

MIKOTOKSYNOTWÓRCZE GRZYBY FITOPATOGENICZNE Z RODZAJU *FUSARIUM* I ICH WYKRYWANIE TECHNIKAMI PCR

Michalina Suchorzyńska*, Anna Misiewicz

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
Zakład Mikrobiologii, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2009 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka rodzaju *Fusarium*. 2.1. Morfologia. 2.2. Charakterystyka ważnych gatunków *Fusarium*. 2.2.1. *Fusarium culmorum*. 2.2.2. *Fusarium graminearum*. 2.2.3. *Fusarium poae*. 2.3. Choroby powodowane przez *Fusarium* sp. 3. Mikotoksyny. 4. Mikotoksyny fuzaryjne. 4.1. Bowerycyna, moniliformina, fumonizyny. 4.2. Zearalenon. 4.3. Trichoteceny. 4.3.1. Trichoteceny z grupy B. 4.3.2. Trichoteceny z grupy A. 5. Występowanie mikotoksyn fuzaryjnych w Polsce i na świecie. 6. Najważniejsze czynniki środowiska związane z tworzeniem mikotoksyn. 7. Geny warunkujące formowanie zearalenonu i trichotecenów. 7.1. Charakterystyka *Tri5*, *Tri7*, *Tri3* i *Tri13*. 7.2. Charakterystyka PKS4 i PKS13. 8. Metody molekularne. 8.1. Metody detekcji i identyfikacji oparte na procedurze PCR. 8.1.1. SCAR. 8.1.2. RT-PCR. 8.1.3. Real-Time PCR. 9. Podsumowanie

Mycotoxigenic phytopathogenic fungi of *Fusarium* genus and their identification by PCR techniques

Abstract: Fungi belonging to the genus *Fusarium* are recognized as one of the most dangerous pathogens causing serious plant, human and animal diseases. In addition, they are able to produce very toxic compounds known as mycotoxins. Mycotoxins have various toxic effects on microorganisms, plants, animals and humans. The most common mycotoxins found in the natural environment are zearalenone and trichothecenes, including deoxynivalenol. These compounds cause disorders and deformations during plant growth. They also cause human and animal diseases connected with digestive, reproductive and immune system. Lots of genes are recognized in the biosynthesis of these mycotoxins. Essential genes in trichothecenes synthesis are *Tri5* and *Tri7* genes, and in zearalenone synthesis another two genes PKS4 and PKS14.

Molecular methods based on PCR allow to evaluation of mycotoxicity of filamentous fungi. The easiest and most frequently used method is SCAR. Other molecular analyses like RT-PCR and Real-Time PCR are very expensive methods but are also very sensitive and less and less labour-intensive and thus are used in this kind of tests as well.

1. Introduction. 2. Characterization of *Fusarium* genus. 2.1. Morphology. 2.2. Characterization of important *Fusarium* species. 2.2.1. *Fusarium culmorum*. 2.2.2. *Fusarium graminearum*. 2.2.3. *Fusarium poae*. 2.3. Diseases caused by *Fusarium* sp. 3. Mycotoxins. 4. *Fusarium* mycotoxins. 4.1. Beauvericins, moniliformin, fumonisins. 4.2. Zearalenone. 4.3. Trichothecenes. 4.3.1. Type B trichothecenes. 4.3.2. Type A trichothecenes. 5. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins worldwide and in Poland. 6. The most important factors involved in mycotoxins synthesis. 7. Genes involved in the biosynthesis of zearalenone and trichothecenes. 7.1. Characterization of *Tri5*, *Tri7*, *Tri3* i *Tri13*. 7.2. Characterization of PKS4 and PKS13. 8. Molecular methods. 8.1. Detection and identification methods based on PCR. 8.1.1. SCAR. 8.1.2. RT-PCR. 8.1.3. Real-Time PCR. 9. Summary

Słowa kluczowe: *Fusarium* sp., mikotoksyny, PCR, trichoteceny, zearalenon

Key words: *Fusarium* sp., mycotoxins, PCR, trichothecenes, zearalenone

1. Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Fusarium* należą do najczęściej izolowanych patogenów upraw rolniczych na świecie [28]. Są one przyczyną olbrzymich strat gospodarczych, które wynikają z wysokiej patogenności i toksynotwórczości, dlatego też uznano je za jedne z najgroźniejszych grzybów strzępkowych. *Fusaria* infekują uprawy roślinne o podstawowym znaczeniu gospodarczym dla człowieka [15]. Posiadają także zdolność do syntezy wysoce niebezpiecznych i toksycznych metabolitów, zwanych mikotoksynami [47].

Mikotoksyny tworzone przez *Fusaria* określono mianem mikotoksyn fuzaryjnych. Uważa się, iż odegrały one istotną rolę w historii, począwszy od średnio-wiecznej Europy, przez czasy kolonialne obu Ameryk,

aż do czasów obecnych. Dodatkowo wysuwano liczne hipotezy, iż mikotoksyny produkowane przez *Fusaria* mogły być przyczyną wyginięcia Etrusków czy pomoru w Atenach w V w p.n.e. [15, 60].

W środowisku naturalnym wykrywa się obecność kilku klas mikotoksyn fuzaryjnych: zearalenonu, trichotecenów, fumonizyn, moniliforminy oraz bowerycyny. Wykazują one działanie toksyczne w stosunku do mikroorganizmów, roślin, a także ludzi i zwierząt [57]. Związki te wytwarzane są przeważnie przez: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. nivale*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* [49, 52, 58]. Na terenie Polski dominują *F. culmorum*, *F. graminearum* [3, 38].

Problemy wynikające z patogenności i zdolności do syntezy mikotoksyn przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

* Autor korespondencyjny: Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Zakład Mikrobiologii, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa; (022) 6063680, (022) 606 36 74; ibprs.ibprs@pl; suchorzynska@ibprs.pl

są jednym z ważniejszych zagadnień rolnictwa zarówno w krajach ubogich jak i bogatych. O randze tego problemu może świadczyć fakt, iż w 2006 r. Unia Europejska wprowadziła ujednolicone normy dla zawartości mikotoksyn, które najczęściej występują w produktach pochodzenia zbożowego. Ponadto coraz większe znaczenie przywiązuje się do metod mających zapobiegać zakażeniom płodów rolnych przed zbiorem [38, 57]. Ogromne znaczenie mają techniki pozwalające na wczesne wykrycie obecności patogena i określenie jego zdolności do tworzenia mikotoksyn. Są to decydujące i obecnie podstawowe elementy profilaktyki ochrony przed zanieczyszczeniem toksynami upraw rolniczych oraz uzyskiwanych z nich produktów spożywczych i paszowych [28]. W celu uniknięcia strat upraw spowodowanych tworzeniem przez patogeny mikotoksyn wykorzystuje się różne metody biologii molekularnej. Metody te umożliwiają szybkie zastosowanie środków zaradczych i unikanie skażonej żywności [3, 28].

