

ПРОФИЛЬ МИКОТОКСИНОВ, ТИПИЧНЫЙ ДЛЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ (РЕПРОДУКЦИОННЫХ) СЕМЯН РАПСА МАСЛИЧНОГО*

Г.П. КОНОНЕНКО¹  [✉], В.Т. ВОЛОВИК², А.А. БУРКИН¹, С.Е. СЕРГЕЕВА²

Для семян рапса *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk — третьего по значимости источника растительного масла в мире существуют специальные требования к послеуборочной обработке (быстрое высушивание до стандартной влажности из-за угрозы массового заплесневения при хранении) (J.T. Mills, 1987; J.T. Mills, R.N. Sinha, 1980). Все известные случаи обнаружения микотоксинов в семенах этой культуры связывают либо с инфицированием растений в поле, либо с воздействием неблагоприятных факторов при уборке (I. Brazauskienė с соавт., 2006; A. Mankevičienė с соавт., 2011, L. Wu с соавт., 2017). В настоящем исследовании впервые получено подтверждение того, что для семян рапса не свойственно присутствие токсичных метаболитов грибов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Myrothecium* и ряда других. Цель работы — микотоксикологическое обследование семян рапса масличного, полученных с соблюдением надлежащих фитосанитарных и технологических условий при выращивании, уборке и хранении. Оригинальные (репродукционные) семена были собраны с опытных участков лаборатории кормовых культур и систем полевого кормопроизводства ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса в 2009-2021 годах. После измельчения в лабораторной мельнице 158 образцов анализировали по унифицированной методике с помощью аттестованных коммерческих и исследовательских иммуноферментных тест-систем (ГОСТ 31653-2012). Для экстракции применяли смесь ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84:16 при расходе 5 мл на 1 г навески. Микотоксины (Т-2 токсин, дезоксиниваленон, зеараленон, фумонизины группы В, эргоалкалоиды, альтернариол, роридин А, афлатоксин В₁, стеригматоцистин, циклопиазоновую кислоту, эмодин, охратоксин А, цитринин, микофеноловую кислоту, PR-токсин) определяли в экстрактах после 10-кратного разбавления буферным раствором. В семенах урожая 2009-2020 годов, сбор которых проходил при обычных погодных условиях и без нарушений режимов высушивания и хранения, микотоксины не были обнаружены. Лишь у одного образца ярового рапса (сорт Бизон, 2019 год) была выявлена слабая загрязненность микофеноловой кислотой и в составе микобиоты идентифицирован продуцирующий ее микромицет *Aspergillus pseudoglaucus* Blochwitz. В семенах сбора 2021 года, который проходил при повышенной температуре и влажности, в 67,5 % образцов яровых и в 25,6 % озимых культур установили контаминацию фоновыми количествами эргоалкалоидов (от 2 до 12 мкг/кг). Кроме того, в 28,6 % образцов ярового рапса показано присутствие альтернариола, в основном в малых количествах (от 8 до 32 мкг/кг) и реже с более выраженным накоплением (от 46 до 775 мкг/г). В одном из образцов ярового рапса, который дольше других хранили в недосушенном состоянии, выявили наибольшее загрязнение альтернариолом и интенсивное инфицирование грибом *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire с экспериментально подтвержденной способностью к токсинообразованию. Таким образом, при соблюдении фитосанитарных и технологических правил выращивания и хранения семян рапса нет оснований для беспокойства по поводу угрозы их контаминации токсинами, продуцируемыми грибами родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Myrothecium* и других. Все выявленные случаи загрязненности семян микотоксинами относились к образцам, собранным при сочетании неблагоприятных погодных условий или нарушениях правил хранения.

Ключевые слова: рапс масличный, семена, микотоксины, иммуноферментный анализ.

Для семян рапса — третьего по значимости источника растительного масла в мире, который в 2020-2021 годах обеспечил 14,1 % его глобального производства (1), — существует специальное требование к послеуборочной обработке: наиболее быстрое высушивание до стандартной влажности 5-8 %. Эта мера связана с реальной угрозой массового плесневения семян, особенно актуальной в агрозонах с теплым и влажным периодом уборки, а также в местах хранения, где наблюдаются отклонения от оптимальных параметров (2, 3). Исследования, выполненные на территории многих стран, — Румынии (4, 5), Литвы (6, 7), Польши (8, 9), Сербии (10, 11), Индии (12, 13), Эфиопии (14) — показали, что в момент уборки и во время хранения в семенах рапса присутствует обширное сообщество ассоциированных грибов, включающих

* Работа выполнена в рамках договора о сотрудничестве ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса и ВНИИВСГЭ — филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН от 17 марта 2021 года.

