Agrotest fyto, s.r.o.

Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s umělou inokulací obilnin fuzáriózami klasů

Kroměříž 2012

Agrotest fyto, s.r.o.

Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s umělou inokulací obilnin fuzáriózami klasů

Kroměříž 2012

Metodika vznikla využitím poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace, Rozhodnutí MZe ČR č. RO0211 ze dne 28. 2. 2011 a projektů MZe NAZV č. QI111B044 a QJ1210008.

Metodika prošla oponentním řízením a získala osvědčení o uplatnění certifikované metodiky vydané Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským: *194-10/KÚ/UKZUZ/2012*

Oponenti:

RNDr. Jan Nedělník, Ph.D., Zemědělský výzkum, s.r.o., Troubsko
Ing. Pavel Kraus Ph.D., ÚKZÚZ, Brno

ISBN 978-80-87555-09-5

Autoři:

Ludvík Tvarůžek
Pavel Matušinsky
Markéta Vyšohlídová

Obsah

1. Cíl metodiky 6
2. Úvod 6
3. Vlastní popis metodiky 7
4. Příprava inokula 8
5. Vlastní inokulace porostu 11
6. Hodnocení rozsahu napadení klasů 12
7. Závěr 14
8. Srovnání „novosti postupů“ 14
9. Popis uplatnění certifikované metodiky 14
10. Ekonomické aspekty 14
11. Seznam použité literatury 14
12. Seznam publikací, které předcházely metodice 15

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky jsou postupy přípravy inokula, zakládaní pokusů a vlastní umělé infekce suspenzí s konidiemi *Fusarium* spp. a následné hodnocení rozsahu napadení klasů fuzariózami. Metodika byla vytvořena za účelem provádění experimentů vedoucích k vyvinutí či testování chemického nebo biologického preparátu (např. fungicidu), či ošetření fyzikálního charakteru na potlačení klasových fuzarióz u obilnin nebo pro posouzení vlivu různých technologií zpracování půdy či jiných agronomických zásahů na rozvoj fuzarióz klasů obilnin. Dále je metodika určena pro hodnocení stupně odolnosti odrůd a linií obilnin k fuzariózám klasů např. ve šlechtitelském procesu.

2. Úvod

Fuzariózy klasů (anglicky *Fusarium head blight*, FHB) způsobené komplexem druhů rodu *Fusarium*, jsou rozšířeny celosvětově a patří mezi nejzávažnější choroby na obilninách. Fuzariózy klasu se u pšenice (Obr. 1) a ječmene projevují předčasným odumřením klasů nebo jejich zbělením. Onemocnění klasů fuzariózami je zvláště významné ve vlhčích oblastech. V případě napadení klasů může dojít k význačným ztrátám na výnosech způsobených sterilitou klásků a nedostatečně vyvinutými obilkami a také ke kontaminaci zrna mykotoxiny. Je známa celá řada druhů rodu *Fusarium*, které se podílejí na vzniku fuzarióz, ale mezi nejčastější a nejvýznamnější patří: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* a *F. poae*. Na území České republiky převažují *F. graminearum* a *F. culmorum*. Poslední studie ukazují zvyšující se zastoupení druhu *F. poae*. Škodlivost fuzarióz spočívá jednak v redukci výnosu, ale zejména ve schopnosti mnoha původců fuzarióz produkovat mykotoxiny. Fuzáriové mykotoxiny mohou způsobovat vážné zdravotní potíže jak u člověka, tak u hospodářských zvířat. Následně dochází k projevům chronické nebo akutní mykotoxikózy (trávicí potíže, poruchy plodnosti atd.). Nejvýznamnější fuzáriové mykotoxiny jsou trichoteceny zejména deoxynivalenol (DON) a nivalenol (NIV) a zearalenony (ZEA). Ke tvorbě výše uvedených zdraví škodlivých toxinů v zrnu dochází zejména při infekci druhy *F. graminearum* a *F. culmorum*. Existuje ale celá řada dalších toxinů, způsobovaných dalšími druhy fuzárií, jejich podrobný rozbor je však nad rámec předkládané metodiky.

