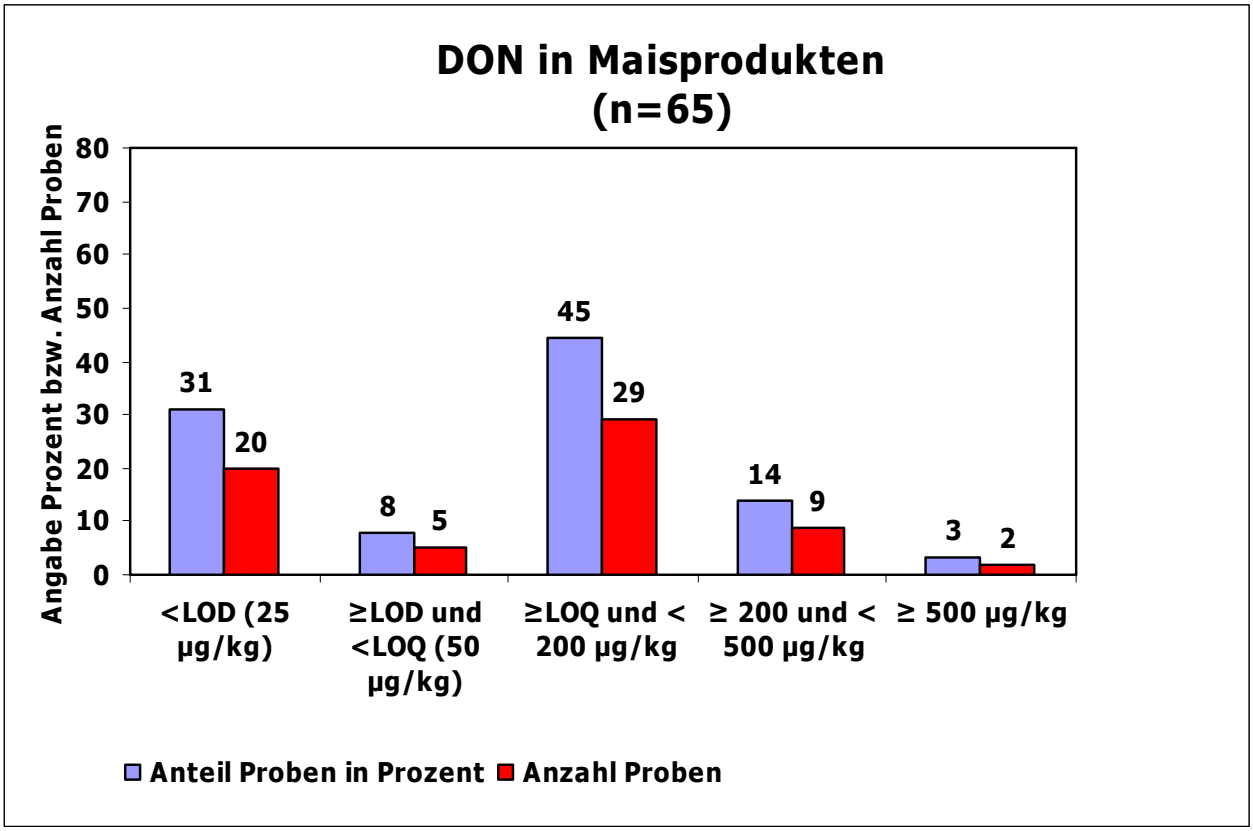


Abb.3 DON-Gehalte in Maisprodukten

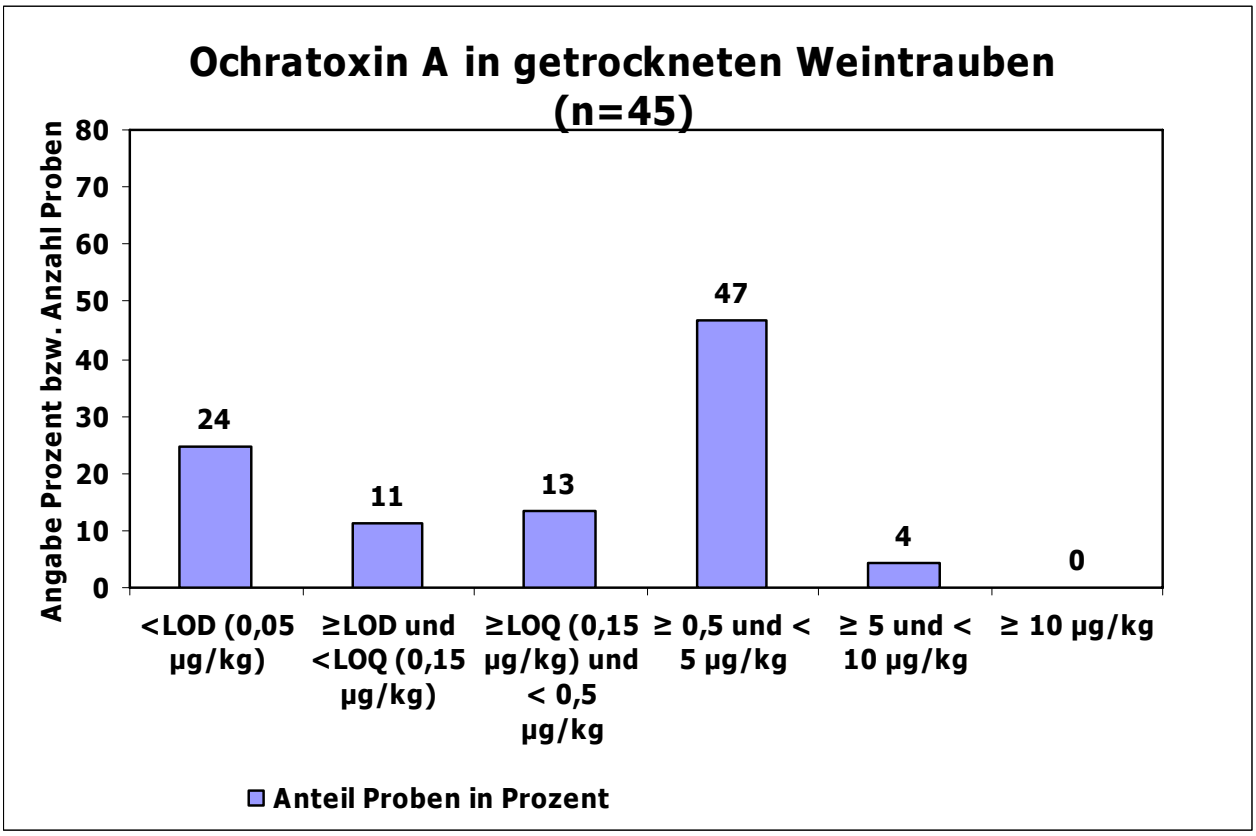


Abb.4 Ochratoxin A in getrockneten Weintrauben

Autor

Dipl.-Ing. Armin RADITSCHNIG, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz

Mutterkornalkaloide – Bedeutung und erste eigene Ergebnisse zum Vorkommen 2007

Ergot alkaloids – relevance and first own results of incidences in 2007

M. APPELT & F. M. ELLNER

Summary:

Ergot intoxications are well known since the Middle Ages. Even today concerning ergot alkaloid contents in food can occur occasionally. We analyzed 17 ergot samples from different federal states and single sclerotia to determine alkaloid content and distribution suggesting toxin specific legal limits. The total alkaloid content varied from 0.03 – 0.18% (rye) and 0.06 – 0.22% (triticale).

Keywords:

Ergot alkaloids, ergot, *Claviceps purpurea*, toxicity, regulation, HPLC-FLD

Zusammenfassung:

Vergiftungen mit Mutterkorn (Ergotismus) sind seit dem Mittelalter wohlbekannt. Auch heute können in Lebensmitteln gelegentlich Mutterkornalkaloidgehalte auftreten, die zu Besorgnis Anlass geben. Wir untersuchten hier 17 Mutterkornproben aus unterschiedlichen Bundesländern und Einzelsklerotien auf Alkaloidgehalt und -verteilung, deren Ergebnisse toxinspezifische Grenzwerte nahelegen. Der Gesamtalkaloidgehalt lag bei 0,03 - 0,18% (Roggen) bzw. 0,06 - 0,22% (Triticale).

Stichworte:

Ergotalkaloide, Mutterkorn, *Claviceps purpurea*, Toxizität, Regulierung, HPLC-FLD

Einleitung:

Als Mutterkorn werden die Dauerstadien (Sklerotien) des auf verschiedenen Süßgräsern parasitierenden Schlauchpilzes *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne bezeichnet, die sich besonders in feuchten Jahren vor allem bei Roggen und Triticale, seltener an Weizen, Gerste und Hafer, aber auch an Futter- und Wildgräsern finden. Seit dem Mittelalter sind schwere Massenvergiftungen durch den Verzehr mit Mutterkorn durchsetzten Getreides dokumentiert, denen hunderttausende Menschen zum Opfer fielen. Die Ergotismus genannten chronischen Vergiftungssymptome treten in zwei Ausprägungen auf, die zum Tode führen können: E. gangraenosus (Antoniusfeuer, ignis sacer) mit brennenden Schmerzen, Nekrosen, Gefäßspasmen und Absterben von Gliedmaßen bis hin zu deren Abfallen und E. convulsivus, bei dem Krampfanfälle, Kopfschmerzen, Übelkeit und Psychosen im Vordergrund stehen. Anzeichen akuter Intoxikation sind neben unspezifischer Symptome wie Durst, Übelkeit und Kopfschmerzen Parästhesien („Kribbelkrankheit“), Krämpfe, Verwirrung, Tachykardie, Uterusblutungen und ggf. Aborte bis hin zum Tod durch Atemlähmung oder Kreislaufversagen. In Mitteleuropa treten durch die bessere Getreidereinigung Vergiftungen

heute nur noch in Einzelfällen oder iatrogen durch Anwendung von Einzelalkaloiden auf (Migränetherapeutika oder Gynäkologika, weiterhin viele partialsynthetische Wirkstoffe für neurologische Erkrankungen wie Morbus Parkinson etc.).

Die im Mutterkorn enthaltenen Toxine, die zu den Indolalkaloiden zählen, weisen ein tetrazyklisches Ergolinsystem auf und werden in Lysergsäurederivate und Clavine, bei denen die Carboxygruppe der Lysergsäure zu einer Methyl- oder Hydroxymethylgruppe reduziert ist, unterteilt. Die Lysergsäurederivate gliedern sich in einfache Amide (Ergometrin, Ergin) und Alkaloide mit einem zyklischen Peptidrest (Ergotamin, Ergosin, Ergocristin, Ergokryptin, Ergocornin, etc.).

Die Lysergsäurederivate treten außerdem in zwei stereoisomeren Formen auf, die das Suffix –in (8(*R*)-) bzw. –inin (8(*S*)-, Isolysergsäurederivate) tragen, bei denen es sich um Epimere an C-8 handelt.

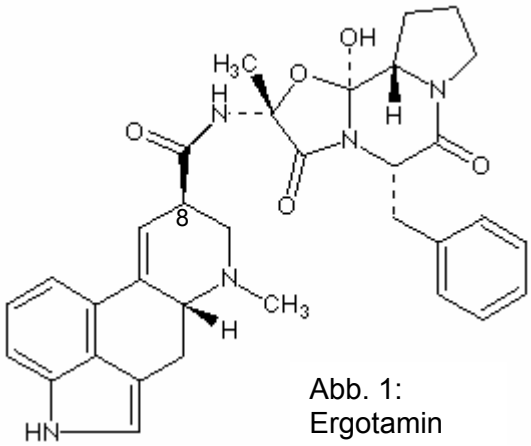


Abb. 1: Ergotamin

Die Mutterkornalkaloide sind sowohl lichtempfindlich als auch thermolabil und epimerisieren leicht (reversibel). Toxikologisch bedeutsam sind vor allem die *R*-Isomeren (-ine), da vorwiegend sie biologisch stark aktiv sind.

Der Mutterkorngehalt in Getreide für den menschlichen Verzehr darf in der EU seit April 2000 maximal 0,05% betragen, was bei einem durchschnittlichen Alkaloidgehalt von etwa 0,2 % 1 mg Gesamtalkaloide pro Kilogramm entspricht. Der Gesamtalkaloidgehalt und das Verteilungsmuster der Einzelalkaloide des Mutterkorns ist jedoch abhängig von der Wirtspflanze, der *Claviceps*-Art und ihrer (chem.) Rasse, der geographischen Herkunft, dem Alter der Droge und ihren Lagerbedingungen. Daher ist es sinnvoller, zulässige Höchstmengen nicht mehr einfach über prozentuale Anteile an Mutterkornsklerotien zu definieren, sondern toxinspezifische Grenzwerte für die wichtigsten Alkaloide festzusetzen. Für die hierfür notwendige Lebensmittelanalytik befindet sich in Deutschland ein amtliches Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB in Vorbereitung.

Im Rahmen dieser Untersuchung haben wir in Mutterkornproben von Roggen und Triticale verschiedener Herkunft und Getreidesorten der Ernte 2007 den Alkaloidgehalt und dessen Verteilung bestimmt. Dabei wurden auch einzelne Sklerotien untersucht und mit dem Durchschnittsgehalt der Probe verglichen.

Methode:

Die HPLC besteht aus einem Agilent 1100 System mit Fluoreszenzdetektor (λ_{Ex} 330 nm, λ_{Em} 415 nm), die Säule ist eine Phenomenex Gemini Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 4,6 mm) und auf 30°C temperiert. Mit Acetonitril/Ammoniumcarbamatpuffer (0,2 g/l) (1:1) als mobiler Phase wird bei einem Fluss von 0,8-1,5 ml/min isokratisch eluiert.

Das gemahlene Mutterkorn (≤ 0,5 mm, ca. 50 mg) wird mit 50,0 ml basischem Extraktionsmittelgemisch 45 min geschüttelt. Dem Extrakt werden ohne weitere Probenvorbehandlung 1000, 100 und 20 µl-Aliquote entnommen und das Extraktionsmittel im N_2-Strom bei 30°C abgedampft. Nach Aufnahme in 1 ml Laufmittelgemisch (Ultraschallbad, Vortexer) werden 10 µl direkt injiziert (Nadelwaschprogramm) (1, 2, [modifiziert für Mutterkornsklerotien]).

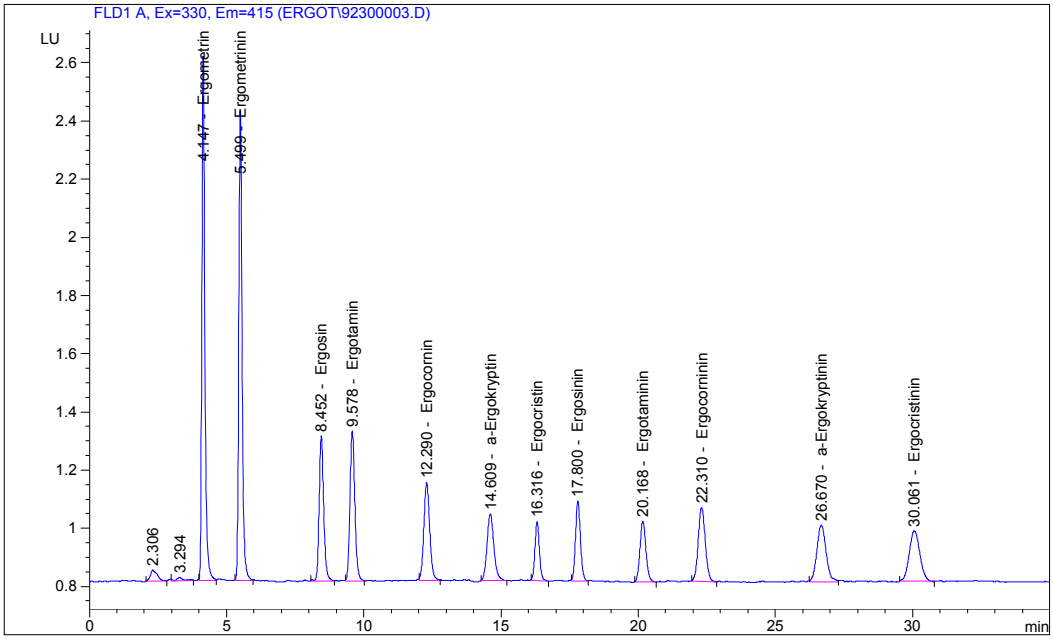


Abb. 2: Ergotalkaloid-standard 25 ng/ml

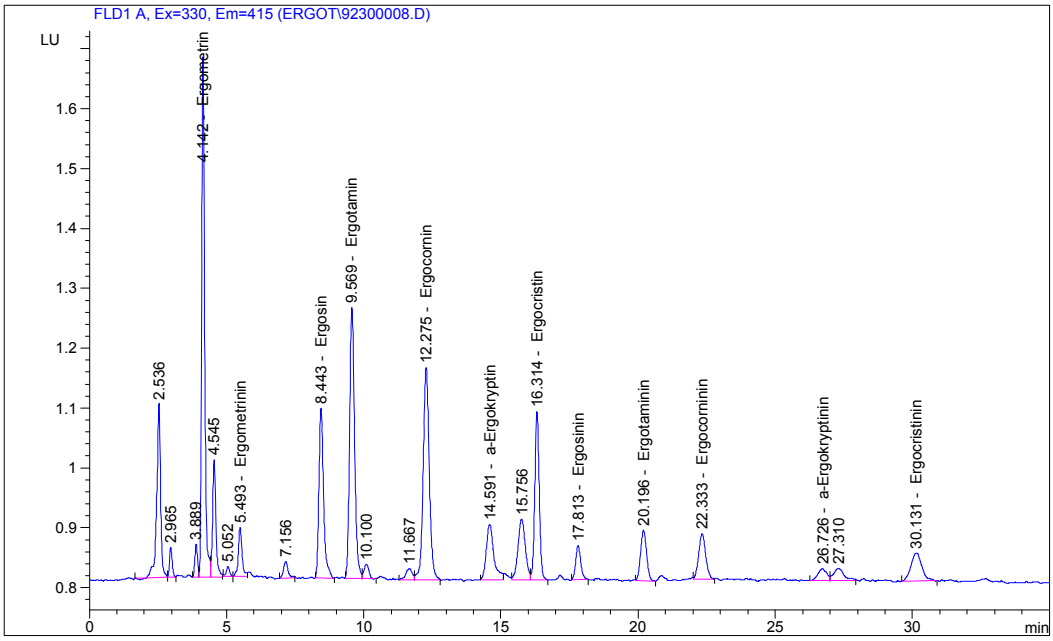


Abb. 3: Chromatogramm einer Mutterkornprobe

Ergebnisse:

Es wurden 13 Proben von Mutterkornsklerotien div. Roggensorten aus Sachsen-Anhalt (9), Bayern, Sachsen, Berlin und Baden-Württemberg sowie 4 von Triticalesorten aus Bayern und Sachsen untersucht. Der Gesamtalkaloidgehalt lag bei 0,03 - 0,18% (Roggen) bzw. 0,06 - 0,22% (Triticale). Einzelkornmessungen der Roggensorte Avanti ergaben Gesamtgehalte von 0,2 ‰ - 0,32%, der Wert der Mischprobe war 0,18%. Bei der Sorte Fernando fanden wir 0,3 ‰ - 0,37%, bei

der Mischprobe 0,06% Gehalt. Für die Triticalesorte SW Talentro ergab sich ein ähnliches Bild: 0,5 ‰ - 0,39% in den Einzelsklerotien und 0,21% als Wert der Mischprobe. Das mittlere Sklerotiengewicht betrug 83,7 mg (Avanti), 99,3 mg (Fernando) bzw. 86,2 mg (SW Talentro).
Zwischen der Größe der Einzelsklerotien und deren Alkaloidgehalt und -verteilung konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden (siehe Beispiel Tab. 2).

Gehalte der Hauptalkaloide in den untersuchten Mutterkornproben [‰]				
	Ergotamin	**Ergocristin**	**Ergosin**	**Ergocornin**
Winterroggen	4 - 31	3 - 40	4 - 18	2 - 31
Triticale	7 - 32	10 - 60	12 - 28	4 - 25

⇦ Tab. 1: Alkaloidgehalte in Mutterkorn

⇩ Tab. 2: Einzelkorn-Alkaloidgehalte

Einzelkornmessung Roggenmutterkorn (Fernando): ausgewählte Hauptalkaloidgehalte [‰]						
Sklerotium	Ergotamin	Ergocristin	Ergocornin	Ergosin	Ergocorninin	Ergocristinin
481,8 mg	0,2	0,1	-	-	-	-
354,6 mg	0,9	83	106	15	84	
247,1 mg	38	148	2	8	-	92
238,2 mg	0,1	0,2	-	-	-	0,2
158,7 mg	0,3	-	-	-	-	-
84,0 mg	21	54	0,9	3	-	43
69,9 mg	-	-	-	-	-	-
Misch	4	10	11	4	8	9

Für die toxikologische Beurteilung des Mutterkorns und die Festlegung eines Grenzwertes für den Alkaloidgehalt in Lebensmitteln besteht das Problem, eine Schwellendosis für Gesundheitsschäden für ein Gemisch aus komplex wirkenden, in ihren Gehalten schwankenden Substanzen mit divergierenden rezeptorvermittelten Wirkungen zu finden. Momentan kann von einer tolerierbaren Tagesdosis der Einzelalkaloide von max. 1-3 µg/kg Körpergewicht ausgegangen werden. Wegen der vermutlich additiven Wirkung sollte die tolerierbare Menge an Gesamtalkaloiden nicht höher als der für ein Einzelalkaloid liegen und die Höchstmenge in Getreide für den menschlichen Verzehr 100 µg Gesamtalkaloide/kg nicht übersteigen (BfEL).

