

Výskyt nových "emerging" a dalších mykotoxinů ve vzorcích zrna různých odrůd a genetických zdrojů ječmene jarního

(Occurrence of new "emerging" and other mycotoxins in grain samples of different cultivars and genetic resources of spring barley)

Vaculová¹, K., Zachariášová², M., Hajšlová², J., Džuman², Z., Smutná³, P., Ehrenbergerová³, J., Zavřelová¹, M.

¹Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž

²Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

³Mendelova univerzita v Brně

Souhrn: Přítomnost nových „emerging“ fusariových a alternariových toxinů (enniatiны B, B1, A, A1, beauvericin, alternariol, alternariol monomethyleter, tentoxin, tenuazonová kyselina a mykofenolová kyselina) byla detekována ve vzorcích zrna 29 odrůd a genetických zdrojů ječmene jarního, pěstovaných v letech 2011-2012 ve dvou lokalitách (Kroměříž, Žabčice) a na dvou variantách infekce (přirozená infekce a inokulace *Fusarium culmorum*). Četnost výskytu a nalezené hladiny všech mykotoxinů se lišily v závislosti na experimentální lokalitě, ročníku, variantě infekce a testovaných materiálech ječmene. Nicméně nejvyšší obsahy enniatinů B, B1 a A1 byly stanoveny ve variantách s přirozenou infekcí v lokalitě Žabčice a v roce 2012. Nejvyšší sumární obsah „emerging“ a alternariových mykotoxinů vykazovaly vzorky zrna odrůd Cebada Capa a Ricardo a nejnižší obsah byl zjištěn u odrůdy CDC Rattan s waxy typem škrobu.

Klíčová slova: ječmen, genetické zdroje, přirozená infekce, inokulace *Fusarium culmorum*, enniatiны, beauvericin, alternariové toxiny

Abstract: Presence of the „emerging“ and Alternaria toxins (enniatiны B, B1, A, A1, beauvericin, alternariol, alternariol monomethyleter, tentoxin, tenuazonic acid and mycophenolic acid) were detected in the set of 29 samples of spring barley grain samples from cultivars and genetic resources grown under two variants of infection (natural infection and artificial inoculation with *Fusarium culmorum*) in two localities (Kroměříž, Žabčice) during the period of 2011-2012. All mycotoxins were found with different frequencies of occurrence, and at various concentration levels between the experimental years, locations, variants of infection and tested barley samples; however, a higher contents of enniatiны B, B1 and A1 were analyzed in the variants with natural infection, in the location Žabčice and in the year 2012. The highest overall concentrations of the „emerging“ and Alternaria toxins were found in the grain samples of cultivars Cebada Capa and Ricardo; the lowest one in the cultivar CDC Rattan with waxy starch type.

Key Words: barley, genetic resources, natural infection, inoculation *Fusarium culmorum*, enniatiны, beauvericin, Alternaria toxins

Úvod

Z pohledu ochrany zdraví spotřebitele je zajištění zdravotní nezávadnosti potravin jedním z nejpozorněji sledovaných témat současnosti. V případě potravinářských surovin a krmiv představují aktuální nebezpečí přirozeně se vyskytující kontaminanty, mezi kterými přední místo zaujímají mykotoxiny, sekundární metabolity patogenních hub kulturních plodin. Vyznačují se akutní nebo chronickou toxicitou pro lidi i hospodářská zvířata, a proto je celosvětově těmto toxinům věnována stále větší pozornost.

Nejvyšší přípustné limity u obilovin a výrobků z nich jsou podle Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 (a jeho změn, zakotvených v nařízeních (ES) č. 1126/2007, 105/2010 a 165/2010) stanoveny pro mykotoxiny deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A, fumonisin B1 a B2 a aflatoxiny B1, B2, G1 a G2. Na základě stanoviska výboru CONTAM vydala komise ES doporučení 2013/165/EU ohledně sledování přítomnosti toxinů T-2 a HT-2 v obilovinách a výrobcích z obilovin. Výsledky sledování přítomnosti a škodlivosti širokého spektra mykotoxinů v surovinách, potravinách a krmivech prokazují, že potenciální nebezpečí představují nejen tyto „klasické“, ale i jiné, doposud ne běžně detekované, jako jsou alternariové toxiny, námelové alkaloidy, enniatiны, diacetoxyscirpenol, beauvericin, moniliformin, fusaproliferin a další, kterým by měla být věnována zvláštní pozornost (Hajšlová *et al.* 2011, Jestoi *et al.* 2009). Navíc doposud nebyla charakterizována jejich kombinovaná toxicita (Hajšlová 2010).

Ječmen je druhou nejrozšířenější obilninou na území České republiky a významnou surovinou pro sladařství, pivovarnictví i výrobu krmiv. Kontrola a aplikace opatření proti fuzariózám klasu (FHB), chorobám působeným houbovými patogeny, je tedy nezbytným krokem k zajištění zdravotně nezávadné produkce. Rozsah napadení porostů ječmene houbovými patogeny se každoročně mění a míru i stupeň výskytu těchto nepříznivých biotických činitelů ovlivňuje řada environmentálních i agrotechnických faktorů. Svou roli hraje i citlivost odrůd ječmene daná odlišnostmi mezi genotypy (Jordahl *et al.* 2002, McMullen *et al.* 2008, Neate *et al.* 2003, Rudd *et al.* 2001, Váňová *et al.* 2004, Yoshida *et al.* 2008 a další). V předloženém příspěvku byl hodnocen výskyt a koncentrace nových „emerging“ fusariových mykotoxinů a alternariových toxinů u souboru vybraných odrůd a genetických zdrojů ječmene jarního, pěstovaných ve dvou letech na dvou lokalitách v podmínkách přirozené infekce a umělé inokulace patogenem *Fusarium culmorum*.