Přesná diagnostika původců fuzarióz klasu je nezbytná pro pochopení faktorů podílející se na rozvoji onemocnění a akumulaci mykotoxinů. Mykologické určení jednotlivých druhů je

dosti obtížné i pro zkušeného fytopatologa, proto jsou v poslední době k rozvíjeny a zaváděny metody založené a polymerázové řetězové reakci (PCR). V současnosti jsou známy druhově specifické primery pro mnoho druhů rodu *Fusarium* např. pro *F. avenaceum* (Turner et al., 1998), *F. culmorum* a *F. graminearum* (Nicholson et al., 1998), *F. poae* (Parry et Nicholson, 1996). Mimoto jsou dostupné laboratorní metody pro přímé stanovení obsahu jednotlivých mykotoxinů v zrnu jako ELISA test či HPLC.

Obr. 1 Porost ozimé pšenice s příznaky fuzarióz klasů

3. Vlastní popis metodiky

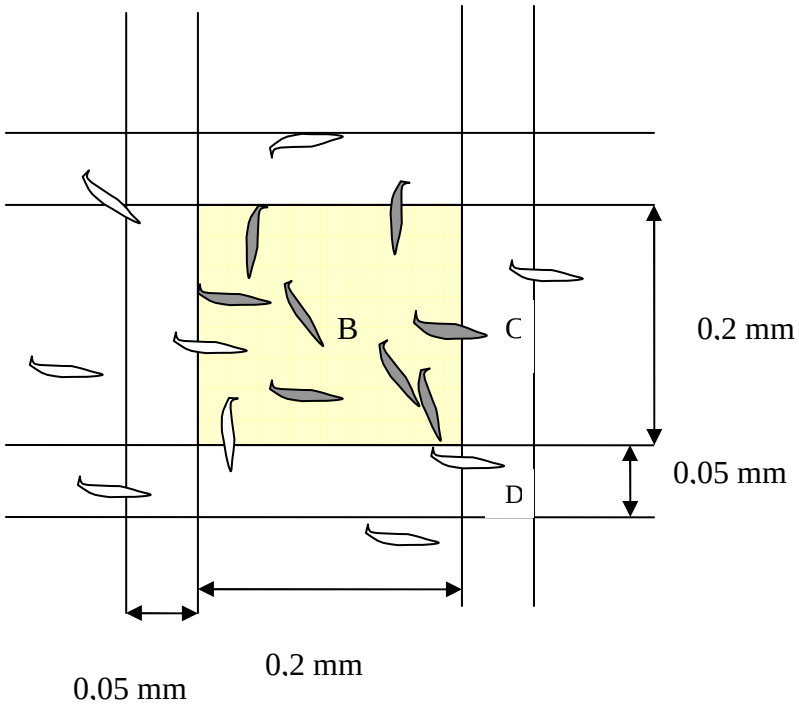
Následující text přináší podrobné návody přípravy inokula (suspenze konidií), aplikace inokula na porost (termín, koncentrace apod.) a vyhodnocení intenzity napadení klasů. V současné době není v ČR dostupná jednotná metodika pro provádění pokusů s umělou inokulací obilnin fuzáriemi.

4. Příprava inokula

Za účelem přípravy inokula jsou vybrány izoláty houby, pocházející z daného, testovaného druhu obilniny. Jako vhodná metoda pro produkci velkého množství inokula slouží pěstování houby na sterilovaných zrnech pšenice v Erlenmayerových baňkách (Obr. 2). Do skleněné baňky vložíme 50 g zrna pšenice, přidáme 40 ml destilované vody a autoklávujeme po dobu 20 minut při 120°C. Necháme vychladnout a znovu autoklávujeme za stejných podmínek. Po vychladnutí přidáme fragment agaru s příslušným kmenem fuzária. Po dobu zhruba 7 – 10 dnů umístíme pod UV lampu při teplotě 20°C a každý den důkladně protřepeme. Po stimulaci infekčního substrátu NUV světlem za účelem dosažení maximální sporulace je substrát usušen a uskladněn dlouhodobě (v rámci jedné sezóny) k následnému použití. Výběr druhu fuzária pro umělou inokulaci provádíme podle účelu experimentu. Pokud není cílem sledovat určitý kmen nebo druh fuzária provedeme inokulaci aplikací izolátu jednoho z dvou rozhodujících druhů klasových toxigenních fuzárií: *Fusarium graminearum* nebo *Fusarium culmorum* popř. směsí obou těchto u nás nejrozšířenějších druhů.

