

## Fusariové mykotoxiny v zrnu ječmene jarního a jejich přenos do sladu

### *Fusarium mycotoxins in spring barley and their transfer into malt*

ALEXANDRA MALACHOVÁ<sup>1</sup>, JANA HAJŠLOVÁ<sup>1</sup>, JAROSLAVA EHRENBERGEROVÁ<sup>2</sup>, MARTA KOSTELANSKÁ<sup>1</sup>, MILENA ZACHARIÁŠOVÁ<sup>1</sup>, JANA URBANOVÁ<sup>1</sup>, RADIM CERKAL<sup>2</sup>, IVANA ŠAFRÁNKOVÁ<sup>2</sup>, JAROSLAVA MAR-KOVÁ<sup>2</sup>, KATEŘINA VACULOVÁ<sup>3</sup>, PAVLÍNA HRSTKOVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 / Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: jana.hajslava@vscht.cz

<sup>2</sup>Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno / Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno

e-mail: jaroslava.ehrenbergerova@mendelu.cz

<sup>3</sup>Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž a Agrotest fyto, s. r. o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž / Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. and Agrotest fyto, Ltd., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž

e-mail: vaculova.katerina@vukrom.cz

**Malachová, A. – Hajšlová, J. – Ehrenbergerová, J. – Kostelanská, M. – Zachariášová, M. – Urbanová, J. – Cerkal, R. – Šafránková, I. – Marková, J. – Vaculová, K. – Hrstková, P.: Fusariové mykotoxiny v zrnu ječmene jarního a jejich přenos do sladu.** Kvasny Prum. 56, 2010, č. 3, s. 131–137.

Fusariové mykotoxiny jsou toxicke sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub rodu *Fusarium*. Prezentovaná studie shrnuje získané poznatky o výskytu širokého spektra těchto mykotoxinů v produkčním řetězci ječmen – slad ve 12 vybraných odrůdách/líních ječmene jarního pěstovaných low-input a konvenčním přístupem v letech 2005–2008 na lokalitě Žabčice a Kroměříž.

**Malachová, A. – Hajšlová, J. – Ehrenbergerová, J. – Kostelanská, M. – Zachariášová, M. – Urbanová, J. – Cerkal, R. – Šafránková, I. – Marková, J. – Vaculová, K. – Hrstková, P.: Fusarium mycotoxins in spring barley and their transfer into malt.** Kvasny Prum. 56, 2010, No. 3, p. 131–137.

*Fusarium* mycotoxins are secondary metabolites of microscopic filamentous fungi of *Fusarium* genus. This paper summarises current knowledge on the field of mycotoxin contamination of barley, mycotoxin transfer into malt and compares them with results achieved within 2005–2008 years on the set of 12 spring barley cultivars grown in low-input and conventional agricultural systems in Žabčice a Kroměříž.

**Malachová, A. – Hajšlová, J. – Ehrenbergerová, J. – Kostelanská, M. – Zachariášová, M. – Urbanová, J. – Cerkal, R. – Šafránková, I. – Marková, J. – Vaculová, K. – Hrstková, P.: Fusarium Mykotoxine im Korn der Sommergerste und ihre Übertragung ins Malz.** Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 3, S. 131–137.

*Fusarium* Mykotoxine sind eine toxische sekundäre Stoffwechselprodukte von mikroskopischen faserartigen Schimmelpilzen des Stammes *Fusarium*. Der Artikel präsentiert alle gewonnene Erkenntnisse über das Auftreten von diesen Mikroorganismen im Zeitraum 2005–2008 in dem Breitspektrum der Produktionskette Gerste – Malz auf den 12 ausgelesenen Gerstensorten/Linien, die in den 2 Lokalitäten Žabčice und Kroměříž durch Low-input und mit traditionellem Zugang gezüchtet wurden.

**Klíčová slova:** ječmen jarní, deoxynivalenol, nivalenol, HT-2, T-2, *Fusarium* spp.

**Keywords:** spring barley, deoxynivalenol, nivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin, *Fusarium* spp.

## 1 ÚVOD

*Fusarium Head Blight (FHB)* je celosvětově rozšířené onemocnění obilovin způsobené mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium*, které napadají úrodu již v průběhu vegetace [1]. Dominujícími původci fusarioz jsou v Evropě *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* a *F. avenaceum* [2,3,6]. FHB může být ve vlhkých letech příznivých pro rozvoj parazitů přičinou značných ekonomických ztrát vyplývajících z poklesu výnosů a nutriční / technologické jakosti zrna (degradace proteinů a škrobu). V zrnu přítomné produkty sekundárního metabolismu mikromycet navíc mohou představovat závažné zdravotní riziko nejen pro lidi, ale i hospodářská zvířata, u kterých někdy díky menší pozornosti věnované kvalitě krmiva může dojít i k projevům akutních mykotoxikóz. Tyto toxiny jsou chemicky i tepelně stabilní látky, z toho důvodu dochází k jejich přenosu z kontaminovaných zrn do cereálních výrobků (mouka, chléb, pivo).

V podmírkách mírného klimatického pásmu jsou nejběžněji se vyskytujícími a také nejvíce sledovanými mykotoxiny trichotheceny, fumonisiny a zearalenon. Expozice trichothecenů může u konzumentů vyvolat nevolnost, zvracení, dále poškození jater, endokrinního a nervového systému. Zearalenon má výrazné estrogenní účinky [4]. Fumonisiny vyskytující se převážně v kukuřici a kukuřičných produktech negativně ovlivňují nervový systém a jsou jim přiřízeny také hepatotoxické a neurotoxické účinky [5]. Vedle značných zdravotních rizik, která fusariové mykotoxiny představují pro konzumenty a hospodářská zvířata, způsobují také řadu technologických problémů při zpracování – inhibují syntézu enzymů během sladování a zpomalují růst kvasinek při výrobě piva, spolu se štavelany jsou pravděpodobně přičinou tzv. prepěňování piva (gushing) [7,8].

Pro ochranu konzumentů před expozicí různými chemickými škodlivinami vydala Evropská komise Nařízení (ES) č. 1126/2007 ze dne

## 1 INTRODUCTION

*Fusarium Head Blight (FHB)* is a worldwide spread disease caused by microscopic filamentous fungi of *Fusarium* spp. which infest cereals during vegetation period in the field [1]. In Europe, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* a *F. avenaceum* are the most common fungal species responsible for outbreak of FHB which can cause considerable economic losses due to lower yields and decline of grain quality (degradation of proteins and starch) [2,3,6]. Secondary, toxic metabolites of *Fusarium* fungi – mycotoxins may pose a serious health risk not only for humans but also for farm animals. The impact of mycotoxin on animal health varies considerably and mycotoxins may cause fatal intoxications as well as subclinical disease conditions. Acute intoxications are in most cases confined to a small number of animals.

Unfortunately, *Fusarium* toxins are thermally and chemically stable substances thus survive under conditions of food processing and transfer into cereal-based products such as flour, bread and beer.

The most abundant mycotoxins occurring under conditions of moderate temperature zone are trichotheccenes, fumonisins a zearalenone. These toxins may also cause poisoning incidents. Principal symptoms of trichotheccenes exposure are nausea, lethargy, vomitus and attack of liver, endocrine and nervous system. Zearalenon has significant oestrogenic effect [4] and fumonisins, occurring predominantly in maize and maize products, negatively influence nervous system and furthermore are responsible for damage of liver and kidney cells [5]. As mentioned above, mycotoxin contamination causes wide range of technological problems in food processing e.g. inhibits enzymes during malting and slows down yeast growth during brewing. Besides oxalates, mycotoxins are connected with so-called undesirable beer gushing [7,8].