Literatur:

1 Müller, C., Klaffke, H. S., Krauthause, W., Wittkowski, R., *Mycotoxin Research,* **22:** 197-200

2 Müller, C., private Mitteilung (in Veröffentlichung)

Autoren

Dipl.-Chem. Matthias APPELT, Dr. Frank M. ELLNER, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (ab 01.01.2008: Julius-Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen), Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str 19, D-14195 Berlin

Genomforschung an *F. graminearum*: relevant für zukünftige Bekämpfungsstrategien?

Genomics of F. graminearum: relevance for future control strategies?

U. GUELDENER, MICHAELA PERUCI, F. BERTHILLER, ANGELA CZIFERSZKY, GERLINDE WIESENBERGER, C. ERHART, JASMIN DREXLER, K. BRUNNER, R. SCHUHMACHER, R. KRSKA, M. LEMMENS, R. MITTERBAUER & G. ADAM

Summary:

The control of the fungal pathogen *Fusarium graminearum* which causes severe diseases of small grain cereals and maize is difficult. Complete genetic resistance is not available in the breeding material, fungicide treatment and biocontrol lack efficacy, and changes in agricultural practice (low tillage) may increase the disease pressure. Genome research allowes the development of new tools to increase our understanding of the virulence mechanisms of this pathogenic fungus. The knowledge obtained by interdisciplinary approaches should lead to new ways to antagonize or neutralize target genes. The strategy is exemplified by the gene *PPT1* encoding a central enzyme for the biosynthetic pathway of many secondary metabolites.

Keywords: *Fusarium graminearum*, genome database, secondary metabolites

Zusammenfassung:

Die Kontrolle des pathogenen Pilzes *Fusarium graminearum*, des Erregers der Ährenfusariose von Getreide und der Kolbenfäule von Mais, ist schwierig. Es ist keine vollständige Resistenz im Zuchtmaterial bekannt, Fungizidbehandlung und Biokontrolle sind ineffizient, und gegenwärtige Trends im Pflanzenbau (hin zu nichtwendender Bodenbearbeitung) dürften den Befallsdruck in Zukunft noch erhöhen. Die Genomforschung erlaubt die Entwicklung neuer Werkzeuge, die zu einem verbesserten Verständnis der Virulenzmechanismen dieses Pilzes führen. Die durch interdisziplinäre Zusammenarbeit gewonnen Einblicke sollten neue Strategien ermöglichen, wie Virulenzmechanismen des Pilzes neutralisiert werden können. Dies soll am Beispiel des Gens *PPT1* dargelegt werden, das für die Biosynthese von verschiedenen Pilzmetaboliten von entscheidender Bedeutung ist.

Schlüsselwörter: *Fusarium graminearum*, Genomdatenbank, Sekundärmetaboliten

Einleitung:

Im Gegensatz zu Mehltau- und Rostpilzen von Getreide hat *Fusarium graminearum* (und andere „nekrotrophe“ pflanzenpathogene Pilze) ein extrem breites Wirtsspektrum. Monogene vollständige Resistenzen sind in keinem der Wirte bekannt, sondern es wurden polygen oder (bedingt durch geringe Auflösung der Analyse) oligo-gen vererbte quantitative Unterschiede in der Resistenz

identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass von Seite des Pilzes multiple Virulenzmechanismen benutzt werden, die in höher resistenten Linien zumindest partiell neutralisiert werden können. Über die molekularen Mechanismen, die es *F. graminearum* erlauben ein so breites Spektrum von Pflanzen zu befallen, ist noch wenig bekannt. Die Produktion des Proteinbiosyntheseinhibitors Deoxynivalenol ermöglicht es dem Pilz die Abwehrreaktion der Wirtspflanze (zumindest partiell) lahm zu legen oder zu verzögern. Gendisruptionsmutanten die keine Trichothecene mehr bilden, können sich in befallenen Ähren nicht mehr ausbreiten. Der wirkungsvollste QTL für *Fusarium*-Ausbreitungsresistenz in Weizen geht mit erhöhter Toxinresistenz einher, wobei DON in inaktives DON-Glucosid übergeführt wird (Lemmens *et al.*, 2005).

Durch den enormen Fortschritt in den Sequenziertechniken und die Verfügbarkeit von Methoden der Genomforschung ist es nun möglich geworden, die Frage, welche Gene für die Virulenz von *Fusarium* notwendig sind, neu zu stellen.

Werkzeuge und Ergebnisse der *Fusarium*-Genomforschung

Finanziert mit Mitteln des US Department of Agriculture (etwa 2 Millionen Dollar) wurde die Sequenz des Genoms von *Fusarium graminearum* am Broad Institute ermittelt. (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_graminearum/Home.html).

Die Genomgröße von *Fusarium graminearum* beträgt annähernd 36 Mb (Millionen Basen), und ist somit etwa 12x größer als das Genom des Bakteriums *Escherichia coli*, oder 83x kleiner als das Genom des Menschen oder anderer Säugetiere. Die Strategie war dabei, die Enden von zufälligen Klonen aus Genbanken anzusequenzieren („shotgun“ Methode), wobei solange sequenziert wurde, bis statistisch jede Base im Genom 10,6 fach abgedeckt sein sollte. Das „Puzzle“ (Sequenzen aus über 600.000 Sequenzläufen) wurde mittels eines Computerprogrammes zusammengesetzt, wobei immer wieder kleine Lücken auftreten. Die Sequenz hat jedoch hervorragende Qualität, 97% aller Basen befinden sich in einer durchgängigen Sequenz („Contig“) größer 1,6 Mb. Die Vorhersage, für welche Genprodukte (Proteine, ribosomale RNAs, etc.) die DNA Sequenz kodiert, ist bei Pilzen noch schwierig, da Programme zur Erkennung von „Introns“ (Genunterbrechungen) noch viele Fehler liefern. Verschiedene bioinformatische Algorithmen führten zu divergierenden Vorhersagen über die Zahl und Struktur der etwa 12.000 Proteine von *F. graminearum*.

Im Rahmen des österreichischen Genomforschungsprogrammes GEN-AU (Pilotprojekt FUSARIUM, Koordinator G. Adam) wurde daher ein Schwerpunkt auf die manuelle Annotation und den benutzerfreundlichen Informationszugang gesetzt. Im Projekt wurde von U. Güldener (MIPS, Munich Information Center for Protein Sequences) eine für die weltweite *Fusarium*-Forschergemeinde nunmehr extrem wichtige Genomdatenbank erstellt (FGDB siehe: http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/ und Gueldener *et al*, 2006a).

Basierend auf den Genmodellen wurde mit US Mitteln ein Affymetrix Gen-Chip erstellt (Güldener et al, 2006b), der es nun erlaubt, die Expression aller Gene in einem Experiment zu verfolgen. Dies führte zum Beispiel zur Identifizierung von Genen, die ausschließlich während des Befalls der Pflanze exprimiert werden. Weiters wurden Gene identifiziert, die nur in *F. graminearum* vorkommen, in nahe verwandten *Fusarium*-Arten jedoch nicht. Weltweit bemühen sich nun Forscher mit Hilfe dieser neuen Ressourcen attraktive Kandidatengene auszuwählen und deren Relevanz experimentell zu testen. Die Ergebnisse der Arbeiten von 45 Forschern (davon 16 aus USA und Kanada, und 21 aus Europa) wurden in einem Ende 2007 erschienen Science-Artikel (und insbesonders im Supporting Online Material) zusammengefasst (Cuomo *et al.*, 2007. http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/317/5843/1400/DC1). Interessant ist zum Beispiel die Fragestellung, welche Unterschiede zwischen dem Genom eines harmlosen Saprophyten (z.B. *Neurospora crassa*), und dem Phytopathogen *F. graminearum* bestehen (siehe Tabelle 1). Zwar ist das Genom des Pathogens etwas kleiner, es kodiert jedoch für etwa 1500 Gene mehr, wobei die Zahl der vorhergesagten „sekretierten Proteine“, von denen viele eine Rolle im Angriff auf die Pflanzenzellwand spielen dürften, im Pathogen deutlich größer ist. Auffällig ist auch, dass der pathogene Pilz mehr Transkriptionsregulator-Proteine aufweist. Neben Proteinen, welche die Zellwandpolymere angreifen (in Tabelle 1 sind nur Pektinabbauende als Beispiel gezeigt) sind vor allem Zuckertransporter im Pathogengenom überrepräsentiert. Besonders augenscheinlich ist jedoch, dass der Pathogen über eine wesentlich höhere Kapazität zur Biosynthese und zum Transport von Sekundärmetaboliten hat, wobei weitgehend unbekannt ist, was die Produkte dieser Synthesewege sind. Bekannte Produkte von Polyketidsynthasen (PKS) von *F. graminearum* sind z.B. das rote Pigment und Zearalenon. Die Siderophore (siehe Beitrag F. Berthiller) sind Produkte von nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NRPS). Die Trichothecene (z.B. Deoxynivalenol) dagegen sind Produkte einer Terpenoidsynthase (TS), die anschließend von Cytochrom P450 Enzymen weiter modifiziert werden. Die Bäckerhefe besitzt weder PKSs noch NRPSs Gene und hat nur 5 TSs (zum Vergleich siehe Tabelle 1).

Basierend auf der Hypothese, dass Sekundärmetaboliten des Pilzes entscheidend zur Virulenz beitragen, wurde im Rahmen des GEN-AU Projektes ein attraktives „Target-Gen“ zur *Fusarium*-Kontrolle identifiziert. Alle PKSs und NRPSs benötigen zur Funktion die posttranslationale Anheftung einer prosthetischen Gruppe (4-Phosphopantethein). Das Gen *PPT1*, das für die Phosphopantethein-Transferase (Ppt1) kodiert, konnte identifiziert werden und wurde inaktiviert. Die Erwartung, dass der Verlust der Ppt1 gleichbedeutend mit einer gleichzeitigen Inaktivierung aller PKS und NRPS Gene sein sollte und somit zum Verlust der Fähigkeit zur Bildung vieler Sekundärmetaboliten führt, wurde bestätigt (siehe auch Beitrag Berthiller *et al.* in diesem Heft). Die Mutante weist auch drastisch reduzierte Virulenz auf (Peruci *et al.*, 2006, Peruci *et al.*, in Vorbereitung). Ziel von weiterführenden Arbeiten ist es nun, Inhibitoren des Enzyms

Phosphopantethein-Transferase zu identifizieren. Solche Substanzen könnten beispielsweise als natürliche Inhaltsstoffe in Pflanzen vorkommen, die höhere *Fusarium*-Resistenz aufweisen.

Eine mögliche zukünftige Strategie in der *Fusarium*-Resistenzzüchtung wäre daher, auf erhöhten Gehalt solcher Inhibitoren zu selektieren. Eine Voraussetzung ist natürlich, dass solche Substanzen nicht toxische für Mensch, Tiere und Pflanzen sind. Dies ist wahrscheinlich, der Mensch beispielsweise besitzt nur eine Phosphopantethein-Transferase mit stark divergierender Sequenz und einer Rolle im Lysin-Katabolismus. Alternativ könnten synthetische Ppt-Inhibitoren auch als Pflanzenschutzmittel Anwendung finden, die nicht wie bisher unselektiv das Wachstum von Pilzen inhibieren sondern nur die Bildung von Virulenzfaktoren des Pathogens unterbinden, und die Pflanze befähigen, selbst den Angriff des Pathogens abzuwehren.

Tabelle 1: Vergleich der Genome von *Neurospora crassa* und *F. graminearum*

Eigenschaft / Proteingruppe	***N. crassa***	***F. graminearum***
Genomgröße (Kb)	38.044	36.093
Vorhergesagte Zahl an Proteinen	10.082	11.640
Vorhersage „Sekretierte Proteine“	891	1.442
Transkriptionsregulator-Proteine	114	320
Major Facilitator Superfamily	**121**	**292**
Esterase/Lipase/Thioesterase	73	169
Cytochrome P450	43	115
Zucker-Transportproteine	34	91
ABC transporter	**44**	**76**
NRPS (nicht-ribosomale Peptid-Synthasen)	**3**	**20**
PKS (Polyketidsynthasen)	**7**	**15**
TS (Terpenoidsynthasen)	**7**	**17**
Pektat-Lyasen	2	13
Cutinasen	2	9
Pektin-Lyasen	0	4

Ausgewählte Gruppen von Proteinen sortiert nach Häufigkeit. Fett gedruckt: Genprodukte mit einer vermutlichen Rolle im Sekundärmetabolismus und Transport von Metaboliten.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim österreichischen Genomprogramm GEN-AU, bei der Christian Doppler Forschungsgesellschaft und beim Hochschuljubiläumsfonds der Stadt Wien für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Cuomo CA, Güldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma LJ, Baker SE, Rep M, Adam G, .. *et al.* … Kistler HC (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. Science **317**(5843), 1400-2.

Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Stümpflen V, Mewes HW, Adam G (2006a) FGDB: a comprehensive fungal genome resource on the plant pathogen *Fusarium graminearum*. Nucleic Acids Res **34**, D456-8.

Güldener U, Seong KY, Boddu J, Cho S, Trail F, Xu JR, Adam G, Mewes HW, Muehlbauer GJ, Kistler HC (2006b) Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. Fungal Genet Biol. **43**, 316-25

Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Adam G, Buerstmayr H, Mesterházy 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**, 1318-24.

Peruci M, Berthiller F, Lemmens M, Schuhmacher R, Krska R, Cziferszky A, Mitterbauer R, Adam G (2006) Phosphopantetheinyltransferase required for post-translational activation of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthases is a virulence factor of *Fusarium graminearum*. Biol Plant Microbe Interact **5**, 580-585.

Autoren:

Dr. Ulrich GUELDENER, Munich Information Center for Protein Sequences, Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit & Umwelt, GmbH, Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Neuherberg, Deutschland.

Dr. Michaela PERUCI; Dr. Angela CZIFERSZKY, Dr. Gerlinde WIESENBERGER, Clemens ERHART, Jasmin DREXLER, Dr. Kurt BRUNNER, Dr. Rudolf MITTERBAUER, Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM. Zentrum für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien.

Dr. Franz BERTHILLER, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA, 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.

Eine Achillesferse der Pilze? Siderophore von *Fusarium graminearum*

An Achilles heel of fungi? Siderophores of Fusarium graminearum

F. BERTHILLER, MICHAELA PERUCI, K.F. NIELSEN, G. ADAM, R. KRSKA UND R. SCHUHMACHER

Summary:

Siderophores are iron chelating compounds, produced by many microorganisms including various *Fusarium* species to facilitate uptake of sufficient amounts of iron. Beside the known siderophores malonichrome and triacetylfusarinine C, for the first time also triacetylfusarinine B, diacetylfusarinine A and acetylfusarinine were detected in culture media of wild-type *Fusarium graminearum*. In contrast, a 4'-phosphopantetheinyl-transferase (*ppt1*) knockout strain was no longer able to produce siderophores.

Keywords: siderophores, *Fusarium graminearum*, malonichrome, triacetylfusarinine C

Zusammenfassung:

Siderophore sind Eisen komplexierende Verbindungen, die von zahlreichen Mikroorganismen, wie auch verschiedenen *Fusarium*-Arten, gebildet werden um die ausreichende Aufnahme von Eisen zu ermöglichen. Neben den bekannten Siderophoren Malonichrom und Triacetylfusarinin C konnten bei Wildtyp *Fusarium graminearum* erstmals auch Triacetylfusarinin B, Diacetylfusarinin A und Acetylfusarinin nachgewiesen werden. Dagegen war ein 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase-Deletionsstamm (*ppt1*) nicht mehr in der Lage Siderophore zu produzieren.

Schlüsselwörter: Siderophore, *Fusarium graminearum*, Malonichrom, Triacetylfusarinin C

Einleitung:

Wie viele Mikroorganismen, synthetisieren auch *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* - die Hauptverursacher der Ährenfusariose - Siderophore und geben sie in die Umgebung ab. Siderophore (griechisch: Eisenträger) sind niedermolekulare Verbindungen mit einer hohen Affinität zu Eisen. Mehrere unterschiedliche, intrazelluläre und extrazelluläre, Siderophore wie Ferrichom, Coprogen und Fusarinin wurden bereits für *Fusarium sp.* beschrieben (Renshaw et al., 2002). Die hauptsächliche biologische Funktion von extrazellulären Siderophoren ist es die Versorgung des Mikroorganismus mit Eisen sicherzustellen. Dabei werden Siderophore aus der Zelle ins umgebende Medium ausgeschieden, Fe^{3+} komplexiert und anschließend wieder in die Zelle transportiert. Eisen ist für alle Eukaryoten essentiell und spielt auch in der Pflanze-Pilz-Interaktion eine wichtige Rolle.

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Siderophore Virulenzfaktoren von *F. graminearum* sind (Oide et al., 2006). Da *F. graminearum* für eine ausreichende Versorgung mit Eisen auf Siderophore angewiesen ist, stellen diese Verbindungen ein potentielles Ziel bei der Bekämpfung des Pilzes dar. Gelänge es die Biosynthese von Siderophoren bei *F. graminearum* zu unterbinden oder zu hemmen, würde ein dadurch vermindertes Pilzwachstum bzw. die geringe Virulenz auch verminderte Kontamination mit Mykotoxinen im Getreide bedeuten.

Siderophore werden von Nicht-Ribosomalen-Peptid-Synthetasen (NRPS) gebildet. NRPS benötigen dazu die prostethische Gruppe 4′-Phosphopantethein, welche essentiell für deren Funktion ist. Wir haben ein *F. graminearum* Gen identifiziert, welches für eine 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (Ppt1) kodiert (Peruci et al., 2006). Weiter wurde eine Deletionsmutante (*Δppt1*) hergestellt, die Ppt1 nicht mehr produzieren kann. Hier stellen wir Ergebnisse dieser Mutante *Δppt1* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm PH-1 bezüglich ihrer Siderophor-Bildung vor.

Durchführung:

Anzucht der Kulturen

Der *F. graminearum* Wildtyp-Stamm PH-1 und die Deletionsmutante *Δppt1* wurden für 2-8 Tage unter Eisenmangel bei 25 °C mit einem natürlichen Tag/Nacht-Zyklus angezüchtet. Synthetische Flüssig- und Festmedien (Saccharose, KH_2PO_4, $MgSO_4$, KCl, $NaNO_3$, Spurenelemente) wurden dazu mit Mycel von einer 7 Tage alten Vollmedium-Platte (PDA) angeimpft.

Probenvorbereitung

Pro Platte wurden 8 Agarpropfen ausgestochen, in ein Becherglas überführt und hintereinander mit Isopropanol und Ethanol extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, eingetrocknet und in 80%igem wässrigem Methanol mit oder ohne (bei der Bestimmung der Desferri-Formen) 100 mM $FeCl_3$ direkt vor der Analyse aufgenommen.

Die Flüssigkulturen wurden zentrifugiert um das Mycel zu entfernen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung und Aufkonzentration der Siderophore mittels Festphasenextraktion (Oasis MAX SPE, Vac RC 60 mg, Waters). Dazu wurden die Säulchen mit 1 ml Methanol und 1 ml 3%iger wässriger Ameisensäure konditioniert und mit 5 ml der angesäuerten Probe beladen. Nach Wasch-Schritten mit 1 ml 3%iger wässriger Ameisensäure, 2 ml 3%iger Ammoniaklösung, 2 ml Wasser und 1 ml Acetonitril, wurden die Siderophore mit 1 ml 80%igem wässrigem Methanol mit 100 mM $FeCl_3$ eluiert.

LC-UV-MS Analyse

Die HPLC Trennung wurde mit einer Phenyl-C_6-Säule (2x50mm, 3µm Gemini, Phenomenex) und einem linearen Gradient von 5% auf 100% Acetonitril (20 mM NH_4COOH, 40 mM HCOOH) durchgeführt. Die Flussrate betrug 300 µl/min, die Säulentemperatur 40°C, als Injektionsvolumen wurden 3 µl gewählt, die Wellenlänge des UV-Detektors betrug 435 nm. Electrospray Spektren von m/z 100-1000 wurden mit einem hochauflösendem Flugzeit-Massenspektrometer (LCT-TOF, Waters-Micromass) im positiven Ionenmodus aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion:

Für den *F. graminearum* Wildtyp-Stamm PH-1, zeigten die UV-Signale und Massenspektren (samt charakteristischer Isotopenmuster von Eisen) das Vorhandensein von vier Siderophoren (Fig. 1). Im Gegensatz dazu wurden keine extrazellulären Siderophore in Kulturen der *F. graminearum* Deletionsmutante *Δppt1* gefunden. Der mit * markierte Peak bei 10.3 min ist eine Verunreinigung aus dem LC-Gradient und kein Siderophor.