2. Charakterystyka rodzaju *Fusarium*

2.1. Morfologia

Rodzaj *Fusarium* został utworzony w roku 1809 przez Link'a na podstawie charakterystycznych cech tj. obecność kajakowato- lub bananowato-kształtnych zarodników konidialnych [43]. Zgodnie z najnowszą systematyką [43] grzyby z rodzaju *Fusarium* zostały zaliczone do:

Gromady: *Eumycota* – Grzyby właściwe

Podgromady: *Fungi imperfecti* – Grzyby niedoskonałe

Klasy: *Hyphomycetes* – Strzępczaki

Rzędu: *Moniliales* – Moniliowce

Rodziny: *Tuberculariaceae* – Gruźelkowate

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są szeroko rozpowszechnione w glebie, szczególnie zasiedlają żyzne, urodzajne gleby, zaś stosunkowo rzadko leśne [33]. Mogą rozwijać się również na różnych częściach roślin, resztkach roślinnych i innych związkach organicznych [12].

Fusaria tworzą zarodniki bezpłciowe zwane konidiami. Wyróżnia się trzy typy zarodników: makrokonidia, mikrokonidia oraz chlamydospory [43]. Przy pomocy tych zarodników następuje rozprzestrzenianie się grzybów z wiatrem czy deszczem w środowisku naturalnym.

Makrokonidia są wielokomórkowe zaokrąglone lub wydłużone. Najczęściej przyjmują kształt sierpowaty, prosty lub grzbietowo-brzuszy. Wielkość makrokonidiów jest stosunkowo stała dla danego gatunku, dlatego wykorzystuje się je do określania przynależności do danego gatunku *Fusarium* sp.

Drugim typem zarodników są mikrokonidia, wytwarzane na pojedynczych fialidach, w rzekomych

główkach czy łańcuszkach. Przybierają kształt owalny, eliptyczny lub maczugowaty. Obecność lub brak mikrokonidiów jest cechą diagnostyczną za pomocą której można określić dany izolat do gatunku. Trzecim rodzajem zarodników są chlamydospory. Podobnie jak w przypadku mikrokonidiów ich tworzenie przez izolaty *Fusarium* sp. jest ważną cechą w identyfikacji gatunkowej. Zarodniki te mogą występować pojedynczo, w parach lub skupieniach [43, 56].

2.2. Charakterystyka ważnych gatunków *Fusarium*

2.2.1. *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum należy do sekcji *Discolor*. Powszechnie występuje w klimacie umiarkowanym, dominuje w rejonach chłodniejszych tj. Północna, Zachodnia Europa. Izolowany jest ze wszystkich części roślin rolniczych tj. pszenicy, jęczmienia, żyta, owsa, kukurydzy, pomidorów. Toleruje zmiany temperatury oraz może rozwijać się w warunkach małego potencjału wodnego. Syntetyzuje zearalenon oraz mikotoksyny z grupy trichotecenów w tym deoksyniwalenol, niwalenol [3, 43].

Fusarium culmorum nie tworzy stadium doskonałego. Wytwarza krótkie, grube, z mocno wygiętą częścią grzbietową makrokonidia. Makrokonidia przedzielone są zazwyczaj 3-ma lub 4-ma przegrodami. *F. culmorum* nie produkuje mikrokonidiów. Chlamydospory mogą występować pojedynczo, w łańcuszkach i skupieniach [43, 69]. Z filogenetycznego punktu widzenia jest podobny do *F. graminearum* oraz do *F. crookwellense*.

2.2.2. *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum jest kolejnym ważnym fitopatogenem. Podobnie jak *F. culmorum* należy do sekcji *Discolor*. Gatunek ten dominuje na obszarach o klimacie cieplejszym jak śródziemnomorski (Europa Południowa) czy zwrotnikowy porażając głównie zboża drobnoziarniste oraz kukurydzę [3]. Wytwarza dwa typy konidiów. Cienkie, długie makrokonidia, o kształcie sierpowatym i prostym, składające się z 5-ciu do 6-ciu przegród. Drugim typem zarodników są okrągłe chlamydospory występujące w grzybni pojedynczo, w skupieniach oraz łańcuszkach. Izolaty *Fusarium graminearum* przypominają wyglądem *F. culmorum*, *F. crookwellense* oraz *F. pseudograminearum*. Patogen ten jest zdolny do tworzenia m.in. zearalenonu, fuzaryny C oraz metabolitów z grupy trichotecenów [43].

2.2.3. *Fusarium poae*

Fusarium poae jest patogenem zaliczonym do sekcji *Sporotrichiella*, izolowanym przeważnie w klimacie umiarkowanym. Jest on czynnikiem chorobotwórczym owsa, a także jęczmienia, pszenicy czy żyta [36]. Krótkie, sierpowate przedzielone 3-ma przegrodami

makrokonidia oraz chlamydospory tworzone są bardzo rzadko. Wytwarza on głównie okrągłe, nie przedzielone przegrodami mikrokonidia na monofialidach. *F. poae* porażając wiechy i kłosa zbóż posiada zdolność tworzenia fuzaryny X, oraz trichotecenów (niwalenolu, fuzaryny X, diacetoksyscirpenolu, T-2 toksyny) [36, 43].

2.3. Choroby powodowane przez *Fusarium* sp.

Stosowane w nowoczesnym rolnictwie uprawy monokultur bez tradycyjnego płodozmianu, oszczędnościowe systemy uprawy (minimum tillage system) oraz jednostopniowy zbiór plonów skutkuje wzrostem porażenia upraw rolniczych przez patogeny [38].

