

POVEZAVA MED STOPNJO OKUŽENOSTI KLASOV IN ZRN PŠENICE S FUZARIOZAMI TER VSEBNOSTJO MIKOTOKSINA DEOKSINIVALENOLA

Franci Aco CELAR¹, Igor ŠANTAVEC², Gabrijela TAVAR KALCHER³, Katarina KOS⁴

¹Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

²Veterinarska fakulteta, Inštitut za higieno in patologijo prehrane živali, Ljubljana

IZVLEK

Fuzarioza klasa (FK) je pomembna glivi na bolezen pšenice, predvsem v okoljih z dolgotrajnimi vlažnimi vremenskimi razmerami med cvetenjem in mehko vošeno zrelostjo zrnja. FK povzroča kompleks gliv iz rodu *Fusarium*, med katerimi so najpogostejše *F. graminearum*, *F. culmorum* in *F. avenaceum*. Te glive tvorijo nevarne mikotoksine, katerih kopičenje je škodljivo za zdravje živali in ljudi. Namen te raziskave je bil oceniti pojavnost različnih vrst gliv iz rodu *Fusarium* na 19 sortah pšenice na dveh različnih lokacijah (Jable, Rakican) v dveh zaporednih rastnih dobah (2012–2013). Poleg tega smo hoteli ugotoviti, ali obstaja kakšna povezava med ocenjeno stopnjo okuženosti klasov na njivi, laboratorijsko ugotovljeno okuženostjo zrnja z glivami *Fusarium* spp. in vsebnostjo mikotoksina deoksinivalenola (DON). Za ocenjevanje poljske okuženosti klasov je bila uporabljena ocenjevalna skala z 10 kategorijami. Vrste gliv rodu *Fusarium* so bile po metodi agarne plošče, ki jo priporoča ISTA, determinirane v laboratoriju pod mikroskopom. Koncentracija mikotoksina DON je bila ovrednotena z metodo ELISA. Iz pšenice, pobranih na različnih lokacijah, smo izolirali glive *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* in *F. tricinctum*. Potrjena je bila možna pozitivna linearna povezava med pogostostjo gliv *F. graminearum* in *F. culmorum* na zrnih pšenice ter koncentracijo mikotoksina DON ($r=0,71$). Med okuženostjo klasov in vsebnostjo mikotoksina DON v zrnju pšenice ni bilo ugotovljene signifikantne povezave.

Ključne besede: *Fusarium*, fuzarioza klasa, okuženost zrnja, pšenica, deoksinivalenol

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP BETWEEN LEVEL OF WHEAT HEAD AND KERNEL INFECTION WITH FUSARIOSIS AND MYCOTOXIN DEOXYNIVALENOL CONTENT

Fusarium head blight (FHB) is an important disease of wheat in environment with prolonged wet climatic conditions from flowering through the soft-dough stage of kernel development. FHB is caused by a complex of *Fusarium* species, of which *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. avenaceum* are most frequently involved. These fungi produce dangerous mycotoxins, which accumulation is harmful for health of animals and humans. The aim of this work was evaluation of incidence of *Fusarium* species on 19 wheat varieties at two different locations (Jable, Rakican) in two consecutive growing seasons (2012–2013). In addition, we wanted to find out if there is a correlation between the field estimated severity of *Fusarium* head blight, the laboratory detected kernel infection by *Fusarium* spp. and the content of mycotoxin deoxynivalenol (DON). The head blight severity was estimated under field conditions using a visual scale with 10 categories of infection. Species composition of the

¹ dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-mail: franc.celar@bf.uni-lj.si

² asist. dr., prav tam

³ dr., Cesta v Mestni log 47, SI-1000 Ljubljana

⁴ doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

genus *Fusarium* was microscopically determined in laboratory using agar plate method recommended by ISTA. The concentration of mycotoxin DON in kernels was evaluated by ELISA method. *Fusarium* species isolated from wheat kernels collected at different locations were following: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* and *F. tricinctum*. A strong positive linear correlation between the incidence of *F. graminearum* and *F. culmorum* on wheat kernels and concentration of mycotoxin DON was confirmed ($r=0.71$). No significant correlation between head infection and DON mycotoxin content in grains was found.

