

Vliv inokulace houbou *Fusarium culmorum* na obsah deoxynivalenolu a výnosové znaky u dihaploidních linií jarního ječmene

(Effect of *Fusarium culmorum* inoculation on deoxynivalenol content and yield traits in spring barley doubled haploids)

Nesvadba Zdeněk, Horáčková Simona, Tvarůžek Ludvík, Polišínská Ivana,
Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž

Souhrn

Infekce ječmene některými druhy rodu *Fusarium* způsobuje zhoubnou chorobu označovanou jako fuzáriové vadnutí klasů, jejímž výsledkem je pokles výnosu a snížení kvality zrna ječmene. Cílem práce bylo analyzovat reakci dihaploidních linií (DH) jarního ječmene k fuzáriovému vadnutí klasů. DH linie byly získány metodou androgenese *in vitro* po hybridizaci linie Zao Zhou 3 (dvouřadá, středně odolná) a linie PI 383933 (šestiřadá, náchylná). DH linie a výchozí rodičovské komponenty byly uměle inokulovány v polních podmínkách suspenzí konidií *Fusarium culmorum* – izolát FC-417/02. Bylo provedeno vizuální hodnocení choroby po inokulaci a následně byl analyzován obsah deoxynivalenolu (DON) a stanoveno procento klíčivých a infikovaných zrn na papírových roládách. Byly studovány vlivy způsobené infekcí *Fusarium culmorum* na výnosotvorné znaky. Obsah deoxynivalenolu se u inokulovaných dihaploidů pohyboval v rozmezí od 5,33 do 46,44 mg.kg⁻¹. U inokulovaných rostlin byla zjištěna redukce výnosu, hmotnost tisíce zrn a podílu zrna na sítě 2,5 mm.

Klíčová slova: jarní ječmen, fuzáriové vadnutí klasů, deoxynivalenol, výnos, dihaploidní linie, *Fusarium culmorum*

Summary

Infection of barley by several species of *Fusarium* causes a destructive disease known as Fusarium head blight (FHB), results in reduced of yield and decrease of barley grain quality. Objectives of this study were analysed spring barley doubled haploid lines (DH) for their responses to Fusarium head blight. DH lines were derived by androgenesis *in vitro* after hybridisation of line Zao Zhou 3 (2row, middle resistant) and PI 383933 (6row, susceptible). DH lines and parental cultivars were artificially inoculated with conidial suspension of *Fusarium culmorum*, FC-417/02 isolate under field conditions. Visual observations of disease after inoculation followed by analysis of deoxynivalenol (DON) and the percentages of germinating and infected grains on paper rolls were checked. Effects of *Fusarium culmorum* infection on yield traits were studied. The deoxynivalenol content of inoculated doubled haploids ranged from 5.33 to 46.44 mg.kg⁻¹. In the inoculated plants was observed a reduction of yield, 1000 kernel weight and decrease in the kernel fraction 2.5 mm.

Key words: spring barley, Fusarium head blight, deoxynivalenol, yield, doubled haploid lines, *Fusarium culmorum*

Úvod

Houby rodu *Fusarium* jsou významnými patogeny většiny zemědělských plodin. Po dlouhé období bylo fuzáriové vadnutí klasů (Fusarium head blight, FHB) minoritním, sporadicky se vyskytujícím onemocněním. V posledních letech se však rychle stalo významným faktorem eliminujícím výnosy a kvalitu obilovin v mnoha pěstitelských oblastech světa a nesoucí s sebou velké ekonomické ztráty. Nejvíce nebezpečným aspektem této choroby je kontaminace zrna mykotoxiny (Ma a kol., 2009). Nejvýznamnějšími producenty mykotoxinů jsou druhy *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* a *F. verticillioides*. Jejich toxické produkty tvoří různorodou skupinu mnoha desítek látek, z nichž nejznámějšími a nejlépe sledovanějšími jsou deoxynivalenol, nivalenol, T-2 a HT-2 toxin, zearalenon a fumonisiny (Polišínská, 2008).

Vhodné podmínky pro výskyt a šíření fuzarióz představuje kombinace vyšší teploty a vysoké vzdušné vlhkosti. Dalšími faktory, které přispívají k rozvoji fuzarióz, jsou nevhodné předplodiny (zejména kukuřice či jiné obilniny), pěstování později kvetoucích odrůd, hustý a poléhavý porost, stres působící na rostlinu (předchozí poškození přispívá k rozvoji infekce) či absence použití mořeného osiva a vhodných fungicidů (Ort, 2004).

