

Houby rodu *Fusarium* v přirozeně infikovaných porostech sladovnických odrůd / linií ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a jejich identifikace a kvantifikace za využití real-time PCR metody

Fungi Of Fusarium sp. in Naturally Infected Malting Barley Varieties / Lines (Hordeum vulgare L.) and Their Identification and Quantification by The Real-Time PCR Method

MARTIN KMOCH, IVANA ŠAFRÁNKOVÁ, LUDMILA HOLKOVÁ, RADOVAN POKORNÝ, JAROSLAVA MARKOVÁ
Mendelova univerzita v Brně, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno / Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic
e-mail: martin.kmoch@mendelu.cz

Kmoch M. – Šafránková I. – Holková L. – Pokorný R. – Marková J.: Houby rodu *Fusarium* v přirozeně infikovaných porostech sladovnických odrůd/linií ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a jejich identifikace a kvantifikace za využití real-time PCR metody. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 203–208.

Fytopatogenní houby rodu *Fusarium*, způsobující fuzáriovou hnilobu klasů ječmene (běloklasost), jsou celosvětově významným zdrojem nebezpečných mykotoxinů ve sklizené produkci. Kromě tvorby mykotoxinů mohou negativně ovlivňovat výnos. Cílem práce bylo stanovit pomocí real-time PCR metody vliv odrůdy/linie, fungicidního ošetření a lokality na přirozené infekce obilí jarního ječmene (*Hordeum vulgare* L.) houbami rodu *Fusarium*. Pokus byl proveden v roce 2010 na lokalitě Žabčice a Kroměříž. Do pokusu bylo zařazeno 14 odrůd/linií ve dvou variantách – fungicidně ošetřená a bez ošetření (kontrola).

V obilích ječmene byly identifikovány a kvantifikovány nejvýznamnější druhy *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* a *F. culmorum*. Nejčastěji bylo identifikováno *F. avenaceum* a *F. graminearum*. Mezi odrůdami/liniemi nebyly obecně zjištěny statisticky významné rozdíly v intenzitě infekce obilí sledovanými patogeny. Mezi lokalitami byl zjištěn v intenzitě infekce statisticky průkazný rozdíl pouze u druhu *F. avenaceum*. Statisticky významně nižší infekce obilí ječmene byla prokázána u fungicidně ošetřené varianty pouze u patogenu *F. graminearum*. Obecně nižší infekce obilí druhů rodu *Fusarium* byla zjištěna u chemicky ošetřené varianty.

Kmoch M. – Šafránková I. – Holková L. – Pokorný R. – Marková J.: Fungi of *Fusarium* sp. in naturally infected malting barley varieties/lines (*Hordeum vulgare* L.) and their identification and quantification by the real-time PCR method. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 203–208.

Phytopathogenic fungi of *Fusarium* sp. causing fusarium ear blight are a significant source of dangerous mycotoxins in harvested production worldwide. Besides production of mycotoxins, they can also negatively affect yield. The aim of this study was to determine with the real-time PCR method the effect of a variety/line, fungicide treatment and locality on the intensity of natural infection of spring barley grains (*Hordeum vulgare* L.) by fungi of *Fusarium* spp. The experiment was conducted at the localities Žabčice and Kroměříž in 2010. The experiment comprised 14 varieties/lines in two variants – fungicide treated and without treatment (control). *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, and *F. culmorum* were the most significant species identified and quantified in barley grains. *F. avenaceum* and *F. graminearum* were identified most frequently. Between varieties/lines, no statistically significant differences were found in infection of grains caused by the studied pathogens. Statistically significant difference between localities was found only *F. avenaceum* sp. A statistically significant difference between the fungicide-treated variant and fungicide-non-treated variant was found in the pathogen *F. graminearum*. Generally lower level of barley grains infection by *Fusarium* spp was determined in a chemically treated variant.

Kmoch, M. – Šafránková, I. – Holková, L. – Pokorný, R. – Marková, J.: Die Pilze der Familie *Fusarium* in den naturinfizierten Bewuchsen von Braugerstensorten/Linien (*Hordeum vulgare* L.) und ihre Identifikation und Quantifikation durch Anwendung der real-time PCR Methode. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 203–208.

Die fytopathogene Pilze der Familie *Fusarium*, die Fusarium Fäule der Gerstenaehren verursachen, stellen in der ganzen Welt eine bedeutende Quelle der gefährlichen Mykotoxine in der abgeernteten Produktion dar. Weiterhin können diese Pilze auch den Erntenertrag negativ beeinflussen. Der Artikel befaßt sich mit der Methode real-time PCR den Einfluß der Sommergerstensorte/Linie, Fungizidbehandlung und der Lokalität auf die Naturinfektion der Grasfrucht der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.) durch die Pilze der Familie *Fusarium* festzustellen. Im Jahre 2010 in der Lokalität Žabčice und Kroměříž wurde ein Versuch durchgeführt. Es wurden 14 Sorten/Linien in zwei Varianten – eine fungizidbehandelt, die zweite ohne chemische Behandlung eingesetzt. In den Grasfrüchten wurden die bedeutendsten Sorten *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* und *F. culmorum* identifiziert und quantifiziert. Am häufigsten wurden *F. avenaceum* und *F. graminearum* identifiziert. Unter Sorten/Linien wurden keine statistisch bedeutenden Unterschiede in der Infektionsintensität der Grasfrucht durch die verfolgte Pathogene festgestellt. Unter den Lokalitäten wurde nur einen statistisch bedeutenden Unterschied bei der Sorte *F. avenaceum* ermittelt. Eine statistisch bedeutende niedrigere Infektion der Gerstengrasfrucht wurde nur bei der fungizidbehandelte Variante beim Pathogen *F. graminearum* nachgewiesen. Eine niedrigere Infektion durch die Pathogene der Familie *Fusarium* in Allgemein wurde bei der chemisch behandelte Variante gefunden.