Key words: *Fusarium*, Fusarium head blight, kernel infection, wheat, deoxynivalenol

1 UVOD

Na območjih zmerne podnebja, predvsem v okoljih z dolgotrajnimi vlažnimi vremenskimi razmerami med cvetenjem in mehko vošeno zrelostjo zrnja, okužuje pšenico več vrst gliv iz rodu *Fusarium*. Poleg klasov oziroma zrn okužujejo tudi korenine, stebela in liste. Do sedaj je evidentiranih 12 vrst. Okužbe z njimi povzročajo v povprečju od 10 do 40 % izpade pridelka. Poleg tega te glive pred in po žetvi tvorijo mikotoksine. Z njimi so predvsem močno onesnaženi pridelki pšenice in ječmena, ki predstavljata kar 80 % pridelave žit v Evropi. Ostale vrste žit (rž, tritikala, oves) so manj občutljive na okužbo klasov s fuzariozami in so zaradi tega njihova zrna tudi manj kontaminirana z mikotoksini (Bottalico in Perrone, 2002). Najpogosteje zastopane *Fusarium* vrste, izolirane iz okuženih klasov pšenice v Evropi in pri nas, so *F. graminearum*, *F. avenaceum* in *F. culmorum*, nekoliko manj *F. poae*, *F. equiseti*, v manjši meri oz. sporadično pa se pojavljajo vrste *F. tricinctum*, *F. cerealis*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum* in *F. solani* (Bottalico in Perrone, 2002; Zemlji in sod., 2008).

Podobno kot pšenico tudi koruzo okužujejo številne fuzarioze. Od 17 skupno ugotovljenih *Fusarium* vrst se jih kar 11 pojavlja tako na pšenici kot koruzi (Bottalico in Perrone, 2002), kar omogoča njihovo ohranjanje v ozkem kolobarju koruza-žita in posledično veča gospodarsko škodo. Slovensko kmetijstvo je živinorejsko usmerjeno, tako da na njivah pretežno gojimo rastline, ki so namenjene živalski krmi (koruza, žita itn.). Ugotovimo lahko, da pri nas v poljedelski pridelavi prevladuje ozek kolobar (koruza, žita) ali v nekaterih primerih celo monokultura koruze (Kocjan A ko in Šantavec, 2010). Predominatni glivni vrsti, povzročitelji fuzarioz, tako pri koruzi kot žitih, sta *F. graminearum* in *F. avenaceum*, ki tvorita pomembne mikotoksine, kot so DON, nivalenol (NIV), zearalenon (ZEN) in moniliformin (MON). Kot tretja pomembna vrsta se pri koruzi pojavlja *F. subglutinans* (MON), pri pšenici pa *F. culmorum* (DON, ZEN) (Milevoj, 2002; Logrieco in sod., 2002; Zemlji in sod., 2008). Zavedati se moramo, da glive iz rodu *Fusarium* ne živijo samo na rasti koruzi oz. žitih, temveč se lahko zelo dobro razvijajo kot saprofiti na uskladišnih pridelkih, silažni koruzi in celo na izdelkih živilske industrije. Pojavnost gliv *Fusarium* spp. v pridelkih, krmi in izdelkih živilsko predelovalne industrije je odvisno od številnih dejavnikov okolja kot tudi na in pridelave in skladiščenja (izbor sort, gnojenje, obdelava tal, kolobar, kemično varstvo, tehnologija skladiščenja in obdelave zrnja ipd.).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Ugotavljanje poljske okuženosti klasov pšenice in zastopanosti gliv *Fusarium* spp. v okuženem zrnju

