

LIETUVOS AGRARINIŲ IR MIŠKŲ MOKSLŲ CENTRAS

KARINA STUMBRIENĖ

**GRYBO *FUSARIUM GRAMINEARUM* IŠPLITIMAS, CHEMOTIPŲ
STRUKTŪRA, PATOGENIŠKUMAS IR KONTROLĖ LIETUVOJE
AUGINAMUOSE KVIEČIUOSE**

Daktaro disertacija

Žemės ūkio mokslai, Agronomija (01A)

AKADEMIJA, 2018

Disertacija rengta 2013–2017 metais Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centre pagal Lietuvos Respublikos švietimo ir mokslo ministro 2012 m. vasario 24 d. įsakymu Nr. V-327 suteiktą doktorantūros teisę Aleksandro Stulginskio universitetui su Lietuvos agrarinių ir miškų, mokslų centru.

Mokslinė vadovė:

dr. Skaidrė Supronienė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija 01A)

Mokslinė konsultantė:

dr. Roma Semaškienė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija 01A)

Disertacija ginama Agronomijos mokslo krypties taryboje

Pirmininkas

Prof. habil. dr. Zenonas Dabkevičius (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija 01A)

Nariai

Prof. dr. Dalia Ambrazaitienė (Klaipėdos universitetas, Biomedicinos mokslai, Biologija 01B)

Dr. Gražina Statkevičiūtė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija 01A)

Dr. Judita Černiauskiene (Aleksandro Stulginskio universitetas, Žemės ūkio mokslai, Agronomija 01A)

Prof. dr. Małgorzata Jedryczka (Lenkijos mokslo akademijos Augalų genetikos institutas, Žemės ūkio mokslai, Agronomija 01A)

Disertacija ginama viešame Agronomijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2018 m. birželio 26d., 13 val. Aleksandro Stulginskio Centrinų rūmų 217 auditorijoje.

Adresas: Aleksandro Stulginskio universitetas, Studentų g. 11, Akademija, LT-53361, Kauno r., Lietuva.

Disertacija išsiuntinėta 2018 m. gegužės 25 d. Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro ir Aleksandro Stulginskio universiteto bibliotekose.

TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS	5
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION	7
ĮVADAS	30
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	34
1.1. Varpų fuzariozė ir <i>F. graminearum</i> grybų reikšmė šios ligos pasireiškimui ir mikotoksinų produkcijai kviečiuose, infekcijos sąlygos	34
1.2. <i>F. graminearum</i> patogenezė kviečių varpose	36
1.2.1. Infekcinės struktūros, varpų pažeidimo etapai ir sąlygos, fuzariozės požymiai	36
1.2.2. Patogeniškumo veiksniai, susiję su trichotecenų biosinteze, <i>F. graminearum</i> chemotipai ir jų identifikavimas, veiksniai įtakojantys <i>F. graminearum</i> chemotipų struktūrą lauko populiacijoje	38
1.3. Cheminė ir biologinė <i>F. graminearum</i> infekcijos prevencija	40
2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS	42
2.1. Ekspediciniai tyrimai	42
2.1.1. Grūdų mėginių surinkimas <i>F. graminearum</i> grybų išplitimo tyrimams	42
2.1.2. Kviečių varpų surinkimas grybo <i>F. graminearum</i> populiacijos tyrimams	42
2.2. Laboratariniai tyrimai	43
2.2.1. Trichotecenus produkuojančių <i>Fusarium</i> grybų identifikavimas ir išplitimo įvertinimas grūduose klasikiniais mikrobiologiniais metodais	43
2.2.2. Trichotecenus produkuojančių <i>Fusarium</i> grybų identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas grūduose qTL PGR metodu	44
2.2.3. <i>F. graminearum</i> populiacijos tyrimai	47
2.2.4. Skirtingų <i>F. graminearum</i> chemotipų kamienų kolonijų ir konidijų morfologinių požymių įvertinimas	47
2.2.5. Skirtingų <i>F. graminearum</i> chemotipų kamienų fenotipinių požymių įvertinimas	48
2.2.6. Skirtingų <i>F. graminearum</i> chemotipų kamienų patogeniškumas kviečiams	48
2.2.7. <i>F. graminearum</i> 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų jautrumo fungicidams nustatymas <i>in vitro</i>	51
2.3. Cheminių ir biologinių preparatų veiksmingumas prieš <i>F. graminearum in vivo</i>	52
2.5. Tyrimų duomenų statistinė analizė	54
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS	55

3.1. Trichotecenus produkuojančių <i>Fusarium</i> grybų išplitimas Lietuvoje užaugintuose vasarinių ir žieminių kviečių grūduose.....	55
3.2. <i>F. graminearum</i> chemotipai, jų išplitimas ir pasiskirstymas vasarinių ir žieminių kviečių grūduose.....	57
3.3. <i>F. graminearum</i> chemotipų struktūra skirtingose Lietuvos vietose išsidėsčiusiuose vasarinių kviečių laukuose	61
3.4. Skirtingų chemotipų izoliatų morfologiniai ir fenotipiniai požymiai, jautrumas fungicidams ir patogeniškumas kviečiams <i>in vitro</i>	64
3.4.1. Skirtingų chemotipų izoliatų morfologiniai ir fenotipiniai požymiai.....	64
3.4.3. <i>F. graminearum</i> 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumas skirtingų veislių žieminiams ir vasariniams kviečiams <i>in vitro</i>	71
3.4.4. <i>F. graminearum</i> 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumas skirtingų veislių vasariniams kviečiams <i>in vivo</i>	76
3.5. Cheminių ir biologinių kontrolės priemonių efektyvumas prieš dirbtinai lauko sąlygomis inicijuotą varpų fuzariozę kviečiuose.....	77
IŠVADOS.....	81
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	82
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	94
PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ ATSPAUDAI.....	95
PADĖKA.....	112
PRIEDAI	113
GYVENIMO APRAŠYMAS (CV).....	119

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

- 15ADON – 15- acetil-deoksinivalenolis
3ADON – 3-acetil-deoksinivalenolis
BBCH – augimo tarpsnių skalė
BSA – galvijų serumo albuminas (bovine serum albumin)
ddH₂O – sterilus distiliuotas vanduo
DNR – deoksiribo nukleono rūgštis
DON – deoksinivalenolis
ES – Europos sąjunga
F_{fakt} – Fišerio faktinis kriterijus
FGRK – *Fusarium graminearum* rūšių kompleksas
FMM – neagarizuota minimali *Fusarium* terpė
LAMMC – Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras
MA – morkų agaras
MIK – Minimali inhibuojanti koncentracija
NaCl – Natrio chloridas
NaOCl – Natrio hipochloritas
NIV – Nivalenolis
NK – neigiama kontrolė
NS – patikimų skirtumų 0,05 ir 0,01 tikimybės lygiu nėra
PDA – bulvių dekstrozės agaro terpė (angl. Potato dextrose agar)
PGR – polimerazės grandininė reakcija
qTL PGR – tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija
SNA – specializuota mitybos terpė (vok. Spezieller Nährstoffarmer Agar)
SSR – mikrosatelitų sekos (angl. simple sequence repeats)
TRI – trichotecenai
UV – ultravioletiniai spinduliai
VF – varpų fuzariozė
VU GMF – Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas

WA – vandens agaras

ZEN – zearalenonas

ŽI – Žemdirbystės institutas

**ALEKSANDRAS STULGINSKIS UNIVERSITY
LITHUANIAN RESEARCH CENTER FOR AGRICULTURE AND FORESTRY**

KARINA STUMBRIENĖ

**DISTRIBUTION OF *FUSARIUM GRAMINEARUM* FUNGI, STRUCTURE OF
CHEMOTYPES, PATHOGENICITY AND CONTROL IN WHEAT GROWN IN
LITHUANIA**

**SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION
Agricultural sciences, Agronomy (01A)**

Akademija, 2018

Dissertation was prepared during 2013–2017 in Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry according to order No. V–327 by the Minister of Education and Science, released on 24th of February 2012, which granted the doctoral right to Aleksandras Stulginskis University together with Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

Scientific supervisor

Dr. Skaidrė Supronienė (Lithuanian Research Center for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy 01A)

Scientific consultant

Dr. Roma Semaškienė (Lithuanian Research Center for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy 01A)

The defence of doctoral thesis will be held at the Council of Defence for Agricultural Sciences, Agronomy

Chairman

Prof. habil. dr. Zenonas Dabkevičius (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural sciences, Agronomy 01A)

Members

Prof. dr. Dalia Ambrazaitienė (Klaipeda University, Biomedical sciences, Biology 01B)

Dr. Gražina Statkevičiūtė (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural sciences, Agronomy 01A)

Dr. Judita Černiauskiene (Aleksandras Stulginskis University, Agricultural sciences, Agronomy 01A)

Prof. dr. Małgorzata Jedryczka (Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Agricultural sciences, Agronomy 01A)

Doctoral thesis will be defended at the public session of the Council of Defence for Agricultural sciences, Agronomy on the 26th of June, 2018 at 1 p.m., in the auditorium 217 of Aleksandras Stulginskis University.

Address: Studentų g. 11, Akademija, LT-53361, Kaunas distr., Lithuania.

The summary of the doctoral thesis was distributed on the 25th of May, 2018. The doctoral dissertation are available at the libraries of Aleksandras Stulginskis University and Lithuanian Research Center of Agriculture and Forestry.

INTRODUCTION

Plant diseases are the result of the plant – host interaction, pathogen virulence and environment conditions. The etiology of the disease is determined by the meteorological conditions as well as human activities: use of fungicides, cultivation technique, distribution of plant reproductive material, sowing methods and other factors. The impacts of a changing climate contribute to the high yield losses caused by the diseases (Parikka et al., 2012a).

Fungi of the *Fusarium* genus are the most economically important phytopathogens in crops worldwide (McMullen et al., 1997; Bottalico, Perrone, 2002). They cause harmful cereal disease - fusarium head blight (FHB) which reduces crop yield and quality, thereby contaminating grains with mycotoxins which are hazardous to human and animal health (Bottalico, Perrone, 2002; Surai, Mezes, 2005).

Certain fungi of the *Fusarium* genus and *Microdochium nivale* can cause FHB (Bottalico, Perrone, 2002; Yli-Mattila, 2010). In previous years, the species of *Fusarium poae*, *F. avenaceum* and *F. culmorum* dominated in cooler regions of the world, while *F. graminearum* - in the warmer ones (Bottalico, Perrone, 2002). The Central European region, major part of North America and Asia were designated as the area of the distribution of *F. graminearum* approximately up to year 2000 (Yli-Mattila, 2010). Subsequently, the rapid spreading of *F. graminearum* is observed in the Northern Europe – Holland, England (Waalwijk et al., 2003; Nicholson et al., 2003), Norway (Yli-Mattila, 2011), Sweden (Fredlund et al. 2008), Finland (Yli-Mattila et al., 2008, 2009; Parikka et al., 2012a; b), Denmark (Nielsen et al., 2011), Estonia, Latvia (Supronienė et al., 2010b) and Poland (Stepien et al., 2008). In Lithuania, the spread of *F. graminearum* has been established in recent years (Sakalauskas et al., 2014). The spreading of *F. graminearum* is associated with the use of glyphosate, reduced tillage (Fernandez et al., 2005), but most of all with environmental conditions and global warming (Parikka et al., 2012a, b).

