**Wpływ temperatury i okresu inkubacji
na tworzenie toksycznych metabolitów przez
Alternaria radicina i *A. alternata***

**KRYSTYNA TYLKOWSKA¹,
JADWIGA GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA²,
DOROTA SZOPIŃSKA¹, HANNA DORNA¹,
MICHELE SOLFRIZZO³, ANNALISA DE GIROLAMO³**

¹ Katedra Nasiennictwa Ogrodniczego Akademii Rolniczej
im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu,
Baranowo, ul. Szamotulska 28, 62-081 Przeźmierowo

² Katedra Chemii Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

³ Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Via Amendola 122, 70126 Bari, Italia

¹ Department of Seed Science, August Cieszkowski Agricultural University of Poznań,
Baranowo, Szamotulska 28, 62-081 Przeźmierowo, Poland

² Department of Chemistry, August Cieszkowski Agricultural University of Poznań,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

³ Institute of Sciences of Food Production, CNR, Via Amendola 122, 70126 Bari, Italy
Effects of temperature and incubation period on production of toxic metabolites by
Alternaria radicina and *A. alternata*

(Otrzymano: 01.04.2005)

S u m m a r y

The production of toxic metabolites by four isolates of *Alternaria radicina* and two isolates of *A. alternata* in rice grains and carrot discs at 1, 10 and 20°C was investigated. Incubation lasted 21 and 35 days or 14 and 28 days for rice grains and carrot discs, respectively. Accumulation of toxins in inoculated carrot roots stored for 24 weeks and in inoculated dried carrots stored for 48 weeks was also determined. It was found that *A. radicina* produced radicinin (RAD) and *epi*-radicinol (*epi*-ROH), whereas tenuazonic acid (TeA), altertoxin I (ATX I), alternariol (AOH) and alternariol methyl ether (AME) were produced by *A. alternata*. Although the isolates tested were capable of producing toxins in rice grains at 1°C, none of them was detected in carrot discs.

Accumulation of *epi*-ROH was observed in carrot roots stored for 24 weeks, whereas decreased amounts of RAD and *epi*-ROH were observed in dried carrots stored for 48 weeks. No *A. alternata* toxins were detected in stored carrot roots, whereas trace amounts of AOH were recorded in dried carrots after 32 and 48 weeks of storage.

Key words: *Alternaria radicina*, *A. alternata*, carrot, toxins, radicinin (RAD), *epi*-radicicol (*epi*-ROH), tenuazonic acid (TeA), alteroxin I (ATX I), alternariol (AOH), alternariol methyl ether (AME).

WSTĘP

Alternaria radicina Meier, Drechsler & E.D. Eddy uznawany jest przede wszystkim za patogena roślin z rodziny *Apiaceae*, choć uważa się również, że poraża tylko marchew, a inne rośliny porażane są przez gatunki blisko z nim spokrewnione (Nørgaard, 1945; Ellis, 1971; Pryor, 2002; Pryor i Gilbertson, 2002). Grzyb ten infekuje marchew we wszystkich fazach wzrostu i rozwoju, a największe szkody wyrządza podczas przechowywania korzeni (Glaser, 1978; Pryor, 2002). *A. alternata* Fr. (Keisler) to najpowszechniej występujący gatunek rodzaju *Alternaria* (Scheffer, 1992; Rotem, 1994). Izolowano go z owoców i warzyw, w tym marchwi (Bottalico i Logrieco, 1998; Solfrizzo i in., 2005). Obydwa gatunki tworzą metabolity wtórne o właściwościach toksycznych wobec roślin i zwierząt (Montemurro i Visconti, 1992; Bottalico i Logrieco, 1998). *A. radicina* tworzy radicininę (RAD), radicicol (ROH) i *epi*-radicicol (*epi*-ROH) o właściwościach fitotoksycznych (Montemurro i Visconti, 1992; Tylkowska i in., 2003; Solfrizzo i in. 2004b). Spośród metabolitów tworzonych przez *A. alternata* największe znaczenie ze względu na swoją toksyczność dla ssaków mają: kwas tenuazonowy (TeA), alternariol (AOH), eter metylowy alternariolu (AME), altenuen (ALT) i alteroxyny (ATX) (Montemurro i Visconti, 1992; Bottalico i Logrieco, 1998; Scott, 2001).

