

## 물포화 Silica gel chromatography에 의한 Deoxynivalenol 생산에 관한 연구

김 종 수·최 민 철  
경상대학교 수의과대학  
(1992년 6월 8일 접수)

### A study on deoxynivalenol production by water-saturated silical gel chromatography

Jong-shu Kim, Min-cheol Choi  
College of Veterinary, Gyeongsang National University  
(Received June 8, 1992)

**Abstract** : Deoxynivalenol producing isolates of *Fusarium Graminearum* R 6576 was grown on rice for 25 days at 19,25 and 28°C. Maximum production of deoxynivalenol(DON) by *Fusarium graminearum* R 6575 occurred at 28°C and 20 days. Maximum concentration of 940 ppm DON were obtained after 20 days at an initial moisture content of 40%. A DON derivative, 15-acetyl-DON (15-ADON), was also found at concentrations of 150~300ppm after 5~10 days.

Crude culture extracts were purified by water-saturated silica gel column chromatography which selectivity extracted DON when methylene chloride was as the mobile phase. Purity of crystallized DON was verified by thin layer and high performance liquid chromatography. Also this method was advantage method or production of DON and require little organic sorbent than the other methods.

### 서 론

Deoxynivalenol (3, 7, 15-trihydroxy-12, 13-epoxy-trichothecene-9-en-8-one)은 여러종류 곡물에서 자연적으로 발생하는 곰팡이의 제2차 대사산물인 trichothecene mycotoxin이다. 그러나 이는 주로 *Fusarium graminearum*에 의해서 발생하게 되며 돼지에서 구토, 사료섭취 거부와 번식장애를 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>1-3</sup> DON은 1973년 미국과 일본에서 *Fusarium graminearum*에 감염된 보리에서 처음으로 분리되었으며<sup>4,5</sup>, 이 *Fusarium* 속균이 생성하는 trichothecene의 유도체들은 현재 50여종이 보고되어 있으나 이들중 가장 흔하게 자연발생하는 trichothecene은 T-2 toxin, Deoxynivalenol, Nivalenol(NIV)

을 들수 있다.<sup>6</sup> 이 중 Deoxynivalenol 독소는 *Fusarium* 속이 생성하는 trichothecene중 가장 많이 분리되는 독소로 일본 남부지방에서 맥류적미병에 이병된 곡류를 섭취하여 인축에 중독증이 발생하여 첫중독증의 원인으로 보고된 이래<sup>4</sup>, 1984년 미국에서 오염된 곡류중 Deoxynivalenol에 감염된 곡류가 80%에 이른다고 보고되어 있으며<sup>7</sup> 영국, 프랑스, 독일에서는 약 70%<sup>8</sup>, 캐나다에서는 90%<sup>10</sup>, 지역에 따라서 약간의 차이는 보이지만 중국에서는 80~100%<sup>9</sup>, 일본에서는 70~100%<sup>10</sup>, 우리나라 밀에서는 20~60%, 보리에서는 92~100%까지 Deoxynivalenol이 생성된다는 보고가 있으며<sup>10</sup>, 이 Deoxynivalenol 생성균주의 분포는 세계적인 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 특히 우리나라에서는 1963년 맥류의 붉은곰팡이병으로

\* 이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조정비에 의해서 연구되었음.