2.1.1 Poskusna zemljišča

Vsako leto na pridelovalnih zemljiših Biotehniške šole Raki an (Prekmurje) in Centra za razvoj kmetijstva in podeželja Jable (centralna Slovenija) izvajajo sortne makroposkuse strnih žit in koruze. V okviru teh poskusov je vsakoletno posejanih več deset sort pšenice. Gre za nabor perspektivnih sort, namenjenih pridelavi v Sloveniji, ki se med seboj razlikujejo po ranosti, tipu, izvoru idr. Poskusni lokaciji se med seboj močno razlikujeta po vremenskih razmerah, predvsem množini padavin, ki močno vplivajo na pojavnost fuzarioz. Na poskusnih parcelah izvajajo integrirani na in pridelave žit. Poskuse izvajajo na zemljiših, kjer se v dvopolju izmenjujeta koruza in pšenica.

Podatki o poskusnih lokacijah:

Lokacija **Raki an** (46°38'N, 16°11'E, nadmorska višina: 184 m) leži v osrednjem delu Prekmurja v bližini Murske Sobotne. Referenčna meteorološka postaja je Murska Sobota, ki je prav tako v Raki anu v neposredni bližini poskusa. Povprečna dolgoletna srednja temperatura zraka znaša 9,3 °C, najhladnejši je januar s povprečno temperaturo -2 °C, maksimalna povprečna mesečna temperatura je 19,5 °C. Povprečna letna množina padavin v dolgoletnem povprečju znaša 812 mm. Tla na poskusni lokaciji so tipična distrična rjava na holocenski prodatni naplavini.

Lokacija **Jable** (46°8'N, 14°34'E, nadmorska višina: 305 m) leži v osrednjem delu Ljubljanske kotline v predalpskem klimatskem območju Slovenije. Referenčna meteorološka postaja je Brnik. V dolgoletnem povprečju (1951–94) je srednja letna temperatura znašala 8,5 °C. Najhladnejši mesec je januar s povprečno temperaturo -2,1 °C, najtoplejši pa julij z 18,8 °C. Na leto povprečno pade 1352 mm padavin. Tla na lokaciji Jable so zmerno ogledjena na silikatno apnenasti podlagi.

V raziskavo smo vključili tudi vzorce ekološko pridelane pšenice, da bi ugotovili, kakšna je njihova okuženost, v primerjavi z integrirano pridelano pšenico. V ta namen smo pridobili reprezentančno število vzorcev ekološko pridelane pšenice, ki izvirajo iz območja v bližini naših poskusnih lokacij (Prekmurje, Gorenjska in osrednja Slovenija), nekaj pa tudi z drugih pridelovalnih območij.

218

2.1.2 Spremljanje cvetenja in poljsko ugotavljanje okuženosti klasov pšenice

V maju in juniju smo v rastnih sezonah 2012 in 2013 na obeh lokacijah spremljali cvetenje 30 različnih sort pšenice. Zabeležili smo začetek cvetenja, polno cvetenje in konec cvetenja (BBCH 61, 65 in 69). Pridobili smo tudi meteorološke podatke za omenjeni lokaciji.

Za ugotavljanje okuženosti klasov pšenice smo v razvojni fazi BBCH 71-75 (vodena do srednje zrelosti) naključno nabrali 3-krat po 30 klasov posamezne sorte pšenice in po 10-stopenjski skali (Stack in McMullen, 1998) vizualno ocenili okuženost klasov in izračunali povprečno okuženost posamezne sorte s fuzariozami.