Korzenie marchwi przechowuje się na spożycie i jako wysadki do produkcji nasiennej. Powszechne jest też przechowywanie jej w postaci suszu. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu temperatury i okresu inkubacji na tworzenie wymienionych toksyn przez omawiane *Alternaria* spp. *in vitro* oraz ich akumulacji w przechowywanej marchwi.

MATERIAŁ I METODY

Test *in vitro*. Badania przeprowadzono na czterech izolatach *Alternaria radicina* i dwóch izolatach *A. alternata*.

Inkubacja w ziarnie ryżu. Do kolb stożkowych o pojemności 100 ml odważono po 20 g ryżu, dodano 10 ml wody destylowanej i poddano sterylizacji w autoklawie

przez 15 min. w temperaturze 121°C. Schłodzony ryż inokulowano trzema krążkami grzybni o średnicy 5 mm wyciętymi z zewnętrznej części 14-dniowych kolonii poszczególnych izolatów *A. radicina* lub *A. alternata* rosnących na pożywce PDA (Difco). Każdy krążek pochodził z innej płytki. Dla każdego z czterech powtórzeń zastosowano krążki z trzech kolejnych płytek. Kolbki umieszczono w cieplarkach w temperaturze 1, 10 i 20°C i inkubowano przez 21 lub 35 dni. Kolbki wytrząsano codziennie, co chrońło przed zbrylaniem się ryżu, na którym rozwijała się grzybnia. Po inkubacji ziarno poddawano sterylizacji przez 3 min. w autoklawie w temperaturze 121°C, a następnie zawartość kolbek suszono w temperaturze 40°C do czasu, gdy ziarno było powietrznie suche.

Inkubacja na plastrach marchwi. Wolne od objawów chorobowych, umyte, obrane i osuszone korzenie marchwi nieznaney odmiany krojono na plastry o grubości około 5 mm, które odkażano zanurzając w etanolu o stężeniu 70% i przez 3 min. w 1,5% roztworze podchlorynu sodu (NaClO), po czym płukano trzykrotnie wodą sterylną i osuszano na bibule. Następnie układano je w płytkach Petriego na bibule filtracyjnej nasączonej 6 ml mieszaniny roztworów chlortetracykliny i streptomycyny o stężeniach 0,05% (1+1; v+v). Dla każdej kombinacji przygotowano 20 plastrów, które inokulowano krążkami o średnicy 5 mm pobieranymi z brzegów 14-dniowych kolonii poszczególnych izolatów obu gatunków rosnących na pożywce PDA w płytkach Petriego. Jedno powtórzenie stanowiło 5 plastrów, każdy zainkubowany krążkiem z innej płytki. Nakładano je na środek plastra, grzybnią do dołu. Zamknięte płytki z zainkubowaną marchwią umieszczono w cieplarkach w temperaturze 1, 10 i 20°C i inkubowano przez 14 lub 28 dni. Ze względu na stan marchwi inkubowanej w temperaturze 20°C przez 28 dni nie wykonano analizy na zawartość toksyn. Po inkubacji plastry sterylizowano przez 3 min. w temperaturze 121°C, rozdrabniano, po czym suszono przez 24 godz. w temperaturze 50°C.

