

MONİLİFORMİN MİKOTOKSİNİNİN *in vitro* GENOTOKSİK ETKİLERİ

Hüseyin AKSOY¹, Serkan YILMAZ², Mustafa ÇELİK³,
Deniz YÜZBAŞIOĞLU⁴, Fatma ÜNAL⁴

¹ Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Serdivan, SAKARYA

² Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Osmaniye MYO Teknik Programlar Bölümü,
Çevre Koruma Programı, OSMANİYE

³ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, KAHRAMANMARAŞ

⁴ Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, ANKARA
E-posta:haksoy@sakarya.edu.tr

ÖZET

Mikotoksinler çeşitli mantar türleri tarafından oluşturulan, insan ve hayvan besinlerinde de bulunabilen, ikincil metabolitlerdir. Birçok mikotoksinin mutajenik oluşunu açıklayan çalışmalar vardır. Bu çalışmada, *Fusarium proliferatum*'un oluşturduğu Moniliformin mikotoksininin, *in vitro* insan lenfositlerindeki genotoksitesisi tek hücre jel elektroforezi (comet) tekniği kullanılarak araştırılmıştır. 2,5-25 µM'lık doz aralığı kullanılarak yapılan araştırmada Moniliformin mikotoksininin oluşturduğu DNA kırıklarının elektroforezle oluşturduğu kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti bakımından değerlendirmesi yapılmıştır. Araştırma sonucuna göre Moniliformin mikotoksininin kısa süreli muamelelerde *in vitro* genotoksik etkili bir ajan olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Moniliformin, Genotoksisite, Comet tekniği

in vitro GENOTOXIC EFFECTS OF MONILIFORMIN MYCOTOXIN

ABSTRACT

Mycotoxins are various fungal secondary metabolites that can be found in contaminated food and feed of humans and animals. There are investigations to explain that some mycotoxins may be mutagenic. In this study, it was investigated that genotoxicity of mycotoxin Moniliformin from *Fusarium proliferatum* in *in vitro* human lymphocytes that was used single cell gel

electrophoresis technique (comet). In this investigation, it was evaluated that tail length, tail intensity and tail moment from DNA breakage from mycotoxin Moniliformin in 2.5-25 µM dose intervals. The results demonstrate that mycotoxin Moniliformin is genotoxic effective agent in human lymphocytes in vitro short time treatments.

Key words: *Moniliformin, Genotoxicity, Comet technique*

GİRİŞ

İnsanlar gerek çevresel faktörlere bağlı olarak ve gerekse beslenme kaynaklı olarak çeşitli toksinlere maruz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda da çeşitli sağlık sorunları ile karşılaşmakta ve hastalıklarla mücadele etmek durumunda kalınmaktadır. Mikotoksinler çeşitli mantar türleri veya küfler tarafından oluşturulan ve çoğunlukla kontaminasyon sonucu insan ve hayvan besinlerinde bulunan ikincil metabolitlerdir [1-3]. Mikotoksinler başlıca *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* ve *Fusarium spp.* cinsi mantarlar tarafından üretilen toksik ikincil metabolitlerdir. Bununla birlikte mikotoksinler buğday, arpa, mısır ve pirinç gibi besin kaynaklarının yaygın kontaminantlarıdır. İnsan ve hayvan besinlerindeki mikotoksinlerin temel kaynağı da bu ve bunlardan elde edilen ürünlerdir. Bu nedenlerle de insan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır [4]. Mikotoksinlerle kontamine olmuş bu gıdaların yenmesi durumunda patojenik durumlar ortaya çıkabilir, karaciğer, böbrek, sinir sistemi hasarları ve hatta kanser gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir [5, 6].

Fusarium cinsine ait mantarların mısır ve çeşitli hububat bitkilerinin gövde ve hava köklerine yerleşmesiyle oluşturduğu mikotoksinler ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır. Diğer yandan depolanan ürünlerde de mikotoksinler birikerek tehlikeli boyutlara ulaşabilir [7].