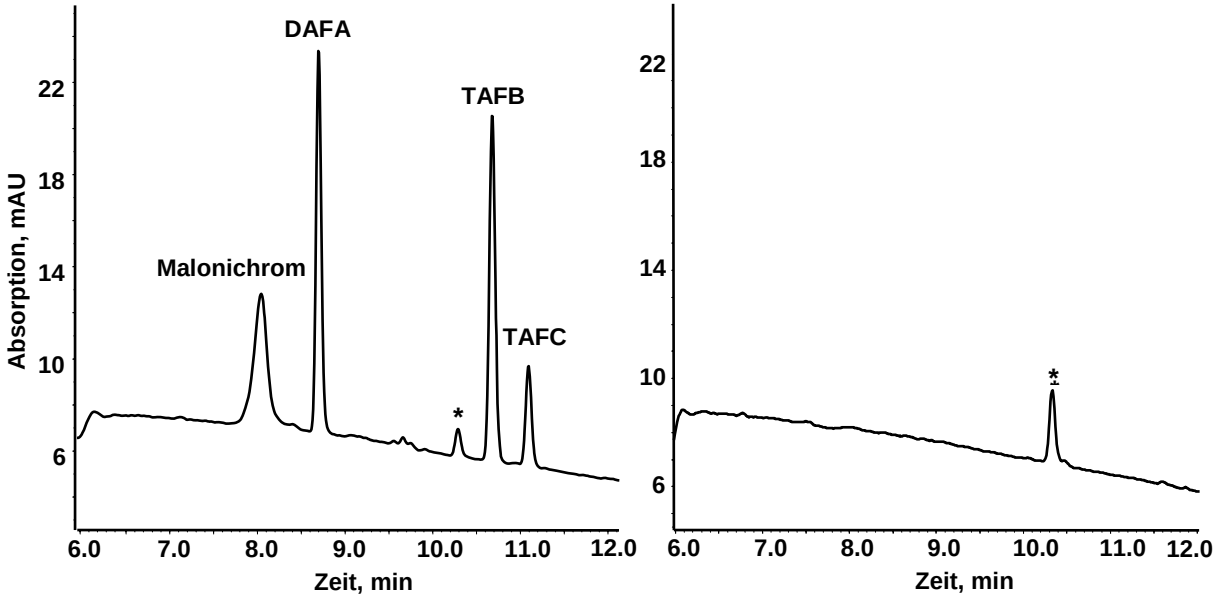


Fig.1. HPLC-UV Chromatogramm (435nm) von *F. graminearum* PH-1 (links) und *Δppt1* (rechts)

Die erwartete Verbindung **Triacetylfusarinin C** (TAFC, Moore and Emery, 1976) wurde in den Kulturen von *F. graminearum* PH-1 identifiziert. Massenspektren und Retentionszeit (11.1min) stimmen mit dem Standard (EMC Microcollections GmbH) überein. Die Masse des $[M+H]^+$ Ions der bei 8.0 min eluierenden Verbindung (887.2232 amu) wurde in einer Pilzmetaboliten-Datenbank (Antibase 2005) gefunden. Dadurch wurde die Substanz als **Malonichrom**, ein weiteres bekanntes Siderophor von *Fusarium* nachgewiesen (Emery, 1980).

Das Massenspektrum der bei 10.7 min eluierenden Substanz zeigt ein Signal bei *m/z* 924.3418. Dies entspricht einem gegenüber TAFC um 18 Masseneinheiten erhöhten Messwert und stammt von einer Anlagerung eines Wassermoleküls pro Formeleinheit. Die Verbindung wurde mittels Tandem-Massenspektrometrie (Applied Biosystems QTrap, Daten nicht gezeigt) als lineare Form von TAFC, **Triacetylfusarinin B** (TAFB) identifiziert.

Mit hochauflösender und Tandem-Massenspektrometrie konnte die zum Peak bei 8.7 min gehörende Substanz als **Diacetylfusarinin A** (DAFA), ein acetyliertes Dimer von Fusarinin identifiziert werden. Darüber hinaus konnte auch das Monomer **Acetylfusarinin** nach Extraktion seiner Massenspur aus dem Totalionenstrom- Chromatogramm gefunden werden. Da die Esterbindung welche die einzelnen Acetylfusarinin Monomere miteinander verknüpft sehr labil ist, ist wahrscheinlich, dass es sich bei Acetylfusarinin und DAFA um Abbauprodukte der Trimere TAFB und TAFC handelt (Fig. 2). Wurde vor der Analyse kein Eisen zugesetzt, konnten auch alle Desferri-Formen der Analyten gefunden werden. Sämtliche Siderophore wurden sowohl auf Agarplatten als auch im Flüssigmedium gebildet.

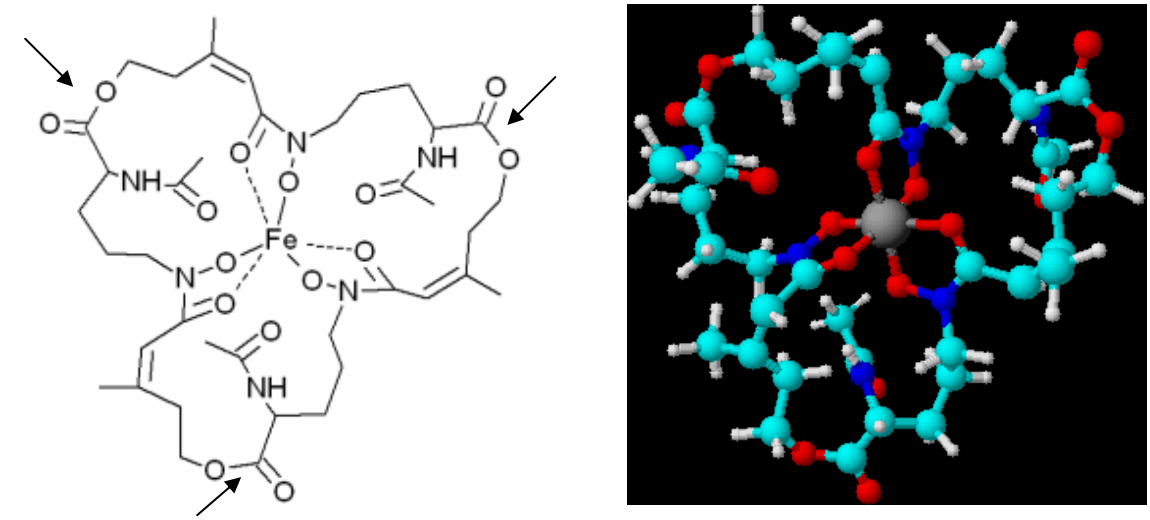


Fig.2. Struktur von TAFC (Pfeile kennzeichnen Esterbindungen der Acetylfusarinin-Monomere)

4´-Phosphopantethein ist essentiell für Nicht-Ribosomale-Peptid- (und Polyketid-) Synthetasen. Deletion des für Phosphopantetheinyl-Transferase codierenden Gens im Wildtyp-Stamm PH-1 resultierte in der Abwesenheit von Siderophoren in Kulturmedien der Mutante *Δppt1*. Die Virulenz der *PPT1* Knockout-Mutante war gegenüber dem Wildtyp drastisch reduziert (Peruci et al., 2006), wodurch *PPT1* zu einem attraktiven Ziel wird um pathogene Pilze mittels geeigneter Inhibitoren zu bekämpfen.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei der Dänischen Technischen Universität (DTU), beim FWF und der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Emery T., 1980. Malonichrome, a new iron chelate from *Fusarium roseum*. Biochim Biophys Acta **629**, 382-390.

Moore R.E., Emery T., 1976. N^{α}-Acetylfusarinines: Isolation, Characterization, and Properties. Biochemistry **15**, 2719-2723.

Oide S., Moeder W., Krasnoff S., Gibson D., Haas H., Yoshioka K., Turgeon B.G., 2006. *NPS6*, Encoding a Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in Siderophore-Mediated Iron Metabolism, Is a Conserved Virulence Determinant of Plant Pathogenic Ascomycetes. Plant Cell **18**, 2836-2853.

Peruci M., Berthiller F., Lemmens M., Schuhmacher R., Krska R., Cziferszky A., Mitterbauer R., Adam G., 2006. Phosphopantetheinyltransferase required for post-translational activation of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthases is a virulence factor of *Fusarium graminearum*. Biol Plant Microbe Interact **5**, 580-585.

Renshaw J.C., Robson G.D., Trinci A.P.J., Wiebe M.G., Livens F.R., Collison D., Taylor J., 2002. Fungal siderophores: structures, functions and applications. Mycol Res **106**, 1123-1142.

Autoren:

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

Dr. Kristian Fog NIELSEN, BioCentrum – DTU, Technical University of Denmark, Søltofts Plads, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark

DI Michaela PERUCI und Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Zentrum für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien

Genetisch veränderte Bäckerhefe als sensitiver Bioindikator für DON

Genetically engineered yeast as sensitive bioindicator for deoxynivalenol

SHAMSOZOHA ABOLMAALI, MICHAELA PERUCI, R. MITTERBAUER, HANNA WEINDORFER,
DORIS LUCYSHYN, M. SHAMS, O. SPADIUT, M. LEMMENS, G. ELLERSDORFER, D. MOLL & G. ADAM

Summary:

The goal of this work was to develop a low cost bioassay for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON). We constructed a DON-sensitive *Saccharomyces cerevisiae* indicator strain with three disrupted ABC transporters (*pdr5 pdr10 pdr15*), inactivated trichothecene acetyltransferase *ayt1* and two mutations in the ubiquitin-proteasome machinery (*ubi4 ubp6*). The resulting strain YZAS107 showed 50% growth inhibition at a DON concentration of 5 mg/l and is a useful tool to screen microbes for the ability to degrade DON.

Keywords: Deoxynivalenol, ubiquitin, proteasome, elongation inhibitor

Zusammenfassung:

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines preisgünstigen Biotests für das Mykotoxin Deoxynivalenol. Es wurde ein DON-sensitiver Hefestamm konstruiert, indem drei Gene für ABC Transporter (*pdr5 pdr10 pdr15*), eine Trichothecen-Acetyltransferase (*ayt1*) und zwei Gene des Ubiquitin-Proteasom-Systems (*ubi4 ubp6*) inaktiviert wurden. Der resultierende Hefestamm zeigt 50% Wachstumsinhibition bereits bei 5 mg/l DON, und ist ein nützliches Werkzeug zum Screening von Mikroorganismen auf die Fähigkeit zum DON-Abbau.

Schlüsselwörter: Deoxynivalenol, Ubiquitin, Proteasom, Elongationsinhibitor

Deoxynivalenol ist ein Proteinbiosyntheseinhibitor aus der Klasse der Trichothecene. Für diese Mykotoxine gibt es nicht nur zahlreiche instrumentielle Analysenmethoden sondern auch auf Antikörpern basierende Detektionsverfahren. Einfache Bioassays für DON wären jedoch eine kostengünstige Alternative bei großen Probenzahlen, wie sie beispielsweise in der Pflanzenzüchtung oder beim Screening nach DON-abbauenden Mikroorganismen auftreten. Bisher verwendete Indikatororganismen reichen von Salinenkrebsen bis zu Algen (*Chlorella*, *Chlamydomonas*) etc. Stand der Technik ist die Verwendung eines besonders DON-sensitiven *Kuyveromyces marxianus* Hefestammes (Engler et al, 1999). Wildtyp Bäckerhefe ist weniger sensitiv als diese Organismen, hat jedoch den Vorteil, dass das Genom gezielt manipuliert werden kann.

Bereits in früheren Arbeiten (Mitterbauer & Adam, 2002) konnte gezeigt werden, dass ABC Transporterproteine, die als molekulare Efflux-Pumpen wirken, strukturell sehr unterschiedliche Substanzen und auch DON wieder aus der Zelle pumpen, und so für die hohe Resistenz verantwortlich sind. Es wurden daher drei “pleiotropic drug resistance” (*PDR*)-Gene inaktiviert (*pdr5 pdr10 pdr15*). In diesen Hefen wird DON in relevanten Konzentrationen aufgenommen, jedoch vom *AYT1* Genprodukt, einer Trichothecen-3-O-Acetyltransferase, zu weniger toxischem 3-ADON metabolisiert. Um diesen Schutzmechanismus zu unterbinden, wurde auch dieses Gen inaktiviert.

In einem Screen auf DON-Resistenz vermittelnde Weizen cDNAs wurden Klone identifiziert, die eine bedeutende Rolle des Ubiquitin-Proteasome Systems für die DON-Resistenz nahe legen (Lucyshyn, in Vorbereitung). Fehlerhafte Proteine werden in Eukaryonten durch das Peptid Ubiquitin für den Abbau markiert, und in einem aus vielen Untereinheiten bestehenden Komplex von ATP-abhängigen Proteasen, dem Proteasom, wieder in Aminosäuren zerlegt (siehe Smalle & Vierstra, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass DON *in vitro* sehr stark die Elongationsphase der Proteinsynthese inhibiert (Shams, 2007), also bei subletalen DON-Konzentrationen vermutlich massenhaft verkürzte, fehlerhafte Proteine entstehen, die energieaufwändig wieder abgebaut werden müssen. Die daraus resultierende Erschöpfung des Ubiquitin-Vorrates der Zelle ist offensichtlich der primäre Mechanismus der Toxizität von DON.

Durch Inaktivierung des Genes *UBI4* (Polyubiquitin), das unter Stressbedingungen transkriptionell hochreguliert wird, um den erhöhten Ubiquitinbedarf zu decken, wurde der Hefestamm sensitiver gegen DON. Zu einer DON-Hypersensitivität führt weiters die Inaktivierung des Gens *UBP6*, das für eine Protease kodiert, die Ubiquitin abspaltet, bevor es zum Abbau im Proteasom kommt. In der *ubp6* Mutante kann Ubquitin somit nicht rezykliert werden, sondern wird gemeinsam mit den fehlerhaften Proteinen zerstört. Der Hefestamm YZAS107 in dem beide Gene inaktiviert sind, ist noch sensitiver gegen DON. Die genetischen Modifikationen (*pdr5*Δ::*TRP1 pdr10*Δ::*hisG pdr15*Δ::*loxP ayt1*Δ:: *loxP ubp6*Δ::*loxP ubi4*Δ::*loxP)* führten dazu, dass diese Hefe bereits bei 12 mg/l DON im Medium stark in ihrem Wachstum inhibiert wird.

Abbildung 1 zeigt Wachstumskurven des DON-sensitiven Hefestammes YZAS107 und des Ausgangsstammes YRU41 mit intakten *UBI4 UBP6* Genen bei steigender Zugabe von DON (Ausgangs-Zelldichte OD_{600} = 0,05). YZAS107 wurde entwickelt, um in einem Schnellverfahren verschiedene Mikroorganismen auf die Fähigkeit des DON-Abbaus zu testen. In einem Agar-Diffusionstest wurden Verdünnungen von DON auf Filterpapierscheiben geträufelt. Abbildung 1 (rechts) zeigt deutlich die Bildung eines Hemmhofes bereits bei 25 µg DON.

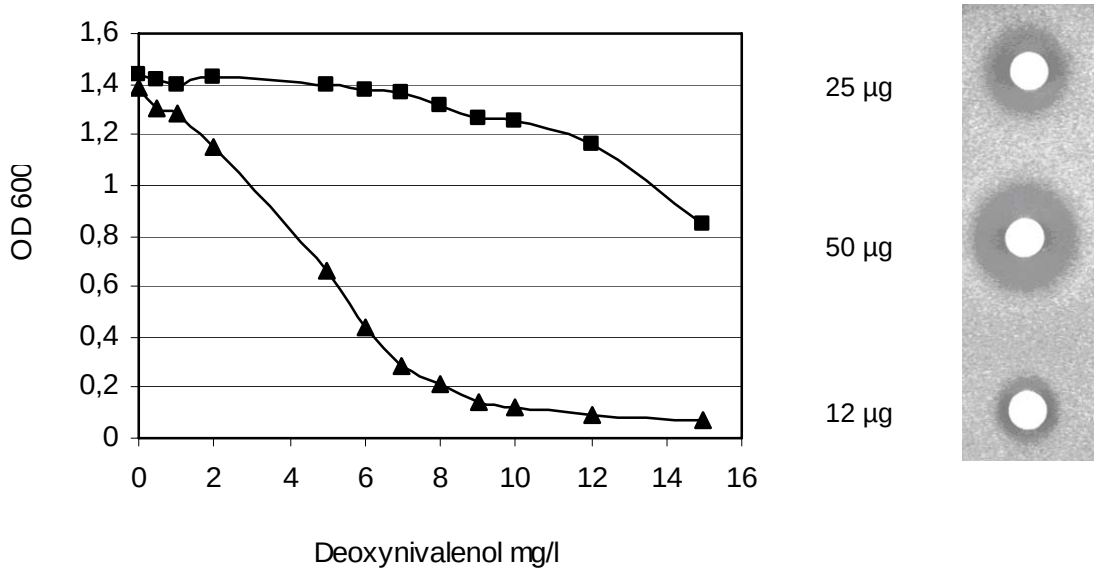


Abbildung 1: Links: Inhibition des Wachstums der Hefestämme YZAS107 (*ubp6 ubi4*, Dreiecke) und des Ausgangsstammes YRU41 (Quadrate) in YPD + DON (28°C, 16 Stunden, Ausgangs OD_{600} = 0,05). Rechts: Agar Diffusions-Test mit YZAS107. Die absoluten Mengen DON welche auf das Filterscheibchen geträufelt wurden, sind angegeben.

Diese Sensitivität ist zwar noch nicht ausreichend um DON in natürlich kontaminierten Getreideproben nachzuweisen. Der Test erwies sich jedoch als sehr nützliches Werkzeug zum Screening von Mikroben auf die Fähigkeit zum DON-Abbau im Mikrotiterplattenmaßstab (Abolmaali *et al.*, in press).

Danksagung:

S. Abolmaali war Empfängerin eines ÖAD Nord-Süd-Dialog Stipendiums. Die Autoren bedanken sich beim BM:BWK (”Iran”) für die Förderung dieses Projektes und beim BMLFUW für die Förderung von Vorarbeiten.

Literatur:

Abolmaali S, Mitterbauer R, Spadiut O, Peruci M, Weindorfer H, Lucyshyn D, Ellersdorfer G, M Lemmens, Moll WD, Adam G (2008) Engineered bakers yeast as a sensitive bioassay indicator organism for the trichothecene toxin deoxynivalenol. J. Microbiol Methods (*in press*).

Engler KH, Coker R, Evans IH (1999) A novel colorimetric yeast bioassay for detecting trichothecene mycotoxins. J. Microbiol Methods **35**, 207-218.

Mitterbauer R, Adam G (2002) *Saccharomyces cerevisae* and *Arabidopsis thaliana*: useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plants to toxins. Eur. J. Plant Pathol. **108,** 699-703.

Shams M (2007) Characterization of two wheat cDNAs conferring resistance against deoxynivalenol (DON) in yeast. Diplomarbeit Univ. für Bodenkultur, Wien.

Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu Rev Plant Biol **55,** 555-90

Autoren:

Dr. Shamsozoha ABOLMAALI, Dr. Michaela PERUCI; Dr. Rudolf MITTERBAUER, Hanna WEINDORFER; Dr. Doris LUCYSHYN, DI Oliver SPADIUT, DI Mehrdad SHAMS, Mag. Günther ELLERSDORFER, Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM. Zentrum für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien.

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.

Dr. Wulf-Dieter MOLL, BIOMIN Research Center, TZT Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

Methodik zur Ermittlung von Fusariumbefall und Sortenresistenz bei Getreide

Method for the evaluation of Fusarium infection and variety resistance in cereals

M. OBERFORSTER

Summary

In the Austrian system of variety registration common wheat and durum wheat are evaluated for their resistance against FBH (*Fusarium* head blight). The values of the plots which scale from 1 to 9 based on natural or semi-natural infection, are transformed to states of expression, these expression are also scaled from 1 to 9. This attribute was added to the descriptive list of varieties in 1996. Since 2005/06 a series of separate FHB tests show the results of the spreading of infected maize stubbles on the winter wheat crops. The inoculation with a conidia suspension method during anthesis was abandoned. A significant correlation (r = 0.85**) of FHB between the natural infection and the maize stubble method was found. Plant height and *Fusarium* symptoms showed a low negative intervarietal correlation (r = -0.33 n.s. to -0.35*).

Zusammenfassung

Im österreichischen Verfahren auf Sortenzulassung werden Weich- und Durumweizen hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber Ährenfusarium beurteilt. Die Boniturwerte der Parzellen (Skala 1 bis 9), basierend auf natürlichem oder semi-natürlichem Fusariumbefall, werden in Ausprägungsstufen (Skala 1 bis 9) umgeschlüsselt. Das Merkmal wurde im Jahr 1996 in die Beschreibende Sortenliste aufgenommen. In einer separaten Versuchsserie von Winterweizen wird Ährenfusarium seit 2005/06 zusätzlich durch Ausstreuen infektiöser Maisstoppeln provoziert. Die Sprühinokulation mittels Konidiensuspension zur Blütezeit wird nicht mehr durchgeführt. Der durchschnittliche Befall in Wertprüfungen und Maisstoppelregistern korrelierte signifikant (r = 0,85**). Halmlänge und Ährenfusarium waren intervarietal schwach negativ assoziiert (r = -0,33 n.s. bis -0,35*).

Schlüsselwörter / Keywords: Ährenfusarium / *Fusarium* head blight, Boniturschema 1 bis 9 / scale 1 to 9, Weizensorten / wheat varieties, Maisstoppelmethode / maize stubble method

Einleitung

Ertrag und Qualität von Getreide können durch Ährenfusarium – im Wesentlichen handelt es sich um *Fusarium graminearum* (Hauptfruchtform *Gibberella zeae*) und *F. culmorum* – beeinträchtigt werden. Vor allem die Kontamination des Ernteguts mit Toxinen bereitet Sorge. Der Anbau widerstandsfähiger Sorten begrenzt das Risiko. Bei der Feststellung des landeskulturellen Wertes von Weichweizen wird der Krankheit erhebliche Bedeutung zugemessen. Winter- und Sommerdurum sind bei geringer genotypischer Variabilität anfälliger. Über die Reaktion der in Österreich registrierten Triticalesorten gegenüber Ährenfusarium ist wenig bekannt, bei natürlicher Infektion sind die Symptome zumeist unauffällig.

