

Accumulation of zearalenone in winter wheat grain in the artificial inoculation conditions

Akumulacja zearalenonu w ziarnie pszenicy ozimej w warunkach sztucznej inokulacji

Agnieszka Waśkiewicz¹, Romuald Gwiazdowski², Monika Beszterda¹, Krzysztof Kubiak², Halina Wiśniewska³, Tadeusz Praczyk², Piotr Goliński¹

Summary

Fusarium culmorum have traditionally been associated with temperate cereals, since these fungi require somewhat lower temperatures for growth and mycotoxin production as compared to the aflatoxigenic *Aspergillus* species. The aim of the experiment was to determine, using chromatography analysis (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), the concentration of secondary metabolite – zearalenone (ZEA) in grain of different cultivars of winter wheat inoculated with *F. culmorum* (isolate KF 350). There were statistically significant differences in the degrees of contamination zearalenone in analyzed grains of winter wheat. The highest mean content of ZEA was found in grain of Kris (734.45 ng/g) and Zyta (154.35 ng/g) cultivars.

Key words: winter wheat, *Fusarium culmorum*, zearalenone, HPLC

Streszczenie

Grzyby strzępkowe gatunku *Fusarium culmorum* powszechnie kojarzone są z kolonizacją zbóż uprawianych w klimacie umiarkowanym, ze względu na niższe wymagania temperaturowe dla wzrostu i produkcji mikotoksyn w porównaniu z syntetyzującymi aflatoksyny grzybami z rodzaju *Aspergillus*. Celem przeprowadzonego doświadczenia była chromatograficzna (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) analiza stężenia metabolitu wtórnego – zearalenonu (ZEA) w ziarnie różnych odmian pszenicy ozimej inokulowanych *F. culmorum* (izolat KF 350). Stwierdzono, że badane odmiany pszenicy ozimej były istotnie zróżnicowane pod kątem zawartości zearalenonu. Najwyższe średnie stężenie toksyny odnotowano w odmianach: Kris (734,45 ng/g) oraz Zyta (154,35 ng/g).

Słowa kluczowe: pszenica ozima, *Fusarium culmorum*, zearalenon, HPLC

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Chemii

Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań
agat@up.poznan.pl; monika.beszterda@up.poznan.pl; piotrg@up.poznan.pl

² Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

R.Gwiazdowski@iorpib.poznan.pl; K.Kubiak@iorpib.poznan.pl; T.Praczyk@iorpib.poznan.pl

³ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
hwis@igr.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Pszenica należy do zbóż drobnoziarnistych szczególnie podatnych na atak i kolonizację grzybami z rodzaju *Fusarium*, przy czym w obrębie gatunku występuje zróżnicowanie podatności genotypów zarówno na samo porażenie kłosów przez patogen, jak i zawartość mikotoksyn w ziarnie (Goliński i wsp. 2010; Weber i wsp. 2011). Jednocześnie występowaniu infekcji sprzyja obecność patogenów w poprzednim sezonie wegetacyjnym oraz udział zbóż przekraczający 70% w ogólnym płodozmianie.

Od kilku lat prowadzone są, zakrojone na szeroką skalę, badania monitoringowe mające na celu określenie skali zanieczyszczenia środowiska naturalnego toksycznymi związkami o silnym działaniu estrogenym (Gromadzka i wsp. 2008). Zearalenon – mikotoksyna syntetyzowana przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, strukturą chemiczną przypomina naturalnie występujące estrogeny, takie jak: estradiol, estron i estriol i jest trzecią spośród najczęściej stwierdzanych mikotoksyn w tkankach zwierząt i roślin (Waśkiewicz i wsp. 2008; Goliński i wsp. 2009; Suchorzyńska i Misiewicz 2009). Zearalenon syntetyzowany jest poprzez szlak octanowo-polimalonianowy. Wykazano, iż w jego syntezie bierze udział wiele genów, które kodują enzymy określane mianem syntaz poliketydowych (PKSs – polyketide synthase) (Bingle i wsp. 1999). Największe ilości zearalenonu syntetyzowane są przy wilgotności około 16% i temperaturze poniżej 25°C (Goliński i wsp. 2010).

Założeniem niniejszego doświadczenia była chromatograficzna (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) analiza stężenia metabolitu wtórnego – zearalenonu (ZEA) w ziarnie różnych odmian pszenicy ozimej inokulowanych grzybem *Fusarium culmorum* (KF350), o potwierdzonym doświadczalnie potencjale toksynotwórczym.