F. graminearum, which is associated with FHB, belongs to a *F. graminearum* species complex consisting of at least 16 different phylogenetic species (O'Donnell et al., 2000, 2004, 2008; Starkey et al. 2007; Yli-Mattila et al., 2009). The main mycotoxins produced by *F. graminearum* and other closely related species such as *F. culmorum*, *F. cerealis* and *F. pseudograminearum* are the group B trichothecenes (TRI) - deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) (Jennings et al., 2004; O'Donnell et al. 2000; Ward et al., 2008). DON is the most common mycotoxin in cereals in Europe, including Lithuania (Bottalico, Perrone, 2002; Mankevičienė et al. 2007a, 2011). Maximum levels of DON in unprocessed cereals and their products are defined in the EU Commission regulations. NIV level is not limited, but studies show that its level of toxicity is similar to that of DON (Eriksen et al., 1998). Depending on the production of the group B TRI, *F. graminearum* isolates can be divided into two chemotypes: NIV or DON. DON chemotype is further divided into isolates producing 3-acetyl-deoxynivalenol (3ADON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15ADON). Among the *F. graminearum* isolates, the 15ADON chemotype is dominating in the United Kingdom (Jennings et al., 2004a, b), Austria (Adler et al., 2002), Germany (Talas et al., 2011), China (Yli-Mattila et al. 2010). The advantage of 3ADON has been established in

Finland (Jestoi et al., 2004a, b; 2008), Norway (Langseth et al., 1999) and Northwest Russia (Yli-Mattila et al., 2010).

TRI producers chemotyping studies have not been performed in Lithuania until now. There was no data available on the production of NIV in cereals. Fungi of genus *Fusarium* and mycotoxin studies in Lithuanian cereal production were carried out for about 10 years. Recently, a pronounced spread of *F. graminearum* species which was accompanied by an increase in concentrations of DON and ZEN toxins in grains, especially in spring cereals was observed. In a large part of the wheat DON contents exceeded the permitted limits (Mankevičienė et al., 2011, 2014; Supronienė et al., 2012b). The use of classical methods for the identification of *Fusarium* species was quite limited seeking to differentiate very closely, for example, the species of *F. graminearum* complex, and, moreover, did not allow to distinct the different chemotype of the same species. Chemotyping allow to assess the toxicity of trichothecene isolates, the structure of outdoor populations. With regard to similar researches in the neighboring countries, chemotyping allow to predict changes in *Fusarium* fungi populations in more detail rather than only species level, and at the same time to provide potential qualitative and quantitative changes in grain yields. As the isolates of different chemotype exhibited diverse metabolic activity and pathogenicity, the identification of predominant chemotypes would allow more effective use of crop protection measures and prevention of grain contamination with mycotoxins.

Hypothesis. The assessment of the spread, pathogenicity and resistance to fungicides of *F. graminearum* strains associated with the group B trichothecene production will reveal the toxicological potential of this fungus and allow for more efficient pathogen control in wheat.

The aim of the research was to determine the distribution of fusarium head blight causing pathogen - *F. graminearum* and the structure of *F. graminearum* chemotypes in the wheat grown in Lithuania, as well as assess the pathogenicity, morphological and phenotypic characteristics and sensitivity of different strains of *F. graminearum* chemotypes to fungicides.

Main tasks:

1. To assess the significance of *F. graminearum* fungi in the complexe of fusarium head blight causal agents - the group B trichothecene producers according to their prevalence in wheat grains.
2. Identify the *F. graminearum* chemotypes, assess their prevalence and distribution in wheat grains.
3. Assess the structure of *F. graminearum* chemotypes in spring wheat fields located in different places of Lithuania.
4. Assess the pathogenicity of different *F. graminearum* chemotype isolates to wheat, the morphological and phenotypic characteristics and sensitivity to fungicides *in vitro*.
5. Investigate the efficiency of chemical and biological preparations against *F. graminearum* induced fusarium head blight in wheat.

Statements for defence:

1. At the beginning of this decade greatly widespread pathogen *F. graminearum* is the main fusarium head blight causal agent among the group B trichothecene producers in wheat grown in Lithuania.

2. The structure of the *F. graminearum* chemotypes associated with the production of the group B trichothecenes in the wheat grown in Lithuania is typical to Central and Northern Europe, but the distribution of *F. graminearum* strains of 15-acetyl-deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in separate field populations is probably related to microclimatic conditions of a certain field.

3. Pathogenicity of *F. graminearum* isolates to winter and spring wheat varied depending on the individual aggressiveness of the isolate and the wheat genotype, but did not depend on the *F. graminearum* chemotype.

4. Different *F. graminearum* chemotype strains differed in the sensitivity to metconazole, tebuconazole and prothioconazole *in vitro*.

Scientific novelty. This study has shown that recently widely spread *F. graminearum* is one of the main causative agent of fusarium head blight in spring and winter wheat as well as trichothecene producer in Lithuania. The structure of *F. graminearum* chemotypes in wheat grown in Lithuania is typical to that of Central and Northern Europe with predominantly 15ADON producers compared to 3ADON and NIV ones. By assessing the structure of the chemotypes in the separate field populations, the distribution of 15ADON and 3ADON has been found to be due to the microclimatic conditions of a certain field. There were no clear differences in the pathogenicity, morphological signs and metabolism of different *F. graminearum* chemotypes, but they differed in susceptibility to metconazole, tebuconazole and prothioconazole *in vitro*.

Practical value of work. Compared with the previous years, the performed studies revealed the changes in the structure of fusarium head blight pathogens in Lithuania. It has been established that in recent years, the *F. graminearum* fungi, i.e. harmful producers of group B trichothecenes dominated in the wheat grown in our country. The data on *F. graminearum* chemotypes, their distribution in grains and field populations and the susceptibility to fungicides could be used to optimize the protection of the wheat from fusarium head blight as well as increase the quality of grain.

Approval of work. The main results have been presented and approved at the Nordic Baltic *Fusarium* seminar 494, Riga, Latvia; International 60th Conference of Physics and Natural Sciences „Open Readings 2017“, Vilnius.; International 59th Conference of Physics and Natural Sciences „Open Readings 2016“, Vilnius.; Scientific-Practical Conference “Jaunimas siekia pažangos 2015” (Young people seek progress’ 2015), Akademija, Kauno raj.; Symposium „Power of fungi and mycotoxins in health and disease 2015“, Šibenik, Croatia; XVIIIth International Plant Protection Congress, Berlin, Germany; Nordic Baltic *Fusarium* seminar 478, 2014, Helsinki, Finland; International Symposium of the XIX Baltic Mycologists and Lichenologists 2014, Skede, Latvia; 3rd Young Scientists Conference

„Jaunieji mokslininkai žemės ūkio pažangai“ (Young Scientists for the Progress of Agriculture), 2014, Vilnius.

Publications. Two scientific publications have been published on the topic of the dissertation: one publication, referenced and cited in the Clarivate Analytics Web of Science database, and one peer-reviewed periodical. There are also 6 summaries in scientific conferences.

Content and volume of dissertation. The doctoral dissertation is written in the Lithuanian language. It consists of 120 pages, 20 tables, 17 figures. A total of 163 references have been used. The dissertation contains introduction, literature review, materials and methods, results and discussions, summary, conclusions, references, list of publications.

MATERIALS AND METHODS

Experiment characteristics: The experiments have been carried out in 2014–2017. Laboratory analysis has been carried out at the Laboratory of Microbiology and at the Laboratory of the Department of Plant Pathology and Protection (PPP) of the Institute of Agriculture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. Field experiments have been conducted on the experimental fields of PPP Department.

Collection of grain samples. Grain samples have been collected according to the rules of *International Seed Testing Association* (2014). 148 grain samples of spring and winter wheat have been collected from 49 commercial farms located in 12 different districts of Lithuania in the years 2013 and 2014 (Fig. 1). In each district, the samples have been taken on the average from three farms; and from 3–5 different fields of each farm. Approximately 1 kg of grain has been taken immediately after thrashing. Laboratory samples (about 100 g) were stored at -20 °C till performance of analysis.

Collection of wheat heads. Wheat heads for the *F. graminearum* population analysis have been collected from different fields of spring wheat in 2014 and 2015: 4 fields were located in Alytus, Kretinga, Mažeikiai and Vilkaviškis districts, 3 – in Kėdainiai district, and 2, next to each other, in Šakiai district (Fig. 1). From each field, 60 heads with clear symptoms of FHB were randomly collected, taking 20 heads at the beginning, in the middle and at the end of every field. Collected samples were stored at -20 °C temperature, till performance of analysis.

***Fusarium* spp. infection level in grain.** 120 grains from each sample were sterilised for 1 min in 1.0% NaOCl solution, then rinsed 3 times with sterile water, drained on sterile filter paper and placed to a Petri plate (10 grains per plate) on a PDA medium containing Triton-X (0.8 ml / L). *Fusarium* spp. damaged grains (%) have been assessed after 7–14 days incubation at the temperature of 25 ± 2 °C (Mathur, Kongsdal, 2003)

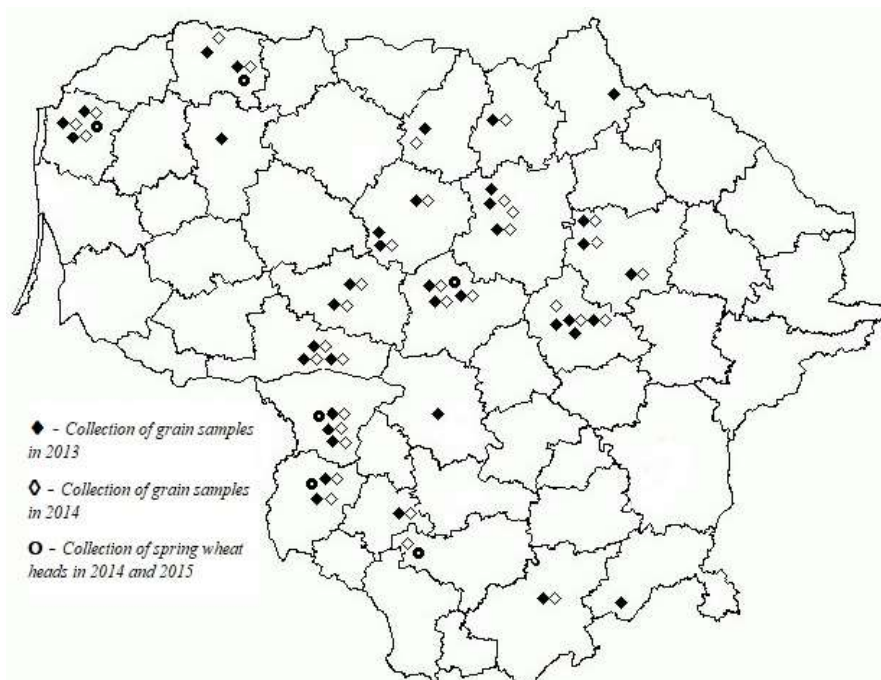


Fig. 1. The sampling points for spring and winter wheat grains in 2013 and 2014 year, and the sampling points for spring wheat heads in 2014 and 2015 year, in Lithuania

***F. graminearum* isolation from heads.** Isolation of *F. graminearum* from FHB infected heads was performed according to Talas et al. (2011) methodology.