28. září, kterým doplňuje Nařízení 1886/2006 z 19. prosince. Tato nařízení udávají nejvyšší přípustná množství různých kontaminujících látek v potravinách. Z fusariových mykotoxinů jsou v současné době legislativně stanoveny maximální limity pouze pro deoxynivalenol, zearalenon a fumonisiny [9,10].

Globální oteplování a klimatické změny přispívají k rozširování dříve méně běžných druhů fusarií. Důsledkem toho se spektrum mykotoxinů v různých komoditách rok od roku mění a bývá výrazně pestřejší [11]. V posledních dvou letech se tak pravděpodobně rozšířily chemotypy *Fusarium culmorum* produkující nivalenol (NIV) [12] nebo fusaria (*F. sporotrichioides* a *F. poae*) produkující převážně HT-2 a T-2 toxin (HT-2 a T-2) [13]. Zvýšená incidence HT-2 a T-2 v posledních letech vedla k diskusi o zavedení legislativního opatření také u těchto dvou toxinů. EFSA (European Food Safety Authority) – Evropský úřad pro bezpečnost potravin navrhl monitorovat obsahy HT-2 a T-2 v obilovinách s cílem zamezit potenciálnímu nebezpečí intoxikace. V lednu 2009 bylo na základě výsledků monitoringu opět projednáno legislativní stanovení limitu pro sumu HT-2 a T-2 v obilovinách a v současné době se o zavedení limitů stále jedná.

## 2 AKTIVITY VÝZKUMNÉHO CENTRA PRO STUDIUM OBSAHOVÝCH LÁTEK JEČMENE A CHMELE V OBLASTI MYKOTOXINŮ

Problematika fusariových mykotoxinů se, s ohledem na svou závažnost, stala jedním z významných témat projektu Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele (dále jen Výzkumné centrum) financovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy. Koordinacní pracoviště Mendelova univerzita Brno (MENDELU Brno) spolu se Zemědělským výzkumným ústavem Kroměříž s. r. o., se zaměřily na různé aspekty pěstování klíčové suroviny pro výrobu piva, ječmene s akcentem na zhodnocení faktorů ovlivňujících rozvoj FHB. Ústav chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha) se zaměřil na dokumentaci dopadů použitých agronomických praktik na výskyt fusariových mykotoxinů. Pro tento účel byly zavedeny a aplikovány moderní instrumentální metody využívající hmotnostní spektrometrii pro přesné stanovení širokého spektra fusariových toxinů, jak legislativou limitovaných a tudíž častěji sledovaných, tak i těch, o jejichž výskytu jsou v ČR, ale i v řadě dalších evropských zemí jen velmi omezené informace. Pro posouzení přenosu těchto škodlivin do produktů zpracování a tak generaci dat významných pro posouzení dietární expozice konzumentů, vyrobil Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Brně z vybraných šárží ječmene slad, který byl též analyzován. V následujících odstavcích jsou stručně shrnutý nejvýznamnější výsledky získané v rámci této interdisciplinární spolupráce.

## 3 VÝSKYT FUSARIOVÝCH MYKOTOXINŮ V JEČMENI A DALŠÍCH CEREÁLIÍCH

Ječmen, stejně jako další cereálie pěstované v podmírkách mírného klimatického pásmá, může obsahovat v době sklikně detekovatelné koncentrace různých druhů fusariových mykotoxinů. Příklady zjištovaných úrovní kontaminace a s ní související toxikologické i technologické aspekty jsou diskutovány v řadě studií, v tomto stručném přehledu uvádíme pouze nejvýznamnější práce publikované v poslední dekádě [14–20]. Zajímavé výsledky přinesla např. studie Edwards (2009) shrnující výskyt mykotoxinů v konvenčně a ekologicky pěstovaném ječmeni v letech 2002–2005. Ze 446 vzorků byl DON detekován v 57 % vzorků. Pouze u jednoho vzorku hladina DON přesahovala maximální limit pro nezpracované cereálie určené pro lidskou spotřebu (1250 µg/kg) a byly v něm detekovány také acetylované formy DON (3-a 15-ADON). HT-2 a T-2 byly detekovány ve 36 %

The European Commission has been established the Commission Regulation (EC) No. 1126/2007 amending Commission Regulation (EC) No. 1886/2006 which sets maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. In these regulations maximum levels of deoxynivalenol, zearalenon and fumonisins are included [9,10].

Climate changes contribute to spread of so far not common *Fusarium* species. Consequently, spectrum and levels of mycotoxins in various commodities are changing annually [11]. Probably due to climate conditions changes chemotypes *Fusarium culmorum* responsible for NIV production [12] or *F. sporotrichioides* a *F. poae* synthesised HT-2 and T-2 are spread during last two years [13]. The increased incidence of HT-2 and T-2 resulted in proposal to set legislation limit for sum of HT- and T-2 in cereals but new regulation is still in progress.

## 2 SCIENTIFIC ACTIVITIES OF RESEARCH CENTRE FOR BARLEY AND HOP SUBSTANCES PROJECT ON THE FIELD OF MYCOTOXIN CONTAMINATION

The issue of *Fusarium* mycotoxins is one of the main task in scientific project of Research Centre for Barley and Hop substances (Research Centre) supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. Coordinating institution Mendel University in Brno together with Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd., have been responsible for growing of raw material for beer production and assessment of factors influencing FHB development. In addition, Department of Food Chemistry and Analysis of Institute of Chemical Technology Prague has been focused on assessment of impact employed agricultural practices on mycotoxin levels. New and modern analytical method based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry has been developed and validated for determination of a wide range of mycotoxins within single run. In the follow-up research barley was micromalted at the Research Institute for Brewing and Malting, Plc and on the ground of mycotoxin occurrence in malt was generated data important for assessment of dietary exposure of consumers. The following section summarizes results obtained within this integrated collaboration.

## 3 OCCURENCE OF FUSARIUM MYCOTOXINS IN BARLEY AND OTHER CEREALS

Barley, as well as other cereals can be contaminated by mycotoxins. Reports concerning mycotoxin contamination of this commodity have brought by many countries from around the world [14–20]. Recent study published by Edwards (2009) summarized occurrence of mycotoxins in conventional and organic barley harvested within 2002–2005 in the United Kingdom. In total, 446 of barley samples were examined for the most abundant mycotoxins, DON was detected in percentage incidence of 57 %. It should be noted, that maximum limit established for DON in unprocessed cereals (1,250 µg/kg) was exceed only in one sample. HT-2 and T-2 were observed in percentage incidence of 36 % and 12 % with maximum levels of 105 a 138 µg/kg, respectively [21].

