

TOXIGENIC MICROMYCETES AND THEIR MYCOTOXINS ASSOCIATED WITH TRANSGENIC BT-MAIZE AND NONTRANSGENIC HYBRIDS OF MAIZE

TOXINOGENNÍ MIKROMYCETY A MYKOTOXINY NA TRANSGENNÍ BT-KUKUŘICI A NA NETRANSGENNÍCH HYBRIDECH KUKUŘICE

Slezáková L.

Katedra ochrany rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21, Praha 6, Česká republika.

E-mail: Slezakova@seznam.cz

ABSTRACT

In 2002-2004 a mycological examination of corn – transgenic and nontransgenic hybrids from two localities (Praha – Ruzyně and Ivanovice na Hané) was made. The main aim was isolation of toxigenic fungi, especially *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. The study material included five hybrids of maize - Bt-maize (enrichment with delta-endotoxin from soil bacteria *Bacillus thuringiensis*), nontransgenic hybrids with parasitic wasp *Trichogramma*, for biological control of ECB and between hybrids without any protection. In total, 84 taxa of microfungi were identified, 8 species belong to genus *Aspergillus*, 18 species to genus *Fusarium* and 25 species to genus *Penicillium*. A similar complex of micromycetes was recorded on Bt maize compared to the nontransgenic hybrids, but the frequency of toxigenic species was significantly reduced in Bt-maize when compared to mean of all nontransgenic hybrids. Bt-maize was found to be infected by toxigenic micromycetes at a lower level compared to nontransgenic hybrids and grain was found to contain lower amounts of three selected mycotoxins (FUM, DON and ZEA).

Keywords: maize, Bt-maize, *Bacillus thuringiensis*, toxigenic micromycetes, *Fusarium*, *Penicillium*, *Ostrinia nubilalis*, ECB, biological protection, *Trichogramma*, mycotoxins

ABSTRAKT

V letech 2002-2004 byl prováděn průzkum mykobioty transgenní a netransgenní kukuřice na dvou lokalitách (Praha-Ruzyně a Ivanovice na Hané). Hlavním cílem byla izolace toxinogenních mikromycetů, především druhů rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Studováno bylo pět variant kukuřice – Bt-kukuřice (obohacená o δ -endotoxin z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis*), netransgenní hybridy s biologickou ochranou pomocí parazitické vosičky rodu *Trichogramma* a hybridy kukuřice bez ochrany. Celkem bylo izolováno 84 taxonů hub, z toho 8 druhů patřilo do rodu *Aspergillus*, 18 druhů do rodu *Fusarium* a 25 druhů do rodu *Penicillium*. Na všech hybridech kukuřice bylo izolováno podobné spektrum mikromycetů, ale na Bt-kukuřici

byly frekvence potenciálně toxinogenních mikromycetů výrazně nižší. Bylo zjištěno, že Bt-kukuřice je napadána mikromycetami méně než netransgenní hybridy kukuřice a byl zjištěn u Bt-kukuřice také nižší obsah vybraných mykotoxinů (FUM, DON a ZEA).

Klíčová slova: kukuřice, Bt-kukuřice, *Bacillus thuringiensis*, toxinogenní mikromycety, *Fusarium*, *Penicillium*, *Ostrinia nubilalis*, ECB, biologická ochrana, *Trichogramma*, mykotoxiny

ÚVOD

Zavíječ kukuřičný (ECB) je nejvýznamnější škůdce kukuřice ve střední Evropě (Magg et al., 2003). Napadení kukuřice zavíječem se na území ČR už třetím rokem za sebou zvýšilo a v roce 2003 bylo v některých oblastech extrémně vysoké. Nejvíce napadena byla oblast střední a východní Moravy (Bagar, 2004). Housenky zavíječe kukuřičného způsobují škody svým žírem ve stéblech, případně v palicích kukuřice (Rotrekl, 2004). Další škody jsou způsobeny tím, že poranění umožňují vstup původcům houbových chorob do rostliny. Zde spočívá největší riziko v tom, že některé houby, zejména rodu *Fusarium*, produkují toxické látky (mykotoxiny), které mají nepříznivý vliv na zdravotní stav hospodářských zvířat (Bagar, 2002). Mykotoxiny patří k nejzávažnějším kontaminantům potravin. Vykazují u člověka i u zvířat širokou škálu biologických účinků. Tyto účinky představují pro člověka a hospodářská zvířata významná zdravotní rizika, jejichž dosah není dodnes komplexně zhodnocen (Ostrý et Ruprich, 1996; Bárta et al., 1998). Biologické účinky mykotoxinů jsou akutní a chronická toxicita, cytotoxicita, neurotoxicita, imunosupresivní účinky, teratogenita, mutagenita, karcinogenní a kancerostatické účinky (Betina, 1990).

Nejzávažnější škody nejen na porostech kukuřice, ale i následně na kvalitě produktů způsobují houby rodu *Fusarium*. Nejdůležitější druhy, které napadají kukuřici a jsou potenciální producenti mykotoxinů ve střední Evropě jsou *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. subglutinans* a *F. poae*, přičemž *F. graminearum* dominuje v jižních oblastech, zatímco severněji se vyskytuje *F. culmorum*. Druh *F. subglutinans* je nejvíce rozšířen v oblastech s vysokým napadením kukuřice zavíječem (Kokaisl et Prokeš, 1997).

Stále více používanou přímou ochranou proti zavíječi kukuřičnému je biologická ochrana pomocí parazitické vosičky rodu *Trichogramma*. Drobná vosička *Trichogramma evanescens* (drobněnka vejcožravá) je vaječný parazitoid, který klade vajíčka do vajíček hostitelských druhů motýlů (Bagar, 2002).

Jednou ze současných metod snížení ztrát výnosů kukuřice způsobené zavíječem kukuřičným je využívání kukuřice rezistentní k zavíječi kukuřičnému – Bt-kukuřice. Tato kukuřice nese ve své genetické výbavě gen získaný od bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt), který indukuje v rostlině produkci delta-endotoxinu, letálního pro škůdce. Rostlina se tak proti němu chrání sama, a to po celou dobu vegetace (Jirsák et Balšánek, 1999). Srovnávací studie (Magg et

al. 2001, 2002), ukazují výrazně nižší obsah mykotoxinů u transgenních hybridů kukuřice. Gatch et Munkvold (2002) také uvádějí výrazně nižší napadení stébel Bt-kukuřice druhu *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* než u ostatních hybridů kukuřice, jak při sledování přírodní infekce larvami, tak v infekčních pokusech se zavíječem kukuřičným. Clements et al. (2003) rovněž uvádějí, že Bt-kukuřice, obsahující Cry 1Ab protein v obilkách a pletivech, vykazuje menší koncentrace fumonisínů a snížení hniloby palic kukuřice. Také Munkvold et al. (1997, 1999) v experimentech shodně zjistili u Bt-kukuřice nižší koncentrace fumonisínů, snížení napadení palic a stébel zástupci rodu *Fusarium*.