***Fusarium* fungi morphological identification.** Monocultures have been purified according to the methods described by Leslie, Summerell (2006), and grown on PDA and SNA at 25 ± 2 °C for 10-30 days until the formation of macroconidia. Species were identified by Nelson et al. (1983) and Leslie, Summerell (2006). *F. graminearum* isolates have been selected for further molecular studies.

Grain homogenization before DNA extraction. 10 grams of grain from each sample were homogenised using a Retsch mill M 301 (Retsch GmbH, Germany). The grain powders were stored in plastic bags in the freezer (-20 °C) till extraction of DNA.

DNA extraction from pure *F. graminearum* cultures and grain. The DNA was extracted from a flour sample or fresh mycelium of 0.1 g using a commercial DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lithuania). The DNA extraction procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The DNA was stored at +4 °C in the fridge for a short time, and at -20 °C in the freezer for longer time.

DNA quality control. The DNA quality was verified by the biophotometer and electrophoresis in 1.0% of agarose gel.

Real time PCR conditions. The reaction was carried out on the 96-well microplate (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate) using a commercial reaction mixture with SybrGreen (Power SYBR ® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, JAV), in a thermocycler 7900HT Sequence Detection system (Applied Biosystems, JAV). Reaction volume 12.5 µl: 6,25 µl Power SYBR ® Green PCR Master Mix; Using 300 nM primers

(Table 1 - depending on the target), 0.4 µg/µl bovine serum albumin – BSA (Thermo Fisher Scientific, Lithuania); 2,4 µl ddH₂O; 2.5 µl the DNA of the test sample. Cycling protocol: 2 min 50 °C; 10 min 95 °C; (15 °C, 95 °C; 1 min 62 °C) repeated for 40 cycles.

Table 1. Primers *EF1a* used to Real Time PCR

Target	Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
<i>F. graminearum</i>	FgramB379 fwd	CCATTCCTGGGCGCT	Nicolaisen et al., 2009
	FgramB411 rev	CCTATTGACAGGTGGTTAGTGACTGG	
3ADON	3ADONfwd	AACATGATCGGTGAGGTATCGA	
<i>F. graminearum</i>	3ADONrev	CCATGGCGCTGGGAGTT	
15ADON	15ADONfwd	GTTTCGATATTCATTGGAAAGCTAC	Nielsen et al., 2012
<i>F. graminearum</i>	15ADONrev	CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA	
NIV	NIVfwd	GCCCATATTCGCGACAATGT	
<i>F. graminearum</i>	NIVrev	GGCGAACTGATGAGTAACAAAACC	
Plant	Hor1fwd	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC	Nicolaisen et al., 2009
	Hor2rev	GGCCCTTGTAACCAGTCAAGGT	

Quantitative assessment of *F. graminearum* and different chemotype strains DNA in grain samples. *F. graminearum* species and potential 15ADON, 3ADON and NIV producers were quantified in wheat grain samples by quantitative real-time PCR (qPCR). Ten-fold dilution series of pure *F. graminearum* (verified by real-time PCR) and *F. graminearum* strains identified as potential producers of 15ADON (strain A18.10), 3ADON (strain D40.1.1) and NIV (strain G108) DNA have been used for standard curves. A plant assay was performed according to Nicolaisen *et al.* (2009) and the values given as the amount of fungal DNA per amount of plant DNA.

Morphological characteristics of different *F. graminearum* chemotype strains. The isolates were grown on PDA, SNA and carrot agar at 15 °C, 20 °C and 25 °C temperatures. Each day the diameter of the colonies was measured. On the sixth day of growth, the length and width of 30 conidia of each isolate were measured on a SNA medium at 25 °C in the dark (Leslie and Summerell, 2006). After 10 days of growth on the PDA, the color of the colonies was assessed from the top and the bottom.

Phenotypic characteristics of different *F. graminearum* chemotype strains. The ability of *F. graminearum* isolates of different chemotype to absorb various carbon and nitrogen sources has been studied. Two isolates of 3ADON chemotype A (strain 18.10) and B (45.4.1), 15ADON chemotype isolate D (40.1.1) and one NIV chemotype G (108) isolate were used in the experiment. For phenotyping of isolates, Biolog Phenotype Microarray 96-well microplates PM1, PM2A (both with different sources of carbon) and PM3B (with different nitrogen sources) were used. The procedure was carried out in accordance with the protocol recommended by the Biolog manufacturer.

F. graminearum colonies were grown for 7 days on a PDA medium, then a mycelium with conidia was washed from the plates and a 62% of absorbance inoculum was prepared in Biolog IF-F inoculum fluid. 50 µl of the resulting suspension was transferred to a 20 ml IF-F - aqueous solution (4:1) and inoculated (100 µl per well) into phenotyping microplates. The solution for PM3B microplate was further supplemented by 0.6 ml of 32 M glucose and 1.6 ml of aqueous 1 M phosphate and sulfate solutions, correspondingly reducing the volume of pure water in them. The inoculated microplates were incubated for 5 days at 26 °C and scanned by Biolog MicroLOG microplate reader at 590nm wave length. The results have been rated by using “+/-” system where “+” denoted the ability of an isolate to catabolise a particular source and “-” denoted inability.

Pathogenicity of different *F. graminearum* chemotype strains to wheat. Seven *F. graminearum* strains were used in pathogenicity tests: three of 3ADON (18.10, 26.10.3, 45.4.1), three of 15ADON (29.8.2, 32.7, 40.1.1) and one of NIV (108). Pathogenicity tests have been performed on different varieties of spring and winter wheat using a detached leaf assay (Kumar et al., 2011) *in vitro* and wheat head inoculation test in the field conditions (Haidukowski et al., 2005). Both experiments have been repeated twice.

Preparation of inoculum. *F. graminearum* isolates for the inoculum have been grown on an SNA medium at 25 ± 2 °C for 7 days. The concentration of spores was assessed in the hemocytometer chamber. The working concentration for the *in vitro* test was prepared as 1.0×10^6 spores ml⁻¹.

Detached leaf assay was performed on four winter wheat varieties, i.e. on SW Magnifik, Skagen, Kovas DS, Famulus and five spring wheat varieties, namely Hamlet, Tybalt, Vanek, Diskett and Triso. The plants were grown in a greenhouse for 5 weeks until development of three leaves (BBCH 13). Second- and third-leaf segments of 4 cm long from the middle part of the leaf have been used for pathogenicity studies. Four leaflets were put per Petri plate on 0.5% water agar supplemented with 10 mg l⁻¹ of kinetin. The leaflets at the middle were damaged using the pipette tip and inoculated with 5 µl of spore suspensions to different strains of *F. graminearum* chemotype or ddH₂O in the control treatment. The length and diameter of necrotic area was measured daily up to 3 days (Kumar et al., 2011). Inoculated leaflets were incubated at room temperature.

Spring wheat varieties Diskett and Tybalt were selected for field experiment. Heads were inoculated with the spore suspensions of different *F. graminearum* chemotypes (concentration 0.6×10^4) on the same day to avoid the difference in meteorological conditions. The pathogenicity of *F. graminearum* for spring wheat was estimated according to the incidence and severity of FHB, grain infection level and grain yield.

Sensitivity of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains to fungicides *in vitro*. There has been examined the sensitivity of seven *F. graminearum* strains, namely, three of 3ADON (18.10, 26.10.3, 45.4.1), three of 15ADON (29.8.2, 32.7, 40.1.1), and one NIV (108) chemotype to tebuconazole, metconazole, and prothioconazole that were the triazole fungicide active substances used for FHB control. The study used 96-well microplates (300 µl volume wells) and non-agarized minimal *Fusarium* medium (FMM) (Leslie et al., 2006). The FMM medium was supplemented by the fungicides with the maximum concentration of 1 µM and reduced by double dilutions to 1/512 µM. The

fungicides were dissolved and diluted by 96% ethanol, at the concentration equal to 4% of the total volume of the medium in all the dilutions. The study used 2 negative controls: 100% FMM medium and 96% FMM medium – 4% ethanol solution. The layout of the study options on the microplate was shown in Figure 2. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the selected fungicides inhibiting the growth of *F. graminearum* was assessed.

NK	NK	NK	1/64	1/64	1/64	1/16	1/16	1/16	1/4	1/4	1/4
			μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
NK+Et	NK+Et	NK+Et	1/128	1/128	1/128	1/32	1/32	1/32	1/8	1/8	1/8
			μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
1	1	1	1/256	1/256	1/256	1/64	1/64	1/64	1/16	1/16	1/16
μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
1/2	1/2	1/2	1/512	1/512	1/512	1/128	1/128	1/128	1/32	1/32	1/32
μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
1/4	1/4	1/4	1	1	1	1/256	1/256	1/256	1/64	1/64	1/64
μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
1/8	1/8	1/8	1/2	1/2	1/2	1/512	1/512	1/512	1/128	1/128	1/128
μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
1/16	1/16	1/16	1/4	1/4	1/4	1	1	1	1/256	1/256	1/256
μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
1/32	1/32	1/32	1/8	1/8	1/8	1/2	1/2	1/2	1/512	1/512	1/512
μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM

Metconazole *Prothioconazole* *Tebuconazole*

NK – negative control; NK+Et – negative control with 4% ethanol

Fig. 2. The location of the study options in a 96-well microplate is to detect the minimum concentration of metconazole, prothioconazole and tebuconazole inhibiting growth of *F. graminearum*.

Prior to experiment, *F. graminearum* isolates were cultured on agarized SNA medium for 7 days at 25 °C. Inoculates were prepared by washing the fungus mycelium with the spore mass from the plate by a sterile FMM medium. The concentrations were measured using the turbidimeter and unified up to 70% of absorbance. The resulting inoculates were poured into microplates by 25 μl in each well and then filled up with 100 μl pure FMM medium, FMM and ethanol or FMM and ethanol a solution with fungicides dissolved therein. All three options of the study were examined in 3 replicates. Inoculated microplates incubated at 25 °C for 10 days, followed by visual MIC determination.