Bütün dünyada mikotoksinler gıda ve ürünlerin ticaretinde ve pazarlamasında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Sadece Amerika'da *Fusarium*-mikotoksinlerinden kaynaklanan buğday ve arpada yaşanan kayıp yıllık 2,9 milyar Amerikan Dolarını bulmuştur [8].

Bütün mikotoksinler mantar orijinli olsalar da mantarlar tarafından oluşturulan bütün toksik bileşikler mikotoksinler olarak adlandırılmazlar. Bakterilere karşı toksik olan mantar ürünleri antibiyotik (penisilin gibi) olarak, bitkilere karşı toksik olanlar fitotoksin olarak adlandırılırlar [9]. Omurgalılar ve diğeri hayvan gruplarına karşı mikotoksinler düşük konsantrasyonlarda toksik etki gösterirler. Etanol gibi diğeri düşük molekül ağırlıklı mantar metabolitleri ise sadece yüksek konsantrasyonlarda toksiktirler ve mikotoksin olarak değerlendirilmezler [10].

Mikotoksinler orijinlerine göre 3 gruba ayrılırlar. Bu gruplar isoprenoid yolu boyunca üretilen metabolitleri, poliketidleri ve amino asitlerden oluşan metabolitleri içerir [11]. Mikotoksinlerin toplam sayısı bilinmemekle birlikte, tanımlanan 300 civarında mikotoksinin yanında mantarların potansiyel toksik metabolitlerinin binlerce olduğu tahmin edilmektedir [5].

Moniliformin (3-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione) ilk defa Cole ve arkadaşları [12] tarafından *Fusarium moniliforme* kültüründen izole edilmiştir. Daha sonra ise *Fusarium proliferatum*'dan tanımlanmıştır [13]. Moniliforminin keşfinden sonra çok sayıda çalışma, bazı çalışmaların [14-16] aksine, *F. moniliforme*'nin Moniliformin üretmediğini ortaya koymuştur [17-19].

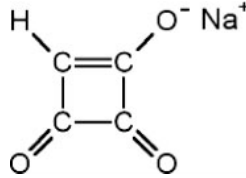
Moniliforminin genotoksitesitesi ile sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan, Ames testi [20, 21], *E. coli* K-12 suşuyla SOS-spot testi, *Bacillus subtilis* bakterisiyle *recA* testi [22, 23] ve rat hepatositlerinde programlanmamış DNA sentezi testlerinde [24] negatif sonuçlar elde edilmiştir. Bunlara karşılık, bitkilerde [25], rat hepatositlerinde [21], insan lenfositlerinde [26] yapılan araştırmalarda pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Çeşitli hücre tiplerinde de Moniliforminin sitotoksitesitesi gösterilmiştir [27-29].

Bu çalışmada, Moniliformin mikotoksininin, kısa süreli mutajenite testlerinden olan Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (Single Cell Gel

Electrophoresis-Comet) yöntemiyle in vitro insan lenfositlerinde genotoksisitesi araştırılmıştır. Comet olarak alkali Comet uygulanmış ve tek hücrede oluşan tek zincir kırıkları analiz edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, Moniliformin mikotoksininin insan periferik lenfositlerindeki potansiyel genotoksisitesinin araştırılması ve bu konudaki tartışmalara ışık tutmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Test materyali olan Moniliformin (Katalog No: 71376-34-6) (Şekil 1), NaCl (Katalog No: 7647-14-5) H₂O₂ (Katalog No: 7722-84-1) Sigma'dan, EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Triton X-100 (Katalog No: 9002-93-1), DMSO (Katalog No: 67-68-5), Düşük erime ısıları agar (LMA) (Katalog No: 9012-36-6), Yüksek erime ısıları agar (NMA) (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog No: 1239-45-8), KCl (Katalog No: 7447-40-7) Applichem'den, PBS (Katalog No: L 1825), Trypan Blue (Katalog No: L 6323) ve Biocoll (Katalog No: L 6115) Biochrom'dan temin edilmiştir.