MATERIÁL A METODIKA

V průběhu let 2002-2003 byly provedeny odběry palic kukuřice s viditelným požerkem od zavíječe kukuřičného a s patrným myceliem na povrchu kukuřice (*Zea mays* L.) v různém stupni zralosti ze dvou lokalit v České Republice, a to z Ivanovic na Hané a z Prahy-Ruzyně. Lokalita Ivanovice na Hané se nachází v oblasti typické pro pěstování kukuřice na zrno s pravidelným vysokým výskytem zavíječe kukuřičného. Lokalita Praha-Ruzyně se nachází v okrajové oblasti pěstování kukuřice na zrno s nepravidelným škodlivým výskytem zavíječe kukuřičného. Ve všech experimentech bylo přirozené napadení porostů zavíječem kukuřičným. Na obou lokalitách byly polní pokusy ve všech letech za sebou prováděny na stejné ploše, jako monokultura kukuřice. Pouze u Bt-kukuřice byly odebírány palice s mechanickým poškozením nebo viditelným myceliem na povrchu. V průběhu vegetace se jednalo o odběry předsklizňové a krátce po sklizni, usušení a uskladnění obilí o odběry posklizňové.

Na každé lokalitě byly použity 3 strategie ochrany vůči zavíječi kukuřičnému: 1) insektrezistentní Bt-kukuřice MON 810, tj. geneticky modifikovaná kukuřice s vneseným genem z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* (genetická ochrana), 2a) hybrid Monumental-izolinie bez Bt-toxinu (kontrolní varianta – agrotechnická ochrana), 2b) hybrid Monumental-izolinie bez Bt-toxinu biologicky ošetřen proti zavíječi kukuřičnému pomocí parazitické vosičky rodu *Trichogramma* (biologická ochrana), 3a) hybrid Raissa - náchylný k zavíječi kukuřičnému ze sortimentu hybridů povolených v ČR (kontrolní varianta – agrotechnická ochrana), 3b) hybrid Raissa biologicky ošetřený pomocí parazitické vosičky rodu *Trichogramma* (biologická ochrana).

Pro zjištění druhového spektra mikromycetů byly použity metody: přímá izolace viditelného mycelia z povrchu palice (přenos mycelia patrného pod binokulární lupou sterilní jehlou z povrchu palice na izolační média) a metoda omytí obilí (náhodně vybrané tři obilky z palice byly následně ponořeny do 5 ml sterilní vody a po dobu 2 minut třikrát třepány v ultrasonické třepačce). Omyté obilky byly přeneseny sterilní pinzetou na izolační média. Pro izolaci mikromycetů z uskladněné kukuřice byla použita metoda omytí a neomytí obilí. Jako základní izolační média byla použita: agar se sladovým extraktem (MEA), kukuřičný agar (CMA) a půdní agar s glukózou a bengálskou červení (SEGA). Petriho misky s izolačními médii byly inkubovány v termostatu ve tmě při 25°C.

Při druhové identifikaci zástupců rodu *Aspergillus* a *Penicillium* byla použita média MEA, CZ (Czapkův agar), CYA (Czapkův agar s kvasničným extraktem), DG 18 (agar s dichloranem a 18% glycerolu), AFPA

(*Aspergillus flavus* a *parasiticus* agar). K determinaci zástupců rodu *Fusarium* byla použita média: speciální živný agar (SNA), ovesný agar (OA) a bramboro-dextrózový agar (PDA). Jako určovací literatura sloužila Booth (1971), Brayford (1993), Burgess et al. (1988), Gerlach et Nirenberg (1982), Pitt (1979, 1991), Ramirez (1982), Raper et Fennell (1965), Raper et Thom (1949), Samson et al. (1996) a Seifert (1996).

V obilkách kukuřice bylo provedeno imunoenzymatické stanovení obsahu mykotoxinů soupravami ELISA s kalibrací certifikovanými standardy. Celkem bylo analyzováno 50 vzorků, jako vzorky sloužily namleté kukuřičné obilky. Analyzovány byly mykotoxiny: deoxynivalenol (DON), T-2 toxin, fumonisiny (FUM), zearalonon (ZEA) a aflatoxiny (AF). Testy ELISA byly provedeny ve Výzkumném ústavu pícninářském v Troubsku.

Získaná data byla zpracována metodami mnohorozměrné statistické analýzy v programu Canoco.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo provedeno 29 odběrů a zpracováno 315 vzorků kukuřice s hlavním cílem posoudit vliv napadení kukuřice zavíječem kukuřičným na následnou kontaminaci toxinogenními houbami, ale také zhodnotit vliv typu lokality, varianty pokusu a jejího ošetření na celkovou skladbu mykobioty obilek.

Tato práce byla zaměřena hlavně na sledování zastoupení hlavních producentů mykotoxinů, tedy rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*, ostatní izolované kmeny byly v mnoha případech určovány pouze na úrovni rodů. Také zhodnocení výskytu izolovaných druhů se týká pouze zástupců výše uvedených rodů.

Izolováno bylo celkem 83 taxonů mikroskopických hub náležejících do 25 rodů, včetně neurčených mycelií. Většina izolovaných druhů patří do oddělení Ascomycota a Zygomycota. Z celkového počtu mikromycetů bylo izolováno 51 druhů toxinogenních rodů *Aspergillus* (8 druhů), *Fusarium* (18 druhů) a *Penicillium* (25 druhů).

Soupis všech izolovaných taxonů hub.

Acremonium strictum W. Gams
Acremonium sp. div.
Alternaria alternata (Fr.) Keissl.
Alternaria tenuissima (Kunze) Wiltshire
Aspergillus flavus Link
Aspergillus fumigatus Fresen.
Aspergillus niger Tiegh.
Aspergillus ochraceus K. Wilh.
Aspergillus sclerotiorum G. A. Huber
Aspergillus ustus (Bainier) Thom et Church
Aspergillus versicolor (Vuill.) Tirab.
Aspergillus sp.
Chaetomium globosum Kunze
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A.deVries
Cladosporium herbarum (Pers.) Link
Cladosporium sphaerospermum Penz.
Epicoccum nigrum Link
Eurotium rubrum Jos. König et al.
Fusarium acuminatum Ellis et Everh.
Fusarium avenaceum (Corda) Sacc.

Fusarium cf. *avenaceum* (Corda) Sacc.
Fusarium culmorum (W. G. Sm.) Sacc.
Fusarium dimerum Penz.
Fusarium cf. *equiseti* (Corda) Sacc.
Fusarium graminearum Schwabe
Fusarium oxysporum Schltdl.
Fusarium poae (Peck) Wollenw.
Fusarium proliferatum (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach et Nirenberg
Fusarium sambucinum Fuckel
Fusarium solani (Mart.) Sacc.
Fusarium cf. *solani* (Mart.) Sacc.
Fusarium sporotrichioides Sherb.
Fusarium subglutinans (Wollenw. et Reinking) P. E. Nelson, Tousson et Marasas
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg
Fusarium tricinum (Corda) Sacc.
Fusarium sp. div.
Geomyces pannorum (Link) Sigler et J. W. Carmich.
Geosmithia putterillii (Thom) Pitt
Geotrichum candidum Link
Gonatobotrys simplex Corda
Hormiactis sp.

