

***Fusarium* mycotoxins and methods of assessing the mycotoxicity: a review.**

Mikotoksyny fuzaryjne oraz sposoby ustalania mikotoksynotwórczości: przegląd.

KOLENDA Magdalena* and MROCZKOWSKI Sławomir

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, Bydgoszcz: *correspondence: kolenda@utp.edu.pl

Abstract

Fungi of the genus *Fusarium*, which may infect many species of plants, as well as reduce the quantity of yield and deteriorate the grain and forage quality, are a threat because of the possibility of mycotoxin contamination of the forage. The ability to produce mycotoxin is commonly found in many types of fungi. The European Commission has introduced a standardized content of these toxins in various products. Therefore, there is a need to determine mycotoxicity and mycotoxin content in various products, including the forage. Aim of this paper is to gather information about mycotoxins produced by fungi of the genus *Fusarium* and ways of detecting them.

Keywords: chromatography, *Fusarium*, mycotoxin, SCAR-PCR

Streszczenie

Grzyby z rodzaju *Fusarium*, porażające wiele gatunków roślin uprawnych oraz płody rolne, obniżają ilości plonu i pogarszają jego jakość, w konsekwencji pogarszając jakość pasz. Grzyby te stanowią zagrożenie również ze względu na możliwość zanieczyszczania produktów spożywczych mikotoksynami. Zdolność do ich tworzenia jest powszechnie spotykana u wielu rodzajów grzybów mikroskopowych. Komisja Europejska wprowadziła ujednolicone zawartości tych toksyn w różnych produktach, w związku z czym istnieje potrzeba ustalania mikotoksynotwórczości poszczególnych patogenów oraz zawartości mikotoksyn w różnych produktach, w tym w paszy podawanej zwierzętom. Celem niniejszej pracy jest zebranie informacji o mikotoksynach produkowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz sposobów ich wykrywania.

Słowa kluczowe: chromatografia, *Fusarium*, mikotoksyny, SCAR -PCR

Detailed abstract

Fungi of the genus *Fusarium* can be found in all climatic zones. It was found that the most common species that occur in Poland are *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*, which may cause deterioration in the quantity and quality of yield. Fungi of the genus *Fusarium*, are characterized by the ability of mycotoxins production. Due to its mycotoxicity these fungi are a serious threat to animal feeds and the forage quality as well as the health of both humans and animals.

Mycotoxins are secondary metabolites produced during the metabolism of various microscopic fungi. They are capable of inducing toxic effects on animals, including human. The main mycotoxins produced by fungi of genus *Fusarium* are trichothecenes, zearalenone and fumonisins.

Trichothecenes are a large group of mycotoxins, which are divided into four groups: from A to E, in which the first two groups are the greatest threat. Group A contains T-2 toxin, which is considered to be the most toxic substance produced by fungi of the genus *Fusarium*. This mycotoxin may causes damage to bone marrow, and consequently, may cause reduction in white blood cells. Moreover, consumption of the contaminated grain and forage may lead to death due to the alimentary toxic aleukia (ATA). However, mycotoxins from group B, which include deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV), are detected more often than other mycotoxins. These toxins cause many disturbances in the organisms of animals and may even lead to death. General signs of toxicosis include vomiting, nausea, diarrhoea and food refusal which may lead to death. DON may cause chromosome aberrations in mammalian cells and cell transformation, while NIV may inhibit DNA synthesis and cause apoptosis. Next type of *Fusarium* mycotoxins are fumonisins which are found mainly in the corn and derived products. Horses are especially sensitive to fumonisin. These mycotoxins causes a disease called leukoencephalomalacia, which attacks the nervous system. The last type of fusarial toxin is zearalenone, which has hormonal, estrogenic activity. Therefore, in animals, it causes structural changes in the reproductive system

European Commission has introduced a uniform standard of mycotoxins content in food and feed. Therefore, man makes attempts to determine the content of mycotoxins in food and forage, using different techniques for determining both the potential and actual mycotoxicity of fungi that infect food and forage.

In phytopathological studies particularly SCAR-PCR (Sequence Characterized Amplified Region PCR) is widely used. Using appropriate primers, it is possible to determine the potential mycotoxicity by verifying whether the pathogen has genes responsible for the mycotoxins production. To identify genes, specific SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) primers are used. Usually primers that amplify sequences of the *Tri* gene cluster, including *Tri5*, *Tri7* or *Tri13*, are used.