Material und Methoden

Wertprüfungen von Winterweizen der Feucht- und Übergangslagen aus den Jahren 2005 bis 2007 (3 bis 13 Ergebnisse, 14 bzw. 30 Genotypen) wurden analysiert. Die Prüfglieder waren 3- bis 4-fach wiederholt, die Parzellenfläche variierte zwischen 9,6 und 13,5 m^2. Vorfrüchte waren Körnermais, Winterraps, Körner- und Futterleguminosen, Körnersenf sowie Raygras, mehrheitlich erfolgte die Grundbodenbearbeitung mit dem Pflug. Für die Prüfung des Einflusses der Halmlänge auf den Fusariumbefall wurden Ergebnisse von 1997 bis 2007 einbezogen.

Bei der Maisstoppelmethode werden im Oktober oder November mit *Fusarium* spp. infizierte Stängelteile auf die Parzellen (3,0 bis 6,0 m^2, 2-fach wiederholt) gleichmäßig verteilt. Auf jedem Quadratmeter kommen 8 Stoppeln mit einer Länge von 30 bis 35 cm.

Häufigkeit und Stärke des Fusariumbefalls wurden nach der Skala 1 bis 9 (visuelle Schätzung ausgebleichter Ährenteile, 1 = kein Befall, … 9 = sehr starker Befall) in einer Note zusammengefasst. Der Boniturskala ist eine Prozentskala unterlegt (Bundesamt 2001). Bestände mit hoher Befallsstärke zeigen im Allgemeinen auch eine größere Befallshäufigkeit. Mitunter wird auch der Prozentsatz ausgebleichter Ährchen geschätzt. Für die Beschreibende Sortenliste werden die Felddaten in Ausprägungsstufen (Skala 1 bis 9, 1 = resistent, … 9 = sehr stark anfällig) transformiert. In die Berechnungen fließen Differenzen zu Standardsorten und adjustierte Mittelwerte ein. Die Weichweizen sind mit Noten von 2 bis 7, die Durumweizen von 6 bis 8 eingestuft (Agentur 2007).

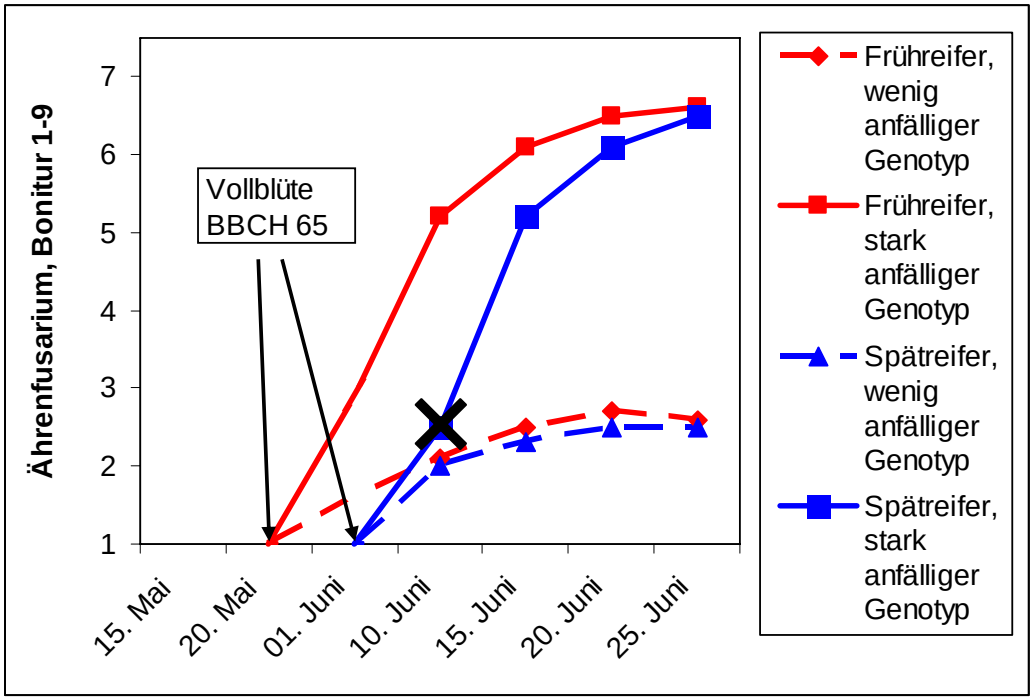


Abbildung 1: Viermalige Fusariumbonitur: Ausschluss eines Wertes bei einem Genotyp mit spätem Blühdatum und hoher Anfälligkeit (Schema)

Ergebnisse und Diskussion

Physiologische Resistenzmechanismen: Mehrere Resistenztypen (Typ I bis Typ VII) sind beschrieben worden (Mesterhazy 1995, Rodemann und Mielke 2007). Am besten untersucht sind die Eindring- (Typ I) und Ausbreitungsresistenz (Typ II). Weil die Resistenz gegen Ährenfusarium weder rassen- noch artspezifisch ist (Lemmens et al. 1993, Mesterhazy 1995), sind Einflüsse wechselnder Anteile von *F. culmorum* und *F. graminearum* nicht zu befürchten. Schwierigkeiten bei den Fusariumtests bereiten hingegen die differenten Blühzeitpunkte der Genotypen. Eine wechselhafte Witterung in der Phase des empfindlichen Blühstadiums beeinflusst die Infektion und Krankheitsausbreitung, vermehrte Genotyp x Umwelt-Interaktionen sind die Folge (Miedaner et al. 2001). Für eine zuverlässige Erfassung des Resistenzpotenzials sind Ergebnisse aus mehreren Makroumwelten nötig. Um den verzerrenden Einfluss variabler Blühtermine zu minimieren, kann die Fläche unter der Krankheitsentwicklungskurve (AUDPC) bestimmt werden. Im Rahmen der amtlichen Wertprüfung wird meist 1 bis 2 Mal (selten 3 oder 4 Mal) bonitiert und auf AUDPC-Werte verzichtet. Bei Sorten, die ein spätes Blühdatum mit hoher Anfälligkeit kombinieren, wird gelegentlich die erste Bonitur von der weiteren Verrechnung ausgeschlossen (Abb. 1). Die kombinierte Erfassung von Befallshäufigkeit und -stärke integriert die Eindring- und Ausbreitungsresistenz. Die Boniturdaten der einzelnen Jahre korrelieren signifikant (Tab. 1).

Tabelle 1: Winterweizen Feuchtlagen – Intervarietale Beziehung (Korrelationskoeffizient r) von Fusariumbonituren der Jahre 2005 bis 2007 (Jahresmittelwerte, 14 Genotypen)

	2005	**2006**	**2007**	**2005 - 2007**
Anzahl der Versuche	n = 3	n = 13	n = 11	n = 27
Mittelwert (Sortiment)	2,80	2,79	2,61	2,73
Spannweite (Sortiment)	1,93 - 4,50	2,04 - 4,01	1,85 - 4,41	2,07 - 4,31
2005	-	0,92**	0,85**	0,98**
2006		-	0,74**	0,93**
2007			-	0,92**

Das Auslegen von Maisstoppeln erzeugt einen höheren Infektionsdruck ohne die sätechnischen Nachteile einer Minimalbodenbearbeitung nach Maisvorfrucht in Kauf nehmen zu müssen. Die Methode bringt eine bessere Differenzierung als in den Ertragsprüfungen (Abb. 2). Sowohl natürliche wie semi-natürliche Infektionsbedingungen liefern aussagekräftige Daten zur Beurteilung der Fusariumresistenz. Die Sortenrangfolgen stimmen weitgehend überein (r = 0,85**), Wosnitza et al. (2000) kommen zu einem ähnlichen Ergebnis. Zu den widerstandsfähigsten Winterweizen zählen Antonius, SZD 9369, Astardo, Capo und Erla Kolben; Winnetou und SE 320/05 WW zeigten die deutlichsten Symptome. Neben der phänotypischen Erfassung der Fusariumresistenz sind in der Literatur auch *in-vitro* Methoden sowie Untersuchungen mit molekularen Markern beschrieben (Ruckenbauer et al. 2001).

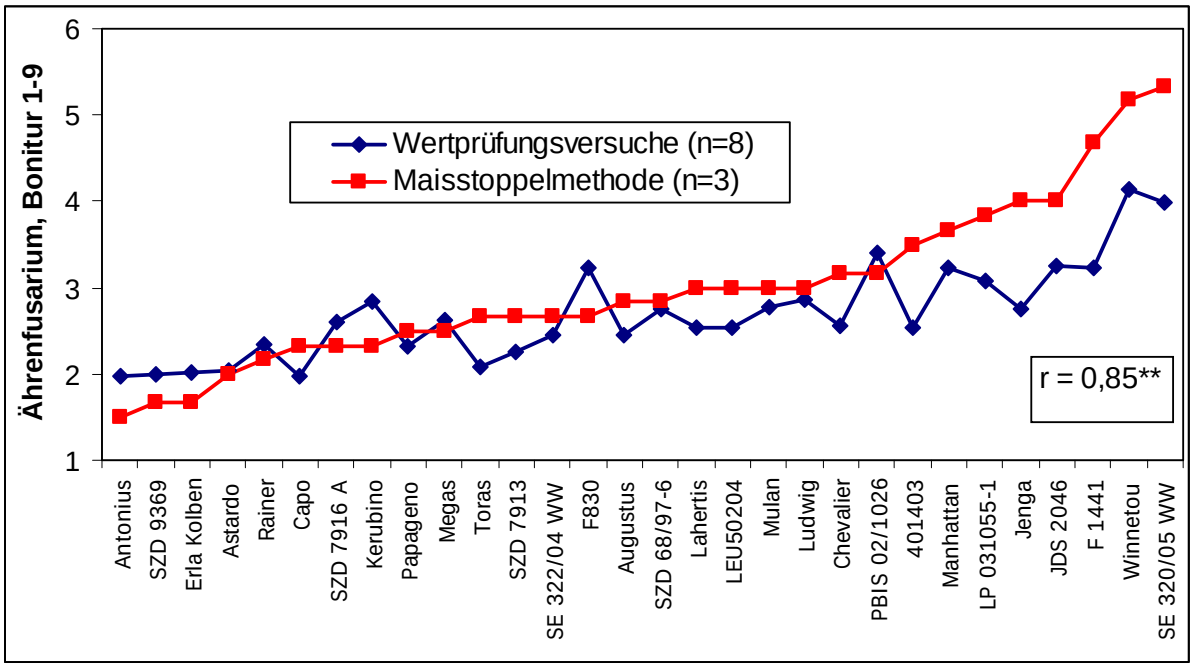


Abbildung 2: Winterweizen Feuchtlagen – Fusariumbefall in Wertprüfungen und Maisstoppelregistern im Jahr 2007 (Mittelwerte, 30 Genotypen)

<u>Morphologische Resistenzmechanismen:</u> Neben den genetisch-physiologischen Mechanismen können auch die Halmlänge, die Begrannung, Ähren- und Bestandesdichte sowie das Ausmaß der Offenblütigkeit Einfluss nehmen (Mesterhazy 1995, Buerstmayr et al. 2000). Ein geringer Abstand zwischen Fahnenblatt und Ähre fördert bei aufrechter Blattstellung das Auftreten von *Fusarium* (Lienemann 2002). Kurzhalmige Weizensorten neigen zu erhöhtem Befall.

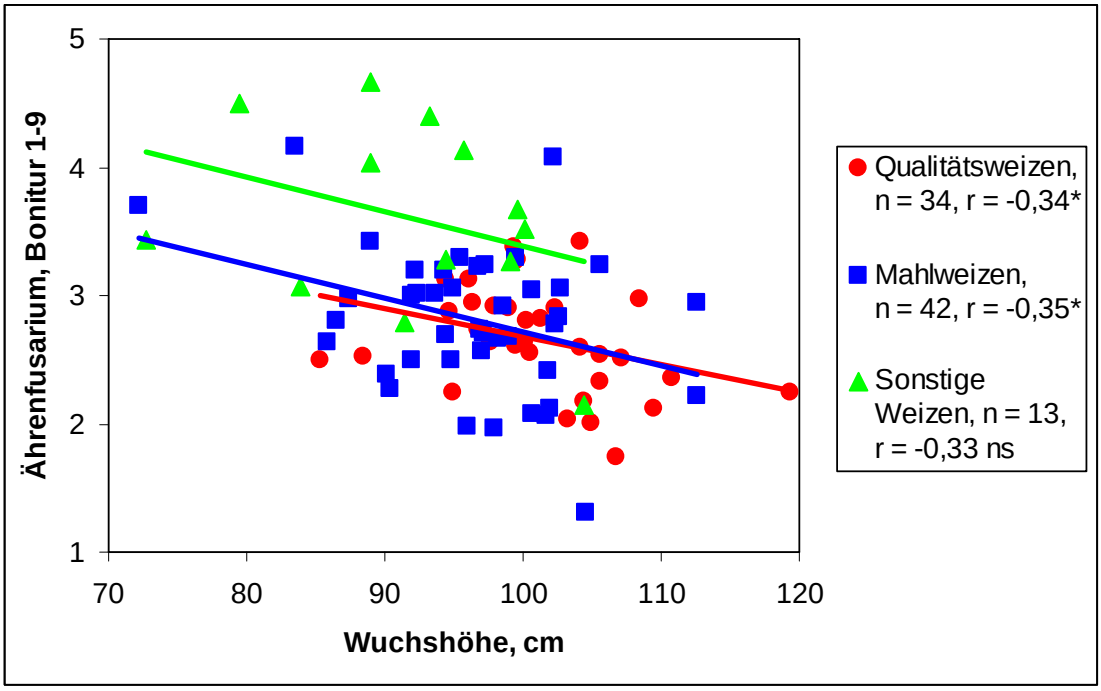


Abbildung 3: Winterweizen (Qualitäts-, Mahl- und Sonstige Weizen) – Intervarietale Beziehung zwischen Wuchshöhe und Ährenfusarium (Adjustierte Mittelwerte, Versuche 1997 bis 2007)

Der Zusammenhang ist schwach ausgeprägt (r = -0,34* bei Qualitätsweizen, -0,35* bei Mahlweizen, -0,33 n.s. bei Sonstigen Weizen) und schließt die Züchtung fusariumtoleranter Kurzstrohweizen nicht aus. Allerdings zeigt die Sortengruppe der Sonstigen Weizen (Futterweizen) bei vergleichbarer Halmlänge signifikant mehr Fusariumbefall. Teilweise könnte dies auf die kompakteren Ähren zurückgeführt werden.

Literatur

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (Hrsg.), 2007: Österreichische Beschreibende Sortenliste 2007. Landwirtschaftliche Pflanzenarten.

Buerstmayr H., B. Steiner, M. Lemmens and P. Ruckenbauer, 2000: Resistance to *Fusarium* head blight in winter wheat: heritability and trait associations. Crop Science 40, 1012-1018.

Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft (Hrsg.), 2001: Methoden für Saatgut und Sorten. Richtlinien für die Sortenprüfung.

Lemmens M., H. Buerstmayr and P. Ruckenbauer, 1993: Variation in *Fusarium* head blight susceptibility of international and Austrian wheat breeding material. Die Bodenkultur 44, 65-78.

Lienemann K., 2002: Auftreten von *Fusarium*-Arten an Winterweizen im Rheinland und Möglichkeiten der Befallskontrolle unter besonderer Berücksichtigung der Weizensorte. Diss., Bonn.

Mesterhazy A., 1995: Types and components of resistance against *Fusarium* head blight of wheat. Plant Breeding 114, 377-386.

Miedaner T., C. Reinbrecht, U. Lauber, M. Schollenberger and H.H. Geiger, 2001: Effects of genotype and genotype x environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. Plant Breeding 120, 97-105.

Rodemann B. und H. Mielke, 2007: Anfälligkeit verschiedener Winterweizensorten gegenüber Ährenfusarium (Zulassungsjahre 2001 bis 2006). Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. 410, 66-83.

Ruckenbauer P., H. Buerstmayr and M. Lemmens, 2001: Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). Euphytica 119, 121-127.

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, 67-68.

Autor

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

Verringerung der Fusarium- und Mykotoxinbelastung durch Sortenwahl:

Ergebnisse bei Mais nach zwei Versuchsjahren

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

In den Jahren 2005 und 2006 wurden in Grabenegg bei Melk und Gleisdorf im Rahmen eines vom Ministerium bezahlten Projektes alle Maissorten des jeweils zweiten Wertprüfungsjahres inklusive aller Vergleichssorten in zweifacher Wiederholung in Parzellen mit etwa 100 Pflanzen angebaut. Unter natürlicher als auch künstlicher Infektion wurden diese 90 Hybriden auf Mykotoxinbelastung untersucht.

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

Von jeder Sorte wurde in den beiden Wiederholungen eine Mischprobe von ca. 1 kg schonend getrocknet und in Papiersäcken bis zur Laboruntersuchung kühl gelagert.

Neben diesen Standorten des Institutes für Pflanzengesundheit (Grabenegg und Gleisdorf) wurden außerdem aus allen vier Reifegruppen von mehreren Wertprüfungsstandorten des Sortenzulassungsverfahrens Mischproben aus den jeweils drei Wiederholungen pro Standort gezogen. Eine zeitaufwendige visuelle Beurteilung fand hier nicht statt.

DON-Gehalte der Sorten

Bei der natürlichen Infektion war der DON-Gehalt auf einem Standort (2006, Breitbrunn) bei 3 Sorten höher als der Grenzwert für Futtermittel-Ausgangserzeugnisse von 8000 µg/kg (grau, fett). Bei knapp 10% der Sorten wurde der Lebensmittel-Grenzwert von 1750 µg/kg (fett) überschritten. Auffallend ist, dass 30% der Sorten auf dem Gleisdorfer Standort des Institutes für Pflanzengesundheit 2005 und alle Sorten in Breitbrunn 2006 den Lebensmittel-Grenzwert

überschreiten. Rechnet man die beiden stark belasteten Standorte weg, ergibt sich eine Überschreitung des Lebensmittel-Grenzwertes bei knapp 3% der Sorten. In Breitbrunn erfolgte die Ernte zeitgerecht, Zünslerbruch trat wenig auf, es wurde jedoch Wintergerste als Vorfrucht angebaut. In beiden Jahren erfüllen rund 82 % der untersuchten Sorten die besonders strengen Kriterien für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine (bis 900 µg/kg).

Die künstliche Infektion weist wie erwünscht sowohl 2005 als auch 2006 deutlich überhöhte Werte auf. Dadurch lassen sich Sortenresistenzen besser beobachten. Bei 47% der Sorten wurde der Lebensmittelgrenzwert von 1750 µg/kg (fett) überschritten. Die DON-Gehalte sind auf 6% der Proben höher als der Grenzwert für Futtermittel-Ausgangserzeugnisse von 8000 µg/kg (grau, fett).

Zusammenfassend kann man zwischen Risikosorten und auffallend resistenten Sorten unterscheiden. Überdurchschnittlich hohe DON-Gehalte, konnten bei einzelnen Sorten über beide Versuchsjahre nicht nur auf den hierzu angebauten künstlich infizierten Versuchsserien in Gleisdorf und Grabenegg, sondern auch auf Wertprüfungsstandorten des Sortenzulassungsverfahrens unter natürlichem Infektionsdruck festgestellt werden. Ebenso wurden Sorten mit deutlich unterdurchschnittlichen Befallswerten beobachtet. 20% der untersuchten Hybriden blieben auf allen Standorten sowohl bei der natürlichen- als auch bei der künstlichen Infektion unter dem Lebensmittel-Grenzwert von 1750 µg/kg. Bei der natürlichen Infektion sind 55% der Sorten auf jeden Standort unter dem Lebensmittel-Grenzwert.

ZON-Gehalte der Sorten

Ein geringerer Teil der Proben wurde auf Zearalenon untersucht.

Unter natürlichen Infektionsbedingungen erfüllen 33% der Hybriden die hohen Anforderungen als Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Ferkel und Jungsauen. Jedoch wurde bei 47% der Proben der Lebensmittel-Grenzwert überschritten. Dieser Wert resultiert aus den besonders hohen ZON-Gehalten in Breitbrunn. Außerdem wurden nur auf diesem Standort ZON-Gehalte über dem Grenzwert für Futtermittel-Ausgangserzeugnisse von > 2000 µg/kg ermittelt.

Die künstliche Infektion machte wie erwünscht Sortenunterschiede sichtbar. 41% der Proben erreichten die besonders strengen Kriterien für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine (resultierend aus den guten Werten auf dem Grabenegger Standort 2006), 30% der Hybriden überschritten den europäischen Grenzwert für Lebensmittel von > 350 µg/kg. Auf dem Gleisdorfer Standort 2006 wurde der Futtermittel-Ausgangserzeugnisgrenzwert bei einigen Sorten deutlich überschritten.

