

Fuzáriové mykotoxiny a patogeny rodu *Fusarium* v obilovinách sklizně 2008

(*Fusarium mycotoxins and pathogens in cereals from the 2008 harvest*)

RNDr. Ivana Polišenská¹, Ph.D., Ing. Ondřej Jirsa¹, Ph.D., Dr. Ing. Jaroslav Salava²
¹Agrotest fyto s.r.o., Kroměříž, ²Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

SOUHRN

Na obsah mykotoxinu deoxynivalenolu (DON) byly analyzovány vzorky pšenice, ječmene a žita z různých oblastí ČR, určené pro potravinářské využití. U pšenice byl hodnocen také výskyt zearalenonu (ZEA). Hodnoty byly porovnány s legislativním limitem pro potravinářské obiloviny, který je podle nařízení Komise (ES) 1881/2006 pro DON 1250 µg/kg a pro ZEA 100 µg/kg. Ze souboru 1035 vzorků pšenice bylo pro kvantitativní analýzu DON vybráno cíleným způsobem na základě obsahu viditelně fuzariózních zrn 105 vzorků. Pozitivní obsah DON (nad limit kvantifikace-LOQ) byl zjištěn u 51 vzorků, obsah překračující limit 1250 µg/kg byl nalezen u 20 vzorků. Nejvyšší hodnota DON u pšenice činila 4543 µg/kg. Limit pro obsah ZEA byl u pšenice překročen u 6 vzorků, maximální obsah ZEA (204 µg/kg) byl zjištěn u vzorku s obsahem DON 2818 µg/kg. Potvrdily se závěry z předcházejících let, že vyšší pravděpodobnost výskytu nadlimitních hodnot DON je u pšenice pěstované po předplodiné kukuřici. Ze souboru 422 vzorků sladovnického ječmene bylo náhodně vybráno a na obsah DON analyzováno 50 vzorků. 5 vzorků mělo obsah DON nad 500 µg/kg, 1 přesáhl platný limit pro potravinářské obiloviny. Maximální zjištěná hodnota činila 3710 µg/kg. Ze souboru 95 vzorků žita bylo na obsah DON analyzováno 20 vzorků, 2 vzorky měly DON nad 200 µg/kg, maximální hodnota činila 261 µg/kg. Žádný vzorek žita nepřesáhl limit pro potravinářské obiloviny. V řadě dosud systematicky sledovaných let 2005–2008 byl v roce 2008 výskyt DON u pšenice nejnižší. Na vzorcích pšenice i ječmene byl sledován výskyt druhů patogenů *Fusarium*. Nejčastěji se vyskytujícím druhem na pšenici bylo v roce 2008 *F. graminearum*, na ječmeni *F. poae*.

Klíčová slova: pšenice, ječmen, obiloviny, mykotoxiny, DON, ZEA

SUMMARY

Samples of wheat, barley and rye for food use were collected from various production regions of the Czech Republic and analyzed for the content of deoxynivalenol (DON) mycotoxin. Wheat samples were also screened for zearalenone (ZEA) occurrence. Mycotoxin levels were compared with limits for food cereals according to Commission Regulation (EC) 1881/2006 being 1250 µg/kg for DON and 100 µg/kg for ZEA. Among 1035 wheat samples, 105 were selected for DON analysis based on the presence of visually scabby kernels. Positive content of DON (above the limit of quantification, LOQ) was determined in 51 samples and the content exceeding the limit of 1250 µg/kg was found in 20 samples. The highest value of DON content measured in wheat was 4543 µg/kg. The limit for ZEA content in wheat was exceeded in four samples and its maximum content (204 µg/kg) was assessed in the sample with DON content of 2818 µg/kg. Conclusions from preceding years were confirmed suggesting that above-limit values of DON are more probable in wheat grown after preceding crop maize. Out of 422 samples of malting barley, 50 samples were randomly selected and analyzed for DON content. Five samples contained more than 500 µg/kg DON and one exceeded the legal limit for food cereals. The maximum value assessed was 3710 µg/kg. Of 95 rye samples, 20 were analyzed for DON content. Two samples had the DON content above 200 µg/kg, maximum value was 261 µg/kg, i.e. none of them exceeded the limit for food cereals. In the period of 2005–2008 systematically examined, DON occurrence was the lowest in 2008. *Fusarium* species were observed on wheat and barley samples. In 2008, the most frequent species was *F. graminearum* on wheat and *F. poae* on barley.