Mucor circinelloides Tiegh.
Mucor hiemalis Wehmer
Mucor sp. div.
Paecilomyces cf. *lilacinus* (Thom) Samson
Penicillium brevicompactum Dierckx
Penicillium canescens Sopp
Penicillium citreonigrum Dierckx
Penicillium crustosum Thom
Penicillium digitatum (Pers.: Fr.) Sacc.
Penicillium expansum Link
Penicillium griseofulvum Dierckx
Penicillium hordei Stolk
Penicillium chrysogenum Thom
Penicillium islandicum Sopp
Penicillium cf. *islandicum* Sopp
Penicillium minioluteum Dierckx
Penicillium cf. *minioluteum* Dierckx
Penicillium oxalicum Currie et Thom
Penicillium pulvillorum Turfitt
Penicillium purpurogenum Stoll
Penicillium cf. *purpurogenum* Stoll

Penicillium purpurogenum var. *rubri-sclerotium* Thom
Penicillium simplicissimum (Oudem.) Thom
Penicillium cf. *spinulosum* Thom
Penicillium thomii Maire
Penicillium cf. *variabile* Sopp
Penicillium viridicatum Westling
Penicillium sp. div.
Penicillium sp. (subg. *Aspergilloides*)
Phialophora fastigiata (Lagerb. et Melin) Conant
Phoma sp.
Rhizopus arrhizus A. Fisch.
Rhizopus stolonifer (Ehrenb.) Vuill.
Rhizopus sp.
Scopulariopsis brumptii Salv.-Duval
Spiniger meineckellus (A. J. Olson) Stalpers
Talaromyces trachyspermus (Shear) Stolk et Samson
Trichoderma sp.
Verticillium sp. div.
Ulocladium chartarum (Preuss) E. G. Simmons
 mycelia sterilia
 arthrosporická houba

Nejčastěji byly izolovány ze zástupců rodu *Aspergillus* druhy *Aspergillus versicolor* (frekvence výskytu 17,0%), *Aspergillus fumigatus* (6,5%), *Aspergillus ochraceus* (6,1%), *Aspergillus flavus* (4,8%), ze zástupců rodu *Fusarium* se nejčastěji vyskytovaly druhy *Fusarium verticillioides* (40,0%), *Fusarium subglutinans* (34,4%), *Fusarium proliferatum* (19,1%), *Fusarium oxysporum* (12,2%) a *F. sporotrichioides* (5,2%) a ze zástupců rodu *Penicillium* se nejčastěji vyskytoval druh *Penicillium crustosum* (7,4%). V Tab. 1 jsou uvedeny druhy mikroskopických hub rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* izolované ze vzorků kukuřice z předsklizňových a posklizňových odběrů z lokalit Praha-Ruzyně a Ivanovice na Hané v letech 2002-2003.

Tab. 1 – Druhy mikroskopických hub rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* izolované ze vzorků kukuřice z předsklizňových a posklizňových odběrů z lokalit Praha-Ruzyně a Ivanovice na Hané v letech 2002-2003. Zvýrazněné druhy se vyskytovaly ve více než 10 vzorcích. Frekvence výskytu druhu je vypočtena z celkového počtu 230 vzorků.

Izolované taxony	Počet vzorků	Frekvence výskytu %
<i>Aspergillus flavus</i>	11	4,8
<i>A. fumigatus</i>	15	6,5
<i>A. niger</i>	2	0,9
<i>A. ochraceus</i>	14	6,1
<i>A. sclerotiorum</i>	4	1,7
<i>A. versicolor</i>	39	17,0
<i>A. sp.</i>	1	0,4
<i>Eurotium rubrum</i>	2	0,9
<i>Fusarium acuminatum</i>	1	0,4
<i>F. avenaceum</i>	4	1,7
<i>F. cf. avenaceum</i>	1	0,4
<i>F. culmorum</i>	2	0,9
<i>F. cf. equiseti</i>	1	0,4

<i>F. graminearum</i>	1	0,4
<i>F. oxysporum</i>	28	12,2
<i>F. poae</i>	6	2,6
<i>F. proliferatum</i>	44	19,1
<i>F. solani</i>	1	0,4
<i>F. sporotrichioides</i>	12	5,2
<i>F. subglutinans</i>	79	34,4
<i>F. tricinctum</i>	1	0,4
<i>F. verticillioides</i>	92	40,0
<i>F. sp. div.</i>	9	3,9
<i>Penicillium brevicompactum</i>	5	2,2
<i>P. canescens</i>	1	0,4
<i>P. citreonigrum</i>	1	0,4
<i>P. crustosum</i>	17	7,4

<i>P. digitatum</i>	1	0,4
<i>P. expansum</i>	4	1,7
<i>P. hordei</i>	9	3,9
<i>P. chrysogenum</i>	7	3,0
<i>P. islandicum</i>	2	0,9
<i>P. cf. islandicum</i>	2	0,9
<i>P. minioluteum</i>	3	1,3
<i>P. cf. minioluteum</i>	2	0,9
<i>P. oxalicum</i>	5	2,2
<i>P. pulvillorum</i>	2	0,9
<i>P. purpurogenum</i>	3	1,3
<i>P. cf. purpurogenum</i>	1	0,4
<i>P. purpurogenum</i> var. <i>rubrisclerotium</i>	7	3,0
<i>P. cf. spinulosum</i>	1	0,4
<i>P. cf. variable</i>	1	0,4
<i>P. sp. div.</i>	6	2,6
<i>Talaromyces</i> <i>trachyspermus</i>	1	0,4

Tab. 2 – Frekvence výskytu izolovaných druhů na variantách pokusu z lokality Praha-Ruzyně z odběrů předsklizňových a posklizňových v letech 2002 a 2003. Zvýrazněné jsou druhy, jejichž frekvence výskytu přesahovala průměr nad 5%. Vysvětlivky - varianty pokusu: 1 - Bt-kukuřice, 2 - Raissa, 3 - Raissa + Trichogramma, 4 - Izolinie, 5 - Izolinie + Trichogramma, L1 – lokalita Praha-Ruzyně, L2 – lokalita Ivanovice na Hané