Grzyby z rodzaju *Fusarium* infekują wiele upraw roślinnych, w tym zboża drobnoziarniste (pszenica, pszenżyto, żyto, jęczmień), a także kukurydzę, ziemniaki oraz wiele innych roślin ważnych dla człowieka [15, 40, 43]. Rośliny są porażane w różnych fazach rozwojowych, powodując choroby przed- i powschodowe, tj. fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, zamieranie ziarna, zgorzel siewek, fuzariozy kłosów i wiech owsa, choroby podsuszkowe czy fuzariozę kłosów pszenicy (ang. scab, FHB) [15, 36, 46, 58]. Porażone uprawy cechują się obniżoną wartością konsumpcyjną i handlową. Dodatkowo uzyskiwane plony są zanieczyszczone niebezpiecznymi dla ludzi i zwierząt mikotoksynami [15, 58, 61]. Niektóre z tych mikotoksyn jak deoksyniwalenol wywierają działanie fitotoksyczne, przejawiające się wzmożoną patogennością grzybów [66].

3. Mikotoksyny

Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami wytwarzanymi głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Choroby powodowane przez grzyby tworzące mikotoksyny to mikotoksykozy, zaś nauka zajmująca się ich badaniem nosi nazwę mikotoksykologii [6]. Mikotoksyny mogą być produkowane przez grzyby zarówno w czasie wzrostu roślin, ale także podczas ich przechowywania, transportu i przetwarzania. Ww. związki mogą wykazywać działanie fitotoksyczne, zootoksyczne. Poza tym są szkodliwe dla innych mikroorganizmów [57]. Metabolity te wykazują różne działanie toksyczne tj. cytotoksyczne, genotoksyczne, neurotoksyczne, hepatoksyczne czy immunosupresyjne. Wynika to z budowy strukturalnej tych związków, które mogą składać się od prostych pierścieni heterocyklicznych, po nieregularne 6 lub 8 członowe pierścienie [18, 57].

Związki te mogą wchodzić w sposób pośredni i bezpośrednio do łańcucha pokarmowego ludzi i zwierząt: pośrednio przez spożywanie mięsa i mleka zwierząt

skarmianych skażonymi produktami lub bezpośrednio spożywając produkty roślinne porażone przez *Fusaria* czy inne grzyby strzępkowe [24].

Obecnie do mikotoksyn zaliczono około 400 związków. Pod względem ekonomicznym i toksykologicznym w skali światowej istotne znaczenie ma 5 klas mikotoksyn: aflatoksyny, ochratoksyny, zearalenon, fumonizyny i trichoteceny [57, 67].

Aflatoksyny i ochratoksyny są wytwarzane głównie przez gatunki grzybów z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*. Grzyby te rozwijają się w czasie złego przechowywania produktów zbożowych.

Pozostałe klasy mikotoksyn są produkowane przez patogenne gatunki *Fusarium* sp. [18, 24, 57]. Mikotoksyny tworzone przez *Fusaria* określono mianem mikotoksyn fuzaryjnych [15, 60].

4. Mikotoksyny fuzaryjne

Grzyby z rodzaju *Fusarium* ze względu na patogenność oraz wysoką toksyczność stwarzają poważne problemy w nowoczesnym rolnictwie. Wśród wszystkich gatunków *Fusarium* produkujących mikotoksyny do najbardziej mikotoksynotwórczych gatunków na świecie zaliczono: *F. culmorum* i *F. graminearum*. *Fusarium culmorum* jest patogenem dominującym w regionach chłodniejszych np. w Europie Północnej, zaś *F. graminearum* w rejonach cieplejszych [24, 52, 58]. Ważne znaczenie mają również: *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* i *F. sambucinum* [49].

Fusaria są w stanie wytwarzać kilka mikotoksyn: moniliforminę, bowerycynę, fumonizynę, zearalenon oraz trichoteceny [23, 49]. Mikotoksyny fuzaryjne wykazują silne, zróżnicowane działanie toksyczne.

Występowanie różnych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* jest dużym problemem w rolnictwie. Wynika to z porażania roślin oraz negatywnego wpływu mikotoksyn na ich rozwój. Negatywny wpływ na rośliny przejawia się zamieraniem komórek, chlorozami, zahamowaniem wzrostu roślin, kiełkowania nasion, zamieraniem ziarna. Mikotoksyny są czynnikami wywołującymi zaburzenia w procesach mitozy i metabolizmie białkowym u roślin. Wytwarzanie mikotoksyn w strefie korzeniowej roślin uważane jest za główną przyczynę zmian w pobieraniu i rozmieszczaniu składników pokarmowych w roślinie m.in. na skutek zahamowania rozwoju korzeni i włośników. Może również wpływać niekorzystnie na proces mikoryzy [9].

Związki te kumulują się w zainfekowanych komórkach roślinnych i w ten sposób mogą także dostawać się do łańcucha pokarmowego ludzi i zwierząt [57, 67]. Mogą wówczas być przyczyną poważnych chorób, jak hyperestrogenizm, rozmiękania leukodystroficznego upośledzeń wątroby, nerek, a także nowotworów

(przełyku, wątroby) [3, 57]. W dodatku produkty zbożowe są coraz częściej wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym [36].

Ze względu na powszechność występowania w środowisku naturalnym, wynikające z tego niebezpieczeństwo dla ludzi i zwierząt oraz straty gospodarcze za najważniejsze mikotoksyny fuzaryjne uznano trichoteceny oraz zearalenon [49].

4.1. Bowerycyna, moniliformina, fumonizyny

Bowerycyna (BEA) została odkryta jako naturalne zanieczyszczenie kukurydzy we Włoszech, Austrii, Polsce oraz Afryce Południowej. Jest syntetyzowana przez *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. semitectum* [44]. Ten cykliczny heksapeptyd wykazuje specyficzną aktywność inhibicji acetylotransferazy cholesterolu. Może powodować apoptozę komórek i fragmentację DNA. BEA posiada aktywność owadobójczą i jest wysoce toksyczna dla larw *Artemia salina* [59].

Moniliformina (MON) jest wytwarzana przez *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* i *F. oxysporum* [65]. Moniliformina jest silnie kardiotoxyczną mikotoksyną. Długotrwałe spożywanie produktów zanieczyszczonych tą toksyną jest czynnikiem powodującym wady serca [24, 55].

Fumonizyny produkowane są przez *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. napiforme*. Zostały podzielone na trzy grupy A, B, C, na podstawie różnic w strukturze chemicznej. Do najważniejszych fumonizyn należy fumonizyna B1, fumonizyna B2 i fumonizyna B3 [39, 50]. Fumonizyny stanowią powszechne zanieczyszczenie produktów konsumpcyjnych i pasz otrzymywanych z kukurydzy, w takich regionach jak Chiny, Europa, Afryka Południowa i Ameryka Północna. Działanie tych mikotoksyn zostało skorelowane z metabolizmem sfingolipidów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego w komórkach roślinnych, różnicowaniem i zamieraniem komórek, indukowaniem stresu oksydacyjnego [16, 57, 60, 67].