Şekil 1. Moniliforminin kimyasal yapısı

Araştırmanın yapıldığı comet tekniği, Singh ve arkadaşlarının [30] metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Sigara içmeyen bir bayan ve bir erkek bireyden heparinli enjektörle alınan periferik kandan, içerisinde 1'er mL (mililitre) fosfat tamponu (PBS) bulunan ependorflara, 100'er µL (mikrolitre) eklenerek, buz üzerinde bekletilmiş ve ependorfların dip kısmına 100'er µL lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) eklenerek 4 °C'de 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Ayırılan lenfositlerin 100'er µL'si 100'er µL test maddesinin çeşitli dozları ile (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 µM-mikromolar-) süspansiyon edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Trypan blue ile hücrelerin

canlılıkları (\geq % 97) tespit edilmiştir. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen tüplerden üst kısım atılmış ve 100'er µl PBS ile resüspanse edilmiştir. 75 µl düşük erime ısıly agar, 100 µl lenfositile karıştırılıp, önceden yüksek erime ısıly agar ile kaplanan lamların üzerine damlatılmış ve 24X60 mm'lik lamel ile kapatılmıştır. Bu halde preparatlar 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir.

Daha sonra lamların üzerindeki lameller dikkatlice kaldırılmış ve lizing solüsyonunda buzdolabında 1 saat bekletilmiştir. Buradan alınan lamlar, içerisinde elektroforez tamponu (pH>13) bulunan tanka yerleştirilmiş ve 20 dakika bekletilmiştir. 25 V (volt), 300 mA'de (miliamper) 20 dakika elektroforez yapıldıktan sonra preparatlar, nötralizasyon tamponu (pH=7,5) ile muamele edilmiştir. Etidyum bromidle boyanan preparatlar Olympus marka flörsan mikroskop (546 nm-nanometre- eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli) altında 40X objektifte incelenmiştir.

Her bir doz için her bir donörden 100'er hücre olmak üzere toplam 200 hücre "Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK" kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir. Tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapılmıştır.

Yapılan çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesinde *students-t* testi kullanılmıştır.

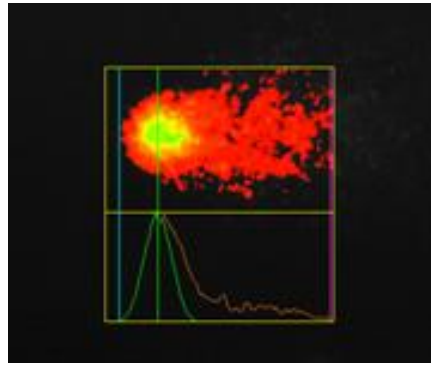
BULGULAR

Yapılan bu araştırmada Moniliformin mikotoksininin in vitro insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA kırıklarının, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti açısından elde edilen sonuçları Tablo 1’de gösterilmiştir. Comet testi ile elde edilen DNA kırıkları ve ölüm grafiği Resim 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Moniliformin ile muamele sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Dozlar (μM)	Kuyruk uzunluğu (μm)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk momenti
Kontrol	51,43 \pm 0,95	2,74 \pm 0,21	0,76 \pm 0,06
2,5	55,33 \pm 1,04*	4,02 \pm 0,33*	1,08 \pm 0,09*
5	53,22 \pm 0,90	4,75 \pm 0,75*	1,43 \pm 0,29*
10	46,88 \pm 1,03*	3,86 \pm 0,61	0,95 \pm 0,16
15	51,19 \pm 0,93	4,92 \pm 0,79*	1,35 \pm 0,28*
20	52,32 \pm 1,40	5,89 \pm 0,94*	1,80 \pm 0,34*
25	53,17 \pm 1,26	5,85 \pm 1,01*	1,77 \pm 0,48*
Pozitif kontrol (H_2O_2)	100,32 \pm 4,36	20,20 \pm 1,72	0,99 \pm 1,20

* Kontrolle göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark vardır (*students-t* testi)



Resim 1. Moniliformin muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü ve ölümü grafiği.