Materiały i metody / Materials and methods

Doświadczenia prowadzono w Polowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Winnej Górze, w sezonie wegetacyjnym 2010/2011. Doświadczenie założono w uk-

ładzie bloków losowanych kompletnych w trzech powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 10,5 m², na czterech odmianach pszenicy ozimej: Bogatka, Kris, Muszelka oraz Zyta (tab. 1). W fazie BBCH 65–69 (kwitnienie) wykonano inokulację zawiesiną zarodników grzybów *Fusarium culmorum* (izolat KF 350) o stężeniu 2 mln zarodników/ml.

Uzyskane po zbiorze próbki ziarna po uprzednim zmieleniu, poddano ekstrakcji mikotoksyn i po przesączeniu poddano procesowi oczyszczania na kolumnkach powinowactwa immunochemicznego firmy Vicam®. Odparowaną do sucha pozostałość rozpuszczano w 200 µl mieszaniny acetonitryl:metanol:woda (70:20:10, v/v/v), homogenizowano w łaźni ultradźwiękowej i dozowano na kolumnę. Identyfikację jakościową i ilościową zearalenonu wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem aparatu Waters 2695, z zestawem detektorów Multi Fluorescence Detector Waters 2475, Photodiode Array Detector Waters 2996 oraz kolumną C18 Nova Pak 3,9 × 150 mm. Fazę nośną stanowiła mieszanina rozpuszczalników: acetonitryl: woda: metanol (46:46:8, v/v/v), rozdziału dokonano przy przepływie 0,5 ml/min i limicie detekcji 0,3 ng/g.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując analizę wariancji do weryfikacji hipotez zerowych o braku wpływu odmiany pszenicy ozimej na poziom stężenia zearalenonu w ziarnie. Obliczono wartości najmniejszych istotnych różnic na poziomie $\alpha = 0,05$ i na ich podstawie wyznaczono grupy jednorodne.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Problemy wynikające z patogenności i zdolności do syntezy mikotoksyn przez grzyby rodzaju *Fusarium* są jednym z ważniejszych zagadnień rolnictwa zarówno w krajach rozwijających się, jak również w krajach o wysokim poziomie praktyk agrotechnicznych. Podatność upraw pszenicy na *Fusarium* spp. i biosynteza mikotoksyn zależy od stopnia wirulencji patogenów oraz warunków pogodowych w trakcie okresu wegetacji roślin na polu i podczas ich zbioru.