Z literatury je známo, že počet prací zabývající se fuzariózami u pšenice převyšuje počet výzkumných studií u ječmene. Je to z toho důvodu, že pšenice má mnohem větší hospodářský význam jako obilovina, ale i proto, že fuzariózy způsobují větší hospodářské škody na pšenici než na ječmeni. Obě plodiny jsou napadány těmi stejnými fuzáriovými patogeny, ale existují rozdíly v jejich reakci na napadení. Obecně lze říci, že ječmen je méně náchylný k FHB než pšenice. Pokud se týká výnosu, tak fuzariózy ovlivňují více výnos pšenice než ječmene, na druhou stranu je vyšší akumulace mykotoxinů u ječmene a to z důvodů existence obalových částí – pluch a plušek, které jsou součástí ječného zrna až do doby konečného využití (Steffenson, 2003).

V minulém období se ve šlechtění ječmene v hojně míře využívaly dihaploidi, kteří umožňují urychlení procesu homozygotizace linií. Princip spočívá v převedení rostlin získaných z haploidních gamet na diploidní úroveň polyploidizací, takže každá dihaploidní rostlina je zcela homozygotní na všech lokusech (Chloupek, 2008). Populace dihaploidních linií získaných z F₁ generace reprezentuje náhodný výběr gamet z F₁ hybridů. Z tohoto důvodu jsou DH linie také dobrým materiálem pro genetické studie na kvantitativní a kvalitativní znaky (Adamski et al., 1999).

Tab. 1: Hodnocení napadení klasů fuzárií v poli, laboratorní hodnocení výskytu fuzárií v zrna na papírových roládách, stanovení obsahu deoxynivalenolu a vybrané výnosové znaky. Inokulovaná varianta

Odrůda / DH linie	Řad	Pol. hodn. (%)	Lab. test (%)	DON (mg.kg ⁻¹)	Výnos zrna (kg.2,5 m ²)	HTZ (g)	PPZ (%)
Zao Zhou 3	2	10	20	5,33	0,86	47,2	87,7
DH 47	2	8	0	26,73	0,95	40,1	82,3
DH 48	2	9	5	6,35	0,97	38,5	83,2
DH 8/03	2	13	4	6,83	0,90	38,4	74,1
DH 13/03	2	32	3	38,54	0,92	30,0	78,6
DH 18/03	2	7	6	22,25	0,86	37,1	86,9
PI 383933	6	40	5	19,38	0,98	31,6	78,9
DH 41	6	9	8	14,02	0,86	32,6	78,9
DH 55	6	38	14	44,79	0,96	27,6	78,9
DH 9/03	6	20	7	22,27	0,90	31,6	72,6
DH 11/03	6	12	22	22,75	0,73	26,6	74,6
DH 14.1/03	6	25	0	43,42	1,11	40,2	84,2
DH 14.2/03	6	7	5	46,44	0,82	33,7	82,9
DH 17/03	6	9	4	45,61	1,09	27,0	77,7

Cílem předložené práce bylo analyzovat DH linie jarního ječmene s ohledem na napadení klasů, obsahu deoxynivalenolu, redukci výnosu zrna, hmotnosti tisíce zrn (HTZ) a podílu předního zrna (PPZ) po očkovaní houbou *Fusarium culmorum* v polních podmínkách.

Materiál a metody

Pro experimentální práci byly použity dva parentální genotypy ječmene jarního: dvouřadá odrůda Zao Zhou 3 s deklarovanou střední rezistencí a šestiřadá linie PI 383933 s deklarovanou náchylností vůči klasovým fuzariózám, které byly získány z kolekce genetických zdrojů jarního ječmene Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. Dále byl testován soubor 12 dihaploidních linií (5 dvouřadých a 7 šestiřadých) vzniklých androgenezí *in vitro* z F₁ generace křížení Zao Zhou 3 x PI 383933 na pracovišti ÚEB AV ČR Olomouc (Vagera a Ohnoutková, 1993).

1) Polní pokusy

Pokusy byly založeny a vedeny metodou znárodněných dílců na pozemcích firmy Agrotest fyto, s.r.o. Každý genotyp byl vyset ve dvou opakováních (inokulovaná a neinokulovaná varianta) o rozměrech parcely 1 m². Předplodinou byla cukrovka. Pokus byl vyset dne 8. 4. 2008. Parcely byly v době plného kvetení (DC 65) uměle inokulovány suspenzí konidií *Fusarium culmorum* (izolát FC-417/02). V závislosti na odlišných růstových fázích byly klasy ječmene infikovány vždy ve dvou termínech 5. 6. a 11. 6. 2008. Koncentrace inokula byla jednotně mikroskopicky adjustována na hodnotu 6 milionů konidií na 1 ml suspenze. K inokulaci parcel byla použita aplikační technika, která zajistila aplikaci stálého a pro celý pokus shodného množství inokula. Vizuální hodnocení bylo provedeno 21 dní po inokulaci – 27. 6. a 1. 7. 2008 dle stupnice Horsfall-Barretta, jako procentický podíl zaschlých klásků po napadení chorobou. V době plné zralosti bylo 15 klasů z každé parcely ostříháno a zrno bylo ručně vydoleno. Parcely byly dne 26. 7. 2008 sklizeny maloparcelovým kombajnem Osevan.