인하여 인축에 중독증이 대대적으로 발생하자 그 당시 농림부에 붉은곰팡이 대책위원회가 설립되었으나 그 후로는 이 *Fusarium*에 대한 연구는 지속되지 못했다. 그러나 1983, 1984년도에 우리나라에서 이 Deoxynivalenol 발생율이 보리에서 근 100%에 이른다는 보고는 해마다 곡류에서 Deoxynivalenol 오염이 발생하고 있다는 것을 알 수 있으며 이로 인한 인축에 미칠 중독증은 심각한 문제로 대두될 수 있다고 본다. 그러나 이러한 중독증에 관한 연구는 국내에서는 거의 찾아볼 수 없으므로 이 *Fusarium* 진균독소에 대한 중독연구가 절실히 요구되는 바이며 이러한 중독증을 연구하려면 많은 양의 Deoxynivalenol toxin이 필요로 하는데 이를 수입하여 사용할려면 고가를 지불하여야 하기 때문에 경제성을 고려하지 않을 수 없다. 또한 여러가지 곡물에서 자연적으로 발생하는 Deoxynivalenol toxin의 양은 8ppm(8 $\mu$ g/g) 정도의 극히 미량이므로 중독증을 연구하는데는 극히 부족한 양이다. 따라서 중독증을 연구하는데는 대량의 Deoxynivalenol toxin을 생산할 필요성이 있다.<sup>11</sup> 대량의 Deoxynivalenol 생산을 위해서 옥수수, 쌀 등과 같은 곡물을 이용하여 실험실에서 Deoxynivalenol toxin을 대량 생산하는 방법들이 연구되어지고 있으며<sup>3,12~14</sup>, 실험실에서 Deoxynivalenol toxin 생산을 하는 것은 crude Deoxynivalenol toxin 생산을 위해 아주 적합한 방법이며 이에는 solid와 liquid substrates가 연구되어지고 있다.<sup>3,12</sup> 비록 crude Deoxynivalenol toxin 추출을 위한 column chromatography, Thin Layer Chromatography(TLC)와 High Press Liquid Chromatography(HPLC) 방법 등이 보고되어져 있으나 이러한 방법들은 많은 시간을 요하고 여러가지 clean up 단계를 필요로 하는 부리한점들이 있다.<sup>14~17</sup>

본 연구자는 국내에서는 아직도 미개척분야인 이 *Fusarium* 진균소독인 Deoxynivalenol을 물 포화 silica gel chromatography법으로 생산하고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**진균접종 :** 멸균 흡속에 보존되어 있는 *Fusarium graminearum* R 6575(*Gibberella zeae* U5375 · Michigan State University U.S.A)을 potato dextrose agar plate에 접종하고 25°C에서 7일간 배양하였다. 90ml carboxymethyl cellulose(CMC)배지에 agar plugs를 3~4개 넣고 25°C에서 진탕배양하였다. 진탕배양후 여과하고 macroconidia 농도를 측정하였다.

**DON 추출 :** 추출방법은 Pathre와 Mirocha<sup>15</sup>의 방법에 따라 60% methanol로 blending하고 믹스된 것을 여과하

여 methanol을 증발시켰다. 추출물을 sodium chloride로 포화시킨후 침전물을 제거하였다. 침전물제거후 ethylacetate : water(1 : 2)의 비율로 3번 추출여과하고 감압농축후 silica gel chromatography 용으로 공하였다.

**Silica Gel Chromatography :** 37mm i.d. Michel-Miller glass chromatographic column 에 silica gel (Davisil, 200/425 mesh, 60A, 99+)을 채우고 유속(flow rate)을 5ml/min(10~40 psi)로 유지하였다. 500~600ml의 증류수로 칼럼을 포화시키고, methylene chloride로 물이 나오지 않을때까지 칼럼을 통과시켰다. 시료를 칼럼에 넣고 fraction collectors로 10ml씩 채취하여 TLC로 체크하였다. TLC상에 DON이 체크되면 methylene chloride를 중단하고 증류수로 교체하여 DON이 나타나지 않을때까지 다시 10ml씩 채취하여 TLC 상에서 체크하였다. DON이 함유되어 있는 분획만 모아서 ethyl acetate로 추출, 농축하였다.

**DON crystallization :** 농축추출물을 질소로 고정 건조시킨후 소량의 ethyl acetate로 녹인다음 표준 DON을 뿌려서 결정화시켰다. 침전물이 생기면 ethyl acetate로 다시 녹여 여과시켜서 보관하였다. 결정화된 DON은 TLC 및 HPLC로 확인하였다.

**Analytical procedures :** 20×10cm silica gel G plate (Redi plates, Fish Scientific Co.)에 농축된 시료를 점적하고 toluene-ethyl acetate(1 : 3)으로 전개, 건조한 후 15% aluminum chloride용액으로 발색시키고 110°C에서 5분간 가열한후 365nm UV로 표준 DON과 비교하였다. 결정화된 DON의 순도확인은 HPLC(ISCO, Lincoln, N.E)로 확인하였고, 이에 사용된 pump는 model 2300 HPLC pump와 V<sup>4</sup> variable wavelength 검출기(detector)이며 파장은 224nm, sensitivity은 0.05 a.u.f.s., 이용된 칼럼은 RP-18 spheri-10 MPLC analytical (22cm×4.6mm i.d.)을 이용하였다. 이동상(mobile phase)은 50% methanol(Vol/Vol), 유속은 2ml/min으로 하였다. 물층에 있는 독성성분과 methylene chloride 층에 있는 독성성분간의 ratio(toxin concentration in water/toxin concentration in methylene chloride)를 비교하여 partition coefficient를 측정하였다.