DON-Gehalte in µg/kg (sortiert nach der Summe der DON-Gehalte)

> 8000 µg/kg Futtermittel: Futtermittel-Ausgangserzeugnisse: Getreidekörner und –produkte (**grau, fett**)

> 1750 µg/kg Lebensmittel: Commission Regulation No 1126/2007 (**fett**)

< 900 µg/kg Futtermittel: Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine

DON	2005																	2006																	
	künstl.		natürliche Infektion															künstl.		natürliche Infektion															
					1					2					3		4					1				2				3				4			
	Gleisdorf	Grabenegg	Gleisdorf	Grabenegg	Kilb	Lambach	Wartberg	Weiz	Zinsenhof I	Breitbrunn	Diendorf	Gleisdorf II	Lambach II	Zinsenhof II	Gleisdorf III	Kalsdorf/Ilz	Fluttendorf	Hatzendorf	Gleisdorf	Grabenegg	Gleisdorf	Grabenegg	Kilb	Wartberg	Weiz	Zinsenhof I	Breitbrunn	Diendorf	Gleisdorf II	Zinsenhof II	Gleisdorf III	Oberwart	Ritzlhof	Tulbing	Eltendorf	Hatzendorf	Pachfurth	Weikendorf
Sorte 1	83	940	130	0																																			
Sorte 2	560	77	560	0															91	1700	330	0													890	440	130	0
Sorte 3																			140	1200	140	290													600	610	250	38
Sorte 4	1200	**1800**	83	0	84	260	600	120	150																														
Sorte 5	910	**1900**	950	1200											110	380	880	700	720	840	0	0									120	66	280	94	420	360	150	0
Sorte 6	680	1400	280	0	620	520	93	300	1000										720	1100	110	43	350	1200	220	0												
Sorte 7	670	790	640	0																																		
Sorte 8	0	300	53	0													750	150	130	**5100**	120	76													310	61	94	450
Sorte 9																			550	**3500**	27	0									76	0	150	55				
Sorte 10	330	**3900**	86	130						200	0	95	50	240					1200	180	170	0					**3300**	30	120	51								
Sorte 11	860	**2900**	0	0	660	300	290	0	100										**2400**	920	240	170	430	460	57	340												
Sorte 12	1600	350	1000	1100															850	620	270	1600									86	550	62	130				
Sorte 13	470	**2200**	110	0																																		
Sorte 14	590	**2200**	**2400**	0															44	410	120	0					**1900**	280	180	610								
Sorte 15	930	780	**1800**	0													**4900**	290	510	570	37	490													**3300**	560	150	0
Sorte 16	**5400**	**1900**	67	700											300	67			400	1700	400	0									790	820	870	980				
Sorte 17																			750	190	0	0					**7000**	380	220	140								
Sorte 18																			820	**6600**	72	0	190	990	270	66												
Sorte 19	**2100**	**2100**	700	0																																		
Sorte 20																			450	**2400**	190	0					**5800**	480	100	760								
Sorte 21	**2200**	**5800**	510	380						290	250	140	200	260					**3100**	**2600**	61	0					**8000**	250	320	400								
Sorte 22	**2700**	**4100**	190	82						750	1500	160	420	390					640	**3100**	260	0					**12000**	220	160	**2600**								
Sorte 23	360	**16000**	370	50													770	700	27	**3200**	1100	130													760	150	600	0
Sorte 24	**4800**	**4000**	**2200**	75						790	1100	110	50	820					1600	**3100**	1400	370					**8000**	980	660	820								
Sorte 25	**3600**	**5700**	**2200**	240						220	**2200**	270	270	810					**8500**	**4600**	41	0					**3800**	140	200	260								
Sorte 26	**2600**	**3500**	**2300**	220						960	430	130	350	1700					**13000**	**1800**	330	35					**8300**	330	160	200								
Sorte 27	700	**9200**	1100	1200						1000	760	520	840	1100					**1900**	**5300**	290	270					**11000**	840	400	980								
Sorte 28	**5300**	**4900**	640	760															**5500**	**8200**	940	96	680	1700	400	500												
Sorte 29	**2200**	**11000**	**3900**	190	530	**3500**	**3400**	880	420																													
	1702	3656	928	264	474	1145	1096	325	418	601	891	204	311	760	205	224	1825	460	1915	2562	289	155	413	1088	237	227	6910	393	252	682	268	359	341	315	1047	364	229	81

ZON-Gehalte in µg/kg (sortiert nach der Summe der DON-Gehalte)

> 2000 µg/kg Futtermittel: Futtermittel-Ausgangserzeugnisse: Getreidekörner und –produkte (grau, fett)

> 350 µg/kg Lebensmittel: Commission Regulation No 1126/2007 (**fett**)

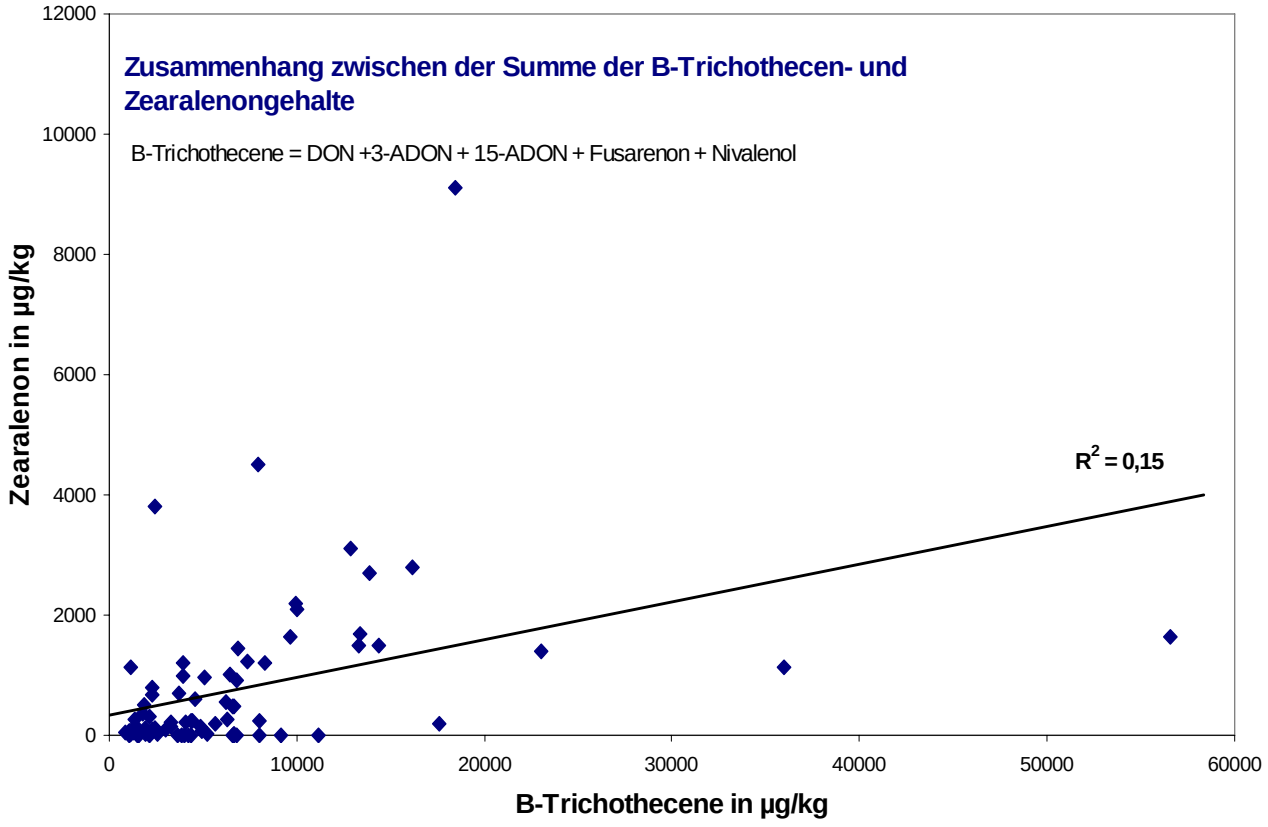
< 100 µg/kg Futtermittel: Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Ferkel und Jungsauen

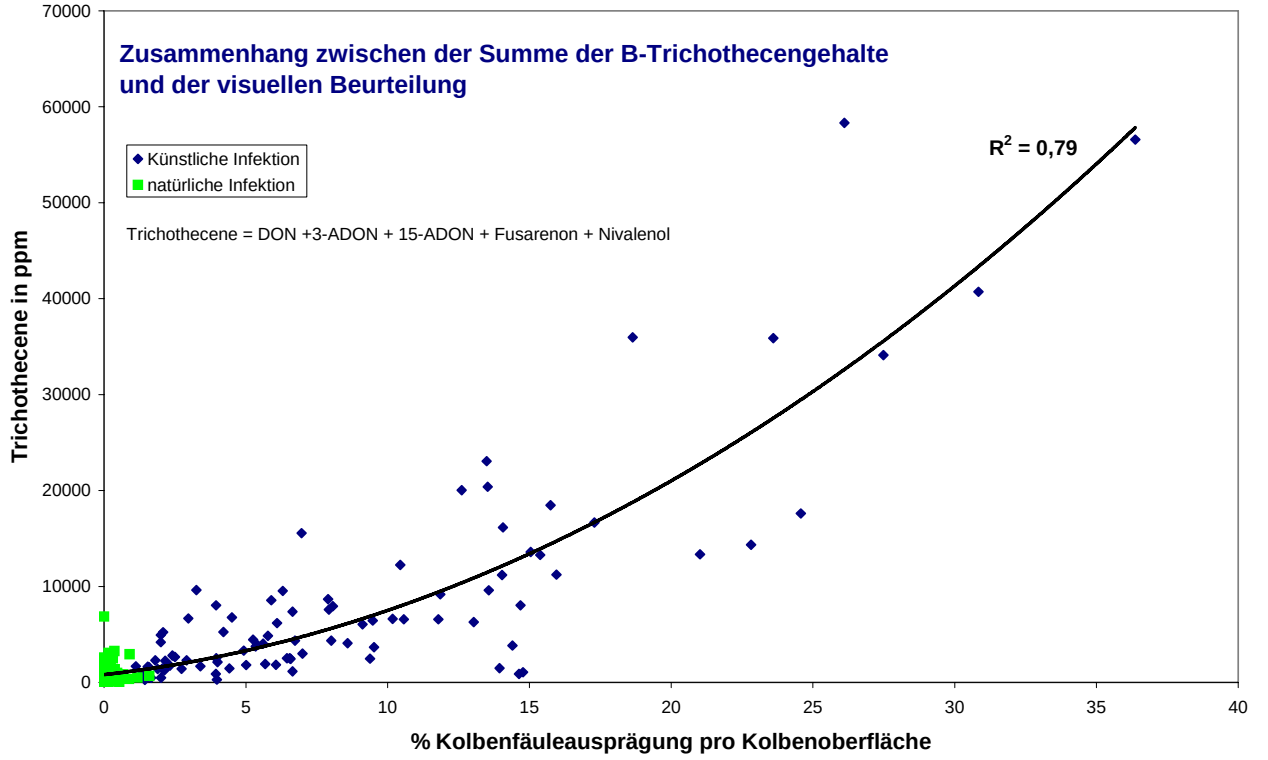
ZON	2005											2006							
	künstl.		natürliche Infektion									künstl.		natürliche Infektion					
	Gleisdorf	Grabenegg	Gleisdorf	Grabenegg	Lambach	Wartberg	Weiz	Zinsenhof I	Diendorf	Fluttendorf	Hatzendorf	Gleisdorf	Grabenegg	Gleisdorf	Grabenegg	Wartberg	Breitbrunn	Zinsenhof II	Eltendorf
Sorte 1		242																	
Sorte 2													44						
Sorte 3													12						
Sorte 4	229	**364**																	
Sorte 5																			
Sorte 6		325						**1124**				120	0			47			
Sorte 7		134																	
Sorte 8													0						
Sorte 9													0						
Sorte 10		**555**										**670**					**990**		
Sorte 11	20	73										**710**							
Sorte 12	135		44	88											7				
Sorte 13		**1213**																	
Sorte 14		213	88														**800**		
Sorte 15	**1502**	182	20							**923**									**960**
Sorte 16	**1407**	**1693**											0						
Sorte 17												100					**1200**		
Sorte 18												0	0						
Sorte 19	**1632**	**1003**																	
Sorte 20												64	0				**470**		
Sorte 21												**490**	0						
Sorte 22									**504**			140	0				2700	210	
Sorte 23		**1130**								104	58		13	270					
Sorte 24												63	0	31			2100		
Sorte 25												2800	0				**600**		
Sorte 26												9100	0				2200		
Sorte 27												3800	20				3100		
Sorte 28	256	**1220**		62								4500	7			130			
Sorte 29	**1643**	**1503**	**1445**		188	232	48												
	853	704	399	75	188	232	48	1124	504	514	58	1735	6	151	7	89	1573	210	960

Sorten, die bereits besonders niedrige bzw. hohe DON-Gehalte aufweisen, zeigen eine ähnliche Tendenz bei den ZON-Gehalten.

Zusammenhang zwischen den B-Trichothecen- und ZON-Gehalten

Höhere Zusammenhänge als zwischen den DON- und ZON-Gehalten wurden zwischen der Summe der B-Trichothecen- und den ZON-Gehalten gefunden. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,15**.** Bei Proben die bereits einen geringen ZON-Gehalt aufweisen, ist in vielen Fällen der Gehalt der Trichothecene ebenfalls gering. Für die meisten Sorten gilt eine eher zufällige Verteilung der Werte, so dass man im Einzelfall auf eine Zearalenon-Analyse nicht verzichten kann.

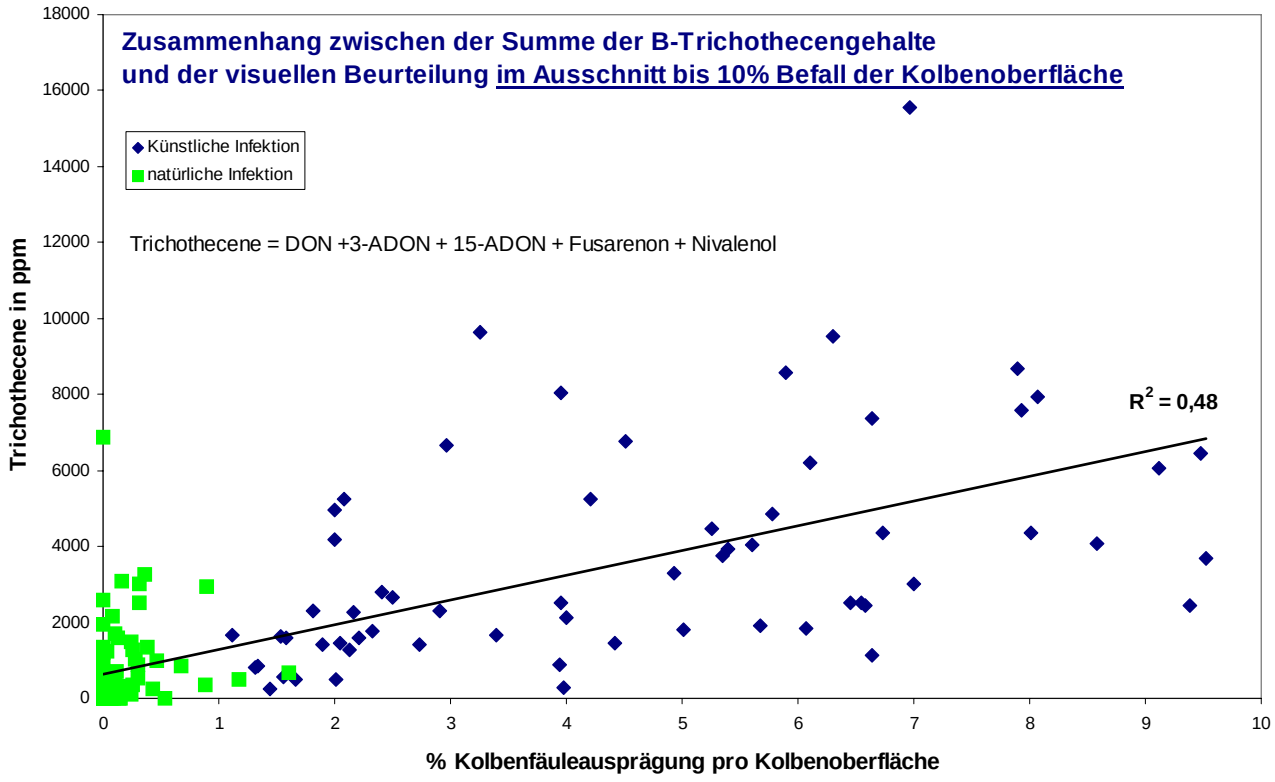

Zusammenhang zwischen der Summe der B-Trichothecen- und Zearalenongehalte
B-Trichothecene = DON +3-ADON + 15-ADON + Fusarenon + Nivalenol
R^2 = 0,15
Zearalenon in µg/kg
B-Trichothecene in µg/kg
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000


Zusammenhang zwischen der Summe der B-Trichothecengehalte und der visuellen Beurteilung
Künstliche Infektion
natürliche Infektion
Trichothecene = DON +3-ADON + 15-ADON + Fusarenon + Nivalenol
R^2 = 0,79
Trichothecene in ppm
% Kolbenfäuleausprägung pro Kolbenoberfläche
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
70000
0
5
10
15
20
25
30
35
40

Zusammenhang zwischen den Analysenwerten und der visuellen Bonitur

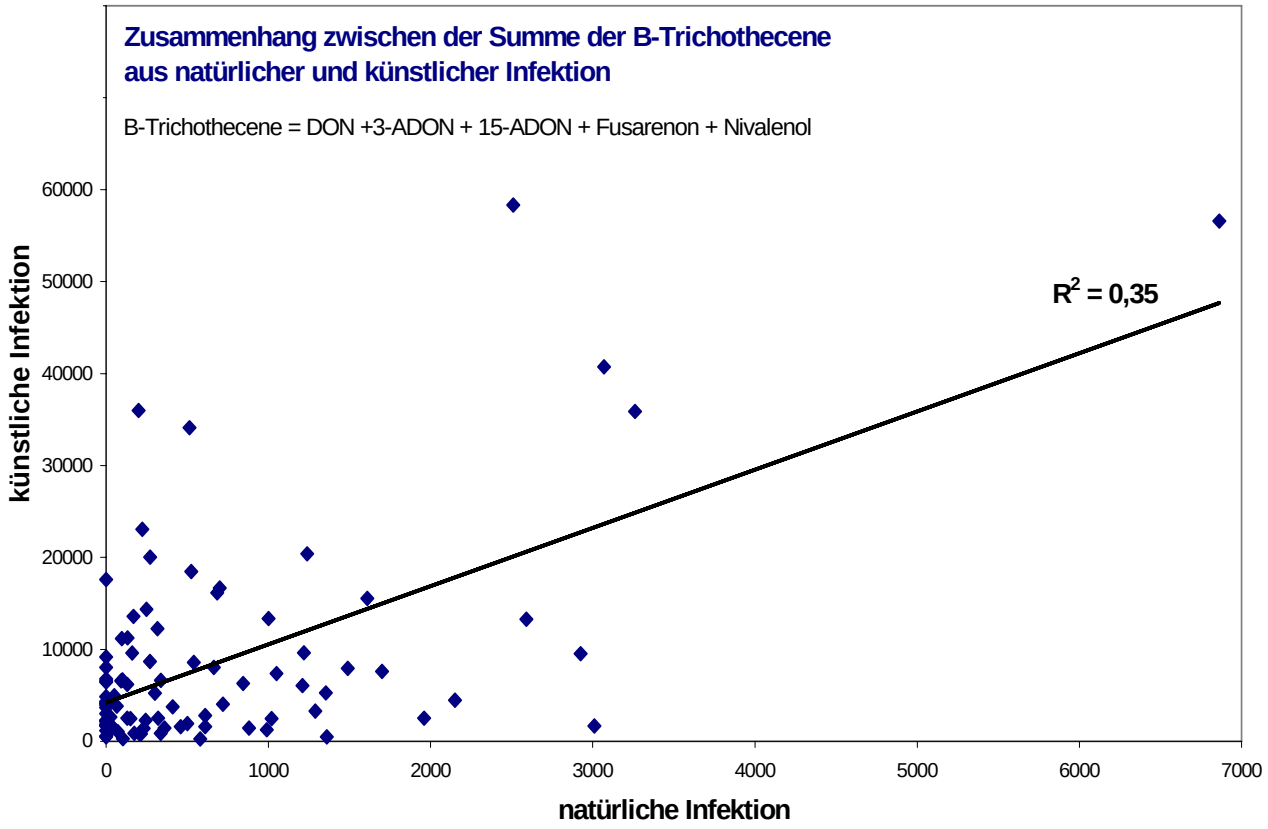
Eine hohe Korrelation von r =0,89 zwischen der visuellen Beurteilung der Befallsfläche am Feld nach dem Öffnen der Lieschblätter und den Laborgehalten der B-Trichothecene bestätigt für die beiden Beobachtungsjahre die Sinnhaftigkeit der Beurteilung der Befallsfläche der einzelnen Kolben. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,79.

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-Trichothecenen gegenüber, zeigt sich weiterhin eine deutliche Abhängigkeit zur visuellen Bonitur. Das Bestimmtheitsmaß beträgt immer noch 0,48 (r =0,7).



Zusammenhang zwischen natürlicher und künstlicher Infektion

Der Vergleich der Summe der B-Trichothecen-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.



Zusammenfassend lässt sich nach 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. Nur die künstliche Infektion gewährleistet in Jahren mit niedrigem Befallsdruck klare Differenzierungen. Eine Kombination von natürlicher und künstlicher Infektion bei möglichst hoher Versuchszahl ist am sinnvollsten. Die visuelle Beurteilung korrelliert in einem sehr hohen Maße mit den B-Trichothecen- bzw. DON-Gehalten.

Autoren

H. FELDER, G: DERSCH, M. PLANK, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

R. ÖHLINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz

Molekulare Möglichkeiten zur Detektion von Trichothecen produzierenden *Fusarium* Arten.