The occurrence of mycotoxins in cereals harvested in Czech Republic is discussed in detail in survey published by Hajšlová et al. (2007) [22]. In this study, 198 samples of cereals, wheat, barley and rye obtained in years 1999–2001 were examined to DON occurrence, later on, in 2005, another 65 samples of wheat and barley were analysed to most abundant trichothecenes (NIV, DON, FUS-X, suma ADONs, HT-2 a T-2). The lowest levels of DON were observed in rye harvested in 2001 (22–190 µg/kg). In contrary, the highest levels of this toxin were detected in case of barley (maximum level of 2,021 µg/kg). As mentioned above, cereal samples from 2005 were anal-

Tab. 1 Přehled použitých fungicidů v letech 2005–2008 / Overview of fungicide treatment within the experimental period

2005		2006		2007 a 2008	
Fungicid <i>Fungicide</i>	Účinná látka <i>Active substances</i>	Fungicid <i>Fungicide</i>	Účinná látka <i>Active substances</i>	Fungicid <i>Fungicide</i>	Účinná látka <i>Active substances</i>
Horizon 250 EW Mirage 45 EC	tebuconazole prochloraz	Alto Combi 420 EC Tango Super	cyproconazole carbendazin fenpropimorph epoxyconazole	Falcon 460 EC	tebuconazole triadimenol spiroxamine

a ve 12 % všech vzorků s maximálními hladinami 105 a 138 µg/kg [21].

Výskyt mykotoxinů v cereáliích pěstovaných v České republice je komplexněji shrnut ve studii autorů Hajšlová a kol. (2007) [22]. Celkem 198 vzorků cereálů (pšenice, ječmene a žita) sklizených v letech 1999–2001 bylo vyšetřeno na obsah DON a dále 65 vzorků pšenice a ječmene z roku 2005 na hladiny nejvýznamnějších trichotheceň (NIV, DON, FUS-X, suma ADONs, HT-2 a T-2), kdy nejnižší hladiny DON byly detekovány ve vzorcích žita pěstovaného v roce 2001 (22–190 µg/kg). Naopak nejvyšší hladiny tohoto fusariotoxinu byly zjištěny u vzorků ječmene (až 2021 µg/kg). Jak již bylo uvedeno výše, vzorky cereálů sklizené v roce 2005 byly vyšetřeny jak na trichotheceň typu B (DON, NIV, FUS-X, suma ADONs), tak na trichotheceň typu A (HT-2 a T-2). Celkem 40 vzorků ze 41 bylo pozitivních na alespoň jeden z cílových analytů (DON = 98 %, NIV = 78 %, suma ADONs 7 %, HT-2 15 % a T-2 39 % vzorků). Naproti tomu FUS-X nebyl detekován v žádném z vyšetřovaných vzorků. Majoritní DON byl detekován v rozmezí koncentrací 6–597 µg/kg. Ostatní trichotheceň byly ve srovnání s DON detekovány na podstatně nižších hladinách [22].

#### 4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ OBSAH MYKOTOXINŮ V CEREÁLIÍCH

Mikromycety rodu *Fusarium* patří mezi půdní mikroorganismy, k infekci obilním a následné produkci mykotoxinů proto dochází již v průběhu vegetace. Základním faktorem ovlivňujícím napadení fusarii a kritičnost choroby jsou klimatické a povětrnostní podmínky prostředí, které hrají hlavní roli ve všech stupních jejich vývoje. Teplotní podmínky během zimního období pak ovlivňují přežití mikroskopických vláknitých hub na posklizňových zbytcích. V průběhu mírných zim jsou plísně schopny sporulace, díky tomu mikromycety přežijí i v nepříznivých podmínkách. Naopak suché a velmi chladné počasí na podzim a v zimě tomuto trendu brání. Jarní klima ovlivňuje typ, kvalitu a dobu rozšíření vznikajících spor. Pokud se doba šíření spor shoduje s dobou kvetení, následky mohou být rozsáhlé. V létě dochází k rozrůstání plísní a produkci mykotoxinů. Záleží ovšem také na „rezistenci“ a aktuálním výživném stavu rostliny, přítomnosti dalších patogenů a virulenci jednotlivých druhů plísní [16,17].

K minimalizaci mykotoxinové kontaminace obilnin lze přispět do držováním tzv. zásad správné zemědělské praxe (Good Agricultural Practice). Ty zahrnují mimo jiné střídání plodin, správné ošetření půdy po sklizni i před setím a racionální aplikaci hnojiv a pesticidů [6].

Volba vhodného chemického ošetření je složitou otázkou. Účinek fungicidu na rozvoj FHB záleží na mnoha faktorech, zejména na účinné látky, způsobu a době aplikace zvoleného přípravku. Ošetření fungicidem je účinné v případě, že je použit bezprostředně před napadením patogeny a klasy jsou přípravkem zcela pokryty. Na účinnost má také významný vliv průběh povětrnosti během aplikace [23–25].

Od roku 2005 probíhá v rámci Výzkumného centra každoroční studie zaměřená na zhodnocení výskytu fusariových mykotoxinů v zrnu vybraných odrůd a linii ječmene jarního. Do studie je zařazeno celkem dvacet odrůd/linií – sedm pluchatých odrůd sladovnického typu ječmene jarního – Amulet, Jersey, Bojos, Malz, Prestige, Sebastian, Tolar, bezpluchá odrůda Merlin a bezpluché linie KM 1057, KM 1910 (v roce 2009 byla registrována pod názvem AF Lucius), KM 2084, KM 2283 (všechny linie byly vyšlechtěny v ZVÚ Kroměříž, s. r. o.). Odrůdy a linie jsou pěstovány na dvou lokalitách – Žabčice (systém pěstování bez chemického ošetření a s chemickým ošetřením fungicidy, typ a účinné látky jednotlivých přípravků shrnuje tab. 1) a Kroměříž (pokusná série bez chemického ošetření). V roce 2006 byla sklizeň na lokalitě Žabčice zničena (abnormální srážkový úhrn vedl k pořůstání zrna), proto byly k analýzám využity vzorky z náhradních lokalit – Branišovice a Uherský Ostroh (zkušební stanice Ústředního kontrolního zkušebního ústavu zemědělského – ÚKZÚZ).

Všechny vzorky ječmene jarního byly vyšetřeny na obsah vybraných fusariových mykotoxinů (NIV, DON, suma ADONs, fusarenon-X dále jen FUS-X, HT-2, T-2 a ZON) na Ústavu chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Pro tyto účely zde byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií typu iontová past. Metoda byla validována a akreditována dle ISO 17025 Českým institutem pro akreditaci (ČIA).

Naměřená data potvrzují některé závěry uvedené v předchozích publikacích [14–22]. Spektrum mykotoxinů se v průběhu čtyř pokusných let změnilo. V roce 2005 byl u většiny vzorků zrnu detekován DON (průměrná hladina 42 µg/kg) spolu s HT-2 (průměrná hladina 25 µg/kg). V následujícím roce byla zjištěna přibližně stejná incidence

vedená k oběma trichotheceňm z B skupiny (DON, NIV, FUS-X, suma ADONs) a trichotheceňm z A skupiny (HT-2 a T-2). Celkem 40 vzorků z 41 mají pozitivní výsledek vzhledem k minimálnímu množství analytů (DON = 98 %, NIV = 78 %, suma ADONs = 7 %, HT-2 = 15 % a T-2 = 39 %). Naopak FUS-X nebyl detekován v žádném vzorku. Hladiny DON v roce 2006 byly v rozmezí 6–715 µg/kg. Hladiny HT-2 a T-2 byly v rozmezí 0–320 µg/kg.