Materiál a metody

Materiál:

Odrůdy a genetické zdroje ječmene jarního (celkem 29 - Tab. 1), registrované k pěstování v ČR nebo vedené v Genové bance ČR, se lišily jak v hospodářských, tak morfologických znacích (typ klasu: 2-řadý a 6-řadý; typ pluchatosti obilky: pluchatá a bezpluchá), a také v chemickém složení zrna (rozdíly ve slože-

ní škrobu: standardní s poměrem amyloza/ amylopektin = cca 25:75 a „waxy“ s geneticky podmíněným, sníženým podílem amylozy do úrovně cca 5-10 %).

Pěstební technologie a ošetření v průběhu vegetace:

Materiály ječmene byly pěstovány v polních podmínkách lokalit Kroměříž a Žabčice v letech 2011-2012 v maloparcelních pokusech po optimálních předplodinách pro danou lokalitu (parcely 2 x 2,5-4,5 m²), s využitím standardní pěstební technologie bez použití fungicidů. Pokus byl založen ve dvou variantách infekce porostů – přirozená infekce (N) a umělá infekce (I) patogenem *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. kmen KM16902; DON chemotyp). Inokulace suspenzí konidií patogenního izolátu druhu *F. culmorum* (koncentrace 0,5 mil. konidií/1 ml inokula; postřiková dávka 200 l.ha⁻¹) byla provedena podle metodiky Tvarůžek *et al.* (2012) v optimální vegetační fázi (BBCH 61-64). Po sklizni byl vyhodnocen výnos zrna (t.ha⁻¹) a hmotnost 1000 zrn (HTZ, g). Odběr vzorků na analýzu mykotoxinů byl proveden na laboratorním děliči vzorků.

Analytické metody:

Mykotoxiny byly analyzovány metodou ultra-účinné kapalinové chromatografie (ultra-účinný kapalinový chromatograf Acquity (Waters) a chromatografická kolona HSS T3, 100 x 2.1 mm; 1,8 μm (Waters) s tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (hmotnostní analyzátor typu lineární iontová past, qtrapMS/MS (AB Sciex) na pracovišti VŠCHT v Praze. Kvantifikace byla prováděna s pomocí nejintenzivnějšího (kvantifikačního) iontového přechodu metodou externí kalibrace na kalibrační řadu matričních standardů. Výsledky byly korigovány na výtěžnost metody, která byla zjištěna pomocí analýzy vzorků s přidáním známým množstvím mykotoxinů (tzv. „spiky“).

Analyzované mykotoxiny:

Bylo získáno celé spektrum mykotoxinů (cca 50 druhů). V daném příspěvku je hodnocen výskyt a koncentrace pouze vybraných - nových fusariových (tzv. „emerging“) a alternariových toxinů. Jedná se o následující mykotoxiny: enniatin A (EnnA), enniatin A1 (EnnA1), enniatin B (EnnB), enniatin B1 (EnnB1), beauvericin (BEA), alternariol (AOH), alternariol monomethyleter (AME), tentoxin (Tentox), kyselina tenuazonová (TeA) a kyselina mykofenolová (MPAc) – vše v μg.kg⁻¹.

Statistické zpracování:

Data byla zpracována využitím software STATISTICA, verze 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Průměrné hodnoty obsahu mykotoxinů byly vypočteny z pozitivních hodnot (naměřených nad LOQ).

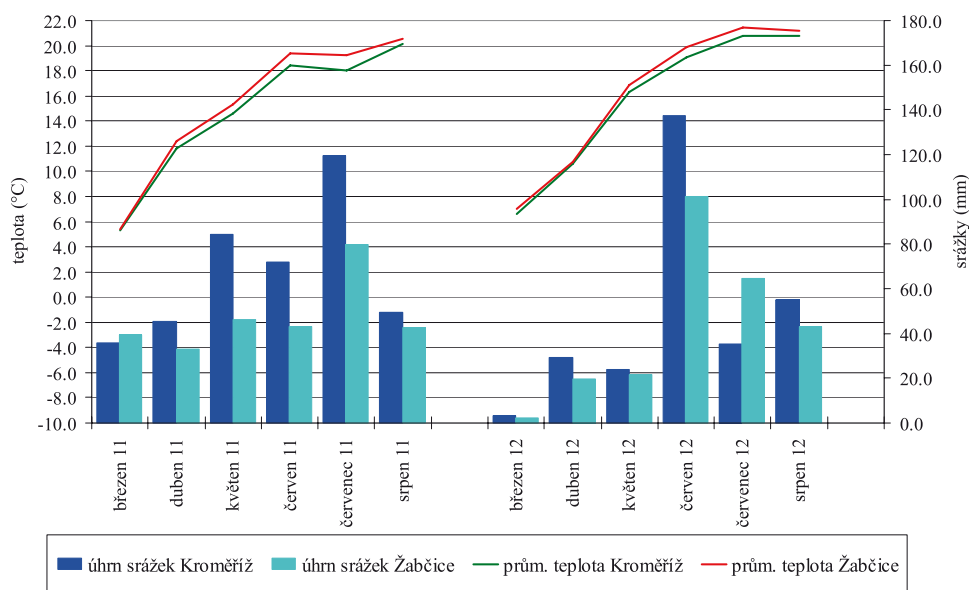
Popis pokusných lokalit:

Kroměříž (49° 17' severní šířky, 17° 22' východní délky, 235 m nad mořem) výrobní oblast řepařská, půdní typ – černozem luvická (ČMI), půdní druh – prachová hlína, průměrná roční teplota 8,7 °C, průměrný roční úhrn srážek 559 mm.