Influence of chemical and biological preparations against *F. graminearum* in vivo. *F. graminearum* susceptibility to fungicidal and potential biological control means was determined under the conditions of artificially caused FHB infection in winter and fungicides in the *in vitro* experiment. The artificial infection was carried out in winter spring wheats on the experimental fields of the Institute of Agriculture of the LAMMC in the summer of 2015 and 2016. For artificial infection, the 3ADON chemotype *F. graminearum* isolate 26.10.3 was used, which was one of the most susceptible to wheat variety 'SW Magnifik' and spring wheat varieties 'Diskett' and 'Tybalt'. *F. graminearum* 26.10.3 susceptibility was investigated for the fungicide Juventus (BASF, active substance metconazole, 90 g l⁻¹) and for the

metabolites of *B. subtilis* bacteria strains MBK-a3 and MBK-r4 in the tryptic soy broth medium, retrieved from the microorganism collection of the Faculty of Natural Sciences, Vilnius University. The impact of *B. subtilis* bacterial strains MBK-a3 and MBK-r4 against 17 *Fusarium* strains was established in previous studies (Sakalauskas et al., 2014).

Field experiment conditions. Each of the metconazole (90 g^l⁻¹) and cell-free supernatants from the selected bacterial strains were applied in water volume of 400 L ha⁻¹. Bacterial supernatants were diluted 1:2 (v/v) for 400 L ha⁻¹. Spraying was carried out during wheat anthesis using a high pressure bicycle sprayer. The pressure was equal to 3 bars; a flat fan nozzle was used and the propellant was compressed by N₂. Inoculation with *F. graminearum* spore suspension, at 40 ml per m² (600 ml per plot), took place during 24 hours of fungicide application using the same bicycle sprayer. Both inoculation and treatment by the test products were performed in the evening, at the wind-free conditions at relative humidity exceeding 75% (Haidukowski et al., 2005). The efficiency of the test products against FHB and *F. graminearum* influence on grain yield parameters were assessed by comparing the artificially inoculated untreated plots (untreated control). The concentration of *F. graminearum* spores in the suspension for winter wheat was 0.6 x 10⁴ spores ml⁻¹ and for spring wheat – 1.0 x 10⁴ spores ml⁻¹.

FHB incidence and severity were assessed at the late milk growth stage (BBCH 77) according to the scale proposed by Engle et al. (2003). 100 heads per plot were randomly selected and examined. Grain yields in t ha⁻¹ were adjusted to 15% moisture content. Moisture (%) of harvested grain, protein (%), gluten (%) and starch (%) contents and sedimentation value were determined using an Infratec 1241 whole grain analyser (Foss, Denmark), and thousand grain weight (TGW) was calculated with a Condator grain counter (Hoffman Manufacturing, Germany). The percentage of *Fusarium*-damaged grains was assessed by weighing the visually shrivelled and/or discoloured grains according EU standard EN 15587:2008+A1:2013. The percentage of *F. graminearum*-infected grain was detected by plating the surface-sterilised wheat grain onto PDA (Merck, Germany) and subsequent visual and microscopic analysis of morphological features of mycelial growth according to Leslie et al. (2006) was carried out.

Meteorological conditions. Meteorological conditions were described basing on the data from the LHTM Dotnuva Meteorological Station, registered at the Academy (Kedainiai district) in 2015 and 2016. Both years, the weather conditions were unfavorable for the spread of FHB. Comparing the two years, the weather conditions in 2016 were less favorable for the spread of FHB than in 2015.

Data analysis. The data of the research has been processed using a dispersion analysis method. Calculations of average and standard deviations for the statistical analysis were carried out by using the MS Excel program. The minimum significant difference R05 was calculated using the ANOVA program (Tarakanovas, Raudonius 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Presence of trichothecene producing *Fusarium* spp. in wheat grains. In this study, the predominant trichothecene (TRI) producing *Fusarium* species were identified and quantified in wheat grains grown in Lithuania. In 2013 and 2014, the *Fusarium* fungi infected on the average 43.0% of spring and 16.1% of winter wheat grain. These findings coincide with Suproniene et al. (2010a) studies, where *Fusarium* infection was also detected higher in spring cereal grain (on average 44.5% in 2005 and 19.4% in 2006) than in winter cereal grain (on average 9.5% in 2005 and 8.4% in 2006).

Of the species capable of producing DON, 3ADON, 15ADON and NIV, *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae* were detected (Table 2). *F. graminearum* was dominant in spring wheat (found in 13.7% of grain, *F. poae* in 8.2% and *F. culmorum* in 0.4%), and *F. poae* slightly dominated in winter wheat (2.9% of grain, *F. graminearum* 2.2%, *F. culmorum* 0.2%). According to data of literature sources, TRI are synthesized by the *F. graminearum* species complex and other closely related species such as *F. culmorum*, *F. cerealis* and *F. pseudograminearum* (O'Donnell et al., 2000, 2004; Bennett, Klich, 2003; Goswami, Kistler, 2004; Starkey et al., 2007; Yazar et al., 2008). NIV in grains could also be produced by *F. poae* (Bottalico, Perrone, 2002; Yli-Mattila, 2010).

Table 2. Presence of *Fusarium* species in spring and winter wheat grain harvested in Lithuania in 2013 and 2014 years

The number of grains damaged by <i>Fusarium</i> , %							
<i>Fusarium</i> spp.	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. avenaceum</i>	Other <i>Fusarium</i>	
<i>Spring wheat, 2013, No. of samples = 64</i>							
Mean	45.3	12.3	0.2	4.3	3.2	18.1	9.8
Sx	3.4	1.6	0.1	0.7	0.4	1.7	1.8
Min	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Max	96.7	49.2	1.7	25.8	10	60	112.5
<i>Spring wheat, 2014, No. of samples = 64</i>							
Mean	40.7	15.0	0.5	12.0	5.1	10.2	1.6
Sx	3.6	2.9	0.1	2.4	1.0	1.5	0.5
Min	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0
Max	100.0	95.0	5.8	79.2	42.5	50.0	18.3
<i>Winter wheat, 2013, No. of samples = 64</i>							
Mean	23.4	2.6	0.2	3.9	3.1	13.1	3.4
Sx	6.4	0.6	0.1	0.9	1.4	4.3	1.0
Min	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Max	90.0	6.7	2.0	13.3	20.0	60.7	10.8
<i>Winter wheat, 2014, No. of samples = 64</i>							
Mean	8.7	1.8	0.1	1.8	0.6	3.7	0.5
Sx	2.7	1.0	0.1	1.4	0.4	1.8	0.4
Min	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Max	39.2	8.3	0.8	14.2	3.3	19.2	3.4

Higher amounts of *F. graminearum* DNA in both wheat grain was found in 2013, compare to 2014. In 2013, the amount of *F. graminearum* DNA in spring wheat grain was 7.4 times higher (102.2 pg ng⁻¹) than in winter wheat grain (13.9 pg ng⁻¹), while in the year 2014 - only 3.2 times higher (Table 3).

These study showed that in 2013 and 2014 *F. graminearum* was one of the main species among the B group TRI producers in Lithuania grown wheat. Foreign studies also show that *F. graminearum* is the most common species worldwide (Schilling et al., 1996; Ward et al., 2008; Boutigny et al., 2011; Yli-Mattila et al., 2017). Meanwhile, studies carried out in 2005 and 2006 in Lithuania showed that *F. poae* was dominant TRI producing *Fusarium* species and *F. graminearum* DNA was not completely detected in the 36 comercial varieties tested (Suproniene et al., 2010a).

Table 3. *F. graminearum* DNA quantity in spring and winter wheat grains harvested in Lithuania in 2013 and 2014 years

Indicators	<i>F. graminearum</i> DNA (pg) per plant DNA (µg)		
	2013	2014	
Spring wheat	Mean	102.2	23.0
	Sd	21.6	5.3
	Min	0.0	0.0
	Max	1068.6	182.5
No. of samples investigated		64	50
No. of positive samples		63	49
Winter wheat	Mean	13.9	7.2
	Sd	4.3	4.0
	Min	0.1	0.01
	Max	54.6	58.8
No. of samples investigated		15	15
No. of positive samples		15	15

***F. graminearum* chemotypes, their prevalence and distribution in spring and winter wheat grains.** Chemotyping results showed that among the pure *F. graminearum* cultures 73.3% of isolates were potential producers of 15ADON, 26.7% – of 3ADON, and 1.0% – of NIV (Table 4). Comparing this data with the studies carried out in Northern Europe, it was obvious that the chemotype distribution in Lithuania grown wheat was more similar to the results of research carried out in Germany where the 15ADON producers also prevailed and a very small proportion of NIV producers was detected (Talas et al., 2011). Studies in Britain showed a much higher proportion of NIV producers (25%), but 15ADON again was the dominant chemotype (Jennings et al., 2004a, b).

The assessment of TRI chemotype producers in a homogenized grains revealed a somewhat different picture than in pure *F. graminearum* cultures: the frequency of detection of 3ADON was found to be as high (69.8%) as of 15ADON (78.3%) (Table 5).

The essential difference between these two studies was the higher detection frequency of the 3ADON chemotype. This chemotype in Europe, both in pure cultures and in grains, was relatively low and was more frequent in South-East Asia and the eastern part of North America (Becher et al., 2013).

Table 4. *F. graminearum* 15ADON, 3ADON and NIV chemotype identification in pure cultures by using real time PCR

Ct meaning	Positive samples, %			
	<i>F. graminearum</i>	15ADON	3ADON	NIV
≤ 29	99.0	64.8	20.0	1.0
30-37	1.0	6.7	5.7	0.0
38-40	0.0	1.9	1.1	0.0
Negative samples, %	0.0	26.7	73.3	99.0

Table 5. DNA quantity (pg fungal DNA/μg plant DNA) of 3ADON, 15ADON and NIV chemotype in spring and winter wheat grain harvested in Lithuania in 2013 and 2014

Indicators	2013 year			2014 year			
	15	3 ADON	NIV	15	3 ADON	NIV	
	ADON			ADON			
Spring wheat	Mean	97.1	4174.7	4.9	14.5	405.9	0.0
	Sd	43.9	1265.6	3.1	6.5	113.7	0.0
	Min	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Max	2090.4	62862.8	177.5	283.2	3059.4	0.0
No. of samples investigated		64	64	64	50	50	50
No. of positive samples		55	59	4	36	35	0
Winter wheat	Mean	0.6	359.0	33.3	0.7	190.7	0.0
	Sd	0.3	209.4	33.3	0.5	94.9	0.0
	Min	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Max	4.6	3146.2	499.9	7.5	1234.6	0.0
No. of samples investigated		15	15	15	15	15	15
No. of positive samples		9	8	1	6	10	0

Structure of *F. graminearum* chemotypes in the fields of spring wheat located in different places of Lithuania. *F. graminearum* was isolated from FHB infected spring wheat heads, collected in 2014 and 2015 at different fields of Lithuania. The potential producers of 15ADON made up on the average 70%, 3ADON producers – 30%, and NIV producers have not been found (Fig. 3). The structure of the *F. graminearum* chemotypes, varied not only between the research year and different districts, but also between the fields in the same district and adjacent fields.