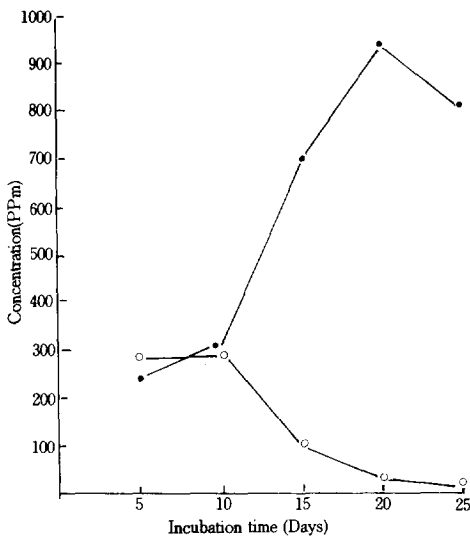
## 결 과

**DON 생산 :** *F. graminearum* R 6576을 배양하여 얻은 10<sup>6</sup> macroconidia를 배지에 접종하여 습도를 28%, 30%, 35%, 40%, 48% 온도를 20°C, 25°C, 28°C에서 5일 간격으로 25일동안 배양한 결과 습도 40%, 배양온도 28°C, 배양시간 20일에 DON이 가장 많이 산출되었고 그 농도는 940ppm이었다(Table 1). 15번 탄소에 acetylated 되

**Table 1.** Production of DON by *F. graminearum* R 6576 on rice at difference temperature and initial moisture contents(M.E± S.D)

Temp (°C)	Incubation time (days)	Concentration (ppm)				
		28%	30%	35%	40%	48%
19	10	NA	2.1±0.2	6.8±1.4	4.5±2.4	2.3±0.4
	15	NA	0.8±0.1	9.4±1.7	7.6±1.3	4.4±0.5
	20		1.9±0.1	9.1±2.1	10.1±3.4	3.9±1.4
	25		NA	26.3±4.3	20.4±4.1	8.4±2.0
25	10	50.2±1.2	150.7±21	103±9.0	80.1±2.5	16.1±2.4
	15	101.4±7.8	131.0±17	130.1±11	114.4±14	82.3±3.7
	20	90.0±3.1	104.1±8.9	209±12.1	180±21	101.2±10
	25	110.4±11.1	NA	185±18.2	201±27	94.7±6.9
28	10	19.6±1.2	43.5±2.4	320±10	307±10	50.1±4.3
	15	24.1±0.4	73.1±1.4	511±21	710±27	201.4±14
	20	40.2±2.1	107±16	703±27	940±18	411.3±21
	25	0.45±0.1	97.4±3.7	640±46	820±21	146.2±16

\*:None analysis



**Fig 1.** Production of DON and 15-ADON by *F. graminearum* R 6576 on rice (DON:●; 15-ADON:○)

어 생산되는 DON의 유도체인 15-acetyl DON은 배양후 5~10일 사이에 150~300ppm으로 나타났다(Fig 1).

**DON 정제:** 물로 포화시킨 silica gel column chromatographic에서 분리된 crude DON을 TLC상에 전개시킨 모양은 Fig 2에 나타나있다. 첫번째 fraction부터 80번째 fraction까지는 DON을 제외한 모든 색소와 대사산물들이 methylene chloride에 의해 용출되었는 반면에 DON은 칼럼에 남아 있었다. 81번째 fraction부터 용매를 증류수로 대체한 결과 85 fraction부터 97 fraction까지 methylene chloride와 증류수가 섞여서 나왔고, 98번 fracti-

on부터 DON만을 함유한 증류수 fraction이 나왔다. 140번째 fraction부터 DON은 나타나지 않았다. DON 농도는 DON이 나타나기 시작한 첫 번째 fraction에서는 높았으나 fraction이 많이 진행될수록 그 농도는 점차 감소하였다(Fig 2). fraction 98번째부터 145번째 fraction을 모아 결정화 시킨결과 약 2.5g의 DON을 얻을 수 있었다. 얻어진 DON을 Mass spectrometry로 확인하고(Fig 3), 순도는 HPLC로 확인하였다(Fig 4).