Keywords: wheat, barley, cereals, mycotoxins, DON, ZEA

ÚVOD

Legislativa

V roce 2008 nedošlo ke změně legislativy limitující obsah mykotoxinů v potravinářských obilovinách. Maximální limity kontaminujících látek v potravinách jsou nadále určeny nařízením Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006; metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách nařízením Komise (ES) č. 401/2006. V nejbližším období se očekává přezkoumání maximálních limitů v obilovinách pro deoxynivalenol (DON), zearalenon (ZEA) a fumonisiny (B_1 a B_2) v obilovinách a má být rovněž zvažena vhodnost stanovení maximální úrovně pro T-2 a HT-2 toxiny. V současné době jsou pro tyto komplexní

plánované změny sbírány potřebné podklady. Právní předpisy Evropského Společenství (ES) vycházejí z několika hledisek. Musí být k dispozici data o úrovni kontaminace potravin z národního monitoringu členských zemí, musí být známa toxicita příslušného mykotoxinu a ohled je brán také na to, aby byly stanovené limity splnitelné v praxi.

V průběhu roku 2008 došlo ke změně nařízení, které stanoví podmínky pro přejímání obilovin platebními agenturami (u nás Státní zemědělský intervenční fond – SZIF). Dnem 1. července vstoupilo v platnost nové nařízení Komise (ES) č. 687/2008, kterým bylo zrušeno NK (ES) č. 824/2000 včetně jeho následných změn. Povinnosti SZIF týkající se sledování kontaminujících látek v obilovinách však změněny nebyly a řídí se platnými nařízením pro jednotlivé komodity podle jejich

určení, a to buď jako potravinářské suroviny (pro pšenici obecnou a pšenici tvrdou) nebo krmiva (pro ječmen, kukuřici, čirok).

V současné době pro potravinářskou pšenici a ječmen platí limit pro obsah DON 1250 µg/kg (1,25 mg/kg, tj. 1,25 ppm) a pro ZEA 100 µg/kg (0,1 mg/kg, tj. 100 ppb). Kromě těchto fuzáriových mykotoxinů je v pšenici a ječmeni pro potravinářské užití limitován ještě obsah dalších mykotoxinů, a to aflatoxinu B₁ (2 µg/kg), sumy aflatoxinů (B₁+B₂+G₁+G₂) (4 µg/kg) a obsah ochratoxinu A (5 µg/kg).

Mykotoxiny – produkty mikroorganismů

Hlavními producenty mykotoxinů v obilovinách jsou v našich klimatických podmínkách houby rodu *Fusarium*, které způsobují onemocnění obilovin – fuzariózy klasu. Nejvýznamnějšími v ČR jsou druhy *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum* a na kukuřici také *F. verticillioides*. Jejich toxické produkty tvoří různorodou skupinu mnoha desítek látek, z nichž nejznámějšími a nejsledovanějšími jsou DON, ZEA, nivalenol, T-2 a HT-2 toxin a fumonisiny. V přirozených podmínkách se obvykle vyskytuje více fuzáriových mykotoxinů najednou. Jeden druh *Fusarium* spp. je totiž schopen produkovat více různých mykotoxinů a na jedné rostlině se může vyskytovat i více druhů *Fusarium*. Může pak docházet k synergickému efektu, kdy se negativní toxické účinky jednotlivých mykotoxinů na lidský organismus zesilují.

Protože obsah fuzáriových mykotoxinů v obilovinách i složení spektra patogenů *Fusarium* závisí zejména na průběhu počasí v daném roce, je třeba jejich výskyt monitorovat každoročně. V Zemědělském výzkumném ústavu v Kroměříži s.r.o. a nyní v Agrotestu fito s.r.o. je sledován výskyt fuzáriových mykotoxinů v obilovinách v ČR systematicky od r. 2005. Na obsah DON je každoročně analyzováno cca 100 vzorků pšenice, 50 ječmene a 20 žita. U vybraných vzorků jsou pak sledovány i další mykotoxiny.