By using chromatographic techniques it is possible to determine whether a given sample contains mycotoxins and to conduct quantitative analysis, mainly, using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Thin Layer Chromatography (TLC) and Gas Chromatography (GC).

HPLC allows to determine a large number of mycotoxins present in the sample. By using HPLC method it is possible to detect zearalenone, fumonisins and trichothecenes, such as DON and NIV. By using the TLC method simultaneously five mycotoxins can be separated and determined. TLC its name owes to the stationary phase which is a thin layer, placed on a flat plate. The low analysis cost and

availability caused that this method has become widely used in quality analysis, both agricultural products and food. This method can be used to determine ochratoxin A, zearalenone, T-2 toxin, NIV, and DON. Mobile phase in a Gas Chromatography is a gas, which moves inside the column with the stationary phase. Gas chromatography is used to identify a number of mycotoxins, such as zearalenone and trichothecenes including deoxynivalenol and nivalenol.

Wprowadzenie

W przyrodzie występuje wiele gatunków grzybów mikroskopowych. Grzyby należące do rodzaju *Fusarium* znaleźć można we wszystkich strefach klimatycznych (Kwaśna et al., 1991), w tym w klimacie umiarkowanym. Uznaje się je za sprawców wielu chorób roślin uprawnych, w tym fuzariozy kłosów. Porażać mogą każdą część rośliny, również samo ziarno (Ivic et al., 2009). Na terenie Polski stwierdzono, że najczęściej występują dwa gatunki tego rodzaju: *Fusarium culmorum* i *Fusarium avenaceum* (Bottalico and Perrone, 2002), które mogą być przyczyną pogorszenia ilości oraz jakości plonu. Poważnym zagrożeniem jest możliwość zanieczyszczenia ziarna mikotoksynami, co w konsekwencji prowadzi do pogorszenia jakości paszy podawanej zwierzętom hodowlanym (Leslie and Summerell, 2006; Łukanowski and Lenc, 2009). Grzyby mikroskopowe, do jakich należą te z rodzaju *Fusarium*, charakteryzują się zdolnością do tworzenia mikotoksyn (Chełkowski, 2004). Ze względu na swą patogeniczność i toksynotwórczość grzyby te stanowią poważne zagrożenie dla jakości plonów oraz zdrowia zarówno ludzi jak i zwierząt (Arseniuk and Góral, 2005; Łukanowski and Lenc, 2009). Z tego też powodu człowiek podejmuje starania mające na celu ustalenie mikotoksynotwórczości grzybów zakażających produkty spożywcze oraz paszę (Chandler et al., 2003; Hue et al., 1999; Jennings et al., 2004; Nicholson et al., 2004; Russell and Paterson, 2006).

Mikotoksyny fuzaryjne

Mikotoksyny są metabolitami wtórnymi wytwarzanymi podczas przemiany materii przez wiele grzybów mikroskopowych (Bennett and Klich, 2003). Wykazują one działanie toksyczne w stosunku do organizmów żywych.

Mikotoksyny produkowane przez grzyby, należące do rodzaju *Fusarium*, nazywa się mikotoksynami fuzaryjnymi. Podzielić je można na kilka grup, przede wszystkim znaczenie mają: trichoteceny A i B, fumonizyny oraz zearalenon wraz z pochodnymi. Wszystkie z nich charakteryzują się wysoką toksycznością w stosunku do mikroorganizmów, roślin, zwierząt oraz ludzi (Arseniuk and Góral, 2005). Zawartość mikotoksyn w ziarnie uznawana jest za wskaźnik jego jakości (Chełkowski, 2004). Wielu badaczy podejmuje starania mające na celu określenie progów toksyczności poszczególnych mikotoksyn oraz ich wpływu na różne organy zwierząt (Gutzwiller, 2010; Malekinejad et al., 2007).

Trichoteceny

Trichoteceny stanowią dużą grupę mikotoksyn, obejmującą ponad 150 pokrewnych związków. Produkowane są przez wiele rodzajów grzybów takich jak: *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Cylindracarpon* i *Stachybotrys* (Brown et al., 2004). Mikotoksyny te dzieli się na cztery grupy: od A do E, z których dwie pierwsze stanowią największe zagrożenie (Sudakin, 2003). Grupa A reprezentowana jest przez najbardziej toksyczne związki typu T-2. Najczęściej wykrywane są jednak mikotoksyny z grupy B, do których zalicza się deoksynivalenol i niwalenol (Liu et al., 1998).

