

JULIUSZ PERKOWSKI  
Akademia Rolnicza Poznań  
JERZY CHEŁKOWSKI  
SGGW w Warszawie

## PORÓWNANIE ZAWARTOŚCI DEOKSYNIWALENOLU ORAZ 3-ACETYLODEOKSYNIWALENOLU W NATURALNIE PORAŻONEJ PSZENICY W LATACH 1986–1988

Do grupy trichotecenów należy około 100 zidentyfikowanych do tej pory związków [25], z których jednak niewiele wykryto w produktach pochodzenia naturalnego [11, 31].

Do najczęściej występujących w zbożach metabolitów z tej grupy mikotoksyn należą: deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), 3-acetylodeoksyniwalenol (3-AcDON), 15-acetylodeoksyniwalenol (15-AcDON) oraz fuzarenon-X (FUS-X) tworzone przez *F. graminearum* oraz *F. culmorum* [2, 6, 28]. Oprócz tych toksyn w porażonych ziarnach spotyka się często równocześnie posiadający właściwości estrogenne zearalenon.

Obydwa przedstawione powyżej gatunki *Fusarium* stanowią w Polsce główne zagrożenie upraw zbóż takich jak pszenicy [2, 14], pszenżyta [17], jęczmienia [19, 32] oraz – obok *F. subglutinans* i *F. moniliforme* – kukurydzy [1, 16].

Prowadzone od kilku lat badania nad naturalnie porażoną przez grzyby rodzaju *Fusarium* pszenicą są przedmiotem niniejszej pracy.

### *Metodyka prowadzonych badań*

W badaniach przeprowadzonych w ramach tej pracy w latach 1986–1988 próby polowe pszenic zbierano opierając się na obserwacjach zmian chorobowych roślin uprawnych na terenie 18 województw w okresie od stadium dojrzałości mleczej do stadium dojrzałości zbiorczej, tuż przed żniwami. Określano procent kłosów na danym polu wykazujących objawy fuzariozy, a kłosy z takimi objawami w liczbie 20 (lub większej) z danego pola ścinano i traktując je jako pojedynczą próbę przechowywano (wilgotność 15%) aż do czasu analizy mikologicznej.

Na podstawie badań mikroskopowych, stosując klucz Nelsona [10], określono gatunek porażający poszczególne kłosy. W tabeli 1 przedstawiono gatunki grzybów rodzaju *Fusarium* wyosobnione z kłosów pszenicy w latach 1986–1988. Kłosy porażone przez dominujące gatunki *F. graminearum* oraz *F. culmorum* oddzielono od

Tabela 1

Gatunki grzybów rodzaju *Fusarium* sp. wyosobnione z porażonych kłosów pszenicy  
(wg klucza Nelsona)

Gatunek	Procentowa zawartość grzybów rodzaju <i>Fusarium</i> w porażonych kłosach		
	Pszenica		
	1986	1987	1988
<i>F. avenaceum</i>	21	21	36
<i>F. crookwellense</i>	3	4	—
<i>F. culmorum</i>	31	17	49
<i>F. graminearum</i>	18	13	6
<i>F. nivale</i>	21	42	9
<i>F. sp.</i>	6	1	—

pozostałych (porażonych przez grzyby innego gatunku) i dzielono je ręcznie, zazwyczaj\* na 3 frakcje:

- A) ziarniaki o wyraźnych cechach porażenia przez grzyby rodzaju *Fusarium* (różowe przebarwienie, ziarniaki lekkie, pomarszczone, z nitkami grzybni na powierzchni), oznaczając je jako ziarniaki porażone (Z.P.),
- B) ziarniaki bez takich zmian, wyglądające na zdrowe, oznaczając je jako ziarniaki zdrowe (Z.Z),
- C) plewy razem z osadką kłosową, oznaczając je jako plewy (Plewy).

Po dokonaniu podziału ziarniaków na ziarniaki porażone oraz na wyglądające na zdrowe obliczano procent ziarniaków wykazujących typowe cechy porażenia przez grzyby rodzaju *Fusarium* (% PFZ). Ilości DON kumulowane w ziarnach oraz w innych częściach pszenicy (plewy, osadki kłosowe) są zazwyczaj znacznie wyższe od innych toksyn, takich jak 3-acetylo- oraz 15-acetylodeoksyniwalenol (3-AcDON, 15-AcDON), niwalenol (NIV) i jego pochodne oraz zearalenon (ZEA) [6, 8, 17, 21].

