

Evaluation of the concentration level of fumonisins in various corn cultivars

Ocena poziomu stężeń fumonizyn w różnych odmianach kukurydzy

Piotr Szulc¹, Andrzej Kruczek¹, Jan Bocianowski², Agnieszka Waśkiewicz³,
Monika Beszterda³, Piotr Goliński³

Summary

Fumonisin are important naturally-occurring mycotoxins produced purely by *Fusarium* species. The occurrence, frequency and implication of mycotoxins entering the food and feed chain through cereal grain have gained global attention over the last decade. The aim of this work was to monitor fumonisin synthesis in sixteen cultivars maize grain samples in four replication. There were statistically significant differences in the degree of contamination of fumonisins in analysed cultivars of maize. We found that the selected corn cultivars were significantly different in terms of the content of fumonisins. Hybrids with F (flint) and D (dent) grain type had significantly higher content of fumonisins than those of mixed type D/F (dent/flint) and F/D (flint/dent). Together with an increase in FAO number, fumonisins concentration decreased.

Key words: maize, *Fusarium* spp., fumonisins, high performance liquid chromatography (HPLC)

Streszczenie

Fumonizyny należą do mikotoksyn syntetyzowanych w warunkach naturalnych przez liczne gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium*. Występowanie, częstotliwość i następstwa obecności mikotoksyn fuzaryjnych w ziarnie zbóż i tym samym w żywności i paszach stało się w ostatnich latach przedmiotem wnikliwych badań. Celem pracy było monitorowanie syntezy fumonizyn w ziarnie szesnastu odmian kukurydzy. Stwierdzono, że badane odmiany kukurydzy były istotnie zróżnicowane pod kątem zawartości fumonizyn. Mieszańce w typie ziarna F (flint) i D (dent) charakteryzowały się zdecydowanie wyższą zawartością fumonizyn, niż te w typie mieszanym D/F (dent/flint) i F/D (flint/dent). Wraz ze wzrostem liczby FAO zmniejszał się generalnie poziom stężeń fumonizyn.

Słowa kluczowe: kukurydza, odmiany, *Fusarium* spp., fumonizyny, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Agronomii
Dojazd 11, 60-623 Poznań
pszulc@up.poznan.pl; kruczek@up.poznan.pl

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych
Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań
jboc@up.poznan.pl

³Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Chemii
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań
agat@up.poznan.pl; monika.beszterda@up.poznan.pl; piotrg@up.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Kosmopolityczne grzyby rodzaju *Fusarium* należą do najczęściej izolowanych patogenów upraw rolniczych na świecie (Suchorzyńska i Misiewicz 2009). Struktura i wielkość ziarniaków oraz długi okres dojrzewania kolby powodują, że kukurydza jest bardziej narażona na infekcję grzybami mikroskopowymi w stosunku do zbóż drobnoziarnistych (Sulewska i wsp. 2006). Za źródło infekcji *Fusarium* spp. uważa się materiał siewny, glebę oraz tzw. rośliny rezerwurowe – chwasty, na których rozwijają się bezobjawowo, nie tracąc patogenności (Tekieła 2009; Wit i wsp. 2010). Trudność w zwalczaniu tych grzybów wynika z tego, że są to organizmy ubikwistyczne, dobrze przystosowane do zmieniających się warunków atmosferyczno-glebowych, o dużej tolerancji w stosunku do czynników środowiska i rozwijające się w szerokim zakresie temperatur 0–30°C. Wykształciły one również liczne mechanizmy pozwalające na skuteczną konkurencję o nisze ekologiczne. Wśród mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby rodzaju *Fusarium*, grupę ważnych metabolitów stanowią fumonizyny (Marasas i wsp. 2004). Jest to rodzina poliketydowych pochodnych, strukturalnie bardzo podobna do sfinganiny, inhibująca biosyntezę sfingolipidów, a tym samym toksyczność tej grupy związków w stosunku do roślin, zwierząt, a także ludzi (Wit i wsp. 2010). Zawartość mikotoksyn w porażonym materiale roślinnym, w największym stopniu, zależy od czynników środowiskowych wzajemnie oddziałujących z genotypem roślin (Płaskowska 2010).

Celem pracy była ocena zróżnicowania poziomu stężeń fumonizyn w ziarnie szesnastu odmian kukurydzy pastewnej.