4.2. Zearalenon

Zearalenon (ZEA) tworzony jest głównie przez *F. culmorum* i *F. graminearum*. Sklasyfikowano go jako niesterydowy estrogen lub mikoestrogen, zwany czasami fitoestrogenem. Zredukowana forma zearalenonu, zwana zearalenolem wykazuje zwiększoną aktywność estrogeniczną. Obecność mikotoksyny w roślinach powoduje zmiany w różnicowaniu kalusa pszenicy oraz rozwoju generatywnym roślin. U zwierząt, które były karmione zanieczyszczoną paszą może skutkować uszkodzeniami organów rozrodczych oraz zakłóceniami reprodukcyjnymi [6, 24, 51, 57].

4.3. Trichoteceny

Trichoteceny stanowią rodzinę pochodnych ponad 60 seskwiterpenoidów, które są wytwarzane przez liczne rodzaje grzybów tj. *Fusarium*, *Myrothecium* czy *Trichoderma* [6]. Trichoteceny zostały podzielone pod względem budowy na 4 grupy: A, B oraz C i D. W środowisku powszechnie występują trichoteceny należące do grupy A (T-2 toksyna, HT-2 toksyna oraz diacetoksyscirpenol i neosolaniol) oraz B (deoksyniwalenol oraz jego pochodne, niwalenol i fuzaryna X) [20, 57]. Trichoteceny z grupy B posiadają grupę funkcyjną, ketonową w pozycji węgla C-8, natomiast związki z grupy A posiadają w tym miejscu inną grupę tlenową [24].

Ze względu na częstotliwość występowania w produktach pochodzenia roślinnego przeznaczonych na cele spożywcze i paszowe uważa się, iż trichoteceny z grupy B wywierają większy wpływ na człowieka i środowisko. Zaś w tej grupie do najważniejszych mikotoksyn zalicza się deoksyniwalenol (DON, womitoksyna) i jego pochodne (3AcDON i 15AcDON) oraz niwalenol (NIV) [3, 6, 38].

4.3.1. Trichoteceny z grupy B

Deoksyniwalenol oraz niwalenol produkowane są głównie przez *F. culmorum*, *F. graminearum*, a także przez *F. poae* [24]. Z przeprowadzonych badań wynika, iż niwalenol wykazuje aż o 14 razy większą toksyczność w stosunku do deoksyniwalenolu. Jednakże niwalenol jest mniej toksyczny od trichotecenów z grupy A [68].

Działanie fitotoksyczne DON-u i NIV-u oraz ich pochodnych przejawia się hamowaniem kiełkowania nasion, hamowaniem wzrostu korzeni i pędów, redukcję świeżej masy organów roślinnych, więdnieniami, chlorozami i nekrozami. Spożywanie zakażonej żywności przez zwierzęta i ludzi prowadzi do zaburzeń: układu pokarmowego, rozrodczego czy immunologicznego. Poza tym związki te powodują istotne zmiany na poziomie komórkowym, obniżając aktywność białek i enzymów oraz hamując ich syntezę. Powodują zaburzenia w przepuszczalności błon komórkowych. Mikotoksyny te ingerują w fazy inicjacji, elongacji i terminacji, przyczyniają się też do indukcji aberracji chromosomowych, zaburzeń mitozy, a także apoptoz i nekroz [6, 9, 23, 24, 49, 57, 67, 71].

4.3.2. Trichoteceny z grupy A

Związki te są wytwarzane przez *F. poae* oraz *F. sporotrichioides*. T-2 toksyna i diacetoksyscirpenol (DAS) wykazują działanie cytotoxyczne, immunosupresyjne [24].

5. Występowanie mikotoksyn fuzaryjnych w Polsce i na świecie

Uprawy roślinne w tym uprawy zbóż drobnoziarnistych mogą być infekowane przez wiele gatunków *Fusarium*. Istotne znaczenie ma to na terenach, gdzie z jednej strony panują warunki klimatyczne dogodne dla wzrostu różnych gatunków *Fusarium*, z drugiej zaś zmienne warunki klimatyczne przyczyniające się do rozwoju różnych gatunków *Fusarium* w każdym roku uprawy. Do najczęściej występujących *Fusarium* na świecie należą *F. culmorum* oraz *F. graminearum* [38, 49].

Fusarium culmorum przeważa w regionach o klimacie umiarkowanym, np. morskim, charakteryzującym się średnimi temperaturami w ciągu lata (Niemcy, Holandia, Skandynawia, Polska). *Fusarium graminearum* dominuje na obszarach o klimacie cieplejszym, gdzie odnotowywane są wysokie temperatury w okresie letnim (Ameryka Północna), śródziemnomorskim (Europa Południowa) i zwrotnikowym (Chiny) [3]. Grzyby te zdolne są do syntezy najważniejszych mikotoksyn: deoksyniwalenolu i jego pochodnych (15-AcDON, 3-AcDON) oraz niwalenolu. Patogeny wytwarzające 3-AcDON są bardziej pospolite w Europie i Azji, natomiast tworzące 15-AcDON w Ameryce Północnej i Południowej. Na początku XXI wieku wyizolowano w Kanadzie *Fusaria* zdolne do syntezy zarówno 3- i 15-AcDON. Deoksyniwalenol (DON) jest najczęściej wykrywany na pszenicy, jęczmieniu, kukurydzy i owsie, zaś rzadziej w życie i ryżu.

Niwalenol (NIV) jest powszechnie syntetyzowany przez izolaty grzybów rozwijających się w Japonii, rzadko wykrywany w Ameryce Północnej i Południowej [42, 57].

Na terenie Polski występują grzyby produkujące wszystkie rodzaje mikotoksyn fuzaryjnych. Stężenie tych mikotoksyn jest jednak znacznie niższe w produktach zbożowych niż w krajach Europy Zachodniej i Północnej. *Fusaria* tworzące DON oraz NIV izolowane są głównie na pszenicy, pszenżycie, życie i kukurydzy. Wysokie stężenie moniliforminy wykryto na pszenicy, pszenżycie oraz owsie, a fumonizyn na kukurydzy [3, 38].

