Wytwarzanie patuliny przez różne izolaty grzyba *Penicillium expansum* (Link) Thom*

M. PYTEL i H. BORECKA

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

⟨Otrzymano dn. 27.01.1981⟩

Abstract

M. Pytel, H. Borecka ⟨Research Institute of Pomology and Floriculture, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, Poland⟩ Acta Agrobotanica 35, ⟨2⟩: 235-242, 1982.

Production of patulin by various isolates of Penicillium expansum (Link) Thom

The production of patulin by fourteen isolates of *Penicillium expansum* (Link) Thom was studied. The fungus was isolated from apples, pears and air in cold storage rooms in Poland. Different isolates of fungus produced from 268 to 2225 µg/ml patulin into the liquid medium. The productivity of the isolates depends on the source of carbon in the medium and temperature during fungus growth. Production of patulin was not correlated with the pathogenicity of the fungus isolate. The fungus produces less patulin when growing on apple tissue than on Czapek liquid medium.

WSTĘP

Grzyby z rodzaju *Penicillium* należą do powszechnie występujących patogenów owoców w okresie przechowywania. Najczęściej sprawcą gnicia jabłek jest grzyb *Penicillium expansum* (Link) Thom (Borecka, 1962; 1977). Szkodliwość tego gatunku polega nie tylko na rozkładzie gnilnym owoców, lecz także na wytwarzaniu toksyny patuliny, która przenika do podłoża (Sommer i in., 1974, 1977; Wilson i Nuovo, 1973; Frank i in., 1976). Stwierdzono, że patulina jest toksyczna dla wszystkich grup systematycznych świata żywego i ma działanie hepatotoksyczne, rakotwórcze, mutagenne i teratogenne (Ciegler i in., 1971, 1976; Ciegler, 1977; Reiss, 1970, 1973; Singh, 1967). Dawki letalne dla ssaków wynoszą przy podawaniu podskórnym LD₅₀ 15 mg/kg, a przy

*Praca magisterska wykonana w Instytucie Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii, SGGW-AR w Warszawie. Praca częściowo finansowana przez USDA PL-480, FG-Po-351 (JB-17).

Thesis for master's degree at Department of Phytopathology, Institute of Plant Protection, Warsaw Agricultural University, Warsaw. Partly supported by grant USDA PL-480, FG-Po-351 (JB-17).

doustnym 35 mg/kg (Ciegler, 1977). Systematyczne podawanie patuliny powoduje jej kumulację w organizmie i progresywne działanie. Badania histopatologiczne wykazały w takich przypadkach degradację powierzchni kory mózgowej, przekrwienie mięśni i innych organów, obrzęk płuc, a także zmiany w wątrobie i nerkach (Bullerman, 1979; Ciegler, 1977).

Patulina (4-hydroksy-4H-furo (3,2c) pyran-2(6H)-1) wzór sumaryczny $C_7H_6O_4$, ma ciężar molekularny 154, jest metabolitem wytwarzanym przez niektóre gatunki grzybów należących do rodzajów *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssosclamyces* (Ciegler i in., 1971).

W badaniach przeprowadzonych na owocach porażonych przez grzyby z rodzaju *Penicillium* ustalono występowanie podobnych ilości patuliny w jabłkach, gruszkach, brzoskwiniach, morelach i czereśniach, natomiast znacznie mniej toksyny występowało w miększu śliwek (Buchanan i in., 1974; Frank i in., 1976; Harwig i in., 1973; Lovett i in., 1975; Sommer i in., 1974). 50% badanych jabłek z objawami mokrej zgnilizny, zawierało patulinę w ilościach od 17,7 mg/jabłko do 20 mg/jabłko (Harwig i in., 1973). Ilość patuliny w zgniłej tkance owocu wzrasta wraz ze wzrostem plamy gnilnej, lecz koncentracja toksyny w zgniłej tkance maleje (Buchanan i in., 1974). Zdrowa tkanka jabłka wokół plamy gnilnej zawiera patulinę w małych ilościach (Lovett i in., 1975). W owocach czereśni, moreli i śliwek przenikanie toksyny do zdrowej tkanki jest małe, natomiast w przypadku owoców brzoskwiń, gruszek i pomidorów przenikanie to jest duże (Buchanan i in., 1974; Frank i in., 1977).