Žabčice (49° 01' severní šířky, 16° 37' východní délky, 184 m nad mořem) výrobní oblast kukuřičná, podoblast K2, půdní typ – fluvizem glejová (FLg), půdní druh – jílovitohlinitá až jílovitá,

s obsahem jílnatých částic 55 až 65 %, průměrná roční teplota 9,2 °C, průměrný roční úhrn srážek 480 mm.

Průměrné teploty a srážky ve vegetačním období let 2011 a 2012 na obou pokusných lokalitách jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1: Průběh počasí ve vegetačním období let 2011-2012 na lokalitách Kroměříž a Žabčice

Výsledky a diskuse

Výnos zrna a hmotnost obilek

Ve sledovaném souboru genotypů ječmene byly zastoupeny odrůdy i genetické zdroje s deklarovanou odlišnou náchylností FHB, které se navíc lišily morfologicky (typem klasu a typem pluchatosti) i chemickým složením zrna (poměrem hlavních polysacharidů škrobu). Jejich reakce na silný tlak patogena (inokulaci *F. culmorum*) se projevila ve většině případů snížením výnosu zrna (v průměru o 0,1 až 1,5 t.ha⁻¹) a HTZ (o 0,6 až 5,5 g). Pokles výnosu zrna byl registrován zejména na lokalitě Kroměříž (v průměru o 0,9 t.ha⁻¹), zatímco v Žabčicích byla diference mezi přirozeně infikovanou a inokulovanou variantou prakticky nulová (rozdíl 0,06 t.ha⁻¹ (u?) inokulované varianty; data nejsou uvedena). Nejsilněji se negativní vliv inokulace projevilo u náchylných 6-řadých odrůd Cebada Capa a Ricardo, za nimi následovaly 2-řadé odrůdy s hustým klasem (Prosa a Henrike) a kanadské bezpluché odrůdy s waxy typem škrobu CDC Merlin a CDC Rattan (Tab. 1). Více než 10% relativní pokles výnosu oproti variantě s přirozenou infekcí vykazovaly také 2-řadé odrůdy se standardním složením škrobu Waggon a Kompakt. Byly ale pozorovány i případy, kdy se výnos zrna odrůdy po inokulaci nesnížil nebo dokonce došlo k jeho navýšení. Genetický zdroj rezistence z USA 6NDRFG-1 vykázal nejen v průměru zvýšený výnos zrna (o 0,3 t.ha⁻¹), ale současně i vyšší HTS (o 1,2 g). Vyšší průměrný výnos zrna byl zjištěn také u starších 2-řadých odrůd Annabell a Pejas, 6-řadých odrůd Druvis a Rolfi, bezpluché odrůdy Taiga a odrůdy Krasnodarskij 95 (Tab. 1), u níž Chrpová *et al.* (2011) kromě odolnosti napadení FHB pozorovali i vysokou toleranci k akumulaci mykotoxinu DON v zrna.

Z pohledu rozdílů v důsledku morfologických odlišností byl výnos zrna vlivem inokulace více snížen u pluchatých a 6-řadých materiálů (v průměru o 0,3 a 0,4 t.ha⁻¹, resp.), zatímco v případě hmotnosti obilky tomu bylo naopak (pokles průměrné HTZ u bez-

pluchých materiálů o 3 g a u 2-řadých o 2,8 g). Mezi poklesem výnosu a snížením HTZ byla nejsilnější korelace vypočtena pro materiály s 6-řadým klasem ($r = 0,54^*$) a naopak v případě ječmene s waxy typem škrobu byl tento vztah negativní ($r = -0,49$), tedy při malém snížení výnosu byla pozorována velká redukce hmotnosti obilky. Literární údaje vesměs uvádějí, že 6-řadé odrůdy jsou k napadení FHB citlivější a odrůdy s bezpluchým zrnem naopak více odolné (Buerstmayr *et al.* 2004, Usele *et al.* 2011, Yoshida *et al.* 2008 aj.). Jak je zřejmé z Tab. 1, reakce jednotlivých materiálů ječmene na vysoký tlak patogena byla různá, a proto nelze jednoznačně potvrdit výsledky, ke kterým zahraniční autoři dospěli. Snížení výnosu zrna nebo hmotnosti obilky nemusí být vždy ve vztahu k akumulaci mykotoxinů. Asymptotický výskyt mykotoxinů T-2 a HT-2, který se projevil tím, že napadení fusarií v průběhu vegetace nebylo vůbec pozorovatelné a přesto bylo zrno kontaminované jejich sekundárními toxickými produkty, zaznamenalo u ovsa více autorů (Hajšlová 2008, Imathiu *et al.* 2013).

toxinů kolísal nejen podle typu mykotoxinu, ale i pěstební lokality a varianty pokusu. Nejčastěji byly detekovány EnnB (100 % případů nad limitem kvantifikace - LOQ) a B1 (výskyt v 95-98 %) a s vysokou četností byl také detekován EnnA1 (72-93 %). Četnost výskytu BEA byla od 50 do 59 % a EnnA od 28 do 59 %. Rozsah naměřených hodnot obsahu mykotoxinů byl velmi proměnlivý a lišil se jak podle pěstebních lokalit a pokusných ročníků, tak i způsobu infekce porostů. Průměrná koncentrace enniatinů se ve variantě s přirozenou infekcí pohybovala od 4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EnnA) po 561 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EnnB), v inokulované variantě od 4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EnnA) po 183 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EnnB). Průměrný obsah BEA kolísal podle variant od 36 do 126 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Obr. 2). Je zajímavé, že obecně byly hladiny enniatinů vyšší ve variantách s přirozenou infekcí a významně se lišila také lokalita Žabčice, kde byly naměřeny maximální hodnoty v případě EnnB (až 2323 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; odrůda Merlin; 2011), EnnB1 (až 1228 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) i EnnA1 (až 1219,8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) - v obou případech v roce 2012 u linie KM 1057 (Obr. 3).