6. Najważniejsze czynniki środowiska związane z tworzeniem mikotoksyn

Mikotoksyny mogą być wytwarzane przez grzyby zarówno w czasie przed- i późnym, podczas przechowywania, transportu i przetwarzania. Tworzenie tych związków powiązane jest ze stresem roślin, nadmiernym uwodnieniem magazynowanych produktów. Niewłaściwą praktyką przechowywania i niską jakością

produktów zbożowych [17]. Grzyby produkujące mikotoksyny rozwijają się w temperaturze o zakresie 10–40°C, przy pH 4–8, na suchej powierzchni [41] lub na produktach zbożowych o wilgotności 12–13%. Udowodniono, iż optymalne warunki dla wzrostu grzybów nie muszą być najlepszymi dla syntezy mikotoksyn [34]. Związki te mogą być tworzone w trudnych warunkach dla wzrostu grzyba. Dowiedzono iż, stosowanie środków grzybobójczych nie wpływa hamująco na wytwarzanie mikotoksyn, a może powodować efekt odwrotny. Pod wpływem fungicydów grzyby mogą być poddane nadmiernemu szokowi, co skutkuje zwiększoną produkcją mikotoksyn [10, 27].

7. Geny warunkujące formowanie zearalenonu i trichotecenów

Przeprowadzone badania biochemiczne i genetyczne nad gatunkiem *Fusarium sporotrichioides* umożliwiły zidentyfikowanie wielu genów zaangażowanych w biosyntezę mikotoksyn [70]. Powiązano syntezę trichotecenów z kompleksem szlaków który rozpoczyna się od związku, zwanego trichodienem i zawiera dużą liczbę reakcji chemicznych tj. utlenienie, cyklizacje czy estryfikacje [21].

Wiele genów związanych z produkcją trichotecenów zostało zidentyfikowanych wewnątrz 26-kpz segmentu DNA [11]. Wyróżniono 16 genów biorących udział w syntezie trichotecenów, większość z nich tworzy zgrupowanie genów określonych mianem zbioru *Tri*. Znajdują się w nim geny wykazujące szczególny wpływ na formowanie trichotecenów. Są to *Tri5*, *Tri7*, *Tri13* oraz *Tri3* [1, 2]. Poza zbiorem genów *Tri* znajdują się tam 4 inne geny wpływające na syntezę trichotecenów [24, 49].

Na przełomie ostatnich kilku lat zauważono silne oddziaływanie zearalenonu na środowisko [36]. Dlatego rozpoczęto doświadczenia z wykorzystaniem różnych metod molekularnych na detekcję genów biorących udział w formowaniu zearalenonu [26, 45]. Zearalenon powstaje w szlaku octanowo-polimalonianowym [22]. Wykazano, iż w jego syntezie bierze udział wiele genów, które kodują enzymy określane mianem syntaz poliketydowych (PKSs) [8]. Geny te zostały zaliczone do typu I syntaz poliketydowych (PKSs). Dzieli się je na redukujące PKS i nie-redukujące geny PKS wśród których najważniejsze to PKS4 i PKS13.

7.1. Charakterystyka *Tri5*, *Tri7*, *Tri3* i *Tri13*

Gen *Tri5* koduje enzym syntazę trichodienu, katalizujący cyklizację i izomeryzację fosforanu furanylu do trichodienu. Jest on pierwszym genem biorącym

udział w biosyntezie trichotecenów. Jeżeli gen *Tri5* jest nieobecny w genomie wówczas grzyby nie są zdolne do syntezy trichotecenów [24].

Geny *Tri7* i *Tri13* kontrolują typ powstającej mikotoksyny [69]. Z badań Lee i in. oraz Brown' a i in. wynika, iż gen *Tri7* powoduje acetylację niwalenolu i jego przemianę do 4-acetyloniwalenolu (4-ANIV) [11, 42]. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż grzyby posiadające niefunkcjonalny gen *Tri7* nie są zdolne do syntetyzowania NIV, ani jej pochodnej 4-ANIV [32].

Gen *Tri13* powoduje konwersję DON w NIV. Jeśli nastąpią zaburzenia ekspresji tego genu grzyby nie są zdolne do syntezy niwalenolu [11, 42], natomiast tworzą deoksyniwalenol [14]. Gen *Tri3* odpowiada za tworzenie pochodnych deoksyniwalenolu, powodując jego acetylację w pozycji 3 lub 15 [62].

7.2. Charakterystyka PKS4 i PKS13

Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy syntezą zearalenonu, a aktywnością jednego genu, oznaczonego jako PKS4. Uważa się, iż obecność genu PKS4, świadczy o potencjalnej zdolności do syntezy zearalenonu przez izolaty *Fusarium* sp. PKS4 koduje enzym, który stymuluje ekspresję innego genu PKS13 niezbędnego w syntezie zearalenonu. Białko kodowane przez gen PKS13, bierze udział w końcowym etapie formowania zearalenonu. Powoduje przyłączenie jednostki węglowej do końcowego związku pośredniego [26, 45].

8. Metody molekularne

Ogromne znaczenie mają techniki pozwalające na wczesne wykrycie obecności patogenu i określenie jego zdolności do tworzenia mikotoksyn. Są to decydujące i obecnie podstawowe elementy profilaktyki ochrony przed zanieczyszczeniem toksynami produktów spożywczych i paszowych [28]. W celu uniknięcia strat upraw spowodowanych występowaniem patogenów wykorzystuje się różne metody biologii molekularnej. Metody te umożliwiają szybkie zastosowanie środków zaradczych i unikanie skażonej żywności [3, 28, 29, 30]. Opierają się one na analizie struktury DNA, a wyniki z analiz molekularnych nie zależą od stanu fizjologicznego badanego organizmu. Metody te pozwalają na łatwiejszą oraz szybszą ocenę mikotoksynotwórczości w porównaniu do tradycyjnych metod [3, 53].

8.1. Metody detekcji i identyfikacji oparte na procedurze PCR

Opracowanie w 1974 r. przez Kary Mullis' a techniki służącej do specyficznego powielania sekwencji określonych odcinków DNA, stało się początkiem rozwoju dużej liczby badań w patologii roślin [19].

Metoda reakcji łańcuchowej polimerazy PCR znalazła wiele zastosowań m.in. w klasyfikacji izolatów grzybów, badań interakcji gospodarz-patogen. Szczególny rozwój tej techniki nastąpił po 1988 r., kiedy wykorzystano po raz pierwszy enzym polimerazę z bakterii *Thermus aquaticus* (*Taq*), wykazującą stabilność w wysokich temperaturach [31].