как патогены этих растений, так и сапротрофные грибы. Сведения о контаминации семян рапса микотоксинами немногочисленны. Исследователи объясняют их появление либо инфицированием растений в поле, либо воздействием неблагоприятных факторов при уборке (15, 16).

В настоящем исследовании впервые представлено подтверждение того, что для семян рапса не свойственно присутствие токсичных метаболитов грибов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Myrothecium* и ряда других.

Цель работы — микотоксикологическое обследование семян рапса масличного, полученных с соблюдением надлежащих фитосанитарных и технологических условий при выращивании, уборке и хранении.

Методика. Объектами исследования были 158 образцов оригинальных (репродукционных) семян озимого и ярового рапса *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk, полученных на опытных участках ФНЦ кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса в 2009–2021 годах.

Сопоставление данных по температуре воздуха и влажности в периоды уборки семян проводили на основании сведений из журнала наблюдений метеостанции «Луговая» (Московская обл.).

Микотоксикологический анализ семян урожая 2021 года (120 образцов) проводили через 2 мес после сбора. Семена урожая 2020 года и образцы от предыдущих сборов, взятые с семенного склада, анализировали в марте 2021 года, то есть сроки хранения составляли около 9 мес (урожай 2020 года) и от 2 до 10 лет.

Содержание Т-2 токсина (Т-2), дезоксиниваленола (ДОН), зеараленона (ЗЕН), фумонизинов группы В (ФУМ), эргоалкалоидов (ЭА), альтернариола (АОЛ), роридина А (РОА), афлатоксина В₁ (АВ₁), стеригматоцистина (СТЕ), циклопиазоновой кислоты (ЦПК), эмолина (ЭМО), охратоксина А (ОА), цитрина (ЦИТ), микофеноловой кислоты (МФК), PR-токсина (PR) определяли по унифицированной методике (ГОСТ 31653-2012. Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. М., 2012) с помощью панели из 15 аттестованных коммерческих и исследовательских иммуноферментных тест-систем (СТО 00494143.01-2015 «Тест-системы для непрямого конкурентного иммуноферментного анализа. Общие технические условия», ВНИИВСГЭ). Нижние пределы количественных измерений соответствовали 85 % связывания антител и составили 1 (АВ₁, ЭА), 2 (Т-2, ОА, СТЕ), 5 (РОА), 10 (АОЛ, МФК, ЗЕН, ЭМО, ЦИТ, ЦПК), 40 (ДОН, ФУМ), 100 мкг/кг (PR).

Для экстракции размолотых образцов семян использовали смесь ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84:16 при расходе 5 мл на 1 г навески. Непрямой конкурентный иммуноферментный анализ выполняли после 10-кратного разведения экстрактов фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) с Tween 20.

Результаты. Данные по использованным в работе образцам семян рапса приведены в таблице 1. При использовании унифицированной методики и панели из 15 иммуноферментных тест-систем в 38 образцах семян рапса урожаев 2009–2020 годов микотоксины обнаружены не были.

Полное их отсутствие указывало на то, что это состояние оставалось стабильным и не зависело от сроков хранения семян. Уборка в указанные годы проходила в условиях, соответствующих многолетним климатическим параметрам, и каких-либо отклонений от нормативов по высушиванию семян не фиксировали. Следует отметить, что ранее в пяти образцах семян

рапса урожая 2015–2018 годов из восточной части Польши также не удалось найти ни один из 13 аналитов, включая фузариотоксины диацетоксисцирпенол, Т-2 токсин, НТ-2, ниваленол, дезоксиниваленол, 3-ацетил-дезоксиниваленол, фузаренон Х, зеараленон, а также афлатоксины В₁, В₂, G₁, G₂ и охратоксин А (17).