Obr. 2 Sterilní zrna pšenice porostlá *F. culmorum* sloužící jako médium pro přípravu inokula

Pro vlastní infekci je tedy kmen fuzária namnožen kultivační metodou na sterilovaných zrnech pšenice. Před inokulací si nejprve připravíme zásobní suspenzi. Substrát, obsahující zárodky patogena na 30 min. namočíme do vody a následně mikroskopicky **stanovíme počet konidií na 1 ml zásobní suspenze** (Bürkerova komůrka) (Obr. 3, 4).



Obr. 3 Bürkerova komůrka, rozdělení zorného pole na čtverce B, D a obdélník C dle velikosti. Počítáme konidie ve čtverci B. U konidií, které protínají okraj čtverce, započítáváme pouze ty, jež protínají horní a pravý okraj. Započítané konidie jsou vybarveny tmavě. Obsah mikroskopovaného množství u čtverce B je 0,04 mm^2 (0,2 mm x 0,2 mm). Objem u čtverce B je 0,004 mm^3 (0,04 mm^2 x výška 0,1 mm).

Zásobní suspenzi mikroskopujeme po umístění do Bürkerovy komůrky. Odečet konidií provedeme nejméně ve 4 opakováních. Následující vzorce platí pouze pro čtverec B (viz. obr. 3). Koncentrace v zásobní suspenzi se vypočte dle vzorce:

*Koncentrace konidií zásobní suspenze = [(celkový počet konidií ve všech opakováních / počtem opakování) / objem mikroskopovaného množství tj. 0,004 mm^3)]*1000*

Nebo jednodušší varianta

*Koncentrace konidií zásobní suspenze = (celkový počet konidií ve všech opakováních / počtem opakování) * 250 000*

Takto vypočteme množství konidií v 1 ml zásobní suspenze. Jelikož jsme zásobní suspenzi připravili v menším množství vody např. v 1 litru a koncentrace je při správném provedení velmi vysoká, můžeme nyní přistoupit k přípravě pracovní suspenze, kterou budeme aplikovat

na rostliny. Takové suspenze již budeme potřebovat mnohem větší množství. Koncentrace je u pracovní suspenze adjustována na 500 000 konidií na 1 ml. Tento výpočet ředění provedeme podle následujícího vzorce:

*Objem vody které je nutno přidat do zásobní suspenze = [(koncentrace konidií zásobní suspenze/koncentrace konidií pracovní suspenze)-1]*objem zásobní suspenze*

Před vlastní aplikací k suspenzi přidáme smáčedlo (např. Tween 20) v dávce 0,2 ml/l. Aplikace se provádí postřikem do klasu.

Obr. 4 Makrokonidie *F. culmorum* při přípravě roztoku pro umělou inokulaci v Bürkerově komůrce

Praktický příklad výpočtu:

Připravím si zásobní suspenzi ponořením inokulovaných zrn do 1 litru vody. Ve čtverci B Bürkerovy komůrky napočítám 17 konidií.

Výpočet koncentrace v zásobní suspenzi:

*17 / 0,004 * 1000 = 4 250 000 konidií/ml*

Výpočet ředění na pracovní suspenzi:

*(4 250 000/500 000 – 1) * 1 = 7,5 l*

Výsledek: Když přidám do 1 litru zásobní suspenze 7,5 litrů vody, získám celkem 8,5 l pracovní suspenze o koncentraci 500 000 konidií/ml. Jak snadné!