Wśród licznych metod molekularnych służących do wykrywania, identyfikacji i klasyfikacji patogenów są stosowane są obecnie techniki tj. SCAR, RT-PCR, Real-time PCR.

8.1.1. SCAR

Metoda SCAR (specyficzny PCR) polega na powielaniu za pomocą pary starterów ściśle zdefiniowanego obszaru genomu [5]. Startery, które są wykorzystywane w tej technice mogą być uzyskane z badań metodą RAPD, a ich długość wynosi 17–24 nukleotydów [28].

Analiza SCAR jest metodą bardzo przydatną w identyfikacji, wykrywaniu i charakteryzowaniu patogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Stosowana jest jako analiza porównawcza genomów organizmów, do ustalania lub weryfikowania przynależności gatunkowej badanych izolatów [28].

SCAR jest wykorzystywany do wykrywania określonych genów w populacjach grzybów. Ma to szczególne znaczenie w kontekście właściwości patogenów tj. różnorodna patogeniczność oraz zdolności do syntezy mikotoksyn.

Za pomocą starterów zaprojektowanych na podstawie fragmentów genów odpowiedzialnych za formowanie wielu mikotoksyn w tym, trichotecenów można dokonać rozróżnienia izolatów zdolnych do syntezy tych związków. W takich badaniach wykorzystuje się startery ułożone m.in. na genach *Tri5*, *Tri7* [14, 32, 30]. Na podstawie sekwencji genów PKS4 i PKS13 można określić potencjalną zdolność grzybów do syntezy zearalenonu [45]. Przykładowe pary starterów pozwalające na analizę genów biorących udział w syntezie trichotecenów i zearalenonu zamieszczono w tabeli I.

8.1.2. RT-PCR

RT-PCR (Reverse-transcription – PCR) jest metodą wykorzystującą enzym odwrotną transkryptazę do przemiany RNA w cDNA przez amplifikację PCR. Analiza RT-PCR umożliwia zbadanie aktywności genu i stanowi ważny krok do zrozumienia jego funkcji, działania i aktywności [4, 48].

Technika RT-PCR pozwala badaczom w jasny sposób stwierdzić, czy dany grzyb wykazuje aktywność produkcji mikotoksyn. Określenie jej jest możliwe przez detekcję (mRNA) dla transkryptu genów zaangażowanych w formowanie metabolitów wtórnych. Jeśli geny biosyntezy mikotoksyn ulegają transkrypcji wówczas dany metabolit jest wytwarzany [24].

Tabela I
Wybrane startery wykorzystywane w technice SCAR do detekcji genów Tri5, Tri7 oraz PKS4 i PKS13

Gen	Piśmien- nictwo	Para starterów	Sekwencja starterów	Wielkość produktu
Tri5	[25]	HA <i>Tri</i> F	5'-CAGATGGAGAAGTGGATGGT-3'	260pz
		HA <i>Tri</i> R	5'-GCACAAGTGCCACGTGAC-3'	
Tri7	[14]	M_ <i>Tri</i> 7F	5'-TGGATGAATGACTTGAGTTGACA-3'	483pz
		M_ <i>Tri</i> 7R	5'-AAAGCCTTCATTCACAGCC-3'	
PKS4	[45]	PKS4 F	5'-AGATGGCCATGGTGTCTCGTGAT-3'	400 pz
		PKS4R	5'-GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT-3'	
PKS13	[45]	PKS13F	5'-AGCCGGGAAAGCCATACCATACAT-3'	400pz
		PKS13R	5'-GCTTGCAATCTCGATCGCCATAAT-3'	

Analiza RT-PCR została szeroko wykorzystana w genetyce grzybów do kontroli ekspresji specyficznych genów pod działaniem różnych warunków fizjologicznych [4].

RT-PCR został także użyty do monitorowania ekspresji genów mikotoksyn powiązanych z syntezą trichotecenów [37] oraz zearalenonu [45]. W tabeli II zamieszczono przykładowo stosowane startery w metodzie RT-PCR.

8.1.3. Real-Time PCR

Real-Time PCR jest techniką, która w czasie przeprowadzania analizy umożliwia mierzenie powstających produktów automatycznie po każdym cyklu reakcji w zamkniętych probówkach za pomocą specjalnych sond DNA [4, 24, 64].

Bezpośredni pomiar gromadzonego produktu pozwala na kontrolę faz w czasie trwania reakcji. Początkowa ilość badanego DNA w analizie może być powiązana z liczbą cykli, w której obserwowany jest znaczący wzrost fluorescencji [4]. Produkty PCR mogą być monitorowane przy użyciu zarówno fluorescencyjnych, interkalujących barwników DNA tj. SYBR Green lub sekwencję specyficznej sondy nukleotydowej. Przykładem może być sonda *TaqMan*, która obecnie jest najpowszechniej stosowana w tej

metodzie [4]. Burlakoti i in. przeprowadzili badania z wykorzystaniem tej techniki dowodząc tym samym jej zastosowanie w analizach mikotoksynotwórczości [13].

Analiza Real-Time PCR wraz ze specyficznymi starterami i sondą *TaqMan* umożliwiła ocenę wytwarzania trichotecenów różnych gatunków *Fusarium* sp., w tym *F. graminearum* z ziarna jęczmienia [63].

Uważa się, iż ilościowy Real-Time PCR jest prawdopodobnie w obecnych czasach najlepszą metodą do detekcji grzybów syntetyzujących mikotoksyny [29, 35, 54].

Przykładowe sekwencje starterów wykorzystywanych w tej technice znajdują się w tabeli III.