Odrůda	P ůvod	P lch. ¹⁾	Typ klasu	Typ škrobu ²⁾	Rozdíl ³⁾		Odrůda	P ůvod	P lch. ¹⁾	Typ klasu	Typ škrobu ²⁾	Rozdíl ³⁾	
					V ýnos zrna, t.ha ⁻¹	HTZ, g						V ýnos zrna, t.ha ⁻¹	HTZ, g
6NDRFG-1	USA	pl	6ř.	stand.	0,3	1,2	KM 2551	CZE	n	2ř.	waxy	-0,1	-4,8
AC Klink	CAN	pl	6ř.	stand.	-0,3	-3,1	Kompakt	SVK	pl	2ř.	stand.	-0,3	-4,7
AF Lucius	CZE	n	2ř.	stand.	0,0	-4,0	Krasnodarskij 95	SUN	pl	2ř.	stand.	0,2	-2,6
Amulet	CZE	pl	2ř.	stand.	-0,2	-2,1	Madeira	DEU	pl	2ř.	stand.	-0,2	-2,2
Annabell	DEU	pl	2ř.	stand.	0,4	-1,6	Merlin	CAN	n	2ř.	waxy	-0,1	-2,1
Arra	FIN	pl	6ř.	stand.	-0,1	-1,5	Nitran	SVK	pl	2ř.	stand.	-0,6	-1,7
CDC Rattan	CAN	n	2ř.	waxy	-0,7	-2,6	Nordus	DEU	pl	2ř.	stand.	-0,3	-3,0
Cebada Capa	ARG	pl	6ř.	stand.	-1,5	-1,7	Pejas	CSK	pl	2ř.	stand.	0,1	-3,6
Diplom	DEU	pl	2ř.	stand.	-0,3	0,0	Primus	CSK	pl	2ř.	stand.	0,0	-0,6
Druvis	LVA	pl	6ř.	stand.	0,1	-1,7	Prosa	AUT	pl	2ř.	stand.	-0,9	-5,3
Henrike	DEU	pl	2ř.	stand.	-0,8	-3,2	Ricardo	URY	pl	6ř.	stand.	-1,1	-5,5
Chevron	CHE	pl	6ř.	stand.	-0,5	-2,1	Rolfi	SWE	pl	6ř.	stand.	0,1	-2,8
KM 1057	CZE	n	2ř.	stand.	-0,3	-3,2	Taiga	DEU	n	2ř.	stand.	0,5	-0,9
KM 2084	CZE	n	2ř.	stand.	-0,2	-3,8	Waggon	GBR	pl	2ř.	stand.	-0,6	-5,3
KM 2460	CZE	pl	2ř.	waxy	-0,5	-1,3							

¹⁾ - pluchatost obilky: pl = pluchatá, n = bezpluchá; ²⁾ - stand. = standardní složení škrobu, waxy = změněný podíl amylozy a amylopektinu; ³⁾ - absolutní rozdíl mezi inokulovanou a přirozeně infkovanou variantou

Tab. 1: Seznam, charakteristika odrůd a genetických zdrojů ječmene jarního a průměrné rozdíly v hospodářských znacích mezi inokulovanou a přirozeně kontaminovanou variantou

„Emerging“ mykotoxiny

Změny klimatu i stále se snižující pestrost pěstovaných plodin přispívají k rozšiřování dříve méně běžných druhů rodu *Fusarium* a dalších druhů houbových patogenů (produkovaných např. rody *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* apod.). Čím dál častěji je proto v analyzovaných vzorcích obilovin detekováno více skupin mykotoxinů současně, což může být příčinou řady vedlejších efektů pozorovaných například v praxi při aplikaci krmiv s nižšími než limitními hladinami sledovaných mykotoxinů (Binder *et al.* 2007). Díky stále preciznějším možnostem podchycení přítomnosti limitovaných mykotoxinů nejsou proto, podle názoru některých odborníků, hlavním problémem projevy akutních mykotoxikóz, ale zejména dlouhodobý příjem nízkých hladin mykotoxinů, který je příčinou špatného zdravotního stavu, snížení výkonnosti, metabolických poruch, snížené fertility, imunosuprese a dalších nežádoucích souvisejících projevů (Bryden 2012, Jestoi 2008, Kokkonen 2012, aj.).

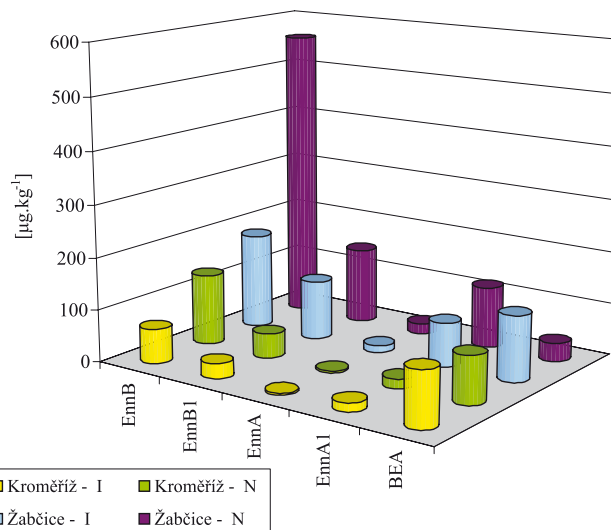
Výsledky uvedené v Tab. 2 ukazují, že četnost výskytu i rozsah naměřených hodnot sledovaných fusariových „emerging“ myko-