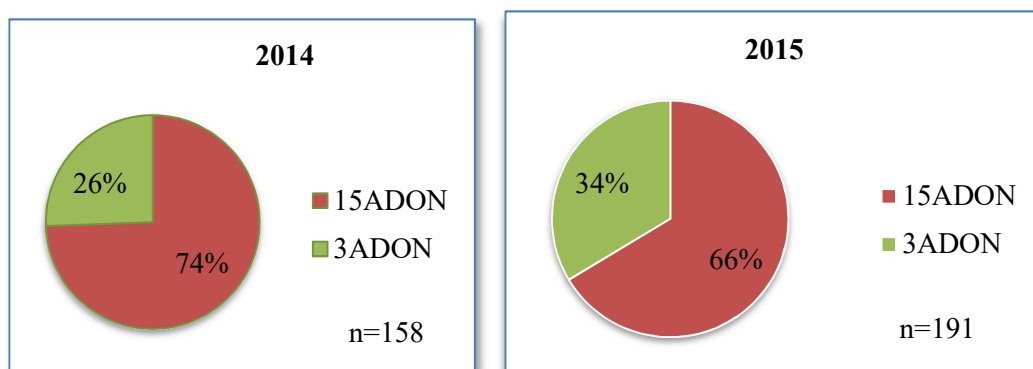


Fig. 3. Distribution of *F. graminearum* 15ADON and 3ADON chemotypes in spring wheat in 2014 and 2015 year. n - number of isolates tested

Morphological and phenotypic features of *F. graminearum* isolates of different chemotype. The morphological characteristics of the *F. graminearum* isolates: colony structure, color, growth rate and size of the conidia indicated that there was no link between the fungal chemotype and the morphological features it was similar to the result of research carried out of Liu et al. (2017), whose found that the morphological characteristics of the 3ADON, 15ADON and NIV chemotypes were not significantly different. In our study, the color and structure of mycelium in different chemotypes isolates did not differ. *F. graminearum* mycelium color varied from pale orange to yellow, and from red brown to orange which probably varies depending on the pH of the medium (Leslie and Summerell, 2006). In this study, there has been also found that the *F. graminearum* chemotype had not affected the metabolic activity (the ability to absorb different carbon and nitrogen sources) of the fungus.

Sensitivity of *F. graminearum* chemotype strains to fungicides *in vitro*. In these studies, the sensitivity of seven *F. graminearum* strains (three – 3ADON, three – 15ADON, one – NIV) to fungicides (tebuconazole, metconazole, prothioconazole) *in vitro* was determined. All fungicidal active substances are used against FHB. However, in recent years, the world has come to the conclusion that the efficacy of tebuconazole in the fields against FHB is inadequate (McMullen et al., 2012).

F. graminearum 3ADON, 15ADON and NIV chemotype isolates susceptibility to metconazole, prothioconazole, and tebuconazole *in vitro* studies showed that all the seven studied *F. graminearum* isolates were susceptible to used fungicide, however, mostly sensitive they were to metconazole impact (average minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.03 μM), and most resistant they were to tebuconazole (average MIC of 0.14 μM) (Fig. 4 A). Susceptibility to prothioconazole was medium (average MIC of 0.1 μM). The studied isolates differed according to susceptibility to different fungicides, but in all cases the same susceptibility trend remained – the MIC of metconazole in all the *F. graminearum* strains was the lowest, while that of tebuconazole was the highest. On the average, to inhibit the growth of 15ADON chemotype isolates the increased concentration of active substances was required rather than for 3ADON chemotype isolates (Fig. 4 B).

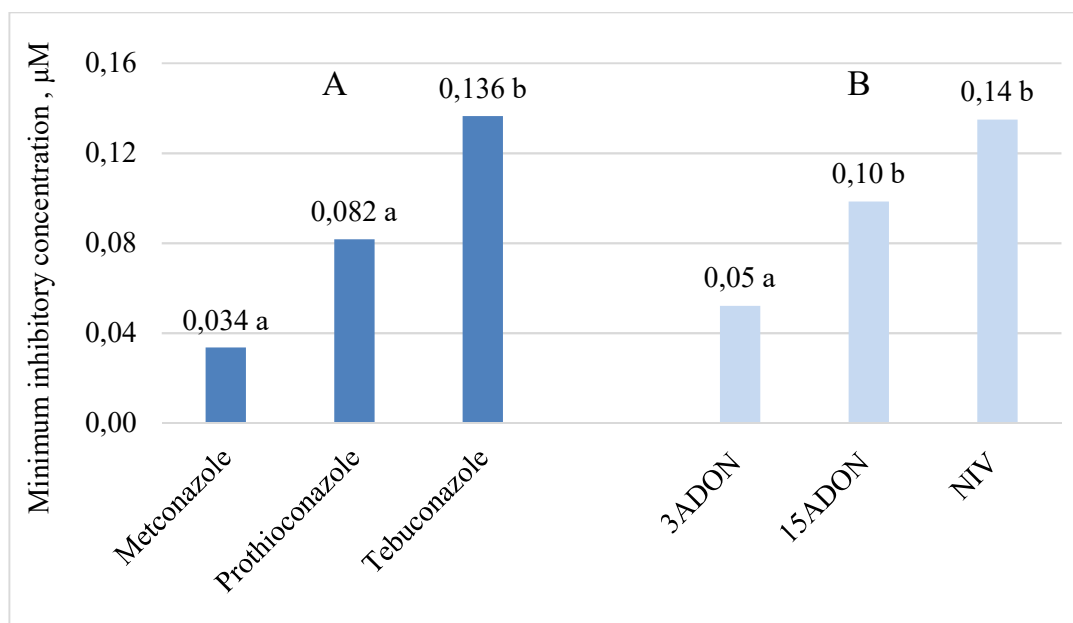


Fig. 4. Minimum inhibitory concentration (MIC: **A** - of different fungicide inhibiting *F. graminearum* mycelium growth; **B** - of fungicides for different *F. graminearum* chemotype strains

*Different letters indicate the significant differences between the treatments ($P < 0.05$)

Pathogenicity of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains to different varieties of winter and spring wheat *in vitro*. The results of detached leaf assay showed that the development of necrosis spots on leaves was essentially dependent on the wheat genotype (Table 6).

Table 6. Influence of spring wheat genotypes on leaf damages caused by *F. graminearum* infection

Variety	Diameter of necrotic area, mm		
	24 hours after inoculation	48 hours after inoculation	72 hours after inoculation
Hamlet	5.2 e	10.0 d	11.5 cd
Tybalt	3.8 bc	8.0 b	10.3 bcd
Vanek	4.8 cde	9.6 d	11.8 d
Diskett	2.4 a	6.5 a	8.4 a
Triso	3.4 ab	8.0 b	9.9 b

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($P < 0.05$)

Significant differences appeared among individual *F. graminearum* strains, but there was no differences observed between the pathogenicity of different chemotypes (Table 7). In both winter and spring wheat, the smallest necrotic area was detected on the leaves induced with the 3ADON 26.10.1 strain, while exceptionally large spots were formed by the

15ADON strain 40.1.1. Liu et al. (2017) found that there was no significant difference between the aggressiveness of *F. graminearum* 3ADON and 15ADON chemotype strains to wheat, but the pathogenicity of the studied NIV chemotype was significantly lower.

Table 7. Influence of *F. graminearum* chemotype strains on winter wheat leaf damage

Chemotype	Strain	Diameter of necrotic area, mm		
		24 hours after inoculation	48 hours after inoculation	72 hours after inoculation
3ADON	18.10	7.6 bcd	13.8 b	16.5 bcd
	45.4.1	7.5 bcd	14.5 bcd	16.9 bcd
	26.10.3	4.9 a	11.2 a	13.6 a
15ADON	40.1.1	8.4 d	16.3 d	18.2 d
	32.7	7.3 bcd	14.7 bcd	17.3 bcd
NIV	108	6.9 b	14.5 bcd	17.1 bcd

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($P < 0.05$)

Pathogenicity of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains to different varieties of spring wheat *in vivo*. The results of the *in vivo* study showed that all *F. graminearum* strains, irrespective of the chemotype, increased the incidence and severity of FHB, visually observed amount of *Fusarium*-damaged grains and *F. graminearum* infection level in the grains and had a negative impact on the weight of 1000 grains of Diskett variety (Table 8). However, the differences were more pronounced among isolates rather than among chemotypes. Von der Ohe's et al., 2010, studies found that *F. graminearum* isolates of 3ADON chemotype posed a higher risk to food safety, but the average aggressiveness and DON production of Canadian *F. graminearum* isolates with 3ADON and 15ADON chemotypes in field-grown spring wheat were similar.

Efficiency of chemical and biological control measures against artificially induced fusarium head blight in wheat. The study showed that fungicide metconazole significantly reduced the incidence and severity of FHB and the amount of *Fusarium*-damaged grain (%) in winter and spring wheat (Table 9, Table 10). *Bacillus* sp. MBK-a3 strain showed the potential in reducing the *F. graminearum* induced FHB incidence and severity in spring wheat variety Diskett. MBK-r4 showed only the capability to reduce *F. graminearum* infection in harvested grain, as there was less *Fusarium*-damaged grain of spring wheat variety Diskett and winter wheat variety Magnific compare to control.

Table 8. Severity of *Fusarium* head blight (FHB) and 1000 grain weight of spring wheat inoculated at anthesis with different *F. graminearum* chemotype strains in 2015 year

Treatment		FHB severity, %		1000 grain weight, g	
		Diskett	Tybalt	Diskett	Tybalt
Control	Not infected	0,5 a	0,4 a	39,5 c	44,4 abc
3ADON	A (18.10)	23.5 bcd	6.7 b	37.4 a	45.4 c
	B (45.4.1)	26.1 cd	13.1 d	37.0 a	44.1 abc
	C (26.10.3)	22.2 bcd	15.9 d	37.3 a	43.6 abc
15ADON	D (40.1.1)	25.1 cd	7.8 b	36.5 a	44.6 abc
	E (32.7)	19.9 bcd	7.7 b	37.5 abc	44.1 abc
	F (29.8.2)	26.2 d	6.9 b	37.8 abc	43.0 a
NIV	G (108)	15.6 b	7.1 b	38.0 abc	45.0 bc

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

Table 9. Influence of fungicide metconazole and *B. subtilis* strains to fusarium head blight (FHB) incidence and severity (%), *Fusarium*-damaged and *F. graminearum*-infected grain (%) of spring wheat variety Diskett.