Benefits of molecular methods for the detection of trichothecene producing Fusarium species.

K. BRUNNER & R. L. MACH

Abstract. A quantitative real-time PCR based assay has been developed for the quantitative detection of all common Trichothecen producing *Fusarium* species in a single test run. Real-time PCR allows the detection of even minor amount of *Fusarium* biomass in almost any sample material: soil, plants and harvested grain. This technique is fast, cheap, sensitive and provides information on plant pathology related questions and, to a certain extent also allows quality control of cereals. This method was developed at the Vienna University of Technology and in 2007 the first field trials for the evaluation of this test system were conducted in lower- and upper Austria.

Key words: *Fusarium*, trichothecene, PCR

Zusammenfassung. Es wurde ein real-time PCR basierter Ansatz entwickelt, um alle häufig vorkommenden Trichothecen produzierenden *Fusarium* Arten in einem einzigen Testlauf zu quantifizieren. Die real-time PCR erlaubt die Bestimmung von kleinsten Mengen an *Fusarium* Biomasse in fast allen erdenklichen Probenmatrices. Sowohl Boden, Pflanzenteile als auch geerntetes Getreide können analysiert werden. Diese Technologie ist schnell, billig, sensitiv und erlaubt Aussagen zu Fragen der Pflanzenpathologie und zu einem gewissen grad ist diese Methode auch zur Qualitätsbestimmung geeignet. Dieser Test wurde an der TU Wien entwickelt und 2007 bereits in ersten Feldversuchen in Nieder- und Oberösterreich evaluiert.

Schlüsselwörter: *Fusarium*, Trichothecene, PCR

Die Klasse der Trichothecene sind die wohl am häufigsten gefundenen *Fusarium* Toxine und die prominentesten Vertreter wie Dioxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV) und T2 Toxin sind alle akut toxisch. Insgesamt kann *Fusarium* noch zahlreiche andere Trichothecene bilden oder aber Derivate der oben genannten bilden (z.B. 3-Ac DON, 15-Ac DON). Eine Erfassung der Trichothecen Gesamtmenge durch konventionelle Analytik ist daher schwierig und kostenintensiv. All diese Toxine verbindet jedoch ein gemeinsamer Biosyntheseweg, beginnend mit einer Trichodiensynthase. Genau dieses Gen (tri5), das am Beginn der Synthese aller Toxine der Trichothecenklasse steht, wurde als Zielgen für eine PCR basierten Nachweis ausgewählt. Durch den Nachweis dieses Teiles der Pilz – DNA werden alle potentiellen Trichothecenbildner erfasst. Bisher wurde der Nachweis an folgenden Arten überprüft: *Fusarium graminearum, F. culmorum, F. poae, F. langsethiae, F. cerealis, F. equiseti* und *F. sporotrichioides.*

DNA ist ein sehr stabiles Molekül und überdauert auch nach dem Absterben eines Lebewesens noch lange Zeit in einer Probe. Das heißt, dass die Menge der mittels PCR nachgewiesen DNA von dem eventuell noch lebenden Organismus stammt, vorwiegend aber Auskunft gibt über die Gesamtmenge der jemals in der Probe gewesenen Biomasse. Im Fall von *Fusarium* bedeutet dies,

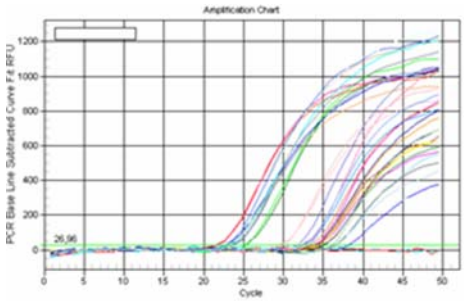
dass bei einer Analyse von geerntetem Getreide jene Menge Pilz nachgewiesen wird, die ursprünglich am Feld zum Absterben der Ähre geführt hat.

Der Ablauf der Analyse:

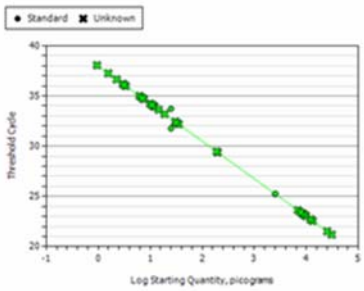
1) DNA Isolation aus der Probe
   Dieser Schritt ist der wichtigste und auch schwierigste. DNA ist ein sehr großes Molekül und die Isolation aus hart-zähem Material wie Getreide ist schwierig. Um maximale Effizienz bei der DNA Gewinnung zu erzielen, wurde im Zuge der Optimierung der Probenaufbereitung ein dreistufiges Isolationsverfahren etabliert:
   mahlen => pulverisieren in flüssigem Stickstoff => DNA Extraktion mit kommerziellem Kit

2) Der real-time PCR Lauf
   Im Zuge des PCR Laufes werden wenige Ausgangsmoleküle an Pilz-DNA vermehrt. Das Anwachsen der DNA Menge wird über Fluoreszenzdetektion verfolgt. Würde man mit nur einem Molekül *Fusarium* DNA starten, so endet man nach ca. 30 Minuten Laufzeit mit 10^9 Molekülen.

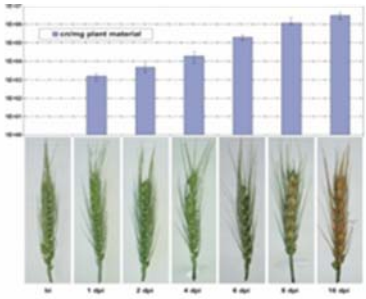
3) Die Auswertung



Optischer Output der Messung



Automatische Auswertung anhand von DNA Standards


Korrelation der gefundenen DNA Menge mit dem beobachteten Grad der Infektion

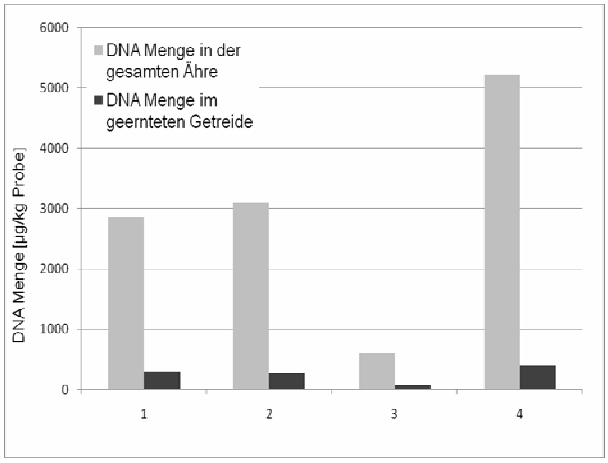
Nach zahlreichen Schritten der Optimierung und Evaluierung hinsichtlich Selektivität und Spezifität im Labor, wurden 2007 Feldversuche durchgeführt, um verschiedene Anwendungsmöglichkeit der real-time PCR in der Praxis zu testen.

Der Infektionsweg

Fusarium überdauert den Winter im Boden an Pflanzenrückständen. Zur Blütezeit des Getreides werden bei ausreichender Feuchtigkeit Fruchtkörper gebildet und Ascosporen auf die blühende Ähre geschossen. Die Fusariummenge im Boden hängt stark von der Vorfrucht ab (Mais und Weizen sind Risikovorfrüchte) und von der Bodenbearbeitungsmethode. Bedingt durch einen hohen Bodenbedeckungsgrad bei reduzierter Bodenbearbeitung oder bei Direktsaat, bergen diese Böden meist erhöhtes Infektionsrisiko.

Standort	Vorfrucht	Kultur	Boden-bearbeitung	*Fusarium* DNA in den Pflanzenrückständen (Boden) [µg/kg Probe]	*Fusarium* DNA auf den Blättern [µg/kg Probe]
A	Sonnenblume	Gerste	Grubber, 2x	2,2	0,110
	Sonnenblume	Gerste	Grubber, 1x	8,1	0,039
	Sonnenblume	Gerste	Direktsaat	9,3	n.d.
	Körnermais	Weizen	Direktsaat	57	n.d.
B	Körnermais	Weizen	Grubber	10,2	0,004
	Körnermais	Weizen	Direktsaat	5,5	0,007
	Winterraps	Weizen	Direktsaat	n.d.	0,050
C	Weizen	Durum	Grubber	31,9	0,009
	Weizen	Durum	Direktsaat	22,7	0,031

Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit der *Fusarium* Inokulummenge im Boden von der Vorfrucht und vom Standort. Der Standort C wurde zur Provokation von *Fusarium* Infektion während der Blütezeit des Durum mehrfach bewässert. In der Literatur wurde mit kontroversiellen Ergebnissen diskutiert, ob eine Infektion auch über die Blattetagen erfolgen kann. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden auch die zwei obersten Blätter der Getreidepflanzen auf die Anwesenheit von *Fusarium* analysiert. Obwohl die meisten Proben positiv getestet wurden, konnte weder eine Korrelation mit der Inokulummenge im Boden (siehe Tabelle 1), noch mit der gefundenen Pilzmenge in der Ähre hergestellt werden.



In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie stark sich *Fusarium* durch die Spindel der Ähre in die Körner ausbreitet. Analysiert wurden einerseits die gesamten Ähren und andererseits geerntetes Getreide. Abbildung 2 zeigt, dass bei Weizen nur etwa 10% der gesamten *Fusarium* Biomasse, die zur Infektion führte, in den Getreidekörnern zu finden ist. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit, bei der Ernte möglichst alle Pflanzenzeile vom sauberen Korn abzutrennen.

Evaluierung von Fungizideinsatz

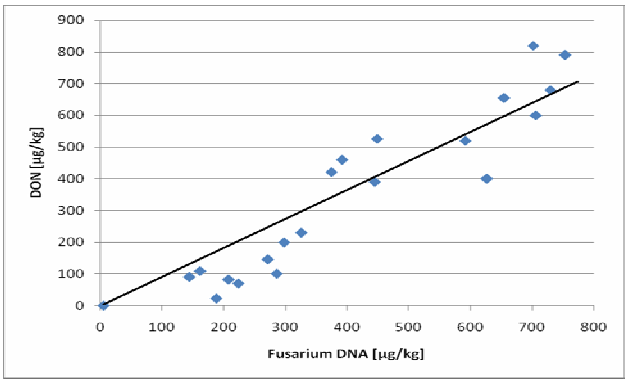
Die quantitative PCR Bestimmung von *Fusarium* ist die einzige direkte Nachweisemethode für die Effizienz von Fungiziden, denn es wird der tatsächliche Rückgang der *Fusarium*menge bestimmt. Messung des DON Gehaltes sind eine indirekter Test und vertrauen auf die Korrelation zwischen DON Gehalt und Biomasse.

Kultur	Bodenbearbeitung	unbehandelte Kontrolle [µg DNA/kg Probe] (DON)	Fungizid [µg DNA/kg Probe]
Durum	Pflug	445 (490)	286 (100)
Durum	2x Grubber	754 (810)	145 (90)
Durum	1x Grubber	702 (820)	162 (110)
Durum	Direktsaat	375 (460)	209 (82)

Tabelle 2 zeigt, wie stark die Biomasse durch das applizierte Fungizid vermindert wurde. In Klammern sind die gemessenen DON Werte der jeweiligen Proben angegeben. In den meisten fällen korreliert die *Fusarium* Biomasse gut mit der DON Menge.

Qualitätsanalyse von Getreide

Grundsätzlich wird ein Zusammenhang zwischen *Fusarium*menge und Toxinmenge in einer Prober eher bezweifelt. Dennoch gibt es dazu bisher keine Aussage in der Literatur, da die Pilzmenge immer nur mit einem einzigen Toxin verglichen wurde.



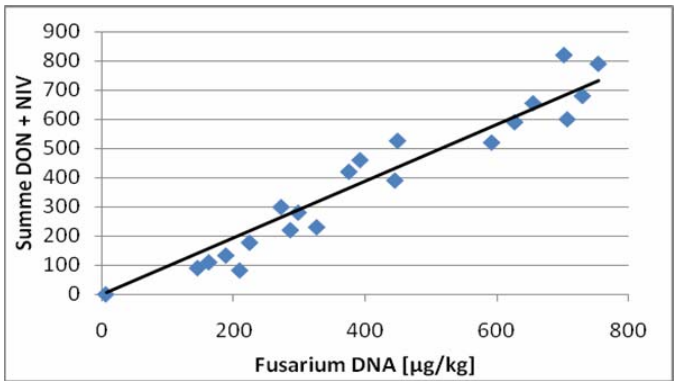


Abbildung 2 zeigt links die Korrelation zwischen *Fusarium* DNA Gehalt und DON Werten. Rechts ist zu sehen, dass die Korrelation mit der Summe aus DON und NIV Gehalt wesentlich besser ist. In Diese Analyse wurden Werte aus Triticale, Weizen und Durum aus verschiedenen Standorten integriert. Die Ergebnisse zeigen, dass Proben mittels PCR eher auf einen gesamten Trichothecengehalt hin untersucht werden können, als dass eine konkrete Aussage Über ein einziges Toxin abgegeben werden kann.

Autoren

K. BRUNNER und R. L. MACH, beide Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Abteilung Gentechnik und Angewandte Biochemie.

Wirkung von Thiophanat-methyl auf die Mykotoxinbildung in Getreide

Effect of Thiophanate-methyl on mycotoxin formation in cereals

F. M. ELLNER & H. BUSCHHAUS

Abstract

Thiophanate-methyl (TM) is a benzimidazole fungicide with a broad spectrum of activity against various plant pathogens. There is only little evidence about the effect of TM on Fusarium fungi belonging to the FHB complex. Under field conditions TM was applied at a rate of 770gai/ha at BBCH growth stages varying from 61 to 75 and reduced deoxynivalenol (DON) by 40 to 57% in wheat and triticale. The application of TM 1-3; 6-10, and 11-23 days after artificial inoculation of *F. graminearum* spores reduced the amount of DON significantly, up to 10 days between 65 and 67% and even at the last application still by 44%. No relationship between the amount of Fusarium-contaminated grains and DON content could be found in winter wheat treated with reduced application rates of TM, whereas both parameters corresponded well in tebuconazole-treated plots. In in-vitro studies different *Fusarium* species isolated from maize at various locations throughout the world were cultivated on maize grits containing 0, 0.5, 1.0, 10, or 50µg TM/mg medium, respectively. Significant effects on growth could be observed with concentrations starting at 10µg TM/mg medium. The influence on mycotoxin formation varied depending on the *Fusarium* strain investigated. The effect of TM on mycotoxin production was higher than on mycelium growth.

Zusammenfassung

Thiophanat-methyl (TM) ist ein Benzimidazolfungizid mit breitem Wirkungsspektrum gegenüber verschiedenen Pflanzenpathogenen. Bisher gibt es nur wenige Erkenntnisse über die Wirkung von TM auf Fusarien, die in Getreide die partielle Taubährigkeit verursachen können. In Freilandversuchen wurde TM mit einer Aufwandmenge von 770 gai/ha in den Wachstumsstadien BBCH 61 – 75 appliziert und reduzierte die Konzentration an Deoxynivalenol (DON) in den Körnern von Weizen und Triticale um 40 – 57%. Eine TM-Behandlung 1-3, 6-10 und 11-23 nach künstlicher Infektion mit *F. graminearum* Sporen führte zu einer signifikanten DON Reduktion, die bis zu 10 Tage p.i. 65 bis 67 % erreichte und auch bei der letzten Applikation noch 44 % betrug. Zwischen der Anzahl Fusarium infizierte Körner und dem DON Gehalt konnte in Winterweizen bei Anwendung reduzierter Aufwandmengen an TM keine Korrelation festgestellt werden, wohingegen beide Parameter in Tebuconazol behandelten Parzellen gut übereinstimmten. In in-vitro Untersuchungen wurden verschiedene Fusariumarten, isoliert von Mais aus unterschiedlichen Regionen der Welt, auf Maisgrieß kultiviert, der 0; 0,5; 1,0; 10,0; und 50,0 µg TM/mg Medium enthielt. Signifikante Wachstumsdepressionen waren ab 10 µg TM/mg Medium zu beobachten. Der Effekt auf die Mykotoxinproduktion variierte in Abhängigkeit von dem verwendeten Fusariumisolat und war häufig ausgeprägter als auf das Myzelwachstum.

Einleitung

Thiophanat-methyl (TM) ist ein Benzimidazol-Fungizid und schon über 30 Jahre auf dem Markt. Es verfügt über ein breites Wirkungspektrum gegen ökonomisch bedeutende Schadpilze aus den Gattungen der Ascomyceten, Deuteromyceten und Basidiomyceten. TM befindet sich im Zulassungsverfahren als „DONstop“ zur Bekämpfung von Fusarien spp. in Getreide und zur Reduktion der Mykotoxinbelastung. Der Hauptwirkungsmechanismus beruht auf der Hemmung der Tubulinaggregation und damit verbunden, der Mitose (Davidse & Flach, 1977; Hammerschlag & Sisler, 1972). Es gibt Hinweise, das Metaboliten von TM oder anderen Benzimidazol-Fungiziden in die Atmungskette eingreifen und somit die Energiebereitstellung für katabole Prozesse unterdrücken können (Kataria & Grover, 1976; Hammerschlag & Sisler, 1972).

Methoden

In 13 Feldversuchen wurde TM als 700 WDG zu den Wachstumsstadien BBCH 61, 65, 71, und 75 mit einer Aufwandmenge von 1,1 kg/ha appliziert. Winterweizen und Triticale wurden in randomisierten Blockanlagen unter natürlichen Infektionsbedingungen angebaut. In weiteren Versuchen wurde Winterweizen natürlich mit *Fusarium culmorum* infiziert und zu BBCH 65 mit TM (770 gai/ha) 1-3 Tage, 6-10 Tage und 11-23 Tage nach Inokulation behandelt. Nach der Ernte erfolgte die Bestimmung des DON Gehaltes in den gereinigten Körner mittels HPLC nach Ellner (2000). In einem dritten Set erfolgte der Einsatz reduzierter TM Konzentrationen mit 250, 375, und 500 gai/ha sowie Tebuconazol in der empfohlenen Aufwandmenge von 250 gai/ha. Hier erfolgte nach der Ernte ebenfalls die Analyse der DON Belastung und zusätzlich nach einer Oberflächensterilisation der Körner die Bestimmung der Befallshäufigkeit mit *F. graminearum* auf SNA-Medium.

Die Fusariumisolate für die in-vitro Untersuchungen stammten alle aus der Stammsammlung der BBA und wurden auf SNA-Medium in Petrischafen bei 25 °C für mindestens 10 Tage vorkultiviert. Myzelstücke mit 0,5 cm Durchmesser wurden auf sterilisierten Maisgrieß oder SNA überführt, der 0; 0,5; 1,0; 10,0 oder 50,0 µg TM/g Medium enthielt. Nach 10 – 12 Tagen wurde Extraktionslösung zugegeben und das gesamte Medium mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Ein Aliquot des klaren Überstandes wurde zur Trockne eingeengt, in Methanol/Wasser (50:50) aufgenommen und mittels HPLC auf Mykotoxine untersucht. Für den Fumonisin Nachweis wurde mit Wasser extrahiert und der klare Überstand direkt im ELISA-Test der Firma R-biopharm entsprechend dem Protokol des Herstellers analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Zu den Wachstumsstadien BBCH 61, 65, und 71 reduzierte TM in Winterweizen und Triticale die DON Bildung im Durchschnitt um 57, 55, und 56%. Sogar zur Milchreife bei BBCH 75 konnte unter den verschiedenen Bedingungen der 13 Standorte innerhalb Europas DON um 40% reduziert werden. Die Behandlung mit Tebuconazol zum optimalen Zeitpunkt führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Tab. 1).

Tabelle 1: Einfluß von TM auf den DON Gehalt in Getreide nach Behandlung zu verschiedenen Wachstumsstadien; Durchschnitt von 13 Feldversuchen der Jahre 2005 und 2006

Zeitpunkt der Applikation	% DON Reduktion
BBCH 61 TM	57 a
BBCH 65 TM	55 a
BBCH 71 TM	56 a
BBCH 75 TM	40 a
BBCH 65 Tebuconazol	56 a
Unbehandelte Kontrolle	0 b

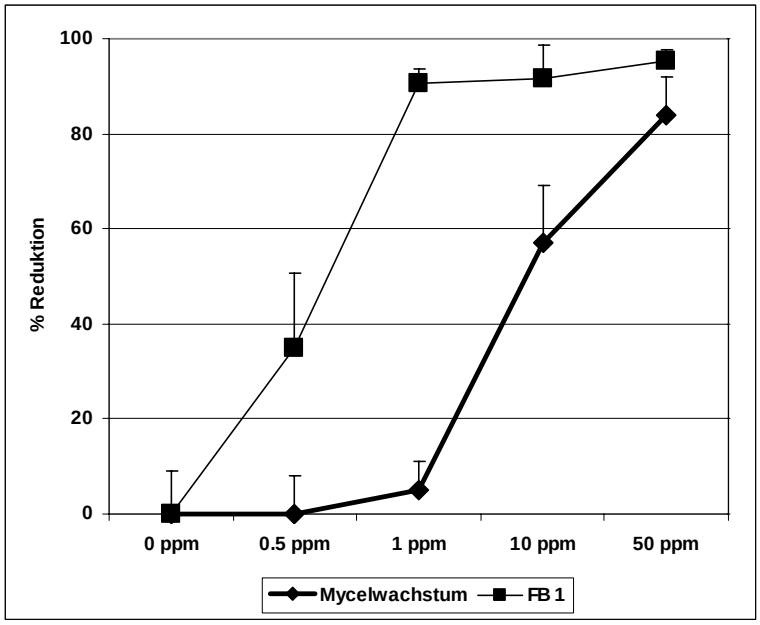
Zahlen mit gleichen Buchstaben sind voneinander nicht signifikant verschieden ($p < 0,01$) DON Konzentration der unbehandelten Kontrolle 1,37+/-1,22 mg /kg

In den Versuchen mit künstlicher Inokulation mit *F. culmorum* zum Zeitpunkt BBCH 65 senkte TM den DON Gehalt um 67 %, 65 % bzw. 44% wenn die Behandlung 1-3, 6-10 bzw. 11-23 Tage nach Inokulation erfolgte. Dies weist auf ein breiteres Applikationsfenster für TM hin im Vergleich zu den zugelassenen Azol Fungiziden.