5. Vlastní inokulace porostu

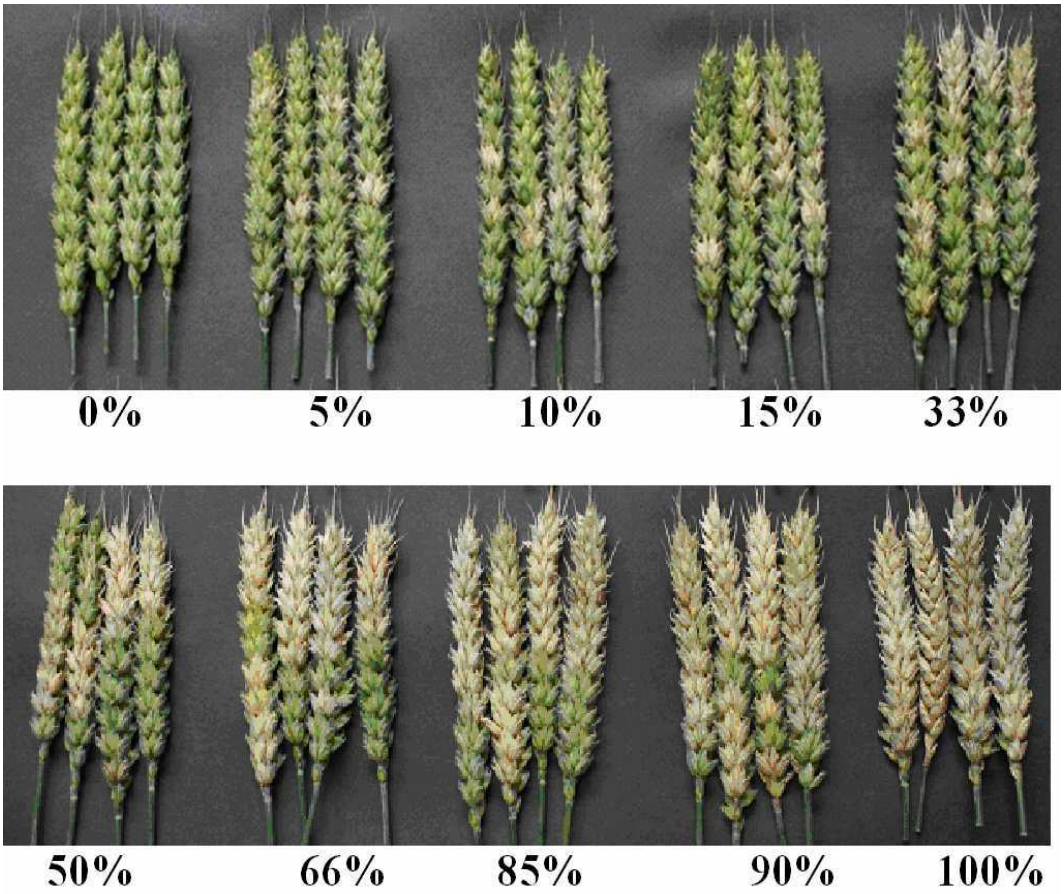
Ve vývojovém stádiu kdy 50% rostlin je v počátku květu (BBCH 61-64) je provedena inokulace kvetoucích porostů obilnin suspenzí konidií fuzárií. Pro zvýšení úspěšnosti inokulace je možno inokulaci opakovat týden po první inokulaci, tím infikujeme i klasy, které při první inokulaci ještě nekvetly. K tomuto účelu je nezbytné použít aplikační techniku, která zajistí aplikaci stálého a pro celý pokus shodného množství inokula. Koncentrace inokula je jednotně mikroskopicky adjustována na hodnotu 500 000 konidií/ ml suspenze (viz. předchozí kapitola). Objem postřikové suspenze na plochu porostu je 0,2 l /10 m^2. To odpovídá množství 200 l suspenze na hektar. Při koncentraci pracovní suspenze 500 000 konidií na mililitr je na 1 m^2 aplikováno 10 milionů konidií. Vždy je vhodné provést inokulaci navečer nebo nejlépe ve dnech, kdy není silné sluneční záření.