Varianta pokusu	1		2		3		4		5		Průměr	
Lokalita	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2
Druh houby												
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	14,6	0	4,2	0	0	0	2,1	2,3	4,2	0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,2	2,3	4,2	2,3	6,3	4,5	4,2	4,5	0	0	3,8	2,7
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	2,1	2,3	0	0	0	0	0	0	0,4	0,5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	4,2	2,3	10,4	6,8	2,1	0	2,1	0	0	2,3	3,8	2,3
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	2,1	0	4,2	0	2,1	0	0	0	0	0	1,7	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	12,5	11,4	6,3	15,9	14,6	2,3	6,3	6,8	2,1	6,8	8,4	8,6
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0	0	0,4	0
<i>Eurotium rubrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	2,3	0,4	0,5
<i>Fusarium acuminatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3	0	0,5
<i>Fusarium avenaceum</i>	2,1	0	2,1	0	0	0	0	0	2,1	2,3	1,3	0,5
<i>Fusarium</i> cf. <i>avenaceum</i>	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0
<i>Fusarium culmorum</i>	0	0	0	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0,9
<i>Fusarium</i> cf. <i>equiseti</i>	0	0	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0,5
<i>Fusarium graminearum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0,4	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,3	4,5	0	13,6	2,1	6,8	2,1	9,1	0	18,2	2,1	10,4
<i>Fusarium poae</i>	2,1	0	0	0	2,1	4,5	0	4,5	0	0	0,8	1,8
<i>Fusarium proliferatum</i>	2,1	2,3	8,3	13,6	10,4	18,2	10,4	4,5	10,4	13,6	8,3	10,4
<i>Fusarium solani</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0,4	0
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	2,1	0	0	0	4,2	2,3	6,3	6,8	2,1	0	2,9	1,8
<i>Fusarium subglutinans</i>	6,3	22,7	2,1	25,0	0	31,8	4,2	34,1	0	52,3	2,5	33,2
<i>Fusarium tricinctum</i>	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0
<i>Fusarium verticillioides</i>	6,3	20,5	35,4	22,7	27,1	36,4	8,3	20,5	2,1	15,9	15,8	23,2
<i>Fusarium</i> sp. div.	2,1	0	0	4,5	4,2	2,3	4,2	2,3	0	0	2,1	1,8
<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,1	2,3	2,1	0	0	0	0	2,3	0	2,3	0,8	1,4
<i>Penicillium canescens</i>	0	0	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0,4	0
<i>Penicillium citreonigrum</i>	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
<i>Penicillium crustosum</i>	2,1	0	8,3	9,1	2,1	6,8	2,1	4,5	0	2,3	2,9	4,5
<i>Penicillium digitatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0,4	0
<i>Penicillium expansum</i>	0	2,3	0	2,3	2,1	0	0	0	0	2,3	0,4	1,4
<i>Penicillium hordei</i>	2,1	0	2,1	0	6,3	0	4,2	2,3	0	2,3	2,9	0,9
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,3	0	2,1	0	2,1	2,3	2,1	0	0	0	2,5	0,5
<i>Penicillium islandicum</i>	0	2,3	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,5
<i>Penicillium</i> cf. <i>islandicum</i>	0	0	0	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0,9
<i>Penicillium minioluteum</i>	2,1	0	0	0	2,1	2,3	0	0	0	0	0,8	0,5
<i>Penicillium</i> cf. <i>minioluteum</i>	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3	0,4	0,5
<i>Penicillium oxalicum</i>	0	0	0	0	6,3	0	0	2,3	0	2,3	1,3	0,9
<i>Penicillium pulvillorum</i>	0	0	0	0	2,1	0	0	0	2,1	0	0,8	0
<i>Penicillium</i> cf. <i>purpurogenum</i>	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0,5
<i>Penicillium purpurogenum</i>	2,1	0	2,1	2,3	0	0	0	0	0	0	0,8	0,5
<i>Penicillium purpurogenum</i> var. <i>rubrisclerotium</i>	2,1	0	0	0	2,1	0	4,2	0	6,3	0	2,9	0
<i>Penicillium</i> cf. <i>spinulosum</i>	0	0	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0,5
<i>Penicillium</i> cf. <i>variabile</i>	0	0	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0,4	0
<i>Penicillium</i> sp. div.	0	0	0	0	0	0	6,3	2,3	4,2	0	2,1	0,5
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	0	0	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0,5
Celkem druhů mikromycetů	21	11	17	15	21	15	15	14	13	16	36	33

V Tab. 2 jsou uvedeny celkové frekvence výskytu druhů, které byly izolovány po oba roky na lokalitě Praha-Ruzyně a Ivanovice na Hané v předsklizňových a posklizňových odběrech na jednotlivých variantách pokusu. V nejvíce vzorcích se na lokalitě Praha-Ruzyně vyskytovaly druhy *Aspergillus versicolor* (8,4%), *Fusarium proliferatum* (8,3%) a *F. verticillioides* (15,8%), na lokalitě Ivanovice na Hané se nejvíce vyskytovaly druhy *Aspergillus versicolor* (8,6%), *Fusarium oxysporum* (10,4%), *F. proliferatum* (10,4%), *F. subglutinans* (33,2%) a *F. verticillioides* (23,2%).

Mykotoxiny

V roce 2002 nebyl v obilcích Bt-kukuřice detekován v žádném vzorku z obou lokalit ani jeden ze čtyř hodnocených mykotoxinů. Výskyt mykotoxinů byl vyšší v obilcích kukuřice z lokality Ivanovice na Hané než v obilcích z lokality Praha-Ruzyně. Z obilků z lokality Ivanovice na Hané byl zjištěn výskyt všech čtyř hodnocených mykotoxinů (ZEA, DON, T-2 toxin, FUM). Nejvyšší frekvence výskytu i průměrné hodnoty výskytu byly zjištěny u toxinu DON. Z obilků kukuřice z lokality Praha-Ruzyně byly zjištěny pouze mykotoxiny ZEA a DON.

V roce 2003 byly zjišťovány mykotoxiny produkované zástupci rodů *Fusarium* (ZEA, DON, FUM) a *Aspergillus* (AFL). V žádném z analyzovaných vzorků nebyly zjištěny mykotoxiny nad jejich detekovatelnou hladinou (LOQ – Limit for quantification).

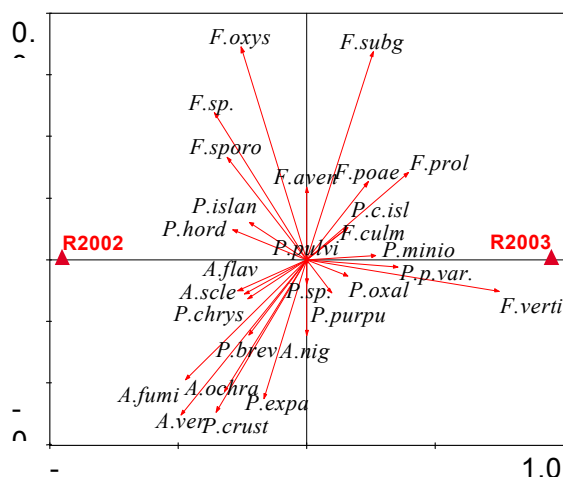
Vliv proměnných prostředí

Postupný výběr nezávislých proměnných prostředí v RDA analýze (Redundancy analysis) pomocí Monte Carlo permutačních testů byl použit pro zjištění, které proměnné prostředí jsou nejvíce důležité pro mykobiotu kukuřice. Z analýzy vyplývá, že 38% celkové variability mykobioty kukuřice lze vysvětlit proměnnou prostředí – roky, tedy mykobiota kukuřice byla nejvíce rozdílná v jednotlivých rocích. Statisticky průkazný je i vliv ostatních proměnných prostředí. Typ odběru (předsklizňový, posklizňový) vysvětluje 25% celkové variability mykobioty, další vliv má i lokalita (22%) a varianta pokusu (11%). Nejmenší vliv na vysvětlení variability mykobioty kukuřice má použití rozdílné metodiky.