1. Характеристика семян ярового и озимого рапса *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk, использованных в микотоксикологическом обследовании (Московская обл., 2009–2021 годы)

Культура	Год урожая	Сорта, гибриды, селекционные образцы
Рапс озимый	2012–2018	Сорта: Горизонт (2018), Северянин (2012, 2013, 2017, 2018), Столичный (2014, 2017, 2018)
	2019	Сорта: Гарант, Северянин
	2020	Сорт: Северянин
	2021	Сорта: Гарант (два срока сева), Горизонт (два срока сева), Добродей, Казимир, Лауреат, Лорис, Норд (два срока сева), Оливин, Прогресс, Сармат, Северянин (два срока сева), Северянин (другая репродукция), Селигор, Столичный (два срока сева), Элвис, Asparagus, Brauen Schmitthole, Dunne, Grunder Sch., Hangry Gap, Imperial, Jot Neuf, Jrig Scdrap, Lider, Symmons, Taisetze note, Victor, Zenit, Zorni Образцы: № 4, № 2 НПЦ, № 4 НПЦ, № 6 НПЦ, ВН-360-14Л, ВН-364-14Р, ВН-469-15Л, ВН 726-17Р, ВН 912-15
Рапс яровой	2009–2018	Сорта: Бизон (2016), Викрос (2011, 2017), Грант (2009), Луговской (2017), Новосел (2015), Подмосковский (2012, 2015, 2018)
	2019	Сорта: Бизон, Велес, Грант, Новосел, Подмосковский
	2020	Сорта: Викрос, Новосел, Подмосковский, Светозар
	2021	Сорта: Бизон, Велес, Викрос, Грант, Луговской, Новик, Новосел, Подмосковский Гибриды: Астра 4, Астра 5, Астра 6, ВИК 1, ВИК 2, ВИК 3, ВИК 4, ВИК 5, Викрос, Драго, Каралино, Лагонда, Ларец, Люмен, Миракль, Макро, Сальса М 45, Смилла, Чеви КЛ Образцы: Викрос М 48.2, Викрос МД 38, Викрос МД 69.1, Викрос МД 70, Викрос МЛ 35, Викрос МЛ 38, Викрос МЛ 49, Викрос МЛ 69, Викрос МЛ 102, Грант МД 4.1, Новик МА 81, 25-3, 379-13, 557-15, 580-15, 902, 951-3, 948-3, 948-4, 948-6, 949-2; 951-1, 951-18, 7, 10, 15, 17, 19, 23, 26, 27, 38, 39, 40, 1/20, F 1/21, 2-7/15 М 74, 8/20, 18/20, 29/20, 32/20, 33/20, 75/20, 88/20, 359/20, 369/20, 372/20, 388/20

Единственным исключением в сборах семян за период с 2009 по 2019 годы был образец ярового рапса (сорт Бизон, 2019 год), в котором содержалась МФК в небольшой концентрации, близкой к пределу определения метода (20 мкг/кг). Один из штаммов *Aspergillus pseudoglaucus* Blochwitz (№ 448/2), полученный в ходе микологического анализа образца по общепринятой процедуре, включающей выделение чистых культур грибов и их идентификацию, при экспресс-тестировании (7 сут, 25 °С, сусловый агар) продуцировал МФК в количестве 2000 нг/г среды, а также токсин антрахинонового ряда — ЭМО (70 нг/г среды). Появление МФК в этом образце, вероятно, было результатом кратковременного нарушения условий его хранения, а более длительное действие негативных факторов могло привести к сочетанной контаминации. Продуцирование двух токсинов с количественным преобладанием МФК типично для штаммов этого гриба, встречающихся в зернопродукции (неопубликованные данные авторов).

В семенах урожая 2021 года также отсутствовали Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ, ОА, ЦИТ, АВ₁, СТЕ, ЦПК, РР, ЭМО и РОА. Однако в части образцов были обнаружены ЭА и АОЛ (табл. 2). ЭА, биосинтез которых известен для грибов многих таксонов, в том числе родов *Penicillium* и *Aspergillus* (18), содержались в фоновых количествах от 2 до 12 мкг/кг, и частота их выявления у яровых сортов оказалась больше, чем у озимых (67,5 % против 25,6 %). В 28,6 % образцов семян ярового рапса был обнаружен АОЛ —

один из токсичных метаболитов мелкоспоровых видов *Alternaria*. Содержание этого токсина в основном оставалось небольшим — от 8 до 32 мкг/кг, реже (у 6 образцов) варьировало от 46 до 775 мкг/г. Большинство положительных образцов содержали только ЭА (32 образца) или имели совместную загрязненность (20 образцов), в двух присутствовал только АОЛ.

Вегетационный период 2021 года был в целом теплее обычного. В 34 декадах года из 37 среднесуточная температура воздуха оказалась выше нормы. Среднесуточная температура летом превышала среднюю многолетнюю на 4,6 °С, осенью — на 3,1 °С, вегетация продлилась до конца I декады ноября. Осадков выпадало в 1,36 раза больше среднемноголетнего количества, превышения этого показателя в период с апреля по сентябрь распределялись неравномерно.