Wszystkie badania dotyczące patuliny obejmują głównie jej występowanie w różnych gatunkach owoców i w ich przetworach oraz szkodliwość tej toksyny dla zdrowia ludzi i zwierząt (Beer, 1974; Bullerman, 1979). Duża zmienność w zdolności grzyba do wytwarzania patuliny (Sommer i in., 1974) jest jednym z czynników decydujących o stopniu skażenia tą toksyną owoców i ich przetworów (Wilson i Nuovo, 1973; Scott i in., 1972; Lindroth i Miskanen, 1978; Meyer, 1978).

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie różnic w zdolności polskich izolatów grzyba *Penicillium expansum* do wytwarzania patuliny.

MATERIAŁ I METODYKA

Zbadano wytwarzanie patuliny przez czternaście izolatów grzyba *Penicillium expansum* (Link) Thom. Izolaty pochodziły z owoców różnych odmian jabłek i gruszek oraz z powietrza w chłodni (tab. 1). Wytwarzanie patuliny przez grzyb analizowano metodą opisaną przez Lovett'a i in. (1975) przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej i spektrofotometru siatkowego. Podstawą do oceny poziomu wytwarzania patuliny przez izolat była ilość tej toksyny w płynnej pożywce Czapka, na której grzyb rósł siedem dni w temperaturze 25°C. Pożywkę

tę zaszczepiono krążkami grzyba wyciętymi z pasa środkowego siedmiodniowej kultury macierzystej. Trzy kultury jednego izolatu, rosnące na 25 ml pożywki płynnej każda, stanowiło jedno powtórzenie. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Tabela 1—Table 1

Pochodzenie izolatów grzyba *Penicillium expansum* (Link) Thom
Origin of *Penicillium expansum* (Link) Thom isolates

Nr izolatu No. of isolate		Pochodzenie Origin
	Jabłka odmian: Apple varieties:	
879	'Malinowa Oberlandzka'	Skierniewice, chłdnia +4°C, 5% CO ₂ + 2% O ₂
	'Oberländer Himbeerapfel'	Skierniewice, cold storage +4°C, 5% CO ₂ + 2% O ₂
783	'Starking'	Nowa Wieś k/Warki
	'Starking'	Nowa Wieś near Warka
86	'Landsberska'	Lubianków k/Skierniewic
	'Landsberger Renette'	Lubianków near Skierniewice
630	'Malinowa Oberlandzka'	Dąbrowice k/Skierniewic
	'Oberländer Himbeerapfel'	Dąbrowice near Skierniewice
404	'Jonatan'	Warszawa — Ursynów
	'Jonathan'	Warsaw — Ursynów
696	'Książę Albrecht Pruski'	Skierniewice, chłdnia 0°C
	'Prinz Albrecht von Preussen'	Skierniewice, cold storage 0°C
611	'Malinowa Oberlandzka'	Skierniewice, chłdnia 0°C
	'Oberländer Himbeerapfel'	Skierniewice, cold storage 0°C
	Gruszki odmian: Pear varieties:	
240	'Lukasówka'	Skierniewice, chłdnia +4°C
	'Alexander Lucas'	Skierniewice, cold storage +4°C
47	'Salisbury'	Skierniewice, chłdnia 0°C
	'Princesse Marianne'	Skierniewice, cold storage 0°C
	Powietrze, chłdnia: Air, cold storage:	
744	+4°C	Skierniewice
742	+4°C	Skierniewice
2	+4°C	Skierniewice
729	0°C	Skierniewice
19	0°C	Skierniewice

W celu ustalenia związku pomiędzy patogenicznością badanych izolatów, a ich zdolnością do wytwarzania patuliny, zakażono każdym izolatem grzyba po 10 sztuk jabłek odmiany 'Starking'. Do zakażeń użyto krążków kultur, które umieszczano z dwóch stron jabłka, w miejscu usuniętej skórki. Jabłka przecho-

wywano w temperaturze 15°C i 95% RH. Po siedmiu dniach, na podstawie wielkości powstałych plam gnilnych, ustalano patogeniczność izolatu oraz analizowano wydzielanie patuliny do zgniłej tkanki jabłek przez cztery reprezentatywne izolaty grzyba *Penicillium expansum*. Każdy z tych izolatów wytwarzał różną ilość patuliny do płynnej pożywki Czapka. Te same izolaty grzyba użyto do wstępnego ustalenia wpływu temperatury na wytwarzanie patuliny. Kultury rosły w temperaturach 15°C i 25°C. Dobór temperatur miał na celu wyeliminowanie czynnika zahamowania wzrostu grzyba przez zbyt niską temperaturę.