2) Posklizňové analýzy

a) Laboratorní testování na papírových roládách

Pro zjištění kontaminace ječmene jarního fuzárií byly provedeny analýzy sklizeného zrna na stupeň infekce prorostlé do zrna. Od každého vzorku bylo odebráno 2 x 100 zrn. Hodnocení bylo prováděno metodou podle Tvarůžek a kol. (2003).

b) Stanovení obsahu deoxynivalenolu

Stanovení obsahu deoxynivalenolu bylo prováděno kvantitativní imunoenzymatickou metodou ELISA. Byly používány kity RIDASCREEN FAST DON (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, SRN), které jsou schváleny AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Pro přípravu vzorků, extrakci i vlastní stanovení byla dodržována metodika předepsaná výrobcem. Měření bylo prováděno na spektrofotometru MRX II (Dynex, USA), pro zpracování dat byl používán program Revelation (Dynex, USA).

Výsledky a diskuze

V polních pokusech s umělou inokulací *F. culmorum* na dihaploidních liniích a výchozích rodičovských genotypy jarního ječmene byla dosažena vysoká kontaminace DON, která se pohybovala v rozmezí od 5,33 mg.kg⁻¹ do 46,44 mg.kg⁻¹ (Tab. 1). U neinfikovaného kontrolního souboru stejných genotypů byl obsah DON výrazně nižší a pohyboval se v rozpětí 0,04 až 0,78 mg.kg⁻¹ (Tab. 2). DH linie získané z F₁ generace Zao Zhou 3 x PI 383933 v pokusu vykazovaly různý stupeň náchylnosti k *F. culmorum*. Tato variabilita se projevila například v kontaminaci zrna mykotoxinem v inokulované variantě, kde u dvouřadých linií DH 48 a DH 8/03 byla zaznamenána relativně nízká akumulace DON (6,35, respektive 6,83 mg.kg⁻¹), která se blížila hodnotě rodičovského genotypu Zao Zhou 3 (5,33 mg.kg⁻¹). Na druhé straně vykazovaly šestiřadá linie DH 17/03 a DH14.2/03 vysokou koncentraci DON (45,61, respektive 46,44 mg.kg⁻¹). Linie DH 14.2/03 byla současně genotypem s nejvyšší redukcí výnosotvorných znaků.

Testováním průkaznosti rozdílů mezi průměry u sledovaných znaků mezi infikovanou a neinfikovanou variantou bylo

Tab. 2: Hodnocení napadení klasů fuzárií v poli, laboratorní hodnocení výskytu fuzárií v zru na papírových roládách, stanovení obsahu deoxynivalenolu a vybrané výnosové znaky. Neinokulovaná varianta

Odrůda / DH linie	Řad	Pol. hodn. (%)	Lab. test (%)	DON (mg.kg ⁻¹)	Výnos zrna (kg.2,5 m ²)	HTZ (g)	PPZ (%)
Zao Zhou 3	2	0	4	0,04	0,91	48,7	89,0
DH 47	2	2	0	0,06	1,00	44,4	85,2
DH 48	2	10	0	0,06	1,03	41,9	84,0
DH 8/03	2	16	2	0,14	0,95	43,3	81,1
DH 13/03	2	4	4	0,45	0,97	41,6	80,5
DH 18/03	2	0	0	0,16	0,91	42,4	88,4
PI 383933	6	16	6	0,78	1,09	42,6	81,5
DH 41	6	0	0	0,20	0,94	40,7	82,6
DH 55	6	2	0	0,30	1,03	38,1	80,4
DH 9/03	6	6	0	0,14	0,99	39,7	77,7
DH 11/03	6	10	4	0,39	0,82	38,2	79,8
DH 14.1/03	6	12	6	0,13	1,23	41,9	85,6
DH 14.2/03	6	0	2	0,41	0,88	37,7	84,9
DH 17/03	6	0	2	0,57	1,18	37,5	80,0

zjištěno, že vysoce průkazné rozdíly byly zaznamenány u polního hodnocení napadení fuzárií, obsahem DON a hmotností tisíce zrn (Tab. 3). Průkazné rozdíly mezi variantami byly vypočteny u laboratorního testování na papírových roládách. Statisticky neprůkazné rozdíly byly nalezeny u výnosu zrna a podílu předního zrna na síť 2,5 mm.