Materiały i metody / Materials and methods

Doświadczenie polowe wykonano w Katedrze Agromonii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, na polach Zakładu Dydaktyczno-Doświadczalnego w Swadzimiu, w dwóch sezonach wegetacyjnych 2009 i 2010, w czterech powtórzeniach polowych. Materiał do badań stanowiło ziarno szesnastu odmian kukurydzy pastewnej typu flint (F), dent (D) oraz mieszanych flint/dent (F/D) i dent/flint (D/F): PR 39 D 60 (F, FAO 210), PR 39 K13 (F, FAO 220), PR 39 G 12 (F, FAO 230), P-8000 (D, 240), PR 39 T 45 (F/D, FAO 240), PR 39 D 23 (F/D, FAO 260), PR 39 F 58 (D/F, FAO 260), PR 38 N 86 (D, FAO 270), PR 38 H 20 (D, FAO 290), Clarica (D, FAO 280), LG 3215 (F, FAO 220), LG 3216 (F/D, FAO 250), Absolut (F/D, FAO 250), LG 3232 (F/D, FAO 240), LG 3233 (F/D, FAO 240), LG 3252 (F/D, FAO 250). Na całym polu doświadczalnym stosowano takie samo nawożenie NPK w ilości: 100 kg N/ha w formie mocznika, 80 kg P₂O₅/ha w formie polifoski 6 i 120 kg K₂O/ha w formie soli potasowej 60%. Gęstość siewu wynosiła 79 000 roślin/ha. Zbiór kukurydzy wykonano kombajnem poletkowym firmy Wintersteiger. Z masy omlotowej ziarna pobrano próby do oznaczeń fumonizyn.

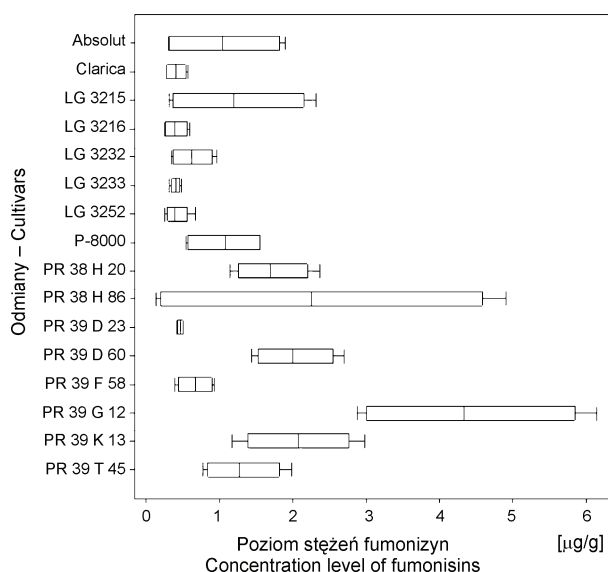
Zmieloną próbkę (25 g) zalewano 50 cm³ mieszaniny metanol:woda (3:1, v/v), homogenizowano, a następnie

ekstrakt sączono przez sączek Whatman nr 4. Otrzymany przesącz doprowadzano 0,1 M roztworem KOH do pH = 5,8–6,5 i oczyszczano na kolumnie Bond Elut firmy Varian. Kolumnę przemywano kolejno 5 cm³ roztworu metanolu i 5 cm³ mieszaniny metanol:woda (3:1, v/v), następnie наносono na nią 10 cm³ przesączu (odpowiednik 5 g próbki), po czym przepuszczano 8 cm³ mieszaniny metanol:woda (3:1, v/v) oraz 3 cm³ metanolu. Celem osuszenia, przepuszczano przez kolumnę powietrze, a fumonizyny wymywano 14 cm³ 0,5% roztworu kwasu octowego w metanolu. Rozpuszczalnik odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 40°C, a suchą pozostałość przechowywano do czasu analizy w temperaturze –18°C.

Suchą pozostałość rozpuszczano w 200 µl mieszaniny acetonitryl:woda (1:1, v/v) z czego pobierano 50 µl i mieszało z 200 µl roztworu OPA (phthalaldehyde) (40 mg OPA + 1 cm³ metanol + 5 cm³ 0,1 M Na₂B₄O₇ + 50 µl 2-mercaptoetanol). W badanym materiale oznaczano fumonizyny (FB_s) metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC – high performance liquid chromatography) z wykorzystaniem zestawu aparatury Waters 2695, Multi Fluorescence Detector Waters 2475 oraz kolumny C₁₈ Nova Pak 3,9 × 150 mm. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując analizę wariancji do weryfikacji hipotez zerowych o braku wpływu lat, odmian, typu ziarna i liczby FAO na poziom stężeń sumy fumonizyn FB₁, FB₂ i FB₃. Zastosowano test Tukeya przy poziomie istotności p = 0,05.