9. Podsumowanie

Grzyby z rodzaju *Fusarium* uznano za najniebezpieczniejsze patogeny wywołujące poważne choroby u roślin, a także ludzi, zwierząt. W dodatku są one zdolne do syntezy wysoce toksycznych związków zwanych mikotoksynami. Najczęściej występujące w środowisku to zearalenon oraz trichoteceny, w tym deoksyniwaleol. Związki te są przyczyną zaburzeń we wzroście i rozwoju roślin, a także chorób związanych z układem

Tabela II
Wybrane startery używane do identyfikacji genów odpowiedzialnych za syntezę mikotoksyn w technice RT-PCR [wg 45]

Gen	Para starterów	Sekwencja starterów
PKS4	PKS4-1	5'-AGATGGCCATGGTGTCTCGTGAT-3'
	PKS4-2	5'-GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT-3'
PKS13	PKS13-1	5'-AGCCGGGAAAGCCATACCATACAT-3'
	PKS13-2	5'-GCTTGCAATCTCGATCGCCATAAT-3'
PKS14	PKS14-1	5'-AGGGCTCGATTGTTGCGGATTCT-3'
	PKS14-2	5'-TTCTTCCC GCCACTTCAAACA-3'

Tabela III

Wybrane startery stosowane do detekcji genów biorących udział w syntezie mikotoksyn w technice Real-Time PCR

Gen	Piśmiennictwo	Para starterów	Sekwencja starterów	Wielkość produktu
Tri5	[13]	Tri5-F	5'-TCTTAACACTAGCGTGCGCCTTCT-3'	193pz
		Tri5-R	5'-CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA-3'	193pz
Pks4	[45]	PKS4-PS.1	5'GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT3'	400pz
		PKS4-PS.2	5'ATGCCCTGATGAAGAGTTTGAT3'	400pz
PKS13	[45]	PKS13-PS.1	5'CCCCAACTCGACGTCAAATCTAT 3'	400pz
		PKS13-PS.2	5'TTCTTCCCGCCGACTTCAAAAACA3'	400pz

pokarmowym, rozrodczym czy odpornościowym u ludzi i zwierząt. Za tworzenie trichotecenów i zearalenonu odpowiedzialnych jest szereg genów. Istotną rolę w biosyntezie trichotecenów odgrywają geny *Tri5*, *Tri7*, a w syntezie zearalenonu geny *PKS4* i *PKS13*. Metody molekularne oparte o reakcję PCR umożliwiają dokonanie szybkiej oceny mikotoksynotwórczości wśród grzybów strzępkowych. Do powszechnie stosowanej metody molekularnej ze względu na prostotę wykonania należy SCAR. Coraz częściej stosowane są badania z wykorzystaniem technik Real-Time PCR i RT-PCR, które pomimo wysokich kosztów analiz cechują się wysoką wrażliwością, większą powtarzalnością i mniejszą pracochłonnością.

Piśmiennictwo

- Alexander N.J., McCormick S.P., Hohn T.M.: *Tri12*, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides* gene isolation and expression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 977–984 (1999)
- Alexander N.J., McCormick S.P., Larson T.M., Jurgenson J.E.: Expression of *Tri15* in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr. Genet.* **45**: 157–162 (2004)
- Arseniuk E., Góral T.: Fuzarioza kłosów – czynniki sprawcze i gospodarcze znaczenie choroby. IHAR w Radzikowie. www.pin.org.pl/hrin/txt/2005/3-6.rtf (2005)
- Atkins S.D., Clark I.M.: Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.* **45**, 3–15 (2004)
- Bednarek P.T., Chwedorzewska K.: Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia*, **1**, 9–34 (2001)
- Bennet J.W., Klich M.: Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497–512 (2003)
- Berg J., Tymoczko J.L., Stryer L.: *Poznanawanie genów*. [w:] *Biochemia*, Wyd. V. Wyd. Naukowe PWN SA, Warszawa 2005, str. 149–151.
- Bingle L.E., Simpson T.J., Lazarus C.M.: Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 209–223 (1999)
- Bis H.: Uzdolnienia do produkcji mikotoksyn grzybów wyizolowanych z gleb Krakowa i jego okolic. *Zesz. Nauk. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Rolnictwo)*, **89/546**, 43–50 (2006)
- Boyacioglu D., Hettiarachchy N.S., Stack R.W.: Effect of three astemic fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Can. J. Plant Sci.* **72**, 93–101 (1992)
- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E.: A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **32**, 121–133 (2001)
- Burgess L.W.: General ecology of the *fusaria*. p. 225–235 [In:] Nelson P. E., Toussoun T. A., Cook R. J., (ed): *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Penn. State University Press, University Park, 1081
- Burlakoti R.R., Estrada R., Rivera V.V., Boddada A., Secor G.A., Adhikari T.B.: Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet and wheat. *Phytopathol.* **97**, 835–841 (2007)
- Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P.: Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 355–367 (2003)
- Chełkowski J.: *Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy*. Wyd. SGGW-AR, Warszawa 1985
- Cole R.J., Jarvis B.B., Schweikert M.A.: *Handbook of secondary fungal metabolites*, vol. III. Acad. Press, New York 2003
- Coulombe R.A.: Symposium biological action of mycotoxins. *J. Dairy Sci.* **76**, 880–891 (1993)
- Creppy E.E.: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* **127**, 19–28 (2002)
- Czembor P.Cz.: Markery PCR w badaniach grzybów fitopatogenicznych. IHAR, Radzików 1995, s. 151–163
- Desjardins A.E., 2006: *Fusarium mycotoxins chemistry, Genetics and Biology*. Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, MN. 2006
- Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P.: Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.* **57**, 595–604 (1993)
- Dewick P.N.: The acetate pathway: fatty acids and polyketides, p. 35–117. In P.N. Dewick (ed.), *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons LDT, West Sussex, England, 2001
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C.: *Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity*. *Anim. Feed Sci. Tech.* **80**, 183–205 (1999)