Akumulacja toksyn w przechowywanych korzeniach marchwi. W badaniach zastosowano po jednym izolacie *A. radicina* i *A. alternata* o wysokiej toksynotwórczości. Do doświadczenia wybrano korzenie nieznaney odmiany, nieuszkodzone i wolne od objawów chorobowych. Każdy korzeń nakłuwano, co 2,5 cm od góry korzenia, pięcioma drewnianymi wykałaczkami zanurzonymi wcześniej na 1 godz. w zawiesinach *A. radicina* i *A. alternata* o stężeniach wynoszących odpowiednio 1×10^5 i 1×10^7 jtk·ml⁻¹. Zawiesiny sporządzono z 14-dniowych kultur rosnących na pożywce PDA. Wykałaczki obcinano tak, by wystawały około 3 mm nad powierzchnię korzenia. Korzenie inkubowano w workach foliowych przez siedem dni w temperaturze 20°C, w ciemności. Po inkubacji korzenie ułożono w koszach, owinięto bibułą i umieszczono w przechowalni. Kontrolę stanowiły korzenie nieinokulowane. Dla każdego grzyba i kombinacji kontrolnej przygotowano 120 korzeni, które po inokulacji podzielono na pięć powtórzeń, tj. 20 korzeni na każdy termin przechowywania. Korzenie przechowywano przez 24 tygodnie w przechowalni o temperaturze wynoszącej około 2°C i wilgotności względnej powietrza około 100%. Analizy na zawartość toksyn wykonywano co 6 tygodni. Po każdym z wyznaczonych terminów przechowywania usuwano

wykałaczki, z każdego korzenia wykrawano po pięć plastrów o grubości około 5 mm (równoległe do miejsca wklucia wykałaczek), sterylizowano przez 3 min. w temperaturze 121°C, po czym suszono przez 24 godz. w temperaturze 50°C.

Akumulacja toksyn w przechowywanym suszu marchwi. Do badań wybrano te same izolaty *A. radicina* i *A. alternata*, co w doświadczeniu z przechowywanymi korzeniami. Plastry marchwi przygotowano w sposób opisany dla testu *in vitro*. Inokulowano je zawiesinami *A. radicina* i *A. alternata* o stężeniach wynoszących odpowiednio 1×10^5 i 1×10^7 jtk·ml⁻¹. Zawiesiny sporządzono z 14-dniowych kultur rosnących na pożywce PDA. W środkową część każdego plastra wbijano drewnianą wykałaczkę, którą wcześniej zanurzano na 1 godz. w odpowiedniej zawieszynie. Wykałaczki obcinano tak, by płytki można było zamknąć. Dla każdego grzyba i każdego terminu analizy przygotowano 50 plastrów. Kontrolę stanowiły nieinokulowane plastry marchwi. Tak przygotowane plastry inkubowano przez siedem dni w temperaturze 20°C, w ciemności. Po inkubacji usuwano wykałaczki, a plastry po rozdrobnieniu suszono przez 24 godz. w temperaturze 50°C. Wysuszoną marchew przechowywano w papierowych torebkach w temperaturze około 20°C, przy wilgotności względnej powietrza około 50%. Analizy na zawartość toksyn wykonywano co 16 tygodni.

Chemiczna analiza alternariotoksyn. Powietrznie suche i rozdrobnione w młynku elektrycznym ziarno ryżu (5 g) lub plastry marchwi (2 g) ekstrahowano 20 ml mieszaniny acetonitrylu, metanolu i wody (45+10+45; v+v+v) o pH=3, wytrząsając próbki przez 30 min. Po przesączeniu (bibuła filtracyjna Whatman 4 oraz filtr membranowy 0,45 µm) ekstrakty rozcieńczano wodą do odpowiednich stężeń. Ekstrakty analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem kolumny C₁₈ oraz absorpcyjnego detektora, przy długości fali detekcji 224 i 345 nm oraz 256 nm, odpowiednio dla metabolitów *A. radicina* i *A. alternata*. Radicininę (RAD) i *epi*-radicinol (*epi*-ROH) oznaczano przy czasie retencji 11,4 i 12,4 min., zmieniając w fazie nośnej zawartość acetonitrylu w wodzie liniowo od 10% do 30% w czasie 22 min., przy przepływie 1 ml fazy nośnej/min. (Solfrizzo i in., 2004b). Analizę zawartości TeA, ATX I, AOH i AME prowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Solfrizzo i in. (2004a), przy czasach retencji tych toksyn, odpowiednio: 6,4; 7,0; 9,8 i 14,8 min., stosując jako fazę nośną mieszaniny acetonitrylu i wodnego roztworu NaH₂PO₄ (pH=3). Toksyny identyfikowano porównując czasy retencji i widma UV dla pików w chromatogramach analizowanych ekstraktów z odpowiednimi danymi standardów tych toksyn. Analizę ilościową prowadzono metodą standardu zewnętrznego przez porównanie powierzchni pików oznaczanej toksyny i jej standardu o znanym stężeniu.