Toksyna T-2

Toksyna ta należy do trichotecenów z grupy A. Najczęściej syntetyzowana jest przez takie gatunki *Fusarium* jak: *F. sporotrichoides*, *F. poae* (Arseniuk and Góral, 2005), oraz *Fusarium langsethiae* (Imathiu et al., 2008). Uznawana jest za najbardziej toksyczną toksynę produkowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Moss, 2002). Izoluje się ją z ziaren kukurydzy, pszenicy, owsa oraz jęczmienia (Creppy, 2002). Zatrucia mikotoksynami, zarówno u ludzi jak i u zwierząt objawiać się mogą nudnościami, wymiotami, ostrymi biegunkami. Możliwe jest również wystąpienie toksycznej aleukii żywieniowej (ATA) oraz uszkodzenia szpiku kostnego (Moss, 2002). W przypadku świń spożycie paszy zawierającej 2 – 3 mg T-2 na kilogram, może prowadzić do znacznej redukcji liczby czerwonych i białych krwinek oraz stężenia hemoglobiny, podczas gdy zawartość T-2 rzędu 0.5–1 mg*kg⁻¹, może powodować obniżenie liczby limfocytów T (Conkova et al., 2003). W skrajnych przypadkach zatrucie prowadzić może nawet do śmierci (Moss, 2002). Przykładem opisywanym w literaturze, może być epidemia toksycznej białaczki żywieniowej, która miała miejsce na Syberii podczas II Wojny Światowej. Spowodowała ona śmierć wielu tysięcy ludzi (Arseniuk and Góral, 2005).

Deoksyniwalenol (DON)

Z pośród trichotecenów z grupy B największe znaczenie ma deoksyniwalenol (DON), zwany również womitoksyną, ze względu na działanie wymiotne (Moss, 2002). Jest on najczęściej izolowaną mikotoksyną z ziarna zbóż (Arseniuk and Góral, 2005). Nielsen i in. (2009) donoszą, że w Unii Europejskiej, aż 57% żywności pochodzenia zbożowego zanieczyszczonych jest deoksyniwalenolem. Mikotoksyna ta produkowana jest przez patogeniczne szczepy *F. graminearum* i *F. culmorum* (Abramson et al., 2005; Chełkowski). Według Packa (2006) DON może być przyczyną występowania aberracji chromosomowych w komórkach ssaków oraz transformacji komórek, prowadzących do powstania zmian nowotworowych. U zwierząt głównymi objawami zatrucia tą mikotoksyną, po spożyciu zanieczyszczonej paszy, są wymioty, biegunki oraz zanik apetytu, który w skrajnych przypadkach doprowadzić może nawet do śmierci głodowej (Chełkowski, 1985). Do najbardziej wrażliwych na tę mikotoksynę gatunków zwierząt zalicza się świnię, gdyż już bardzo niskie dawki rzędu 50 µg*kg⁻¹ masy ciała mogą powodować u nich wymioty (Pestka, 2007).

Zalecenie Komisji Europejskiej z dnia 17 sierpnia 2006 roku ustanowiło, że dla materiałów paszowych pochodzenia zbożowego maksymalna zawartość deoksyniwalenolu wynosi 8 mg*kg⁻¹, podczas gdy dla mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych wynosi 5 mg*kg⁻¹, z wyjątkiem pasz przeznaczonych dla świń, dla których próg jest znacznie niższy i wynosi 0.9 mg*kg⁻¹ oraz cieląt, jagniąt i koźląt, dla nich próg ustanowiono na wysokości 2 mg*kg⁻¹ (WE nr 576/2006, 2006).