Zawartość DON, który jest odpowiedzialny za poziom skażenia, jest często skorelowana z innymi cechami badanymi w porażonych ziarnach. Sporadycznie porównywano zawartość DON w ziarnie ze zmniejszeniem wagi ziarna oraz ze spadkiem plonowania [26, 30]. Najczęściej jednak badana była zależność pomiędzy zawartością DON w ziarnie a procentem ziaren porażonych przez *Fusaria* (DON/PFZ) [5, 15, 29, 33]. Przygotowane w ten sposób próbki poddano analizie chemicznej. Wszystkie próby pszenic porażone grzybami rodzaju *Fusarium* analizowano w następujący sposób: w kolbie stożkowej o pojemności 200 cm<sup>3</sup> z korkiem szlifowym, do naważki 10 g zmielonego ziarna dodano 50 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika ekstrahującego metanol – 1,5% roztwór wodny chlorku potasu (60:40) i wstrząsano próbę 15 minut.

W celu całkowitej ekstrakcji pozostawiano ją do następnego dnia. Wytrząsano 10 minut i sączono pod zmniejszonym ciśnieniem, używając zestawu próżniowego z

\* Próby pszenicy zebrane w 1986 r. podzielono jedynie na ziarniaki i plewy.

lejkiem próżniowym Büchnera wyłożonym bibułą filtracyjną. Celem odtłuszczenia do rozdzielacza pobierano 25 cm<sup>3</sup> klarownego przesączu, dodawano 25 cm<sup>3</sup> heksanu i wytrząsano 3 minuty. Oddzieloną dolną warstwę metanolową wytrząsano ponownie z 20 cm<sup>3</sup> heksanu (warstwę heksanową odrzucano). Warstwę metanolową umieszczoną w rozdzielaczu wytrząsano trzykrotnie 3 minuty z chloroformem (15 cm<sup>3</sup> każda porcja). Zebrane w kolbie okrągłodennej warstwy chloroformowe odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem (wyparka próżniowa) w temp. 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w niewielkiej objętości (ok. 5 cm<sup>3</sup>) metanolu i przenoszono ilościowo do szczelnego naczynka, a następnie odparowywano do sucha w strumieniu gazowego azotu. Oczyszczanie wykonywano przy użyciu minikolumny wypełnionej oktadecylową fazą związaną C<sub>18</sub> wg następującej metodyki:

Do suchej pozostałości dodawano 0,1 cm<sup>3</sup> metanolu, a następnie dopełniano do 2 cm<sup>3</sup> mieszaniną metanol-woda (45:55). Ekstrakt przenoszono ilościowo na kolumnę o pojemności 3 cm<sup>3</sup> napełnioną fazą odwróconą C<sub>18</sub> (Sep-Pak C<sub>18</sub> firmy J. T. Baker) uprzednio przemytą 10 cm<sup>3</sup> metanolu, a następnie 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej (nie dopuszczając do wysuszenia kolumny). Zaadsorbowane metabolity wymywano za pomocą 2 cm<sup>3</sup> mieszaniny metanol-woda (45:55). Ekstrakty przenoszono ilościowo do szczelnego naczynka i odparowywano do sucha w temp. 50°C w strumieniu gazowego azotu.

Po dokonaniu ekstrakcji i oczyszczania do sucha ekstraktów dodawano po 0,15 cm<sup>3</sup> metanolu.

Na oczyszczone i zaimpregnowane AlCl<sub>3</sub> [13] płytki do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz do wysokorozdzielczej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) firmy Merck наносono badane ekstrakty oraz standardy i badano zawartość toksyn w sposób opisany w pracach [12, 13, 20, 21, 22, 26].

Po wykonaniu analizy metodą TLC wyniki jej potwierdzano metodami chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem masowym GC/MS oraz tandemowej spektrometrii masowej MS/MS [23, 24].