WYNIKI

Test *in vitro*. Wszystkie izolaty *A. radicina* inkubowane w ryżu tworzyły RAD, natomiast w marchwi *epi*-ROH. Trzy z nich tworzyły także RAD (Tab. 1 i 2). Wydłużenie

okresu inkubacji z 21 do 35 dni wpłynęło na zwiększenie produkcji RAD w temperaturze 1°C. Podniesienie temperatury do 10°C spowodowało znaczący wzrost produkcji RAD przez wszystkie izolaty w obydwu okresach inkubacji. Wydłużenie okresu inkubacji w temperaturze 10°C wpłynęło na wzrost ilości RAD tworzonej przez trzy izolaty. W porównaniu do temperatury 10°C, w temperaturze podniesionej do 20°C, po inkubacji przez 21 dni, zanotowano zwiększenie ilości RAD tworzonej przez trzy izolaty, podczas gdy jeden tworzył ją na niższym poziomie. U trzech izolatów zanotowano zwiększenie ilości RAD produkowanej w tej temperaturze po wydłużeniu okresu inkubacji.

Nie stwierdzono obecności RAD i *epi*-ROH w plastrach marchwi inkubowanych w temperaturze 1°C przez 14 i 28 dni, ani w temperaturze 10°C po inkubacji przez 14 dni. Obie toksyny wykryto po inkubacji w temperaturze 10°C przez 28 dni oraz w temperaturze 20°C przez 14 dni.

Izolaty *A. alternata* tworzyły na obydwu podłożach TeA, AOH i AME (Tab. 3 i 4). W ryżu stwierdzono ponadto obecność albertoksyny I (ATX I). Mniej toksynotwórczy izolat inkubowany w ryżu przez 21 dni w temperaturze 1°C tworzył tylko TeA w niewielkim stężeniu. Po wydłużeniu okresu inkubacji do 35 dni zwiększyła się zawartość TeA, a ponadto wykryto niewielką zawartość AOH i AME. Podniesienie temperatury do 10°C wpłynęło na znaczące zwiększenie zawartości TeA w ryżu inkubowanym przez 21 dni. Stwierdzono także obecność pozostałych toksyn w niewielkim stężeniu. Po wydłużonym okresie inkubacji w tej temperaturze zwiększyła się zawartość TeA, AOH i AME występowały w niewielkim stężeniu, natomiast nie wykryto ATX I. Zarówno podniesienie temperatury do 20°C, jak wydłużenie okresu inkubacji wpłynęło na zwiększenie zawartości TeA i AOH. Zawartość ATX I w ryżu inkubowanym w temperaturze 20°C pozostawała na zbliżonym poziomie. Drugi izolat tworzył TeA, AOH i AME w ryżu inkubowanym w temperaturze 1°C przez 21 i 35 dni, natomiast nie stwierdzono obecności ATX I. W ryżu inkubowanym w temperaturze 10°C przez 21 i 35 dni wzrosła zawartość TeA i AOH. Stężenie AME i ATX I było niewielkie. Podniesienie temperatury do 20°C wpłynęło na dalsze znaczne zwiększenie zawartości wszystkich toksyn z wyjątkiem ATX I.