#### 4 FACTORS EFFECTING MYCOTOXIN CONTAMINATION OF CEREALS

Fungi of *Fusarium* genus are considered to be "field" pathogens, hence they attack crops and produce mycotoxins during vegetation period. The main factor influencing *Fusarium* infestation of cereals seems to be climate which plays significant role in all stages of fungi development. The climate during winter season affects the survival of fungi on crop residues: as far as the winter is mild, fungi are capable of sporulating on the cereal stubble debris. On the other hand, dry and cold conditions during autumn and winter prevent form their survival. In spring, the climate influences quality of produced spores, their dispersal thus the intensity of disease. Coincidence in the dates of spore dispersal and crop flowering is critical for outbreak of disease. In summer, together with the virulence characteristics of *Fusarium* species and the resistance of the plant, climate controls competition between pathogens and thus the rate of mycelium growth in plant [16,17].

The effects of climate are uncontrollable but minimization of FHB incidence is possible due to compliance of Good Agricultural Practice (GAP) which including e.g. crop rotation, soil tillage, fertilization and application of chemical treatment [6].

Unfortunately, choice of suitable chemical treatment is often complicated due to dependence on many factors such as active substances, way and time of application. The highest efficacy of fungicide treatment can be achieved if it is applied just before fungi colonisation of ears and penetration into tissue is effective [23–25].

Since 2005, annual study concerning the evaluation of *Fusarium* mycotoxin occurrence in barley has been started within Research Centre project. Altogether 12 of barley cultivars representing 7 of covered malting barley Amulet, Jersey, Bojos, Malz, Prestige, Sebastian, Tolar, and 5 of hullless cultivars Merlin, KM 1057, KM 1910 (registered as AF Lucius in 2009), KM 2084, KM 2283. The field experiment was set up in two localities – Žabčice (growing in two systems – with and without chemical treatment) and Kroměříž (growing without chemical treatment). Unfortunately, harvest in Žabčice was destroyed due to abnormal precipitation by germination of grain in 2006 hence for all experiments the barley samples harvested in substitute locality Branišovice and Uherský Ostroh were used.

All harvested barley samples were analysed for 6 trichotheceňs and zearalenon (NIV, DON, suma ADONs, FUS-X, HT-2, T-2 a ZON). As mentioned above, analytical method of high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was used for mycotoxin analysis. It should be noted that developed analytical method was validated and accredited according to ISO 17025 by Czech Accreditation Institute (ČIA).

Spectrum and levels of target mycotoxins were changing during experimental period. In 2005 DON was detected in most of samples (mean level of 42 µg/kg) along with HT-2 (mean level of 25 µg/kg) whereas DON levels observed next year were lower (mean level of 13 µg/kg) and contamination by HT-2 and T-2 was insignificant. In 2007, NIV (mean value of 45 µg/kg) with co-occurrence of DON (mean value of 39 µg/kg) was detected almost in all samples. The highest levels as well as incidences of trichotheceňs of A group, HT-2 (maximum level of 715 µg/kg) and T-2 (maximum level of 320 µg/kg), was observed in 2008 when crop was probably invaded by producer of these toxins as a consequence of mild winter. On the other hand, trichotheceňs of B group – NIV, FUS-X and suma ADONs were detected in 7, 0 and 1 of samples, respectively and DON was observed in 19 samples at low levels (mean value of 17 µg/kg).

Comparing growing localities, differences in levels as well as in incidences of mycotoxins were obvious. This was significant especially in 2007, all cultivars harvested in Žabčice contained DON, NIV, HT-2 a T-2 except three covered cultivars Jersey, Tolar a Merlin but in Kroměříž harvest, these toxins were detected only in two hullless cultivars KM 2084 a KM 1910 (AF Lucius), see Fig. 1-2. Similarly, harvest from Kroměříž in 2008 was contaminated predominantly by HT-2 and T-2 and entire spectrum (NIV, DON, HT-2 and T-2) was detected

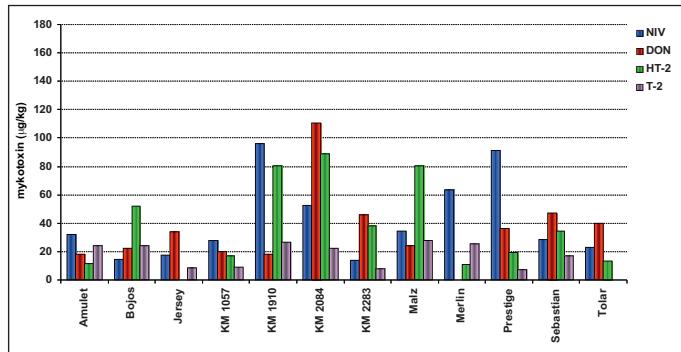
DON, ale na mnohem nižších hladinách (průměrná hladina 13 µg/kg), kontaminace HT-2 a T-2 byla zanedbatelná. V roce 2007 byla pozorována výrazná změna ve spektru mykotoxinů oproti rokům předchozím. Téměř u všech vyšetřených odrůd ječmene byl v zrnu detekován NIV (průměrná hladina 45 µg/kg) spolu s DON (průměrná hladina 39 µg/kg). V tomto roce se také poprvé vyskytoval u většiny odrůd T-2 toxin. V roce 2008 byla úroda pravděpodobně v důsledku velmi mírné zimy napadena producentem HT-2 a T-2, kdy HT-2 byl detekován ve všech případech a na vysokých hladinách (až 715 µg/kg detekovaných u bezpluché odrůdy Merlin). Druhým mykotoxinem s nejvyššími hladinami (až 320 µg/kg detekovaných taktéž u odrůdy Merlin) byl T-2. Trichotheceny typu B (NIV, FUS-X a suma ADONs) nebyly téměř detekovány a DON byl zjištěn u poloviny vzorků na nízkých hladinách (průměrná hladina 17 µg/kg).

Spektrum mykotoxinů se na jednotlivých lokalitách lišilo. Nejvíce to bylo patrné v roce 2007, kdy na lokalitě Žabčice byly v zrnu detekovány DON, NIV, HT-2 a T-2 u všech odrůd s výjimkou Jersey, Tolar a Merlin, kdežto u odrůd pěstovaných na lokalitě Kroměříž byly zmíněny čtyři toxiny zjištěny pouze v zrnu u bezpluchých linii KM 2084 a KM 1910 (AF Lucius), viz obr. 1, 2. Podobný trend pokračoval také v roce 2008. Odrůdy vypěstované na lokalitě Žabčice obsahovaly v zrnu opět převážně spektrum všech čtyř mykotoxinů oproti odrůdám pocházejícím z lokality Kroměříž, kde byly detekovány s výjimkou odrůd Malt a Merlin pouze HT-2 a T-2 toxiny. Rozdíly ve spektru mykotoxinů mezi Žabčicemi a Kroměříž jsou dány pravděpodobně rozdílnými mikroklimatickými podmínkami lokality. Lokalita Žabčice je považována za jednu z nejteplejších oblastí České republiky, díky mírným zimám a nízkým průměrným ročním množstvím srážek (480 mm) se řadí k sušším lokalitám. Naopak Kroměříž je charakterizována jako lokalita „teplá a středně vlhká“ s průměrným ročním množstvím srážek okolo 568 mm. Půdní typ téhoto lokalit je také zcela rozdílný. Použité agrotechnické praktiky v obou lokalitách pravděpodobně nemají významný vliv. Ječmen byl vždy pěstován po předplodině pšenici ozimé v podobném low-input systému.

