

GRZYBY RODZAJU *ALTERNARIA* I ICH TOKSYCZNE METABOLITY WYSTĘPUJĄCE W NASIONACH RZEPAKU OZIMEGO

EWA JAJOR, GRZEGORZ WICKIEL, JOANNA HOROSZKIEWICZ-JANKA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
E.Jajor@iorpib.poznan.pl

I. WSTĘP

Do najczęściej identyfikowanych sprawców czerni krzyżowych na rzepaku należą *Alternaria brassicae* (Berkeley) Saccardo, *A. alternata* (Fr.) Keissel oraz *A. brassicicola* (Schweinitz) Wiltshire (Kochman i Węgorek 1997; Korbias i wsp. 2008). Objawy czerni krzyżowych obserwować można już na siewkach, potem na liściach, łodygach, a w okresie dojrzewania również na łuszczynach. Grzyby przerastają tkanki łuszczyn i zasiedlają nasiona. Nasiona takie są często niedojrzałe i charakteryzują się mniejszą masą oraz zmienioną kompozycją składu chemicznego (Humpherson-Jones i Maude 1982; Conn i wsp. 1990; Rotem 1998). Niepożądanym skutkiem obecności grzybów w lub na nasionach jest możliwość wytwarzania toksycznych metabolitów wtórnych zwanych mikotoksynami. Powszechnie występujący gatunek *A. alternata* może wydzieląć ponad 30 toksycznych substancji, z których najczęściej występującymi są alternariol (AOH – alternariol) i eter monometylowy alternariolu (AME – alternariol monomethyl ether). Mikotoksyny te mogą być produkowane również przez *A. brassicae* (Scott 2001; Ostry 2008).

Celem badań była ocena zasiedlenia nasion rzepaku ozimego przez grzyby rodzaju *Alternaria* oraz określenie zawartości AOH i AME w tych nasionach.

II. MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły nasiona rzepaku ozimego odmiany Lisek, zebrane z doświadczeń ścisłych przeprowadzonych w latach 2006–2008, w Polowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Winnej Górze. Nasiona pochodziły z roślin niechronionych fungicydami oraz z 4 obiektów chronionych, na których podczas wegetacji zastosowano w fazie pąkowania (BBCH 57–59) i pod koniec kwitnienia (BBCH 68–69) fungicydy: Amistar 250 SC (azoksystrobina 250 g/l) i Caramba 60 SL (metkonazol 60 g/l).

Z każdego obiektu pobrano po zbiorach, po 400 nasion (4 próby po 100 nasion). Nasiona odkażano przez 4 minuty w 5% podchlorynie sodu, płukano i suszono, a następnie wykładano na płytki Petriego z zakwaszoną pożywką PDA. Gatunki grzybów identyfikowano po 2–3-tygodniowej inkubacji w temperaturze 18°C, przy fotoperiodzie 12/12 h (Neergaard 1945; Simmons 2007). Otrzymane w doświadczeniach wyniki poddano analizie wariancji oraz zastosowano wielokrotny test Tukeya dla porównań parami badanych kombinacji.

Określenie zawartości alternariolu i eteru monometylowego alternariolu w nasionach rzepaku z poszczególnych obiektów wykonano według metody opracowanej przez Wickiela i wsp. (2010). AOH i AME ekstrahowano z próbek nasion rzepaku mieszaniną metanolu i wody. Przefiltrowany ekstrakt oczyszczano na polimerycznych kolumnach do ekstrakcji do fazy stałej – Oasis HLB firmy Waters. Toksyny eluowano mieszaniną metanolu i acetonitrylu. Eluat odparowywano, a pozostałość rozpuszczano w fazie ruchomej do analizy chromatograficznej. Wymienione mikotoksyny oznaczano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC – Refersed-Phase High-Performance Liquid Chromatography), z detekcją fluorometryczną (FLD – Fluorometric detection).

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzona analiza mikologiczna pozwoliła zidentyfikować na badanym materiale kilkanaście gatunków grzybów patogenicznych i saprotroficznych, wśród których dominowały grzyby rodzajów: *Alternaria*, *Cladosporium* oraz *Penicillium*. Zróżnicowane zasiedlenie odmian rzepaku przez grzyby uzyskano również w innych badaniach (Mrugas i Gwiazdowski 1998; Jajor 2006; Gwiazdowski i Wickiel 2009). Spośród grzybów rodzaju *Alternaria* obserwowano występowanie gatunków: *A. alternata*, *A. brassicae* i *A. brassicicola*. W badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w zasiedleniu nasion pochodzących z poszczególnych obiektów przez grzyby rodzaju *Alternaria* (tab. 1–3). Ilość nasion porażonych przez *Alternaria* spp. pochodzących z obiektów niechronionych była jednak często, w stopniu nieistotnym statystycznie, wyższa w porównaniu do ilości porażonych nasion pochodzących z obiektów chronionych przy pomocy fungicydów. Zasiedlenie nasion rzepaku przez grzyby zależało od warunków pogodowych panujących podczas sezonu wegetacyjnego (tab. 4). Największy odsetek nasion porażonych przez wymienione gatunki grzybów (od 7,75 do 15,5%) obserwowano w drugim roku badań (2007), który charakteryzował się w okresie kwitnienia i dojrzewania rzepaku wysokimi opadami deszczu (tab. 2, 4).