Niwalenol (NIV)

Niwalenol (NIV) jest mikotoksyną wytwarzaną głównie przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, m.in. *F. crookwellence* i *F. poae*, a w mniejszym stopniu również i *F. culmorum* oraz *F. graminearum* (ECH, 2000). Obecność NIV stwierdzono w ziarnach różnych zbóż, w paszach dla zwierząt oraz żywności pochodzenia roślinnego (Pronk et al., 2002). Mikotoksykozy powodowane przez niwalenol objawiają się przede wszystkim brakiem łaknienia i pobierania paszy. Utrzymanie się przez dłuższy czas takiego stanu może skutkować spadkiem masy ciała zwierzęcia oraz pojawieniem się

anemii i krwawej biegunki. W skrajnych przypadkach może nawet prowadzić do śmierci (Kluczek and Kojder, 2000). Na poziomie komórkowym, mikotoksyna ta może hamować syntezę DNA oraz powodować apoptozę (Pasquali et al., 2010).

Fumonizyny

Za głównego producenta fumonizyn uważa się *Fusarium moniliforme* (Peraica et al., 1999). Zagrożenie wystąpienia tych mikotoksyn dotyczy zwłaszcza ziarna kukurydzy i produktów pochodnych (Chełkowski, http). Fumonizyny podzielono na trzy typy: B₁, B₂ oraz B₃ (Stępień et al., 2007), przy czym to fumonizyna B₁ ma największe znaczenie (Bennett and Klich, 2003). Mogą one być wytwarzane przed żniwami, jak i podczas wczesnego etapu suszenia ziarna (Czerwiecki, 2007). Jak wszystkie mikotoksyny wykazują one działanie toksyczne w stosunku do wielu gatunków zwierząt oraz dla człowieka (Kluczek and Kojder, 2000). Konie wykazują szczególną wrażliwość na fumonizynę. Mikotoksyna ta powoduje u nich chorobę zwaną leukoencefalomalacją, obejmującą układ nerwowy. Objawami mogą być między innymi anoreksja, niezdolność ruchowa, zaburzenia świadomości oraz konwulsje. W wyniku zatrucia uszkodzone zostać mogą również nerki i wątroba. U człowieka zaś mogą powodować one nowotwory wątroby i przełyku (Voss et al., 2007).

Dopuszczalna zawartość fumonizyn w paszach zawierających kukurydzę nie może przekraczać 60 mg*kg⁻¹, a w mieszankach paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych przeznaczonych dla świń i koni oraz zwierząt domowych maksymalna zawartość jest znacznie niższa i wynosi 5 mg*kg⁻¹ (WE nr 576/2006, 2006).

Zearalenon

Do głównych producentów zearalenonu (ZEA) zalicza się *Fusarium graminearum* i *F. culmorum* (Lysøe et al., 2006) oraz *F. crookwellense* (Vesonder et al., 1991). Mikotoksyna ta wykazuje aktywność hormonalną – estrogeną. U zwierząt powoduje zmiany strukturalne w układzie rozrodczym (Chełkowski, 2004). Gutzwiller i Gafner (2009) stwierdzili że dieta zawierająca 0.05–0.06 mg*kg⁻¹ zearalenonu może u loch powodować wzrost ilości pęcherzyków Graafa oraz zmniejszać stężenie hormonu gonadotropiny FSH. Jednak niniejsza zawartość ZEA w paszy jest dostatecznie niska by nie powodować negatywnych efektów w odniesieniu do rozmnażania. Badane przez Gitzwillera i Gafnera zawartości były niższe niż maksymalne dopuszczalne zawartości podane przez Komisję Europejską (Gutzwiller and Gafner, 2009). Zalecenie wydane przez tą Komisję stwierdza, że w przypadku zearalenonu progi maksymalnej zawartości dla produktów zbożowych wynoszą 2 mg*kg⁻¹, a dla produktów ubocznych kukurydzy 3 mg*kg⁻¹ (WE nr 576/2006, 2006).

Sposoby ustalania mikotoksynotwórczości grzybów

Grzyby mikroskopowe, zwłaszcza ze względu na swoją zdolność do produkcji mikotoksyn, stanowią poważne zagrożenie dla ludzi i zwierząt (Arseniuk and Góral, 2005). Komisja Wspólnoty Europejskiej uznając powagę problemu, wprowadziła ujednoczone normy zawartości tych toksyn w produktach spożywczych (WE nr 1126/2007, 2007) oraz paszowych, (WE, 2006). Dlatego też podejmuje się starania mające na celu określenie zawartości mikotoksyn w żywności i paszach, stosując różne techniki oznaczania zarówno potencjalnej, jak i faktycznej mikotoksynotwórczości grzybów infekujących żywność oraz paszę (Chandler et al., 2003; Hue et al., 1999; Jennings et al., 2004; 0; Russell and Paterson, 2006).