Moniliformin mikotoksini uygulaması ile DNA'da meydana gelen kırılmalar sonucu oluşan kuyruk uzunluğu 2,5 µM'lık dozda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken, 10 µM'lık dozda anlamlı bir azalış göstermiştir. Diğer dozlarda ise kontrole göre herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Oluşan kuyruktaki DNA yoğunluğunda ise 10 µM'lık doz dışındaki bütün dozlardaki artışlar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kuyruk momenti bakımından da kuyruk yoğunluğundakine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Comet testi DNA'da oluşan hasar ve tamirleri belirlemek için kullanılan hassas bir genotoksisite testidir [30-32]. Alkali comet tekniği ile tek zincir kırıklarının tespiti mümkün olduğu gibi nötral comet tekniği ile de çift zincir kırıklarının tespiti mümkün olmaktadır. Ayrıca, tamamlanmamış DNA tamir bölgelerini de gösteren bu teknik hassas, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olarak kabul görmektedir [32-35]. Bu teknikle, genetik toksikolojide, hemen hemen tüm hücrelerde DNA hasarı direkt olarak belirlenebilmektedir.

Moniliformin mikotoksini ile uyarılan DNA kırıklarının oluşturduğu kuyruk uzunluğunda, 2,5 µM'lık dozda kontrole göre artış gözlenirken, 10 µM'lık dozda bir azalış gözlenmiştir. Bizim düşünçemize göre bu durum, 2,5 µM'lık dozda oluşan kırıkların boyutunun küçük olduğu ve buna bağlı olarak elektroforez sırasında kontrole göre daha hızlı ilerlemiş ve anlamlı derecede bir artış gözlenmiştir. 10 µM'lık dozda ise oluşan kırıkların daha büyük olduğu ve bu nedenle de ilerleme daha yavaş gerçekleşmiştir. Kuyruk yoğunluğu ve momenti açısından da 10 µM'lık dozda artışlar gözlenmiş ancak, bu artışlar kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. Burada da yine, bu dozdaki kırık DNA'ların elektroforezde yavaş ilerlemelerine bağlı olarak, sınırlı bir alanda kalmışlar ve bu iki değerlendirme ölçütü bakımından anlamlı bulunmamıştır. Diğer dozlarda her iki ölçüt için anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Kısa süreli bir uygulama olmasına karşın, comet analizinde, özellikle kuyruk yoğunluğu ve momentindeki bu anlamlı artışlar Moniliformin mikotoksininin DNA'larda kırıklara neden olduğu ve bu nedenle de klastojenik etkili bir toksin olduğu görülmektedir. Çelik ve arkadaşlarının [26], Moniliformin mikotoksininin insan lenfositlerindeki muhtemel genotoksitesinin belirlenebilmesi için yaptıkları çalışmada, Moniliforminle 48 saat süreyle muamele edilen lenfositlerde kromozomal anormallik testinde 10 µM'lık ve daha yüksek dozlarda kontrole göre anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu çalışmada en fazla kromatit kırıkları gözlenirken, ikinci sırada kromozom kırıkları yer almıştır. Bu sonuçlar dikkate alındığında bizim çalışmamızla uygunluk göstermektedir. Çünkü comet testinin esası DNA'da oluşan kırıklardır. Kardeş kromatit değişimi ve mikronukleus testlerinde de 15 µM'lık ve daha yüksek dozlarda kontrole göre anlamlı artışlar gözlenmiştir [26]. Yine aynı araştırmacılar mitotik indekste hiçbir dozda kontrole göre anlamlı farklılıkların olmadığını açıklamışlardır. Bu sonuçlara göre gerek bizim çalışmamızdan ve gerekse Çelik ve arkadaşlarının [26] yaptıkları çalışmadan, Moniliformin mikotoksinin klastojenik ya da genotoksik etkili bir ajan olduğu anlaşılmaktadır. Mitotik indekste anlamlı bir farklılığın olmaması, bu ajanın sitotoksik olmadığını da bir göstergesi olarak düşünülebilir.