2. Частота обнаружения (n^+) и содержание микотоксинов в оригинальных (репродукционных) семенах ярового и озимого рапса *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk (Московская обл., 2021 год)

Культура	n	n^+ (содержание микотоксинов min-max, мкг/кг)	
		эргоалкалоиды	альтернариол
Рапс озимый	43	11 (2-12)	—
Рапс яровой	77	52 (2-5)	22 (8-775)

Примечание. n — число исследованных образцов, n^+ — число положительных образцов, содержащих микотоксины в количестве, превышающем нижний предел измерений. Прочерк означает, что микотоксин не обнаружен.

Уборка семян озимых в конце июля 2021 года проходила при более благоприятных условиях, чем яровых: усиление осадков в июле было наименьшим и составило 13,6 % от месячной нормы. Семена яровых собирали в конце вегетации по мере созревания, когда влажность превышала норму на 70,9 % (в августе) и 52,8 % (в сентябре). В образцах было много сорных семян, влажность которых оказалась особенно высокой, и быстро подсушить их до стандартной влажности удавалось не всегда. Стечение этих обстоятельств, по-видимому, стало причиной активного роста токсигенных микромицетов и накопления микотоксинов в семенах, выраженное в большей степени у яровых. Один из образцов ярового рапса, обозначенный как F 1/21 (см. табл. 1), который не был досушен до нормативной влажности, наряду с ЭА (3 мкг/кг) содержал АОЛ в наибольшем количестве — 775 мкг/кг. При микологическом анализе было выявлено его интенсивное (более 50 %) инфицирование видом *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire. У трех изолятов (№№ 456/1, 456/2 и 456/4) при культивировании (7 сут, 25 °С, солодовый агар) подтвердилась способность продуцировать АОЛ в количествах 980, 1520 и 2500 нг/г среды.

Ранее для грибов, встречающихся в семенах рапса, обсуждалась возможность токсических эффектов метаболитов *Alternaria* spp. (7) и была установлена афлатоксигенность у трех изолятов *Aspergillus flavus* (19). Вид *Aspergillus flavipes*, обнаруженный в составе эндофитов стеблей рапса, также относится к потенциально токсигенным (20). Поиск микромицетов, участвующих в контаминации семян этой культуры токсичными метаболитами, безусловно, следует продолжить в рамках более подробных микологических обследований.

Обобщение полученных результатов показало, что при соблюдении фитосанитарных и технологических правил, независимо от типа выращивания рапса масличного, в его семенах отсутствовали микотоксины. Этот новый факт позволяет предположить их крайне низкое содержание и в вегетирующих растениях, поскольку ранее на примере подсолнечника было показано, что контаминация семян имеет остаточные признаки в сравнении

с зеленой массой (21), а в зрелых плодах (стручках) горчицы посевной и луговых трав семейства Крестоцветные содержание микотоксинов меньше, чем в вегетативной части (22-24). Источником появления микотоксинов в вегетирующих растениях, вероятно, служат грибы, обитающие в виде устойчивых ассоциаций с основным организмом и сохраняющие состав и соотношение компонентов по видовым рангам. Для обширных сообществ эндофитных грибов (25) известна возможность трансмиссии их метаболитов в семена (через миграцию продуцентов из вегетативных частей или вертикальный перенос в виде конъюгированных форм по проводящим путям) (26).

Потенциально токсигенные мелкоспоровые виды грибов *Alternaria* не только входят в состав возбудителей альтернариоза, который ежегодно приводит к значительным потерям урожая рапса (27), но также способны к полупаразитарному обитанию с широкой субстратной специфичностью (28) и недавно идентифицированы как доминирующие среди эндофитов в корнях, стеблях и листьях растений рапса (20). Учитывая это, пока преждевременно судить об источниках появления АОЛ в составе контаминантов семян ярового рапса на фоне изменения внешних условий. Нельзя исключать возможность его трансмиссии как одного из метаболитов эндофитных грибов под влиянием биотических или абиотических смещений. При единственной попытке обнаружения альтернариотоксинов в семенах этой культуры ни один из шести выявлен не был (19).