Wyniki doświadczeń potwierdzają występowanie na nasionach rzepaku trzech wcześniej omawianych gatunków rodzaju *Alternaria*, ale ich procentowy udział był zróżnicowany (Jajor 2006). Najliczniej izolowany był gatunek *A. alternata* i występował on w pierwszym (2006) i trzecim (2008) roku badań na 0,5 do 4,25% nasion (tab. 1, 3). W roku 2007 przez ten gatunek zasiedlonych było od 6,25 do 12% nasion (tab. 2). Uzyskane w badaniach wyniki znajdują potwierdzenie w pracach innych autorów, którzy podają, że z nasion najczęściej izolowanym gatunkiem jest *A. alternata* (Clear i Patrick 1995; Mrugas i Gwiazdowski 1998). Gatunek *A. brassicae* wystąpił na mniejszej ilości nasion (0–3,25%), podobnie jak *A. brassicicola* (0–1,75%). Oba gatunki najliczniej były wyosabniane w sezonie o największych opadach deszczu (tab. 2, 4).

Przeprowadzona analiza chromatograficzna pozwoliła na oznaczenie w nasionach rzepaku eteru monometylowego alternariolu (AME) oraz alternariolu (AOH) (tab. 1–3). Poziom AME w nasionach rzepaku pochodzących z poszczególnych obiektów był w większości powyżej granicy wykrywalności. Najwyższe skażenie AME stwierdzono w nasionach pochodzących z roku 2007 (49,4 i 56,0 ng/g). W nasionach z obiektu pochodzącego z tego samego sezonu oznaczono również AOH (31,4 ng/g). W pozostałych przypadkach zawartość AOH była najczęściej niższa niż granica wykrywalności (LOD – limit of detection) lub oznaczalności tego związku (LOQ – limit of quantitation). Na możliwość produkowania przez grzyby rodzaju *Alternaria* mikotoksyn – AOH i AME wskazywali również Scott (2001); Ostry (2008); Gwiazdowski i Wickiel (2009). W badaniach Gwiazdowskiego i Wickiela (2009), zawartość mikotoksyn w nasionach jarych odmian rzepaku była wyższa niż w ozimych, co było związane z większym zasiedleniem tych nasion przez grzyby rodzaju *Alternaria*. Zwiększone zasiedlenie przez grzyby nie zawsze jednak wpływa na wysoką ilość wytwarzanych przez nie mikotoksyn i odwrotnie (Horoszkiewicz-Janka i wsp. 2010). Na wydzielanie przez grzyby toksyn wpływa wiele determinantów powodujących stres środowiskowy (warunki pogodowe, czynniki chemiczne i biologiczne) oraz genotyp grzyba.

Tabela 1. Zasiedlenie nasion rzepaku ozimego odmiany Lisek przez grzyby rodzaju *Alternaria* oraz występowanie w nich mikotoksyn (Poznań, 2006)

Table 1. The colonization of seeds of winter oilseed rape of cultivar Lisek by the *Alternaria* fungi and the occurrence of their mycotoxins in seeds (Poznań, 2006)

Termin zabiegu Date of treatment	Fungicyd Fungicide	Procent nasion zasiedlonych przez <i>Alternaria</i> spp. Percentage of seeds colonized by <i>Alternaria</i> spp.				Zawartość mikotoksyn Content of mycotoxins [ng/g]	
		<i>A. alternata</i>	<i>A. brassicae</i>	<i>A. brassicicola</i>	ogółem total	AOH	AME
BBCH 57–59	Amistar 250 SC	2,00	0,25	0,50	2,75 a*	3,60	6,00
	Caramba 60 SL	1,75	0,00	0,00	1,75 a	< LOQ	< LOD
	kontrola – control	4,25	0,25	1,00	5,50 a	< LOD	10,40
BBCH 68–69	Amistar 250 SC	1,75	0,25	0,00	2,00 a	< LOD	8,10
	Caramba 60 SL	1,25	0,25	0,25	1,75 a	< LOQ	5,10
	kontrola – control	2,75	0,00	0,00	2,75 a	< LOD	6,60