Tabela 2

## Poziom skażenia prób pszenic zebranych w latach 1986–1988

Rodzaj próby	Rozstęp zawartości toksyn w badanych próbach (mg/kg)		
	Rok		
	1986	1987	1988
% PFZ	21–61	11–72	15–100
DON Z.C.	5,0–18,0	2,4–23,0	2,7–35,0
DON Z.P.	– <sup>***</sup>	9,6–38,0	15,9–39,6
DON Z.Z. <sup>**</sup>	– <sup>***</sup>	0,6–3,6	0,4–3,6
DON Plewy	7,0–26,0	12,0–40,0	12,2–20,6
3-AcDON Z.C.	1,0–2,0* 5/7	0,1–1,5* 9/13	0,1–2,4* 11/13
3-AcDON Z.P.	–	0,1–2,4* 11/13	0,3–3,0 11/13
3-AcDON Plewy	2,0–13,0	0,1–3,2* 10/11	1,6–3,6* 2/3

\* liczba prób zawierających toksyny/liczba prób ogółem przebadanych

\*\* w próbach Z.Z. nie wykryto 3-AcDON

\*\*\* w próbach pszenic 1986 r. oznaczano DON w całej próbce ziarna bez podziału na frakcje Z.P. + Z.Z.

W stosowanej metodzie procentowy odzysk DON wynosił  $73,0 \pm 4,5\%$ , 3-AcDON –  $86,0 \pm 2,8\%$ , natomiast poziom wykrywalności toksyn dla stosowanych płytek HPTLC – 0,05 mg/kg.

Szczegółowe wyniki analiz chemicznych pszenic zebranych w latach 1986 (7 prób), 1987 (13 prób) oraz 1988 (13 prób) podano w pracach [3, 18, 21, 22].

Uzyskane wyniki zawartości DON i 3-AcDON dla różnych frakcji badanego ziarna, jak również wyliczone ilości oznaczonych toksyn dla całkowitej ilości ziarna ( $Z.C. = Z.P. + Z.Z.$ ) podano w tabeli 2 (rozstęp poziomu skażenia prób w mg/kg). Wyznaczenie tej ostatniej wartości miało na celu ilościowe określenie zawartości toksyn w skażonej partii ziarna, jak również umożliwiło ustosunkowanie do wyników innych prac na ten temat. Podawane w literaturze wyniki odnoszą się zazwyczaj do całej partii ziarna, bez podziału na poszczególne frakcje.

**Porównanie wyników  
otrzymanych dla prób pszenic zebranych w latach 1986, 1987, 1988**

Po analizie prób w poszczególnych latach (tabela 3) porównano zawartość toksyn w mg/kg w różnych frakcjach oraz procentu porażonego ziarna dla pszenic zebranych w latach 1986, 1987 oraz 1988 metodą t-Studenta [4, 7].

Tabela 3

**Porównanie zawartości toksyn w różnych frakcjach oraz procentu porażenia ziarna pszenic zebranych w latach 1986, 1987, 1988 metodą t-Studenta**

Rodzaj próby	Rok zbioru pszenicy				NIR				
	1986	1987	1988	1986 -1988	Rok zbioru		Różnica	NIR (0,05)	NIR 0,01
	średnia								
	1	2	3		N	N			
% PFZ	37,71	36,69	42,83	39,07	2	1	-1,0220	17,4903	23,1627
					3	1	5,1319	17,4903	23,1627
					3	2	6,1538	14,6334	19,3793
DON Z.C.	10,00	9,46	14,54	11,33	2	1	-0,5385	7,7957	10,3240
					3	1	4,5385	7,7957	10,3240
					3	2	5,0769	6,5224	8,6377
DON Z.P.	–	21,07	28,19	24,63	2	1	7,1217	6,9596	9,3639
DON Z.Z.	–	1,97	1,70	1,84	nie ma istotnych różnic*				
DON Plewy	18,71	23,50	17,53	19,91	nie ma istotnych różnic**				
3-AcDON Z.C.	0,86	0,45	0,79	0,70	2	1	-0,4033	0,6014	0,8054
					3	1	-0,0655	0,6101	0,8170
					3	2	0,3378	0,5136	0,6877
3-AcDON Z.P.	–	1,20	1,42	1,33	2	1	0,2273	1,0067	1,3545
3-AcDON Plewy	6,26 <sup>+</sup>	2,00	1,73	1,87	2	1	-4,8571	3,0527	4,1235
					3	1	-5,1238	4,3570	5,8853
					3	2	-0,2667	4,1124	5,5550

F<sub>obl.</sub>      F<sub>0,05</sub>      F<sub>0,01</sub>

\* 0,986      3,32      5,39

\*\* 1,161      3,55      6,01

<sup>+</sup> wynik nie uwzględniony do obl. średniej z 3 lat.

