

MAGDALENA TWARUZEK, JAN GRAJEWSKI, NATALIA GRAJEWSKA-WANAT

Zakład Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

## CYTOTOKSYCZNOŚĆ *USTILAGO MAYDIS* IZOLOWANEGO Z KUKURYDZY\*

CYTOTOXICITY OF *USTILAGO MAYDIS* ISOLATED FROM MAIZE

**Streszczenie.** Głównym patogenem kukurydzy są grzyby z rodzaju *Fusarium*. Oprócz *Fusarium* fitopatogenem grzybowym wpływającym na wielkość plonów kukurydzy jest *Ustilago maydis* syn. *Ustilago zae* Unger, będący przyczyną zmian chorobowych określanymi jako głownia guzowata. Celem pracy była ocena cytotoksyczności szczepów *Ustilago maydis* izolowanych z kolb kukurydzy. Wybrano dziewięć szczepów, które poddano testowi cytotoksyczności MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy). Badane izolaty *Ustilago maydis* wykazały średnią i dużą cytotoksyczność w porównaniu z kontrolą. Wysoki poziom cytotoksyczności izolatów *Ustilago maydis* może świadczyć o ich potencjale toksynotwórczym.

**Słowa kluczowe:** kukurydza, *Ustilago maydis*, głownia, test MTT, komórki SK

### Wstęp

Kukurydza jest ważną rośliną uprawną, której powierzchnia zasiewów ze względu na opłacalność ciągle wzrasta. Jednak w ostatnich kilku latach panowały przejściowo niekorzystne warunki dla uprawy tej rośliny. Stresy wywołane przez zmienne warunki klimatyczne (ciepło i susza – szczególnie na glebach piaszczystych) spowodowały, że na wielu polach obserwowano porażenie roślin przez grzyby chorobotwórcze. Głównym patogenem kukurydzy i zbóż drobnoziarnistych są grzyby z rodzaju *Fusarium*. Oprócz *Fusarium* spp. fitopatogenem grzybowym znacząco wpływającym na wielkość plonów kukurydzy jest *Ustilago maydis* syn. *Ustilago zae* Unger, będący przyczyną zmian

---

\*Badania finansowane w ramach projektu międzynarodowego niewspółfinansowanego o numerze decyzji 761/N-AUSTRIA/2010/0.

chorobowych określanych jako głownia guzowata. W ostatnich latach uprawie kukurydzy zagraża również *Sphacelotheca reiliana* – sprawca głowni pyłającej, która jest często mylona z głownią guzowatą (KORBAS 2006, 2007). Porażenie roślin głownią guzowatą na plantacjach jest nierównomierne (często większe występuje w pasach przy brzegach pól), jednak w ostatnich pięciu latach obserwowano plantacje, na których skażenie dochodziło do 80-100% kolb. W takich sytuacjach pojawiło się pytanie, czy są to tylko straty produkcyjne, czy także problem zdrowotny dla zwierząt. Celem badań była ocena właściwości cytotoksycznych *Ustilago maydis* izolowanego z kolb kukurydzy.

## Material i metody

Z narośli głowni wykonano posiewy na pożywkę agarową YGC (ang. *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar*) w celu uzyskania izolowanych, jednozarodnikowych kultur *Ustilago maydis*. Z wykorzystaniem lupy stereoskopowej wybrano tylko te kolonie, które wyrosły z pojedynczych zarodników przetrwalnych – teliospor. Następnie z kolonii wykonano preparaty mikroskopowe, oceniono cechy mikroskopowe pseudo-grzybni utworzonej z cylindrycznych komórek z charakterystycznym odpączkowaniem komórek potomnych pod kątem  $35^\circ$  do osi głównej komórki. W analizowanym materiale skażonym głownią wyodrębniono *Ustilago maydis* na podstawie cech: makroskopowych kolonii i mikroskopowych komórek.

Wyodrębnione izolaty *Ustilago maydis* posiano na podłoże Czapek i inkubowano w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  przez okres 14 dni. Każdy izolat posiano na dwie szalki Petriego. Pełna analiza badawcza obejmowała badanie próby (dwie szalki Petriego z *Ustilago maydis* na podłożu Czapek) i kontroli (szalka z podłożem Czapek). Z prób przygotowano ekstrakty do testu MTT.