Wstępnie przeanalizowano wpływ glukozy i sacharozy, jako źródła węgla w pożywce, na wytwarzanie patuliny przez grzyb. Badania przeprowadzono na płynnej pożywce Czapka.

Wyniki opracowano statystycznie przy zastosowaniu analizy wariancyjnej, porównując średnie przy pomocy testu t Studenta.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wszystkie badane izolaty grzyba *Penicillium expansum* (Link) Thom wydzielają patulinę do płynnej pożywki Czapka, lecz ilości wytwarzanej toksyny były różne i zależały od izolatu grzyba (tab. 2). Najwięcej patuliny, w granicach od 1900 µg/ml do 2225 µg/ml pożywki, wydzielają izolaty 879 i 744, a najmniej izolaty 19, 240, 404, które wytwarzały zaledwie od 268 µg/ml do 523 µg/ml.

Tabela 2 – Table 2

Wydzielanie patuliny i patogeniczność 14 izolatów grzyba *Penicillium expansum*, (Link) Thom
 Patulin production and pathogenicity of 14 isolates of *Penicillium expansum* (Link) Thom

Nr izolatu Isolate no.	Ilość patuliny w µg/l g zgniłej tkanki jabłka Amount of patulin in µg/l g of rotten apple tissue	Ilość patuliny w µg/l ml pożywki Czapka Amount of patulin in µg/l ml Czapek's medium	Patogeniczność wyrażona przeciętną średnicą plamy gnijnej w mm Pathogenicity expressed as mean diameter of rot in millimetres
744	157 b	2225 g	25,1 d
879	—	1900 f	24,4 cd
630	—	1525 e	24,9 d
86	—	1323 de	23,6 c
2	—	1190 d	24,9 d
611	171 b	1038 cd	22,4 b
783	—	1013 cd	20,8 a
696	90 a	975 cd	23,8 c
742	—	938 c	24,5 cd
729	120 ab	933 c	27,1 e
47	—	790 c	26,5 e
19	—	523 b	23,6 c
240	—	375 ab	25,0 d
404	—	268 a	25,0 d

Wydzielanie patuliny, przez cztery wybrane izolaty *Penicillium expansum*, do zgniłej tkanki jabłek odmiany 'Starking' było różne i także zależało od izolatu grzyba. Najwięcej toksyny wydzieliał izolat numer 611, a najmniej izolat numer 696 <tab. 2>. Badane izolaty grzyba *Penicillium expansum* różniły się patogenicznością w stosunku do jabłek odmiany 'Starking' <tab. 2>. Nie stwierdzono jednak zależności pomiędzy patogenicznością izolatu a ilością wytwarzanej patuliny.

Wszystkie polskie izolaty *Penicillium expansum* wytwarzały znacznie więcej patuliny od tych, które badali Sommer i in. <1974>. Różnicę tę można tłumaczyć wpływem podłoża na zdolność grzyba do wytwarzania patuliny. Autorzy ci prowadzili doświadczenia na pożywce ziemniaczanej nie standardowej, podczas gdy przedstawione badania prowadzono na pożywce Czapka. Izolaty polskie wykazały także mniejszą patogeniczność w stosunku do jabłek od tych, jakie badał Sommer i in. <1974>. Przyczyny tego zjawiska należy szukać w składzie chemicznym odmiany jabłek użytych do zakażeń. W naszym przypadku była to odmiana 'Starking', Sommer i in., zakażali odmianę 'Golden Delicious'.