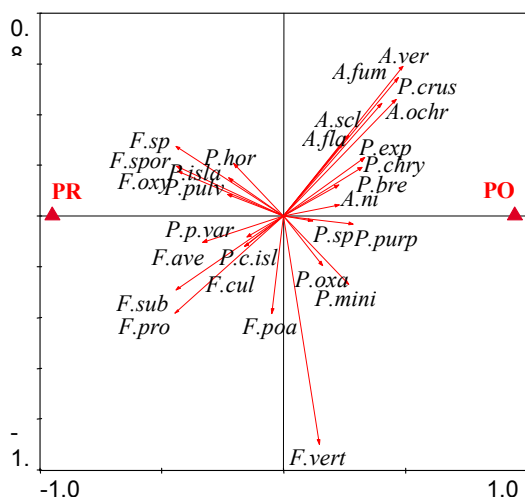
Vliv roku, typu odběru a lokality

Z přímých technik mnohorozměrné analýzy byla zvolena analýza RDA. Testovala se závislost mykobioty na typu odběru, lokalitě a roku. Test kanonických os vyšel průkazný u všech testovaných proměnných (P-value = 0,002). Při testování průkaznosti u variant pokusu, vyšlo P-value 0,554, tedy jde o neprůkazný vliv této proměnné prostředí na mykobiotu kukuřice.

Při analýze proměnné roky, byly jako kovariáty použity lokalita a varianta pokusu. V obr. 1 je oddělen druh *Fusarium verticillioides*, dále *F. culmorum*, *Penicillium minioluteum*, *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium*, *P. oxalicum*, které se vyskytovaly jen v roce 2003. Jen v roce 2002 se vyskytovaly druhy *P. hordei*, *P. islandicum*, *A. flavus*, *A. sclerotiorum*. Druhy *A. niger*, *P. sp.*, *P. pulvillorum*, *Fusarium avenaceum* se vyskytovaly v obou letech. Druhy se vzdálenými šipkami od proměnné prostředí se vyskytovaly v obou letech, ale byly ovlivněny dalšími proměnnými prostředí.

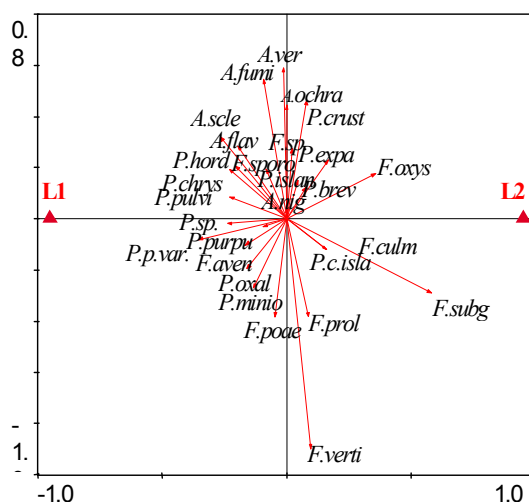


Obr. 1 - Grafický výstup z přímé analýzy RDA. Znázornění pozice jednotlivých druhů ve vztahu k proměnné prostředí – roku.



Obr. 2 - Grafický výstup z přímé analýzy RDA. Znázornění pozice jednotlivých druhů ve vztahu k proměnné prostředí – typu odběru (PR- předsklizňový, PO- posklizňový odběr).

Při analýze proměnné typ odběru, byly jako kovariáty použity lokalita a varianta pokusu. Randomizace proběhla v blocích daných lokalitou a byl použit split-plot design. V obr. 2 jsou odlišeny druhy vyskytující se jen v předsklizňových a jen v posklizňových odběrech. Pouze v posklizňových odběrech se vyskytovaly druhy *Aspergillus niger*, *A. flavus* a všichni uvedení zástupci rodu *Aspergillus* spolu s druhy rodu *Penicillium* – *P. purpurogenum*, *P. expansum*, *P. crustosum*. Pouze v předsklizňových odběrech se vyskytovaly druhy *Fusarium avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. sp.*, *Penicillium pulvillorum*, *P. islandicum*. Druhy, jejichž šipky směřují mimo proměnné prostředí, jsou ovlivňovány ještě dalšími proměnnými prostředí než je typ odběru. Jedná se např. o druh *Fusarium verticillium*, *F. poae*.



Obr. 3 - Grafický výstup z přímé analýzy RDA. Znázornění pozice jednotlivých druhů ve vztahu k proměnné prostředí –lokalitě (L1- Praha-Ruzyně, L2- Ivanovice na Hané).

Při analýze závislosti mykobioty na lokalitě byly jako kovariáty použity varianty pokusu a typ odběru. V obr. 3 jsou druhy odděleny podle výskytu na lokalitách. Druhy nejsou výrazně rozděleny k jednotlivým lokalitám, protože se většinou vyskytovaly na obou. Např. druhy *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinans* se vyskytovaly na obou lokalitách, ale na lokalitě L2 (Ivanovice na Hané) se vyskytovaly ve vyšších frekvencích. Druhy *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus* jsou opět ovlivňovány dalšími proměnnými prostředí.

Zkratky druhů používaných ve statistických analýzách:

A. flav. – *Aspergillus flavus*, *A. fumi.* – *Aspergillus fumigatus*, *A. nig.* – *Aspergillus niger*, *A. ochra.* – *Aspergillus ochraceus*, *A. scler.* – *Aspergillus sclerotiorum*, *A. ver.* – *Aspergillus versicolor*, *F. aven.* – *Fusarium avenaceum*, *F. culm.* – *Fusarium culmorum*, *F. oxys.* – *Fusarium oxysporum*, *F. poae* – *Fusarium poae*, *F. prol.* – *Fusarium proliferatum*, *F. sporo.* – *Fusarium sporotrichioides*, *F. subg.* – *Fusarium subglutinans*, *F. verti.* – *Fusarium verticillioides*, *F. sp.* – *Fusarium sp. div.*, *P. brev.* – *Penicillium brevicompactum*, *P. crust.* – *Penicillium crustosum*, *P. expa.* – *Penicillium expansum*, *P. hord.* – *Penicillium hordei*, *P. chrys.* – *Penicillium chrysogenum*, *P. islan.* – *Penicillium islandicum*, *P. c. islan.* – *Penicillium cf. islandicum*, *P. minio.* – *Penicillium minioluteum*, *P. oxal.* – *Penicillium oxalicum*, *P. pulvi.* – *Penicillium pulvillum*, *P. purpu.* – *Penicillium purpurogenum*, *P.p.v.r.* – *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium*, *P.sp.* – *Penicillium sp.div.*

Mykobiota netransgenní kukuřice

Na rozdíl od prací Nedělníka (1999, 2001), který z lokalit jižní a střední Moravy za dva roky izoloval ze vzorků kukuřice (přímo z palic nebo ze skladu) jen 7 druhů rodu *Fusarium*, bylo izolováno za stejnou dobu celkem 18 druhů tohoto rodu. Dále se liší i druhy, které uvádí jako nejčastější kontaminanty kukuřice, a to *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* a *F. avenaceum*, které byly izolovány jen z menšího množství vzorků. Jak uvádějí Logrieco et al. (2002), za posledních 10 let byl nejčastější izolovaný druh rodu *Fusarium* v Evropě *Fusarium verticillioides*, spolu s druhem *F. subglutinans* a následovani druhem *F. graminearum*. I druh *F. proliferatum* je často uváděn z izolací z Evropy. Druhy sekce *Discolor* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*) převážně působí hniloby kukuřice nenapadené zavíječem, zatímco druhy sekce *Liseola* (*F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*) se vyskytují na kukuřici napadené zavíječem. Tímto by byl vysvětlen

vysoký výskyt druhů sekce *Liseola* v této práci, protože byly odebírány pouze palice napadené zavíječem, a proto se výsledky lišily od prací Nedělníka (1999, 2001). Mezi nejčastěji izolované druhy tedy patřily *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides* a *F. subglutinans*, což je srovnatelné s literaturou (Bakan, 2001). I Šrobárová (2000) uvádí tyto druhy jako nejčastěji izolované na Slovensku, i když se vyskytoval poměrně často i druh *F. graminearum*. Všechny ostatní izolované druhy uvedené autorkou ze Slovenska jsou shodné s druhy, které byly izolovány v této práci. Cotten et Munkvold (1998) izolovali tyto tři druhy z kukuřičných zbytků na poli i po 630 dnech, z čehož vyplývá, že se jedná o dlouhodobý zdroj zástupců rodu *Fusarium*, a proto je důležité zpracování posklizňových zbytků a hluboká orba (Sácká et Bosák, 2002). Logrieco et al. (1993) uvádějí druh *Fusarium subglutinans* také za nejčastější druh napadající kukuřici v Polsku. Podle výsledků se jedná, vedle druhu *Fusarium verticillioides*, také o nejčastější druh z izolací z kukuřice v ČR (Tab. 1), i když není dosud uveden autory z ČR, ale pouze ze SR (Piecková et Jesenská, 1999 a Šrobárová 2000). Jak uvádí práce Kokaisl et Prokeš (1997), druh *Fusarium subglutinans* je nejvíce rozšířen v oblastech s vysokým napadením kukuřice zavíječem kukuřičným, čemuž odpovídají i výsledky této práce. V Rakousku je napadeno 80-90% porostu s vyšším výskytem zavíječe právě tímto druhem. Tento druh byl nejčastěji izolován po oba roky na lokalitě Ivanovice na Hané (viz Tab.2), kde byl výskyt zavíječe kukuřičného vyšší než na lokalitě Praha-Ruzyně. Tento druh je na kukuřici velmi častý, způsobující hniloby stébel a palic hlavně v mírném pásmu, jak uvádí Logrieco et al. (1993). Optimum růstu druhu *F. subglutinans* je při nižších teplotách (Šrobárová, 2000). Vysoký výskyt druhu *F. verticillioides* vysvětlují ve své práci Cotten et Munkvold (1998), kdy při vhodných podmínkách dojde k velkému pomnožení druhu na listech nebo zbytcích a následně pomocí hmyzu, deště či větru se mohou spory rozšiřovat na další části rostliny nebo na další pole.

Druhy *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides* a *F. subglutinans*, které byly často izolovány, podle Chelkowski (1989), Logrieco et al. (2002), Miller (2001) a Munkvold (2003) způsobují tzv. růžovou hnilobu. I v Polsku se vyskytuje v 95% tato hniloba. Růžová hniloba se vyskytuje hlavně v sušších a teplejších oblastech. Tzv. červenou hnilobu způsobují druhy, které byly izolovány jen zřídka (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* a *F. tricinctum*) a objevuje se hlavně v oblastech s vyššími srážkami a nízkými teplotami během léta. Většina z uvedených druhů způsobujících červenou hnilobu byla izolována v roce 2002, bohatším na srážky a s nižšími teplotami.

Mykobiota transgenní kukuřice

Studie o transgenní kukuřici uvádějí (Clements et al., 2003; Gatch et Munkvold 2002; Magg et al., 2002), že výskyt zavíječe kukuřičného v porostu Bt-kukuřice je výrazně nižší na rozdíl od netransgenní kukuřice. V této studii byl výskyt zavíječe kukuřičného po oba studované roky dokonce nulový. V porostu nebyla nalezena napadená a poškozená rostlina s požitky od zavíječe kukuřičného, pro kterého byl letální toxin obsažený v Bt-kukuřici (Kocourek, 2001; Ondřej, 2003). Lze tedy považovat Bt-kukuřici za vysoce účinnou v obraně proti škůdci zavíječi kukuřičnému.

Podle výsledků se mykobiota transgenní kukuřice výrazně neliší od mykobioty kukuřice netransgenní. Na Bt-kukuřici byly celkem za oba roky izolovány shodné druhy mikromycetů s ostatními variantami pokusu. Avšak druhy izolované na Bt-kukuřici se vyskytovaly s nižší frekvencí. Nelze tedy říct, že by se mykobiota kukuřice transgenní a netransgenní výrazně lišila nebo se mikroskopické houby na Bt-kukuřici nevyskytovaly vůbec. Poškození zavíječem kukuřičným není tedy jedinou příčinou napadení kukuřice mikromycetami. Další příčinou může být mechanické poškození

či poškození ptáky (Reid, 1999) a následná kontaminace sporami hub vyskytující se v ovzduší, v půdě a na rostlině (kořeny, stébla, listy). Výskyt zástupců rodu *Fusarium* na Bt-kukuřici lze vysvětlit i možným endofytickým vztahem. Druhy, uváděné jako endofyty kukuřice jsou *Fusarium verticillioides* (Munkvold et Desjardins, 1997; Kulda et Yales, 2000) a *F. oxysporum*. Oba druhy byly izolovány i na Bt-kukuřici.

Výsledky ukazují, že i když byl zaznamenán výskyt zástupců potenciálně toxinogenních druhů na Bt-kukuřici, nebylo pomocí ELISA testů zjištěno detekovatelné množství mykotoxinů po oba studované roky na obou lokalitách (Nedělník, 2004, písemné sdělení).

Některé studie (Schaafsma et al., 2002) nepotvrdily vztah mezi koncentrací fumonisinů a intenzitou napadení kukuřice zavíječem kukuřičným nebo použitím Bt-kukuřice, tak jako jiné práce (Munkvold et al., 1999). Bylo to způsobeno nízkou koncentrací toxinu nebo koncentrací pod úrovní detekce mykotoxinů ve vyšetřovaných vzorcích, v obdobích s méně horkým a suchým počasím. Produkci fumonisinu B₁ v obilkách kukuřice napomáhá spíše horké a suché počasí. Clements et al. (2003) uvádějí, že Bt-kukuřice má výrazně nižší koncentraci fumonisinů, čemuž odpovídají i výsledky ELISA testů v této práci a nižší napadení palic zástupci rodu *Fusarium*, oproti netransgenní kukuřici ve stejných podmínkách. Výsledkem jejich práce je, že Bt-kukuřice MON-810 (použitá i v této práci), je účinná v redukci koncentrace fumonisinů v kukuřičných obilkách, díky snížení napadení kukuřice zavíječem kukuřičným. Koncentrace DON byla u Bt-kukuřice zjištěna výrazně nižší (Schaafsma et al., 2002).

Gatch et Munkvold (2002) uvádějí rozdílné množství druhů působících hniloby stébel kukuřice mezi transgenní a netransgenní kukuřicí. Bt-kukuřice byla méně napadena druhy *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans* a *F. proliferatum* než netransgenní kukuřice.

Druhy, které byly izolovány z Bt-kukuřice, kde vstupní brána pro napadení mikromycety nebyly požitky zavíječe kukuřičného, mohly přežívat na poli v infikovaných zbytcích po obilovinách nebo v půdě ve formě chlamydospór. Kukuřice je považována jako nejnebezpečnější předplodina z důvodu hlavního zdroje zástupců rodu *Fusarium*. Dalším zdrojem infekce by mohlo být infikované osivo a hlavně napadené ostatní části rostliny (Hrubý, 2003; Cotten et Munkvold, 1998; Munkvold 2003).

Dosud v ČR a v zahraničí nebyla provedena studie celkové mykobioty transgenní kukuřice, nebyla tedy možnost výsledky této práce srovnávat s výsledky jiných autorů.

Mykobiota kukuřice – porovnání vlivu lokality a roku

V předsklizňových odběrech palic kukuřice v roce 2002 byl velký rozdíl v množství zjištěných druhů hub na studovaných lokalitách Praha-Ruzyně a Ivanovice na Hané. Z lokality Praha-Ruzyně bylo izolováno více druhů, ale v menší frekvenci výskytu, na lokalitě Ivanovice na Hané bylo menší druhové spektrum s vyšší frekvencí výskytu. Mohlo to být způsobeno vyšším výskytem zavíječe na lokalitě Ivanovice na Hané, a tedy i poškozením palic. Podobné výsledky získali i Kokaisl et Prokeš (1997) a Bagar (2002).

Výskyt druhu *Fusarium verticillioides*, vázaného na přenos zavíječem kukuřičným (Gatch et Munkvold, 2002), byl celkově nižší na lokalitě Praha-Ruzyně (průměr 16%) než na lokalitě Ivanovice na Hané (23%), kde byl vyšší výskyt zavíječe kukuřičného. Vysoký výskyt tohoto druhu v roce 2003 na obou lokalitách lze vysvětlit vyššími teplotami a menšími srážkami v roce, což je pro výskyt druhu

příznivé a také tím, že je považován za endofyta kukuřice, jak uvádí Miller (2001). Almeida et al. (2002) také uvádějí nejvyšší frekvence výskytu druhu v oblastech s horkým počasím.

Mykotoxiny rodu *Fusarium* v obilkách kukuřice

Na obou lokalitách byl nejčastěji ze vzorků kukuřice detekován mykotoxin DON, avšak producenti tohoto mykotoxinu byli izolováni pouze výjimečně.

Z výsledků vyplývá, že může záležet i na podmínkách během roku, kdy v roce 2002 se vyskytovalo detekovatelné množství mykotoxinů u netransgenních variant pokusů, kdežto v roce 2003 se nevyskytl ani jeden zjišťovaný mykotoxin v detekovatelném množství, i když byly ze vzorků izolovány potenciálně toxinogenní mikromycety. Tak jak uvádí Severa et al. (2000), záchyt toxinogenních druhů hub ještě neznamená přítomnost mykotoxinů a všechny kmeny potenciálně toxinogenních mikromycetů nemusí být toxinogenní. Studované roky se lišily v klimatických podmínkách během vegetační doby, v roce 2002 byly nižší teploty a více srážek, rok 2003 byl teplejší s méně srážkami, což mohlo výrazně ovlivnit produkci mykotoxinů.

Na produkci mykotoxinů má vliv mnoho faktorů, a to např. vlhkost, teplota, přítomnost kyslíku, oxidu uhličitého, složení substrátu, převaha toxinogenních druhů mikromycetů, mikrobiální interakce a přítomnost hmyzu (Severa et al., 2000).

ZÁVĚR

Celkem bylo izolováno s použitím všech vybraných metodik 83 taxonů mikromycetů náležejících do 25 rodů, včetně neurčených mycelií. Nejčastěji se vyskytovali zástupci rodů *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* a *Penicillium*. V našich podmínkách se na kukuřici z potenciálně toxinogenních mikromycetů nejčastěji vyskytovaly druhy *Fusarium verticillioides* (40%), *F. subglutinans* (34%), *F. proliferatum* (19%) a *F. oxysporum* (12%), ze zástupců rodu *Aspergillus* hlavně druhy *Aspergillus versicolor* (17%), *A. fumigatus* (7%) a *A. ochraceus* (6%), ze zástupců rodu *Penicillium* nejvíce druh *Penicillium crustosum* (7%).

V mykobiotě transgenní a netransgenní kukuřice nebyl výrazný rozdíl. Druhy, které se nejčastěji vyskytovaly, byly izolovány ze všech variant pokusu, ať už se jednalo o Bt-kukuřici nebo o kukuřici s ošetřením parazitickou vosičkou rodu *Trichogramma*. Výsledky ukázaly, že na Bt-kukuřici se může po mechanickém poškození vyskytovat podobná mykobiota, jako na netransgenní kukuřici po poškození zavíječem kukuřičným.

Bt-kukuřice (rostliny, palice) nebyla po dobu zkoumání napadena škůdcem zavíječem kukuřičným. Z obilí Bt-kukuřice nebyly ELISA testy zjištěny vybrané mykotoxiny.

Pomocí ELISA testů byly z netransgenních variant pokusu detekovány mykotoxiny – fumonisiny (FUM), deoxynivalenol (DON), zeralenon (ZEA) a T-2 toxin. Všechny vyjmenované mykotoxiny byly detekovány jen na lokalitě Ivanovice na Hané a hlavně na variantě pokusu Izolinie. Ze vzorků z lokality Praha – Ruzyně byly detekovány pouze DON a ZEA. V roce 2003 nebyly analyzovány žádné z těchto mykotoxinů.

Mykobiota kukuřice ve vzorcích před sklizňových a posklizňových se částečně lišila, což se dalo očekávat i podle literárních údajů. V posklizňových odběrech převládala skladištní mykobiota kukuřice, zastoupená hlavně rody *Aspergillus* a *Penicillium*.

