

OBSAH FUSARIOVÉHO MYKOTOXINU DEOXYNIVALENOLU A MYKOLOGICKÁ KONTROLA VE VZORCÍCH OBILOVIN V ČR (2000 – 2004)

Content of Deoxynivalenol and Mycological Assessment of the Cereal Samples from the Czech Republic (2000-2004)

Světlana Sýkorová, Eva Matějová, Jana Chrpová, Václav Šíp, Josef Hýsek,
Marie Berová
VÚRV Praha

Abstract

The survey of deoxynivalenol (DON) content and mycological control of pathogenic fungi was accomplished in the samples of wheat, barley and rye from different regions of the Czech Republic in 2000-2004. The samples were obtained from ZVÚ Kroměříž (monitoring of yield quality) and from SRS CR. Limit value for DON in grain is 2 mg/kg (according to Law No.298/1997 and Official Announcement 294/97). Samples containing more than 0,2 ppm (LOQ) were count as positive. DON content was mostly under limit value. *Fusarium graminearum* was more frequent in the Czech Republic than *F. culmorum*.

Key words: wheat, barley, rye, deoxynivalenol, analyses, limit, *Fusarium* spp.

Souhrn

Ve vzorcích pšenice, ječmene a žita z různých okresů ČR (2000-2004) byl prováděn průzkum obsahu mykotoxinu deoxynivalenolu (DON) a mykologická kontrola spektra patogenních vláknitých mikromycet. Vzorky byly získávány ze ZVÚ Kroměříž v rámci prováděného monitoringu kvality sklizně a z odběrů Státní rostlinolékařské správy. Limitní hodnota pro DON činí podle Z. 298/1997 Sb., vyhl. MZ 294/97 v zrna 2 mg/kg. Za pozitivní byly považovány vzorky s obsahem DON nad 0,2 ppm(LOQ). Většina vzorků vykazala nenulový, avšak podlimitní obsah DON. V ČR byl zaznamenán posun k častějšímu výskytu *Fusarium graminearum*.

Úvod

Houby rodu *Fusarium* jsou významnými patogeny většiny zemědělských plodin. Mezi nejčastěji se vyskytující druhy patří *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *Microdochium nivale* a další. Nacházejí se jak ve vegetativních, tak i reprodukčních orgánech a způsobují vadnutí, poškození a úhyn rostlin, u cereálií poškození klasů a následně zrna a zákonitě dochází i k poklesu výnosu. Další riziko však představuje produkce toxických sekundárních metabolitů v zrna -mykotoxinů, z nichž v cereáliích jsou nejvýznamněji zastoupeny trichothecenové deriváty – deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) a T2 toxin, které způsobují jak u člověka, tak u hospodářských zvířat mykotoxikózy, projevující se zvracením a dalšími zažívacími potížemi. DON jako inhibitor proteinové syntézy způsobuje nejen ztráty růstu zvířat, ale značně oslabuje obranné funkce organismu. Snižuje chuť přijímat krmivo a ovlivňováním neuropřenašečů podmiňuje nervové poruchy spojené s agresivitou a kanibalismem. Typickým projevem působení T-2 toxinu je hemoragický syndrom vedoucí ke značné ztrátě krve krvácením do střev a břišní dutiny, často končící úhynutím. Pokusy s T-2 toxinem u potkanů potvrdily schopnost iniciovat tvorbu karcinomu trávicího traktu. Důležitými mykotoxiny druhů rodu *Fusarium* jsou také laktony kyseliny β -resorcylové - zearalenony. Hlavním

druhem produkujícím zearalenony je *Fusarium graminearum*. Zearalenony byly detekovány především v kukuřici a dalších obilninách a způsobují syndromy hyperestrogenismu u vepřů, hovězího dobytka a drůbeže.

Bylo zjištěno, že většina odrůd pšenice a ječmene je náchylná k infekci působené těmito houbami a že neexistují výraznější specifické rozdíly v reakci na napadení různými patotypy *F. graminearum* nebo *F. culmorum*. Napadení cereálií houbami rodu *Fusarium* má vliv nejen na jejich hygienickou nezávadnost (kontaminace mykotoxiny), ale i na technologickou jakost, např. pšeničné mouky, u sladovnického ječmene postiženého fusariózou přechází DON až do výsledného produktu – piva a je jedním z faktorů, které s velkou pravděpodobností způsobují spolu se šťavelany přepěňování (tzv. gushing).