Klíčová slova: *Fusarium* spp., real-time PCR, ječmen jarní, odrůdy

Keywords: *Fusarium* spp., real-time PCR, spring barley, varieties

1 ÚVOD

Houby rodu *Fusarium* jsou významnými patogeny obilnin, u nichž způsobují onemocnění klasů (běloklasost – fuzáriová hniloba klasů), kořenů a pat stébel i odumíráním klíčících rostlin [1]. Nepříznivě ovlivňují výnos i kvalitu produkce [2]. K infekci může docházet kdykoliv během vegetace, pokud je vlhké či deštivé počasí. Nejvýznamnější je napadení klásků, které jsou nejvýmavější v době květu nebo počáteční fázi vospoké zralosti obilí [3]. Napadené obilky představují nebezpečí pro člověka i hospodářská zvířata. Důvodem je produkce toxických sekundárních metabolitů, tzv. mykotoxinů, poškozujících např. zažívací ústrojí, imunitní systém aj., některé mají karcinogenní

1 INTRODUCTION

Fungi of the genus *Fusarium* are significant pathogens of cereals where they cause diseases of ears (fusarium ear blight, FEB) roots and stalk feet and dying of germinating plants [1]. They affect yield and quality of production unfavorably [2]. The infection can occur any-time during vegetation if the weather is hot or wet but the most serious is infestation of spikelets which are more sensitive in the flowering period or at initial phase of grains waxy ripeness [3]. The infested grains are risky both for humans and livestock. The reason is production of toxic secondary metabolites, so-called mycotoxins damaging for example the alimentary tract, immune system etc. some having

potenciál [1, 2, 4]. Chemicky a tepelně stabilní mykotoxiny [5] mohou způsobovat technologické problémy při výrobě piva, konkrétně při sladování (inhibice syntézy enzymů) nebo při kvašení (inhibice růstu kvasinek) [6]. V obilovinách se vyskytují zejména trichotheceny (zvláště deoxynivalenol DON a nivalenol NIV) a jejich deriváty, T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol a neosolaniol [7, 5]. Významným zdrojem trichothecenů jsou *Fusarium graminearum* (teleomorfa *Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* a *F. equiseti* (teleomorfa *G. intricans*) [8]. *F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. poae* produkují deoxynivalenol [9], který přechází i do piva a spolu se štafelany se podílí na přepěňování (tzv. gushing). *F. graminearum* a *F. culmorum* jsou současně také nejvýznamnějšími producenty zearalenonu (ZEA) a jeho derivátů. *F. avenaceum* (teleomorfa *G. avenacea*) produkuje trichotheceny, ale i např. enniatiny a moniliforminy [10].

Výše uvedené houby způsobující fuzáriovou hnilobu klasu ječmene lze omezovat použitím vhodného fungicidu. Účinnost fungicidního ošetření závisí nejen na účinné látce, ale také na způsobu a termínu aplikace [1, 11]. K dosažení maximální účinnosti je třeba fungicid aplikovat několik dní před infekcí rovnoměrně na všechny klasy [12]. Účinnost také závisí na průběhu počasí [13], virulenci patogenních kmenů a především na komplexu přítomných hub [1]. Jednotlivé druhy rodu *Fusarium* vykazují specifickou citlivost vůči účinným látkám: triazoly jsou vysoce účinné na *F. graminearum*, strobiluriny na *F. avenaceum*. Triazoly sice vykazují vysokou účinnost na *F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. avenaceum*, ale mnohem nižší na *Microdochium nivale* (teleomorfa *Monographella nivalis*) [14].

Nejen citlivost k fungicidům, ale i schopnost produkovat mykotoxiny se u jednotlivých druhů rodu *Fusarium* liší, a proto je nezbytná jejich identifikace a kvantifikace [15, 8]. Klasické metody identifikace jsou časově i odborně náročné, naopak relativně rychlé, vysoce citlivé a specifické jsou metody PCR (Polymerase Chain Reaction) a lze je automatizovat [15]. Ke kvantifikaci jednotlivých druhů r. *Fusarium* v infikovaných rostlinných pletivech se využívá real-time PCR (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction) [16, 15].

Cílem práce bylo stanovit vliv odrůdy/linie, fungicidního ošetření a lokality na intenzitu přirozené infekce obilí jarního ječmene houbami r. *Fusarium* pomocí molekulární metody real-time PCR.

2 MATERIÁL A METODY

Blokový pokus se třemi opakováními byl realizován v roce 2010 na lokalitě Žabčice (179 m n. m.) a Kroměříž (220 m n. m.). Do pokusu bylo zařazeno 14 odrůd/linií jarního ječmene – pluchaté – Aksamit, Blaník, Bojos, Jersey, Kangoo, Prestige, Radegast, Sebastian, Malz, Tolar a bezpluché – KM 1057, AF Lucius, KM 2084 a KM 2283 ve dvou variantách: fungicidně ošetřená – konvenční (osivo namořeno přípravkem Raxil TNT, během vegetace fungicidy Archer Top 400 EC a Fandango 200 EC) a bez ošetření (nemořené osivo, v průběhu vegetace byly použity pouze herbicidy). Fungicid Archer Top 400 EC (0,9 l.ha⁻¹) byl aplikován ve vývojové fázi ječmene DC 34 a přípravek Fandango 200 EC (1,2 l.ha⁻¹) ve fázi DC 58–59. Oba přípravky byly aplikovány formou postřiku. Sklizeň obilí byla provedena 28. 7. 2010 pomocí sklízecí mlátičky (Osevan).

Raxil TNT (účinná látka: tebuconazole + triazoxide)

Archer Top 400 EC (účinná látka: fenpropidin + propiconazole)

Fandango 200 EC (účinná látka: fluoxastrobin + prothioconazole)

2.1 Izolace DNA z obilí ječmene

Vzorek obilí každé odrůdy (100 g) byl rozemlet v laboratorním mlýnku a následně 1 g homogenizátu opět homogenizován v třetí misce pomocí tekutého N₂. Ze vzorku (100 mg) byla následně izolována DNA pomocí kitu DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagene, Německo) a stanovena její kvalita a kvantita pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000c.