Treatments	FHB incidente, %			FHB severity, %			Fusarium-damaged grain, %			F. graminearum-infected grain, %		
	2015	2016	Avg	2015	2016	Avg	2015	2016	Avg	2015	2016	Avg
Control	48.7	39.5	44.1	28.0	8.1	18.0	1.5	12.4	7.0	36.0	76.0	56.0
Metconazole	25.7	27.3	26.5**	7.6	4.1	5.8**	0.2	7.1	3.6**	8.7	51.3	30.0**
MBK-a3	41.0	34.3	37.6*	23.2	6.3	14.8*	0.9	10.2	5.5**	28.7	72.3	50.5
MBK-r4	43.3	36.5	39.9	24.4	8.0	16.2	1.6	8.9	5.2**	32.7	83.0	57.8
Avg	39.7	34.4*	37.0	20.8	6.6**	13.7	1.0	9.8	5.3	26.5	70.6**	48.6
<i>F</i> _{fakt. year}	n.s.			**			**			**		
<i>F</i> _{fakt. options}	**			**			**			**		
<i>F</i> _{fakt. year x options}	*			**			**			n.s.		

* - statistically significant differences $P \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $P \leq 0.01$, n.s. – statistically unreliable

The antifungal activity of MBK-a3 and MBK-r4 cultures against *F. graminearum* has been shown in previous work *in vitro* (Sakalauskas et al., 2014). However, the general findings of this study showed that *Bacillus* sp. bacterial strains MBK-a3 and MBK-r4 can not be used for biocontrol of *F. graminearum* *in vivo*, although the effect of bacterial agents has been positive but is generally statistically insensitive, therefore, it is necessary to look for more effective strains. The potential of *Bacillus* sp. strains in successful biocontrol against *Fusarium* strains has also been demonstrated by the following research works

(Marten et al., 2000; Cavaglieri et al., 2005; Sun et al., 2011; Yuan et al., 2012; Prashar et al., 2013;)

Table 10. *Fusarium head blight (FHB) incidence and severity (%) in the winter wheat crop 'SW Magnifik' at the end of maturity (BBCH 77), Fusarium-damaged and F. graminearum-infected grain (%) after harvest*

Research options	FHB incidente, %			FHB severity, %			Fusarium-damaged grain, %			F. graminearum-infected grain, %		
	2015	2016	Avg.	2015	2016	Avg.	2015	2016	Avg.	2015	2016	Avg.
Control ^a	32.1	19.85	25.9	8.8	1.8	5.3	0.77	2.54	1.7	18.8	35.8	27.3
Metconazole	26.5	9.3	17.9**	4.1	0.3	2.2**	0.37	0.82	0.6**	3.0	3.5	3.3**
MBK-a3	32.5	21.5	27.0	9.78	1.8	5.8	0.78	2.57	1.7	14.3	24.5	19.4**
MBK-r4	32.3	18.3	25.3	9.0	1.2	5.1	0.74	2.59	1.7	11.3	19.5	15.4**
Avg.	30.8	17.2**		7.9	1.2**		0.7	2.1**		11.8	20.8**	
<i>F_{fakt.} year</i>		**				**			**			**
<i>F_{fakt.} options</i>		**				**			**			**
<i>F_{fakt.} year x options</i>		n.s.				n.s.			**			*

^a - control - protection measures not used;

* - statistically reliable differences $P \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $P \leq 0.01$, n.s. - statistically unreliable

CONCLUSIONS

1. In 2013 and 2014, *Fusarium* fungi infected on the average 43.0% of spring and 16.1% of winter wheat grain. Of potential producers of DON, 3ADON, 15ADON and NIV in the grain there was identified *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae* species. In spring wheat, *F. graminearum* prevailed – detected on the average in 13.7%, in winter wheat was second species – detected in 2.2% of grains. In 2013, the amount of *F. graminearum* DNA in spring wheat grain was 7.4 times higher (102.2 pg ng⁻¹) than in winter wheat grain (13.9 pg ng⁻¹), while in the year 2014 the figure made up only 3.2 times.
2. The chemotype study showed that 73% of the *F. graminearum* isolates found in spring wheat grain were potential producers of 15ADON, 26% of 3ADON, and only 1% of NIV. The quantitative estimation of chemotype producers in homogenized grain using the qTL PCR method showed that the frequency of detection of 3ADON (69.8%) was as high as that of 15ADON (78.3%). In the spring wheat fields located in different places of Lithuania, the structure of the population of *F. graminearum* varied not only among the different regions and years of research, but also among the areas and adjacent fields. The potential producers of 15ADON made up on the average 66%, 3ADON producers - 34%, and NIV producers were not detected.

3. The results of morphological (colony structure, color, growth rate and size of conidia) and phenotypic characteristics of the *F. graminearum* isolates (the ability to absorb different carbon and nitrogen sources) indicated that there was no clear relationship among the morphological features of the fungus, metabolism and the chemotype
4. The study of the pathogenicity of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains to winter and spring wheat revealed that all the investigated isolates initiated the symptoms of disease, however, the differences were more pronounced among different isolates rather than among the chemotypes. *In vitro* testing of the development of necrotic spots on the leaves essentially depended on the winter and spring wheat genotype. In *in vivo* studies, a higher visually visible amount of *Fusarium*-damaged grain and *F. graminearum* infection level in grain was found in the infected spring wheat grains than that of non-infected. *F. graminearum* had a negative impact on the grain weight of the spring wheat variety Diskett in particular in the fields inoculated by the isolates of 3ADON chemotype
5. The *in vitro* study of the sensitivity of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains to metconazole, prothioconazole and tebuconazole showed that the lowest minimum inhibitory concentration (0.03 μM) was due to the use of metconazole, and the highest (0.14 μM) was due to that of tebuconazole active substances. The active substances of prothioconazole had a minimum inhibitory concentration of 0.1 μM . To inhibit the growth of the 15ADON isolates, a higher concentration of active substances was required rather than for the 3ADON chemotype isolates.
6. The incidence and severity of fusarium head blight, and the amount of *Fusarium*-damaged grain (%) in spring wheat was significantly reduced by the fungicide metconazole used for protection. The impact of the *Bacillus* sp. strains was positive, however, in general, it was statistically insignificant, and thus, it is not recommended to use for wheat protection against fusarium head blight.

LIST OF PUBLICATIONS

Articles in periodical scientific publications with a citation index (impact factor) according (ISI) Wos database:

Suproniene S., Sakalauskas S., Stumbriene K., Zvirdauskiene R., Svegzda P. 2016. Variances in trichothecene chemotype distribution in Lithuanian wheat grain and within pure culture *Fusarium graminearum* isolated from the same grain samples. European Journal of Plant Pathology, 144 (2): 371–381.

Reserarche articles in peerereviewed periodical scientific journals

Sakalauskas S., Stumbriene K., Suproniene S., Svegzda P. 2014. Changes in *Fusarium* Link species composition from Lithuanian wheat grain in years 2005–2007 to 2011–2013. Proceedings of the Latvia University of Agriculture, 32 (327): 45–50.

Conference abstracts

1. Stumbriene K., Suproniene S., Semaskiene R., Gudiukaite R., Svegzda P., Jonaviciene A. Effectiveness of bacterial strains MBK-a3 and MBK-r4 on *Fusarium* head blight of winter and spring wheat caused by artificial infection // Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar 494, 9 – 10 kovas 2017, Riga, Latvia, p. 58.

2. Stumbriene K., Suproniene S., Gudiukaite R., Semaskiene R. Efficacy of selected *Bacillus subtilis* strains against fusarium head blight of wheat caused by artificial infection // Book of abstract of Open Readings 2017 seminar, 14 – 17 kovas 2017, Vilnius, p. 369.

3. Stumbriene K., Suproniene S., Sakalauskas S., Svegzda P., Zvirdauskiene R. B Trichothecene Distribution in Lithuania Wheat Grain// Book of abstract of Open Readings 2016 seminar, 15 – 18 kovas 2016, Vilnius, p. 151.

4. Sakalauskas S., Supronienė S., Stumbrienė K., Švėgžda P, Chemotyping of the FHB pathogens in Lithuanian spring wheat grain // Book of abstract of XVIII International Plant Protection Congress, 24-27 August 2015, Berlin, Germany, P NEDP 32, p. 724.

5. Suproniene S., Sakalauskas S., Stumbriene K., Svegzda P., Mankeviciene A., Fedaraviciute S. The distribution of Type B trichothecene producers in Lithuanian wheat // Book of programme and abstract of Symposium „Power of fungi and mycotoxins in health and disease 2015“, 20-23 September, 2015 Šibenik, Croatia.

6. Supronienė S., Stumbrienė K., Sakalauskas S., Mankevičienė A., Jonavičienė A., Švėgžda P. Distribution of the trichothecene genotypes in spring and winter wheat // Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar, 18–19 lapkritis 2014, Helsikis, Suomija, p. 14.

Information about the Phd student

Karina Stumbrienė was born on 11 June, 1978 in Klaipėda. She studied in the Faculty of Engineering of the Lithuanian University of Agriculture. In 2005 gained the bachelor's degree in Mechanical Engineering. In 2007 K. Stumbrienė gained the master's degree in Mechanical Engineering. In 2013–2017 she was a PhD student in the Institute of Agriculture, Lithuanian Reserarche Centre for Agriculture and Forestry.

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I am thankful to my scientific supervisor Dr. Skaidrė Supronienė for disertation topic advice, patience, understanding, support, inspiration, critical remarks, support for conducting disertation research, for advice on scientific publications and preparation of a disertation, for consultations provided, for useful advice, for encouragement to participate in scientific activities, and for the consultant Dr. Roma Semaškienė for advice and comments.

I am thankful to Department of Plant Pathology and Protection of the Institute of Agriculture for an opportunity to use equipment.

Special thanks are to Dr. Akvilė Jonavičienė for helping set up and supervising field experiments.

I sincerely thank to the team of Laboratory, Microbiology of Open acces Joint Research Centre of Agriculture and Forestry, Lithuanian Researche Centre for Agriculture and Forestry

Thanks to Vilnius Uuniversity, Faculty of Natural science for cooperation.

I am thankful to director of Institute of Agriculture, Lithuanian Researche Centre for Agriculture and Forestry Dr. Gintaras Brazauskas for understanding and support. Also to my friend Dr. Vita Tilvikienė for encouragement to study, for understanding and support.

I am also thankful to my family.