Oznaczanie potencjalnej mikotoksynotwórczości

W badaniach biologicznych ogromne znaczenie miało odkrycie termostabilnej Taq DNA polimerazy z *Thermus aquaticus* oraz sposobów syntezy oligonukleotydów, przyczyniając się do szerszego i skuteczniejszego wykorzystania technik opartych na reakcji PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) (Ma and Michailides, 2006). Dzięki tej technice możliwe jest wykrycie cząsteczki DNA patogena w badanym materiale (Jurado et al., 2005). W przypadku badań fitopatologicznych zwłaszcza metoda SCAR-PCR (Sequence Characterized Amplified Region PCR) znajduje szerokie zastosowanie. Pozwala ona nie tylko na potwierdzenie przynależności gatunkowej różnych patogenów (Bakan et al., 2002; Hue et al., 1999; Łukanowski et al., 2009; Nicholson et al., 1998), lecz dzięki zastosowaniu odpowiednich starterów, umożliwia ustalenie czy dany patogen posiada geny odpowiedzialne za produkcję mikotoksyn, tym samym ustalając potencjalną mikotoksynotwórczość badanego grzyba (Russell and Paterson, 2006). Do identyfikacji stosuje się specyficzne dla danego gatunku lub genu startery SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), otrzymując polimorficzne fragmenty DNA (Irzykowska, 2006; Russell and Paterson, 2006). Metoda ta nie pozwala na wykrycie samych mikotoksyn, jedynie genów odpowiedzialnych za ich produkcję. Dzięki wykorzystaniu starterów zaprojektowanych na podstawie fragmentów genów, możliwe jest ustalenie czy dany patogen posiada geny odpowiedzialne za formowanie mikotoksyn takich jak np. trichoteceny (Chandler et al., 2003; Jennings et al., 2004; Nicholson et al., 2004). W badaniach takich wykorzystuje się startery kopiujące sekwencje genów z klasteru *Tri*, w tym *Tri5*, *Tri7* czy *Tri13* (Łukanowski et al., 2009).

Oznaczanie faktycznej mikotoksynotwórczości

Dzięki zastosowaniu technik chromatograficznych możliwe jest ustalenie czy w danej próbce znajdują się mikotoksyny. W przeciwieństwie do metody PCR, pozwalają one na ustalenie faktycznej mikotoksynotwórczości patogenów, przeprowadzając analizę jakościową i ilościową (Braicu et al., 2008; Russell and Paterson, 2006; Varelis et al., 2006). Zastosowanie znajduje przede wszystkim Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) (Pronk et al., 2002; Shephard, 1998; Turner et al., 2009), cienkowarstwowa (TLC) (Lin et al., 1998) oraz gazowa (GC) (Kinani et al., 2008; Schothorst et al., 2005; Tanaka et al., 2000).

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) zalicza się do metod fizykochemicznych. Opiera się na różnym rozdzieleniu poszczególnych składników mieszanin jednorodnych, na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy związkami chemicznymi a wypełnieniem. Ciśnienie, jakie potrzebne jest do przetłoczenia fazy ruchomej, wynosi 50-100 MPa (Witkiewicz, 2000). Wysokosprawna chromatografia cieczowa jest szeroko stosowana w analityce, do detekcji mikotoksyn (Pronk et al., 2002). Metoda ta umożliwia oznaczenie dużej ilości mikotoksyn znajdujących się w próbce (Berthiller et al., 2007). Dzięki HPLC możliwe jest wykrycie ZEA (Oveisi et al., 2005), trichotecenów, takich jak DON, NIV (Turner et al., 2009) oraz fumonizyn (Wang et al., 2008).