2.2 Izolace DNA z mycelia hub

K vytvoření standardu a kalibračních křivek pro kvantifikaci jednotlivých druhů r. *Fusarium* v obilí ječmene byla izolována DNA z izolátů čistých kultur (Sbírka fytopatogenních hub, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně) pěstovaných na bimbordo-dextrózovém agaru (PDA) v Petriho miskách (9 mm). DNA byla izolována ze 100 mg mycelia stejným způsobem jako u obilí.

2.3 PCR reakce

Reakční směs pro PCR byla složena z následujících komponentů: QuantiTect SYBR® Green PCR Kits (Qiagen, Německo) 12,5 µl, forward primer 0,8 µl (50 µM), reverse primer 0,8 µl (50 µM), Uracil-DNA

carcinogenic potential [1, 2, 4]. Mycotoxins can also create technological problems during brewing, particularly at malting (inhibition of synthesis of enzymes) or fermentation (inhibition of yeast growth) [6]. These toxins are chemically and thermally stable [5]. In cereals, namely trichothecenes (first of all deoxynivalenol DON and nivalenol NIV) and their derivatives, T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol and neosolaniol, occur [7, 5]. Important sources of trichothecenes are *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, and *F. equiseti* (teleomorph *G. intricans*) [8]. *F. graminearum*, *F. culmorum*, and *F. poae* produce deoxynivalenol [9] that also passes into beer and together with oxalates they contribute to overfoaming (so-called gushing). *F. graminearum* and *F. culmorum* are at the same time the most significant producers of zearalenon (ZEA) and its derivatives. *F. avenaceum* (teleomorph *G. avenacea*) produces trichothecenes but also for example enniatins and moniliformins [10].

The above mentioned fungi that cause FEB of barley, can be reduced by use of a suitable fungicide. The efficiency of the fungicidal treatment is variable and hardly predictable. It depends not only on the efficient substance but also on the manner and term of the fungicide application [1, 11]. If the fungicide treatment is to be efficient, it must be used several days prior to the assault and completely to all ears [12]. The efficiency also depends on the meteorological conditions [13], virulence of pathogens and first of all complex of fungi present on the plots [1]. Each fungi causing FEB has specific fungicide sensitivity:

F. graminearum is sensitive to triazols, *F. avenaceum* is more susceptible to strobilurins.

F. graminearum, *F. culmorum*, and *F. avenaceum* are much more sensitive to triazols than *Microdochium nivale* (teleomorph *Monographella nivalis*) [14].

Besides fungicide sensitivity, also capacity to produce mycotoxins in particular *Fusarium* species is different, therefore their identification and quantification is necessary [15, 8]. Classical methods of identification are time and professionally demanding compared to the PCR methods which are relatively fast, highly sensitive and specific and can be automated [15]. The real-time PCR (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction) is used for the quantification of the individual *Fusarium* species in infected plant tissues [16, 15].

The aim of this study was to determine the effect of variety/line, fungicide treatment and locality on the intensity of natural infection of spring barley grains with fungi of *Fusarium* sp using the molecular real-time PCR method.

2 MATERIAL AND METHODS

The block trial with three replications was conducted in the locality Žabčice (179 m above sea level) and Kroměříž (220 m above sea level) in 2010. The experiment comprised 14 varieties/lines of spring barley – hulled – Aksamit, Blaník, Bojos, Jersey, Kangoo, Prestige, Radegast, Sebastian, Malz, Tolar and hulless – KM 1057, AF Lucius, KM 2084, and KM 2283 in two variants: with fungicide treatment – conventional (seed treated with the fungicide Raxil TNT, during vegetation with the fungicides Archer Top 400 EC and Fandango 200 EC) and without treatment (non-treated seed, during vegetation only herbicides were used). The fungicide Archer Top 400 EC (0.9 l.ha⁻¹) was applied in the barley development phase DC 34 and Fandango 200 EC (1.2 l.ha⁻¹) in the phase DC 58–59. Both fungicides were sprayed. Grains were harvested on July 28 2010 with a threshing harvester (Osevan).

Raxil TNT (efficient substance: tebuconazole + triazoxide)

Archer Top 400 EC (efficient substance: fenpropidin + propiconazole)

Fandango 200 EC (efficient substance: fluoxastrobin + prothioconazole)

2.1 DNA isolation from barley grains

A 100 g sample (grains) of each variety was homogenized in a laboratory mill and subsequently 1 g of the sample was homogenized in a mortar with liquid N₂. Subsequently from the sample (100 mg) DNA was isolated using the DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagene, Germany) and its quality and quantity was assessed with the spectrophotometer NanoDrop 2000c.

2.2 DNA isolation from fungi mycelia

To form the standard and calibration curves for quantification of the individual *Fusarium* species in barley grains, DNA was isolated from

glycosylase (2 U), H₂O 9,65 µl, genomická DNA 1 µl (10 ng). Pro *F. graminearum*, *F. poae* a *F. avenaceum* byly pro amplifikaci vybrány páry primerů publikované Nicolaisenem [15], pro *F. culmorum* primery publikované v [17]. Reakční podmínky byly zvoleny dle metodik ve výše citovaných publikacích. PCR reakce každého vzorku probíhaly v objemu 25 µl reakční směsi (3 opakování). Do reakce byla zařazena pozitivní kontrola (standard) a negativní kontrola (bez templátu). Genomická DNA analyzovaných vzorků obilí byla před amplifikací vyrovnána na stejnou koncentraci (10 ng.µl⁻¹). Kalibrační křivka byla vytvořena ze standardů jednotlivých druhů hub, jejichž DNA byla ředěna (10×, 100×, 1 000× a 10 000×). Reakce probíhala v iCycleru (Biorad).