Pro DON byl v ČR vyhláškou Ministerstva zdravotnictví 298/1997 stanoven hygienický limit 2 mg/kg (ppm) pro zrno, 1 mg/kg (ppm) pro mouku, nově od 20.5.2004 Vyhl.č.305/2004 Sb. upravuje limity pro DON v obilovinách pro přímou spotřebu a zpracované obilí, kromě tvrdé pšenice na 0,5 ppm; chléb a jemné pečivo – 0,35 ppm; obiloviny pro dětskou výživu – 0,1 ppm, pro zearalenon v dětské a kojenecké výživě z obilovin 0,02 ppm; pro obiloviny a výrobky z obilovin 0,05 ppm.

Veškerá manipulace s trichotheceny podléhá od 1.1.2003 povolení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) podle zákona č. 281/2002 Sb. o zákazu biologických a toxinových zbraní.

Ve VÚRV Praha byl v letech 2000 až 2002 řešen projekt mezinárodní spolupráce programu COST, akce 835, v němž jsme kromě reakce různých odrůd pšenice a ječmene na umělou infekci definovaným izolátem *Fusarium culmorum* také zjišťovali, jaké hladiny hlavního fusariového mykotoxinu deoxynivalenolu se nacházejí ve vzorcích pšenice, ječmene a žita z provozních ploch v ČR v letech 2000, 2001 a 2002 a jaké je u nich druhové zastoupení houbových patogenů (Sýkorová et al., 2002, 2003; Šíp et al., 2003). Od roku 2003 pokračovala tato činnost v rámci výzkumného záměru VÚRV a nově byla navázána spolupráce se Státní rostlinolékařskou správou týkající se vytipování problematických partií pšenice již v průběhu vegetace, odběru příslušných vzorků před sklizní pro mykologická stanovení přítomnosti fusarií a při sklizni pro stanovení obsahu DON. V současné době pokračuje monitorování obsahu DON v rámci Výzkumného záměru VÚRV.

Metodika

Studovaným materiálem byly soubory vzorků zrna odrůd ozimé pšenice, jarního ječmene a žita z různých okresů ČR v příslušném roce. Tyto vzorky byly získány z každoročního monitoringu kvality sklizně obilovin, který provádí ZVÚ Kroměříž, s.r.o. a vzorky pšenice v roce 2003 prostřednictvím inspektorů SRS. Pro mykologické rozборы bylo z každého průměrného vzorku vyčleněno 300 náhodně odebraných zrn, zbytek vzorku byl rozemlet na laboratorním mlýnku ZM 100 (Retsch) a použit ke stanovení deoxynivalenolu (DON) kvantitativní imunochemickou metodou (ELISA) s využitím komerčních kitů RIDASCREEN FAST DON, vyráběných firmou R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany. Stanovení bylo provedeno podle protokolu předepsaného výrobcem tak, že každý standard i vzorek byl nanášen paralelně do dvou jamek titrační destičky a měřen spektrofotometricky. Výpočet získaných výsledků byl uskutečněn pomocí softwaru RIDA® SOFT Win.

Pro mykologickou kontrolu byla použita metodika mykologicky sledovaných zrn. Zrna byla dezinfikována ponořením (5 minut) do 5% roztoku chlornanu sodného. Po okapání byla zrna umístěna na sladinkový agar v Petriho miskách. Kultivační teplota byla 24 °C. Petriho misky byly inkubovány po dobu 14 dní a odečítány přípravou mikroskopických preparátů z narostlých kolonií mikromycet kolem studovaného zrna a určováním podle morfologických charakteristik.

Výsledky a diskuse

Získané výsledky stanovení obsahu DON a mykologické kontrole ve vzorcích pšenice, ječmene a žita v letech 2000 - 2004 jsou dokumentovány tabulkami 1, 1a, 2 a 3. Jak je patrné z tabulky 1, u pšenice byl zaznamenán výskyt nadlimitního obsahu DON u 1 vzorku v roce 2001 a u 2 vzorků v roce

2003. Mezi soubory vzorků pšenice v roce 2001 a 2003 je však rozdíl v tom, že vzorky v roce 2001 pocházely z náhodných odběrů vzorků z běžné sklizně, vzorky v roce 2003 byly získány z cílených odběrů, které provedli inspektoři Státní rostlinolékařské správy (SRS) z vytipovaných problematických partií. Výskyt vzorků pšenice s vyšším obsahem DON v roce 2003 se tedy dal předpokládat. Tabulka 1a upřesňuje údaje o předplodině, agrotechnice a případném chemickém ošetření u vzorků pšenice z roku 2003 s obsahem DON vyšším než 0,7 ppm. Z tabulky je jasné patrné, že kumulací rizikových faktorů (předplodina kukuřice, minimalizace, chemicky neošetřeno) může již na poli dojít ke značné kontaminaci zrna mykotoxiny.