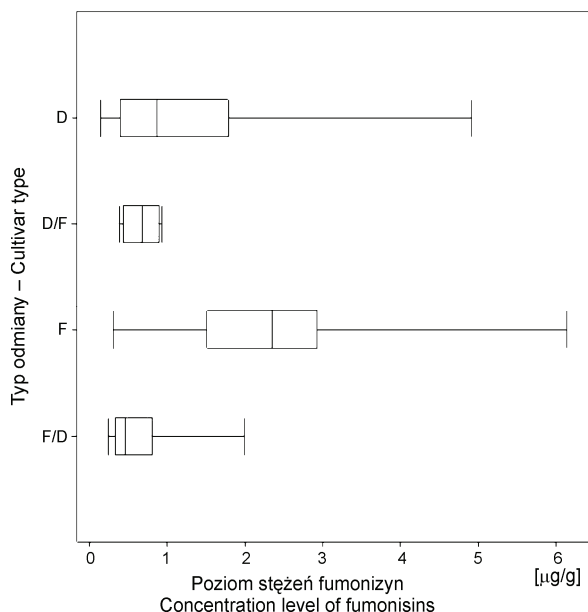
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Nie stwierdzono wpływu lat na obserwowaną cechę. Stąd dalsze analizy dokonano na danych uśrednionych



Rys. 1. Boxplot poziomu stężeń fumonizyn, sklasyfikowany ze względu na odmianę [NIR (0,05) = 1,301]

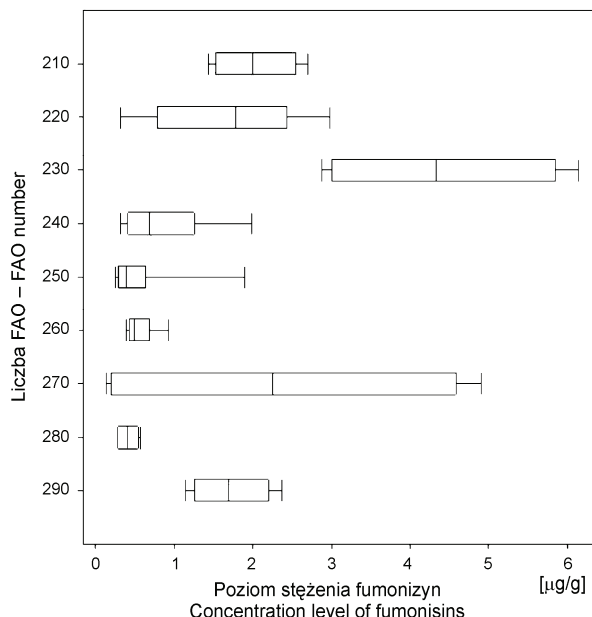
Fig. 1. Boxplot of concentration level of fumonisins, classified by the cultivars [LSD (0.05) = 1.301]



Rys. 2. Boxplot poziomu stężeń fumonizyn, sklasyfikowany ze względu na typ odmiany (D – dent, F – flint, D/F – dent/flint, F/D – flint/dent) [NIR (0,05) = 1,194]

Fig. 2. Boxplot of concentration level of fumonisins, classified by the cultivar type (D – dent, F – flint, D/F – dent/flint, F/D – flint/dent) [LSD (0.05) = 1.194]