Wstępne badania nad wpływem źródła węgla w pożywce na wytwarzanie patuliny przez grzyb wykazały, że reakcja wszystkich badanych izolatów była podobna pomimo, że różniły się one znacznie zdolnością do wytwarzania patuliny. Więcej patuliny wytwarzał grzyb rosnący na podłożu z glukozą niż z sacharozą <tab. 3>.

Tabela 3—Table 3

Wpływ glukozy i sacharozy w pożywce na wytwarzanie patuliny przez izolaty grzyba *Penicillium expansum* (Link) Thom
Influence of glucose and sucrose in medium on patulin production by *Penicillium expansum* (Link) Thom

Nr izolatu Isolate no.	Ilość patuliny w µg/l ml pożywki Amount of patulin in µg/l ml medium	
	sacharoza sucrose	glukoza glucose
879	920 c	1900 e
630	595 b	1525 d
783	288 a	1013 c

NUR przy $p = 0,05$. LSD at $p = 0.05$.

Porównano wytwarzanie patuliny przez izolaty rosnące w dwóch temperaturach, które jednak nie upośledzały wzrostu grzyba. Stwierdzono, że wpływ temperatury na wytwarzanie patuliny był znaczny <tab. 4>, lecz zależał od izolatu. Izolaty 611 i 696 wydzielaly do pożywki podobne ilości patuliny w 15°C i

Tabela 4 – Table 4

Wpływ temperatury na wytwarzanie patuliny
przez izolaty grzyba *Penicillium expansum*
(Link) Thom

Influence of temperature on patulin production
by *Penicillium expansum*
(Link) Thom isolates

Nr izolatu Isolate no.	Ilość patuliny w µg/l ml pożywki Amount of patulin in µg/l ml medium	
	15°C	25°C
729	1845 c	933 a
744	1613 c	2225 d
696	1275 b	975 ab
611	1258 ab	1013 ab

NUR przy $p = 0,05$. LSD at $p = 0.05$

25°C. Izolat 729 wytwarzał w temperaturze 15°C dwa razy więcej toksyny niż w temperaturze 25°C, a izolat 744 odwrotnie, wydzieliał znacznie mniej patuliny w 15°C niż w 25°C.

Badania Sommer'a i in. (1974), prowadzone w dużym przedziale temperatur, pozwoliły na ustalenie dwóch grup w zależności od reakcji na temperaturę. W naszym przypadku jest możliwe wyodrębnienie trzech grup izolatów: pierwsza obejmuje te, które wytwarzają więcej patuliny w wyższej temperaturze, druga obejmuje izolaty nie reagujące na obniżenie temperatury obniżeniem wytwarzania patuliny, oraz trzecia grupa, do której zaliczymy izolaty wytwarzające więcej patuliny w niższej temperaturze.

Patulina, jako metabolit szeroko rozpowszechnionych grzybów z rodzaju *Penicillium*, a przy tym szkodliwy dla zdrowia ludzkiego, była i jest szeroko badana. Badania te obejmują głównie wpływ różnych czynników na zachowanie się toksyny. W badaniach tych autorzy korzystają zwykle z jednego izolatu grzyba. Jedynie Sommer i in. (1974) przeprowadzili badania izolatów pochodzących z różnych części świata. Wyniki przez nich uzyskane mogą sugerować, że różnice w zdolności grzyba do wytwarzania patuliny wiążą się z ich pochodzeniem z różnych stref klimatycznych. Uzyskane wyniki własne nie potwierdziły tych przypuszczeń, gdyż badane izolaty *Penicillium expansum* różniące się znacznie pod względem wytwarzania patuliny, pochodziły nie tylko z jednego kraju, ale nawet z tego samego rejonu i z owoców przechowywanych w tej samej chłodni.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Zbadano wytwarzanie patuliny przez czternaście izolatów grzyba *Penicillium expansum* (Link) Thom. Wstępnie przeanalizowano wpływ glukozy i sacharozy, jako źródła węgla w pożywce oraz wpływ temperatur 15°C i 25°C na wytwarzanie patuliny przez grzyb *Penicillium expansum*. Patogeniczność izolatów *Penicillium expansum* i wydzielanie patuliny do zgniłej tkanki owoców badano na jabłkach odmiany 'Starking'. Przeprowadzone doświadczenia pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Różne izolaty grzyba *Penicillium expansum*, pochodzące z tego samego rejonu sadowniczego lub tej samej chłodni, wykazują różną zdolność do wytwarzania patuliny.
2. Wpływ temperatury na wytwarzanie patuliny przez grzyb *Penicillium expansum* jest złożony i zależy od izolatu grzyba. Niektóre izolaty wytwarzają więcej toksyny w wyższej temperaturze, inne odwrotnie, a jeszcze inne nie reagują na temperaturę w granicach 15-25°C.
3. Skład podłoża, na którym grzyb się rozwija wpływa na wytwarzanie patuliny in vitro. Więcej patuliny grzyb wytwarza na pożywce z glukozą, znacznie mniej z sacharozą.
4. Wytwarzanie patuliny przez grzyb nie zależy od patogeniczności izolatu.