Moniliformin genotoksitesini ile ilgili negatif sonuçların gözlemlendiği çalışmalarla birlikte [20, 22-24], sitotoksitesinin olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [27-29]. Wehner ve arkadaşları [20] ile Knasmüller ve arkadaşları [21], Moniliforminin Ames testinde mutajenik olmadığını ve buna bağlı olarak genotoksik kanserojen olmadığını açıklamışlardır. Knasmüller ve arkadaşları [21] aynı zamanda, rat karaciğerinde yaptıkları araştırmada hücre bölünmesinin inhibe edildiğini ve kromozom kırıklarına rastlandığını tespit etmişlerdir. Styer ve Culter [25], yüksek konsantrasyonlardaki Moniliforminin iğ ipliklerinde bozulmalara neden olduğunu ve bunun c-mitozla sonuçlanarak metafazda birikmenin gözlemlendiğini açıklamışlardır.

Biyokimyasal olarak, mikotoksinlerin etki şekli dört kategoriye ayrılabilir [36]. Bunlar, DNA ile etkileşim, protein sentezinin değışik yollarla inhibisyonu ve hücre zarları veya enerji metabolizması üzerine etkileridir. Belirli bir mikotoksin aynı anda birkaç mekanizmayla birlikte etkili olabilir. Mikotoksinler aynı zamanda, fitotoksik, antimikrobal ve ansektisidal özellikte olabilir.

Moniliforminin sitotoksitesisi lenfosit, iskelet ve kas kası hücreleri haricinde genellikle oldukça düşüktür [4]. Akut Moniliformin toksisitesinin ana belirtileri kaslarda zayıflama, solunum güçlüğü, kalp kası tahribatı, böbrek, akciğçer ve pankreas gibi organlarda histopatolojik değışimler ve bunları takiben koma ve ölüm şeklindedir [37].

Moniliforminin insan lenfositlerindeki oluşturduğu mutasyon mekanizması henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte reaktif oksijen türlerini (ROS) inhibe eden glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz inhibisyonuna neden olmaktadır [38]. Moniliformin maruziyetini takiben ROS üretiminde artışlar gözlenmiştir [29]. ROS'nin DNA molekülünü etkilediğı ve DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına neden olduğı da bilinmektedir. Theil [39], Moniliforminin toksisitesinin moleküler mekanizmasının piruvatın kreps döngüsüne katılımının inhibe edilmesi şeklinde olduğunun düşünölebileceğini açıklamışlardır. Buna ilaveten, kreps döngüsünde bulunan α -ketoglutaratın oksidasyonunun engellendiğı ve sitrat basamağı daha az inhibe edilerek α -ketoglutaratın kısmi oluşumuna izin verildiğı açıklanmaktadır. Burka ve arkadaşları [40] ile Gathercole ve arkadaşları [41], Moniliforminin piruvat dehidrojenaz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe ettiğini tespit ettikten sonra önerilen bu mekanizmayı desteklemişlerdir. Daha başka bir araştırmada da Moniliforminin α -ketoglutarat dehidrojenaz, piruvat dekarboksilaz ve asetohidroksiasit sentetazların aktif bölgelerini inhibe ettiğı ortaya çıkarılmıştır [42]. Moniliformin aynı zamanda transketolaz [40] ve aldoz redüktaz [43] enzimlerinin inhibisyonu ile karbohidrat mekanizmasıyla da ilişkilidir.

Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar açık bir şekilde gösteriyor ki, Fusarium kaynaklı bir toksin olan Moniliformin insan lenfositlerinde kısa süreli in vitro uygulamalarda DNA'da zincir kırıklarına neden olmakta ve bu nedenle de klastojenik etki göstermektedir. Bu etkinin organizma seviyesinde de olup olmadığının anlaşılabilmesi için çeşitli canlılar kullanılarak in vivo araştırmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. and Pavlovic, M., 1999, Toxic effects of mycotoxins in humans, *Bull WHO*, 77 (9), 754-766.
- [2]. Singh, N.D., Sharma, A.K., Dwivedi, P., Patil, R.D. and Kumar, M., 2007, Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study, *J Appl Toxicol*, 27, 589-601.
- [3]. Dönmez-Altuntas, H., Dumlupinar, G., Imamoglu, N., Hamurcu, Z. and Liman, B.C., 2007, Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes, *J Appl Toxicol*, 27, 337-341.
- [4]. Jestoi, M., 2008, Emerging *Fusarium* –Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, and Moniliformin—A Review, *Crit Rev Food Sci*, 48, 21-49.
- [5]. CAST (Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa.), 2003, Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, Task force report No. R139/January 2003.
- [6]. Bennett, J.W. and Klich, M., 2003, Mycotoxins, *Clin Microbiol Rev*, 16, 497-516.
- [7]. Bottalico, A., 1998, *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles in Europe, *J Plant Pathol*, 80, 85-103.
- [8]. Windels, C.E., 2000, Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the Northern great plains, *Phytopathology*, 90, 17-21.
- [9]. Graniti, A., 1972, The evolution of the toxic concept in plant pathology, p. 1-18. In R.K. Wood, A. Ballio and A. Graniti (ed.), *Phytotoxins in plant diseases*, Academic Press, New York.

- [10]. Bennett, J.W., 1987, Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology, *Mycopathologia*, 100, 3-5.
- [11]. Apsimon, J.W., 1994, The biosynthetic diversity of secondary metabolites. In: Mycotoxins in grains: compounds other than aflatoxin. pp. 3–18. Miller, J. D. and Trenholm, H. L., Eds., Eagan Press, St.Paul, Minnesota.
- [12]. Cole, R.J., Kirksey, J.W., Cutler, H.G., Doupink, B.L. and Peckham, J.C., 1973, Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on plants and animals, *Science*, 179, 1324–1326.
- [13]. Munimbazi, C. and Bullerman, L.B., 1998, High-performance liquid chromatographic method for the determination of moniliformin in corn. *J AOAC Intern*, 81(5), 999-1004.
- [14]. Rabie, C.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Lbben, A. and Vleggaar, R., 1982, Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa, *Appl Environ Microbiol*, 43(3), 517-521.
- [15]. Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A., 1986, Moniliformin production in *Fusarium* section Liseola, *Mycologia*, 78(2), 242-247.
- [16]. Mubatanhema, W., Moss, M.O., Frank, M.J. and Wilson, D.M., 1999, Prevalence of *Fusarium* species of the Liseola section on Zimbabwean corn and their ability to produce the mycotoxins zearalenone, moniliformin and fumonisin B1, *Mycopathologia*, 148, 157-163.
- [17]. Thiel, P.G., Meyer, C.J. and Marasas, W.F.O., 1982, Natural occurrence of moniliformin together with deoxynivalenol and zearalenone in Transkeian corn, *J Agricul Food Chem*, 30, 308-312.
- [18]. Schütt, F., Nirenberg, H.I. and Deml, G., 1998, Moniliformin production in the genus *Fusarium*, *Mycotoxin Res*, 14, 35–40.
- [19]. Vesonder, R.F., Wu, W., Weisleder, D., Gordon, S.H., Krick, T., Xie, W., Abbas, H.K. and McAlpin, C.E., 2000, Toxicogenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolated from dairy cattle feed produce fumonisins, moniliformin and a new C₂₁H₃₈N₂O₆ metabolite phytotoxic to *Lemna minor* L., *J Natl Toxins*, 9(2), 103-112.