## 고찰

Tricothecene mycotoxins인 nivalenol, deoxynivalenol, T-2 toxin, zearalenone은 *Fusarium graminearum*에 의해서 생산되어진다. 이것들은 밀, 보리와 다른 곡류의 병을 유발시키는 대부분의 곰팡이가 원인체로서 작용한다. 이 곰팡이에 오염된 곡물들이 사람과 동물의 식량에 오염되어 독성을 유발시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1,4,5</sup> 이러한 중독에는 *Fusarium*에 감염된 곡물을 먹으므로써 러시아에서 alimentary toxic aleukia라는 중독증이 발생한 바 있고,<sup>6</sup> 동물에서는 fusariotoxicoses라는 중독증을 유발한 바 있다.<sup>18</sup> DON과 T-2 toxin은 사료섭취거부<sup>2</sup>, 신경증상<sup>20</sup>, 출혈 등<sup>8</sup>을 유발한다. 이러한 진균독소의 중독 증 연구를 위해서 실험실에서 *Fusarium* spp의 생산이 되고 있다.<sup>2,3,13,21,22</sup> 이 연구중 액체배지를 이용하여 생산하는 방법<sup>21,22</sup>과 고체배지를 이용하는 방법 등이 소개되었다.<sup>2,23</sup>

본 실험에서 *F. graminearum* R 6576을 이용하여 습도, 온도, 배양시간을 달리하여 DON을 생산한 결과 습도 40%, 온도 28°C, 배양시간 20일에서 최대의 DON 생산

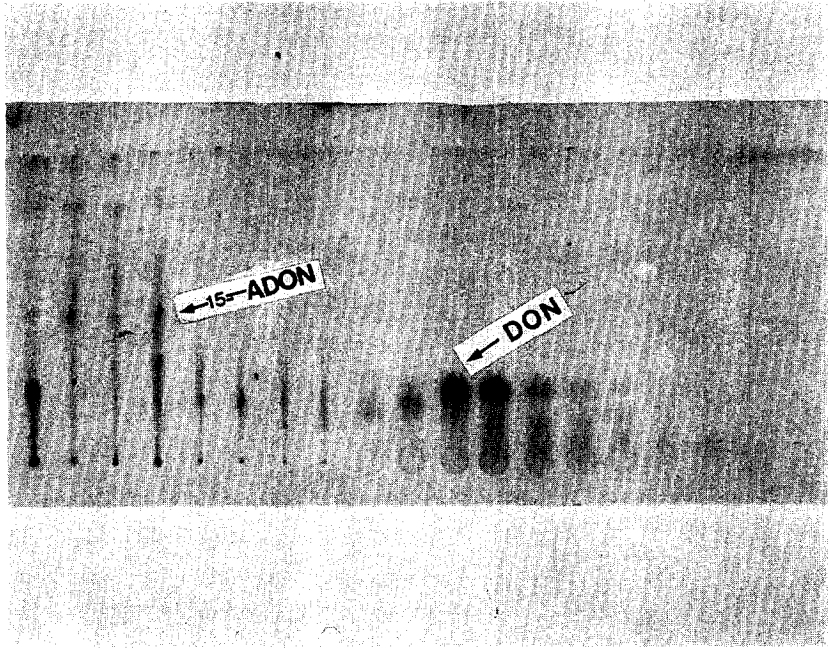


Fig 2. Elution pattern of crude extract on water-saturated silicagel column.