Wybrano dziewięć szczepów *Ustilago maydis* i poddano je testowi cytotoxyczności MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy). Test ten stanowi czułe narzędzie diagnostyczne pozwalające na określenie ogólnej cytotoxyczności grzybów, wykorzystujące komórki świńskich nerek (SK) wrażliwe na większość mikotoksyn. Podstawą testu MTT jest przekształcenie żółtej soli tetrazoliowej MTT przez aktywne metabolicznie, nieuszkodzone toksynami komórki do fioletowego, nierozpuszczalnego w wodzie formazanu (HANELT i IN. 1994). Redukcja MTT do formazanu następuje w sposób proporcjonalny do liczby komórek aktywnych metabolicznie, gdyż tylko takie komórki przeprowadzają ten proces. Komórki świńskich nerek zakażone pleśniami produkującymi mikotoksyny tracą zdolność przekształcania w mitochondriach soli tetrazoliowej w formazan. Jeżeli więc komórki te zostały uszkodzone przez mikotoksyny, to reakcja ta jest mniej intensywna lub nie zachodzi w ogóle, co można stwierdzić po zmianie barwy i oznaczyć fotometrycznie. Reakcja ta świadczy o cytotoxyczności szczepu grzyba w stosunku do komórek SK. Komórki świńskich nerek hodowano przez 48 h w medium zawierającym roztwór antybiotyków (penicylina i streptomycyna, Sigma Aldrich) i płodową surowicę cieląt (Sigma Aldrich), w inkubatorze z  $\text{CO}_2$  Hera Cell firmy Heraeus ( $5\% \text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ , wilgotność na poziomie 98%). Liczba komórek nerek świńskich wynosiła  $2,2 \cdot 10^5$ . Zakresy testowanych stężeń przygotowano w stosunku 1:2 i wynosiły one od 31,25 do 0,061  $\text{cm}^2/\text{ml}$  (tab. 1). Wartość wyrażono w centymetrach kwadratowych powierzchni płytki Petriego, z której pobierano grzyb

Tabela 1. Kolejne rozcieńczenia dla prób izolatów *Ustilago maydis* (cm<sup>2</sup>/ml)  
 Table 1. Serial dilutions for isolates samples of *Ustilago maydis* (cm<sup>2</sup>/ml)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
31,25	15,625	7,813	3,906	1,953	0,977	0,488	0,244	0,122	0,061
+			++				+++		

+ – cytotoksyczność mała, ++ – cytotoksyczność średnia, +++ – cytotoksyczność duża.

+ – low cytotoxicity, ++ – medium cytotoxicity, +++ – high cytotoxicity.

pleśniowy wraz z medium do ekstrakcji, na 1 ml (GNIADK i IN. 2009). Do ilościowych oznaczeń cytotoksyczności wykorzystywano spektrofotometr mikroplótkowy (czytnik Elisa Digiscan firmy Asys Hitech GmbH, Austria) i program MikroWin 2000 (firmy Mikrotek Laborsysteme GmbH, Niemcy). Pomiaru dokonywano przy długości fali 510 nm. Wszystkie wartości absorpcji próbek poniżej 50% aktywności podziałowej uważa się za toksyczne, tak więc na podstawie stopnia rozcieńczenia oznaczano graniczne stężenie toksyczne, tzn. najmniejszą testowaną próbkę, która spowodowała toksyczne działanie na komórki – IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration).

W niniejszych badaniach jednocześnie testowano dwa ekstrakty w umieszczeniu poziomym w 10 stopniach rozcieńczenia. Najwyższy i najniższy rząd poziomy oraz drugi pionowy zagłębień mikroplótki spełniały rolę bariery komórkowej. Pierwszy rząd pionowy na płytce testowej pozostawał wolny jako wartość zerowa dla czytnika. Pozostałe rzędy poziome zawierały ekstrakty, które barwiły się w zależności od uszkodzenia komórek przez mikotoksyny, co było miarą cytotoksyczności badanego szczepu (od barwy jasno- do ciemnofioletowej).

## Wyniki

Wyniki badań cytotoksyczności izolatów *Ustilago maydis* przedstawiono w tabeli 2.

Jedna z prób charakteryzowała się niskim stopniem cytotoksyczności (IC<sub>50</sub> 7,8 cm<sup>2</sup>/ml). Pozostałe izolaty *Ustilago maydis* wykazały cytotoksyczność średnią, w zakresie od 0,49 do 3,9 cm<sup>2</sup>/ml, i dużą – w zakresie od 0,12 do 0,24 cm<sup>2</sup>/ml w porównaniu z kontrolą, która nie posiadała właściwości cytotoksycznych.

Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono obrazy mikroplótek MTT dla czterech szczepów *Ustilago maydis* izolowanych z kolb kukurydzy.