- [20]. Wehner, F.C., Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G., 1978, Lack of mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Fusarium* mycotoxins, *Appl Environ Microbiol*, 35(4), 659-662.
- [21]. Knassmüller, S., Bresgen, N., Kassie, F., Mersch-Sundermann, V., Gelderblom, W., Zöhrer, E. and Eckl, P.M., 1997, Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins fumonisin B1, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutat Res*, 391, 39-48.
- [22]. Ueno, Y. and Kubota, K., 1976, DNA-attacking ağabeylity of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*, *Cancer Res*, 36, 445-451.
- [23]. Auffray, Y. and Boutibonnes, P., 1986, Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using *Escherichia coli* in the SOS spot test, *Mutat Res*, 171, 79-82.
- [24]. Norred, W.P., Plattner, R.D., Vesonder, R.F., Bacon, C.W. and Voss, K.A., 1992, Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes, *Food Chem Toxicol*, 30, 233-237.
- [25]. Styer, C.H. and Cutler, H.G., 1984, Effects of moniliformin on mitosis in maize (*Zea mays*.1984. L), *Plant Cell Physiol*, 25, 1077-1082.
- [26]. Çelik, M., Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. and Dönbak, L., 2009, Evaluation of the genotoxicity of fusarium mycotoxin moniliformin in human peripheral blood lymphocytes, *Environ Mol Mutagen*, (Basımda, DOI: 10.1002/em.20459).
- [27]. Dombrink-Kurtzman, M.A., Javed, T., Bennett, G.A., Richard, J.L., Cote, L.M. and Buck, W.B., 1993, Lymphocyte cytotoxicity and erythrocyte abnormalities induced in broiler chicks by fumonisins B1 and B2 and moniliformin from *Fusarium proliferatum*, *Mycopathologia*, 124, 47-54.
- [28]. Wu, W., Liu, T. and Vesonder, R.F., 1995, Comparative cytotoxicity of fumonisin B1 and moniliformin in chicken primary cell cultures, *Mycopathologia*, 132, 111-116.

- [29]. Reams, R., Thacker, H.L., Novilla, M., Laksa, D., Horn, J., Harrington, D., Greenlee, W. and Vesonder, R., 1996, Development of an L6 myoblast in vitro model of moniliformin toxicosis, *Mycopathologia*, 133, 105-114.
- [30]. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175, 184-191.
- [31]. Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res* 339, 37-59.
- [32]. Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. and Tsuda, S., 2002, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat Res*, 519 (1-2), 103-119.
- [33]. Ross, G.M., Mcnillan, T.J., Wilcox, P. and Collins, A.R., 1995, The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay) technical aspects and application. Report of the Fifth LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer research, *Mutat Res*, 337, 57-60.
- [34]. Tice, R.R. and Vazquez, M., 1998, Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells, *ILS*, 1-9.
- [35]. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F., 2000, Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-221.
- [36]. Betina, V. 1989, Bioactive molecules, Vol. 9: Mycotoxins-chemical, biological and environmental aspects, *Elsevier Sci Publ*, Amsterdam.
- [37]. Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., Steyn, P.S., Van Rensburg, S.J. and Steyn, M., 1977, Toxicity of a moniliformin-producing strain of *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* isolated from maize, *Food Chem Toxicol*, 15, 579-587.
- [38]. Chen, L.Y., Tian, X.L. and Yang, B., 1990, A study on the inhibition of rat myocardium glutathione peroxidase and glutathione reductase by moniliformin, *Mycopathologia*, 110, 119-124.

- [39]. Thiel, P.G., 1978, Amolecular mechanism for the toxic action of moniliformin, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, *Biochem Pharmacol*, 27, 483-486.
- [40]. Burka, L.T., Doran, J. and Wilson, B.J., 1982, Enzyme inhibition and the toxic action of moniliformin and other vinylogous α -ketoacids, *Biochem Pharmacol*, 31(1), 79-84.
- [41]. Gathercole, P.S., Thiel, P.G. and Hofmeyr, J.H.S., 1986, Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex by moniliformin, *Biochem J*, 233, 719-723.
- [42]. Pirrung, M.C. and Nauhaus, S.K., 1996, Cofactor-directed, time-dependent inhibition of thiamine enzymes by the fungal toxin moniliformin, *J Org Chem*, 61, 2592-2593.
- [43]. Deruiter, J., Jacyno, J.M., Cutler, H.G. and Davis, R.A., 1993, Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. II. Moniliformin and small ring analogues, *J Enzym Inhib Med Chem*, 7, 249-256.