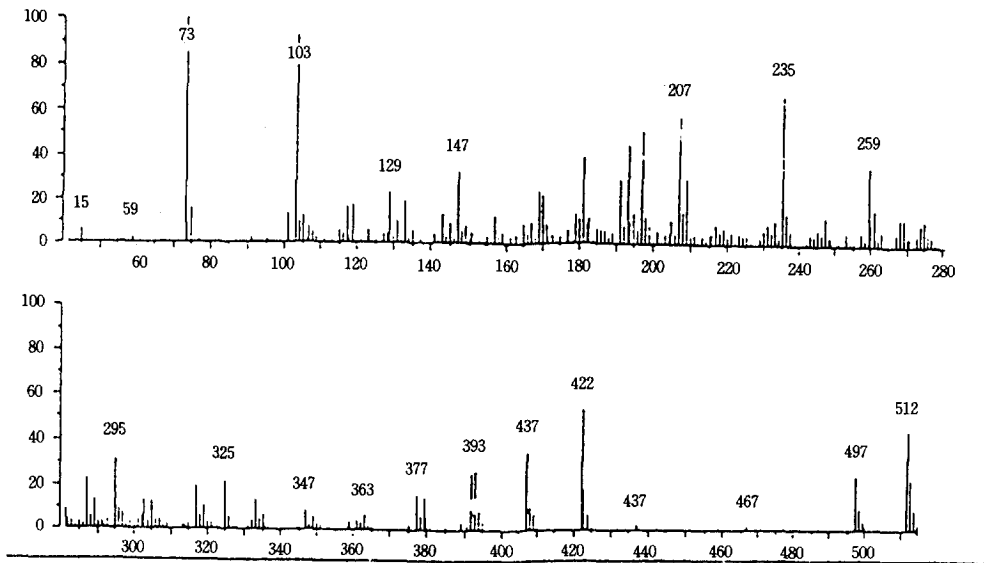


Fig 3. Mass spectrum of trimethylsilyl(TMS) derivative of deoxynivalenol produced by *F. graminearum*.

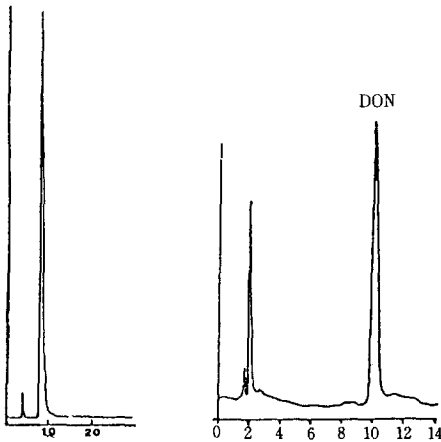


Fig 4. HPLC profile of DON (left-standard, right- from *F. graminearum* culture extracts).

을 얻을 수 있었고 시간이 경과할 수록 DON 생산량은 줄어들었다. 이러한 결과는 Vesonder 등<sup>3</sup>의 보고와 일치하였다. 그러나 Witter 등<sup>12</sup>의 보고와 비교하면 최대의 DON을 생산할 수 있는 온도, 습도는 일치하나 배양 시간이 18일로 약간 짧게 나타났는데 이는 접종순서나 분리방법이 약간 다른데서 오는 것으로 생각되나 본 실험과 거의 같은 경향을 나타내었고, DON 유도체인 15-ADON 생산량도 같은 경향을 나타내었다. Pestka 등<sup>22</sup> 및 Bahrawy 등<sup>23</sup>은 본 실험과 같은 조건하에서 frie medium에 corn steep liquor (CSL)를 첨가하지 않고 배양생산하였을 때는 DON의 양이 극히 미량이었으나 fried medium에 4% CSL를 첨가하였을 때 최대의 DON을 얻을 수 있었다고 한다. Pestka 등<sup>22</sup> 및 Bahrawy 등<sup>23</sup>이 DON 생산에 사용한 배지가 액체배지였으나 본 실험 결과와 거의 일치하는 것으로 보아 Vesonder 등<sup>3</sup> 및 Miller<sup>13</sup>가 액체배지에서 DON 산출량은 고체배지보다 저하된다는 보고와는 상치된다. 이는 배지의 선택도 관여하겠지만 진균접종에서부터 배양, 추출, 정제를 하는데 연구자들이 사용한 방법들이 다 다르기 때문인 것으로 생각되어지나 그 이외에 DON을 생산하는데 영향을 미칠 수 있는 pH, 산소와 이산화탄소의 농도, 배양용기의 크기도 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 무어라 단언하기는 어렵다.