Autorzy dziękują Mgr Wł. K o p a c k i e m u za konsultacje w czasie wykonywania doświadczeń.

LITERATURA

- Beer S. V., 1974. Mycotoxins in apple juice. New York State Hort. Soc. Proc. 119: 165-168.
- Borecka H., 1962. *Penicillium expansum* (Link) Thom jako czynnik chorobotwórczy na jabłkach w okresie przechowywania. Acta Agrobot. 12: 67-78.
- Borecka H., 1977. Fungi of the genus *Penicillium* on apples and pears during the storage period. Acta Agrobot. 30: 213-227.
- Buchanan J. R., Sommer N. F., Fortlage R. J., Maxie E. C., Mitchell F. G., Hsieh D. P. H., 1974. Patulin from *Penicillium expansum* in stone fruits and pears. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 262-265.
- Bullerman L. B., 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. J. Food Prot. 42: 65-86.
- Ciegler A., 1977. Patulin. Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publishers, Inc., pp. 609-624.
- Ciegler A., Detroy R. W., Lillehoj E. B., 1971. Patulin, penicillic acid and other carcinogenic lactones. [In:] Microbial Toxins 6. (eds. Ajl S., Ciegler A., Kadis S.), Academic Press Inc. New York, pp. 409-414.
- Ciegler A., Beckwith A. C., Jackson L. K., 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. App. Environ. Microbiol. 31: 664-667.
- Frank H. K., Orth R., Hermann R., 1976. Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. 1. Kernobst und daraus hergestellte Produkte. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 162: 149-157.
- Frank H. K., Orth R., Figge A., 1977. Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. 2. Verschiedene Obstarten, Gemüse und daraus hergestellte Produkte. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 163: 111-114.
- Harwig J., Chen Y. K., Kennedy B. P. C., Scott P. M., 1973. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment. 6: 22-25.

- Lindroth S., Miskanen A., 1978. Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products. *J. Food Sci.* 43: 446-448.
- Lovett J., Thompson R. G., Boutin B. K., 1975. Trimming as a means of removing patulin from fungus-rotted apples. *J. the AOAC*. 58: 909-911.
- Meyer R., A., 1978. Zum Vorkommen des Mykotoxins Patulin in Obst und Obstprodukten. *Lebensmittel-industrie* 25: 224-225.
- Reiss J., 1970. Untersuchung über die Phytotoxizität von *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* und *Rhizopus nigricans*. *Phytopathologische Zeitschrift* 69: 78-82.
- Reiss J., 1973. Der Einfluss von Mykotoxinen auf Pflanzen. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 151: 256-259.
- Scott P. M., Miles W. F., Toft P., Dube J. G., 1972. Occurrence of patulin in apple juice. *J. Agr. Food Chem.* 20: 450-451.
- Singh J., 1967. Patulin. *Antibiotics I, Mechanism of action.* (eds. D. Gottlieb and P. D. Shaw), Springer-Verlag, New York Inc., pp. 621-630.
- Sommer N. F., Buchanan J. R., Fortlage R. J., 1974. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology* 28: 589-593.
- Sommer N. F., Buchanan J. R., Fortlage R. J., 1977. Patulin in CA-stored apples. *Michigan State Horticulture Report* 38: 212-221.
- Wilson D. M., Nuovo G. J., 1973. Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology* 26: 124-125.