Relativní kvantifikace jednotlivých druhů *r. Fusarium* byla stanovena na základě hodnot C_T . Jako vnitřní kalibrátor byl brán vzorek 100× ředěné DNA z mycelia odpovídajícího druhu.

2.4 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení hodnot získaných při relativní kvantifikaci byla použita vícefaktorová analýza rozptylu a mnohonásobné porovnávání (Tukey-HSD; $\alpha = 0,05$) v programu UNISTAT 5.1. (Unistat Ltd., London, UK). V grafech uvedených ve výsledcích představuje každé písmeno jinou hladinu statistické významnosti při $p=0,05$.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

V roce 2010 byly druhy *r. Fusarium* identifikovány v 75 % vzorků neošetřených fungicidy a v 53 % ošetřených fungicidy. I když četnost výskytu druhů *r. Fusarium* byla zdánlivě vysoká, intenzita napadení byla velmi nízká. Rod *Fusarium* byl v celkové mykoflóře zastoupen pouze 4,15 %. Nejčastěji detekovanými druhy bylo *F. avenaceum* a *F. graminearum*. Složení druhové spektra se může lišit v rámci roku a lokality. Hýsek [18] uvádí na ječmeni v České republice jako nejčastěji izolované druhy *F. culmorum* a *F. poae*. Schilling [19] uvádí jako nejčastější druh v Německu *F. graminearum* a v Holandsku *F. avenaceum*. Limitujícími faktory pro výskyt a rozšíření druhů rodu *Fusarium* jsou kromě meteorologických podmínek i četné agrotechnické faktory (termín výsevu, oševní sled, termín aplikace fungicidu, účinná látka aj.). Na celkové mikrofóře testovaných obilí ječmene v našem materiálu se podílely druhy z 14 rodů patogenních hub. Na všech vzorcích z obou lokalit i variant ošetření byly nejčastěji izolovány saprofytické druhy *r. Alternaria* a *Cladosporium*.

Výskyt druhů *r. Fusarium* v obilích obilnin lze stanovit různými metodami, přičemž se obvykle stanoví podíl napadených obilí a zastoupení jednotlivých druhů. K posouzení možného rizika je ale nutné stanovit i kvantitativní zatížení. Ke kvantifikaci jednotlivých druhů *r. Fusarium* v infikovaných pletivech byla použita metoda real-time PCR.

Intenzita infekce obilí odrůdy Radegast, která byla nejvíce napadena houbou *F. graminearum*, se statisticky průkazně lišila od inten-

pure cultures (Collection of phytopathogenic fungi of the Crop Research Institute Praha-Ruzyně) grown on potato-dextrose agar (PDA) in Petri dishes. DNA was isolated from 100 mg of mycelia using the same method as in grains.

2.3 PCR reaction

Reaction mixture for PCR was prepared from following components: QuantiTect SYBR® Green PCR Kits (Qiagen, Germany) 12.5 µl, forward primer 0.8 µl (50 µM), reverse primer 0.8 µl (50 µM), Uracil-DNA glycosylase (2 U), H₂O 9.65 µl, genomic DNA 1 µl (10 ng). For amplification of *F. graminearum*, *F. poae* and *F. avenaceum*, primer pairs published by Nicolaisenem [15], were selected, for *F. culmorum*, primers published by Schilling [17]. Reaction conditions were chosen according to the methods cited in the above mentioned studies. PCR reaction of each sample was performed in a volume of 25 µl per reaction mixture (3 repetitions). Positive control (standard) and negative control (without template) were included in the reaction. Prior to amplification, genomic DNA of the analyzed samples of grains was equaled to the same concentration (10 ng.µl⁻¹). Calibration curve was formed from the standards of the individual fungi, DNA of which was diluted (10×, 100×, 1 000× and 10 000×). Reaction was performed in the iCycler (Biorad).

Relative quantification of the individual *Fusarium* species was determined on the basis of C_T values. A sample of 100× diluted DNA from the mycelium of the relevant species was taken as an inner calibrator.