Nie stwierdzono obecności toksyn w plastrach marchwi inkubowanych w temperaturze 1 i 10°C, natomiast po inkubacji w temperaturze 20°C wykryto w nich TeA, AOH i AME.

Tabela 1
Wpływ temperatury i okresu inkubacji na tworzenie radiciny
przez *Alternaria radicina* w ziarnie ryżu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Table 1
Effects of temperature and period of incubation on production of radicinin
by *Alternaria radicina* in rice grains ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Izolat Isolate No	Temperatura inkubacji (°C) Temperature of incubation (°C)	Okres inkubacji (dni) Incubation period (days)	
		21	35
1	1	2	52
	10	6032	6852
	20	20462	273
2	1	12	31
	10	1578	8714
	20	5071	9159
3	1	40	125
	10	9280	11892
	20	278	1137
4	1	3	41
	10	712	620
	20	4055	6901

Tabela 2
Wpływ temperatury i okresu inkubacji na tworzenie radiciny (RAD) i *epi*-radicynolu
(*epi*-ROH) przez *Alternaria radicina* w plastrach marchwi ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Table 2
Effects of temperature and period of incubation on production of radicinin (RAD)
and *epi*-radicinol (*epi*-ROH) by *Alternaria radicina* in carrot discs ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Izolat Isolate No	Temperatura inkubacji (°C) Temperature of incubation (°C)	Okres inkubacji (dni) Incubation period (days)			
		14		28	
		RAD	<i>epi</i> -ROH	RAD	<i>epi</i> -ROH
1	1	nd ¹	nd	nd	nd
	10	nd	nd	nd	nd
	20	nd	556	- ²	-
2	1	nd	nd	nd	nd
	10	nd	nd	102	398
	20	nd	533	-	-
3	1	nd	nd	nd	nd
	10	nd	nd	205	514
	20	nd	753	-	-
4	1	nd	nd	nd	nd
	10	nd	nd	nd	nd
	20	24	18	-	-

¹ nie wykryto (poziom detekcji dla RAD i *epi*-ROH = 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

¹ not detected (detection level for RAD and *epi*-ROH = 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

² nie testowano

² not tested

Tabela 3
Wpływ temperatury i okresu inkubacji na tworzenie toksycznych metabolitów
przez *Alternaria alternata* w ziarnie ryżu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Table 3
Effects of temperature and period of incubation on production of toxic metabolites
by *Alternaria alternata* in rice grains ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Izolat Isolate No	Temperatura inkubacji (°C) Temperature of incubation (°C)	Okres inkubacji (dni) Incubation period (days)							
		21				35			
		TeA ¹	ATX I	AOH	AME	TeA	ATX I	AOH	AME
1	1	7	nd ²	nd	nd	561	nd	0,9	1
	10	1804	3	7	4	5077	nd	12	6
	20	13541	63	34	126	28870	47	243	58
2	1	11	8	8	1	715	nd	97	5
	10	3610	6	46	1	8485	16	108	3
	20	32097	8	6708	1385	33771	39	4804	840

¹ TeA – kwas tenuazonowy, ATX I – altertoksyna I, AOH – alternariol, AME – eter metylowy alternariolu

¹ TeA – tenuazonic acid, ATX I – altertotoxin I, AOH – alternariol, AME – alternariol methyl ether

² nie wykryto (poziom detekcji dla TeA i ATX I = $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$, dla AOH i AME = $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$)

² not detected (detection level for TeA and ATX I = $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$, for AOH and AME = $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$)