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC, Thin-Layer Chromatography) jest techniką analityczną, służącą do identyfikacji i rozdzielenia mieszanin związków

chemicznych (Fried et al., 1999). Dzięki tej metodzie można rozdzielić i oznaczyć jednocześnie pięć mikotoksyn. Niski koszt analizy oraz dostępność sprawiły, iż metoda ta stała się powszechnie wykorzystywana w badaniach jakości (Braicu et al., 2008), zarówno żywności, jak i roślin oraz produktów rolniczych. Podczas badania rozdziela się najpierw badaną mieszaninę, a następnie przeprowadza się detekcję poszczególnych składników. Fazą rozdzielającą jest faza stacjonarna, o właściwościach sorpcyjnych (Sherma, 2000). Jest ona cienką warstwą, umieszczoną na płaskiej płytce (Lin et al., 1998). Badane substancje nanosi się punktowo na płytkę, którą umieszcza się w komorze chromatograficznej tak by zanurzyła się w fazie ruchomej (Sherma, 2000). Identyfikację rozdzielonych substancji przeprowadza się na podstawie chromatografów (Witkiewicz and Hetpera, 2004). Stosuje się ją do detekcji takich toksyn jak: ochratoksyna A, zearalenon (Lin et al., 1998), (Broggi et al., 2007), toksyna T-2, niwalenol (Scott et al., 1970), czy deoksyniwalenol (Lin et al., 1998; Tanaka et al., 2000).

Chromatografia gazowa (GC)

Fazą ruchomą w chromatografii gazowej (GC, Gas Chromatography) jest gas, który porusza się wewnątrz kolumny z fazą stacjonarną, osadzoną na jej wewnętrznych ściankach (Witkiewicz and Hetpera, 2004). Substancje analizowane tą metodą muszą, w warunkach panujących podczas analizy, mieć postać gazową. Substancje rozdzielone wykrywane są przez detektor podczas opuszczania kolumny, a następnie sygnały z detektora rejestrowane są w postaci chromatografów. Analiza jakościowa odbywa się dzięki identyfikacji piku poszczególnych składników badanej próby, porównywanym z czasem retencji piku wzorca (Witkiewicz, 2000). Chromatografię gazową wykorzystuje się do identyfikacji szeregu mikotoksyn, w tym trichotecenów (Schothorst et al., 2005) deoksyniwalenolu i niwalenolu (Tanaka et al., 2000) oraz zearalenonu (Kinani et al., 2008).

Podsumowanie

Grzyby patogeniczne stanowią poważne zagrożenie dla ilości i jakości plonu, dla zdrowia a nawet życia ludzi i zwierząt. Grzyby z rodzaju *Fusarium* porażając rośliny i powodując choroby, pogarszają ich wzrost oraz stan ogólny, a wytwarzając mikotoksyny zanieczyszczają końcowy produkt, w tym paszę podawaną zwierzętom hodowlanym a także pogarszają rentowność produkcji i stan zdrowia zwierząt. Najczęściej spotykanymi mikotoksynami są zearalenon oraz trichoteceny, w tym deoksyniwalenol. Związki te powodują zaburzenia zdrowotne u zwierząt i ludzi. Spożycie zakażonej nimi żywności może być przyczyną powstania poważnych chorób, a nawet śmierci.

Ze względu na zagrożenie jakie stanowią mikotoksyny znajdujące się w produktach spożywczych, bądź w paszy, Komisja Europejska ustaliła ujednolicone normy zawartości tych toksyn. Z tego też powodu poszukuje się coraz lepszych sposobów zarówno identyfikacji jak i ilościowego oznaczania mikotoksyn. W tym celu ustala się mikotoksynotwórczość grzybów znajdujących się w danej próbce za pomocą techniki PCR, weryfikując obecność genów odpowiedzialnych za zdolność do syntezy tych toksyn, bądź ustalając faktyczną mikotoksynotwórczość, badając zawartość mikotoksyn w próbce, stosując w tym celu techniki chromatograficzne, w tym HPLC, TLC bądź GC.