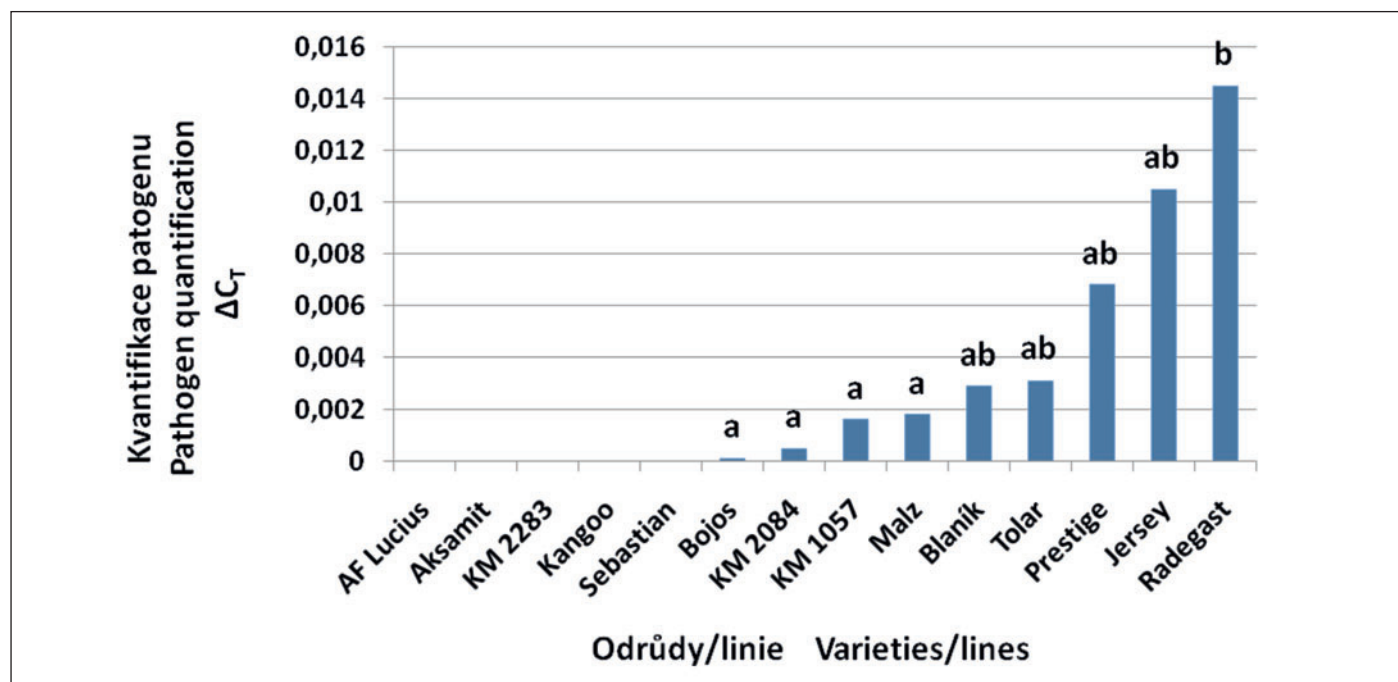
2.4 Statistical evaluation

Multifactorial analysis of variance and multiple comparisons (Tukey-HSD; $\alpha = 0.05$)

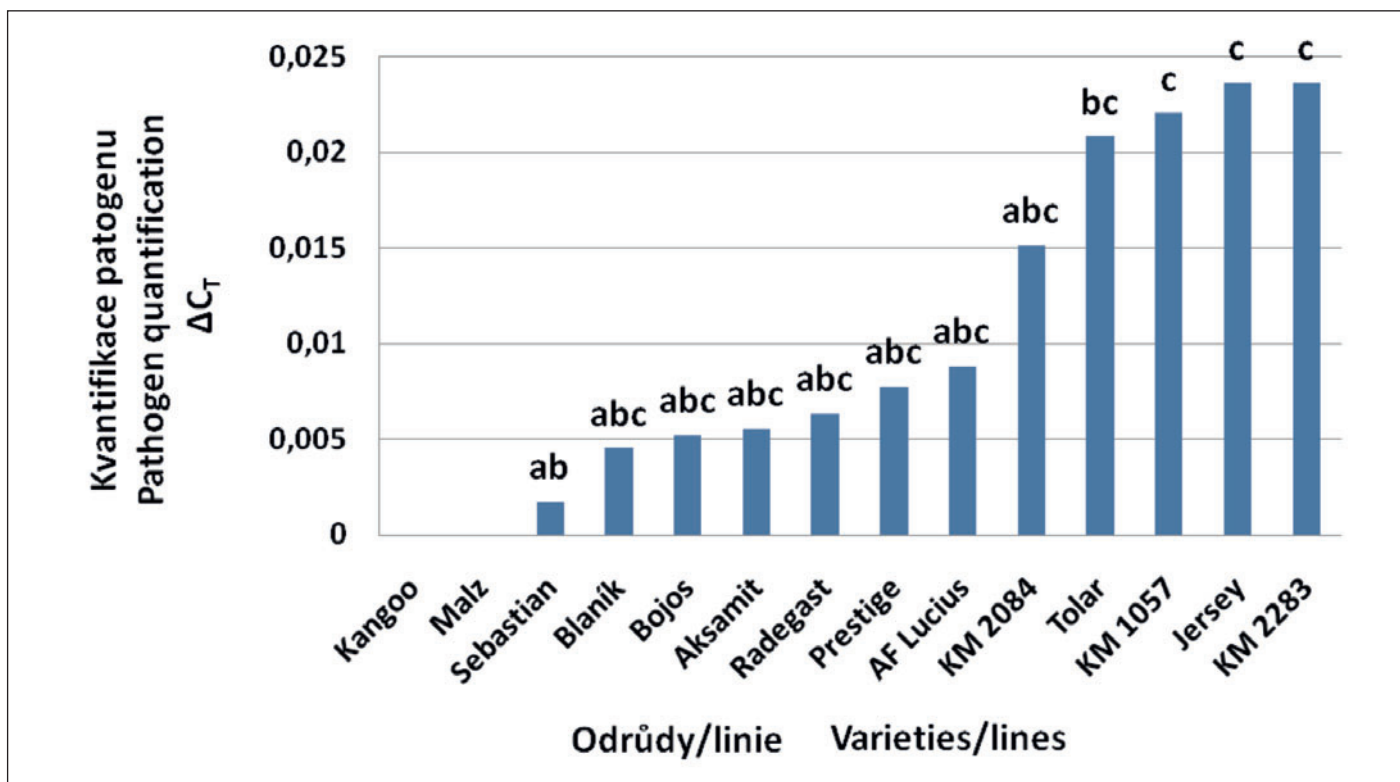
program UNISTAT 5.1 were applied for the statistical evaluation of values obtained at relative quantification. In figures given in results, each letter represents another level of statistical significance at $p=0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

In 2010 *Fusarium* species were identified in 75% of samples without fungicides and 53% of fungicide treated samples. Although the occurrence of species of *Fusarium* was relatively high, intensity of infestation was very low. *Fusarium* species was represented only by 4.15% in total mycoflora. The most frequently detected species were *F. avenaceum* and *F. graminearum*. It is evident that the spectrum of species may differ within a year and locality. According to Hýsek [18] the most often isolated species barley in the Czech Republic are *F. culmorum* and *F. poae*. Schilling [19] gives *F. graminearum* as the most frequently occurring species in Germany and *F. avenaceum* in



Obr. 1 Intenzita infekce obilí odrůd/linií ječmene patogenem *F. graminearum* / Fig. 1 *F. graminearum* infection of grains of barley varieties/lines

Obr. 2 Intenzita infekce obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. avenaceum* / Fig. 2 *F. avenaceum* infection of grains of barley varieties/lines