3. Результаты выборочного микотоксикологического анализа семян, проведенного в разных регионах

Регион	Микотоксины, n^+/n , содержание (min-max, мкг/кг)	Ссылка
Румыния	Афлатоксины, 7/7; дезоксиниваленол, 7/7; зеараленон, 7/7	(4)
Литва	При уборке: афлатоксины, 5/5, (1,0-3,1); охратоксин А, 5/5 (1,9-7,0); дезоксиниваленол, 5/5 (164-183) Через 8 мес хранения: афлатоксины, 3/5 (2,1-3,3); охратоксин А, 5/5 (1,3-1,9); дезоксиниваленол, 0/5	(15)
Литва	Озимый ячмень: дезоксиниваленол, 8/8 (153,5-176,5); зеараленон, 12/12 (10,6-25,6); Т-2 токсин, 8/8 (8,5-10,2) Яровой ячмень: дезоксиниваленол, 6/8 (0-181,0); зеараленон, 12/13 (0-25,10); Т-2 токсин, 8/8 (8,2-10,1)	(16)

Примечание. n — число исследованных образцов, n^+ — число положительных образцов, содержащих микотоксины.

4. Результаты развернутого микотоксикологического анализа семян рапса, проведенного в разных регионах

Регион	n	Микотоксины		Ссылка
		обнаружены n^+ (содержание, min-max, мкг/кг)	не обнаружены	
Испания (Каталония)	20	Афлатоксин В1 — 1 (0,25)	Афлатоксины В2, G1, G2, альтернариол, монометилловый эфир альтернариола, тенуазоновая кислота, алтертоксины I и II	(19)
Китай	29	Аафлатоксин В1 — 10 (0,2-0,8); боверицин — 8 (137,6-898,8); фумонизин В1 — 6 (157,8-474,5); афлатоксин В2 — 2 (0,6; 15-моноацетаты дезоксиниваленола, 1,4)	Афлатоксины G1, G2, охратоксин А, стеригматоцистин, зеараленон, 3- и фумонизины В2, В3, Т-2 токсин, НТ-2	(29)

Примечание. n — число исследованных образцов, n^+ — число положительных образцов, содержащих микотоксины.

Согласно нашим данным, при осложненных условиях уборки в числе контаминантов семян рапса можно ожидать появление ЭА, АОЛ, МФК и ЭМО, однако такая загрязненность вполне может быть свойственна только агрозоне, в которой проводили наблюдение. При микотоксикологической оценке семян из других регионов, выполненной на меньших выборках, были выявлены афлатоксины, ОА и фузариотоксины (табл. 3, 4). Так, из группы фузариотоксинов в Румынии в 2002-2004 годах обнаружены ДОН

и ЗЕН (4), в Литве — ДОН в урожае, полученном с экспериментальных посевов озимого рапса (15). ДОН, ЗЕН и Т-2 выявлены в 2007–2009 годах в семенах ярового и озимого рапса, выращенного с применением традиционной технологии в Кедайнском и Паневежском районах центральной части Литвы (16). В Китае в семенах, полученных с производственных посевов в 11 провинциях, найдены только фузонизин В₁ и боверицин и не обнаружены ЗЕН, моноацетаты ДОН и Т-2 (29). По-видимому, появление фузариотоксинов в семенах было следствием очаговой пораженности растений комплексами возбудителей фузариоза, различающихся по видовому составу. Возможности использованного нами аналитического подхода были вполне достаточными, чтобы уверенно определить степень загрязненности семян афлатоксинами, ОА и фузариотоксинами, выявленными другими исследователями (см. табл. 3, 4).

В России в последние десятилетия сектор производства и переработки семян рапса получил активное развитие, объем посевных площадей вырос почти вдвое, а урожай семян в 2020–2021 годах достиг рекордных 2,4 млн т (30). Эту культуру возделывают в регионах всех федеральных округов — от Северо-Западного до Дальневосточного, значительно различающихся по почвенно-климатическим и агротехническим условиям. Побочная продукция от переработки семян на масло, жмыхи и шроты становится все более востребованной в кормопроизводстве, а продукты биомодификации рапсового жмыха рассматриваются как перспективные функциональные ингредиенты для пищевой промышленности (31). В таких условиях необходимость системного подхода к мониторингу этого сырья в стране не вызывает сомнений. К сожалению, регулярный контроль его санитарного качества пока не организован.

Тем более интересными представляются результаты точечной оценки: образец рапсового жмыха, поступивший из Калининградской области в 2021 году, не содержал изученных микотоксинов, тогда как полученный в 2018 году из Краснодарского края был загрязнен ЦПК (50 мкг/кг) и ЭМО (38 мкг/кг) (неопубликованные данные авторов).