LOD – granica wykrywalności – limit of detection AOH = 0,8 [ng/g], AME = 1,2 [ng/g]

LOQ – granica oznaczalności – limit of quantitation AOH = 2,0 [ng/g], AME = 4,0 [ng/g]

*w kolumnach jednakowymi literami oznaczono wielkości nieróżniące się istotnie
the quantities varying insignificantly were marked with the same letters in the columns

Tabela 2. Zasiedlenie nasion rzepaku ozimego Lisek przez grzyby rodzaju *Alternaria* oraz występowanie w nich mikotoksyn (Poznań, 2007)Table 2. The colonization of seeds of winter oilseed rape of cultivar Lisek by the *Alternaria* fungi and the occurrence of their mycotoxins in seeds (Poznań, 2007)

Termin zabiegu Date of treatment	Fungicyd Fungicide	Procent nasion zasiedlonych przez <i>Alternaria</i> spp. Percentage of seeds colonized by <i>Alternaria</i> spp.				Zawartość mikotoksyn Content of mycotoxins [ng/g]		
		<i>A. alternata</i>	<i>A. brassicae</i>	<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria</i> spp.	ogółem total	AOH	AME
BBCH 57–59	Amistar 250 SC	12,00	3,25	0,25	0,00	15,50 a*	31,40	49,40
	Caramba 60 SL	11,00	0,75	1,50	2,25	15,50 a	< LOD	6,90
	kontrola – control	11,00	0,75	1,75	1,25	14,75 a	< LOD	< LOQ
BBCH 68–69	Amistar 250 SC	6,25	1,00	0,50	0,00	7,75 a	< LOD	< LOQ
	Caramba 60 SL	9,75	2,00	1,25	0,00	13,00 a	< LOD	56,00
	kontrola – control	11,50	1,50	1,25	1,00	15,25 a	< LOD	7,00

LOD – granica wykrywalności – limit of detection AOH = 0,8 [ng/g], AME = 1,2 [ng/g]

LOQ – granica oznaczalności – limit of quantitation AOH = 2,0 [ng/g], AME = 4,0 [ng/g]

*w kolumnach jednakowymi literami oznaczono wielkości nieróżniące się istotnie
the quantities varying insignificantly were marked with the same letters in the columns

Tabela 3. Zasiedlenie nasion rzepaku ozimego Lisek przez grzyby rodzaju *Alternaria* oraz występowanie w nich mikotoksyn (Poznań, 2008)Table 3. The colonization of seeds of winter oilseed rape of cultivar Lisek by the *Alternaria* fungi and the occurrence of their mycotoxins in seeds (Poznań, 2008)

Termin zabiegu Date of treatment	Fungicyd Fungicide	Procent nasion zasiedlonych przez <i>Alternaria</i> spp. Percentage of seeds colonized by <i>Alternaria</i> spp.				Zawartość mikotoksyn Content of mycotoxins [ng/g]	
		<i>A. alternata</i>	<i>A. brassicae</i>	<i>A. brassicicola</i>	ogółem total	<i>A. alternata</i>	<i>A. brassicae</i>
1	2	3	4	5	6	7	8
BBCH 57–59	Amistar 250 SC	2,50	0,75	0,00	3,25 a*	< LOD	10,20
	Caramba 60 SL	1,25	0,00	0,00	1,25 a	< LOD	< LOD
	kontrola – control	3,75	0,25	0,50	4,50 a	< LOD	< LOD

1	2	3	4	5	6	7	8
BBCH 68–69	Amistar 250 SC	0,50	0,00	0,25	0,75 a	< LOD	< LOD
	Caramba 60 SL	1,75	0,50	0,00	2,25 a	< LOD	< LOD
	kontrola – control	2,00	0,25	0,00	2,25 a	< LOD	8,00

LOD – granica wykrywalności – limit of detection AOH = 0,8 [ng/g], AME = 1,2 [ng/g]

LOQ – granica oznaczalności – limit of quantitation AOH = 2,0 [ng/g], AME = 4,0 [ng/g]

*w kolumnach jednakowymi literami oznaczono wielkości nieróżniące się istotnie
the quantities varying insignificantly were marked with the same letters in the columns

Tabela 4. Warunki meteorologiczne w okresie kwitnienia i dojrzewania rzepaku
Table 4. Meteorological conditions at flowering and ripening of oilseed rape

Rok Year	2006				2007				2008			
Miesiąc Month	IV	V	VI	VII	IV	V	VI	VII	IV	V	VI	VII
Średnia temperatura Mean temperature [°C]	9,1	13,8	18,5	23,9	10,4	15,3	19,3	18,9	8,6	13,8	18,1	19,5
Suma opadów Sum of rainfall [mm]	59,4	47,5	14,3	20,3	13,0	78,6	88,0	136,3	35,6	12,9	8,4	63,2
Wilgotność względna Air humidity [%]	77,8	71,4	72,2	57,6	67,1	76,3	77,0	78,8	79,2	73,7	62,5	65,7