Mikroklimatické rozdíly obou pěstebních lokalit společně s rozdílným průběhem počasí v letech 2011 a 2012 mohly způsobit nejen rozdíly v úrovni napadení genotypů ječmene, ale ovlivnit i frekvenci výskytu a obsah sledovaných mykotoxinů. Výzkum různých druhů rodu *Fusarium* a dalších patogenů ukazuje, že jsou variabilní nejen v podmínkách důležitých pro jejich růst (zejména vlhkosti prostředí a teplotě), ale i potenciální patogenitě (Brennan *et al.* 2003, Hudec a Muchová 2010, Parikka *et al.* 2012, Popowski a Celar 2013). Podle výsledků, které uvádějí Brennan *et al.* (2005), rozdíly v patogenitě různých druhů fusarií mohou souviset nejen s jejich rozdílnými teplotními požadavky, ale i s reakcí hostitele na podmínky pěstování. Lokalita Žabčice patří k nejteplejším oblastem České republiky a ročním průměrným úhrnem srážek (480 mm) se řadí k sušším lokalitám. Naopak Kroměříž je charakterizována jako lokalita „teplá a středně vlhká“ s průměrným ročním množstvím srážek okolo 559 mm. Jak je zřejmé z Obr. 1, mezi oběma lokalitami i mezi roky 2011 a 2012 byly zjištěny rozdíly v teplotách a srážkách jak v průběhu celé vegetace, tak zejména v měsících červen a červenec, kdy dochá-

zelo k nalévání a zrání zrna ječmene. To se projevilo nejen na výkonnosti experimentálních materiálů ječmene, ale ovlivnilo také spektrum přítomných patogenních druhů a jejich produkci mykotoxinů.

I když enniatiny a BEA byly poprvé identifikovány v cereáliích pěstovaných ve Skandinávii (Sorensen *et al.* 2008), a proto byly považovány spíše za kontaminanty chladnějších oblastí, byly tyto mykotoxiny později nalezeny také v cereáliích ve Španělsku nebo Itálii (Jestoi *et al.* 2009, Meca *et al.* 2010). Fusariové „emerging“ mykotoxiny, kam se řadí enniatiny, BEA, moniliformin a fusaproliferin, jsou produkovány zejména druhy *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* a *F. sambucinum* (Jestoi *et al.* 2009). Spektrum patogenů, které izolovali Bezděková *et al.* (2013) z obilí ječmene vypěstovaných v lokalitách Kroměříž a Žabčice v roce 2012, zahrnovalo převážně rody *F. poae*, *F. culmorum*, *F. graminearum* a *F. avenaceum*. Zatímco v Žabčicích na obou variantách (přirozená infekce a inokulace *F. culmorum*) převládal druh *F. poae*, v Kroměříži našli převážně *F. culmorum*.

Biologické účinky enniatinů a BEA jsou dokumentovány mnohými výzkumy, provedenými v pokusech *in vitro* a také *in vivo* na laboratorních a hospodářských zvířatech. Pilotní toxikologické výzkumy ukázaly teratogenní a patologické účinky na buněčné kultury *in vitro* (Munkvold *et al.* 1998), Ivanova *et al.* (2006) zjistili v pokusech *in vitro* srovnatelnou toxicitu enniatinů v porovnání s cytotoxicitou mykotoxinu DON. Toxické účinky těchto kontaminantů jsou přičítány jejich ionoformním vlastnostem, avšak jejich případná akutní ani chronická toxicita doposud nebyla potvrzena.



Obr. 2: Průměry sledovaných mykotoxinů v zrně odrůd a genetických zdrojů ječmene jarního z lokalit Kroměříž a Žabčice a dvou variant infekce (N = přirozená infekce; I = inokulace *F. culmorum*)

toxinem s výskytem nad LOQ na obou lokalitách byl Tentox (ve 2 až 21 %). V případě TeA byl výskyt v lokalitě Kroměříž v obou variantách i experimentálních letech nulový a totéž platilo pro výskyt kyseliny mykofenolové (MPAc) v lokalitě Žabčice a v přirozeně infikované variantě v Kroměříži. V Žabčicích byla četnost výskytu TeA od 9 % (varianta s přirozeným výskytem) do 31 % (inokulace *F. culmorum*), nicméně se na této průměrné hodnotě podílel pouze rok 2011. Obdobně také pouze v roce 2011 byl zaznamenán výskyt

MPAc v Kroměříži na inokulované variantě.

Celkově byly hladiny AOH a AME i frekvence výskytu vyšší v lokalitě Kroměříž a to zejména v roce 2011 ve variantě s přirozenou infekcí (obsah v případech nad LOQ kolísal pro AOH od 3 do 140 μg.kg⁻¹ a pro AME od 3 do 77 μg.kg⁻¹), nicméně celkově nejvyšší obsah AOH byl zjištěn v roce 2012, a to u odrůdy Cebada Capa (475 μg.kg⁻¹), která se vyznačovala silnější akumulací také v případě dalších alternariových mykotoxinů (Obr. 4).

Bez ohledu na to, že četnost výskytu a naměřené hladiny alternariových toxinů byly v celku velmi nízké, přítomnost vysokých hladin TeA, která byla naměřena ve variantě s inokulací *F. culmorum* v roce 2011 na lokalitě Žabčice, potvrzuje názor některých autorů, kteří považují za důležité a potřebné sledovat obsah tohoto mykotoxinu. Jak uvádějí Herzig *et al.* (2008), TeA patří k akutně toxickým alternariovým mykotoxinům a její negativní působení se projevuje zejména inhibicí syntézy proteinů, což může při vysokých dávkách tohoto toxinu vést až ke kardiovaskulárnímu kolapsu, tachykardii, masivní gastrointestinální hemoragii a smrti.