24. Edwards S.G., O'Callaghan J., Dobson D.W.: PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi-review. *Mycol. Res.* **106**, 1005–1025 (2002)
25. Edwards S.G., Pirgozliev S.R., Hare M.C., Jenkinson P.: Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1575–1580 (2001)
26. Gaffoor I., Trail F.: Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1793–1799 (2006)
27. Gareis M., Ceynowa J.: Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Lebensmittel-Untersuchung-Forsch.* **198**, 244: 248 (1994)
28. Golińska B., Narożna D., Mądrzak C.J.: Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania, identyfikacji i charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium*. *Biotechnologia*, **3**, 165–177 (2002)
29. Halstensen A.S.: Species-specific fungal DNA in airborne dust as surrogate for occupational mycotoxin exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 2543–2558 (2008)
30. Halstensen A.S., Nordby K.CH., Klemsdal S.S., Elen O., Clasen P.E., Eduard W.: Toxigenic *Fusarium* spp. As determinants of trichothecene mycotoxins in settled grain dust. *J. Occup. Environ. Hyg.* **3**, p. 651–659 (2006)
31. Henson J.M., French R.: The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 81–109 (1993)
32. Jennings P., Coates M.E., Tuner J.A., Chandler E.A.: Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathol.* **53**, 182–190 (2004)
33. Jeschke N., Nelson P.E., Marasas W.F.O.: *Fusarium* species isolated from soil samples collected at different altitudes in the Transkei, Southern Africa. *Mycol.* **82**, 727–733 (1990)
34. Joffe A.Z.: *Fusarium* species: their biology and toxicology. John Wiley & Sons, New York 1986, s. 225–298
35. Keswani J., Kashon M.L., Chen B.T.: Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantitation of fungi in yeast. *J. Environ. Monit.* **7**, 311–318 (2005)
36. Kiecana I., Mielniczuk E., Perkowski J., Goliński P.: Porażenie wiech przez *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie owsa. *Acta Agrobotanica*, **58**, 91–102 (2005)
37. Kimura M., Kaneko I., Komiyama M., Takatsuki A., Koshino H., Yoneyama K., Yamaguchi I.: Trichothecene 3-O-acetyltransferase protect both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterisation of *Tri101*. *J. Biol. Chem.* **273**, 1654–1661 (1998)
38. Kobras M., Horoszkiewicz-Janka J.: Znaczenie i możliwości ograniczenia szkodliwych metabolitów pochodzenia grzybowego. *Progr. Plant Protect.* **47**, 141–148 (2007)
39. Krska R., Welzig E., Boudra H.: Analysis of *Fusarium* toxins in feed: review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **137**, 241–264 (2007)
40. Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P.: Flora polska. Grzyby (Mycota). Instytut Botaniki PAN, Warszawa, 1991
41. Lacey J.: Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. str. 363–397. [In:] Smith J. E., Henderson R. E., (Eds.), *Mycotoxins Anim. Foods*. CRC Press, Boca Raton, 1991
42. Lee T., Han Y.-K., Kim K.-H., Yun S.-H., Lee Y.-W.: *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2148–2154 (2002)
43. Leslie J.F., Summerell B.A.: The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Pub. Prof. first ed., 2006
44. Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kostecki M., Goliński P., Ritieni A., Chełkowski J.: Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3084–3088 (1998)
45. Lysoe E., Klemsdal S.S., Bone R., Frandsen R.J.N., Johansen T., Thrane U., Giese H.: The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3924–3932 (2006)
46. Łacicowa B., Wagner A.: Grzyby towarzyszące *Gaumannomyces graminis* w tkankach pszenicy i pszenżyta. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* **374**, 242–255 (1989)
47. Ławiecki T., Kobras M.: Reakcje wybranych odmian jęczmienia browarnego na porażenie kłosów grzybami z rodzaju *Fusarium*. *Progr. Plant Pathol.* **42**, 869–871 (2002)
48. Łojkowska E.: Diagnostyka molekularna roślin. [w:] „Biotechnologia roślin”. Red. Malepszy S., Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 462–485
49. Magan N., Hope R., Collete A., Baxter E.S.: Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 685–690 (2002)
50. Marcidska I., Biegasa-Kościelniak J.: Wpływ zearalenonu, GA3 i kinetyny na proces różnicowania kalusa pszenicy oraz rozwój generatywny zregenerowanych roślin. *Curr. Tops. Biophys.* **22**, A-92 (1999)
51. Marasas W.F.O., Miller J.D., Riley R.T., Visconti A.: Fumonisin-occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment, p. 332–359. [In:] Summerell B. A., Leslie J. F., Backhouse D., Bryden W. L., Burgess L. W. (ed.), *Fusarium*. Nelson P. E., Memorial Symposium. APS Press, St Paul, Minn., 2001
52. Miller J.D.: Epidemiology of *Fusarium graminearum* diseases of wheat and corn. In: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins (Miller J.D., Trenholm H.L., eds.) Eagon Press, St Paul, MN., 1994, str. 19–36
53. Mitchell T.G., Sandin R.L., Bowman B.H., Meyer W., Merz W.G.: Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *J. Med. Vet. Myc.* **32**, 351–366 (1994)
54. Morrison E., Kosiak B., Ritieni A., Aastveit A.H., Uhlig S., Bernhoft A.: Mycotoxin production by *Fusarium avenaceum* strains isolated from Norwegian grain and the cytotoxicity of rice culture extracts to porcine kidney epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3070–3075 (2002)
55. Nagaraj R.Y., Wu W., Will J.A., Vesonder R.F.: Cardiotoxicity of moniliformin in broiler chickens as measured by electrocardiography. *Poultry Sci.* **74**, 1–21 (1995)
56. Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie J.: Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 479–504 (1994)
57. Packa D.: Mikotoksyny zagrożeniem dla ludzi, zwierząt i roślin. *Rolnicze ABC*, **11**, 5–6 XI (2006)
58. Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.: *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol.* **44**, 207–238 (1995)
59. Pascale M., Visconti A., Pronczuk M., Wiśniewska H., Chełkowski J.: Accumulation of fumonisins, beauvericin and fusaproliferin in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium proliferatum*. *Mycol. Res.* **106**, 1026–1030 (2002)

60. Pittet A.: Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds an updated. *Rev. Med. Vet.* **149**, 479–492 (1998)
61. Polley R.W., Turner J.A.: Surveys of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989–1990. *Ann. Appl. Biol.* **126**, 45–59 (1995)
62. Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mule G., Visconti A.: Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Eur. Food Addit. Contamin.* **22**, 309–315 (2005)
63. Sarlin T., Yli-Mattila T., Jestoi M., Rizzo A., Paavani-Huhtala S., Haikara A.: Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *Eur. J. Plant Pathol.* **114**, 371–380 (2006)
64. Schena L., Franco N., Ippolito A., Gallitelli D.: Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 893–908 (2004)
65. Schutt F., Nirenberg H.J., Deml G.: Moniliformin production in the genus *Fusarium*. *Mycotoxin Res.* **14**, 35–40 (1998)
66. Snijders C.H.A., Krechting C.F.: Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat. *Can. J. Bot.* **70**, 1570–1576 (1992)
67. Stępień M., Sokół-Leszczyńska B., Łuczak M.: Mykotoksyny, produkty spożywcze a zdrowie człowieka. *Post. Mikrobiol.* **46**, 167–177 (2007)
68. Ueno Y.: Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier, Amsterdam, 1983
69. Wagacha J.M., Muthomi J.W.: *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and other role in pathogenesis in wheat-review. *Crop Protection*, **26**, 877–885 (2007)
70. Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., Nell K.: Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9278–9283 (2002)
71. Williams K.C., Blaney B.J.: Effect of the mycotoxins, nivalenol and zearalenone, in maize naturally infected with *Fusarium graminearum* on the performance of growing and pregnant pigs. *Aust. J. Agr. Res.* **45**, 1265–1279 (1994)