Na lokalitě Žabčice byly v roce 2005 hladiny DON u „chemicky ošetřených“ varianty vyšší než u variant bez fungicidní ochrany. V roce 2006 byly vyšetřeny vzorky ječmene jarního pěstované na lokalitách Branišovice a Uherský Ostroh. Spektrum i nálezy sledovaných mykotoxinů byly opět vyšší u „chemicky ošetřených“ variant v porovnání s „chemicky neošetřenými“ variantami. Stejný trend se opakoval také v roce 2007. V roce 2008 nemělo fungicidní ošetření přípravkem Falcon 460 EC na hladinu mykotoxinů významný vliv.

Účinnost fungicidů vůči fuzariázám (viz výše) závisí do jisté míry také na pokrytí klasu fungicidem a penetraci účinné látky do pletiv, která může být zlepšena použitím adjuvantu při aplikaci [8,27]. Účinná látka přitom může mít vliv na potlačení pouze jednoho typu patogenu. Tím se uvolní životní prostor jinému druhu mikromycetů a rozvoj FBH a následná produkce mykotoxinů může mít daleko větší rozsah. Tento fakt byl popsán ve studii R. Simpsona (2001), kdy byla sledována účinnost nejpoužívanějších fungicidních složek na potlačení různých druhů mikromycetů a obsahu DON. Bylo zjištěno, že strobiluriny (azoxystrobin) jsou velice efektivní k potlačení netoxinogenního druhu *Micromochodium niveale* a téměř neúčinné k potlačení vláknitých hub rodu *Fusarium* [23]. Aplikace fungicidu může však vést ke stresu *F. culmorum* nebo *F. graminearum* a produkce mykotoxinů tak může být výrazně vyšší [24]. Tyto dva druhy fusarii byly detekovány také na zrech fungicidně ošetřených varianty ječmene v lokalitě Žabčice, což může být jedna z možných příčin vyšších nálezů mykotoxinů v porovnání s neošetřenou variantou [34].

Obr. 1 Hladiny detekovaných mykotoxinů v zrnu odrůd/linií ječmene pěstovaných v Žabčicích v roce 2007 / Fig. 1 Mycotoxin levels in barley cultivar harvested in Žabčice in 2007



in grains grown in Žabčice. Differences in mycotoxin contamination between localities can be explained by microclimatic conditions and soil composition. Žabčice is characterised as one of the warmest area in the Czech Republic and belongs to dryer localities due to mild winter and low precipitation. Conversely Kroměříž can be classified as “warm and medium humid”. Agricultural practises did probably not affect on differences in mycotoxin incidences because barley was always grown after winter wheat in similar low-input system in both localities.

Contrary to our expectation, the levels of DON were higher in barley treated with fungicides as compared to untreated barley harvested in Žabčice (2005, 2007 and 2008) as well as in Uherský Ostroh and Branišovice (2008).

Efficacy of fungicide treatment depends on coverage of ears and penetration of active substances into plant cells, which can be increased by use of adjuvants [8,27]. Unfortunately, active substance can inhibit the growth of one type of pathogens and thus development of another pathogen resulting in more extensive production of mycotoxins. This fact was discussed in study published by Simpson (2001) when application of azoxystrobin was effective for restrict of non-toxicogenic fungi *Microdochium niveale* and inefficient to *Fusarium* suppression [21]. In contrary fungicide can affect as stressful factor for *F. culmorum* or *F. graminearum* hence the production of toxins is higher [24]. It should be noted that both *F. culmorum* and *F. graminearum* were detected in fungicide treated barley harvested in Žabčice [34].

## 5 MASKED MYCOTOXINS

Besides parent (free) mycotoxins, so-called masked mycotoxins occur in cereals. The hypothesis on existence of “masked” mycotoxins was postulated as soon as in mid-1980s when mycotoxicosis cases observed in farm animals did not correspond to levels of mycotoxins detected during laboratory examination of a feeding stuff. The follow up research showed that mycotoxins can be partly metabolized by living plants as a result of detoxification process [27]. Until now plant metabolites of DON, ZON and ochratoxin A were identified in cereals [30]. Fig. 3 shows the example of masked mycotoxin, deoxynivalenol-3-glucoside (DON-3-Glc).

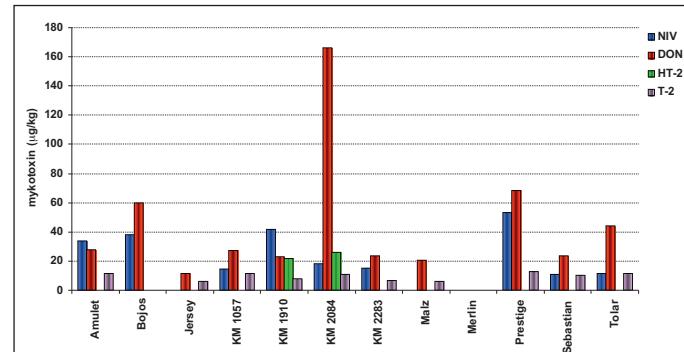
Plant protect themselves from xenobiotic compounds (e.g. pesticides, mycotoxins) by converting them into more polar metabolites, which are further stored in vacuoles or conjugated to biopolymers such as cell wall components [29,30]. Masked mycotoxins can potentially increase health risk for consumers due to release of free (more toxic) mycotoxins from masked forms in gastrointestinal tracts of mammals [29]. Findings of lately published studies indicate even the possibility of release of parent mycotoxins during food processing.

Moreover, studies dealing with plant resistance to *Fusarium* infection advert to high resistance needn't lead to low levels of toxins in grain but low concentration of parent toxin can indicate its transformation into masked forms [31].

## 6 FATE OF FUSARIUM MYCOTOXINS DURING MALTING

*Fusarium* mycotoxins are relatively stable substances hence they survive under conditions of food processing and transferred into fi-

Obr. 2 Hladiny detekovaných mykotoxinů v zrnu odrůd/linií ječmene pěstovaných v Kroměříži v roce 2007 / Fig. 2 Mycotoxin levels in barley cultivar harvested in Kroměříž in 2007



## 5 MASKOVANÉ MYKOTOXINY

Vedle „volných“ mykotoxinů se mohou v cereáliích vyskytovat také tzv. „maskované“ formy. První (nepřímé) úvahy o existenci skrytých zdrojů toxicických sekundárních metabolitů vláknitých hub napadajících obiloviny se objevily již v polovině 80. let 20. století, kdy byly pozorovány mykotoxisy zvířat, při kterých výsledky klinických studií neodpovídaly množství mykotoxinů stanovenému ve zkrmovaném krmivu. Tyto „maskované“ formy mykotoxinů pravděpodobně vznikají při detoxikačních procesech v obilovinách [27], což prokázaly i následné uskutečněné studie zabývající se transformacemi mykotoxinů v rostlinách. Dospud byly identifikovány rostlinné metabolity DON, zearalenonu (ZON) a ochratoxinu A [30]. Obr. 3 ukazuje příklad maskované formy deoxynivalenolu s glukosou – deoxynivalenol-3-glukosidu (DON-3-Glc).