Возможное накопление отдельных микотоксинов в семенах рапса не следует игнорировать и в агрономической практике, учитывая их негативное влияние на всхожесть. Эффективное устранение инфекции семенного материала может быть обеспечено предпосевной подготовкой — дражированием, инкрустированием или обеззараживанием с применением фунгицидов, но для снижения риска контаминации семян необходим их микотоксикологический контроль.

Таким образом, на оригинальных (репродукционных) семенах яровых и озимых культур рапса масличного показано, что при соблюдении фитосанитарных и технологических правил выращивания и хранения нет оснований для беспокойства по поводу угрозы их контаминации токсинами, свойственными грибам родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mutrothecium* и других. Все выявленные случаи загрязненности семян микотоксинами относились к образцам, собранным при сочетании неблагоприятных погодных условий или нарушениях правил хранения.

Авторы выражают благодарность с.н.с. лаборатории микотоксикологии и санитарии кормов ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Елене Алексеевне Пирязевой за выполнение микологического анализа и содействие в поиске литературы.

¹Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5, стр. 1, e-mail: aaburkin@mail.ru, kononenkogr@mail.ru ✉;

Поступила в редакцию 7 мая 2022 года

A TYPICAL MYCOTOXIN PROFILE FOR ORIGINAL (REPRODUCTIVE) OILSEED RAPE SEEDS

G.P. Kononenko¹ ✉, V.T. Volovik², A.A. Burkin¹, S.E. Sergeeva²

¹All-Russian Research Institute of Sanitary, Hygiene and Ecology — Branch of FSC ARRIEV RAS, 5, Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail aaburkin@mail.ru, kononenkogp@mail.ru (✉corresponding author);

²Williams Federal Research Center for Fodder Production and Agroecology, 1, Nauchnii Gorodok, Lobnya, Moscow Province, 141055 Russia, e-mail vik_volovik@mail.ru, mesvetlanka@mail.ru

ORCID:

Burkin A.A. orcid.org/0000-0002-5674-2818

Volovik V.T. orcid.org/0000-0002-8966-4457

Kononenko G.P. orcid.org/0000-0002-9144-615X

Sergeeva S.E. orcid.org/0000-0002-4244-8183

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors are grateful to E.A. Piryazeva (the Laboratory of Mycotoxicology and Feed Sanitation, All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology) for performing mycological analysis and assistance in searching scientific literature.

The work was carried out within the framework of the cooperation agreement between the Federal Scientific Center Williams VIK and VNIIVSGE — Branch of the Federal Scientific Center VIEV RAS (dated March 17, 2021).

Received May 7, 2022

doi: 10.15389/agrobiologia.2022.5.1001eng

Abstract

For rapeseed, the world's third largest source of vegetable oil, there are special requirements for post-harvest processing, which are rapid drying to the required moisture content due to the threat of mass mold during storage (J.T. Mills, 1987; J.T. Mills, R.N. Sinha, 1980). The authors of publications explained all known cases of mycotoxin detection in seeds of this crop by either infection of plants in the field or by the impact of unfavorable factors during harvesting (I. Brazauskienė et al., 2006; A. Mankeviciene et al., 2011, L. Wu et al., 2017). In this study, for the first time, we have confirmed that the presence of toxic metabolites of fungi of the genera *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Myrothecium* and a number of others is not typical for seeds of this crop. The purpose of this work was mycotoxicological examination of oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk seeds under proper phytosanitary and technological conditions during cultivation, harvesting and storage. Original (reproduction) seeds were harvested in 2009–2021 from experimental plots (the Laboratory of fodder crops and field feed production systems, the Williams Federal Research Center, Moscow Province). After grinding in a laboratory mill, 158 samples were analyzed by a unified methodology using certified commercial and research enzyme immunoassay test systems (GOST 31653–2012). For extraction, a mixture of acetonitrile and water was used (84:16 v/v), 5 ml per 1 g sample. Mycotoxins (T-2 toxin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins of group B, ergot alkaloids, alternariol, roridin A, aflatoxin B₁, sterigmatocystin, cyclopiazonic acid, emodin, ochratoxin A, citrinin, mycophenolic acid, PR-toxin) were determined in extracts after 10-fold dilution with phosphate-salt buffer solution (pH 7.4) with Tween 20. The analyzed mycotoxins were not found in the seeds of the 2009–2020 harvests collected under normal weather conditions and without violations of the drying and storage regimes. For only one sample of spring rapeseed (Bison variety, 2019), weak contamination with mycophenolic acid was detected and the producer *Aspergillus pseudoglaucus* Blochwitz was identified in the mycobiota. In the seeds of the 2021 harvested under elevated temperature and humidity, contamination with ergot alkaloids (from 2 to 12 µg/kg = ppb) was found in 67.5 % of spring and 25.6 % of winter crops. In addition, 28.6 % of spring rape samples contained alternariol, mainly in low concentrations (from 8 to 32 ppb) and rarely with a more pronounced accumulation (from 46 to 775 ppb). In one spring rapeseed sample which was stored in an under-dried state for the longest time, the greatest contamination with alternariol occurred and intensive infection with the fungus *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire were determined with an experimentally confirmed ability to toxin formation.