Karina Stumbrienė

**GRYBO *FUSARIUM GRAMINEARUM* IŠPLITIMAS, CHEMOTIPŲ
STRUKTŪRA, PATOGENIŠKUMAS IR KONTROLĖ LIETUVOJE
AUGINAMUOSE KVIEČIUOSE**

DAKTARO DISERTACIJA

Žemės ūkio mokslai, Agronomija (01A)

IVADAS

Augalų ligos yra sąveikos tarp augalo šeimininko, jo atsparumo, patogeno virulentiškumo bei aplinkos sąlygų rezultatas. Ligos etiologiją lemia meteorologinės sąlygos, žmogaus veikla: fungicidų naudojimas, auginimo agrotechnika, dauginamoji medžiaga, sėjos būdai ir kiti faktoriai. Kintančio klimato poveikis prisideda prie ligų sukiamų didelių derliaus nuostolių (Parikka ir kt., 2012a). *Fusarium* genties grybai ekonominiu požiūriu yra bene patys svarbiausi fitopatogenai javuose visame pasaulyje (McMullen ir kt., 1997; Bottalico, Perrone, 2002). Jie sukelia žalingą javų ligą – varpų fuzariozę (VF), pašaknio ligas, kurios mažina javų derlių ir kokybę, užteršia grūdus žmonių ir gyvūnų sveikatai pavojingais mikotoksinais (Bottalico, Perrone, 2002; Surai, Mezes, 2005).

Varpų fuzariozę gali sukelti kai kurie *Fusarium* genties ir *Microdochium nivale* grybai (Bottalico, Perrone, 2002; Yli-Mattila, 2010). Ankstesniais metais *Fusarium poae*, *F. avenaceum* ir *F. culmorum* rūšys vyravo vėsesniuose pasaulio regionuose, o *F. graminearum* – šiltesniuose (Bottalico, Perrone, 2002). Maždaug iki 2000-ųjų *F. graminearum* išplitimo arealu dar buvo įvardijama centrinė Europa, didžioji dalis Šiaurės Amerikos ir Azija (Yli-Mattila, 2010). Tačiau vėliau jau stebimas gana spartus šio grybo išplitimas šiaurinėje Europoje – Olandijoje, Anglijoje (Waalwijk ir kt., 2003; Nicholson ir kt., 2003); Norvegijoje (Yli-Mattila, 2011), Švedijoje (Fredlund ir kt., 2008), Suomijoje (Yli-Mattila ir kt., 2008, 2009; Parikka ir kt., 2012a; b), Danijoje (Nielsen ir kt., 2011), Estijoje, Latvijoje (Supronienė ir kt., 2010b) ir Lenkijoje (Stepien ir kt., 2008). Lietuvoje šio grybo išplitimas patebėtas pastaraisiais metais (Sakalauskas ir kt., 2014). *F. graminearum* išplitimas siejamas su glifosato naudojimu, minimaliu žemės dirbimu (Fernandez ir kt., 2005), tačiau labiausiai su gamtinėmis sąlygomis ir klimato atšilimu (Parikka ir kt., 2012a, b).

Su varpų fuzarioze siejama *F. graminearum* priklauso *F. graminearum* rūšių kompleksui, kurį sudaro mažiausiai 16 filogenetiškai skirtingų rūšių (O'Donnell ir kt., 2000, 2004, 2008; Starkey ir kt. 2007; Yli-Mattila ir kt., 2009). Pagrindiniai mikotoksinai, kuriuos gamina *F. graminearum* rūšių kompleksas ir kitos artimai susiję rūšys tokios kaip *F. culmorum*, *F. cerealis* ir *F. pseudograminearum* yra B grupės trichotecenai (TRI) – deksinivalenolis (DON) ir nivalenolis (NIV) (Jennings ir kt., 2004, O'Donnell ir kt., 2000, Ward ir kt., 2008). DON dažniausias mikotoksinas javų grūduose Europoje, tame tarpe ir Lietuvoje (Bottalico, Perrone, 2002; Mankevičienė ir kt., 2007a, 2011). DON leistini didžiausi kiekiai neperdirbtuose javų grūduose ir jų produktuose yra apibrėžti ES komisijos reglamentuose. NIV kiekiai nėra apriboti, tačiau tyrimai rodo, kad jo toksiškumo lygis panašus kaip DON (Eriksen ir kt., 1998).

Priklausomai nuo gaminamo B grupės TRI, *F. graminearum* izoliatai gali būti skiriami į du chemotipus: NIV ir DON. DON chemotipai išskirti dar į izoliatų gaminančius 3-acetil-deksinivalenolį (3ADON) ir 15-acetil-deksinivalenolį (15ADON). *F. graminearum* izoliatų tarpe 15ADON chemotipas vyrauja Jungtinėje Karalystėje (Jennings ir kt., 2004a, b), Austrijoje (Adler ir kt., 2002), Vokietijoje (Talas ir kt., 2011), Kinijoje (Yli-Mattila ir kt., 2010), 3ADON pranašumas nustatytas Suomijoje (Jestoi ir kt. 2004a, b; 2008), Norvegijoje (Langseth ir kt., 1999) ir šiaurės vakarų Rusijoje (Yli-Mattila ir kt., 2010).

Lietuvoje TRI producentų chemotipavimo tyrimai nėra daryti. Neaptikta duomenų ir apie NIV produkciją grūduose. *Fusarium* grybų ir mikotoksinų tyrimai šalies grūdų produkcijoje atliekami apie 10 metų. Pastaraisiais metais pastebėtas ryškus *F. graminearum* rūšies išplitimas, kuris lydimas DON ir ZEN toksinų koncentracijų padidėjimu grūduose, ypač vasariniuose javuose. Nemažoje dalyje kviečių DON tarša viršija leidžiamas normas (Mankevičienė ir kt. 2011, 2014; Supronienė ir kt. 2012b). *Fusarium* rūšių identifikavimui daugiausia naudoti klasikiniai metodai, kurie yra gana riboti norint atskirti labai artimas, pavyzdžiui, *F. graminearum* komplekso rūšis, be to jie neleidžia atskirti tos pačios rūšies skirtingų chemotipų. Chemotipavimas leidžia įvertinti TRI gaminančių izoliatų toksigeniškumą, lauko populiacijų struktūrą, ir, atsižvelgiant į aplinkiniuose kraštuose atliktus panašius tyrimus, prognozuoti pasikeitimus *Fusarium* grybų populiacijose detaliau nei rūšies lygmenyje, tuo pačiu prognozuoti galimus kokybinius ir kiekybinius grūdų derliaus pokyčius. Kadangi skirtingų chemotipų izoliatai pasižymi nevienodu metaboliniu aktyvumu ir patogeniškumu, vyraujančių chemotipinių grupių nustatymas leistų efektyviau naudoti augalų apsaugos priemones ir apsaugoti grūdus nuo mikotoksinų taršos.

Darbo hipotezė. Su B grupės trichotecenų biosinteze siejamų *F. graminearum* chemotipų kamienų išplitimo, patogeniškumo ir atsparumo fungicidams įvertinimas atskleis šio grybo toksinį potencialą ir sudarys sąlygas efektyvesnei patogeno kontrolei kviečiuose.

Tyrimų tikslas. Ištirti javų varpų fuzariozę sukeliančio *F. graminearum* patogeno išplitimą ir su B grupės trichotecenų biosinteze siejamų *F. graminearum* chemotipų struktūrą Lietuvoje užaugintuose kviečiuose, įvertinti skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų patogeniškumą kviečiams, morfologinius ir fenotipinius požymius bei jautrumą fungicidams.

Tyrimų uždaviniai:

1. Nustatyti *F. graminearum* grybų reikšmę varpų fuzariozės sukėlėjų – B grupės trichotecenų producentų, komplekse, pagal išplitimą kviečių grūduose.
2. Identifikuoti *F. graminearum* chemotipus, įvertinti jų paplitimą ir pasiskirstymą kviečių grūduose.
3. Nustatyti *F. graminearum* chemotipų struktūrą, skirtingose Lietuvos vietose išsidėsčiusiuose vasarinių kviečių laukuose.
4. Nustatyti skirtingų *F. graminearum* chemotipų izoliatų patogeniškumą kviečiams, morfologinius ir fenotipinius požymius bei jautrumą fungicidams *in vitro*.
5. Ištirti cheminių ir biologinių preparatų veiksmingumą prieš *F. graminearum* inicijuotą varpų fuzariozę kviečiuose.

Ginamieji teiginiai:

1. Šio dešimtmečio pradžioje smarkiai išplitęs *F. graminearum* patogenas yra vyraujantis javų varpų fuzariozės sukėlėjas B grupės trichotecenų producentų tarpe Lietuvoje užaugintuose kviečiuose.

2. Su B grupės trichotecenų gamyba siejamų *F. graminearum* chemotipų struktūra Lietuvoje užaugintuose kviečiuose yra būdinga Vidurio ir Šiaurės Europai, tačiau 15-acetil-deksinivalenolio ir 3-acetil-deksinivalenolio *F. graminearum* chemotipų kamienų pasiskirstymas atskirose lauko populiacijose galimai yra susijęs su konkrečiame lauke susiklosčiusiomis mikroklimatinėmis sąlygomis.

3. *F. graminearum* izoliatų patogeniškumas žieminiams ir vasariniams kviečiams kinta priklausomai nuo individualaus izoliato agresyvumo ir kviečių genotipo, bet nepriklauso nuo *F. graminearum* chemotipo.

4. Skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienai skiriasi pagal jautrumą metkonazolui, tebukonazolui ir protiokonazolui *in vitro*.

Mokslinio darbo naujumas. Šiais tyrimais nustatyta, kad pastaraisiais metais *F. graminearum* yra vienas iš pagrindinių vasarinių ir žieminių kviečių varpų fuzariozės sukėlėjų ir trichotecenų producentų Lietuvoje. *F. graminearum* chemotipų struktūra Lietuvoje užaugintuose kviečiuose yra būdinga Vidurio ir Šiaurės Europai, kur vyrauja 15ADON producentai, lyginant su 3ADON ir NIV producentais. Įvertinus chemotipų struktūrą atskirose lauko populiacijose, nustatyta, kad 15ADON ir 3ADON pasiskirstymas galimai yra susijęs su konkrečiame lauke susiklosčiusiomis mikroklimatinėmis sąlygomis. Aiškių skirtumų tarp skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų patogeniškumo, morfologinių požymių ir metabolizmo nenustatyta, tačiau pastebėtas skirtingas jų jautrumas metkonazolui, tebukonazolui ir protiokonazolui *in vitro*.

Praktinė darbo reikšmė. Atlikti tyrimai atskleidė varpų fuzariozės sukėlėjų struktūros pokyčius Lietuvoje, lyginant su ankstesniais metais. Nustatyta, kad pastaruoju metu mūsų šalyje auginamuose kviečiuose vyrauja žalingi B grupės trichotecenų producentai – *F. graminearum* rūšies grybai. Gautus duomenis apie *F. graminearum* chemotipus, jų pasiskirstymą grūduose ir lauko populiacijose bei jautrumą fungicidams, galima bus panaudoti optimizuojant kviečių apsaugą nuo varpų fuzariozės, tuo pačiu gerinant grūdų kokybę.