Detoxikační reakce pravděpodobně chrání rostliny před toxicitou látkami z okolního prostředí, ale také před sloučeninami, které rostliny tvoří samy a zahrnují především tzv. transformace (deepoxidace, deacetylace a isomerace) a konjugace. Během této reakcí jsou reaktivní funkční skupiny redukovány či maskovány tak, aby se toxicita nově vzniklého produktu snížila či úplně eliminovala [30]. Při konjugacích jsou volné mykotoxiny vázány na více polární látky, např. na glukosu, sulfát či glutathion a vzniklé konjugáty jsou ukládány do buňčných vakuol [29]. Biologická dostupnost a toxicita této látky není dospud známa. Potenciální nebezpečí maskovaných mykotoxinů spočívá v jejich hydrolyze při průchodu trávicím traktem konzumentů, při které může dojít k uvolnění původního, více toxicitého mykotoxinu [29]. K rozkladu konjugovaných mykotoxinů (a tedy nárůstu jejich volné formy) dochází pravděpodobně také za vhodných podmínek při technologickém zpracování.

Některé aktuální studie naznačují, že vysoká úroveň „rezistence“ k fusariosám neznamená automaticky nízký obsah toxinu v zrnu, resp. jeho konjugované formy. U rezistentních linii pšenice seté se aplikovaný toxin konjugoval na detoxikační produkt DON-3-Glc. Zaznamenán byl vztah mezi poměrem DON-3-Glc/DON a DON rezistence v případě toxinem osetřených klasů [31].

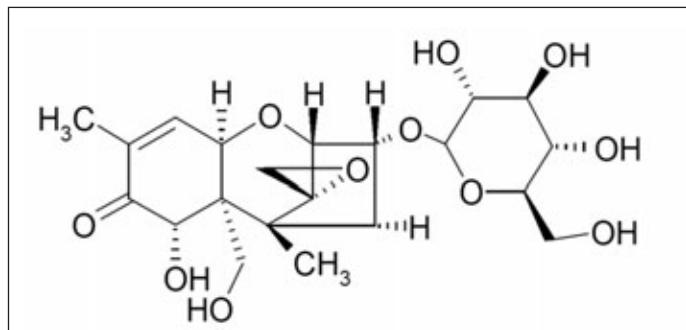
## 6 OSUD FUSARIOVÝCH MYKOTOXINŮ V PRŮBĚHU SLADOVÁNÍ

Fusariové mykotoxiny jsou relativně stabilní sloučeniny a ve většině případů nepodléhají významné degradaci v průběhu běžných technologických operací a mohou přecházet do výsledných produktů určených k lidské spotřebě (výrobky na bázi cereálií – pečivo, pivo, müsli).

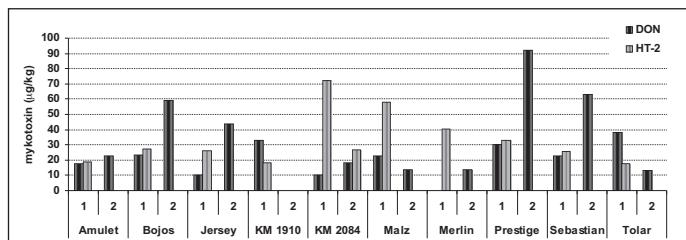
V rámci Výzkumného centra byly vzorky zrnu ječmene sklizeného v roce 2005 zpracovány na slad v mikrosladovně Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a. s., v Brně a následně vyšetřeny na obsah vybraných mykotoxinů v Ústavu chemie a analýzy potravin (VŠCHT Praha). V původním zrnu byly s největší incidencí a na nejvyšších hladinách detekovány DON a HT-2. Z toho důvodu je následující diskuse omezena pouze na tyto dva toxiny. V případě HT-2 došlo v průběhu sladování ke snížení jeho hladin u všech sledovaných odrůd, takže u většiny odrůd nebyl HT-2 detekován. Trend změn hladin DON v průběhu sladování se u jednotlivých odrůd výrazně lišil v závislosti na lokalitě a způsobu pěstování, což názorně dokládají obr. 4–6. Mírné navýšení obsahu DON u sladu oproti výchozí surovině bylo pozorováno převážně u odrůd Amulet, Bojos a Jersey pěstovaných bez chemického osetření na lokalitě Žabčice. Nárůst hladiny DON u této odrůdy byl pozorován i v zrnu sklizeném na lokalitě Kroměříž. Naopak u odrůd Sebastian a Prestige z jednotlivých lokalit byl pozorován opačný trend – sladováním zrnu Sebastianu a Prestige z lokality Kroměříž došlo ke snížení obsahu DON, kdežto u stejných odrůd sklizených na lokalitě Žabčice bylo pozorováno zvýšení hladiny DON ve sladu. V případě většiny chemicky osetřených variant z lokality Žabčice došlo po zesladování ke snížení kontaminace DON. Nejvyšší nárůst DON (až o 33 %) byl pozorován v případě chemicky neošetřené odrůdy Prestige pěstované na lokalitě Žabčice. Na druhé straně ve sladu vyrobeném z odrůdy Malz došlo ke snížení obsahu DON jak u vzorků pěstovaných v Kroměříži, tak v Žabčicích, a to ve variante chemicky osetřené i chemicky neošetřené.

Pozorované trendy potvrzuje většina dospud publikovaných studií zabývajících se osudem mykotoxinů v průběhu sladování [36,32,33]. Nejvíce informací je známo o DON, protože tento mykotoxin se v ječmeni vyskytuje nejčetněji a na vyšších hladinách než ostatní fusariotoxiny. Obecně lze říci, že proces máčení přispívá k redukcii mykotoxinů, které díky své polaritě zpravidla přechází do má-

Obr. 3 Ukázka strukturního vzorce deoxynivalenol-3-glukosidu / Fig. 3 Structural formula of deoxynivalenol-3-glucoside

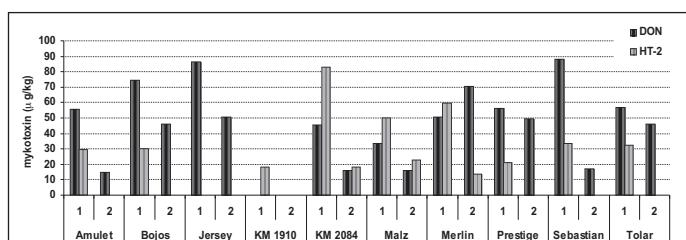


Obr. 4 Změny hladin DON a HT-2 po zesladování zrnu ječmene pěstovaného ve variante „chemicky neošetřeno“ v lokalitě Žabčice / Fig. 4 Changes in DON and HT-2 levels after malting of untreated barley harvested in Žabčice



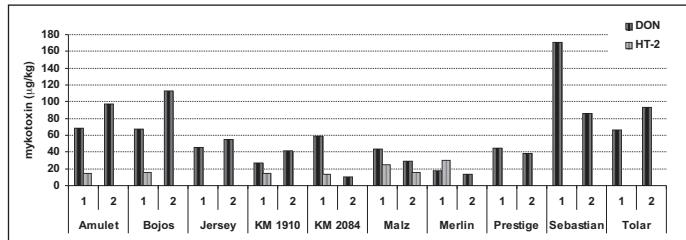
1 ječmen / barley, 2 slad / malt

Obr. 5 Změny hladin DON a HT-2 po zesladování zrnu ječmene pěstovaného ve variante „chemicky ošetřeno“ v lokalitě Žabčice / Fig. 5 Changes in DON and HT-2 levels after malting of fungicide treated barley harvested in Žabčice



1 ječmen / barley, 2 slad / malt

Obr. 6 Změny hladin DON a HT-2 po zesladování zrnu ječmene pěstovaného v lokalitě Kroměříž / Fig. 6 Changes in DON and HT-2 levels after malting of untreated barley harvested in Kroměříž



1 ječmen / barley, 2 slad / malt

nal products dedicated for human consumption (i.e. bakery products, beer).