Greenhalgh 등<sup>24</sup>은 온도와 습도의 조건은 본 실험과 같으나 24일에 최대의 DON 생산을 얻었다고 한다. 이는 본 실험과 차이가 있다. 이것은 사용된 strain(*F. graminearum* DAOM 180378)이 다르기 때문인 것 같다. Richardson 등<sup>25</sup>은 습도 60%, 25°C에서 배양한 결과 28일에서 DON 생산량이 많았다고 한다. 이는 본 실험결과와

상이한데 이것은 곰팡이 성장조건중 가장 중요한 조건인 습도와 온도를 달리한 당연한 결과인 것 같다. *F. graminearum* R 6576으로 DON을 배양한 결과 15-ADON도 같이 산출되었는데 Miller 등<sup>13</sup>도 DON 배양때 DON과 같이 15-ADON이 생산된다는 보고를 한 바 있다. 그러나 Yoshizawa<sup>26</sup>은 15-ADON보다 3-ADON이 DON과 같이 산출된다고 보고하였는데 이는 사용균주가 *Fusarium roseum*이기 때문인 것으로 풀이된다. 그러나 Bahrawy 등<sup>23</sup>은 *F. graminearum* R 6576 이외에 *Van wert AI, stuckey, NRRL 5883*을 이용하여 배양한 결과 *F. graminearum* R 6576은 주로 DON을 생산하는 반면 *Van wert AI, stuckey, NRRL 5883*은 DON 보다 15-ADON을 주로 생산한다고 하였다. 이러한 결과는 *NRRL 5883* 등은 효소학적 혹은 화학적 반응으로 15-ADON이 DON으로 전환되는 능력이 제한된 strain인 것으로 추측하였다. 그러나 Vesonder 등<sup>3</sup>은 *NRRL 5883*이 DON을 많이 생산한다고 하였기 때문에 왜 strain 사이에 차이가 나는지는 앞으로 더 연구를 해야할 것 같다.

DON 정제시 DON을 함유하고 있는 fraction 등은 각 보고자들마다 상이한데<sup>12, 22~25</sup> 이는 이용한 silica gel, 용매, 유속 등이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 본 실험에서 DON 분리는 물로 포화시킨 silica gel에서 silica gel의 흡착기전보다는 액체-액체분리(liquid-liquid partitioning)에 의한 것 같다. 그리고 이때 silica gel은 흡착된 물층을 지지해주는 역할을 한다. DON이 물층으로 흡착되어 분리해 들어감으로 해서 column내에 저장되고 색소 및 기타 대사산물은 column내에 저류되지 못하고 용출되어 나온다. 이때 15-ADON은 DON과 불과 hydroxy group에 하나의 acetyl group으로 대체된 아주 유사한 물질이지만 column내에 저류되지 못하고 용출되어 나오는데 이는 DON과 15-ADON의 분배계수(partition coefficient)가 각각 20과 0.03으로 다르기 때문이며 이때 용매로 사용된 물과 methylene chloride 두 용매액상(liquid phases)차이 때문에 충분히 DON과 15-ADON의 분리는 용이한 것 같다. 이러한 사실은 Pathe와 Mir-ocha<sup>5</sup>이 가검물에서 DON을 추출하는 용매로 methanol 대신에 물을 사용하였고 또한 DON의 높은 수용성으로 보아서도 충분히 입증된다.

## 결 론

자연계에서 널리분포하고 가장 많이 분리되는 *Fusarium* 중 인축에 중독증을 유발하는 deoxynivalenol 대량생산을 위하여 *Fusarium graminearum* R 6576을 이용하여 배양한 결과는 다음과 같다.

1. 습도 40%, 온도 28°C, 배양시간 20일에서 가장 많

은 DON이 생산되었으며 그 농도는 940 ppm이었다.