2.1.3 Identifikacija *Fusarium* vrst na zrnju pšenice in določitev mikotoksina DON

Za vsako sorto oziroma hibrid smo po žetvi na obeh lokacijah vzeli reprezentativne vzorce zrnja. Odvzeli smo jih iz 30 kg vre, za vsako sorto po 2 kg. Polovico odvzetega vzorca smo uporabili za fitopatološko analizo, drugo polovico pa namenili za analizo na mikotoksine. V fitopatološkem laboratoriju smo po metodi, ki jo predpisuje ISTA (International Seed Testing Association), ugotavljali okuženost zrnja pšenice s fuzariozami in določili njihovo vrstno sestavo. Iz dela vzorca, namenjenega za fitopatološko analizo, smo za vsako sorto naključno odvzeli po 100 zrn, jih površinsko sterilizirali z 1 % raztopino Na-hipoklorita, dobro sprali s sterilno vodo in posušili na sterilnem vpojnem papirju. Po pet zrn smo v sterilnih razmerah dali v petrijevke premera 9 cm, ki so vsebovale 15 ml modificiranega PDA agarja (15 g PDA, 10 g tehnične agarje, 0,121 g penicilina G, 0,542 g streptomycin sulfata in dopolnjeno z destilirano vodo do 1000 ml). Antibiotik smo dodali po avtoklaviranju. Za vsako sorto smo tako uporabili po 20 petrijevk in skupaj fitopatološko analizirali 100 zrn. Tako nacepljene petrijevke smo inkubirali v rastni komori v temi pri 20 °C in 60 % r.v.z. Po desetdnevni

inkubaciji smo za vsakega vzorca pregledovali iz zrn z rastle kolonije gliv z mikroskopom pod 100 in 400-kratno povečavo. Naša opazovanja so bila osredotojena na morfologijo makrokonidijev, prisotnost oz. odsotnost mikrokonidijev ter drugih anatomsko morfoloških pokazateljev, pomembnih za identifikacijo vrst. Pri tem smo si pomagali z determinacijskimi ključi za vrste rodu *Fusarium* (Gerlach in Nirenberg, 1982; Burgess in sod. 1994; Summerell in sod., 2003; Leslie in Summerell, 2006). Vsebnost mikotoksina DON v vzorcih zrnja pšenice so določili v laboratoriju Inštituta za higieno in patologijo prehrane živali z ELISA-testom.

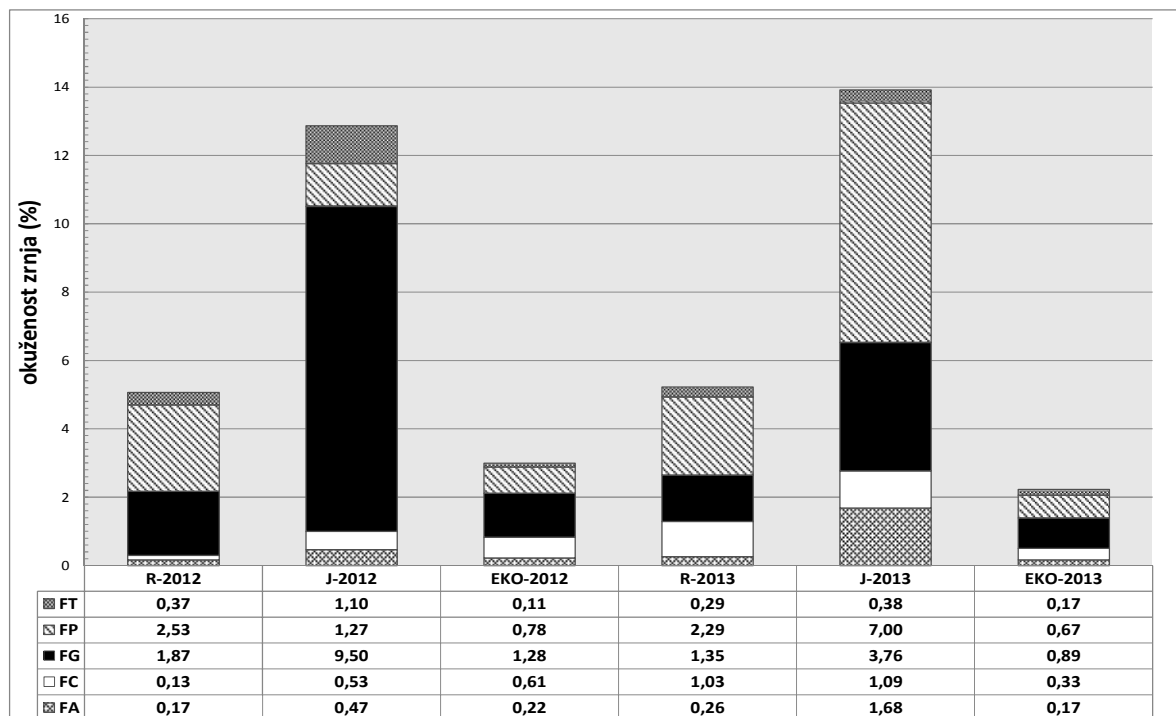
3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Okuženost klasov pšenice