Označení mykotoxinů	Vzorky nad LOQ, %		Min. Max. μg.kg ⁻¹		Vzorky nad LOQ, %		Min. Max. μg.kg ⁻¹		Vzorky nad LOQ, %		Min. Max. μg.kg ⁻¹	
	přirozená infekce		inokulovaná varianta		přirozená infekce		inokulovaná varianta		přirozená infekce		inokulovaná varianta	
	Kroměříž		Kroměříž		Žabčice		Žabčice		Kroměříž		Kroměříž	
EnnB	100	12	741	100	7	436	100	12	2323	100	4	821
EnnB1	95	6	237	95	2	210	98	3	1228	97	6	638
EnnA	40	1	13	28	1	12	55	1	157	59	1	59
EnnA1	93	1	125	79	1	103	78	3	1220	72	9	437
BEA	55	4	332	59	11	331	52	4	276	50	9	301
AOH	53	3	475	43	2	99	21	2	7	9	25	81
AME	31	1	77	28	1	11	19	1	35	14	1	11
TeA	0			0			9	72	327	31	230	7416
Tentox	5	13	16	2	22	22	21	8	42	12	5	30
MPAc	0			16	3	131	0			0		

Tab. 2: Četnost výskytu a rozsah pozitivních hodnot naměřených hladin mykotoxinů podle lokalit a variant infekce

Alternariové toxiny

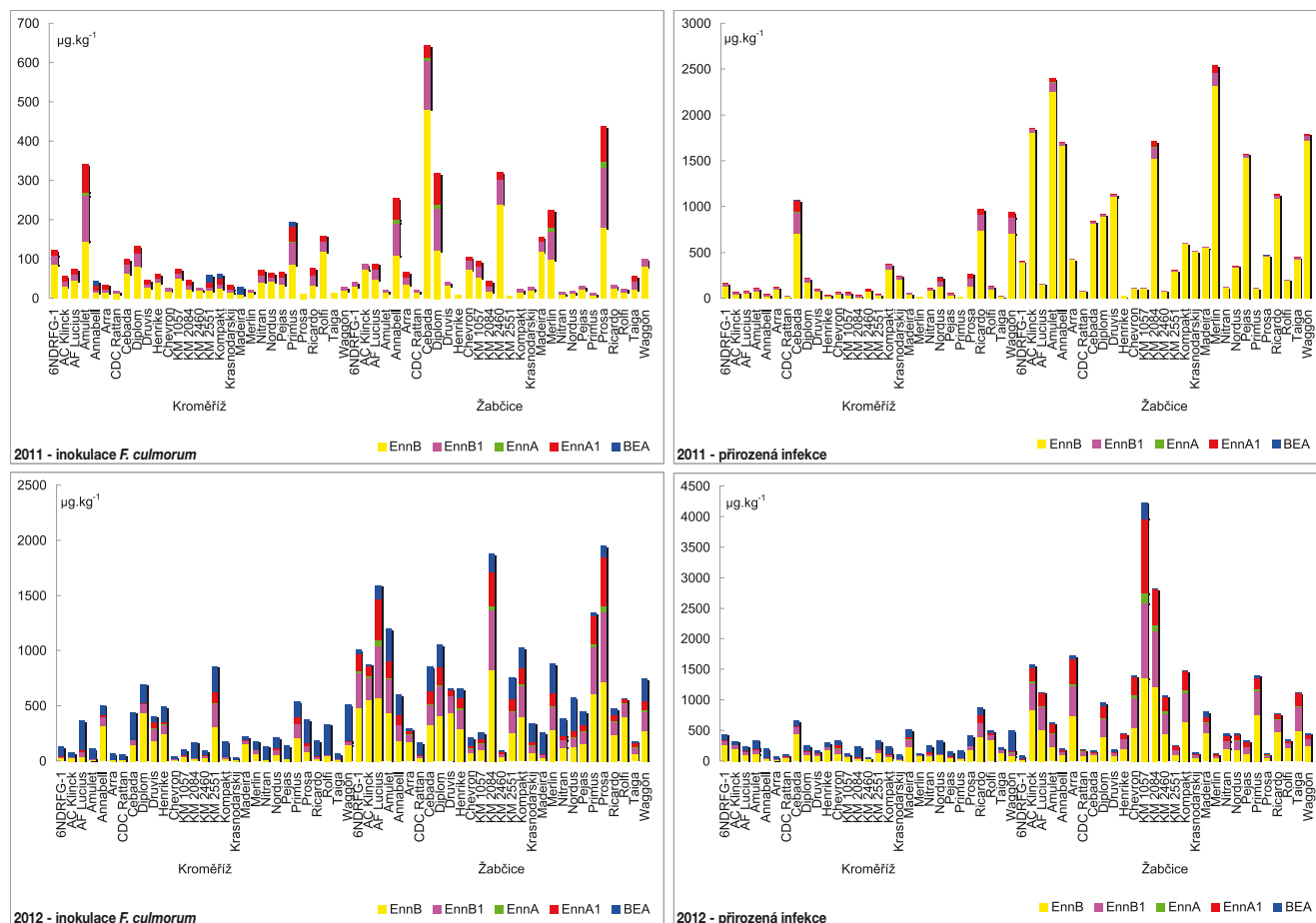
Také mykotoxiny hub rodu *Alternaria* nejsou doposud kompletně chemicky prostudovány, nicméně existují důkazy o tom, že například AOH, TeA, AME a další jsou nebezpečné pro zvířata a vykazují fetotoxické a teratogenní účinky. V pokusech *in vitro* byl prokázán také mutagenní a klastogenní vliv (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011). Pro alternariové mykotoxiny nejsou v ČR stanoveny žádné hygienické limity (Herzig *et al.* 2008).