6. Hodnocení rozsahu napadení klasů

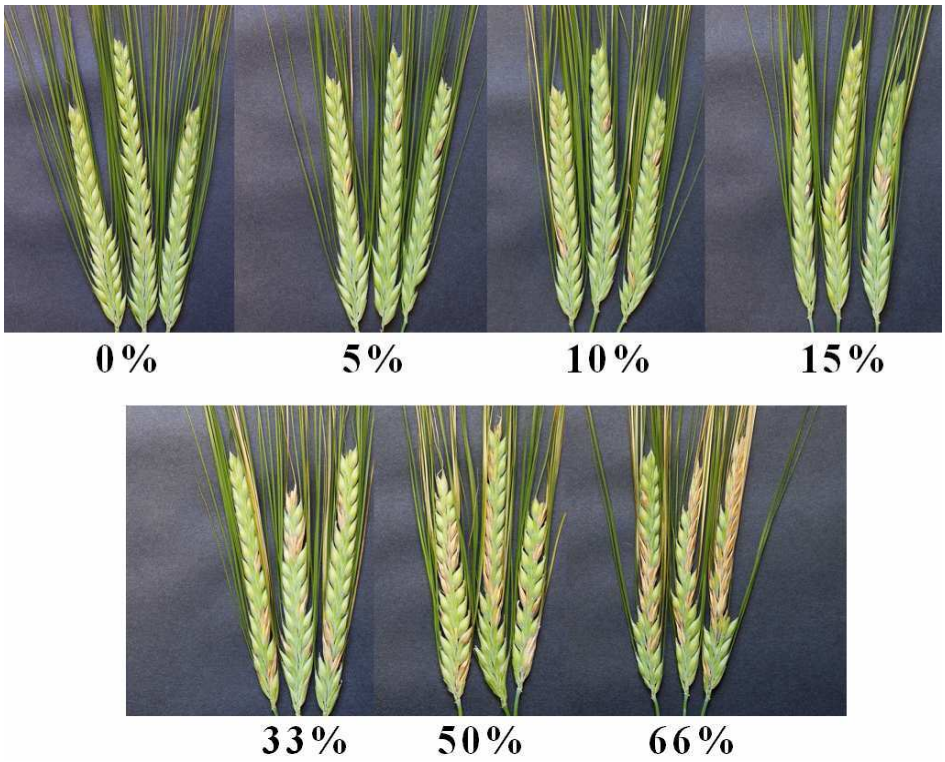
Vizuelní hodnocení je prováděno nejdříve v době dvou týdnů po inokulaci. Celý proces hodnocení končí po 1 měsíci od inokulace. Jako kritérium napadení je brán procentický podíl zaschlých klásků po napadení chorobou. K hodnocení je použita modifikovaná desetibodová stupnice Horsfall-Barretta. Většina pšenic pěstovaných v našich agroekologických podmínkách má průměrně 19-20 klásků na klas. Z toho je odvozeno, že jeden napadený klásek představuje 5% napadení, 2 klásky 10 % napadení, 3 klásky 15 % napadení. Následující třídy představují snadnější hodnocení proporcí mezi 1/3, 1/2 a 2/3 napadeného klasu. Poslední tři třídy charakterizují stav infekce, kdy zbývá zdravých 3, 2-1 a žádný klásků (Tab. 1). Graficky je náhled hodnocení vyobrazen na fotografiích Obr. 5 a 6. Hodnocení provádíme vždy na pěti náhodně vybraných svazcích stébel po 10 klasech sevřených do dlaně na pokusnou parcelu. Postupujeme tedy následovně. Uchopíme svazek stébel, který obsahuje 10 klasů. Každý klas ve svazku vyhodnotíme dle Tab. 1. Získáme tedy deset hodnot napadení. Takových svazků vyhodnotím na každé parcele pět. V případě, že máme každou variantu ve čtyřech opakováních, hodnotíme celkem 200 klasů v každé variantě (50 x 4). Postup je po získání cviku velmi rychlý.

Tab. 1 Vyjádření podílu napadených klásků fuzárií a převod na procenta.

Rozsah napadení	**% vyjádření napadení**
0 klásků	0
1 klásek	5
2 klásky	10
3 klásky	15
1/3 klasu	33
1/2 klasu	50
2/3 klasu	66
3 zdravé klásky	85
2-1 zdravé klásky	90
0 zdravých klásků	100



Obr. 5 Hodnocení rozsahu napadení klasů fuzariózami u pšenice



Obr. 6 Hodnocení rozsahu napadení klasů fuzariózami u ječmene

7. Závěr

Předkládaná metodika byla po několik let ověřována na pracovišti autorů. Postupy jsou důkladně propracovány a pro dané účely plně funkční.

8. Srovnání „novosti postupů“

Dosud nebyla v České republice zpracována jednotná metodika pro zakládání pokusů s umělou inokulací klasovými fuzáriemi. Tento nedostatek předkládaná metodika odstraňuje.

9. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro výzkumné a šlechtitelské subjekty, univerzity a odbornou veřejnost.

10. Ekonomické aspekty

Fuzariózy mají kromě nepříznivého vlivu na snížení výnosu mimořádně nepříznivý dopad na kontaminaci produkce mykotoxiny. Tyto látky sekundárního mechanismu patogenních hub rodu *Fusarium* mají celou řadu nepříznivých vlivů na zdraví zvířat a člověka. V případě, že by metodika alespoň nepatrnou částí přispěla k omezení tohoto nepříznivého vlivu mohly by být ekonomické přínosy teoreticky odhadnuty na miliony Korun českých.

11. Seznam použité literatury

Amelung, D.: Experiences with the isolation of plant pathogenic fungi. In: Proc. of the 4th Internat. symposium of the European Foundation for Plant Pathol., Diagnosis and identification of plant pathogens, Dahne at al. (ed.), 9-12.9.1996, Bonn, p. 35-36.

Hýsek, J., Váňová, M., Hajšlová, J., Radová, Z., Koutecká, J., Tvarůžek, L.: Fusarioses of barley with emphasis on the content of trichothecenes. Plant Protection Sci, 35, 1999, 3, s. 96-102.

Mesterházy, A., Bartok, T.: Effect of chemical control on FHB toxin contamination of wheat. 5th European Fusarium seminar, Szeged, Hungary, in: Cereal Research Communications, 25, 1997, 3/2: 781-783.

Mesterházy, A.: Fungicide control of fusarium scab and impact on toxin contamination. Fusarium head bligfht: global status and future prospects, proceedings of a workshop held at CIMMYT Mexico, 13-17.10.1996, p. 120-124.

Nicholson P., Simpson D.R., Wetson G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 17-37.

Parry D.W., Nicholson P., 1996. Development of PCR assays to detect *F. poae* in wheat. *Plant Pathology* **45**: 383-391.

Turner A.S., Lees A.K. Rezanoor H.N., Nicholson P., 1998. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricintum*. *Plant Pathology* **47**: 278-288.

Tvarůžek, L. Váňová, M., Chromý, Z.: Citlivost odrůd ozimé pšenice na napadení klasů houbovými chorobami (*Stagonospora nodorum* Berk. a *Fusarium culmorum* W.G.SM.). Rostl. výr., 42, 1996, 11, s. 489 - 494.

12. Seznam publikací, které předcházely metodice

Chrpova, J., Sip, V., Stockova, L, Stemberkova, L., Tvaruzek, L., 2011. Resistance to Fusarium Head Blight in Spring Barley Czech J. Genet. Plant Breed., 47, 2011 (2): 58–63

Nesvadba, Z., Vyhnanek, T., Jeziskova, I., Tvaruzek, L., Spunar, J., Pouch, M., 2008. Use of RAPD and AFLP markers for characterisation of winter barley genotypes for breeding to fusarium head blight resistance. Cereal Research Communications, 36 (1): 1-10

Vanova, M., Tvaruzek, L., Matusinsky, P., Hajslova, J., Lancova, K., Lacina, O., Kohoutkova, J. 2008. Fungicidal control of Fusarium head blight on winter wheat and fungicide residues in grain. Cereal Research Communications, 36, Supplement B: 723-725

Nesvadba, Z., Vyhnanek, T., Jeziskova, I., Tvaruzek, L., Spunarova, M., Spunar, J. 2006. Evaluation of spring barley genotypes with different susceptibility to Fusarium head blight using molecular markers. Plant Soil ane Environment, 52 (11): 485-491

ISBN 978-80-87555-09-5