IV. WNIOSKI

1. Na nasionach rzepaku identyfikowano najczęściej gatunek *A. alternata*.
2. Poziom zasiedlenia nasion przez grzyby rodzaju *Alternaria* zależał głównie od warunków pogodowych panujących podczas wegetacji.
3. Największą zawartość AOH i AME obserwowano w nasionach, które były najsilniej zasiedlone przez grzyby rodzaju *Alternaria*.
4. Największe ryzyko zasiedlenia nasion przez grzyby i obecności w nich mikotoksyn istnieje w sezonie o podwyższonej wilgotności.

V. LITERATURA

- Clear R.M., Patrick S.K. 1995. Frequency and distribution of seedborne fungi infecting canola seed from Ontario and western Canada – 1989 to 1993. *Can. Plant Dis. Surv.* 75 (1): 9–17.
- Conn K.L., Tewari J.P., Awasthi R.P. 1990. A disease assessment key for *Alternaria* black spot in rapeseed and mustard. *Can. Plant Dis. Surv.* 70: 19–22.

- Gwiazdowski R., Wickiel G. 2009. Występowanie mikotoksyn alternaryjnych w nasionach rzepaku w zależności od odmian. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 49 (2): 934–937.
- Horoszkiewicz-Janka J., Korbas M., Jajor E., Krawczyk R. 2010. Mycotoxins content and colonization level in winter wheat grain cultivated in transition period following to ecological system. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* 55 (3): 117–121.
- Humpherson-Jones F.M., Maude R.B. 1982. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. *Ann. Appl. Biol.* 100: 61–71.
- Jajor E. 2006. Zasiadlenie nasion populacyjnych i mieszańcowych rzepaku ze zbioru w 2004. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 46 (2): 451–460.
- Kochman J., Węgorok W. 1997. *Ochrona Roślin*. Wyd. V. Plantpress, Kraków, 701 ss.
- Korbas M., Jajor E., Walczak F. 2008. Prognozowanie i sygnalizacja terminów zabiegów ochrony rzepaku przed chorobami. s. 8–44. W: „Poradnik Sygnalizatora Ochrony Rzepaku” (F. Walczak, red.). Inst. Ochr. Roślin – PIB, Poznań, 153 ss.
- Mrugas D., Gwiazdowski R. 1998. Patogeny wyizolowane z nasion rzepaku. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 38 (2): 461–463.
- Neergaard P. 1945. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium* Taxonomy. Parasitism. Economical Significance. Einar Munksgaard, Publisher, Copenhagen, 560 pp.
- Ostry V. 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in food. *World Mycotoxin J.* 1 (2): 175–188.
- Rotem J. 1998. The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology and Pathogenicity. The APS, St. Paul, MN, 326 pp.
- Scott P.M. 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *J. AOAC Int.* 84: 1809–1817.
- Simmons E.G. 2007. *Alternaria*. An Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Series No. 6, Utrecht, 775 pp.
- Wickiel G., Wower K., Gwiazdowski R., Horoszkiewicz-Janka J., Jajor E., Korbas M. 2010. Determination of selected *Alternaria* mycotoxins in rapeseed, rapeseed meal and rapeseed cake. p. 47. 9th. Int. Congress: Mycotoxins and Moulds. Bydgoszcz, 28–29.06.2010. Abstract, 155 pp.

EWA JAJOR, GRZEGORZ WICKIEL, JOANNA HOROSZKIEWICZ-JANKA

FUNGI OF THE *ALTERNARIA* GENUS AND THEIR TOXIC METABOLITES IN SEEDS OF WINTER OILSEED RAPE

SUMMARY

The aim of this study was the evaluation of the oilseed rape colonisation by *Alternaria* genus fungi and the determination of mycotoxins produced by them. The seeds of Lisek cultivar were collected from untreated plants and four objects which were treated at the budding stage (BBCH 58–59) and at the late flowering stage (BBCH 68–69) with fungicides Amistar 250 SC and Caramba 60 SL. After harvesting, the seeds were evaluated for the colonization by fungi of the genus of *Alternaria* and the content of the two alternaria toxins: alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME).

The most frequently occurring species was *A. alternata*. The level of colonization of the seeds by *Alternaria* fungi depended mainly on the weather conditions prevailing during the growing season. Higher content of AOH and AME was observed in the seeds which were colonised the most by the fungus of *Alternaria*.

Key words: rapeseed, *Alternaria* genus, alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME)