

TOMASZ GÓRAL¹
KINGA STUPER-SZABLEWSKA²
ANNA PRZYBYLSKA²
ANNA MATYSIAK²
JULIUSZ PERKOWSKI²

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

² Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Chemii, Poznań, kstuper@up.poznan.pl

Wpływ inokulacji grzybami z rodzaju *Fusarium* na zawartość beta-sitosterolu w ziarnie różnych odmian pszenicy ozimej*

The influence of inoculation with fungi of the genus *Fusarium* on beta-sitosterol content in grain of different varieties of winter wheat

Celem badań było określenie wpływu inokulacji grzybami z rodzaju *Fusarium* na zawartość beta-sitosterolu w ziarnie pszenicy. Analizie poddano 30 odmian pszenicy ozimej, uprawianej w tych samych warunkach agrotechnicznych i klimatycznych w dwóch wariantach doświadczalnych. Pierwszy z nich były to próby kontrolne wzrastające bez ingerencji, natomiast drugim wariantem były próby inokulowane zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*. Beta-sitosterol, jako najważniejszy spośród steroli endogennych roślin analizowano po wcześniejszej saponifikacji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym i ekstrakcji pentanem za pomocą UPLC z detektorem DAD. Na podstawie uzyskanych wyników analiz chemicznych stwierdzono istotne różnice w zawartości analizowanego sterolu między próbkami kontrolnymi i inokulowanymi, jak również między odmianami. Średnie stężenie beta-sitosterolu w próbkach kontrolnych wynosiło 433,51 mg/kg, natomiast w próbkach inokulowanych było istotnie niższe i wynosiło 340,88 mg/kg. Niniejsze badania wskazują jednoznacznie, iż proponowany do tej pory w literaturze, a przedstawiony dla innych mikroorganizmów mechanizm metabolizowania roślinnych steroli jest podobny dla grzybów z rodzaju *Fusarium*.

Słowa kluczowe: beta-sitosterol, *Fusarium*, pszenica

The aim of the study was to determine the effect of inoculation with *Fusarium* fungi on the content of beta-sitosterol in wheat grain. Thirty varieties of winter wheat cultivated under the same agronomic and climatic conditions were tested in two experimental variants. The first of these was a control trial growing without interference, while the second variant was an inoculation experiment with fungal spores of the genus *Fusarium*. Beta-sitosterol, the most important among the endogenous

* Badania zostały częściowo zrealizowane w ramach środków z projektu badawczego NCN nr 2012/07/B/N29/02385

Redaktor prowadzący: Barbara Zagdańska

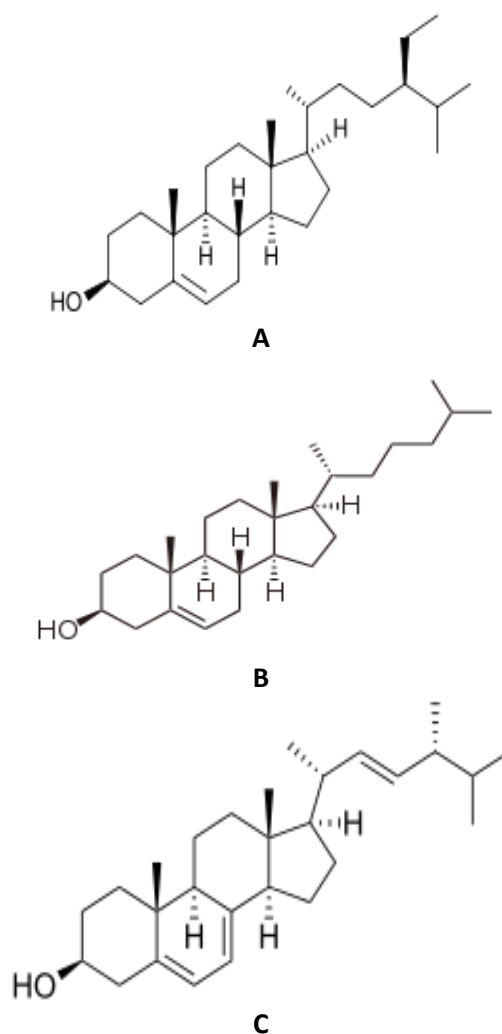
sterols of plants, was analyzed after microwave assisted saponification and pentane extraction with UPLC with DAD detector. Based on the results of the chemical analyzes, significant differences in sterol contents between control and inoculated samples as well as between varieties were found. The mean concentration of beta-sitosterol in the control samples was 433.51 mg/kg, whereas in the inoculated samples it was significantly lower and was 340.88 mg/kg. This study clearly indicates that the mechanism of metabolism of plant sterols presented in the literature for the other microorganisms is similar to that of *Fusarium* species.

Key words: beta-sitosterol, *Fusarium*, wheat

WSTĘP

Sterole endogenne roślin należące do alkoholi alicyklicznych z grupy steroidów nazywane fitosterolami są grupą metabolitów wtórnych, do których zalicza się zarówno sterole, jak i ich nasycone formy, czyli stanole. Badania literaturowe wskazują, iż w ziarnie pszenicy zawartość fitosteroli ogółem wynosi od 344 do 2050 µg/g ziarna (Bryngelsson i in., 1997). Ich największą koncentrację stwierdzono w okrywie owocowo-nasiennej oraz w zarodku ziarniaka pszenicy. Zróżnicowanie zawartości fitosteroli zależy głównie od genotypu pszenicy. Wśród steroli endogennych pszenicy dominującym związkiem jest β-sitosterol, a w następnej kolejności α-sitosterol, stigmasterol, kampesterol, Δ⁵-awenasterol, Δ⁷-awenasterol oraz kampestanol i β-sitostanol (Bryngelsson i in., 1997). Fitosterole w błonach komórkowych roślin odgrywają analogiczną funkcję do tej, jaką pełni cholesterol w błonach komórkowych zwierząt. W związku z powyższym podjęto badania dotyczące wpływu infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium* na poziom fitosteroli w ziarniakach pszenicy z uwzględnieniem zróżnicowania odmianowego. W ziarnie pszenicy fitosterole występują głównie w zarodku, ale także w okrywie owocowo-nasiennej w postaci frakcji niezmydlającej się lipidów, w postaci wolnej, estrów lub glikozydów (Jong i in., 2003). Ich estrowe formy to głównie połączenia z kwasami hydroksycynamonowymi (ferulowy, p-kumarynowy). Zawartość beta-sitosterolu w zbożach określa się na poziomie 50% wszystkich steroli. Pod względem zawartości fitosteroli pierwsze miejsce spośród zbóż zajmuje pszenica i żyto, w dalszej kolejności jęczmień, pszenżyto i owies (Pironen i in., 2000; Quilez i in., 2003; Nurmi i in., 2010).

Podczas infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium* dochodzi do m.in. rozkładu tkanek roślinnych, a jednym z istotnych etapów penetracji grzybni do wnętrza komórki roślinnej jest enzymatyczny rozkład ścian komórkowych ziarniaka. W związku z powyższym biodegradacja steroli jako jednego z ważnych elementów budulcowych jest konieczna (Esche i in., 2012). W literaturze nie zaprezentowano dotychczas danych na temat związku poziomu beta-sitosterolu, czy innych steroli ze zmasowaną infekcją grzybiczą. Beta-sitosterol na skutek podobieństwa strukturalnego do ergosterolu czy cholesterolu (rys. 1) wywołuje w stosunku do nich silny efekt konkurencyjny (Brown i in., 2010). Dzięki temu jest on prawdopodobnie wykorzystywany przez mycobiota w ich szlaku metabolicznym (Alignan i in., 2009).



Rys. 1. Wzory strukturalne: beta-sitosterolu (A), cholesterolu (B) i ergosterolu (C)
Fig 1. Structural patterns: beta-sitosterol (A), cholesterol (B) and ergosterol (C)

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono analizę zawartości beta-sitosterolu w ziarnie 30 odmian pszenicy ozimej uprawianej w 2 wariantach doświadczalnych. Pierwszy to próby kontrolne (K) pozyskane z pszenicy uprawianej w standardowych warunkach, drugi to próby inokulowane (I) grzybami z rodzaju *Fusarium*. Celem badań było określenie zawartości beta-sitosterolu w próbach ziarna pszenicy uprawianej w obydwu wariantach doświadczalnych. Wyniki analiz chemicznych mają dać odpowiedź na pytanie czy zmasowana infekcja patogenami zbóż ma związek ze zmianą zawartości beta-sitosterolu w ziarnie pszenicy oraz czy jest to skorelowane z odpornością analizowanych odmian.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano 30 odmian pszenicy zwyczajnej ozimej (*Triticum aestivum* L.) (tab. 1). Odmiany te znajdują się w Krajowym Rejestrze Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU). Zostały one wprowadzone do rejestru w okresie od 1998 (Mewa) do 2009 (Belenus, Kampana). Według danych COBORU (2010) odmiany Bogatka, Tonacja, Ludwig, Zyta, Legenda, Batuta miały największy udział w nasiennictwie. Analizowane odmiany pszenicy ozimej różniły się pod względem cech morfologicznych, odporności na choroby oraz pochodzenia.

Tabela 1

Charakterystyka 30 odmian pszenicy ozimej (R — odporna, MR — średnio odporna, S — podatna)
(Góral i in., 2015)
Characteristics of 30 winter wheat cultivars (R — resistant, MR — medium resistant, S — susceptible)
(Góral et al., 2015)

No.	Odmiana Cultivar	Pochodzenie Pedigree	Odporność ¹ Resistant ¹
1	Akteur	(87-308 × Astron) × Astron	MR
2	Alcazar	Charger × Lynx	S
3	Anthus*	Greif × (NFC2.192 × Zentos)	MR
4	Batuta	(Konsul × Korweta) × Kobra	R
5	Belenus	Cortez × ST × Hussar	S
6	Bogatka	Urban × Kobra	MR
7	Boomer	Haven × Torfrida × Transit	R
8	Dorota	94ST85 × Tambor	R
9	Figura	(Juma × G 664/26) × Pegassos	MR
10	Garantus	Kris × Piko × Tambor	R
11	Jenga	98/2574 × Dekan	MR
12	Kampana	CRT 9 × Kris	S
13	Kohelia	(Zentos × Kobra) × (Euris × Kobra)	MR
14	Legenda	N2015/85 × Astron	MR
15	Ludwig	Ares × Farmer	MR
16	Markiza	MIB 295 × Zyta	R
17	Meteor	Tarso × Contra × Hadmerslebener 91952-83	MR
18	Mewa	(CHD 756/78 × FD 303) × Gama	R
19	Mulan	Drifter × Maverick	R
20	Muszelka	Kris × Rubens	S
21	Naridana	Rektor × Kobra	MR
22	Nateja*	(Emika × EGRQ) × Kobra	R
23	Ostka St.	Gorbi × STH 48	MR
24	Ostroga	CEB 9504 × Mewa	MR
25	Slade	Normann × [584-4-12 × (Haven × Consort)]	S
26	Smuga	KOC 1688 × CHD 498/84	MR
27	Sukces	Jubilatka × SMH 8134	MR
28	Tonacja	Jubilatka × SMH 8134	MR
29	Türkis	Tambor × Hadmerslebener 91639-89	R
30	Zyta	Jubilatka × SMH 8134	R

¹ Odporność na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych

¹ Resistnce to Fusarium head blight and toxin accumulation

Doświadczenia polowe zostały założone w układzie split-plot. Odmiany wysiano na poletkach o powierzchni 1 m² w trzech powtórzeniach w dwóch kombinacjach. Pierwsza stanowiła kontrolę, niechronioną fungicydami oraz nieinokulowaną. Druga kombinacja

inokulowana była izolatami *Fusarium culmorum*. Dystans pomiędzy blokami wynosił 5 m. Bloki oddzielone zostały pasami szerokości 1 m obsianymi długosłomą odmianą pszenżyta ozimego.

Do produkcji inokulum zastosowano trzy izolaty *Fusarium culmorum* produkujące deoksyniwalenol (KF846 — chemotyp DON), niwalenol (KF350 — chemotyp NIV) i zearalenon (ZFR 16 — chemotyp DON). Izolaty należące do chemotypu u DON pochodziły z Radzikowa i zostały wyizolowane z kłosów pszenicy (Wiśniewska i Kowalczyk, 2005; Ochodźki i Góral, 2006). Izolat o chemotypie NIV pochodził z Holandii (oznaczony, jako IPO348) i został wyizolowany z kłosa pszenicy (Snijders i Perkowski, 1990).

Izolaty były inkubowane na autoklawowanym ziarnie pszenicy w szklanych kolbach przez około 4 tygodni a następnie naświetlane ciągłym światłem UV przez 4 do 7 dni w temperaturze 18°C. Ziarno skolonizowane przez *F. culmorum* było następnie suszone i przechowywane w lodówce w temperaturze 4°C do momentu użycia.

W dniu, kiedy wykonywana była inokulacja, ziarno z grzybnią i zarodnikami *F. culmorum* namaczano w wodzie przez około 2 godziny i następnie filtrowano w celu uzyskania zawiesiny zarodników. Stężenie zawiesin zarodników poszczególnych izolatów ustalono na około 5×10^5 zar./ml za pomocą hematokrytu. Zawiesiny zostały zmieszane w równych proporcjach.

Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników w ilości około 100 ml zawiesiny na 1 m². Inokulacja prowadzona była oddzielnie na każdym poletku na początku kwitnienia i powtarzana około 3 dni później w fazie pełni kwitnienia. W fazie tej pszenica jest najbardziej wrażliwa na infekcję kłosa przez *Fusarium*. Inokulacje prowadzone były w godzinach wieczornych około godziny 20., kiedy temperatura wynosiła poniżej 20°C i wzrastała względna wilgotność powietrza.

W czasie żniw zebrano ręcznie po 100 kłosów z każdego poletka. Kłosa młócone były młocarnią laboratoryjną o słabym nawiewie w celu zapobieżenia utracie lekkich porażonych ziarniaków (Góral i in., 2015).

Analiza beta-sitosterolu

Do analizy pobrano próby o masie ok. 10 g, z których po zmieleniu za pomocą młynka laboratoryjnego (WŻ-1) do dalszych analiz pobrane zostały próbki o masie 0,1 g. Próbki umieszczono w zakręcanych probówkach do kultur o pojemności 17 cm³, w których przeprowadzono ekstrakcję beta-sitosterolu z jednoczesnym zmydleniem. Procesy te przebiegały pod wpływem promieniowania mikrofalowego. W tym celu do probówek dodano metanol (2 cm³) oraz 2 molowy wodny roztwór wodorotlenku sodu (0,5 cm³). Szczelnie zamknięte probówki do kultur dla bezpieczeństwa umieszczono w plastikowych butelkach, które z kolei umieszczono w kuchence mikrofalowej (Whirlpool model AVM 401/1/WH, 2450 MHZ, 900W). Próby poddano wpływowi promieniowania mikrofalowego o mocy 350W w dwóch sesjach po 20 sekund każda. Po schłodzeniu (ok. 15 min.) próby zobojętniono za pomocą 1 molowego wodnego roztworu kwasu solnego (1 cm³). Następnie po dodaniu 2 cm³ metanolu przeprowadzono ekstrakcję beta-sitosterolu za pomocą pentanu (3 × 4 cm³). Ekstrakty pentanowe zebrano i połączono w fiolce o pojemności 8 cm³ i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed analizą

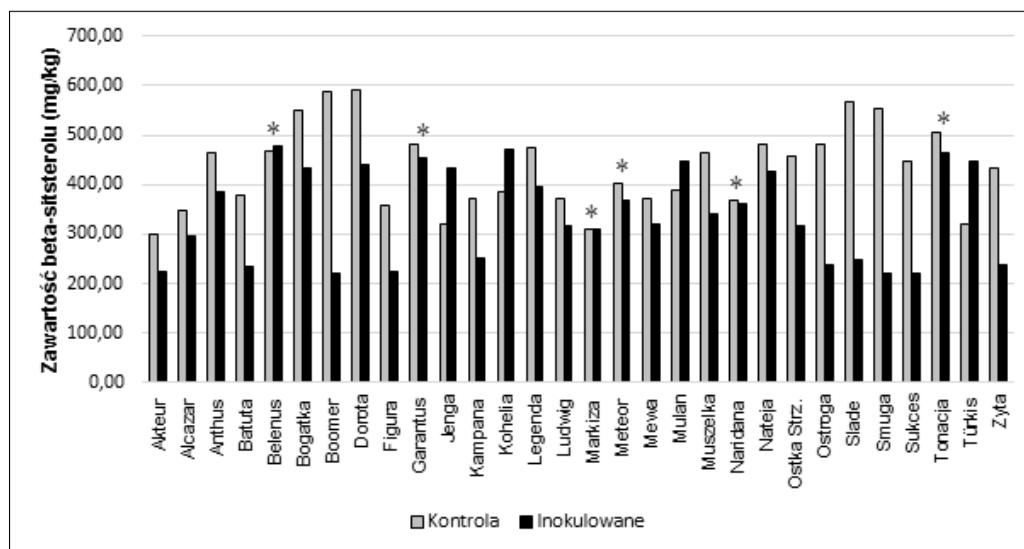
próbki rozpuszczono w 1 cm³ metanolu. Analizę przeprowadzono za pomocą ultrasprawnego chromatografu cieczowego (Acquity UPLC, Waters) z absorbcyjometrycznym detektorem diodowym (Acquity PDA, Waters). Rozdział chromatograficzny odbywał się na kolumnie Acquity UPLC Shield RP 18 1,7 um 2,1 × 150 mm w temperaturze 50°C; jako fazę wymywającą zastosowano mieszaninę metanolu, acetonitrylu i wody w stosunku 85:10:5 (v/v) przy przepływie 0,5 ml/min. Pomiar stężenia beta-sitosterolu prowadzono metodą wzorca zewnętrznego przy długości fali $\lambda = 230$ nm. Identyfikacja związku odbywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego piksu z czasem retencji standardu, który wynosi 1,4 min oraz przez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu i powtórna analizę.

Analiza statystyczna

Zawartość beta-sitosterolu w ziarnie pszenicy wykonano w trzech powtórzeniach chemicznych. Uzyskane wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA). Ocena istotności różnic pomiędzy średnimi została przeprowadzona przy użyciu testu Tukeya dla poziomu istotności $P < 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wśród badanych odmian w wariancie kontrolnym Boomer i Dorota cechowały się najwyższym stężeniem beta-sitosterolu na poziomie ok. 580 mg/kg, najniższe natomiast stężenie tego sterolu stwierdzono dla odmian Akteur i Alcazar na poziomie ok. 300 mg/kg (rys. 2).



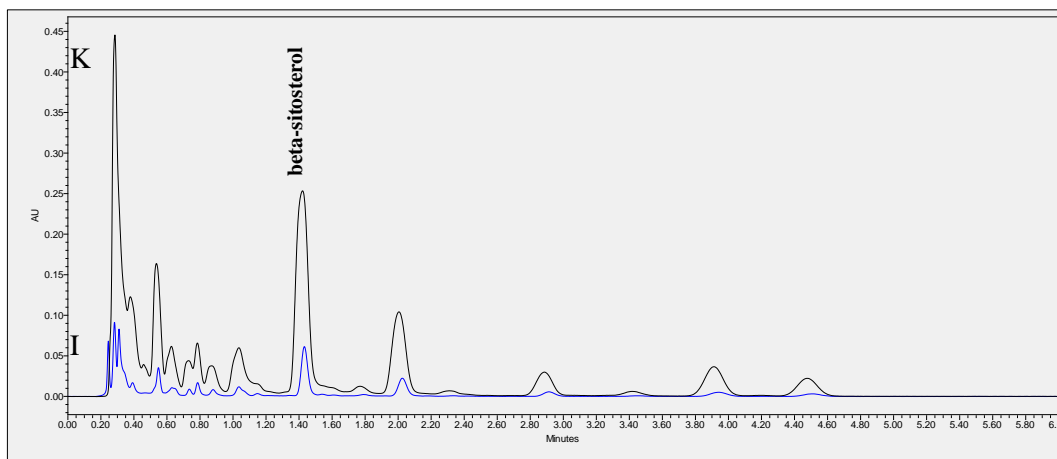
Rys. 2. Zawartość beta-sitosterolu (mg/kg) w ziarnie pszenicy inokulowanych grzybami z rodzaju *Fusarium* oraz prób naturalnie porażonych określanych jako kontrolne (* - oznacza brak istotnych różnic na poziomie ufności 0,05)

Fig. 2. The content of beta-sitosterol (mg/kg) in wheat grains inoculated with *Fusarium* fungi and in naturally infested samples (* - there are no significant differences at the confidence level of 0.05)

Rozpatrując odporność badanych odmian podzielono je na 3 grupy (odporne, średnio odporne i podatne) w ramach których przeanalizowano 10 odmian odpornych, 15 odmian średnio odpornych oraz 5 odmian podatnych (tab. 1).

Zaobserwowano istotne różnice między średnim stężeniem beta-sitosterolu w zależności od odporności badanych odmian pszenicy. Odporne odmiany cechowały się najwyższą średnią zawartością badanego sterolu wynoszącą $354,2 \pm 23,41$ mg/kg, odmiany średnio odporne $337,9 \pm 39,14$ mg/kg, natomiast odmiany podatne średnio $312,8 \pm 16,74$ mg/kg.

W przypadku prób inokulowanych stwierdzono spadek zawartości beta-sitosterolu (rys. 2), jednocześnie zaobserwowano istotny związek między zawartością tego sterolu w próbach kontrolnych i inokulowanych. Im wyższa zawartość beta-sitosterolu w próbach kontrolnych tym wyższy spadek jego zawartości w próbach inokulowanych. Stosunek stężenia analizowanego fitosterolu w próbach kontrolnych do inokulowanych jest w związku z powyższym związany z odpornością odmianową. Najwyższą wartość liczbową niniejszej zależności cechują się odmiany podatne, niższą średnio odporne, najniższą odporne (rys. 4). Przykładowy chromatogram przedstawiający różnice zawartości beta-sitosterolu w próbce ziarna kontrolnego i inokulowanego pszenicy odmiany Slade przedstawia rysunek 3.

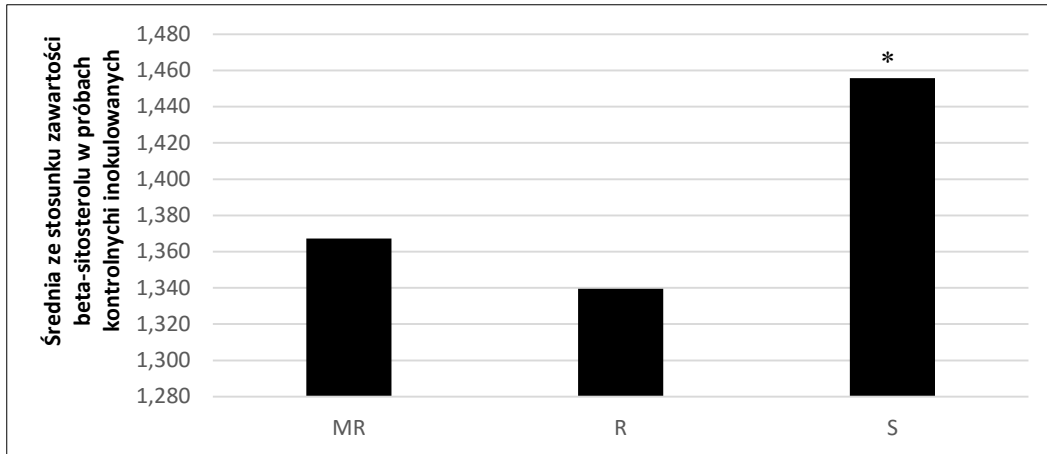


Rys. 3. Graficzne porównanie zawartości beta-sitosterolu w ziarnie pszenicy odmiany Slade, pierwszy chromatogram dotyczy wariantu kontrolnego (K), natomiast drugi wariantu inokulowanego (I)

Fig. 3. Graphical comparison of beta-sitosterol content in wheat grains of the Slade variety, the first chromatogram concerned control variant (K), while the second variant inoculated (I)

Uzyskane wyniki dla dwóch wariantów doświadczalnych wskazują na wykorzystanie lub biodegradację beta-sitosterolu przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. W przypadku pierwszej możliwości może on być wykorzystany w szlaku metabolicznym grzybów poprzez przekształcenie go w ergosterol i transport do ściany komórkowej. Z drugiej strony za pomocą mechanizmów enzymatycznych może być przekształcony w stigmasterol lub cholesterol (Sonaware i in., 2016). Autorzy przedstawili proponowany

mechanizm metabolomiczny steroli pochodzących z komórek pomidora przez drożdże. Stwierdzili, iż komórki drożdżowe za pomocą 12 enzymów w 10 etapach prowadzą do metabolizowania steroli roślinnych głównie w kierunku cholesterolu i stigmasterolu.



Rys. 4. Zależności ilościowe beta-sitosterolu w wariacie kontrolnym i inokulowanym doświadczenia polowego z uwzględnieniem odporności odmian (* - oznacza brak istotnych różnic na poziomie ufności 0,05)

Fig. 4. The quantitative dependence of beta-sitosterol in the control variant and the inoculated field experiment with respect to varietal resistance (* - there are no significant differences at the confidence level of 0.05)

Badania dotyczące wpływu zmasowanej infekcji patogenicznymi gatunkami mikrobiota na zawartość steroli endogennych komórek roślinnych odpowiedzialnych zarówno za szczelność ścian komórkowych jak również wykazujących działanie przeciwutleniające nie były do tej pory prowadzone. Dodatkowym aspektem prowadzonych badań w ramach niniejszej pracy jest przebadanie reprezentatywnej liczby 30 odmian pszenicy ozimej o zróżnicowanej odporności. Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki oraz dokonane obserwacje wyznaczają nowy kierunek w badaniach metabolizmu patogenów grzybowych podczas infekcji zbóż.

LITERATURA

- Alignan M., Roche J., Bouniols A., Cerny M., Mouloungui Z., Merah O. 2009. Effects of genotype and sowing date on phytosterol-phytosterol content and agronomic traits in wheat under organic agriculture. *Food Chem.* 117 (2): 219 — 225.
- Brown A. W., Hang J., Dussault P. H., Carr T. P. 2010. Phytosterol ester constituents affect micellar cholesterol solubility in model bile. *Lipids* 45 (9): 855 — 862.
- Bryngelsson S., Johnsson M., Normen L., Dutta P., Andersson H. 1997. Plant sterols in cereals products. In: *Bioactive inositol phosphates and phytosterols in foods*. Sandberg A-S., Andersson H., Amado R. (Eds), COST 916, Second Workshop, Goteborg: 131 — 134.

- Esche R., Barnsteiner A., Scholz B., Engel K. 2012. Simultaneous analysis of free phytosterols/phytostanols and intact phytosteryl/phytostanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 60 (21): 5330 — 5339.
- Góral T., Stuper-Szablewska K., Buśko M., Boczkowska M., Walentyn-Góral D., Wiśniewska H., Perkowski J. 2015. Relationship between genetic diversity and Fusarium toxin profile of winter wheat cultivars. *The Plant Pathology Journal* 31 (2): 1 — 19.
- Jong A., Plat J., Mensink R. P. 2003. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J. Nutr. Biochem.* 14: 362 — 369.
- Nurmi T., Lampi A. M., Nyström L., Piironen V. 2010. Effects of environment and genotype on phytosterols in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* 58 (17): 9314 — 9323.
- Piironen V., Toivo J., Lampi A.M. 2000. Natural sources of dietary plant sterols. *J. Food Compos. Anal* 13: 619 — 624.
- Prashant D. Sonawane, Jacob Pollier, Sayantan Panda, Jedrzej Szymanski, Hassan Massalha, Meital Yona, Tamar Unger, Sergey Malitsky, Philipp Arendt, Laurens Pauwels, Efrat Almekias-Sieg, Ilana Rogachev, Sagit Meir, Pablo D. Cárdenas, Athar Masri1, Marina Petrikov, Hubert Schaller, Arthur A. Schaffer, Avinash Kamble, Ashok P. Giri, Alain Goossens, Asaph Aharoni. 2016. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature* 3: 16205.
- Quilez J., Garcia-Lorda P., Salas-Salvado J. 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.* 22 (4): 343 — 351.