2. 물 흡착 silica gel chromatography 방법으로 DON을 추출하였고, 이동상(mobile phase)을 methylene chloride로 하였을 때 DON이 선택적으로 추출되었고, 정제 DON의 순수성은 TLC 및 HPLC로 확인되었다. 또한 이 방법은 다른 DON 정제방법보다 소량의 유기용매만 필요하고 간편한 단계로서 정제할 수 있는 장점이 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Vesonder RF, Ciegler A, Jensen AH, Isolation of the emetic principle from *Fusarium* infected corn. *Appl Microbiol* 1973 ; 26 : 1008~1010.
2. Vesonder RF, Ellis JJ, Rohwedder WK. Swine refusal factors elaborated by *Fusarium* strains and identified as trichothecenes. *Appl Environ Microbiol* 1981 · 41 : 323~324.
3. Vesonder RF, Ellis JJ, Kwolek WF, et al. Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* NRRL 6101. *Appl Environ Microbiol* 1982 ; 43 : 967~970.
4. Yosizawa T, Morooka N. Deoxynivalenol and its monoacetate : New Mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agric Biol Chem* 1973 ; 37 : 2933~2934.
5. Morooka N, Uratsuji N, Yosizawa T, et al. Studies on the toxic substance in barley infected with *Fusarium* spp *J Food Hyg Soc Jpn* 1972 ; 13 : 368~375.
6. Ueno Y. Tricothecene mycotoxins mycology, chemistry and toxicology. *Adv Nutr Sci* 1980 ; 3 : 301~353.
7. Cote LM, Reynolds JD, Vesonder RF, et al. Survey of vomitoxin contaminated feed grains in mid-western United States and associated health problems in swine. *JAVMA* 1984 ; 184~189.
8. Tanaka T, Hasegawa A, Matuski Y, et al. A limited survey of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in 1984 UK-harvested wheat and barley. *Food Addic Contam* 1986 ; 3 : 247~252.
9. Ueno Y, Lee US, Tanaka T, et al. Examination of chinese and USSR cereals for the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicon* 1986 a ; 24 : 618~621.
10. Tanaka T, Hasegawa A, Yomamoto S, et al. World-wide contamination of cereal by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J Agri Food Chemi* 1988 ; 36 : 979~983.
11. Trenholm HL, Cochran WP, Cohem H, et al. Survey of vomitoxin contamination of the 1980 white wheat crop in Ontario Canada. *J Am Oil Chem Soc* 1981 ; 58 : 992a~994a.
12. Witt MF, Hart LP, Pestka JJ. Purification of deoxynivalenol by water saturated silica gel chromatography. *J Agri Food Chemi* 1985 ; 33 : 745~748.
13. Miller JD, Taylor A, Greehalgh R. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Can J Microbiol* 1983 ; 29 : 1171~1178.
14. Scott PM, Lawrence GA, Telli A, et al Preparation of deoxynivalenol from field inoculated corn. *J Assoc Off Anal Chem* 1984 ; 67 : 32~34.
15. Pathre SV, Mirocha CJ. Analysis of deoxynivalenol from culture of *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 1978 ; 35 : 992~994.
16. Bennet GA, Peterson RE, Plattner RD, et al. Isolation and purification of deoxynivalenol and a new tricothecene by high pressure liquid chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 1981 ; 58 : 1002~1005.
17. Eppley RM, Trucksess MW, Nesheim S, et al. Deoxynivalenol in winter wheat : Thin layer chromatographic method and survey. *J Assoc Off Anal Chem* 1984 ; 67 : 43~45.
18. Pier AC. An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. *J Am Vet Med Ass* 1973 ; 163 : 1259~1261.
19. Lillehoj EG. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, *Fusarium* toxins and zearalenone. *J Am Vet Med Ass* 1973 ; 163 : 1281~1284.
20. Wyatt RD, Colwell WM, Halmiton PB, et al. Neural disturbances in chickens caused by dietary T-2 toxin. *Appl Microbiol* 1973 ; 26 : 757~761.
21. Ueno Y, Sawano M, Ishii K. Production of tricothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake cultures. *Appl Microbiol* 1975 ; 30 : 4~9.
22. Pestka JJ, Bahrawy AE, Hart LP. Deoxynivalenol and 15-monoacetyl deoxynivalenol production by

- Fusarium graminearum* R 6576 in liquid media. *Mycopathologia* 1985 ; 91 : 23-28.
23. Bahrawy AE, Hart LP, Pestka JJ. Comparison of deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates in corn steep-supplemented fries medium. *J Food Protection* 1985 ; 48 : 705-708.
  24. Greenhalgh R, Neish GA, Miller JD. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalol, and zearalenone formation by canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solide substrates. *Appl Environ Microbiol* 1983 ; 46 : 625-629.
  25. Richardson KE, Hagler WM, Cample CL, et al. Production of zearalenone, T-2 toxin and deoxynivalenol by *Fusarium* spp. isolated from plant materials grown in north calornia. *Mycopathologia* 1985 ; 90 : 155-160.
  26. Yoshizawa T. Red-mold diseases and natural occurrence in Japan. In : Ueno Y, ed. Tricothecene-chemical, biological, and toxicological aspects. *Elsevier New York* 1983 ; 195-209.
-