Keywords: oilseed rape, seeds, mycotoxins, enzyme immunoassay.

REFERENCES

1. Federal'nyy tsentr razvitiya eksporta produktsii APK Minsel'khoza Rossii. *Obzor VED: rapsovoe*

- maslo [Overview of foreign economic activity: rapeseed oil]. Available: <https://aemcx.ru/2021/11/23/obzor-ved-rapsovoe-maslo/>. Accessed: 4.10.2021 (in Russ.).
2. Mills J.T., Sinha R.N., Wallace H.A.H. Assessment of quality criteria of stored rapeseed — a multivariate study. *Journal of Stored Products Research*, 1978, 14(2-3): 121-133 (doi: 10.1016/0022-474x(78)90007-3).
 3. Mills J.T., Sinha R.N. Safe storage periods for farm-stored rapeseed based on mycological and biochemical assessment. *Phytopathology*, 1980, 70(6): 541-547 (doi: 10.1094/PHYTO-70-541).
 4. Tabuc K., Stefan G. Assessment of mycologic and mycotoxicologic contamination of soybean, sunflower and rape seeds and meals during 2002-2004. *Archiva Zootechnika*, 2005, 8: 51-56.
 5. Şesan T.E., Groza O. Mycobiota of rape seeds in Romania. I. Identification of mycobiota associated with rape seeds from different areas of Romania. *Acta Mycologica*, 2013, 48(2): 263-277 (doi: 10.5586/am.2013.029).
 6. Kačergius K., Lugauskas A., Levinskaite L., Varnaite R., Mankevičienė A., Bakutis B., Baliukoniene V., Brūkštie D. Screening of micromycetes producing toxic substances under various conditions. *Botanica Lithuanica*, 2005, 7: 65-75.
 7. Brazauskienė I., Petraitiene E. The occurrence of *Alternaria* blight (*Alternaria* spp.) and *Phoma* stem canker (*Phoma lingam*) on oilseed rape in central Lithuania and pathogenic fungi on harvested seed. *Journal of Plant Protection Research*, 2006, 46(3): 295-311.
 8. Fraş M., Jezierska-Tys S., Tys J. Populations of selected microbial and fungal species growing on the surface of rape seeds following treatment with desiccants or plant growth regulators. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2010, 73(17-18): 1230-1235 (doi: 10.1080/15287394.2010.492007).
 9. Tańska M., Konopka I., Korzeniewska E., Rotkiewicz D. Colour of rapeseed (*Brassica napus*) surface and contamination by fungi during storage of dry and wet seeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, 46(11): 2265-2273 (doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02745.x).
 10. Škrinjar M.M., Miklič V.J., Kocić-Tanackov S.D., Marjanović A.M., Maširević S.N., Suturović I.Z., Blagojević N.T., Šošo V.M. Xerophilic mycopopulations isolated from rapeseeds (*Brassica napus*). *APTEFF (Acta Periodica Technologica)*, 2013, 44: 115-124 (doi: 10.2298/APT1344115S).
 11. Maširević S., Feldeždi M., Škrinjar M., Kocić-Tanackov S., Radujkov D. First report of *Acremonium charitcola* (Lindau) W. Gams on rapeseed samples in storage during 2012 in Serbia. *Research Journal of Agricultural Science*, 2014, 46 (2): 178-181.
 12. Jeswal P. Occurrence of mycotoxins in oil seeds of Bihar State (India) and post-harvest storage suitability for minimization of mycotoxins in oil seeds and its products. *Proc. ISM Conf. «World-wide mycotoxin reduction in food and feed chains»*. Tulln, 2009: 43.
 13. Bhat R., Reddy K. Challenges and issues concerning mycotoxin contamination in oil seeds and their edible oils: updates from last decade. *Food Chemistry*, 2017, 215: 425-437 (doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.161).
 14. Kesho A., Abebe W. Major fungi associated with some cereals, oils and legume crops of seeds grown in main season at Holetta Agricultural Research Center by seed technology multiplication (HARC, EIAR). *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Advanced Technology*, 2021, 2(6): 48-53.
 15. Brazauskienė I., Petraitiene E., Mankevičienė A. Effects of genotype and environmental factors on rapeseed contamination with mycotoxins and mycotoxin-producing fungi. *Ecologija*, 2006, 3: 14-20.
 16. Mankevičienė A., Supronienė S., Brazauskienė I., Gruzdevienė E. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in oil crop seed. *Plant Breeding and Seed Science*, 2011, 63: 109-116 (doi: 10.2478/v10129-011-0022-1).
 17. Kowalska G., Kowalski R. Occurrence of mycotoxins in selected agricultural and commercial products available in eastern Poland. *Open Chemistry*, 2021, 19(1): 653-664 (doi: 10.1515/chem-2021-0056).
 18. Kozlovskiy A.G. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1999, 35(5): 536-545 (in Russ.).
 19. Viñas I., Palma J., Garza S., Sibilia A., Sanchis V., Visconti A. Natural occurrence of aflatoxin and *Alternaria* mycotoxins in oilseed rape from Catalonia (Spain) — incidence of toxigenic strains. *Mycopathologia*, 1994, 128(3): 175-179 (doi: 10.1007/BF01138480).
 20. Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., Chen W., Li G. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*, 2014, 72: 98-108 (doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.02.018).
 21. Zotova E.V., Kononenko G.P., Burkin A.A. V sbornike: *Sovremennaya mikologiya v Rossii* [In: Modern mycology in Russia]. Moscow, 2017, 7: 202-204 (in Russ.).
 22. Kononenko G.P., Zotova E.V., Ustyuzhanina M.I. V sbornike: *Uspekhi meditsinskoy mikologii* [In: Advances in medical mycology]. Moscow, 2019, 20: 649-653 (in Russ.).
 23. Burkin A.A., Kononenko G.P. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*, 2022, 3: 237-245 (in Russ.).
 24. Burkin A.A., Kononenko G.P., Mosina L.V. The first mycotoxicological investigation of white mustard (*Sinapis alba* L.). *Agricultural Biology*, 2019, 54(1): 186-194 (doi: 10.15389/agrobiol-ogy.2019.1.186eng).
 25. Kusari S., Spiteller M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary

- metabolites: progress, challenges and opportunities In: *Metabolomics*. U. Roessner (ed.). InTech, London, 2012: 241-266.
26. Winter M., Koopmann B., Döll K., Karlovsky P., Kropf P., Schlüter K., von Tiedemann A. Mechanisms regulating grain contamination with trichothecenes translocated from the stem base of wheat (*Triticum aestivum*) infected with *Fusarium culmorum*. *Phytopathology*, 2013, 103(7): 682-689 (doi: 10.1094/PHTO-11-12-0296-R).
 27. Saharan G.S., Mehta N., Meena P.D. *Alternaria* diseases of crucifers: biology, ecology and disease management. Springer Science+Business Media Singapore, 2016 (doi: 10.1007/978-981-10-0021-8).
 28. Gannibal F.B., Gasich E.L. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2009, 43(5): 447-456 (in Russ.).
 29. Wu L., Zhou H., Zhu T., Yang H., Dong X., Chen L., Bai Y., Yin N., Ding X., Li P. Fungal diversity and mycotoxin identification of mouldy rapeseed in China. *Oil Crop Science*, 2017, 2(1): 38-48 (doi: 10.3969/j.issn.2096-2428/2017.01.004).
 30. *USDA. Godovoy otchet maslichnym i produktam pererabotki v Rossii* [USDA. Annual report on oilseeds and by-products in Russia]. Available: <https://www.zol.ru/n/33b4c>. Accessed: 15.02.2022 (in Russ.).
 31. Pakhomova O.N. *Razrabotka i ispol'zovanie funktsional'nogo pishchevogo obogatitelya iz zhmykha rapsovogo. Kandidatskaya dissertatsiya* [Development and use of a functional food fortifier produced from rapeseed cake. PhD Thesis]. Orel, 2014 (in Russ.).