## Dyskusja

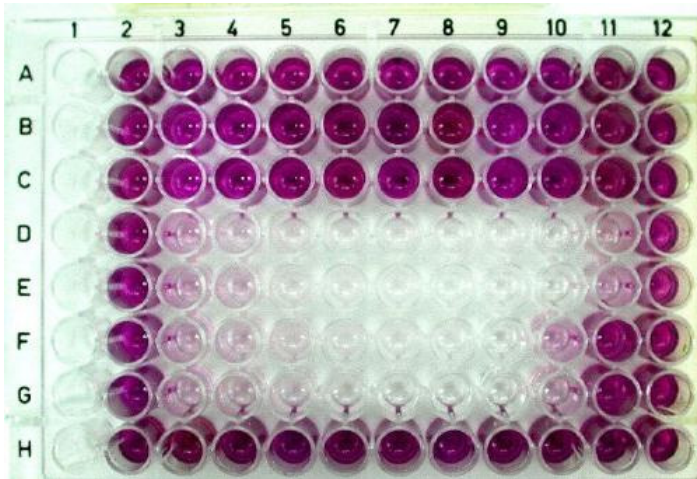
Już we wcześniejszych badaniach, w których oceniano toksyczność całych kolb kukurydzy porażonych głównie guzowatą na poletkach doświadczalnych ZDD Swadzim (GRAJEWSKI i IN. 2008), zaobserwowano większą ich cytotoksyczność w teście MTT niż kolb bez skażenia. Jednak na stopień toksyczności mogły mieć także wpływ różne mikotoksyny tworzone w fazie dojrzałości woskowej i pełnej rośliny przez wykryte

Tabela 2. Cytotoksyczność *Ustilago maydis* izolowanego z kukurydzy  
 Table 2. Cytotoxicity of *Ustilago maydis* isolated from maize

Lp. – No.	IC <sub>50</sub> (cm <sup>2</sup> /ml)	Ocena – Evaluation
1	0,24	+++
2	0,98	++
3	0,12	+++
4	0,24	+++
5	7,8	+
6	0,24	+++
7	0,12	+++
8	3,9	++
9	3,9	++
10 (kontrola – control)	–	–

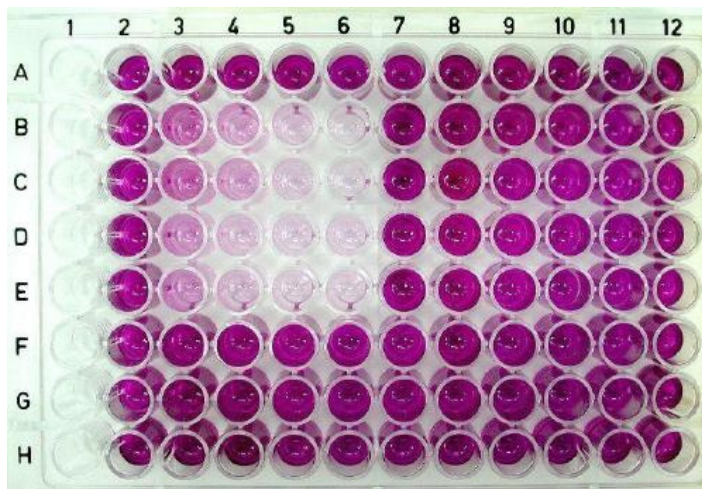
– – brak cytotoksyczności, + – cytotoksyczność mała, ++ – cytotoksyczność średnia, +++ – cytotoksyczność duża.

-- lack of cytotoxicity, +- low cytotoxicity, ++ – medium cytotoxicity, +++ – high cytotoxicity.



Rys. 1. Obraz mikropłytki MTT dla szczepów *Ustilago maydis* z dużą cytotoksycznością (nr 3 i 4) izolowanych z kukurydzy

Fig. 1. Visualisation of a MTT plate for the high cytotoxic *Ustilago maydis* strains (3 and 4) isolated from maize



Rys. 2. Obraz mikro płytki MTT dla szczepów *Ustilago maydis* ze średnią cytotoksycznością (nr 8 i 9) izolowanych z kukurydzy

Fig. 2. Visualisation of a MTT plate for the medium cytotoxic *Ustilago maydis* strains (8 and 9) isolated from maize

liczne gatunki grzybów pleśniowych (TEKIELA 2005). SULEWSKA i IN. (2007) podają, że fitopatogeny wywołujące zmiany chorobowe typu głownia prawdopodobnie wytwarzają toksyczne ergotalkaloidy. W badaniach własnych, stosując metodę oznaczeń HPLC-MS/MS, nie potwierdzono w głowni tych mikotoksyn (GRAJEWSKI i IN. 2008). POTKAŃSKI i IN. (2010) wykazali również, że kiszonki uzyskane z kukurydzy zainfekowanej głownią miały gorszą aerobową stabilność i jakość niż kiszonki z surowca nieskażonego. Wyniki badań cytotoksyczności przedstawione w tabeli 2 jednoznacznie wskazują, że wszystkie oceniane izolaty *Ustilago maydis* zawierały wtórne metabolity, które wykazały średnią lub dużą toksyczność dla komórek zwierzęcych. W przypadku kukurydzy powyższe metabolity mogą powodować nadmierny wzrost i podział komórek rośliny, co objawia się licznymi guzami. Ponieważ nie ma możliwości ochrony kukurydzy przed głownią w okresie jej wegetacji, uzyskany skażony surowiec (szczególnie ziarno), oprócz tego, że ma gorszą wartość pokarmową, może także zagrażać zdrowiu zwierząt.