Piśmiennictwo

- Abramson, D., House, J.D., Nyachoti, C.M., (2005) Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat. *Mycopathologia*, 160: 297–301.
- Arseniuk, E., Góral, T., (2005) Mikotoksyny fuzaryjne w ziarnie zbóż i kukurydzy. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 3: 27–33.
- Bakan, B., Giraud-Delville, C., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E., Brygoo, Y., (2002) Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Applied and environmental microbiology*, 68: 5472–5479.
- Bennett, J.W., Klich, M., (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 36: 497–516.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., (2007) Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 33–37.
- Bottalico, A., Perrone, G., (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 611–624.
- Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., Socaciu, C., (2008) Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin a in different cereals cultivated in romania using thin-layer chromatography-densitometry. *Journal of Food Quality*, 31: 108–120.
- Broggi, L.E., Pacin, A.M., Gasparovic, A., Sacchi, C., Rothermel, A., Gallay, A., Resnik, S., (2007) Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Rios Province, Argentina. *Mycotoxin Research*, 23(2): 59-64.
- Brown, D.W., Dyer, R.B., McCormick, S.P., Kendra, D.F., Plattner, R.D., (2004) Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 454–462.
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P., (2003) Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 355–367.
- Chełkowski, J. [http.: Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy.](http://www.cropnet.pl/mycotoxin)
- Chełkowski, J., (1985) Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy. Skrypt szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego Akademii Rolniczej, Warszawa: pp. 8–13, 20–46.
- Chełkowski, J., (2004) Znaczenie mikotoksyn w hodowli zbóż. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 3: 36–40.
- Conkova, E., Laciakova, A., Kovac, G., Seidel, H., (2003) Review. Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases. *The Veterinary Journal*, 165: 214–220.
- Creppy, E.E., (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19–28.

- Czerwiecki, L., (2007) Mikotoksyny w ziarnie zbóż i co dalej? Przegląd Zbożowo-Młynarski, 51(10): 25–27.
- ECH [http.](http://) (2000): European Commission Health & Consumer Protection Directorate. General Scientific Committee On Food. Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins part 4: nivalenol.
- Fried, B., Sherma J., (1999) Thin-layer Chromatography. Chromatographic science series, 89: 9–25.
- Gutzwiller, A., (2010) Effects of deoxynivalenol (DON) in the lactation diet on the feed intake and fertility of sows. Mycotoxin Research, 26:211–215.
- Gutzwiller, A., Gafner, J.L., (2009) Fertility of sows exposed to zearalenone and deoxynivalenol - a case report. Mycotoxin Research, 25:21–24.
- Hue, F.X., Huerre, M., Rouffault, M.A., Bievre De, C., (1999) Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. Journal of Clinical Microbiology, 37 (8): 2434–2438.
- Imathi, S.M., Ray, R.V., Back, M., Hare, M.C., Edwards, S.G., (2008) *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded *in vitro* detached leaf assays. European Journal of Plant Pathology, 124 (1): 117–126.
- Irzykowska, L., (2006) Markery molekularne w diagnostyce chorób podstawy źdźbła i korzeni zbóż. Postępy Nauk Rolniczych, 6: 31–40.
- Ivic, D., Domijan, A.M., Peraica, M., Milicevic, T., Cvjetkovic, B., (2009) *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju, 60: 435–442.
- Jennings, P., Coates, M.E., Turner, J.A., Chandler, E.A., Nicholson, P., (2004) Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. Plant Pathology, 53: 182–190.
- Jurado, M., Vazquez, C., Patino, B., Gonzalez-Jaen, T.M., (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. Systematic and Applied Microbiology, 28: 562–568.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., (2008) Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples. Journal of Chromatography A, 1190: 307–315.
- Kluczek, J.P., Kojder, A., (2000) Mikotoksyny w zarysie. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej, Bydgoszcz, pp. 120–151.
- Kwaśna, H., Chełkowski, J., Zajkowski, P., (1991) Grzyby. Tom XXII Grzyb niedoskonałe (Deuteromycetes). Polska Akademia Nauk. Instytut Botaniki, Warszawa-Kraków, pp. 7– 22, 82–83.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, pp. 81–159.

- Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J., (1998) Review Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815: 3–20.
- Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J., (1998) Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815: 3–20.
- Liu, W., Sundheim, L., Langseth, W., (1998) Trichothecene production and the relationship to vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. *Mycopathologia*, 140: 105–114.
- Łukanowski, A., Baturo, A., Sadowski, Cz., (2009) Use of molecular techniques in mycological research. In: *Understanding the Requirements for Development of Agricultural Production and of Rural Areas in the Kuyavian-Pomeranian Province as a Result of Scientific Research*. Edited by E. Śliwińska and E. Szychaj-Fabisiak, University of Technology and Life Sciences Press, Bydgoszcz, ISBN: 978-83-61314-29-5: 57–68.
- Łukanowski, A., Lenc, L., (2009) Inokulacja kłosów pszenicy zawiesiną zarodników *Fusarium culmorum* i *Fusarium langsethiae*, objawy fuzariozy kłosów oraz analiza mykologiczna zebranego ziarna. *Progress in Plant Protection*, 49 (2): 671–674.
- Lysøe, E., Klemsdal, S.S., Bone, K.R., Frandsen, R.J.N., Johansen, T., Thrane, U., Giese, H., (2006) The PKS4 Gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3924–3932.
- Ma, Z., Michailides, T.J., (2006) Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 26: 145–161.
- Malekinejad, H., Schoevers, E.J, Daemen, I.J.J.M., Zijlstra, C., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J., Roelen, B.A.J., (2007) Exposure of Oocytes to the *Fusarium* Toxins Zearalenone and Deoxynivalenol Causes Aneuploidy and Abnormal Embryo Development in Pigs. *Biology Of Reproduction*, 77: 840–847.
- Moss, M.O., (2002) Mycotoxin review – 2. *Fusarium*. *Mycologist*, 16 (4): 158–161.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D., Joyce, D., (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 17–37.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Wilson, A.H., Chandler, E., Thomsett, M., (2004) Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 503–514.
- Nielsen, C., Casteel, M., Didier, A., Dietrich, R., Martlbauer, E., (2009) Trichothecene – induced cytotoxicity on human cell lines. *Mycotoxins Research*, 25 (2): 77–84.
- Oveisi, M. R., Hajimahmoodi, M., Memarian, S., Sadeghi, N., Shoeibi, S., (2005) Determination of zearalenone in corn flour and a cheese snack product

- Kolenda and Mroczkowski: Fusarium Mycotoxins And Methods Of Assessing The Mycotoxicity: A Revi...
using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.
Food Additives and Contaminants, 22(5): 443–448.
- Packa, D., (2006) Genotoksyczność mikotoksyn fuzaryjnych. *Postępy Nauk Rolniczych*, 6: 51–74.
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., Bohn, T., (2010) Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 246–253.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M., (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9): 754–766.
- Pestka, J.J., (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 283–298.
- Pronk, M.E.J., Schothorst, R.C., Egmond, H.P., (2002) Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. RIVM Report 388802024/2002, <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/9184/1/388802024.pdf>
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1126/2007 z dnia 28 września 2007 r. (zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006) ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i produktach z kukurydzy. 2007. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*. 29.09.2007: L 255/14–17.
- Russell, R., Paterson, M., (2006) Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Review. Process Biochemistry*, 41: 1467–1474.
- Schothorst, R. C., Jekel, A. A., Van Egmond, H. P., De Mul, A., Boon, P. E., Van Klaveren, J. D., (2005) Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Food Additives and Contaminants*, 22(1): 48–55.
- Scott, P.M., Lawrence, J.W., Walbeek, W., (1970) Detection of mycotoxins by Thin-Layer Chromatography: Application to Screening of Fungal Extracts. *Applied Microbiology*, 20 (5): 839–841.
- Shephard, G.S., (1998) Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *Review. Journal of Chromatography A*, 815: 31–39.
- Sherma, J., (2000) Thin-Layer Chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of chromatography A*, 880: 129–147.
- Stępień, M., Sokół-Leszczyńska, B., Łuczak, M., (2007) Mikotoksyny, produkty spożywcze a zdrowie człowieka. *Postępy Mikrobiologii*, 46(2): 167–177.
- Sudakin, D.L., (2003) Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143: 97–107.
- Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., Ueno, Y., (2000) Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 882: 23–28.

- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Pilets, S.A., (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168–180.
- Varelis, P., Leong, S.-L.L., Hocking, A., Giannikopoulos, G., (2006) Quantitative analysis of ochratoxin A in wine and beer using solid phase extraction and high performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 23(12): 1308–1315.
- Vesonder, R.F., Goliński, P., Plattner, R., (1991) Mycotoxin formation by different geographic isolates of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia*, 113 (1): 11–14.
- Voss, K.A., Smith, G.W., Haschek, W.M., (2007) Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137 (3–4): 299–325.
- Wang, J., Zhou, Y., Wang, Q., (2008) Analysis of mycotoxin fumonisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Chemistry*, 107: 970–976.
- Witkiewicz, Z., Hetpera, J., (2004) *Słownik chromatografii i elektroforezy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: pp. 14-15.
- Witkiewicz, Z., (2000) *Podstawy chromatografii*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa: pp. 155–232.
- Zalecenie Komisji (WE) nr 576/2006 z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt. 2006. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*. 23.8.2006: L 229/7 – 9.