poprzez lata. Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że odmiany kukurydzy były zróżnicowane pod względem poziomu stężeń fumonizyn ($F_{15,48} = 5,44$; $P < 0,001$). Największą zawartość sumy fumonizyn FB_1 , FB_2 i FB_3 obserwowano u odmiany PR 39 G 12 (4,423 µg/g), a najmniejszą u odmiany LG 3233 (0,400 µg/g). Bardzo dużą zmienność obserwowanej cechy obserwowano u odmian PR 38 H 20 i PR 39 G 12 (rys. 1). Z kolei w badaniach Szymańskiej i wsp. (2011) wykazano, że zróżnicowanie genetyczne badanych odmian pod kątem odporności na grzyby z rodzaju *Fusarium* było niewielkie. Typ ziarna kukurydzy w badaniach własnych był również czynnikiem determinującym poziom stężenia sumy fumonizyn ($F_{3,60} = 9,00$; $P < 0,001$), przy czym odmiany w typie flint i dent charakteryzowały się zdecydowanie wyższą zawartością sumy fumonizyn FB_1 , FB_2 i FB_3 (odpowiednio 2,445 i 1,397 µg/g), niż te w typie mieszanym D/F i F/D (odpowiednio 0,667 i 0,675 µg/g). Wykazano również, że odmiany w typie mieszanym ziarna charakteryzowały się większą stabilnością niż odmiany w typie ziarna D i F (rys. 2). Charakterystyka ze względu na liczbę FAO również różnicowała istotnie odmiany pod względem obserwowanej cechy ($F_{8,55} = 9,76$; $P < 0,001$). Najwięcej fumonizyn zawierały odmiany określone liczbą FAO 230 (4,423 µg/g), a najmniej liczbą FAO 280 (0,410 µg/g),



Rys. 3. Boxplot poziomu stężeń fumonizyn, sklasyfikowany ze względu na liczbę FAO [NIR (0,05) = 1,012]

Fig. 3. Boxplot of concentration level of fumonisins, classified by the FAO number [LSD (0.05) = 1.012]

przy najmniejszej zmienności obserwowanej cechy (rys. 3). Brak zależności pomiędzy wczesnością odmian a porażeniem ich przez *Fusarium* spp. wykazał Michalski i wsp. (2000). Według tego autora oprócz wczesności odmian, wpływ na porażenie roślin kukurydzy przez *Fusarium* spp. ma także ich odporność, budowa morfologiczna oraz przebieg warunków atmosferycznych podczas okresu wegetacji.

Wnioski / Conclusions

1. Próbkę ziarna kukurydzy analizowane pod kątem fumonizyn były zasiedlone przez gatunki *Fusarium*.
2. Stwierdzono zróżnicowanie w zależności od genetycznej podatności badanych odmian kukurydzy pod kątem poziomu stężeń sumy fumonizyn. Największą istotnie zawartością sumy fumonizyn FB_1 , FB_2 i FB_3 charakteryzowało się ziarno odmiany PR 39 G 12, a najmniejszą odmiany LG 3233.
3. Odmiany w typie ziarna F i D charakteryzowały się zdecydowanie wyższą zawartością sumy fumonizyn FB_1 , FB_2 i FB_3 , niż te w typie mieszanym D/F i F/D.
4. Stężenie sumy fumonizyn w ziarnie kukurydzy ulegało generalnie istotnemu zmniejszeniu wraz ze wzrostem liczby FAO.

Literatura / References

- Marasas W.F.O., Riley R.T., Hendricks K.A., Stevens V.L., Sadler T.W., Gelineau-van Waes J., Missmer S.A., Cabrera J., Torres O., Gelderblom W.C.A., Allegood J., Martinez C., Maddox J., Miller J.D., Starr L., Sullards M.C., Roman A.V., Voss K.A., Wang E., Merrill Jr. A.H. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture

- and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J. Nutr.* 134: 711–716.
- Michalski T., Perkowski J., Stachowiak J. 2000. Yielding of grain maize and presence of *Fusarium* toxins in dependence on harvest time. *J. Plant Prot. Res.* 40 (3/4): 271–279.
- Pląskowska E. 2010. Charakterystyka i taksonomia grzybów z rodzaju *Fusarium*. *Mikologia Lekarska* 17 (3): 172–176.
- Suchorzyńska M., Misiewicz A. 2009. Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Post. Mikrobiol.* 48 (3): 221–230.
- Sulewska H., Koziara W., Ptaszyńska G. 2006. Porażenie roślin kukurydzy przez *Fusarium* spp. w warunkach opóźniania zbioru. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 46 (2): 712–714.
- Szymańska G., Sulewska H., Grochot G. 2011. Zróżnicowanie podatności odmian kukurydzy na choroby i szkodniki. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 51 (1): 436–440.
- Tekiela A. 2009. Występowanie fuzariozy kolb kukurydzy w latach 2005–2007 a skażenie ziarna przez mikotoksyny w warunkach polskich. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 49 (4): 2081–2086.
- Wit M., Waśkiewicz A., Goliński P., Chelkowski J., Warzecha R., Ochodzki P., Wakuliński W. 2010. Występowanie fumonizyny w ziarniakach i rdzeniach kolb kukurydzy inokulowanych *Fusarium verticillioides*. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 50 (4): 1832–1836.