W przebadanych pszenicach wykryto głównie DON oraz 3-AcDON. Jednak oprócz tych toksyn stwierdzono także w niektórych próbach obecność 15-AcDON, NIV, 4,7-dideoksyniwalenolu oraz zearalenonu [21, 22].

Analizując otrzymane wyniki przedstawione w tabeli 3 można stwierdzić, że dla 8 badanych cech pszenic porażonych naturalnie przez grzyby rodzaju *Fusarium* w latach 1986–1988 nie znaleziono istotnych różnic. Jedynie dla zawartości 3-AcDON w plewach zebranych w 1986 r. (6,26 mg/kg) różnice w stosunku do pozostałych lat są istotne i nie pozwalają na włączenie tego wyniku do obliczenia średniej.

Średnie porażenie ziarna oraz zawartość DON w całości ziarna w 1988 r. było nieco wyższe niż w próbach zebranych w poprzednich latach, różnice te jednak nie są istotne dla badanych populacji pszenic w tych latach, a fakt ten można tłumaczyć wyższą procentowo liczbą prób porażonych przez *F. culmorum*.

Otrzymane wyniki skażenia pszenic są zbieżne z wynikami innych prac prowadzonych w różnych częściach świata nad pszenicami silnie porażonymi przez grzyby rodzaju *Fusarium* [6, 8, 9, 27, 34].

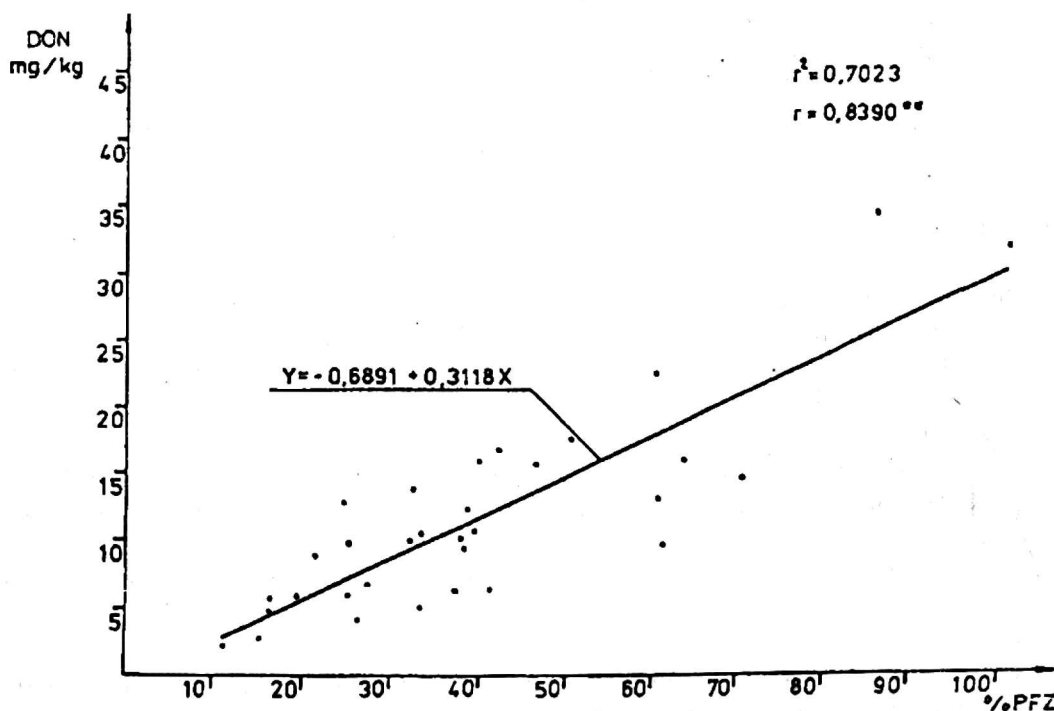
Tabela 4

Wartości współczynników korelacji dla zależności zawartości DON/% PFZ w ziarnach pszenicy zebranych w latach 1986–1988