Tab. 1: Výsledky stanovení obsahu DON ve vzorcích pšenice (2000-2003)

Rok	Poč.vz. (odrůd, okresů)	Prům. obsah DON (ppm)	Min - max	Počet nadlimitních vzorků	Mykologická kontrola
2000	56 (21,48)	0,14	0,003 – 0,74	0	<i>F.oxo, tr.,po. Alt.</i>
2001	55 (14,44)	0,21	0,01 – 2,49	1	<i>F.gr.,oxy.,tr.,av.,po., sol., Alt.</i>
2002	95 (19,47)	0,19	0-1,45	0	<i>F.po.,tr.,gr.,oxy.,cul.,av.,Alt.,Epi.,Drech.</i>
2003 SRS	97 (38,51)	0,36	0-10,1	2	obodováno, posun k častějšímu výskytu <i>F.gr. (75% vzorků)</i>

Vysvětlivky zkratk: *F.gr.,culm.,oxy.,tr.,av.,po., sol.* – *Fusarium graminearum, culmorum, osysporum, tricinctum, avenaceum, poae, solani*
Alt. – *Alternaria sp.*

Drech. – *Drechslera sorokiniana*

Epi. – *Epicoccum sp.*

NIV – zjištěn výskyt chemotypu *Fusaria* produkující nivalenol

Tab. 1a: Doplnující údaje u vzorků pšenice ze sklizně 2003 s obsahem DON > 0,6 ppm.

DON (ppm)	Fusarium zjištěno (body)	předplodina	zpracování půdy	ošetření
0,72	6	řepka ozimá	orba	Artea + Atlas
0,66	6	cukrovka	diskov.	25.5.Juwel, 28.6.2003 Caramba
0,65	5	kukuřice	orba	Amistar+Charisma
10,10	6	kukuřice	minimalizace	ne
3,20	5	siláž. kukuřice	podmítka	Tango Super
1,00	4	kukuřice zrno	minimalizace	Archer
0,78	1	kukuřice	minimalizace	Sportak Alpha, Archer 425 EC

Ve vzorcích ječmene (tab. 2) byl výskyt vzorků s nadlimitním obsahem DON zaznamenán v roce 2001 a 2004 (vždy po 1 vzorku). V roce 2003 sice nebyl nalezen žádný vzorek s nadlimitním obsahem DON, avšak u 1 vzorku byla zjištěna přítomnost chemotypu *Fusarium graminearum* produkujícího jiný trichothecenový derivát nivalenol, jehož toxicita je ve srovnání s DON mnohem vyšší. U tohoto vzorku byla totiž zjištěna velmi nízká koncentrace DON, avšak vysoké procento zrn napadených *F. graminearum*. Přítomnost nivalenolu v tomto vzorku byla prokázána analýzou pomocí plynové chromatografie (GC), která byla provedena na Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT v Praze. Tento příklad dokládá potřebnost současně prováděné chemické analýzy obsahu mykotoxinů a mykologické kontroly přítomnosti houbových patogenů. Ve vzorcích ječmene ze sklizně 2004 mykologická kontrola dosud probíhá.

Tab. 2: Výsledky stanovení obsahu DON ve vzorcích jarního ječmene (2000-2003)

Rok	Poč.vz. (odrůd, okresů)	Prům. obsah DON (ppm)	Min - max	Počet nadlimitních vzorků	Mykologická kontrola
2000	33 (7,24)	0,23	0,02 – 0,55	0	ne
2001	32 (7,24)	0,4	0,02 – 3,77	1	<i>F.gr.,culm.,oxy.,tr.,av.,po.</i> <i>Alt.</i>
2002	30 (5,23)	0,23	0-1,15	0	<i>F.po.,tr.,gr.,oxy.,cul.,av.,</i> <i>Epi.,Drech.</i>
2003	70 (5,43)	0,15	0-0,25	0	<i>F.po.,tr.,gr.,oxy.,cul.,av.,</i> (NIV) <i>Epi.,Drech.</i>
2004	73 (6,45)	0,10	0-2,4	1	dosud probíhá

Ve vzorcích žita, jehož pěstování není zdaleka tak rozšířeno jako pěstování pšenice a ječmene, nebyl nalezen v letech 2000-2002 žádný vzorek s nadlimitním obsahem DON, mykologická kontrola byla prováděna pouze v roce 2002. Spektrum houbových patogenů bylo velmi podobné jako u pšenice a ječmene, avšak výskyt toxigenních druhů (*F. culmorum*, *F. graminearum*) byl mnohem nižší. Vzhledem k výsledkům získaným u žita v letech 2000-2002 a jeho menšímu významu nebyly již od r.2003 průzkum obsahu DON ani mykologická kontrola prováděny.