LITERATURA

- Almeida A. P., Fonseca H., Fancelli A. L., Direito G. M., Ortega E. M. et Correa B. (2002): Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. – J. Agric. Food Chem. 50(13): 3877-3882.
- Bagar M. (2002): Napadení kukuřice zavíječem bylo v loňském roce opět vysoké. – Obil. Listy 10(2): 39.
- Bagar M. (2004): Přípravek Trichoplus – využití nejen v kukuřici. – Agro Magazín 5(1): 25.
- Bakan B. (2001): Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in France. - In: Logrieco A. [ed.], Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, p. 44-50, Brussels.
- Bárta I., Šmerák P., Sedmíková M., Turek B., Kováčová E. et Bártová J. (1998): Mutagenní účinky vybraných mykotoxinů. – Czech J. Food Sci. 16(3): 103-109.
- Betina V. (1990): Mykotoxíny. Chémia – biológia – ekológia. – 284 p., Bratislava.
- Booth C. (1971): The genus *Fusarium*. – 237 p., Kew.
- Brayford D. (1993): The identification of *Fusarium* species. – 118 p., Egham.
- Burgess L. W., Liddell C. M. et Summerell B. A. (1988): Laboratory manual for *Fusarium* research. – 156 p., Sydney.
- Clements M. J., Campbell K. W., Maragos C. M., Pilcher C., Headrick J. M., Pataky J. K. et White D. G. (2003): Influence of Cry 1Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn. – Crop Sci. 43(4): 1283-1293.
- Cotten T. K. et Munkvold G. P. (1998): Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* in maize stalk residue. – Phytopathology 88(6): 550-555.
- Gatch E. W. et Munkvold G. P. (2002): Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. – Plant Dis. 86(10): 1156-1162.
- Gerlach W. et Nirenberg H. (1982): The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. – 406 p., Berlin et Hamburg.
- Häni F., Popow G., Reinhard H., Schwarz A., Tanner K. et Vorlet M. (1993): Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin. – 335 p., Praha.
- Hrubý R. (2003): Fuzariózy klasů ozimé pšenice. – Rostlinolékař 14(4): 10-11.
- Chełkowski J. (1989): Mycotoxins associated with corn cob fusariosis. - In: Chełkowski J. [ed.], Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage, p. 53-62, Amsterdam etc.
- Jirsák I. et Balšánek V. (1999): Novartis a biotechnologie. – Úroda 47(1): 14-15.
- Kirk P. M. (2004): The CABI Bioscience and CBI database of fungal names. – [<http://www.indexfungorum.org/Names/NAMES.ASP>].
- Kocourek F. (2001): Geneticky modifikované organismy v rostlinné výrobě. – In: Masáková L. [ed.], Sborník. Geneticky modifikované organismy a jejich využití v zemědělství, p. 22-26, Praha.
- Kokaisl K. et Prokeš K. (1997): Některé choroby kukuřice a jejich vliv na kvalitu produkce. - In: Badalíková B. et Hrubý J. [eds.], Sborník referátů. Nové pohledy na jakost produktů rostlinné výroby, p. 124-127, Brno.
- Kuldau G. A. et Yates I. E. (2000): Evidence of *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. – In: Bacon Ch. W. et White J. F. Jr. [eds.], Microbial endophytes, p. 487, New York.

- Logrieco A., Moretti A., Ritieni A., Chelkowski J., Altomare C., Bottalico A. et Randazzo G. (1993): Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland. – J. Agric. Food Chem. 41(11): 2149-2152.
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A. et Bottalico A. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. – Eur. J. Pl. Path. 108(7): 597-609.
- Magg T., Melchinger A. E., Klein D. et Bohn M. (2001): Comparison of Bt maize hybrids with their non-transgenic counterparts and commercial varieties for resistance to European corn borer and for agronomic traits. – Pl. Breed. 120(5): 397-403.
- Magg T., Melchinger A. E., Klein D. et Bohn M. (2002): Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. – Pl. Breed. 121(2): 146-154.
- Magg T., Bohn M., Klein D., Merditaj V. et Melchinger A.E. (2003): Concentration of moniliformin produced by *Fusarium* species in grains of transgenic Bt maize hybrids compared to their isogenic counterparts and commercial varieties under European corn borer pressure. – Pl. Breed. 122: 322-327.
- Miller J. D. (2001): Factors that affect the occurrence of fumonisin. – Environ. Health Perspect. 109(2): 321-324.
- Munkvold G. P. (2003): Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. – Europ. J. Plant Path. 109(7): 705-713.
- Munkvold G. P. et Desjardins A. E. (1997): Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? – Plant Dis. 81(6): 556-565.
- Munkvold G. P., Hellmich R. L. et Rice L. G. (1999): Comparison of fumonisin concentration in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. – Plant Dis. 83(2): 130-138.
- Nedělník J. (1999): Poškození kukuřice houbami rodu *Fusarium* a kontaminace jejich metabolity. – In: Pěstování kukuřice a výroba kukuřičné siláže, p. 5-9, Brno.
- Nedělník J. (2001): Aktuální srovnání množství deoxynivalenolu a fumonisinu v identických vzorcích kukuřice. – In: Sborník. Mykotoxiny a jejich stanovení metodou ELISA, p. 17-21, Praha.
- Ondřej M. (2003): Transgen pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis* v odrůdách kukuřice. - Ms., 12 p. [Referát z veřejné schůze České komise pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty, 11. března 2003, Praha]
- Ostrý V. et Ruprich J. (1996): Fumonisin. – Náš Chov 56(8): 19-20.
- Piecková E. et Jesenská Z. (1999): Kolonizácia kukuričných produktov v SR kmeňmi *Fusarium moniliforme*, *F. subglutinans* a *Aspergillus flavus*. – In: Bartl V. et Muzikář V. [eds.], Sborník přednášek. Aktuální problematika mikrobiologie potravin, p. 119-121, Liblice – Byšice.
- Pitt J. I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. – 634 p., New York etc.
- Pitt J. I. (1991): A laboratory guide to common *Penicillium* species. Ed. 2. – 188 p., North Ryde.
- Ramirez C. (1982): Manual and atlas of the *Penicillia*. – 874 p., Amsterdam.
- Raper K. B. et Fennell D. I. (1965): The genus *Aspergillus*. – 686 p., Baltimore.
- Raper K. B. et Thom C. (1949): A manual of the *Penicillia*. – 875 p., Baltimore.
- Reid L. M. (1999): Breeding for resistance to ear rot in corn. In: Proc. Canadian Workshop on *Fusarium* Head Blight. Holiday Inn Crown Plaza, Canada, 28.-30. Nov. 1999, 67-69.

- Rotrekl J. (2004): Závažní škůdci kukuřice a ochrana proti nim. – Agro Magazín 5(1): 22-24.
- Sácká J. et Bosák J. (2002): Zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*) – nebezpečný škůdce kukuřice a ochrana proti němu. - In: Zeman L. [ed.], Kukuřice v praxi, p. 25-30, Brno.
- Samson R. A. et Pitt J. I. [eds.] (1990): Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. - 478 p., New York et London.
- Seifert K. (1996): FusKey – Fusarium interactive key. [<http://res.agr.ca/brd/fusarium>].
- Severa J., Malíř F. et Roubal T. (2000): Pravděpodobnost zvýšení pozitivních nálezů mykotoxinů ve sklizních roku 2000. – In: Příkryl F. [ed.], Konference k problematice N-látek v rostlinných produktech, p. 38-43, Brno.
- Schaafsma A. W., Hooker D. C., Baute T. S. et Illincic-Tamburic L. (2002): Effect of Bt-corn on deoxynivalenol content in grain at harvest. – Plant Dis. 86(10): 1123-1126.
- Šrobárová A. (2000): Populácie húb *Fusarium* spp. sekcie Liseola na zrnách kukurice. – In: Hýsek J. [ed.], Mykologická fytopatologie ve 20. a 21. století, p. 73-75, Praha.