Zależność	Lata zbioru pszenicy						
	Wartość współczynnika korelacji						
	1986	1987	1988	1986/87	1986/88	1987/88	1986–88
DON/%PFZ		**	**	**	**	**	**
Z.C.	0,2078	0,8393	0,9348	0,7002	0,8449	0,8925	0,8380

\*\* poziom istotności  $\alpha = 0,01$

Brak istotnych różnic pomiędzy badanymi cechami, takimi jak zawartość DON (mg/kg) oraz procentem ziarniaków porażonych przez grzyby rodzaju *Fusarium* (% PFZ) pozwolił na zestawienie współczynników korelacji dla tej zależności w ziar-



Rys. 1. Regresja liniowa zawartości DON w ziarnach pszenicy zebranych w latach 1986, 1987, 1988 w zależności od % porażenia ziarna.

niakach pszenicy zebranych w latach 1986–1988 (tabela 4). Zauważalny brak istotnych różnic na poziomie istotności  $\alpha = 0,01$  pomiędzy tymi cechami dla poszczególnych lat (oprócz 1986), a także dla kombinacji par lat (tabela 4), jak również całego trzyletniego okresu, a także przeprowadzona analiza regresji liniowej, pozwoliły na wykreślenie z wyliczonego równania regresji ( $Y = 0,6891 + 0,3118X$ ) wspólnej krzywej regresji dla tej zależności DON/% PFZ (rys. 1).

Z wyznaczonego równania regresji wyliczyć można przyrost ilości DON skumulowanego w ziarnie pszenicy na 1% porażonego ziarna. Wnosi on 0,3118 mg/kg na 1% PFZ.

## LITERATURA

- [1] Chełkowski J.: Mycotoxins associated with corn cob fusariosis. *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Ed. Chełkowski J., Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York–Tokyo, 53–62, 1989.
- [2] Chełkowski J.: Formation of mycotoxins produced by *Fusaria* in heads of wheat, triticale and rye. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Ed. Chełkowski J., Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York–Tokyo, 63–84, 1989.
- [3] Chełkowski J., Visconti A., Perkowski J., Wakuliński W., Bottalico A.: Mycotoxins and fungi accompanying wheat head fusariosis in Poland. *Mycotoxin Research. Special Edition. European Seminar „Fusarium – Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity”*, 57–60, 1988.
- [4] Elandt R.: Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczeń rolniczego. PWN, Warszawa 1984.
- [5] Gang L., Ying X., Zhang Z. H., Fang C. M., Li L.: Investigation of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Anhui province. 7th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan, 67–68, 1988.
- [6] Gareis M., Bauer I., Enders C., Gedek B.: Contamination of cereals and food with *Fusarium* mycotoxins in European Countries. *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Ed. Chełkowski J., Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York–Tokyo, 441–472, 1989.
- [7] Gawęcki J., Wagner W.: Podstawy metodologii badań doświadczalnych w nauce o żywieniu i żywności. PWN, Warszawa–Poznań, 1984.
- [8] Jelinek Ch. F., Pohland A. E., Wood G.: Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 2: 223–230, 1989.
- [9] Luo X.: *Fusarium* toxins contamination of cereals in China. A. 7th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan, 97–98, 1988.
- [10] Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O.: *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London, 1983.
- [11] Noonpugdee Ch., Böhm I., Abdelhamid A. M., Leibetseder I., Schuh M.: Über das Vorkommen von Desoxynivalenol (Vomitoxin, DON) in Futtermitteln für Österreichische Nutztierbestände im Zeitraum von 1979 bis 1985. *Bodenkult.* 37: 87–94, 1986.
- [12] Perkowski J.: Rozdział mieszaniny trichotecen oraz zearalenonu na żelu krzemionkowym w różnych układach rozpuszczalników metodą chromatografii cienkowarstwowej. *Rocz. Akademii Rolniczej* 210: 67–76, 1990.
- [13] Perkowski J.: Rozdział mieszaniny deoksyniwalenolu, 3-acetylodeoksyniwalenolu, 15-acetylodeoksyniwalenolu oraz zearalenonu metodą chromatografii cienkowarstwowej. *Rocz. Akademii Rolniczej* 223: 41–47, 1991.
- [14] Perkowski J.: Tworzenie mikotoksyn w zbożach przez grzyby rodzaju *Fusarium*. *Postępy Nauk Rolniczych – przesłane do druku*.
- [15] Perkowski J., Chełkowski J., Błażczak P., Snijders C. H. A., Wakuliński W.: A study of the correlation between the amount of deoxynivalenol in grain of wheat and triticale and percentage of *Fusarium* damaged kernels. *Mycotoxin Research* 7A: 102–114, 1991.
- [16] Perkowski J., Chełkowski J., Plattner R. D., Goliński P.: Cumulation of mycotoxins in maize cobs infected with *Fusarium graminearum*. *Mycotoxin Research* 7A: 115–120, 1991.