Barley harvested in 2005 within the Research Centre Project was micromalted at Research Institute of Brewing and Malting, Plc and

čecí vody. Schwarz a kol. (1995) dokumentovali ve své studii pokles DON, ZON a 15-ADON během máčení z původních hladin 5–23 µg/g, 1 µg/g a 2 µg/g na hladiny blízké limitům detekce [32]. Tento trend nepřímo potvrzuje i studie [33], kdy promýváním silně kontaminovaného ječmene destilovanou vodou došlo ke snížení koncentrace DON o 69 %.

Během klíčení zeleného sladu se změnila koncentrace DON na 18–114 % výchozí hodnoty – zrna ječmene. Během hvozdění nebyly zaznamenány v obsahu DON žádné výrazné změny, spíše došlo k další mírné redukci. Výsledný slad tedy obsahoval 16–100 % DON oproti koncentraci v původním ječmeni. Relativně vysoké koncentrační hladiny DON však byly detekovány v klíčcích (4–51 µg/g, tj. 46–300 % koncentrace oproti původnímu ječmeni), které jsou odpadem produktem sladování a díky vysokému obsahu nutričních látek se využívají ke krmivářským účelům [32].

Nárůsty obsahu DON během sladování pozorované u některých odrůd ječmene pěstovaného v rámci Výzkumného centra a také v dostupných publikacích mohou být vysvětleny studií uskutečněnou v roce 2007 na VŠCHT Praha [26]. V této práci totiž byly poprvé, kromě běžných fusariových mykotoxinů, stanovovány i obsahy maskovaného DON-3-Glc. Během fáze máčení byl zaznamenán výrazný pokles až úplná eliminace DON a sumy ADONs (3- a 15- ADON). Zajímavé bylo pozorovat mírný nárůst maskovaného DON-3-Glc během prvního až třetího dne máčení (od <5 po 13 µg/kg u ječmene uměle infikovaného vláknitou houbou *Fusarium sp.*), což mohlo být způsobeno začínajícím uvolňováním tohoto maskovaného mykotoxinu z polysacharidů. Během klíčení pak došlo k výraznému nárůstu mykotoxinů DON, DON-3-Glc, suma ADONs a HT-2 toxinu (252, 642, 499 a 181 % oproti výchozím hodnotám v zrnu uměle infikovaného ječmene). Proces hvozdění hladiny mykotoxinů zásadně neovlivnil, případně došlo k mírnému poklesu koncentrace oproti zelenému sladu. Finální slad pak obsahoval zvýšené koncentrace mykotoxinů oproti původnímu ječmeni, pro DON a DON-3-Glc byl průměrný nárůst přibližně 300 a 900 %. Velmi vysoké koncentrace mykotoxinů byly opět kvantifikovány ve sladových klíčcích [26].

Nárůst DON a DON-3-Glc během klíčení může přímo souviset s činností amylolytických enzymů, které pravděpodobně přispívají k uvolňování této mykotoxinů z jejich vázaných forem (polysacharidů, jako je například škrob). Alternativní teorií je pak produkce mykotoxinů „de novo“, což znamená novou produkci mykotoxinů fungální biomasou rozrůstající se nově ve vlhkém a teplém prostředí sladovny během klíčení ječmene. Stabilita obsahu mykotoxinů během hvozdění pak pravděpodobně souvisí s jejich odolností vůči vysokým teplotám (až do 120 °C) a také s eliminací růstu houbového patogenu [26,32].

## 7 ZÁVĚR

V rámci Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele byl v letech 2005–2008 monitorován výskyt vybraných fusariových mykotoxinů ve 12 odrůdách/liniích ječmene jarního v závislosti na pěstební lokalitě a fungicidním ošetření. Během sledovaného období se u souboru odrůd měnilo spektrum jednotlivých mykotoxinů a také jejich hladiny. V letech 2005 a 2006 byly dominantní trichothece typu B (DON, NIV), kdežto v roce 2007 začal převládat výskyt trichothece typu A (HT-2 a T-2), který po velmi mírné zimě kulminoval v nadcházejícím roce, kdy byly hladiny této toxinu nejvyšší za celé sledované období. Je nutné podotknout, že hladiny DON u žádné odrůdy nepřesáhly maximální legislativní limit 1250 µg/kg pro nezpracovaný ječmen [9].

Aplikace fungicidů neměla u většiny odrůd v jednotlivých letech významný vliv na snížení hladin mykotoxinů v zrnu.

Zesladováním ječmene došlo pravděpodobně vyluhováním v máčecích vodách ke snížení hladin HT-2. Trend změn obsahu DON nebyl jednoznačný. Trendy nárůstu/poklesu hladin DON po zesladování byly odlišné pro jednotlivé odrůdy jak v rámci pěstební lokality, tak i systému pěstování.

## Poděkování

Práce byla podpořena projektem MŠMT 1M0570 – Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele.

analysed for mycotoxins at Department of Food Chemistry and Analysis (ICT Prague). Original raw material contained DON and HT-2 at highest level before malting therefore following discussion will be reduced only on these two toxins. Levels of HT-2 was declined during malting, even in most of cultivars, it was not detected in malt. On the other hand, decreases/increases of DON in malt in comparison to initial barley were various depending on locality and way of barley growing, see Fig. 4–6. Slight increase of DON in malt was observed mainly in cultivars Amulet, Bojos a Jersey grown without chemical treatment in Žabčice as well as in Kroměříž. On the other hand in case of Sebastian a Prestige was observed the opposite trend – decline of DON in barley from Kroměříž. DON levels in Sebastian and Prestige malt produced from barley harvested in Žabčice were higher in comparison to DON concentration in barley. Malt produced from chemical treatment barley contained lower DON levels than barley. The highest DON increase (around 33 %) was observed after malting of untreated Prestige cultivar from Žabčice.

Similar trends were confirmed in few studies concerning the fate of mycotoxins during malting [26,32,33]. Most of knowledge is known about DON. Generally, steeping stage contributes to reduction of DON due to its solubilisation in water. Schwarz et al. (1995) documented declines of DON, ZON and 15-ADON during steeping from levels of 5–23 µg/g, 1 µg/g a 2 µg/g to the levels around limits of detection [32]. DON solubilisation in water was indirectly confirmed by Trenholm, who published that 69 % DON was decreased during washing experiments of greatly contaminated barley [33].

During the germination stage, the significant increase of DON in the range of 18–114 % was occurred. Kilning not seems to have any impact on increase of DON. Interestingly, high DON levels were detected in rootlets (46–300 % increase in comparison to initial barley [32].

First evidence about fate of masked mycotoxin DON-3-Glc brought study carried out at ICT Prague [26]. As documented in previous published study, steeping stage contributed to significant decreases of DON and suma ADONs. Interestingly, DON-3-Glc slightly increases during the first and third day of steeping. It can be due to its release from polysaccharides. However, significant increases of DON, DON-3-Glc, suma ADONs a HT-2 (252, 642, 499 a 181 % – corrected to mycotoxin levels in barley) were observed during germination stage. Finally, 300 % and 900 % increases of DON and DON-3-Glc in malt were documented, respectively. Moreover, highest mycotoxin levels were detected in rootlets [32].