METODIKA

U všech 1035 vzorků pšenice sklizně 2008 byl vyhodnocen obsah viditelně fuzariózních zrn (VFZ); na analýzy DON pak bylo vybráno 105 vzorků s nejvyšším obsahem VFZ. Minimální obsah VFZ ve vybraném souboru činil 0,14 %. Vzorky ječmene byly pro analýzy vybrány z celkového počtu 422 vzorků náhodně se zohledněním odrůdy a lokality pěstování. Vybírány byly čtyři odrůdy (Bojos, Prestige, Persey, Tolar) z typicky sladařských oblastí pěstování; celkem bylo analyzováno 50 vzorků. Pro analýzy obsahu DON a ZEA byla použita imunochemická metoda ELISA, jejíž limit kvantifikace (LOQ) je pro DON 200 µg/kg a pro ZEA 1,75 µg/kg. Metoda pro stanovení DON je v laboratoři akreditována Českým institutem pro akreditaci podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005. Přesnost a správnost obou stanovení je ověřována účastí v kruhových testech FAPAS®. Přítomnost patogenů *Fusarium* byla určována molekulárními metodami. DNA byla ze vzorků vyextrahována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) podle metodiky dané výrobcem. Pro jednotlivé druhy *Fusarium* byly použity specifické primery podle publikovaných literárních údajů (pro *F. culmorum* a *F. graminearum* podle Schilling *et al.* (1996), pro *F. avenaceum* podle Turner *et al.* (1998) a pro *F. poae* podle Parry & Nicholson (1996)). Amplifikační PCR produkty byly rozděleny v agarózovém gelu společně se 100-bp standardem (Fermentas), obarveny ethidium bromidem a vizualizovány v UV světle v dokumentačním systému SYNGENE.

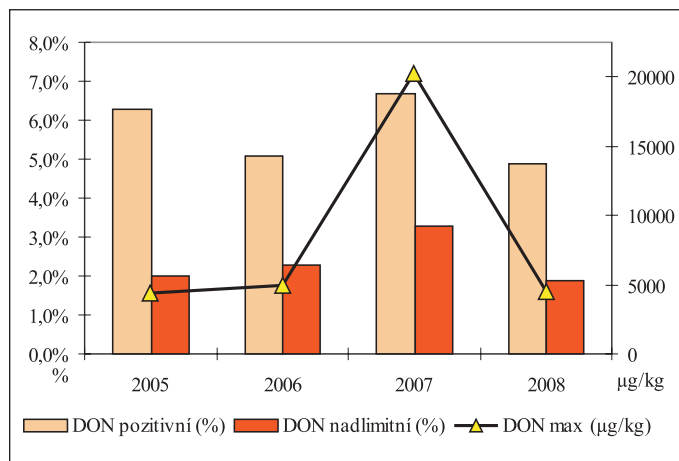
VÝSLEDKY

Pšenice

Z reprezentativního souboru 1035 vzorků pšenice sklizně 2008 bylo na základě zjištěného výskytu fuzariózních zrn vybráno 105 rizikových vzorků, které byly dále analyzovány na obsah DON. Z analyzovaných 105 vzorků mělo 51 vzorků obsah DON pozitivní (tj. nad LOQ). Dvacet z těchto vzorků pak mělo obsah DON nad limit 1250 µg/kg, maximální zjištěná hodnota činila 4543 µg/kg (odrůda Etela, předplodina kukuřice). Vzhledem k celkovému počtu vzorků v souboru (1035) je podíl nadlimitních vzorků pšenice v roce 2008 přibližně 1,9 %. Tento podíl je nejnižší ve sledované řadě let 2005–2008 (Obr. 1). 60 z těchto 105 vzorků bylo analyzováno také na obsah ZEA. Jeho obsah převýšil legislativní limit 100 µg/kg u 6 vzorků pšenice. Maximální hodnota ZEA (204 µg/kg) byla zjištěna u odrůdy Meritto (předplodina kukuřice). Všechny vzorky pšenice s vysokým obsahem ZEA měly také vysoký obsah DON (Tab. 1). Vzorek pšenice s absolutně nejvyšším obsahem DON (4543 µg/kg) měl obsah ZEA 63 µg/kg. Tento vzorek měl také nejvyšší zjištěný obsah VFZ (7,27 %).

Tabulka 1: Obsah DON, odrůda a původ vzorků pšenice s nadlimitním obsahem ZEA, ČR, 2008

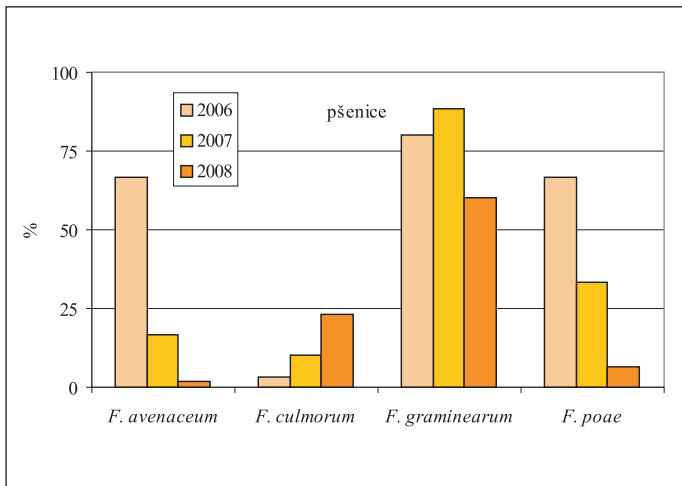
| Kraj | odrůda | předplodina (µg/kg) | ZEA (µg/kg) | DON |
|-------------|---------|---------------------|-------------|------|
| Zlínský | Clarus | neuveдена | 103 | 910 |
| Zlínský | Banquet | kukuřice | 111 | 1387 |
| Zlínský | Ebi | slunečnice | 175 | 2506 |
| Zlínský | Floret | řepka | 187 | 1903 |
| Středočeský | Meritto | kukuřice | 204 | 2818 |
| Pardubický | Biscay | kukuřice | 178 | 1896 |



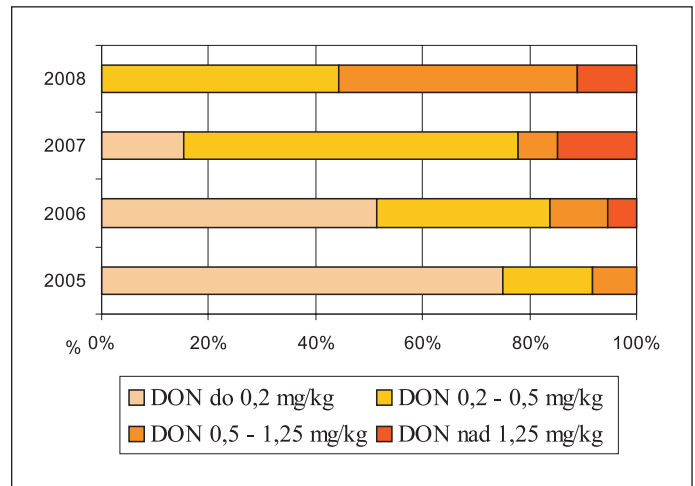
Obr. 1: Obsah deoxynivalenolu (DON) v potravinářské pšenici v ČR, 2005–2008, celkem 400 vzorků

Pro sledování druhového spektra patogenů *Fusarium* spp. bylo analyzováno 60 vzorků potravinářské pšenice. Výsledky stanovení druhového spektra patogenů *Fusarium* ve srovnání s předchozími roky 2006 a 2007 jsou znázorněny na Obr. 2.

Nejčastěji se v roce 2008 na pšenici vyskytovalo *F. graminearum* (36 vzorků z 60), pak *F. culmorum* (14 vzorků), sporadicky se vyskytovalo *F. poae* (4 vzorky) a *F. avenaceum* (jeden vzorek). Jednalo se o velmi různorodý soubor, zastoupeno bylo 33 odrůd, vzorky pocházely z 11 krajů ČR, jako



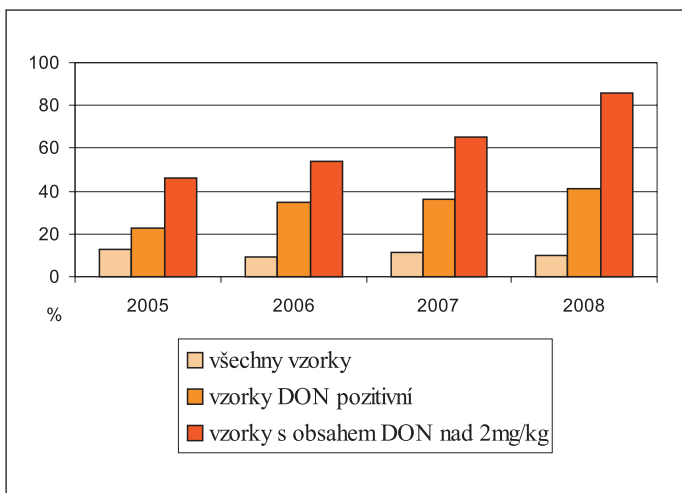
Obr. 2: Podíl jednotlivých druhů *Fusarium* spp. na zrnu pšenice, ČR, 2006–2008, celkem 180 vzorků



Obr. 4: Obsah deoxynivalenolu (DON) ve sladovnickém ječmeni v ČR, 2005–2008, celkem 200 vzorků

předplodina bylo udáváno 13 různých plodin. U třetiny vzorků nebyl identifikován žádný ze sledovaných patogenů *Fusarium*. Většinou se jednalo o vzorky s nízkým obsahem DON, byl však zjištěn vzorek s obsahem DON 1348 $\mu\text{g}/\text{kg}$, u kterého nebyl identifikován žádný druh *Fusarium*. U 20 vzorků s obsahem DON nad limit 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bylo nalezeno *F. graminearum* v 17 případech. Více druhů současně bylo napadeno 20,0 % vzorků.

U analyzovaných vzorků pšenice byla sledována také předplodina (Obr. 3). V souboru všech 1035 vzorků byla v roce 2008 kukuřice předplodinou u 10 % vzorků. Ve skupině vzorků se zjištěným pozitivním obsahem DON (51 vzorků) činil tento podíl 41 %, u 7 vzorků pšenice s vysokým obsahem DON (nad 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) byla kukuřice předplodinou u 6, tj. 86 %.



Obr. 3: Podíl kukuřice jako předplodiny u skupin vzorků s různým obsahem DON, ozimá pšenice, ČR, 2005–2008

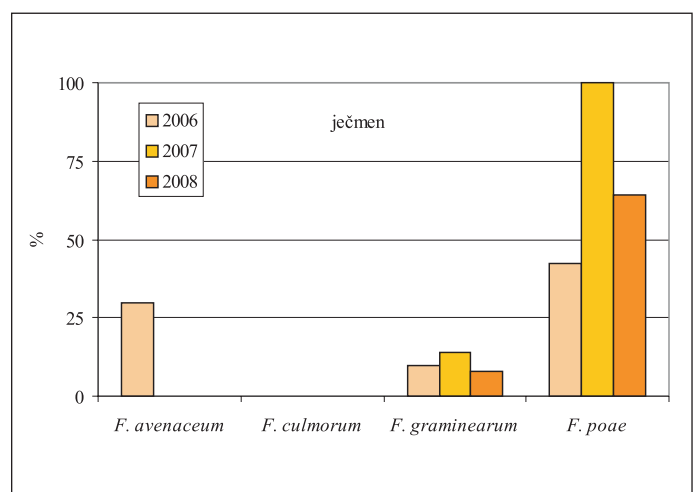
Ječmen

Byl analyzován obsah DON u 50 vzorků jarního ječmene sklizně 2008. Ve sledovaném souboru vzorků byly zahrnuty 4 odrůdy. Nejčetněji zastoupenou odrůdou byla odrůda Bojos (22 vzorků), odrůda Prestige byla zastoupena 14 vzorky, odrůda Jersey 11 vzorky a nejméně zastoupenou byla odrůda Tolar (3 vzorky). Výsledky spolu se srovnáním s roky 2005–2007 jsou

vedeny na Obr. 4. Pět vzorků mělo obsah DON nad 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 vzorek měl obsah DON nad limit pro potravinářské obiloviny. Jednalo se o odrůdu Bojos, vzorek pocházel ze Zlínského kraje a předplodinou byla kukuřice na zrno. Zjištěná hodnota činila 3710 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Jedná se o nejvyšší obsah DON, jaký byl u ječmene nalezen od r. 2005.