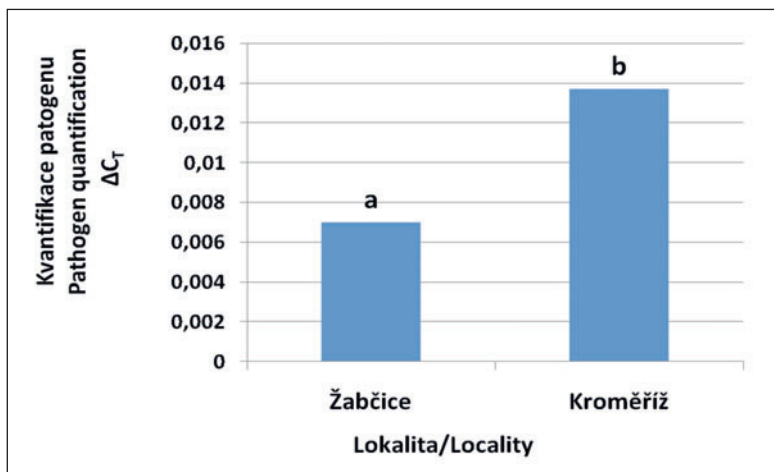
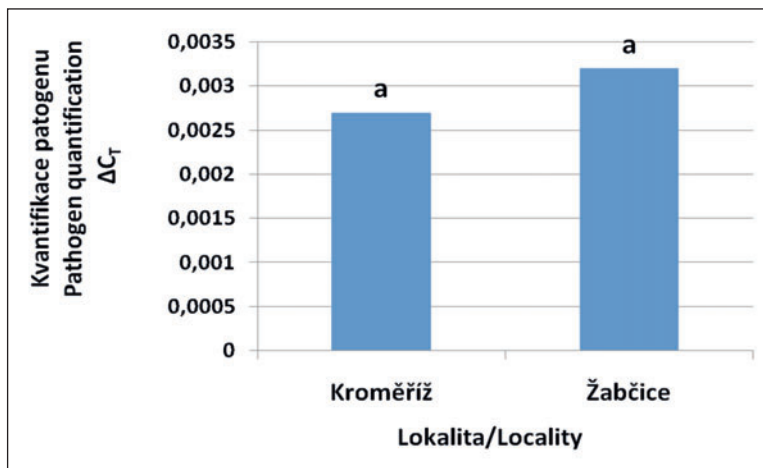
zity infekce obilek odrůd/linií Bojos, KM 2084, KM 1057 a Malz. U ostatních odrůd/linií ječmene nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. U odrůd/linií AF Lucius, Aksamit, KM 2283, Kangoo, Sebastian nebyla infekce obilek patogenem *F. graminearum* zjištěna (obr. 1).

U většiny odrůd/linií ječmene nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v intenzitě infekce obilek patogenem *F. avenaceum*. Pouze odrůdy/linie KM 1057, Jersey, KM 2283, u kterých byla zjištěna nejvyšší infekce obilek, se statisticky významně lišily od ostatních (Kangoo, Malz a Sebastian). Odrůdy Kangoo a Malz nebyly houbou *F. avenaceum* infikovány (obr. 2).

V úrovni infekce obilek odrůd/linií houbou *F. poae* nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Infikovány byly obilky pouze odrůd Radegast a AF Lucius.

Mezi lokalitami byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v intenzitě infekce obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. avenaceum*. Vyšší intenzita infekce obilek touto houbou byla zjištěna na lokalitě Kroměříž (obr. 3).

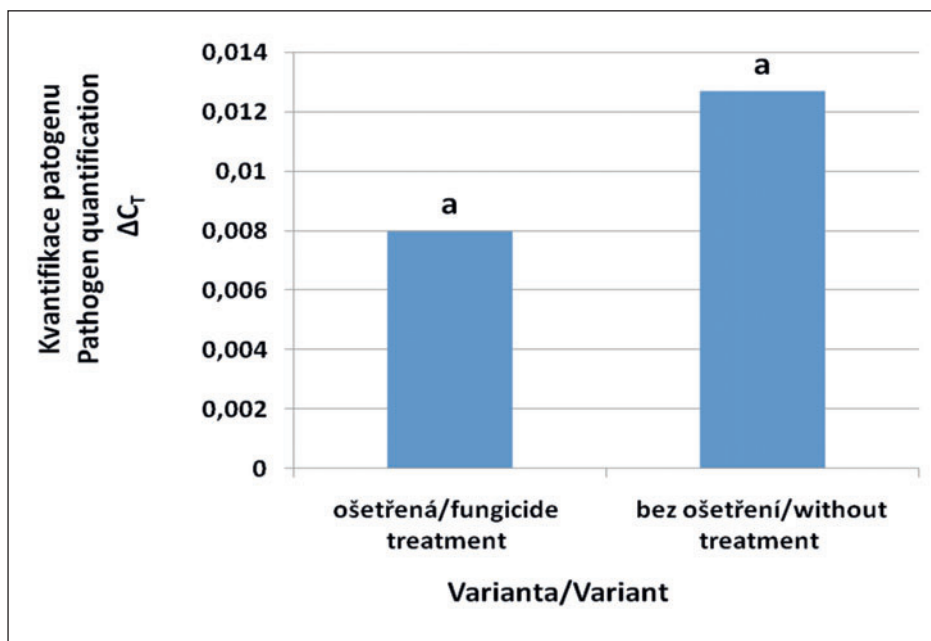
U patogenu *F. graminearum* nebyl prokázán mezi lokalitami rozdíl v infekci obilek odrůd/linií, i když vyšší infekce

Obr. 3 Vliv lokality na infekci obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. avenaceum* / Fig. 3 The effect of the locality on *F. avenaceum* infection of barley grainsObr. 4 Vliv lokality na infekci obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. graminearum* / Fig. 4 The effect of the locality on *F. graminearum* infection of barley grains

Holland. Limiting factors for the occurrence and distribution of *Fusarium* species are weather conditions and numerous agrotechnical factors (term of sowing, sowing sequence, term of fungicide application, efficient substance, etc.). Total microflora of the tested barley grains in the material under study was represented by 14 species of pathogenic fungi. Species *Alternaria* and *Cladosporium* were the most frequently isolated in all samples from both localities and variants of treatment.