Četnost výskytu alternariových mykotoxinů byla v porovnání s „emerging“ mykotoxiny významně nižší a také hladiny detekovaných toxinů se pohybovaly ve většině případů pouze v jednotkách až desítkách μg.kg⁻¹ (Tab. 2).

S nejvyšší četností byl detekován AOH (od 9 do 53 %), AME byl detekován s četností 14-31 % a posledním alternariovým

U drůbeže byla subakutní toxicita pozorována již při koncentraci 10 mg.kg⁻¹ krmiva. Nejvyšší hladiny TeA byly zjištěny v Žabčicích ve variantě s inokulací u odrůd Ricardo, AC Klinck a Druvis (7416; 3377 a 2680 µg.kg⁻¹, resp.), ale například i ve vzorku zrna genetického zdroje 6NDRFG-1 (2200 µg.kg⁻¹) s deklarovanou vyšší rezistencí FHB, který v daném pokusu prokázal nejvyšší odolnost silnému tlaku patogenu z pohledu výnosu zrna a hmotnosti obilky.

mykotoxinů stanovena v roce 2011 u odrůdy Cebada Capa (1065 µg.kg⁻¹) a v roce 2012 u odrůdy Ricardo (876 µg.kg⁻¹). Ve vzorcích z lokality Žabčice byly naměřené hladiny mykotoxinů až násobně vyšší. Maximální sumární hladina Enns a BEA byla stanovena v roce 2011 ve vzorku zrna odrůdy Merlin (2540 µg.kg⁻¹) a v roce 2012 v zrně linie KM 1057 (4237 µg.kg⁻¹). Porovnání pořadí odrůd podle akumulace obou skupin sledovaných mykotoxinů v lokalitě Kroměříž a Žabčice ukázalo, že bez ohledu na variantu infekce a rok sledování vykazovaly nejvyšší



Obr. 3: Složený graf výskytu enniatinů a BEA ve vzorcích zrna ječmene z pokusů s přirozenou infekcí a inokulací porostů *F. culmorum* (lokality Kroměříž a Žabčice, 2011-2012)

Akumulace toxinů v zrně jednotlivých odrůd

Grafy na Obr. 3 a 4, které znázorňují sumární akumulaci jednotlivých typů mykotoxinů podle variant infekce, experimentálních lokalit a jednotlivých ročníků u všech materiálů ječmene dokumentují nejen vliv zmíněných faktorů proměnlivosti, ale i to, že přes významnou variabilitu naměřených hodnot bylo možné detekovat odrůdy, u kterých byla zřejmá vyšší citlivost k akumulaci „emerging“ i alternariových toxinů.

V případě enniatinů a BEA kolísala v inokulované variantě maximální sumární akumulace mykotoxinů v lokalitě Kroměříž od 342 µg.kg⁻¹ (odrůda Amulet; 2011) po 862 µg.kg⁻¹ (linie KM 2551 s waxy typem škrobu; 2012), zatímco v lokalitě Žabčice od 644 µg.kg⁻¹ (Cebada Capa; 2011) po 1947 µg.kg⁻¹ (odrůda Prosa; 2012). Vyšší hladiny byly stanoveny ve vzorcích z přirozeně infikované varianty, kde v Kroměříži byla nejvyšší suma těchto

citlivost odrůdy Cebada Capa a Ricardo. U těchto odrůd byl zjištěn rovněž také nejsilnější výnosový úbytek v důsledku inokulace *F. culmorum*. Třetí odrůdou s nejvyšší sumární akumulací v obou lokalitách byla odrůda Waggon, rovněž s významným výnosovým poklesem, avšak čtvrté místo zaujala odrůda Diplom, u které byl sice v důsledku vyššího tlaku patogenu pozorován malý výnosový úbytek (-0,3 t.ha⁻¹), avšak rozdíl v hodnotách HTZ byl nulový. Nejnižší sumární obsah mykotoxinů byl stanoven v obou lokalitách u odrůdy s waxy typem škrobu CDC Rattan, která naopak patřila k odrůdám s významným poklesem výnosu zrna na inokulovaných variantách. Odrůdy AC Klinck nebo Rolfi reagovaly na napadení fusarií z pohledu obsahu mykotoxinů odlišně; na jedné lokalitě se řadily k odrůdám s nejsilnější akumulací a naopak ve druhé lokalitě patřily ke konci poslední třetiny sledovaného souboru.

Závěr

Hodnocení rozdílných materiálů ječmene v pokusu s přirozenou infekcí a umělou inokulací *F. culmorum* ve dvou letech a na dvou lokalitách potvrdilo, že silný tlak patogenu vyvolává u většiny odrůd a genetických zdrojů pokles výnosu i hmotnosti zrna. Z hlediska frekvence výskytu sledovaných nových „emerging“ fusariových a alternariových mykotoxinů byly nejčastěji detekovány enniatiny B, B1 a A1, zatímco výskyt alternariových toxinů byl méně četný a byl významněji ovlivněn ročníkem a lokalitou. Vyšší obsah všech „emerging“ mykotoxinů byl detekován na variantách s přirozenou infekcí, v lokalitě Žabčice a v roce 2012. Naopak v případě alternariových toxinů byl vyšší výskyt i obsah stanoven v roce 2011, kdy byla naměřena i absolutně nejvyšší hodnota ze všech toxinů a to pro obsah TeA ve vzorku odrůdy Ricardo na lokalitě Žabčice. Reakce odrůd podle akumulace jednotlivých mykotoxinů byla rozdílná, některé odrůdy se vyznačovaly odlišnou akumulací na jednotlivých lokalitách a ne každé odpovídá obsah mykotoxinů v zrna pořadí podle poklesu výnosu zrna nebo HTZ. Odrůdy Cebada Capa a Ricardo se kromě nejvyššího úbytku výnosu zrna vyznačovaly také nejvyšší sumární akumulací všech hodnocených mykotoxinů v zrna na obou lokalitách. Naopak odrůda CDC Rattan celkově akumulovala nejméně mykotoxinů jak v Kroměříži, tak i v Žabčicích, bez

ohledu na to, že silný tlak patogenu měl u této odrůdy velmi silný negativní vliv na výnos zrna. Rozdíly obsahu mykotoxinů nebylo možné vztahovat k typu pluchatosti ani diferencím v typu škrobu, avšak 6-řadé odrůdy se v porovnání s 2-řadými jevily jako citlivější.