Die Anwendung reduzierter TM Konzentrationen in Weizen führte zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich DON Reduktion und Befallshäufigkeit. Während die Gehalte an DON in den Körnen mit steigender TM Konzentration von 3,8 auf 2,0 mg/kg reduziert werden konnte blieb die Anzahl befallener Körner annähernd konstant. Im Gegensatz dazu korrelierte nach Tebuconazol Behandlung die Reduktion an DON mit dem Befall.

Aber nicht nur gegen *F. graminearum* und *F. culmorum* ist TM aktiv, wie in Wachstumsexperimenten auf Kulturmedien gezeigt werden konnte. Im Konzentrationsbereich bis 50 ppm führt TM nicht nur zu einer vollständigen Unterdrückung des Mycelwachstums von *F. graminearum*, *F. glubosum*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* und *F. verticilloides* sondern auch zur Hemmung der Toxinbildung. Das beide Wirkungen nicht parallel verlaufen ist an Abbildung 1 deutlich erkennbar. Die Reduktion der Fumonisinbildung setzt bei *F. subglutinans* bei wesentlich geringeren TM Konzentrationen ein und erreicht auch eher das Maximum als das bei der Wachstumshemmung der Fall war.

Abb. 1 Einfluss von TM auf Mycelwachstum und Fumonisinbildung in *F. subglutinans*



TM ist als Fungizid besonders geeignet, um im Getreideanbau die durch Ährenfusariosen hervorgerufene Kontamination mit Mykotoxinen zu reduzieren. Von besonderem Vorteil ist das im Vergleich zu Azolfungiziden wesentlich breitere Applikationsfenster bis hin zur Milchreife. Die in-vitro Untersuchungen belegen die Wirksamkeit gegenüber den wirtschaftlich bedeutenden, Mykotoxin bildenden Fusariumarten.

Literatur

Davidse, L.C.; Flach, W. (1977): Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*, Journal of Cell Biology (72), S. 174-193.

Hammerschlag, R.S.; Sisler, H.D. (1972): Differential action of benomyl and Methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC) in *Sachromyces pastorianus*, Pestic. Biochem. Phsiol., Vol. 2, S. 123-131

Kataria, H.R.; Grover, R:K: (1976): Effect of Benomyl and Thiophanate-methyl on metabolic activities of *Rhizoctonia solani* Kühn, Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127 A, S. 297-306.

Autoren

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

Dr. BUSCHHAUS, Herbert NISSO Chemical Europe GmbH, Steinstrasse 27,
40210 Düsseldorf

Isotopenverdünnungs-GC/MS von A-Trichothecenen

Isotopic dilution analysis of type A trichothecenes with GC/MS

W. BRODACZ & A. DELLA ROSA

Zusammenfassung:

Isotopenmarkierte Kalibriersubstanzen sind die idealen internen Standards in der massenspektrometrischen Mykotoxinanalytik. Besonders die vollständig ^{13}C-markierten Mykotoxinen zeichnen sich durch völlig gleiche physikalisch/chemische Eigenschaften verglichen mit den nativen Toxinen aus. Als deren ideale interne Standards sofort nach der Extraktion eingesetzt, kompensieren sie praktisch alle Schwankungen und Verluste der gesamten Analysenmethode. Im Vergleich zu einer externen Auswertung werden damit die Variationskoeffizienten um den Faktor 4 bis 5 reduziert. Die Kombination von Festphasenextraktion und Immunoaffinitätssäule erzielt sehr gute Aufreinigung und erlaubt damit hohe Anreicherungen. MSTFA als Silylierungsreagenz ermöglicht eine rasche Derivatisierung ohne notwendige Zerstörung des Überschusses und dient gleichzeitig als Lösungsmittel bei der Splitless-Druckpulsinjektion. Die selektive Messung von je 3 diagnostischen Ionen/Zielanalyten resultiert in einer Bestimmungsgrenze von deutlich unter 5 µg/kg für T-2 Toxin bzw. HT-2 Toxin

Schlüsselwörter: A-Trichothecene, Isotopenverdünnungsanalytik, ^{13}C-Markierung, GC/MS, T-2 Toxin, HT-2 Toxin

Aufgrund der hohen Toxizität von T-2 Toxinen und HT-2 Toxinen sind entsprechend niedere Grenzwerte in Vorbereitung. Daraus resultiert die dringende Forderung nach sehr empfindlichen und selektiven Analysenmethoden. A-Trichothecene zeigen jedoch mit Standarddetektoren weder bei der HPLC noch bei der GC ausreichend selektive Empfindlichkeit, sodass letztlich die Massenspektrometrie die Detektion der Wahl ist. Im Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz der AGES ist eine GC-Methode für B-Trichothecene sehr gut etabliert. Da praktisch alle für die A-Trichothecenanalytik vorgesehenen Proben in der Routine auch auf B-Trichothecene untersucht werden, ist es nahe liegend, das bestehende Extraktionsverfahren (Acetonitril/Wasser; 84/16) inklusive dem Solid Phase Extraction - clean up (SPE; MycoSep-227 Trich+; Fa. Romer Labs) gemeinsam zu nutzen (Abb.1). Wie der Vergleich von verschiedenen clean up - Varianten (Abb. 2) zeigt, ist diese Vorreinigung alleine für die notwendig hohen Anreicherungen aber nicht ausreichend.

Clean up

Hafer gilt als besonders störende Matrix, ist aber als die Haupteintragsquelle für A-Trichothecene umso wichtiger in der Kontrollanalytik. Abbildung 2 zeigt die Totalionenströme (TIC aller SIM-Ionen) des Kalibrierstandards (oben) und darunter den Vergleich von 4 clean up - Möglichkeiten

anhand einer dotierten Haferprobe. Eine Nachreinigung des bereits per SPE (MycoSep-227) vorgereinigten Extraktes mit MultiSep-216 (Fa. Romer Labs) reduziert das chemische Rauschen so weit, dass bei den überprüften Matrizes Mischfuttermittel, Müsli und Hafer ab einem Belastungsgrad von ca. 50 µg/kg je Analyt ausreichend genau gemessen werden kann. Der Vorteil dieser Kombination von SPE-Säulen ist, dass neben HT-2 Toxin und T-2 Toxin noch MAS (Monoacetoxyscirpenol) und DAS (Diacetoxyscirpenol) bestimmt werden können (1).

Für die Anforderungen des Lebensmittelbereiches (Babynahrung) sollten jedoch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze um eine Zehnerpotenz abgesenkt werden. Diese zusätzliche Selektivitätssteigerung ist nur möglich, wenn nach der ersten SPE-Vorreinigung eine Immunoaffinitätssäule (IAC; „Easi-Extract T-2 and HT-2"; Fa. R-Biopharm) eingesetzt wird. In Abbildung 2 ist auch erkennbar, dass die Kombination SPE + IAC deutlich reinere Extrakte liefert, als das alleinige clean up über die IAC. Abgesehen von den erheblichen Zusatzkosten durch die IAC, gehen dadurch die A-Trichothecene MAS und DAS verloren. Die Rückgewinnung bezüglich T-2 – und HT-2 Toxin werden vom IAC-Hersteller mit >70% angegeben. Diese Angabe deckt sich mit den Erfahrungen der Autoren, allerdings wurden auch erhebliche Schwankungen registriert, die zwischen beiden Zielanalyten nicht immer parallel verlaufen. Nicht zuletzt deshalb ist ein zuverlässiger interner Standard (IStd) notwendig, der das komplette clean up mit einschließt.

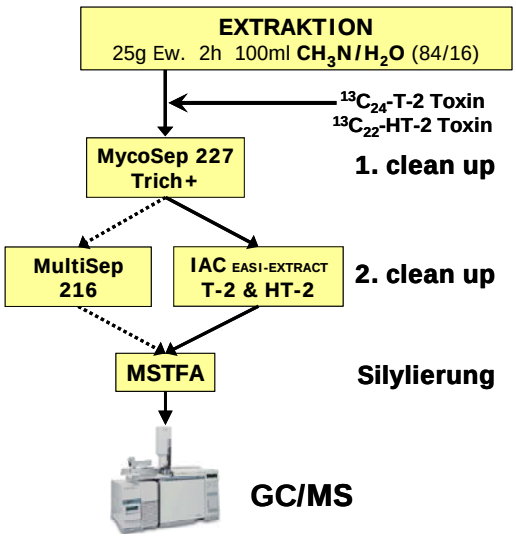
Silylierung

Für die vollständige Silylierung der A-Trichothecene ist MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid mit 1% Trimethylchlorosilan) ausreichend. Mit einem Siedepunkt von 131°C gilt es als das flüchtigste Silylierungsreagenz und kann deshalb gleichzeitig die Funktion des Lösungsmittels übernehmen. Im Gegensatz zu vielen anderen Silylierungsmitteln ist folglich eine aufwendige Zerstörung des MSTFA-Überschusses mit Wasser und die umständliche Reextraktion nicht mehr notwendig. Das ermöglicht einfaches u. sehr schnelles Silylieren (Eindampfen zur Trockene; MSTFA-Zugabe; 30 min bei Raumtemperatur) (2). MSTFA ist für die Zielanalyten ein gutes Lösungsmittel u. der hohe Kp ermöglicht Solvent-Effekte bei hohem Temperaturprogramm-Niveau und damit kurze GC-Zykluszeiten. Kleine Reagenzvolumen (50 – 100µl) steigern die Nachweisempfindlichkeit und reduzieren die Kosten des Silylierungsmittels u. der isotopenmarkierten Standards. Der permanent präsente und hohe Reagenzüberschuss verhindert den Zerfall der TMS-Derivate bei der Lagerung u. Injektion.

^{13}C-markierte interne Standards

Das wichtigste Fundament der Quantifizierung und ausschlaggebend für die vereinfachte Handhabung der gesamten Methode ist der Einsatz von isotopenmarkierten internen Standards. Die vielfältigen Vorteile kommen besonderes dann zum Tragen, wenn die Dotierung der gelabelten Toxine sofort nach der Extraktion erfolgt. Das praktisch idente Verhalten von Zielanalyten und ^{13}C-markierten Analogen ist der entscheidende Vorteil der Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IVMS). Damit sind alle nachfolgenden Arbeitsschritte quantitativ unter Kontrolle der internen

Standards. Alle Verluste und Unregelmäßigkeiten bei Transferschritten oder insbesondere beim (IAC-) clean up, Präzisionsverluste beim Manipulieren mit sehr kleinen Volumen, beim Einengen oder Aliquotieren etc. werden automatisch ausgeglichen. Wenn vollständig ^{13}C-markierte IStds verwendet werden, können selbst schwer kontrollierbare prä- und postchromatographische Matrixeffekte kompensiert werden. Denn im Gegensatz zu deuterierten Standards zeigen sie aufgrund des geringeren, so genannten Isotopeneffekts selbst bei der Kapillar-GC absolut idente Retentionszeiten wie die nativen Toxine (3) (4). Eigene Versuche und die Erfahrungen eines EU-weiten Ringversuches zeigen, dass sich $^{13}C_{24}$-T-2 Toxin als IStd für T-2 Toxin sehr gut eignet, aber nicht gleichzeitig auch HT-2 Toxin ebenso gut kontrollieren kann. Die strukturellen Unterschiede zwischen beiden Toxinen (OH-Gruppe anstatt CH_3COO) sind doch groß genug, um eine gute Korrektur durch den jeweils anderen markierten Standard zu verhindern. Der Autor verwendet daher zugunsten einer optimalen Auswertung der beiden wichtigsten A-Trichothecene beide gelabelten IStd. Wie die Molekülstrukturen nahe legen, sehen die Verhältnisse zwischen $^{13}C_{24}$-T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS) bzw. zwischen $^{13}C_{22}$-HT-2 Toxin und Monoacetoxyscirpenol (MAS) günstiger aus. Eigene Versuche betätigen, dass DAS bzw. MAS in der Routineanalytik über die ohnehin notwenigen IStd $^{13}C_{24}$-T-2 Toxin bzw. $^{13}C_{22}$-HT-2 Toxin ausreichend genau ausgewertet werden können. Bei entsprechendem „Design“ der Methode können die notwendigen Mengen an teuren IStd so gering gehalten werden, dass die Zusatzkosten angesichts der Qualitätsverbesserung vertretbar sind. D.h. alle Aliquotierungen sind vor die Dotierung zu setzen und das Messlösungsvolumen ist möglichst gering zu halten (>= 50 µl genügen und durch den IStd ist das quantitative Handling unkritisch).



Analyt	Target	Qualif.-1	Qualif.-2	ab Runtime
MAS	**408,0**	**285,1**	247,2	**7,5 min**
DAS	**378,2**	**350,1**	290,1	**8,1 min**
13C**-HT-2 Toxin**	**483,2**	367,1		**8,9 min**
HT-2 Toxin	**466,2**	**347,2**	478,2	
13C-**T-2 Toxin**	**365,1**	455,2		**9,8 min**
T-2 Toxin	**436,2**	**350,1**	290,1	

Tab. 1: SIM-Ionen

Abb. 1: Methodenschema mit alternativen clean up – Strategien

Während die in einer EU-Methodenempfehlung (1) vorgeschlagene Methylpolysiloxan-Phase mit 5 % Phenylanteil (z.B. HP-5 etc) hinsichtlich der wichtigsten Analyten T-2 Toxin und HT-2 Toxin keine Basislinientrennung erreicht, ist die mittelpolare Phase DB-35ms ideal geeignet, die 4 A-Trichothecene DAS, MAS, T-2 Toxin und HT-2 Toxin mit einem schnellen Temperaturprogramm zu

separieren (Abb. 2 oben). Die verwendeten Quantifizierungs-Ionen (Target) mit den korrespondierenden 2 Qualifier-Ionen sind für alle Zielanalyten in Tabelle 1 ersichtlich. Für die internen Standards wird zur Absicherung der Peak-Reinheit ein Qualifier mitgemessen.

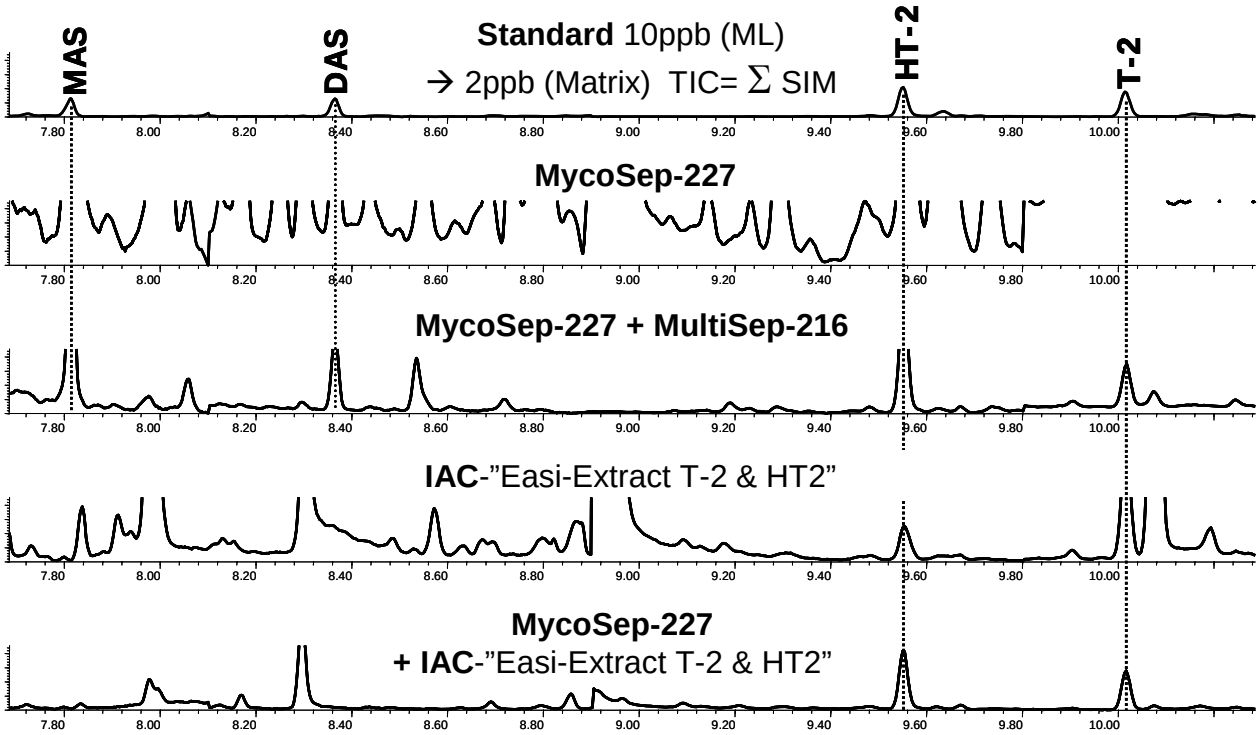


Abb. 2: Vergleich von clean up - Varianten am Beispiel Hafer (Chromatogramme als TIC aller SIM-Ionen)

Literatur:

1. Brodacz W., „Isotopenverdünnungsanalytik von Mykotoxinen mit GC/MSD"; LaborPraxis LP 9, S 46 – 49; September 2007
2. Breidbach A., Povilaityte V., Mischke C., Doncheva I., Stroka J.; „T-2 and HT-2 by GC/MS for official food control - a validated method"; Poster anl. 29. Mykotoxin-Workshop 14.-16.05. 2007 Fellbach, Germany
3. Brodacz W., „Isotopenmarkierte interne Standards in der Mykotoxin-Analytik"; LABO Februar, S 50 – 53; Februar 2007
4. Brodacz W., „Isotopenverdünnungsanalytik – die optimale massenspektrometrische Quantifizierung", Chemiereport.at S46 – 47 6/2007

Autoren:

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

Mykotoxin – Monitoring. Einfache Risikoabschätzung im Betrieb.

Mycotoxin – Monitoring. Simple risk management in the food and feed industry.

M. MAYER

Summary

In the past time food and feed industry has been searching for fast and reliable methods to determinate mycotoxins. With the ELISA method even middle or small structured producers are able to carry out a fast and simple mycotoxin risk management. Different studies from the university in Brno and the IGV show high correlation of the result from comparison analyses which has been made by the HPLC and GC or by the ELISA method. This applies also to internal Neogen studies.

Key words: Mycotoxinmonitoring, ELISA, food industry, feed industry

Zusammenfassung

Seitens der Lebensmittel- und Futtermittelhersteller wird in der Vergangenheit vermehrt nach schnellen und aussagekräftigen Methoden zum Mykotoxin Monitoring gesucht. ELISA Tests bieten mittleren oder kleineren Betrieben die Möglichkeit eine einfache und schnelle Risikoabschätzung zu betreiben. Neuerdings werden auch verstärkt Streifentests (auch „Lateral-Flow-device“ genannt) eingesetzt. Dieser Schnelltest ist in der Durchführung noch schneller als der ELISA und eignet sich auch zur Einzelanalyse als „Eingangskontrolle“ der Warenannahme. Die Resultate aus den präsentierten Vergleichsstudien der Mendel Universität in Brno und des Instituts für Getreideverarbeitung, sowie interne Studien der Firma Neogen, zeigen einen hohen Korrelationskoeffizient zwischen HPLC bzw. GC und den quantitativen ELISA Tests. Der häufig geäußerte Vorwurf der Ungenauigkeit der ELISA-Werte kann damit widerlegt werden.

Schlüsselwörter: Mycotoxinmonitoring, ELISA, Lebensmittelindustrie, Futtermittelindustrie

Einleitung

Der Druck auf die Lebensmittel- und Futtermittelhersteller im Bezug auf Mykotoxin Monitoring wird seitens der Konsumenten immer größer. Immer häufiger wird neben einer Probenaufbereitung in externen Labors eine eigene Risikoabschätzung im Betriebslabor durchgeführt. Damit steigt auch die Nachfrage nach Schnellmethoden für die Lebensmittel- und Futtermittelanalytik, den Forderungen nach frühestmöglicher Verfügbarkeit der Ergebnisse entgegenzukommen.

Durch schnellstmögliche Bestimmung der wertbestimmenden Bestandteile der Rohstoffe bzw. der Zwischen- und Endprodukte wird ein entsprechender Einfluss auf die laufende Produktion möglich, um bezüglich Qualität optimale Wirtschaftlichkeit zu erzielen. Die kritischen Kontrollpunkte eines HACCP Konzepts können somit in sehr wirkungsvoller Weise kontrolliert werden.