The occurrence of *Fusarium* species in cereal grains can be assessed with various methods assessing the rate of infected grains and representation of the individual species. However, for the evaluation of a possible risk it is also necessary to determine quantitative loading. The real-time PCR technique was used for quantification of the individual *Fusarium* species in the infected tissues.

Infection of grains of the variety Radegast which were most infected by fungi *F. graminearum* differed statistically significantly from the infection of the grains of the varieties Bojos, KM 2084, KM 1057, and Malz. In the other barley varieties/lines no statistically significant differences were found. In several varieties/lines (AF Lucius, Aksamit, KM 2283, Kan-



Obr. 5 Vliv fungicidního ošetření na infekci obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. avenaceum* / Fig. 5 The effect of fungicide treatment on barley grains infection by *F. avenaceum*

obilek byla zjištěna na lokalitě Žabčice (obr. 4). *F. poae* se vyskytlo pouze ve dvou vzorcích na lokalitě Žabčice.

I když u neošetřené varianty byla zaznamenána vyšší infekce obilek *F. avenaceum*, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v infekci obilek odrůd/linií ječmene mezi fungicidně ošetřenou a neošetřenou variantou (obr. 5). *F. avenaceum* je méně citlivé k aplikovaným účinným látkám nebo ošetření nebylo provedeno ve správném termínu.

V intenzitě infekce obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. graminearum* byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi fungicidně ošetřenou a neošetřenou variantou. Vyšší infekce obilek byla zaznamenána u chemicky neošetřené varianty (obr. 6), což potvrzuje Simpson *et al.* [14], který uvádí, že *F. graminearum* je citlivé na triazoly.

Mezi ošetřenou a neošetřenou variantou byl zjištěn rozdíl v infekci obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. poae*. Vyšší infekce obilek byla zjištěna u neošetřené varianty. Vzhledem k infekci pouze dvou vzorků nebylo provedeno statistické vyhodnocení. Ukázalo se tedy, že i *F. poae* reagovalo na použité fungicidní látky.

4 ZÁVĚR

Pomocí real-time PCR metody byly identifikovány a kvantifikovány čtyři nejvýznamnější druhy r. *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. poae* a *F. culmorum*) vyskytující se na obilkách odrůd/linií jarního ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v České republice. Nejčastěji bylo identifikováno *F. avenaceum*, a to v 19 vzorcích (33,9 %), *F. graminearum* v 14 vzorcích (25 %). Přítomnost často uváděných druhů v obilkách ječmene, tj. *F. poae* (pouze na lokalitě Kroměříž ve dvou vzorcích odrůd Radegast a AF Lucius) a *F. culmorum* (nebylo prokázáno v žádném vzorku), nebyla potvrzena. Mezi odrůdami/liniemi ječmene byly u několika vzorků zjištěny statisticky významné rozdíly v intenzitě infekce obilek kvantifikovanými patogeny. Mezi lokalitami byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl pouze u druhu *F. avenaceum* (vyšší napadení na lokalitě Žabčice). Statisticky významný rozdíl v intenzitě infekce obilek mezi variantou fungicidně ošetřenou a neošetřenou byl zjištěn pouze u patogenu *F. graminearum*. Varianty ošetřené fungicidy vykazovaly obecně kvantitativně nižší výskyt patogenů rodu *Fusarium*, což napovídá o účinnosti chemického ošetření.

goo, Sebastian) grains infection by *F. graminearum* was found (Fig. 1).

In most barley varieties/lines, statistically significant differences were not found in grains infection by *F. avenaceum*. Statistically significant differences were found only in the varieties/lines KM 1057, Jersey, KM 2283, and Kangoo, Malz and Sebastian. The varieties Kangoo and Malz were not infected by fungus *F. avenaceum* (Fig. 2).

No statistically significant differences were found *F. poae* infection of grains. Only the grains of the varieties Radegast and AF Lucius were infected.

Among the localities, a statistically significant difference was found in barley grains infection by *F. avenaceum*. Higher grains infection by this fungus was detected in the locality Kroměříž (Fig. 3).

In pathogen *F. graminearum* no difference in grains infection was proven in the localities although a higher grains infection was determined in the locality Žabčice

(Fig. 4). *F. poae* occurred only in two samples in the locality Žabčice.

Although in the non-treated variant, higher grains infection by *F. avenaceum* was recorded, no statistically significant difference was determined in grains infection of

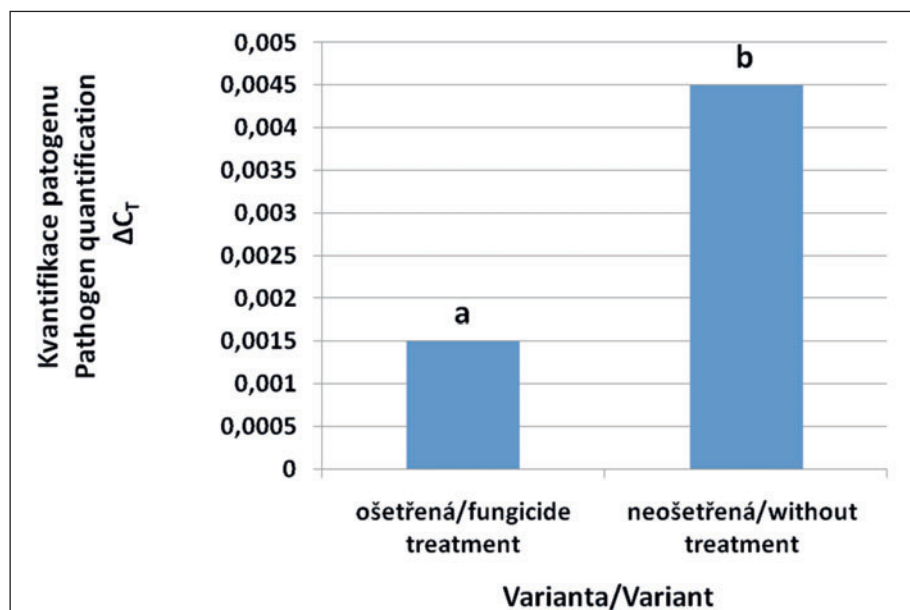
barley varieties/lines between the variant with and without fungicide treatment (Fig. 5). *F. avenaceum* is either less sensitive to the applied efficient substances or the treatment was not conducted in a proper term.