## Wnioski

1. Wszystkie wyizolowane szczepy *Ustilago maydis* wykazały średnią i dużą cytotoksyczność w teście MTT.
2. Wysoki poziom cytotoksyczności izolatów *Ustilago maydis* może świadczyć o ich potencjale toksynotwórczym.
3. Test MTT okazał się skutecznym badaniem do oceny toksyczności *Ustilago maydis*.

## Literatura

- GNIADK A., MACURA A., TWARUŻEK M., 2009. Charakterystyka grzybów występujących w środowisku oddziały intensywnej terapii. Część 2. Cytotoksyczność wyizolowanych grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Mikol. Lek. 16, 1: 15-18.
- GRAJEWSKI J., TWARUŻEK M., ŁUKOMSKA W., BŁAJET-KOSICKA A., BERTHILLER F., 2008. Mikologiczne i mikotoksykologiczne skażenie kolb kukurydzy porażonej *Ustilago maydis*. W: Problemy agrotechniki oraz wykorzystania kukurydzy i sorgo. Red. T. Michalski. Wyd. UP, Poznań: 167-169.
- HANELT M., GAREIS M., KOLLARCIK B., 1994. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. Mycopathologia 128, 3: 167-174.
- KORBAS M., 2006. Głównie kukurydzy i inne choroby – szkodliwość i możliwość zwalczania. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 46, 1: 354-357.
- KORBAS M., 2007. Głównia pyłaca kukurydzy (*Sphacelotheca reiliana*) – nowe zagrożenie w Polsce. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 47, 2: 136-140.
- POTKAŃSKI A., GRAJEWSKI J., TWARUŻEK M., SELWET M., MIKLASZEWSKA B., BŁAJET-KOSICKA A., SZUMACHER-STRABEL M., CIEŚLAK A., RACZKOWSKA-WERWIŃSKA K., 2010. Chemical composition, fungal microflora and mycotoxin content in maize silages infected by smut (*Ustilago maydis*) and the effect of biological and chemical additives on silage aerobic stability. J. Anim. Feed Sci. 19: 130-142.
- SULEWSKA H., KOZIARA W., PANASIEWICZ K., JAZIC P., 2007. Porażenie roślin kukurydzy grzybem *Ustilago zaeae* Unger w zależności od zastosowania nawozów naturalnych. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 47, 2: 348-351.
- TEKIELA A., BEREŚ P., GRAJEWSKI J., MIKLASZEWSKA B., 2005. Wpływ zwalczania chorób i szkodników kukurydzy na zasiedlenie ziarna przez grzyby i zawartość mikotoksyn. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 45, 2: 1149-1152.

## CYTOTOXICITY OF *USTILAGO MAYDIS* ISOLATED FROM MAIZE

**Summary.** The main pathogen of maize are fungi of the genus *Fusarium*. Besides phytopathogenic *Fusarium*, *Ustilago maydis* is another fungal genus affecting maize yields, causing lesions, known as smut. The objective of the study was evaluation of the cytotoxicity of *Ustilago maydis* isolated from maize. Nine *Ustilago maydis* strains were selected to a detailed evaluation of their cytotoxicity using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. *Ustilago maydis* strains showed medium and high cytotoxicity compared to control. High levels of cytotoxicity of *Ustilago maydis* may be indicative of their toxigenic potential.

**Key words:** maize, *Ustilago maydis*, smut, MTT test, SK cells

Twarużek M., Grajewski J., Grajewska-Wanat N., 2013. Cytotoksyczność *Ustilago maydis* izolowanego z kukurydzy. *Nauka Przyr. Technol.* 7, 1, #17.

---

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

*Magdalena Twarużek, Zakład Fizjologii i Toksykologii, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz, Poland, e-mail: twarmag@ukw.edu.pl*

*Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:*

*15.01.2013*

*Do cytowania – For citation:*

*Twarużek M., Grajewski J., Grajewska-Wanat N., 2013. Cytotoksyczność *Ustilago maydis* izolowanego z kukurydzy. *Nauka Przyr. Technol.* 7, 1, #17.*