Z 10-stopenjsko skalo (Stack in McMullen, 1998) smo vsako leto vizualno ocenili okuženost klasov in izračunali povprečno okuženost posamezne sorte s fuzariozami. Hoteli smo namreč ugotoviti, ali obstaja povezava med poljsko oceno okuženosti klasov, laboratorijsko ugotovljeno okuženostjo zrnja in vsebnostjo DON.

Povprečna okuženost klasov vseh preučevanih sort pšenice je bila v obeh letih (2012–13) na obeh lokacijah relativno majhna; v Jablah 3,52 oziroma 1,40 % in v Raki anu 1,87 oziroma 1,81 %. Če te rezultate primerjamo s tistimi, kjer smo ugotavljali okuženost zrnja pšenice v laboratoriju, ugotovimo, da poljska ocena okuženosti podcenjuje dejansko okuženost zrnja. To lahko razložimo s tem, da se fuzarioze na klasu od razvojne faze BBCH 71-75 progresivno razvijajo naprej vse do žetve pšenice in zaradi tega je poznejša okuženost večja. S statistično analizo podatkov smo pozneje ugotovili, da ni statistično značilne povezave med poljsko okuženostjo klasov in vsebnostjo DON v zrnju. Iz tega sledi, da z vizualno oceno okuženosti klasov na njivi ne moremo zadovoljivo napovedati, kakšna bo okuženost zrnja in posledično večja ali manjša onesnaženost z mikotoksini.

219



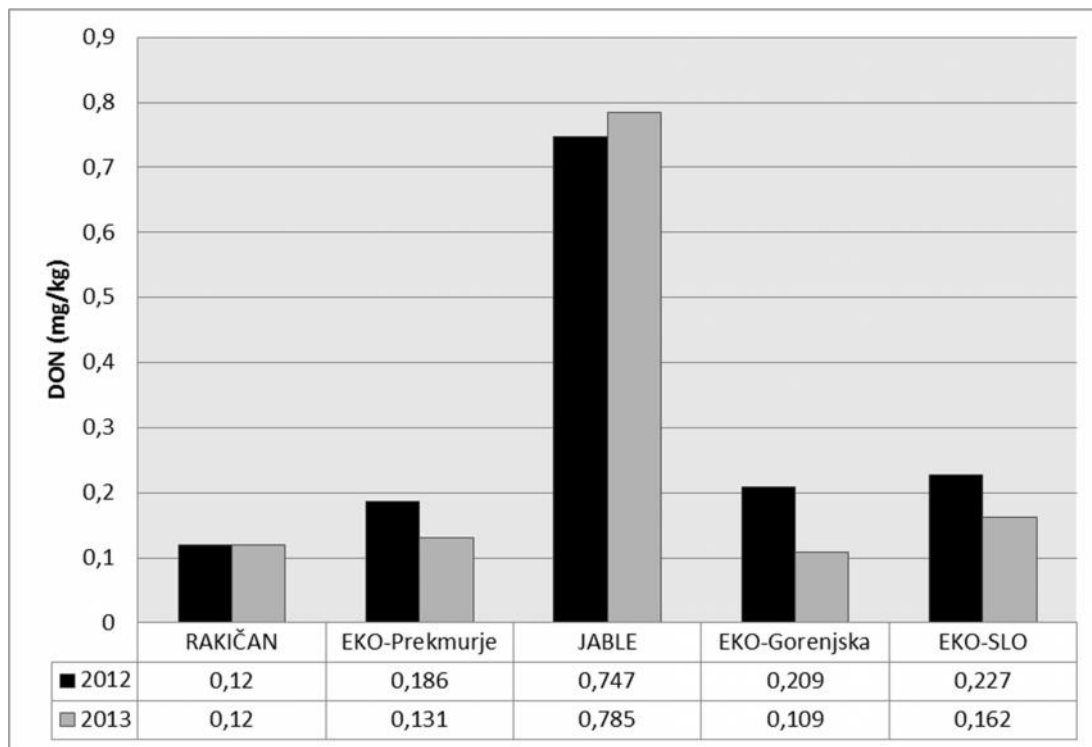
Slika 1: Povprečna okuženost zrnja vseh vzorcev (sort) pšenice v Raki anu (R), Jablah (J) in v ekološki pridelavi z različnimi vrstami gliv iz rodu *Fusarium* (FT - *F. tricinctum*, FP - *F. poae*, FG - *F. graminearum*, FC - *F. culmorum*, FA - *F. avenaceum*) v letih 2012-13.