In grains infected by *F. graminearum*, statistically significant difference between the variants with and without the fungicide treatment was found in infection of grains of barley varieties/lines. Higher grains infection was recorded in chemically non-treated variant (Fig. 6), as confirmed by Simpson [14] who claimed that *F. graminearum* was sensitive to triazols.

Between the treated and non-treated variant, the difference in barley grains infection by the pathogen *F. poae* was found but as only two samples were infected, statistical evaluation was not performed. Higher grains infection was found in the non-treated variant. It means that also *F. poae* reacted to the fungicide substances applied.

4 CONCLUSIONS

Using the real-time PCR method the most significant *Fusarium* species (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. poae* and *F. culmorum*)



Obr. 6 Vliv fungicidního ošetření na infekci obilek odrůd/linií ječmene patogenem *F. graminearum* / Fig. 6 The effect of fungicide treatment on barley grains infection by *F. graminearum*

Poděkování:

Příspěvek byl zpracován s podporou projektu MŠMT 1M0570 – Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele.

were identified and quantified, which occur on barley grains in the Czech Republic. *F. avenaceum*, was the most frequently identified, in 19 samples (33.9 %), *F. graminearum* in 14 samples (25 %). The presence of frequently given fungi, i.e. *F. poae* (only in the locality Kroměříž in two samples of the varieties Radegast and AF Lucius) and *F. culmorum* (not proven in any sample) was not confirmed. Generally, no statistically significant differences were found in barley infection by the studied pathogens in the varieties/lines (with the exception of several samples). Among the localities, statistically significant difference was only in *F. avenaceum* (higher infestation in the locality Žabčice). Statistically significant difference between the variant with fungicide treatment and non-treated variant was found only in the pathogen *F. graminearum*. In the fungicide treated variant generally a lower grains infection by *Fusarium* species was recorded.

Acknowledgements

This study was funded by the project 1M0570 – 70 (Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop) of the MEYS.

LITERATURA / REFERENCES

1. Parry, D. W., Jenkinson, P., Mcleod, L.: Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals- a review. *Plant Pathology* **44**, 1995, 207–238.
2. Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., Joyce, D.: Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**, 1998, 17–37.
3. Bai, G. et Shaner, G.: Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant. Dis.* **80**, 1996, 975–979.
4. D'Mello, J. P. F., Placinta, C., M., Macdonald, A., M., C.: Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**, 1999, 183–205.
5. Desjardins, A. E.: *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*. APS Press, 2006, 260 s.
6. Bakan, B. 1998. Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*, Thèse INA-PG, 150 pp.
7. Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R. C., Gosman, N. E., Simpson, D. R., Thomsett, M., Wilson, A. H.: Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 2003, 691–703.
8. Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., Gonzáles-Jaén M., T.: PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 2005, 562–568.
9. Krmenčík, P., Kysilka, J.: Jedy nižších hub (mykotoxiny) [online]. [cit. 20. 10. 2008]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/obsah.php>, 2007.
10. Langseth, W., Bernhoft, A., Rundberget, T., Kosiak, B., Gareis, M.: Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* **144**, 1998, 103–113.
11. Homdork, S., Fehrmann, H., Beck, R.: Effects of field application of tebuconazole on yield, yield components and the mycotoxin content of *Fusarium*-infected wheat grain. *J. Phytopathol.* **148**, 2000, 1–6.
12. Liggitt, J., Jenkinson, P., Parry, D. W.: The role of saprophytic microflora in the development of *Fusarium* ear blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum*. *Crop Prot.* **16**, 1997, 679–685.
13. Mesterhazy, A., Bartok, T.: Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **49**, 1996, 181–198.
14. Simpson, D. R., Weston, G. E., Turner, J. A., Jennings, P., Nicholson, P.: Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 2001, 421–431.
15. Nicolaisen, M., Supronienė, S., Nielsen, L. K., Lazzaro, I., Spliid, N. H., Justesen, A. F.: Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* **76**, 2009, 234–240.
16. Niessen, L.: PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiology* **119**, 2007, 38–46.
17. Schilling, A. G., Möller, E., M., Geiger, H. H.: Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* **86**, 1996, 515–522.
18. Hýsek, J., Váňová, M., Hajšlová, J., Radová, Z., Koutecká, J., Tvářůžek, L.: Fusariose of Barely with Emphasis on the Kontent of Trichothecenes. *Plant protection Science*, **35**, 1999, 96–102.
19. Schilling, A. G., Möller, E., M., Geiger, H. H.: Molecular differentiation and diagnosis of the cereal pathogens *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. In: Logrieco, A., Seifert, K. A., Leslie, J. F., Petrini, O., Petrini, L. E. Editors, Sydowia, Special Issue, Verlag Ferdinand Berger, Horn, 1997, 71–82.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 3. 6. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 20. 6. 2011

PIVOVARSKÝ KALENDÁŘ 2012

vyjde v listopadu 2011

Cena: 170 Kč (vč. DPH)

Množstevní slevy:

25–49 ks: 150 Kč

50 a více ks: 130 Kč

Objednávky: boudova@beerresearch.cz