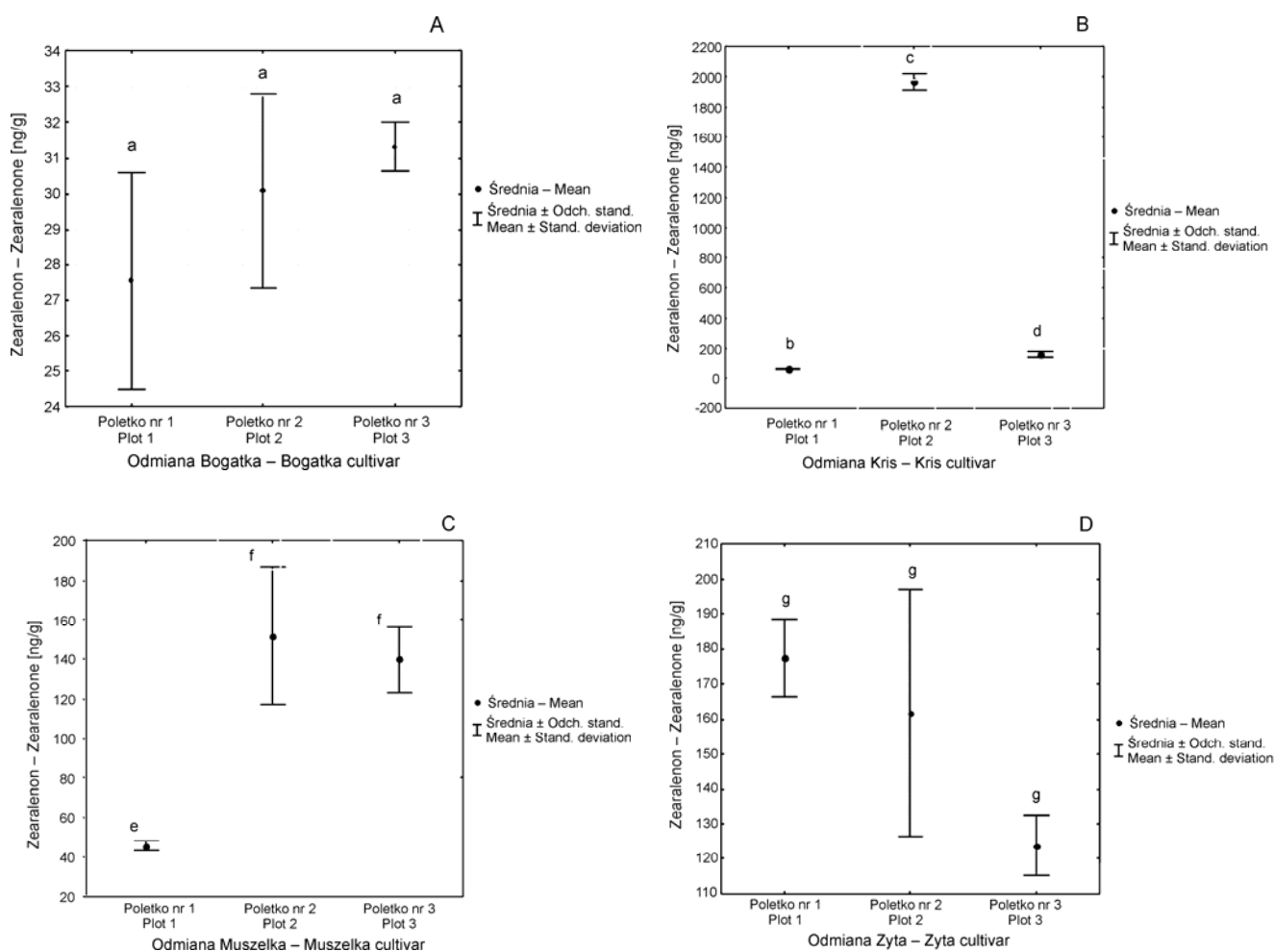
Tabela 1. Podstawowe wskaźniki wartości gospodarczej odmian pszenicy ozimej (według COBORU)
Table 1. Basic indicators of the economic value of winter wheat cultivars (by COBORU)

Odmiana Cultivar	Rok wpisu Year registration	Grupa wartości technologicznej Group of technological value	Plon ziarna – Grain yield [dt/ha]		Mrozoodporność Skala 9° Resistance to frost Scale 9°	Wysokość Height [cm]	Wyleganie Skala 9° Lodging Scale 9°
			poziom level a1	poziom level a2			
Bogatka	2004	chlebowa bread making	80,0	89,9	5	102	6,1
Kris	2000	chlebowa bread making	80,3	91,6	2,5	80	7,9
Muszelka	2008	chlebowa bread making	84,1	94,6	4	83	7,3
Zyta	1999	jakościowa qualitative	73,0	83,3	2,5	109	6,8

Tabela 2. Wartości średnie poziomu zearalenonu [ng/g] w ziarnie badanych odmian pszenicy ozimej wraz z określeniem grup jednorodnych ($\alpha = 0,05$)Table 2. Mean values of the level of zearalenone [ng/g] in grain of winter wheat cultivars with determined homogenous groups ($\alpha = 0.05$)

Odmiana Cultivar	Średnie stężenie zearalenonu Mean concentration of zearalenone [ng/g]	1	2
Bogatka	29,66	***	
Kris	734,45	***	***
Muszelka	112,41		***
Zyta	154,35	***	

***takie same symbole przy wartościach średnich w danej kolumnie oznaczają brak istotnych statystycznie różnic w poziomie stężeń zearalenonu w obrębie analizowanych próbek ziarna pszenicy ozimej (Test HSD Tukeya) – the same symbols for average values in a particular column indicate no statistically significant differences in the level of zearalenone concentrations within the analyzed samples of winter wheat grain (Tukey HSD test)

Rys. 1. Wyniki testu HSD Tukeya grupującego badane odmiany pszenicy (A – Bogatka, B – Kris, C – Muszelka, D – Zyta) ze względu na poziom zearalenonu. Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$ Fig. 1. The Tukey HSD test results grouping tested wheat cultivars according to the level of zearalenone (A – Bogatka, B – Kris, C – Muszelka, D – Zyta). Mean values marked by the same letters are not statistically significantly different at the level of $\alpha = 0.05$