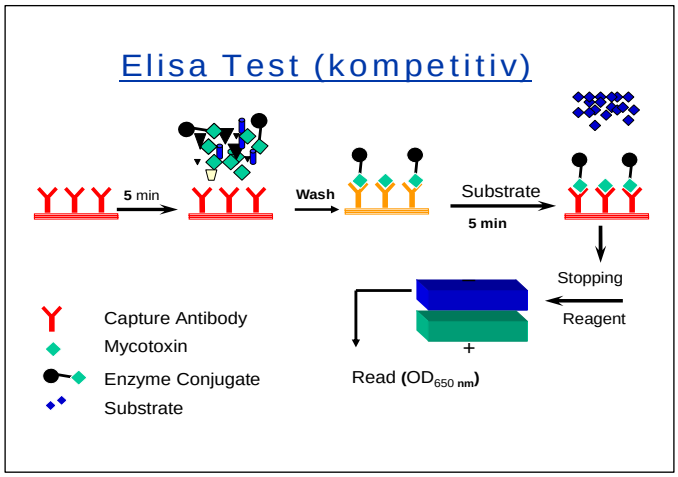
Während in der Futtermittelindustrie bereits ein breites Anwendungsgebiet für Schnellmethoden zu beobachten ist, werden in der Lebensmittelindustrie diese eher seltener eingesetzt. Die Gründe dafür sind meistens vielfältig und basieren häufig auf mangelnden Kenntnisse bezüglich Einsatzmöglichkeiten und Grenzen solcher Verfahren, übersteigerten Erwartungen, sowie der angeblich mangelnden Praxistauglichkeit, Genauigkeit und Zuverlässigkeit der auf dem Markt befindlichen Testsysteme.

Funktionsweise des ELISA Tests

Das Prinzip des ELISA beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Die Nachweisreaktion lässt sich in zwei Schritte unterteilen. Der erste Schritt ist die substanzspezifische Reaktion zwischen Antigen (z.B. dem gesuchten Mykotoxin) und Antikörper. Um diese Reaktion für die Auswertung sichtbar zu machen, wird im zweiten Schritt entweder am Antigen oder am Antikörper eine Enzymmarkierung angebracht. Sie dient dazu, je nach Test die Menge des Antigens oder des Antikörpers zu bestimmen.

Der kompetitive ELISA kommt zum Einsatz, wenn das zu bestimmende Antigen nur eine Antikörper-Bindungsstelle hat. Dies ist meist bei niedermolekularen Substanzen der Fall. Die substanzspezifischen Antikörper sind an der festen Phase (Kavität) gebunden. Zu dem in der Probe befindlichen Antigen wird enzymmarkiertes Antigen (Konjugat) gegeben, wobei nun das freie Toxin in der Probe bzw. Kontrolle mit dem enzymmarkierten (HRP) Toxin um die Bindungsstellen der Antikörper konkurriert. Je nach Gehalt an Antigen in der Probe kann mehr oder weniger enzymmarkiertes Antigen an den Antikörper gebunden werden. Ungebundenes Material wird durch einen Waschschritt entfernt. Durch die Zugabe des TMB-Substrates, welches durch das gebundene Enzym-Konjugat gespalten wird, entsteht eine blaue Färbung, deren Intensität umgekehrt proportional zur Toxinmenge ist, d.h. je stärker die Färbung, desto weniger freies Toxin. Die Auswertung erfolgt nach Zugabe der Stopplösung mit Hilfe eines Mikrostreifenfotometers bei einer Wellenlänge von 650nm. Der tatsächliche Mykotoxingehalt der Probe ergibt sich direkt aus der Standardkurve. Der Test lässt sich jedoch alternativ auch qualitativ durchführen, wobei die Auswertung visuell erfolgt.

Abb. 1:
Prinzip eines kompetitiven ELISA Tests zum Nachweis von Mykotoxinen (Fa. Neogen)



Probenvorbereitung und Extraktion

Die benötigte Probe sollte soweit wie möglich die Zusammensetzung der Charge, aus der sie gezogen wurde, widerspiegeln. Eine repräsentative Probe wird zunächst mittels Kaffee- oder Getreidemühle zerkleinert und gut durchmischt. Bis zu 75% des Materials sollten ein Sieb mit einer Maschengröße von „20 mesh“ (< 500µm) passieren können.

Als Extraktionsmittel werden entweder Wasser oder Methanol, je nach Mykotoxin, verwendet.

Die Probe ist nach einer Abtrennung der Feststoffe fertig für die Mykotoxinuntersuchung.

Einsatzgebiete und Vorteile der Schnelltests

Das Problem vor dem viele Lebensmittel- und Futtermittelhersteller stehen ist, dass seitens des Betriebs aus Kostengründen nur sehr geringe Ansprüche an die Laborausstattung gestellt werden können. Als Standardnachweisverfahren kommen in den meisten Labors die HPLC oder die Gaschromatographie zur Anwendung. Diese Methoden erfordern jedoch einen hohen Investitions- und großen Zeitbedarf für die einzelnen Messungen und stellen hohe Anforderungen an die Ausbildung des Personals. Mit den Schnelltests kann die Mykotoxinuntersuchung ohne einen großen Geräte- und Schulungsaufwand sogar direkt am Ort der Probennahme durchgeführt werden. Die Entscheidung über eine Annahme, Freigabe oder im Extremfall Produktsperrung kann sofort vorgenommen werden. Dies hat eine Optimierung der Lagerhaltung zur Folge, zudem kann das Rückrufrisiko erheblich reduziert werden.

Weiteres können die Schnelltests in Betrieben die über Geräte wie HPLC und GC zur Untersuchung von Mykotoxinen verfügen für ein rasches und günstiges Screening der Proben eingesetzt werden. ELISA und Streifentests können somit als praxistaugliche Schnelltests der Orientierung dienen, um „saubere“ von „verdächtigen“ Proben zu trennen und ein höchstmögliches Maß an Produktsicherheit zu gewähren.

Vergleich von GC bzw. HPLC und ELISA Untersuchungen

Bei einer internen Studie der Firma NEOGEN konnte bei der Auswertung von Vergleichsstudien für GC und ELISA bei den verschiedenen Getreidearten auf ihren Mykotoxingehalt eine Korrelation > 98% gefunden werden.

Eine weitere Vergleichsstudie, die von *Agrotest Fyto* und der *Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno* durchgeführt wurde, ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,95 für Fumonisine in Mais beim Vergleich von HPLC und ELISA.

Eine Studie des *Instituts für Getreideverarbeitung GMBH Nuthetal* zeigt ebenso bei den Untersuchungen von DON mit HPLC und ELISA einen Korrelationskoeffizienten von 0,984. Damit lässt sich die Zuverlässigkeit der ELISA-Tests belegen.

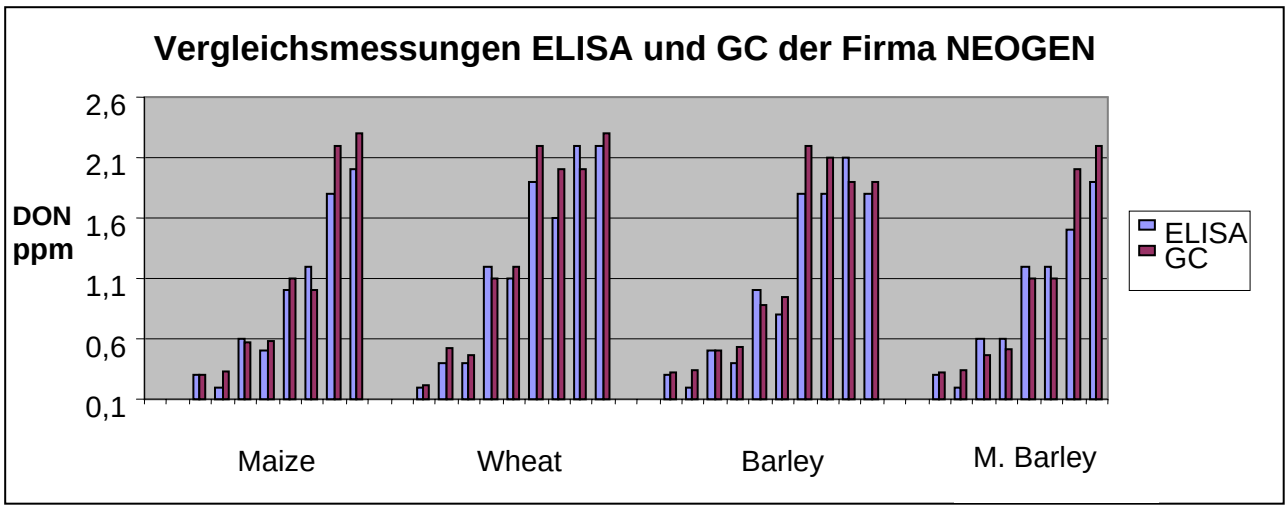


Abb. 2: Vergleichsmessungen von GC und ELISA bei Mais, Weizen und Gerste der Firma Neogen

Literatur:

(1) Polisenska I., Vlastimil D., Jezkova A.; „Fumonisins in maize and their determination by the ELISA and HPLC methods" Agro Test Fyto, Ltd., Kromeriz,; Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Czech Republic

(2) Springer M., Meister U.; „Assessment of rapid methods for mycotoxins"; IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH Nuthetal, Germany.

(3) Steinmüller R.; „Mykotoxin-Schnellanalytik – die schnelle Alternative zur klassischen Analyse", Deutschland

Autoren:

Dipl. Ing. GARSLEITNER Roman, Noack & CO Aktiengesellschaft, Auhofstraße 190, 1130 Wien, rgarsleitner@noackgroup.com;

Mag. MAYER Martin, Noack & CO Aktiengesellschaft, Auhofstraße 190, 1130 Wien, mmayer@noackgroup.com;

Stabilität von Mutterkornalkaloiden in verschiedenen Lösungsmitteln

Stability of Ergot Alkaloid Toxins in Various Solvents

M. HAFNER, M. SULYOK, R. SCHUHMACHER, C. CREWS & R. KRSKA

Abstract

In this study the stability and degree of epimerisation of the six ergot alkaloids mentioned in the recent EFSA report (ergometrine, ergosine, ergotamine, ergocornine, α-ergocryptine und ergocristine and their epimers) has been studied thoroughly for the first time. The toxins were monitored for six weeks in seven solvents at three different temperature levels. The stability of the ergot alkaloids was also tested during an 18-hour HPLC sequence and in different cereal extracts for up to six days.

For long-term storage at room temperature, only chloroform is recommendable; storage in acetonitrile should be performed at -20°C. The ergot alkaloids tested were stable in acetonitrile/alkaline buffer mixture during an 18 hour HPLC sequence. Storage of cereal extracts at 20°C led to a shift of the epimer ratio towards the biologically inactive S-isomers (–inine-forms).

Keywords

Ergot alkaloids, Mycotoxins, Storage, HPLC, Mass spectrometry

Zusammenfassung

Die in diesem Artikel beschriebene Studie testete die Stabilität der im EFSA-Report als bedeutend eingestuften Mutterkorntoxine Ergometrin, Ergosin, Ergotamin, Ergocornin, α-Ergocryptin und Ergocristin bzw. den entsprechenden C-8 Epimeren, welche durch Umlagerungen entstehen können. Die Lagerung erfolgte bis zu sechs Wochen in sieben verschiedenen Lösungsmitteln bei drei Temperaturen. Desweiteren wurde das Verhalten der Toxine während einer 18-stündigen HPLC Sequenz ebenso bestimmt wie ihre Stabilität in vier Getreideextrakten.

Es zeigte sich, dass die einfachen Lysergsäurederivate generell stabiler sind als die größeren Peptidergotalkaloide. Für längere Lagerung von Standards bei allen Temperaturen eignet sich Chloroform, während in Acetonitril nur bei -20°C kein Abbau bzw. keine Umlagerungen erfolgt. Die getesteten Toxine blieben während einer 18-stündigen HPLC Sequenz stabil, eine Lagerung von Getreideextrakten bei 20°C führte jedoch zu Veränderungen im Epimerverhältnis zugunsten der biologisch inaktiven -inin-Form.

Schlüsselworte:

Mutterkorn, Mykotoxine, Lagerung, HPLC, Massenspektrometrie

Einleitung

Mutterkornalkaloide sind Pilzgifte, welche in Mitteleuropa vor allem von Pilzen der Gattung *Claviceps* gebildet werden. Der am häufigsten anzutreffende Produzent ist *C. purpurea*. Diese Pilze befallen die Blüten der Getreidepflanzen und bilden anstelle des Getreidekornes einen Überwinterungskörper, auch bekannt als Sklerotium. Dieser kann mitgeerntet werden und dadurch, sofern er nicht vor der Weiterverarbeitung des Getreides entfernt wird, in die Nahrungskette gelangen (1).

Die am häufigsten anzutreffenden Toxine sind laut EFSA Ergometrin, Ergotamin, Ergosin, Ergocristine, α-Ergocryptin and Ergocornin (2). Diese Toxine haben gemeinsam, dass sie am C-8-Atom epimerisieren und deshalb in zwei isomeren Formen vorkommen können. Nur eine davon ist biologisch aktiv (R-form mit Suffix –in), die durch eine Umlagerung entstehende Epimerform (S-Form, Suffix -inin) ist biologisch inaktiv. Weil sich diese beiden Formen abhängig von den Lagerungsbedingungen ineinander umwandeln können, ist eine Untersuchung der Stabilität dieser Toxine erforderlich um verlässliche Analysen zu gewährleisten.

Material und Methoden

Alle verwendeten Mutterkornalkaloide (Ergometrin, Ergocornin, Ergocristin, α-Ergocryptin, Ergosin, Ergotamin und die jeweilige –*inin*-Epimerform) stammten von Prof. Miroslav Flieger (Czech Academy of Sciences; Prag, Tschechische Republik).

Acetronitril	-	100%
Chloroform	-	100%
Methanol/Dichlormethan	-	50+50 (v+v)
Stabilisierungslösung	Ethylenglykol, 1,2-Propandiol, Weinsäure, Ethanol, Wasser (bidest.)	100g + 100g + 1g; 750 mL + 250 mL
Extraktionsmix	Ammoniak (25%, aq.), Methanol, Ethylacetat, Dichlormethan	1 + 5 + 25 + 50 (v+v)
Methanol/Phosphorsäure	0,25% Phosphorsäure	40 + 60 (v+v)
Acetronitril/Puffer	Puffer: 200 mg Ammoniumacetat pro Liter bidest. Wasser; pH 9	80 + 20 (v+v)

Tabelle 1: getestete Lösungs- und Extraktionsmittel.

Die Stabilität dieser Toxine wurde in sieben Lösungs- oder Extraktionsmitteln getestet (Tabelle 1). Die gesamte Lagerungsdauer betrug sechs Wochen, wobei nach einer und nach drei Wochen Aliquote entnommen und bis zur Messung bei -80°C gelagert wurden. Alle Messungen eines Lösungsmittels erfolgten innerhalb des gleichen HPLC-Meßzyklus.

Stabilität während einer 18-stündigen HPLC Sequenz

Fünf Lösungsmittelmischungen wurden getestet: reines Acetonitril, Acetonitril/ Ammoniumkarbonatpuffer (80+20 und 84+16, v+v), Acetonitril/Ammoniumhydrogenkarbonatpuffer (84+16 v+v; 200 mg/L) and Acetonitril/Ammoniumacetatpuffer (10+20 v+v; 10mM). Jede Lösung enthielt 20 ng/mL der -in-Form der Toxine. 12 Aliquote jeder Lösung wurden innerhalb von 18 Stunden vermessen.

Stabilität in Getreideextrakten

Unkontaminerter Roggen, Weizen sowie Gerste und Hafer wurden mit Aceto-nitril/Ammoniumkarbonatpuffer (84+16, v+v) extrahiert und je 10 ng/mL der sechs Toxine und ihrer Epimere zum Extrakt zugegeben. Aliquote des Extraktes wurden sofort, nach einem, drei und nach sechs Tagen entnommen und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

HPLC-Methode

Die verwendete Methode basierte auf der im Jahr 2006 vorgestellten Methode (3) mit folgenden Modifikationen: keine Detektion von (Dihydro-)Lysergsäure und ein Gradient von 30% Ammoniumkarbonatpuffer auf 80%,

Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden nur die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt; eine ausführlichere Darstellung wurde in der ersten Ausgabe des World Mycotoxin Journal veröffentlicht (4).

Die beiden Untergruppen (einfache Lysergsäurederivate und Peptidalkaloide) weisen eine stark unterschiedliche Stabilität auf; erstere erwiesen sich als stabiler bei allen getesteten Bedingungen.

Für die Lagerung bei +20°C kommt nur Chloroform in Frage, in diesem Lösungsmittel gab es keinerlei Abbau oder Umlagerung. In Acetonitril sind die Toxine nur bei -20°C als Lagertemperatur stabil, bereits bei +4°C machte sich nach sechs Wochen bei den Peptidergotalkaloiden eine deutliche Abnahme der Epimersumme (und damit ein Abbau oder Epimerisierung in der Peptiddomäne) bemerkbar. Dies gilt auch für das Acetonitril/Ammoniumkarbonatpuffergemisch. Die stärkste Epimerisierung (43% Ergosinin zu 57% Ergosin nach sechs Wochen bei +20°C bei 100% Ergosin zu Beginn der Lagerung) wurde nach Lagerung in Methanol/Dichloromethan gemessen.

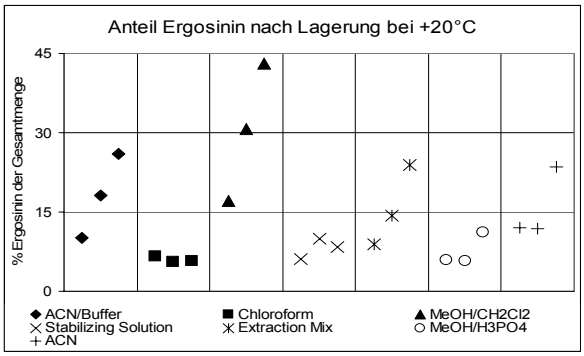


Bild 1: Prozentanteil des gebildeten Ergosinin nach Lagerung eines Ergosin-Standards in verschiedenen Lösungsmitteln. Der erste Daten-punkte jeder Lösungsmittelspalte entsprechen dem Ergosininanteil nach einer Woche, der zweite nach drei und der dritte nach sechs Wochen bei +20°C.

Während einer 18-stündigen HPLC-Sequenz konnte für die Ergopeptide ein leichter Anstieg der -inine festgestellt werden (so erhöhte sich z.B. der Ergosinin-Anteil von 4% auf 6% der Summe beider Epimere in reinem Acetonitril). Für das Gemisch Acetonitril/Ammoniumkarbonatpuffer (90+10, v+v) war der Anstieg geringer, könnte sich aber bei längeren Messungen auswirken.
Der Effekt einer Lagerung von Getreideextrakten ist abhängig vom Getreide und der Lagerungszeit. Während für Roggen am Beispiel Ergocorninin/Ergocornin nach einem Tag bei 20°C noch keine Veränderung des zudotierten Verhältnisses von 50:50 sichtbar war, wurde in Hafer bereits ein Verhältnis von 70:30 erreicht. Bei längerer Lagerung reduzierte sich auch im Roggenextrakt die Menge Ergocornin zugunsten von Ergocorninin, eine schnelle Analyse oder andere Lagerung des Extraktes ist also empfehlenswert.

Danksagung

Die Autoren danken der Christian-Doppler Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

1 Schoch U. und C. Schlatter Gesundheitsrisiken *durch Mutterkorn in Getreide*. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (1985) 76: 631-644.

2 EFSA (European Food Safety Authority) *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*. (2005) EFSA Journal 225: 1-27.

3 Hafner M., M. Sulyok, R. Schuhmacher und R. Krska: *Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur quantitativen Analyse von Ergotalkaloiden*. ALVA-Mitteilungen (2007)5: 116-119

4 Hafner M., M. Sulyok, R. Schuhmacher, C. Crews & R. Krska: *Stability and epimerisation behaviour of ergot alkaloids in various solvents*. World Mycotoxin Journal (2008)1: in press

Autoren

C. CREWS: Central Science Laboratory (CSL), Department for Environment, Food and Rural Affairs, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, United Kingdom

M. HAFNER, M. SULYOK, R. SCHUHMACHER und R. KRSKA, Christian-Doppler-Labor für Mykotoxinforschung, Analytikzentrum, Department for Agrobiotechnologie (IFA-Tulln), Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln, Austria

AUTORENVERZEICHNIS

ABOLMAALI, S. 41

ADAM, G. 31, 36, 41

APPELT, M. 27

BERTHILLER, F. 31, 36

BRODACZ, W. 65

BRUNNER, K. 31, 57

BUSCHHAUS, H. 61

BÜTTNER, C. 14

CREWS, C. 73

CZIFERSZKY, A: 31

DELLA ROSA, A. 65

DERSCH, G. 50

DREXLER, J. 31

EISOLD, A.-M. 14

ELLERSDORFER, G. 41

ELLNER, F. M. 27, 61

ERHART, C. 31

FELDER, H. 50

GOßMANN, M. 14

GROH, S. 6

GUELDENER, U. 31

HAFNER, M. 73

HUMPF, H.-U. 14

KRSKA, R. 31, 36, 73

LEMMENS, M. 31, 41

LUCYSHYN, D. 41

MACH R. L. 57

MARTINEZ, O. 14

MAYER M. 69

MITTERBAUER, R. 31, 41

MOLL, D. 41

NIELSEN, K. F. 36

OBERFORSTER, M. 45

ÖHLINGER, R. 19, 50

PERUCI, M. 31, 36, 41

PLANK, M. 50

RADITSCHNIG, A. 23

SCHUHMACHER, R. 31, 36, 73

SHAMS, M. 41

SPADIUT, O. 41

SULYOK, M. 73

VON BARGEN, S. 14

WEINDORFER, H. 41

WIEDNER, G. 9

WIESENBERGER, G. 31