Vysoké hladiny některých „emerging“ mykotoxinů i TeA, zjištěné u jednotlivých materiálů ječmene na variantách s přirozenou infekcí jsou varováním, že ani tyto, doposud nelimitované toxiny není radno podceňovat. Zejména v letech, kdy jsou vytvořeny přírodní podmínky příznivé pro rozvoj těchto druhů patogenů, kteří zmíněné mykotoxiny produkují.

(Recenzováno)

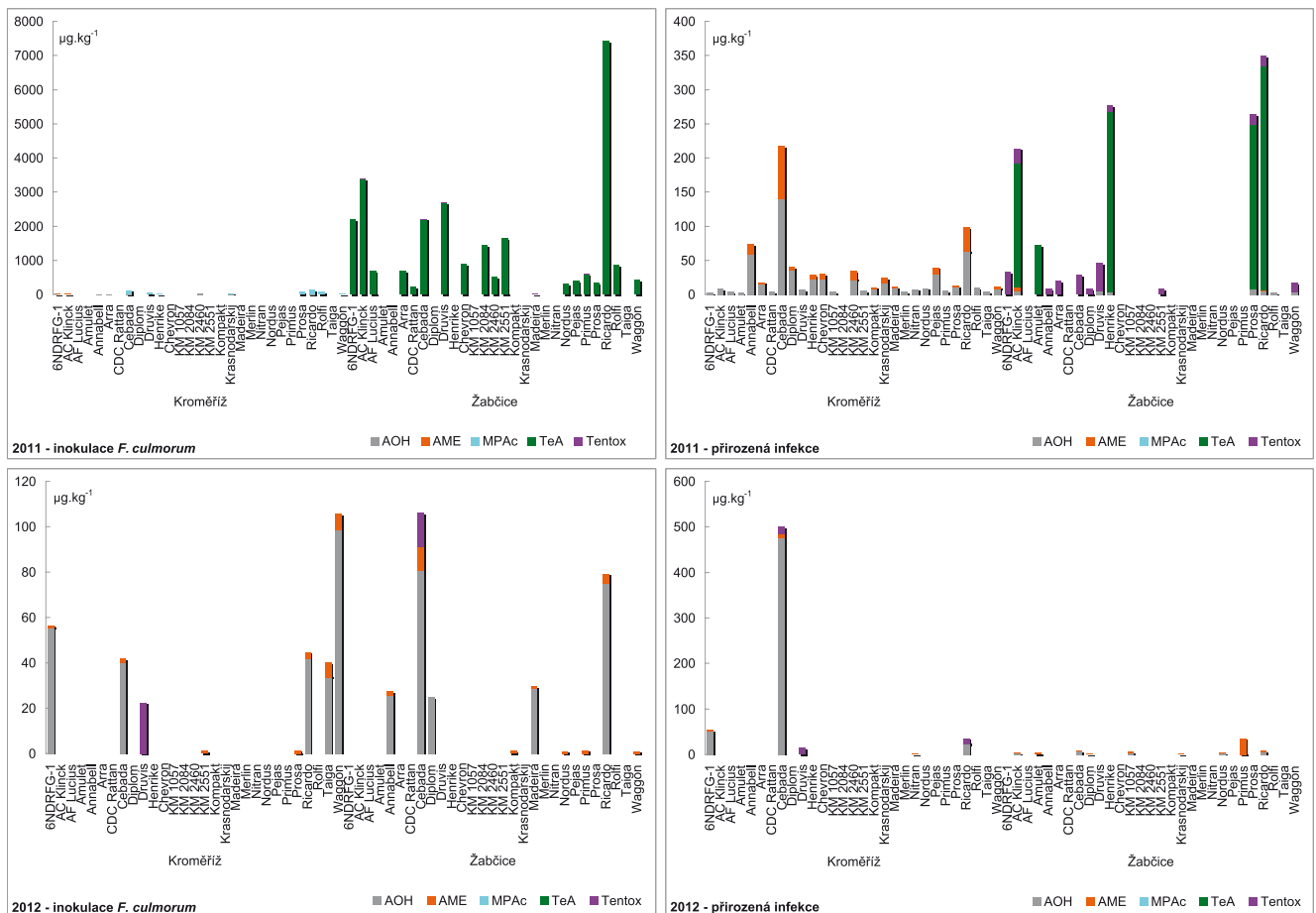
Poděkování

Příspěvek byl vypracován s podporou projektu MZe ČR č. QI111B044 a s využitím institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace RO0211.

Seznam použité literatury je k dispozici u autorů příspěvku.

Kontaktní adresa 1. autora:

Ing. Kateřina Vaculová, CSc., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž vaculova@vukrom.cz



Obr. 4: Složený graf výskytu alternariových toxinů ve vzorcích zrna ječmene z pokusů s přirozenou infekcí a inokulací porostů *F. culmorum* (lokality Kroměříž a Žabčice, 2011-2012)