Ve sledované skupině 50 vzorků ječmene bylo 22 vzorků po předplodině kukuřici, 26 po předplodině jiné než kukuřice a u 2 vzorků informace o předplodině chyběly. Ve skupině vzorků po předplodině jiné než kukuřici bylo nalezeno 5 pozitivních vzorků, po předplodině kukuřici byly pozitivní 4 vzorky, mezi nimi však jeden vzorek s velmi vysokou hodnotou (3710 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Stejně jako v předchozích letech bylo u ječmene identifikováno *F. poae* jako nejčetnější patogen (32 vzorků, tj. 64 %; Obr. 5). Druhým nejčastěji zjištěným patogenem bylo *F. graminearum* (čtyři vzorky, tj. 8 %). Vzorky ječmene s vysokým obsahem DON se vyznačovaly současným výskytem *F. graminearum* a *F. poae*. *F. avenaceum*, které bylo v roce 2006 druhým nejčetnějším druhem (po *F. poae*) nebylo nalezeno ani u jednoho vzorku ječmene. *F. culmorum* u ječmene nebylo identifikováno ani jednou ve všech letech sledování. Zastoupení patogenů v roce 2008 je tedy podobné jako v roce 2007, avšak s nižší frekvencí výskytu.



Obr. 5: Podíl jednotlivých druhů *Fusarium* spp. na zrnu sladovnického ječmene, ČR, 2006–2008, celkem 140 vzorků

Žito

Na obsah DON bylo analyzováno 20 vzorků žita, vybraných na základě lokality původu, odrůdy a předplodiny. Bylo vybráno 10 vzorků po předplodině obilovině a vždy ze stejné oblasti vzorek stejné odrůdy po jiné předplodině. Byly nalezeny 2 pozitivní vzorky, jeden po předplodině obilovině (261 µg/kg) a jeden po předplodině píce (216 µg/kg). V roce 2008, stejně jako v řadě sledovaných let 2005–2007, nebyl zjištěn vzorek žita, který by nespĺňoval limit pro potravinářské obiloviny z hlediska obsahu DON.

DISKUSE

Pro úspěšnou infekci pšeničných klasů je třeba vhodná teplota a srážky spolu s vyšší vzdušnou vlhkostí v době květu ozimé pšenice. Modely, které se zabývají prognózou vzniku epidemie klasových fuzárií (FHB) sledují obvykle teplotu, relativní vlhkost a srážky 7 dní před květem a 10 dnů od začátku kvetení a dále pak intenzitu slunečného svitu ve stejných intervalech jako srážky. Za příznivou teplotu je považováno rozpětí 15–30°C a relativní vzdušná vlhkost vyšší než 90 % trvající 48–72 hodin v době květu ozimé pšenice. Důležité je pak i počasí v celém dalším období dozrávání, neboť rozhoduje o tom do jaké míry se uchycená infekce rozvine a kolik mykotoxinů se vytvoří v samotném zrnu.

V letošním roce v Kroměříži většina odrůd ozimé pšenice odkvetla v období mezi 31. květnem a 10. červnem, podstatně pro výskyt klasových fuzárií bylo tedy období od 24. května do 20. června. V první polovině období zde byl zaznamenán nedostatek srážek výrazně pod úrovní normálu, s průměrnými teplotami normálními až mírně nad normálem, avšak s výkyvy mezi dnem a nocí, ve druhé polovině chladnější, s občasnými srážkami. Klimatické podmínky pro infekci a rozvoj klasových fuzárií a následnou kontaminaci zrna mykotoxiny byly méně příznivé, než v předchozích letech. Tomu odpovídá nejnižší obsah DON v pšenici od r. 2005 jak maximální nalezené hodnoty tak i podíl nadlimitních vzorků.