3.2 Okuženost zrn pšenice

Po metodi, ki jo predpisuje ISTA, smo v laboratoriju ugotavljali okuženost zrn pšenice z glivami *Fusarium* spp. V povpre ju so bile sorte pšenice, ki so rastle v Jablah v letih 2012 in 2013, mnogo bolj okužene z fuzariozami kot sorte pšenice, ki so rastle v Raki anu. Tako je bila skupna okuženost zrnja s fuzariozami v Jablah v letu 2012 12,9 % in leta 2013 13,9 %, medtem ko je bila okuženost vzorcev pšenice iz Raki ana v istih letih 5,1 % oziroma 5,2 %. Vrstna sestava fuzarioz in njihov delež med okuženimi zrni se je spreminjal med lokacijami kakor tudi med leti (slika 1).

Povpre na okuženost zrnja pšenice iz ekološke pridelave (18 vzorcev) je bila v letih 2012 in 2013 izrazito manjša kot pri integrirano pridelani. Skupna okuženost s fuzariozami je bila leta 2012 v povpre ju 3 % in v letu 2013 2,2 %. e pogledamo samo odstotek okuženosti z vrstama *F. graminearum* in *F. culmorum*, ki sta potencialni tvorki mikotoksina DON, je v pridelovalnih sezonah 2012-13 njun skupni povpre ni delež v okuženih zrnih sort pšenice iz Jabel 10 % oziroma 4,9 % ter precej manjši v Raki anu: 2 % oziroma 2,4 %. Pri pšenici iz ekološke pridelave je bilo s prej omenjenima glivama v povpre ju okuženih 1,9 % (2012) in 1,2 % (2013) zrn. Precej manjšo povpre no okuženost pšenice iz ekološke pridelave velja pripisati dejstvu, da v tem na inu izvajajo precej bolj širok kolobar in ne samo dvopolje koruza-pšenica. Poleg tega velja omeniti, da ve ji del ekoloških pridelovalcev nima v kolobarju koruze ali pa pride na njivo šele po treh do štirih letih. Okuženi ostanki koruze imajo namre velik infekcijski potencial za okužbo pozneje posejane pšenice oz. ostalih strnih žit. Naše rezultate potrjuje tudi raziskava Birzele in sod. (2002) v Nem iji. Vrstni nabor gliv rodu *Fusarium* je bolj pester kot na pšenici iz integrirane pridelave, poleg tega so bile ugotovljene nekatere vrste, ki jih na zrnju iz integrirane pridelave nismo našli (*F. subglutinans*, *F. cerealis*, *F. solani* in *F. sporotrichioides*).

220



Slika 2: Povpre na vsebnost DON (mg/kg) za vse vzorce pšenice iz Raki ana, Jabel in ekološke pridelave v letih 2012-13.