DON and DON-3-Glc increases can be joined to enzymatic activities during germination and thus release of mycotoxins from cell structures. Alternatively, „de novo“ formation of fungal secondary metabolites is also conceivable [26,32].

## 7 CONCLUSIONS

Monitoring of mycotoxin contamination of barley cultivars in dependence on growing locality and fungicide treatment was performed during 2005–2008 within the Research Centre for barley and hop substances project. The incidence as well as the levels of mycotoxins was changing annually. In both years 2005 and 2006, trichotheccenes of B group (DON and NIV) were dominating toxins in barley grains whereas HT-2 and T-2 predominated in 2007 with the highest levels in 2008. It should be noted that DON levels did not exceed the EU limit 1 250 µg/kg for unprocessed cereals intended for human consumption [9].

Fungicide treatment had not significant impact on mycotoxin occurrence, in some cases levels of mycotoxins were even higher after application of fungicide compared to untreated barley.

During malting process, HT-2 levels were decreased probably due to solubilisation in steeping water. The toxin could not be detected in malt. No general trend was observed in DON changes. The results were rather controversial, both decrease and increase of this trichotheccene were occurred during malting. No generalization could be drawn regarding the impact of malting process on levels of DON in malt.

## Acknowledgements

This work was supported by a project of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (RC 1M0570).

**LITERATURA / REFERENCES**

1. Hooker, D. C., Schaafsma, A. W., Tamburic-Illincic, L.: Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Disease* **86**, 2002, 611–619.
2. Bottalico, A., Perrone, G.: Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 2002, 611–624.
3. Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J. F.: Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grain. *Plant Science* **166**, 2004, 1389–1415.
4. Creppy, E. E.: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* **127**, 2002, 19–28.
5. Gelderblom, W. C., Kriek, N. P., Marasas, W. F., Thiel, P. G.: Toxicity and carcinogenicity of the Fusarium moniliforme metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis* **12**, 1991, 1247–1251.
6. Edwards, S. G.: Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters* **153**, 2004, 29–35.
7. Krstanović, V., Klapc, T., Velič, N., Milaković, Z.: Contamination of malt and wheat by Fusarium culmorum from the crop years 2001–2003 in eastern Croatia. *Microbiological Research* **160**, 2005, 353–359.
8. Havlová, P., Lancová, K., Váňová, M., Havel, J., Hajšlová, J.: The effect of fungicidal treatment on selected duality parameters of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2006, 1353–1360.
9. European Commission: Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364, 2006, 5–24.
10. European Commission: Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union* L225, 2007, 14–17.
11. Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R. W. A., Noordam, M. Y., Pasante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G. J., Vesperman, A.: Climate Change and Food safety: An Emerging Issue with Special Focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 2009, 1009–2021.
12. Miller, D.: Mycotoxin in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants* **25**, 2008, 219–230.
13. Doohan, F. M., Brennan, J., Cooke, B. M.: Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 2003, 755–768.
14. Kim, J., Kang, H., Lee, D., Lee, Y., Yoshizawa, T.: Natural occurrence of fusarium Mycotoxins (Trichothecenes and Zearalenone) in Barley and Corn in Korea. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1993, 3798–3802.
15. Langseth, W., Rundberget, T.: The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia* **147**, 1999, 157–165.
16. Campbell, H., Choo, T. M., Vigier, B., Underhill, L.: Comparison of mycotoxin profiles amny cereals symplex from eastern Canada. *Canadian Journal of Botany* **80**, 2002, 526–532.
17. Perkowski, J., Kiecania, I., Kaczmarek, Z.: Natural occurrence and distribution of fusarium toxins in contaminated barley cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 2003, 331–339.
18. Pei, S. Ch., Lee, W. J., Kim, S. S., Lee, Y. W.: Occurrence of Deoxynivalenol in Korean Barley and Barley Products. *Journal of American Society of Brewing Chemists* **62**, 2004, 93–96.
19. Sokolović, M., Simpraga, B.: Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Kontrol* **17**, 2006, 733–740.
20. Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Mirardi, V.,
- Miraglia, M.: Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spicas commercialized in Moricci. *Food Kontrol* **17**, 2006, 868–874.
21. Edwards, S. G.: Fusarium Mycotoxin content of UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants* **26**, 2009, 1185–1190.
22. Hajšlová, J., Lancová, K., Sehnalová, M., Krplová, A., Zachariášová, M., Moravcová H., Nedělník J., Marková J., Ehrenbergerová, J.: Occurrence of trichothecene mycotoxins in cereals harvested in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science* **25**, 2007, 339–350.
23. Simpson, D. R., Weston, G. E., Turner, J. A., Jennings, P., Nicholson, P.: Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 2001, 421–431.
24. Heier T., Jain, S. K., Kogel K. H., Pons-Kühnemann, J.: Influence of N-fertilization and Fungicide Strategy on Fusarium Head Blight Severity and Mycotoxin Content in Winter Wheat. *Journal of Phytopathology* **153**, 2005, 551–557.
25. Šíp, V., Chrpová, J., Lešová, L., Sýkorová, S., Kučera, L., Ovesná, J.: Effects of Genotype, Environment and Fungicide Treatment on Development of Fusarium Head Blight and Accumulation of DON in Winter Wheat Grain. *Czech Journal Genetic and Plant Breeding* **43**, 2007, 16–31.
26. Lancová, K., Hajšlová, J., Pousta, J., Krplová, A., Zachariášová, M., Dostálk, P., Sachambula, L.: Transfer of Fusarium mycotoxins and masked deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives And Contaminants* **25**, 2008, 732–744.
27. Kostelanska, M., Hajšlová, J., Zachariášová, M., Malachová, M., Kalachová, M., Pousta, J., Fiala, J., Scott, P. M., Berthiller, F., Krška, R.: Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glycoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 2009, 3187–3194.
28. Nicholson, P., Chander, E., Draeger, R. C., Gosman, N. E., Simpson, D. R., Thomsett, M., Wilson, A. H.: Molecular Tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 2003, 691–703.
29. Berthiller, F., Dall Asta, Ch., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam G., Krška R.: Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* **53**, 2005, 3421–3425.
30. Engelhardt, G., Ruhland, M., Wallnöfer P R.: Metabolism of mycotoxins in plants. *Advances In Food Science* **21**, 1999, 71–78.
31. Lemmens, M., Schulz, U., Berthiller, F., Dall Asta, Ch., Kounik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterházy, A., Krška, R., Ruckenbauer, P.: The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for fusarium head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 2005, 1318–1324.
32. Schwarz, P., Casper, H., Beattie, S.: Fate and development of naturally occurring Fusarium mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **53**, 1995, 121–127.
33. Trenholm, H. L., Charmley, L. L., Prelusky D. B., Warner, R. M.: Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1992, 2147–2151.
34. Šafránková, I., Marková, M., Kmoch, M.: Mykoflóra zrn sladovnických odrůd a linii ječmene jarního na lokalitách Kroměříž a Žabčice. *Kvasny Prum* **56**, 2010, s. 138–144.

*Recenzovaný článek / Reviewed paper*  
*Do redakce došlo / Manuscript received: 2. 11. 2009*  
*Přijato k publikování / Accepted for publication: 31. 1. 2010*