Ačkoliv DON i ZEA mají stejné producenty (*F. graminearum*, *F. culmorum*), o faktorech, které výskyt ZEA ovlivňují, máme málo informací. Výskyt vzorků s nadlimitním obsahem ZEA není příliš častý. V roce 2007 byla hodnota 100 µg/kg pro limit ZEA překročena pouze u jednoho vzorku, a to jen velmi mírně (101 µg/kg), ačkoliv obsah DON byl v tomto roce mnohem vyšší než v roce 2008. V roce 2008 bylo však zjištěno 6 vzorků přesahujících limit pro obsah ZEA a maximální nalezená hodnota byla 204 µg/kg. Jak uvádí na základě sledování velkého počtu vzorků ve Velké Británii Edwards a Ray (2005), v některých letech může více vzorků pšenice přesáhnout limitní hodnoty pro ZEA než pro DON.

U ječmene bylo ze sklizně 2008 zjištěno překročení limitu pro DON pouze u jednoho vzorku, v roce 2007 to byly 4 vzorky. U ječmene nebyla mezi předplodinou kukuřicí a zvýšeným obsahem DON pozorována tak silná vazba jako u pšenice.

Zajímavý je sporadický výskyt patogenů *Fusarium* na zrnu ze sklizně 2008. V některých případech nebyl nalezen žádný ze sledovaných hlavních toxinních druhů *Fusarium* ani na vzorcích s pozitivním obsahem DON. Druhé spektrum patogenů *Fusarium* na pšenici a ječmeni je naprosto odlišné. Zatímco na pšenici ve všech sledovaných letech převládalo *F. graminearum*, na ječmeni jasně dominuje *F. poae*.

ZÁVĚR

Výskyt DON ve vzorcích potravinářské pšenice byl v roce 2008 nejnižší v řadě sledovaných let 2005–2008. Limit pro potravinářské obiloviny byl překročen přibližně u 1,9 % vzorků pšenice. Mezi vzorky pšenice s vyšším obsahem DON převládaly vzorky s předplodinou kukuřice. U 5 vzorků pšenice byly nalezeny v nadlimitních hodnotách současně DON i ZEA.

U ječmene byl v roce 2008 ve srovnání s rokem 2007 nižší podíl vzorků s DON v rozmezí 200–500 µg/kg a limit 1250 µg/kg byl překročen pouze u jednoho vzorku. V roce 2008 však byla nalezena u ječmene nejvyšší hodnota DON (3710 µg/kg) od roku 2005. Jednalo se o ječmen odrůdy Bojos, pěstovaný po předplodině kukuřici. Tento vzorek byl však jediným ječmenem, který v roce 2008 limit pro potravinářské obiloviny přesáhl.

U vzorků žita byl v roce 2008, stejně jako v předcházejících letech obsah DON v porovnání s pšenicí i ječmenem nižší. V žádném z dosud sledovaných let 2005–2008 nebyl zjištěn vzorek žita, který by přesáhl limit 1250 µg/kg.

Protože obsah fuzáriových mykotoxinů v obilovinách závisí zejména na průběhu počasí v daném roce, je třeba jejich výskyt monitorovat každoročně. Kromě počasí mezi rizikové faktory patří způsob zpracování půdy, předplodina a absence fungicidní ochrany. Velmi rizikovou předplodinou pro ozimou pšenici je kukuřice, zejména v kombinaci s minimalizovaným zpracováním půdy.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány v rámci řešení projektů MZe-NAZV QG50041 a QG60047.

LITERATURA

- Komise evropských společenství (2006): Doporučení Komise 2006/576/ES ze dne 17. srpna 2006 o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat. Úřední věstník Evropské Unie, 229, 23. 8. 2006.
- Edwards, S. G., Ray, R. (2005): Fusarium mycotoxins in UK wheat production. Congress Proceedings, The BCPC International Congress Crop Science and Technology 2005, 31 Oct – 2 Nov 2005, Glasgow, Scotland, UK, s. 395–402.
- Parry D. W., Nicholson P. (1996): Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology, 45: 383–391.
- Schilling A. G., Möller E. M., Geiger H. H. (1996): Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. Molecular Plant Pathology, 86 (5): 515–522.
- Turner A. S., Lees A. K., Rezanoor H. N., Nicholson P. (1998): Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. Plant Pathology, 47: 278–288.

Kontaktní adresa: RNDr. Ivana Polišínská, Ph.D., Agrotest fyto s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, polisenska@vukrom.cz