Z literárních údajů je známo (Bottalico a Logrieco, 2002), že v Evropě došlo v posledních letech k výrazným změnám v zastoupení jednotlivých druhů rodu *Fusarium*. Je zřejmé, že i v našich podmínkách začal převládat teplomilnější druh *F. graminearum* (Hýsek et al., 1999, Sýkorová et al., 2003), avšak detailní, celoplošné analýzy v tomto směru nebyly dosud provedeny. Na zvýšení významu *F. graminearum* v našich podmínkách upozorňují též Šindelková a Košťálová (2004) ze Státní rostlinolékařské správy. Je pravděpodobné, že dominance *F. graminearum* je způsobována změnami klimatu, tedy oteplováním častějším v posledních letech. Také osevnické postupy, ve kterých se často střídá pšenice s kukuřicí, vytvářejí příznivé podmínky pro rozšíření *F. graminearum*.

Tab. 3: Výsledky stanovení obsahu DON ve vzorcích žita (2000-2002)

Rok	Poč.vz (odr, okr.)	Prům. obsah DON (ppm)	Min - max	Počet nadlimitních vzorků	Mykologická kontrola
2000	22 (6,22)	0,17	0,05 – 0,46	0	ne
2001	15 (4,15)	0,14	0,02 – 0,33	0	ne
2002	32 (6,20)	0,17	0-1,1	0	<i>F.po.,tr.,gr.,oxy.,cul.,av.,</i> <i>Epi.,Drech.</i>

Závěr

Výsledky víceletého průzkumu obsahu fusariových mykotoxinů v obilovinách sklizených v České republice mají značný význam jako základ databáze údajů, které mohou být využity například při jednáních o stanovení limitů pro obsah některých mykotoxinů v rámci EU a je zřejmé, že takováto databáze by měla být každoročně doplňována o aktuální údaje a současně i rozšiřována na větší rozsah analyzovaných vzorků. V současné době, kdy je kladen oprávněný důraz na bezpečnost potravin, má budování delší časové řady údajů tohoto typu opravdu smysl.

Výzkum zaměřený na získání genotypů s vyšším stupněm rezistence k fusariosám, který intenzivně probíhá prakticky na celém světě, má i velký význam pro produkci zdravého osiva obilovin a následně zdravých a bezpečných potravin na bázi cereálií.

Literatura

- S.Sýkorová, L. Papoušková, V.Šíp, J.Chrpová, J. Hýsek, E.Sychrová : Obsah fusariových mykotoxinů ve vybraných odrůdách jarního ječmene (umělá a přirozená infekce) *The content of fusarium-mycotoxins in some spring barley varieties (artificial and natural infection)*, Kvasny Prum., 48,2002,č.6.,s.149-153.
- S. Sykorova, V. Šíp, M. Nevrklova, Z. Sypecka, J. Hajslova and J. Hysek : The survey of *Fusarium* mycotoxins content in grain of winter wheat cultivars collected from different regions of Czech Republic. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium, 1.-6.9.2003, Paestum, Italy, Vol. 3, Sec.6 , pp.1266 -1268.
- Sip V., Chrpova J., Sykorova S :Analysis of factors that influenced accumulation of *Fusarium* mycotoxins in wheat grain. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium, 1.-6.9.2003, Paestum, Italy, Vol. 3, Sec.6 , pp.1254-1256.

Další citace literatury jsou k dispozici u autorů.

Poděkování

Za finanční podporu MZe ČR Výzkumný záměr VÚRV: *Studium a využití biodiverzity, genetických mechanismů a nových metod pro zlepšování biologického potenciálu odrůd a setrvalý rozvoj zemědělství (2001 – 2003)*

Nové poznatky, metody a materiály pro genetické zlepšování biologického potenciálu plodin a využití agro-biodiversity pro setrvalý rozvoj zemědělství: etapa 5: Vývoj metod, hodnocení a využití výchozích materiálů pro tvorbu genotypů s vysokou nutriční a technologickou kvalitou pro různé využití produkce (2004 – 2008)

Kontaktní adresa autora: Mgr. Světlana Sýkorová, CSc. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, E-mail: sykorova@vurv.cz