Tabela 4
Wpływ temperatury i okresu inkubacji na tworzenie toksycznych metabolitów
przez *Alternaria alternata* w plastrach marchwi ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Table 4
Effects of temperature and period of incubation on production of toxic metabolites
by *Alternaria alternata* in carrot discs ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Izolat Isolate No	Temperatura inkubacji (°C) Temperature of incubation (°C)	Okres inkubacji (dni) Incubation period (days)					
		14			28		
		TeA	AOH	AME	TeA	AOH	AME
1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	20	8	84	80	- ¹	-	-
2	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	20	301	0,8	13	-	-	-

¹ nie testowano

¹ not tested

Pozostałe objaśnienia zamieszczono pod tab 3

For other explanations see footnote for tab 3

Akumulacja toksyn w przechowywanych korzeniach marchwi. Przed przechowywaniem nie stwierdzono obecności toksyn w korzeniach inokulowanych *A. radicina* lub *A. alternata* (Tab. 5). Stan ten utrzymywał się przez 12 tygodni (Tab. 5). Korzenie kontrolne były wolne od toksyn przez cały okres przechowywania. Po 18 tygodniach przechowywania wykryto w nich *epi*-ROH, a jego zawartość zwiększyła się po dalszych 6 tygodniach. Przez cały okres przechowywania korzenie były wolne od toksyn tworzonych przez *A. alternata*.

Tabela 5

Akumulacja toksycznych metabolitów tworzonych przez *Alternaria radicina* i *A. alternata* w inokulowanych korzeniach marchwi przechowywanych w temperaturze 2°C

Table 5

Accumulation of toxic metabolites produced by *Alternaria radicina* and *A. alternata* in inoculated carrot roots stored at 2°C

Okres przechowywania (tygodnie) Period of storage (weeks)	Zawartość metabolitu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) po inokulacji Content of metabolite ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) after inoculation with			
	<i>A. radicina</i>		<i>A. alternata</i>	
	RAD ¹	<i>epi</i> -ROH	AOH	AME
0	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd
12	nd	nd	nd	nd
18	nd	0,7 $\pm$ 0,7 ²	nd	nd
24	nd	13,3 $\pm$ 8,4	nd	nd

¹ skróty objaśniono w tab 3 i 4

¹ for abbreviations see tab 3 and 4

² odchylenie standardowe

² standard deviation

Pozostałe objaśnienia zamieszczono pod tab 2 i 3

For other explanations see footnote for tab 2 and 3

Akumulacja toksyn w przechowywanym suszu marchwi. W suszonej marchwi RAD i *epi*-ROH występowały na zbliżonym poziomie (Tab. 6). Po 16 tygodniach przechowywania stężenie obydwu toksyn zmniejszyło się, po kolejnych 16 tygodniach nie odnotowano obecności RAD, podczas gdy stężenie *epi*-ROH nie zmieniło się. Pod koniec przechowywania stężenie tej toksyny uległo zmniejszeniu. Po 32 i 48 tygodniach przechowywania wykryto obecność AOH w niewielkim stężeniu. Susz z kombinacji kontrolnej był wolny od toksyn.

Tabela 6

Akumulacja toksycznych metabolitów tworzonych przez *Alternaria radicina* i *A. alternata* w inokulowanej, suszonej marchwi przechowywanej w temperaturze pokojowej

Table 6

Accumulation of toxic metabolites by *Alternaria radicina* and *A. alternata* in inoculated and dried carrot root discs stored at room temperature

Okres przechowywania (tygodnie) Period of storage (weeks)	Zawartość metabolitu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) po inokulacji Content of metabolite ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) after inoculation with			
	<i>A. radicina</i>		<i>A. alternata</i>	
	RAD	<i>epi</i> -ROH	AOH	AME
0	12,4 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 2,6	nd	nd
16	3,4 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 1,0	nd	nd
32	nd	3,5 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,6	nd
48	nd	0,7 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	nd