Dihaploidní linie se lišily v redukci výnosových znaků po inokulaci *F. culmorum* (Tab. 4). Byly vypočteny vysoce průkazné rozdíly v redukci výnosu a hmotnosti tisíce zrn mezi

Tab. 3: Testování průkaznosti rozdílů mezi průměry u sledovaných znaků mezi inokulovanou a neinokulovanou variantou

	Inokulovaná	Neinokulovaná	Průkaznost
Polní hodnocení (%)	17	6	**
Laboratorní test (%)	7	2	*
Obsah DON (mg.kg ⁻¹)	23,17	0,27	**
Výnos zrna (kg.2,5m ²)	0,92	1,00	n
HTZ (g)	31,6	38,3	**
PPZ (%)	74,1	76,8	n
** P = 0,01; * P = 0,05; n = neprůkazné			

Tab. 4: Testování průkaznosti redukce výnosu, HTZ a PPZ inokulované varianty k neinokulované kontrole u 2řadých a 6řadých linií

	Dvouřadé	Šestiřadé	Průkaznost
Výnos	94,8	91,2	**
HTZ	88,3	79,0	**
PPZ	96,9	96,3	n
** P = 0,01; * P = 0,05; n = neprůkazné			

dvouřadými a šestiřadými liniemi. Vyšší propad byl v obou znacích zaznamenán u šestiřadých linií. U výnosu to bylo 91,2 % k neinokulované kontrolní variantě, zatímco u dvouřadých DH linií jen 94,8 %. U hmotnosti tisíce zrn činil propad u šestiřadých linií 79,0 % k neinokulované variantě, zatímco u dvouřadých DH linií to bylo 88,3 %. Statisticky neprůkazné rozdíly pak byly nalezeny u znaku podíl předního zrna na síť 2,5 mm (96,3 %, respektive 96,9 %).

Korelační koeficienty mezi vybranými znaky u testovaných parentálních genotypů a DH linií jsou uvedeny v tabulce 5. Byly vypočteny vysoce průkazné korelace mezi obsahem DON a výsledky napadení zrna fuzárií v polních podmínkách a mezi obsahem DON a výsledky laboratorního testování zrna na papírových roládách. Vysoce průkazné korelace byly rovněž zjištěny mezi napadením zrna v polních podmínkách a hodnocením kontaminace zrna na papírových roládách. Průkazná a negativní korelace pak byla zaznamenána mezi obsahem DON a hmotností tisíce zrn. K obdobným výsledkům dospěli ve svých experimentech také Sýkorová a kol. (2002), Adamski a kol. (1999) nebo Chelkowski a kol. (2000), kteří ve své práci hodnotili náchylnost DH linií ječmene získaných metodou „H. bulbosum“ z F₁ generace po křížení dvouřadé

Tab. 5: Korelační koeficienty mezi vybranými znaky

	Obsah DON	Labor. test	Polní hodnocení
Laboratorní test	0,774**		
Polní hodnocení	0,644**	0,776**	
Výnos zrna	-0,161	-0,044	-0,070
Hmotnost 1000 zrn	(-0,427)*	-0,291	-0,182
Podíl zrna na síť 2,5 mm	-0,104	-0,101	-0,071
** P = 0,01; * P = 0,05			

odrády Maresi a šestiřadé odrůdy Pomo, a které byly následně inokulovány *F. culmorum*. Podobný vztah mezi napadením klasů a obsahem DON zjistili i Chrprová a kol. (2009) v pokusech s umělou inokulací *F. culmorum* u odrůd ozimé pšenice registrovaných v ČR.

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že dvouřadé DH linie vykazovaly v našich experimentech lepší odolnost vůči napadení fuzárií než DH linie šestiřadé. Podobné výsledky zaznamenal i Takeda (1990), který studoval odolnost hybridů ječmene ke *Gibberella zeae*. To může mít souvislost s morfoloogickou strukturou šestiřadého klasu a vyšší hustotou fertálních klásků. Tato stavba klasu může poskytnout příznivé podmínky pro infekci a šíření choroby než klas dvouřadého ječmene. Závěry, že dvouřadé ječmeny jsou obecně více rezistentní než šestiřadé publikovali také Steffenson (2003), Zhou a kol (1991), Chen a kol (1991).

Závěr

Tvorba rezistentních odrůd ječmene představuje neefektivnější využití nákladů v ochraně před FHB, zvláště jsou-li s tím využívána pěstební opatření, střídání plodin a aplikace fungicidů, která vedou ke snížení výskytu patogena. Přestože některé současné trendy v biotechnologii a molekulární biologii slibují urychlení tvorby odrůd s odolností k FHB, tak je třeba počítat s časovou náročností a obtížností z důvodu inkorporace rezistence k FHB, která je kontrolována mnoha geny s relativně malým účinkem. S přihlédnutím k obtížnostem zahrnujícím komplex genetických znaků rezistence k FHB ve šlechtitelských programech se dá předpokládat, že i tvorba rezistentní sladovnické odrůdy jarního ječmene bude ještě hodně dlouhá a náročná. Už vzhledem k tomu, že mnoho významných hospodářských a kvalitativních parametrů požadovaných pro sladovnický ječmen je kontrolováno polygenně a proto selekce a přenos těchto mnoha genů do „balíku“ označovaného jako odrůda sladovnického ječmene bude časově i pracovně náročná (Steffenson, 2003).

Přehled literatury

- ADAMSKI, T., CHELKOWSKI, J., GOLIŃSKI, P., KACZMAREK, Z., KOSTECKI, M., PERKOWSKI, J., SURMA, M., WIŚNIEWSKA, H., 1999: Yield reduction and mycotoxin accumulation in barley doubled haploids inoculated with *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. J. Appl. Genet. 40 (2): 73–84.
- CHELKOWSKI, J., WIŚNIEWSKA, H., ADAMSKI T., GOLIŃSKI, P., KACZMAREK, Z., KOSTECKI, M., PERKOWSKI, J., SURMA, M., 2000: Effects of *Fusarium culmorum* head blight on mycotoxin accumulation and yield traits in barley doubled haploids. J. Phytopatology, 148: 541–545.
- CHEN, X., M., YANG, Y., H., GAO, D., S., 1991: Primary identification of resistance to scab of Chinese barley germplasm sources. Zhejiang Agric. Sci., 2: 91–97.
- CHLOUPEK O., 2008: Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, Academia Praha: s. 307.
- CHRPOVÁ, J., VÁŇOVÁ, M., ŠÍP, V., 2009: Využití různých metod pro hodnocení rezistence k fuzarióze klasu u odrůd pšenice ozimé registrovaných v ČR. Obilnářské listy 17 (4): 98–102.
- MA, H., M., GE, H., ZHANG, X., LU, W., YU, D., CHEN, H., CHEN, J., 2009: Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Chinese barley. J. Phytopathol, 157: 166–171.

ORT, P., 2004: Horizon 250 EW a nebezpečí fuzariózy klasů obilovin. Obilnářské listy 12 (3): 74–75.

POLIŠENSKÁ I., 2008: Nežádoucí látky v rostlinných produktech – Mykotoxiny: 57–59. In: Prugar, J. a kol., Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, VÚPS, a.s.: 327 s.

STEFFENSON, B. J., 2003: Fusarium head blight of barley: impact, epidemics, management and strategies for identifying and utilizing genetic resistance: 241–295. In: K. J. Leonard and W. R. Bushnell (ed) Fusarium head blight of wheat and barley. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA: 512 s.

SÝKOROVÁ, S., PAPOUŠKOVÁ, L., ŠÍP, V., CHRPOVÁ, J., HÝSEK, J., SYCHROVÁ, E., 2002: Obsah fusariových mykotoxinů v odrůdách jarního ječmene (umělá a přirozená infekce). Kvasný průmysl, 48, (6): 149–153.

TAKEDA, K., 1990: Selection response and parent-offspring correlation of the resistance to Fusarium head blight in barley. Japan J. Breed. 40: 91–101.

TVARŮŽEK, L., JI, L., CAO, K., 2003: Reaction of Winter Wheat Genotypes from Chinese and Czech Collection to Fusarium Head Blight and Leaf Diseases. In: Dagun Liu (ed.): Research of Plant Pathology in Hebei. China Agriculture Press, Vol. 1: 94–100.

VAGER, J., OHNOUTKOVÁ, L., 1993: In vitro production of androgenesis in wheat and barley. Rostlinná výroba, 39: 97–114.

ZHOU, X., CHAO, M., LIANG, X., 1991: Screening and testing of barley varieties for scab resistance. Acta Phytopathologica Sin., 18: 261–264.

Poděkování

Publikované výsledky byly dosaženy v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT: MSM 2532885901.

Recenzováno

Adresa autora: nesvadba.zdenek@vukrom.cz