- [17] Perkowski J., Chełkowski J., Wakuliński W.: Deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol and *Fusarium* species in winter triticale. *Mycotoxin Research* 4: 97–100, 1988.
- [18] Perkowski J., Chełkowski J., Wakuliński W.: Mycotoxins in cereal grain. Part 13. Deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol in wheat kernels and chaff with head fusariosis symptoms. *Die Nahrung* 34, 4: 325–328, 1990.
- [19] Perkowski J., Kiecana I., Chełkowski J.: Trichothecene mycotoxins in barley kernels inoculated with *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. sporotrichioides*. Third European Seminar „*Fusarium* – Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance”, 1992.
- [20] Perkowski J., Kwaśna H., Latus D., Chełkowski J., Brayford D., Grabarkiewicz-Szczęśna J.: Mycotoxins produced by Discolor section *Fusarium* species. *Mycotoxin Research. Special Edition, European Seminar „Fusarium – Mycotoxins Taxonomy, Pathogenicity”*. Warsaw 1987, 41–45, 1988.
- [21] Perkowski J., Plattner R. D., Goliński P., Vesonder R. F., Chełkowski J.: Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-dideoxynivalenol and zearalenone in Polish wheat. *Mycotoxin Research* 6, 1: 7–12, 1990.
- [22] Perkowski J., Wakuliński W., Chełkowski J.: Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol and zearalenone in wheat in 1988. *Microbiologie – Aliments – Nutrition* 8: 241–247, 1990.
- [23] Plattner R. D.: Gas chromatography – mass spectrometry as a tool for mycotoxin analysis. *Modern Method in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins*. Ed. Cole R. J., 393–414, 1986.
- [24] Plattner R. D., Bennett G. A.: Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadrupole mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66, 6: 1470–1477, 1983.
- [25] Scott P. M., Kanhere S. R.: Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 368: 374–380, 1986
- [26] Snijders C. H. A., Perkowski J.: Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* 80, 6: 566–570, 1990.
- [27] Sydenham E. W., Thiel P. G., Marasas W. H. O., Nieuwenhuis J. J.: Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in *Fusarium graminearum* infected undergrade wheat in South Africa. *J. Agric. Food Chem.* 37, 4: 921–926, 1989.
- [28] Tanaka T., Hasegawa A., Yamamoto S., Lee U. S., Sugiura Y., Ueno Y.: Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36: 979–983, 1988.
- [29] Teich A. H., Hamilton I. R.: Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1429–1431, 1985.
- [30] Teich A. H., Shugar L., Smid A.: Soft white winter wheat cultivar field – resistance to scab and deoxynivalenol accumulation. *Cer. Res. Comm.* 15: 109–114, 1987.
- [31] Ueno Y.: Trichothecenes as environmental toxicants. *Korean J. of Toxicol.* 1: 3–15, 1985.
- [32] Ueno Y., Lee U.-S., Tanaka T., Hasegawa A., Strzelecki E.: Natural co-occurrence of nivalenol and deoxynivalenol in Polish cereals. *Microbiol. Alim. Nutr.* 3: 321–326, 1985.
- [33] Wang Y. Z., Miller J. D.: Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *J. Phytopathology* 122: 118–125, 1988.
- [34] Yoshizawa T.: Red-mold diseases and natural occurrence in Japan. In „Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects” (Ed.) Ueno Y., Elsevier and Kodansha Ltd., Amsterdam and Tokyo, 195–209, 1983.