Objaśnienia zamieszczono pod tab. 5

For explanations see footnote for tab. 5

DYSKUSJA

Ziarno ryżu okazało się dobrym podłożem do wykazania zdolności do tworzenia toksyn przez *A. radicina* i *A. alternata*, nawet w temperaturze 1°C. Podniesienie temperatury inkubacji do 10°C wpłynęło na zwiększoną produkcję toksyn. W temperaturze 20°C izolaty obydwu gatunków inkubowane przez 21 dni na ogół tworzyły toksyny na najwyższym poziomie. Wydłużenie okresu inkubacji nie zawsze powodowało zwiększenie stężenia tworzonych toksyn, a w wypadku RAD tworzonego przez jeden izolat *A. radicina* oraz AOH i AME notowano nawet mniejsze stężenie. Można przypuszczać, że po osiągnięciu maksymalnego poziomu tworzenia toksyn w temperaturze 20°C następował ich rozkład. Podobne zjawisko zaobserwowano dla TeA w nasionach słonecznika (Etcheverry i in., 1994).

Tournas i Stack (2001) wykazali obecność AOH i AME tworzonych przez *A. alternata* w winogronach przechowywanych w temperaturze 4°C. W niniejszych badaniach nie stwierdzono obecności zarówno tych toksyn, jak i TeA, ani w plastrach marchwi inkubowanych w temperaturze 1 i 10°C, ani w korzeniach marchwi przechowywanych w temperaturze około 2°C. Mimo powszechnego występowania *A. alternata* w korzeniach marchwi pochodzących z niechronionych upraw nie stwierdzono w nich obecności TeA, ATX I, AME i AOH ani bezpośrednio po zbiorze, ani podczas przechowywania (Solfrizzo i in., 2005). TeA, AOH i AME wykrywano w plastrach marchwi inkubowanych w temperaturze 20°C przez 14 dni, a AOH i AME także w suszu po 32 tygodniach przechowywania w podobnej temperaturze. Dane te wskazują na potencjalne ryzyko skażenia toksynami tworzonymi przez *A. alternata* marchwi przechowywanej w tej temperaturze, co wydaje się nie stwarzać zagrożenia przy przechowywaniu w niższej temperaturze.

Testowane izolaty *A. radicina* tworzyły RAD i *epi*-ROH zarówno *in vitro*, jak i w przechowywanej marchwi. Dopiero podniesienie temperatury inkubacji do 20°C lub wydłużenie okresu inkubacji do 28 tygodni przy temperaturze 10°C wpłynęło na tworzenie tych toksyn w plastrach marchwi. Solfrizzo i in. (2004b) wykazali, że podniesienie temperatury do 10 i 20°C po okresie przechowywania w temperaturze 1°C wpłynęło na zwiększenie stężenia RAD, ROH i *epi*-ROH. W niniejszej pracy stwierdzono zwiększoną akumulację RAD w marchwi podczas długotrwałego przechowywania w temperaturze 2°C. W suszu marchwi, przechowywanym w temperaturze około 20°C, odnotowano zmniejszanie się stężenia RAD i *epi*-ROH. Jak wspomniano, podobne zjawisko wystąpiło w teście *in vitro*, a zaobserwowali to także Solfrizzo i in. (2004b) w przechowywanej marchwi.

Ze względu na właściwości RAD i *epi*-ROH, ich obecność w marchwi wpływa na obniżenie jej jakości, nie wydaje się jednak, by stwarzała zagrożenia dla zdrowia konsumenta.

Podziękowanie. Badania były finansowane przez European Commission, Quality of Life and Management of Living Resources Programme (QLK1-1999-00986) i Komitet Badań Naukowych. Autorzy dziękują prof. dr hab. Mikołajowi Knaflewskiemu z Katedry Warzywnictwa AR w Poznaniu za udostępnienie przechowalni do badań.