We wszystkich analizowanych próbkach ziarna czterech odmian populacyjnych pszenicy ozimej poddanych wcześniejszej inokulacji zarodnikami grzyba *F. culmorum* (izolat KF350) wykryto obecność mikotoksyny – zearalenonu, przy średnim poziomie stężeń wynoszącym 257,72 ng/g. W badanym ziarnie średni poziom toksyny

był istotnie statystycznie zróżnicowany i kształtował się w zakresie od 29,66 ng/g (odmiana Bogatka) do 734,44 ng/g (odmiana Kris) (rys. 1, tab. 2).

Dla odmiany Bogatka średni poziom toksyny w ziarnie pochodzącym z trzech niezależnych poletek, kształtował się w przedziale stężeń od 24,84 do 32,87 ng/g (rys. 1A),

natomiast w przypadku odmiany Kris wynosił od 66,55 do 2018,23 ng/g (rys. 1B). W ziarnie odmian Muszelka i Zyta stwierdzono średni poziom ZEA na poziomie: 112,41 ng/g oraz 154,35 ng/g (tab. 2). W obrębie badanych odmian pszenicy ozimej wysoką zmienność stężenia toksyny zaobserwowano u odmiany Kris, natomiast względną stabilność dla obserwowanej cechy odnotowano dla odmian: Bogatka oraz Zyta. Uzyskane wyniki są zbieżne z danymi literaturowymi, gdzie podobne wartości stężeń zearalenonu uzyskano w doświadczeniu przeprowadzonym jednocześnie w dwóch niezależnych lokalizacjach na dziesięciu różnych odmianach pszenicy ozimej. Poziomy stężenie zearalenonu w ziarnie pochodzącym z kłosów poddanych inokulacji zarodnikami *F. culmorum* (izolat KF 846), kształtowały się w zakresie od 20 do 480 ng/g (Sitaniec, okolice Zamościa) oraz od 10 do 100 ng/g (Cerekwica, okolice Poznania) (Goliński i wsp. 2010). W innych badaniach przeprowadzonych przez Waśkiewicz

i wsp. (2008) w wyniku inokulacji różnych odmian pszenicy ozimej *F. culmorum* poziom ZEA kształtował się w granicach stężeń od 10 do 174 ng/g.

Wnioski / Conclusions

1. Spośród analizowanych odmian populacyjnych pszenicy ozimej, w ziarnie odmiany Bogatka stwierdzono najniższą zawartość zearalenonu równą 29,66 ng/g.
2. Dla odmiany Kris odnotowano najwyższy średni poziom stężenia zearalenonu wynoszący 734,45 ng/g.
3. Dużą zmiennością w stopniu kontaminacji ziarna zearalenonem charakteryzowała się odmiana Kris, w porównaniu do odmian: Bogatka oraz Zyta o stabilnych wartościach obserwowanej cechy.

Literatura / References

- Bingle L.E., Simpson T.J., Lazarus C.M. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* 26: 209–223.
- Goliński P., Waśkiewicz A., Gromadzka K. 2009. Mycotoxins and mycotoxicoses under climatic conditions of Poland. *Polish J. Vet. Sci.* 12 (4): 581–588.
- Goliński P., Waśkiewicz A., Wisniewska H., Kiecana I., Mielniczuk E., Gromadzka K., Kostecki M., Bocianowski J., Rymaniak E. 2010. Reaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to infection with *Fusarium* spp.: mycotoxin contamination in grain and chaff. *Food Add. Contam.* 27 (6): 1015–1024.
- Gromadzka K., Waśkiewicz A., Chełkowski J., Goliński P. 2008. Zearalenone and its metabolites – occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin J.* 1 (2): 209–220.
- Suchorzyńska M., Misiewicz A. 2009. Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Post. Mikrobiol.* 48 (3): 221–230.
- Waśkiewicz A., Gromadzka K., Wisniewska H., Goliński P. 2008. Accumulation of zearalenone in genotypes of spring wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. *Cereal Res. Comm.* 36, Suppl. B: 401–404.
- Weber R., Matkowski K., Śmiałek E. 2011. Analiza korespondencji porażenia ziarna u odmian pszenicy ozimej przez *Alternaria alternata* i grzyby z rodzaju *Fusarium*. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 51 (2): 700–703