3.3 Onesnaženost zrnja z mikotoksinom DON

Mo nejša okužba pšenice s fuzariozami, predvsem z glivama *F. graminearum* in *F. culmorum*, v Jablah se je izrazila tudi v povečani vsebnosti mikotoksina DON v zrnju. V obeh letih njegova povprečna vsebnost močno presega tiste, ugotovljene v zrnju pšenice, pridelane v Raki anu in ekološki pridelavi (slika 2).

4 SKLEPI

S statistično analizo pridobljenih podatkov v letih 2012-13 za 19 sort na lokacijah Jable in Raki an smo prišli do naslednjih ugotovitev.

- med sezonama ni bilo statističnih razlik v povprečni vsebnosti DON v zrnju pšenice;
- v povprečju obeh let se je vsebnost DON v Jablah (697 µg/kg) statistično razlikovala od tiste v Raki anu (130 µg/kg);
- vse sorte, vključno s raziskavo, so imele v dveletnem povprečju višje vsebnosti DON v Jablah kot v Raki anu. Vendar je bila ta razlika med lokacijama statistično značilna le pri naslednjih sortah: Alixan, Ketchum, Lord, Lukullus in SY Moisson. Pri sortah Ketchum in Lord je povprečna vsebnost v Jablah celo presegala zakonsko dovoljeno mejo 1250 µg/kg;
- po deležu okuženih klasov se med seboj statistično ne razlikujejo lokacije, niti rastne sezone in posamezne sorte;
- v Jablah je bilo v povprečju z glivami iz rodu *Fusarium* okuženih 12,9 % zrn, v Raki anu pa 5,4 %. Razlika je statistično značilna;
- v povprečju ni okuženosti zrn z vsemi fuzariozami v obeh letih med sortami ni statistično značilnih razlik;
- v Jablah je bila povprečna okuženost zrnja z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, potencialnima tvorkama DON, 7,1 % v Raki anu pa 2,5%. Razlika je statistično značilna;
- obstaja močna povezava med okuženostjo pšenice (izraženo v deležih) z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* ter vsebnostjo DON. ($r = 0,71$; $r^2 = 50,7$ %). Povezava je linearna: $DON = 0,0439 + 7,782 \times DFgFc$ (DFgFc je v deležih od 0,0 do 1; DON je izražen v mg/kg).

5 LITERATURA

- Birzele, B., Meier A., Hindorf, H., Krämer, J., Dehne, H.W. 2002. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in Rhineland, Germany. V: Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology, 108, 7: 675-684.
- Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 667-673.
- Bottalico, A., Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. V: Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 611-624.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd ed. Sydney: University of Sydney: 136 s.
- Gerlach, W., Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium* a pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanst. Ld – u Forstw. Berlin-Dahlem, 209: 406 str.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual, 1st edn. Ames, Backwell, 110, 4: 573-85.
- Logrieco, A., Mule, G., Morreti, G., Bottalico, A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. V: Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 597-609.

- Milevoj, L. 2002. Tri desetletja spremljanja fuzarioz (*Fusarium* spp.) pri koruzi. V: Tajnšek, Anton (ur.), Šantavec, Igor (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2002: zbornik simpozija [Zre e, 5. in 6. december 2002], ([Novi izzivi v poljedelstvu]). Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2002: 78-82.
- Kocjan A ko, D., Šantavec, I. 2010. Crop rotation on arable and livestock farms in Slovenia = Kolobar na poljedelsko-živinorejskih kmetijah v Sloveniji. *Acta agriculturae Slovenica*, 95, 3: 245–251.
- Stack, R.W., McMullen, M.P. 1998. A Visual Scale to Estimate Severity of Fusarium Head Blight in Wheat (<http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp1095.pdf>).
- Summerell, B.A., Salleh, B., Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87: 117–28.
- Zemlji , A., Rutar, R., Žerjav, M., Verbi , J. 2008. Vpliv sorte, gnojenja z dušikom, in razkuževanja semena na okuženost zrnja pšenice S *Fusarium* sp. in onesnaženost z mikotoksini. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2008, Rogaška Slatina, 4. in 5. december 2008. Tajnšek A. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 257–262.