LITERATURA

- Bottalico A., Logrieco A., 1998. Toxigenic *Alternaria* Species of Economic Importance. W: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety (wyd. Sinha K. K., Bhatnagar D.). Marcel Dekker, Inc., New York – Basel – Hong Kong: 65–108.
- Ellis M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Etcheverry M., Chulze S., Dalcero A., Varsavsky E., Magnoli K., 1979. Effect of water activity and temperature on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on sunflower seeds. *Mycopath.*, 126: 179–182.
- Glaser T., 1978. Czarna zgnilizna marchwi. *Rocz. AR Pozn.* 98, *Ogrodnictwo*, z. 7: 71–85.
- Montemurro N., Visconti A., 1992. *Alternaria* Metabolites – Chemical and Biological Data. W: *Alternaria*, Biology, Plant Diseases and Metabolites (wyd. Chełkowski J., Visconti A.). Elsevier, Amsterdam – London – New York, Tokio: 449–557.
- Neergaard P., 1945. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Taxonomy, Parasitism and Economical Significance. Einar Munksgaard, Copenhagen.
- Pryor B.M., 2002. Black Rot. W: *Compendium of Umbelliferous Crops Diseases* (wyd. Davis R.M., Raid R.N.). APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota: 25–27.
- Pryor B.M., Gilbertson R.L., 2002. Detection and eradication of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Dis.* 78 (5): 452–456.
- Rotem J., 1994. The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

- Scott P.M., 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. J. AOAC Int., 84: 1809–1817.
- Scheffer R.P., 1992. Ecological and Evolutionary Roles of Toxins from *Alternaria* Species Pathogenic to Plants. W: *Alternaria*, Biology, Plant Diseases and Metabolites (wyd. Chelkowski J., Visconti A.). Elsevier, Amsterdam – London – New York, Tokio: 101–122.
- Solfrizzo M., De Girolamo A., Vitti C., Visconti A., van den Bulk R., 2004a. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. J. AOAC Int., 87: 101–106.
- Solfrizzo M., De Girolamo A., Vitti C., Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczęśna J., Szopińska D., Dorna H., 2005. Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. Food Addit. Contam., 22 (4): 302–308.
- Solfrizzo M., Vitti C., De Girolamo A., Visconti A., Logrieco A., Fanizzi F.P., 2004b. Radicinols and radicinin phytotoxins produced by *Alternaria radicina* on carrots. J. Agric. Food Chem., 52: 3655–3660.
- Tournas V.K., Stack M.E., 2001. Production of Alternariol and Alternariol Methyl Ether by *Alternaria alternata* grown on Fruits at Various Temperatures. J. Food. Prot., 64 (4): 528–532.
- Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczęśna J., Iwanowska H., 2003. Production of toxins by *Alternaria alternata* and *A. radicina* and their effects on germination of carrot seeds. Seed Sci. Technol., 31: 309–316.

Streszczenie

Zbadano tworzenie toksycznych metabolitów przez *Alternaria radicina* i *A. alternata* w ziarnie ryżu i krążkach marchwi w temperaturze 1, 10°C i 20°C. Inkubacja w ziarnie ryżu trwała 21 i 35 dni, a w plastrach marchwi 14 i 21 dni. Określono także akumulację tych toksyn w inokulowanych przechowywanych korzeniach i suszu marchwi. Grzyb *A. radicina* tworzył radicininę (RAD) i *epi*-radicinol (*epi*-ROH), natomiast *A. alternata* – kwas tenuazonowy (TeA), altertoksynę I (ATX I), alternariol (AOH) i eter metylowy alternariolu (AME). Choć w temperaturze 1°C obydwa gatunki tworzyły toksyny w ziarnie ryżu, to w plastrach marchwi ich nie wykryto. W korzeniach przechowywanych przez 24 tygodnie następowała akumulacja *epi*-ROH. Stężenie RAD i *epi*-ROH w suszu zmniejszało się. Korzenie były wolne od toksyn tworzonych przez *A. alternata*, natomiast w suszu przechowywanym przez 32 i 48 tygodni wykryto śladowe ilości AOH.

VACAT