Tyrimų rezultatų aprobavimas. Pagrindiniai disertacijos teiginiai pristatyti: Šiaurės Baltijos šalių *Fusarium* seminare (Nordic Baltic *Fusarium* seminar 494), Riga, Latvia; Tarptautinėje 60-tojoje fizikos ir gamtos mokslų konferencijoje „Open Readings 2017“, Vilnius.; Tarptautinėje 59-tojoje fizikos ir gamtos mokslų konferencijoje „Open Readings 2016“, Vilnius; Mokslinėje-praktinėje konferencijoje „Jaunimas siekia pažangos 2015“, 2015, Akademija, Kauno raj.; Simpoziume „Power of fungi and mycotoxins in health and disease 2015“, Šibenikas, Kroatia; XVIII Tarptautiniame augalų apsaugos kongrese, Berlynas, Vokietija; Šiaurės Baltijos šalių *Fusarium* seminare (Nordic Baltic *Fusarium* seminar 478) 2014, Helsinkis, Suomija; Tarptautinis XIX Baltijos mikologų ir lichenologų simpoziumas 2014, Skede, Latvija; III Jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Jaunieji mokslininkai žemės ūkio pažangai“, 2014, Vilnius.

Publikacijos. Disertacijos tema paskelbtos dvi mokslinės publikacijos: viena leidinyje, referuojamame ir turinčiame citavimo indeksą duomenų bazėje „Clarivate Analytics Web of Science“, viena recenzuojamame periodiniame leidinyje. Taip pat 6 santraukos mokslinių konferencijų leidiniuose.

Disertacijos apimtis ir struktūra. Disertaciją sudaro santrauka, santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros analizė, tyrimų metodai ir sąlygos, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, naudotos literatūros sąrašas, paskelbtų publikacijų sąrašas, publikacijų atspaudai, priedai, padėka, gyvenimo aprašymas,. Disertacijos apimtis 120 puslapių. Tekstą iliustruoja 20 lentelių ir 17 paveikslų. Literatūros sąrašė yra 163 šaltiniai.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Varpų fuzariozė ir *F. graminearum* grybų reikšmė šios ligos pasireiškimui ir mikotoksinų produkcijai kviečiuose, infekcijos sąlygos

Fusarium yra laikoma viena iš labiausiai paplitusių ir svarbiausių aplinkai grybų genčių. Tai – kosmopolitinė ir labai įvairialypė saprofitinių, fitopatogeninių ir toksigeninių grybų grupė, sutinkama beveik visose pasaulio ekosistemose (Nelson ir kt., 1994; Schmale III ir Bergstrom, 2003). Tačiau kai kurių *Fusarium* rūšių egzistavimas ir įvairovė apsiriboja tik tam tikru regionu ar klimato sąlygomis (Leslie, Summerell, 2006). Kaip fitopatogenai, šie grybai gali pažeisti augalus visuose vystymosi etapuose, nuo sėklos iki subrendimo (Moretti, 2009). Dėl *Fusarium* grybų sukeltos žalingos kviečių, miežių, kvietrugių, rugių ir avižų ligos – varpų fuzariozės (VF), patiriami dideli grūdų derliaus ir kokybės nuostoliai (Eckard ir kt., 2011). VF pažeisti grūdai gali būti mažesnio svorio, pakitusios baltymų ir angliavandenių sudėties, užteršti grybų antriniais metabolitais – mikotoksinais, naudojant sėklai jie gali nedygti arba dygimo energija gali būti sumažėjusi (Bottalico ir Perrone, 2002; Argyris ir kt., 2003; Surai, Mezes, 2005). Grūdų kokybė ypač nukenčia kai jie užteršiami mikotoksinais, kurie daro neigiamą poveikį žmonėms ir gyvūnams, jie sukelia ligas ir didelius ekonominius nuostolius (Zain, 2011). Tai didelė problema visame pasaulyje, nes mikotoksinais užteršiami tiek pašarai, tiek maisto produktai (Zain, 2011; Mayer, 2008). Aflatoksinai, ochratoksinai, trichotecenai, zearalenonas, fumonizinais ir skalsių alkaloidai daro didžiausią neigiamą įtaką žemės ūkio ekonomikai (Zain, 2011). Mikotoksinų problema dažniau pasireiškia vietovėse, kuriose vyrauja šiltas ir drėgnas klimatas, palankus toksigeninių grybų plitimui, tačiau su ja susiduriama ir vidutinio klimato zonoje (Bennett ir Klich, 2003). VF sukiantys *Fusarium* genties grybai daugiausia siejami su trichotecenu (TRI) ir zearalenono (ZEN) produkcija grūduose (Bottalico, Perrone, 2002). Lietuvos sąlygomis užauginti grūdai dažniausiai būna užteršti trichotecenais – deoksinivalenoliu (DON) ir T-2 toksinu bei ZEN (Mankevičienė ir kt., 2011; Supronienė ir kt., 2012 b). Europoje auginamų javų grūduose dažniausiai aptinkami DON ir ZEN (Bottalico, Perrone, 2002).

Varpų fuzariozės infekcijos vystymasis ir mikotoksinų susidarymas priklauso nuo daugelio ekologinių veiksnių: aplinkos temperatūros, oro drėgnumo, kritulių kiekio, oro užterštumo, substrato sudėties, grybų toksiškumo lygio, mikrofloros kiekio. Fuzariozės infekcijos plitimui įtakos turi ir nematodai, pažeidžiantys augalus (Roháčik ir Hudec, 2007). Meteorologinės sąlygos yra pagrindinis veiksnys lemiantis *Fusarium* grybų išplitimą bei mikotoksinų gamybą (Schaafsma ir kt., 2001; Doohan ir kt., 2003; Rohacik, Hudec, 2005; Ramizer ir kt., 2006). Temperatūra, kurioje liga plinta yra nuo 16 iki 30 °C šilumos, o sporoms sudygti pakanka 12 valandų drėgno periodo, todėl naktimis susidaranti gausi rasa kartais gali šias sąlygas užtikrinti (Schaafsma ir kt., 2001; Schmale III ir Bergstrom, 2003). Tačiau optimalios sąlygos VF plisti susidaro javų žydėjimo ir brandimo metu vyraujant 22–27 °C temperatūrai ir lietingiems orams, kai didesnė nei 80 proc. santykinė oro drėgmė išsilaiko 48–72 h ir ilgiau, o pasėliuose laikosi pastovi drėgmė. Vėsesniu oru liga išplinta, jei ilgai laikosi didelė santykinė oro drėgmė. Palankiomis ligai plisti sąlygomis užkrato požymiai išryškėja per tris dienas, o javų derlius gali būti sugadintas per kelias savaites.

Epidemijos metu vizualūs ligos simptomai pasirodo labai greitai (Schmale III ir Bergstrom, 2003). Grybo sporos didesniu atstumu plinta vėjuotu ir lietingu oru (Parry ir kt., 1995; McMullen ir kt., 1997; Schmale III ir Bergstrom, 2003). Lietaus lašų pagalba *Fusarium* askosporos ir konidijos nuo infekuotų augalų liekanų, javų pašaknio ar kitų žemiau esančių augalo dalių patenka ant varpų (Pereyra ir Dill-Macky, 2008; Vanagienė ir Baškys, 2009; Mourellos ir kt., 2014; Pagnussatt ir kt., 2014). Augalai užsikrečia keliais etapais, kurie dažniausiai vyksta vienu metu: infekcijos patekimas ant augalo paviršiaus; sporų dygimas; ligos sukėlėjo įsiskverbimas į augalo audinius; parazitinės tarpusavio sąveikos tarp patogeno ir augalo šeimininko atsiradimas (Šurkus ir Gaurilčikienė, 2002). Kai varpų žydėjimo metu vyrauja sausesni orai ir užsikrėsti sąlygos mažiau palankios, į žydinčią varpą patekęs *Fusarium* užkratas gali kurį laiką išsilaikyti ir varputes užkrėsti vėlesniais javų brendimo tarpsniais, kai tik susidaro tam palankios sąlygos. Derliaus praradimus dažniausiai lemia ankstyva infekcija, vėlesnė gali būti ir be aiškiai matomų požymių, tačiau dalis grūdų vis tiek bus pažeisti *Fusarium* grybų. Tai gali turėti neigiamos įtakos grūdų kokybei (Yli-Mattila, 2011). Šios ligos plitimą lemia daug veiksnių, tačiau svarbiausias yra meteorologinės sąlygos. Krituliai javų žydėjimo tarpsniu yra kritinis veiksnys *Fusarium* genties grybams plisti. 5 mm ir daugiau kritulių per dieną iš esmės padidina epidemijos riziką, ypač kai oro temperatūra yra apie 25 laipsnius pagal Celcijų. Esant aukštesnei oro temperatūrai, ligos požymiai vystosi dar greičiau (Schmale ir Bergstrom, 2003; Mankevičienė ir kt., 2007b).

Meteorologinės sąlygos turi tiesioginę įtaką grūdų drėgniui derliaus nuėmimo, transportavimo bei saugojimo metu, taip pat mikroskopinių grybų produkuojamiems toksinams susikaupti. Mikotoksinų produkcija labai priklauso ir nuo daugelio ekologinių veiksnių (aplinkos temperatūros, drėgnio, substrato sudėties, grybų toksiškumo, konkurencinės mikrofloros, mikrobinės tarpusavio sąveikos, kenkėjų bei mechaninio pažeidimo derliaus nuėmimo ir saugojimo metu (Lōiveke ir kt., 2004; Lugauskas ir kt., 2004; Dabkevičius ir kt., 2005; Lugauskas ir kt., 2007; Mankevičienė ir kt., 2007a).

Fuzariozę sukeliančiais patogenais užkrėstos sėklos ir dirvoje esančios augalų liekanos įvardijamos pirminiu VF infekcijos šaltiniu (Pereyra ir Dill-Macky, 2008). Dirvožemyje *Fusarium* genties grybai išsilaiko gana ilgai (Webster ir Weber, 2007). Tokia galimybė susidaro dėl grybo gyvenimo ir išgyvenimo ypatumų: aktyvios vegetacijos, saprotrofinio mitybos būdo bei ląstelių struktūrų įvairovės (Lugauskas ir kt., 2004; Webster ir Weber, 2007). Tačiau pats dirvožemis nėra laikomas ligos sukėlėjų infekcijos šaltiniu, nes grybo infekcinės struktūros dažniausiai aptinkamos augalinėse liekanose (Landschoot ir kt., 2011).

Mažiausiai 18 skirtingų *Fusarium* rūšių ir rūšių kompleksų gali sukelti varpų fuzariozę. Labiausiai paplitę varpų fuzariozės sukėlėjai pasaulyje priklauso *Fusarium graminearum* rūšių kompleksui (FGRK), kurį sudaro per 16 rūšių, identifikuotų naudojant skirtingų lokusų sekoskaitos metodą (O'Donnell ir kt., 2004, 2008; Yli-Mattila ir kt., 2009). Atskiros FGRK rūšys skiriasi pagal TRI chentipą ir agresyvumą bei paskirstymą regionuose. *F. graminearum* laikoma labiausiai paplitusia FGRK rūšimi visame pasaulyje (Schilling ir kt., 1996; Ward ir kt., 2008; Boutigny ir kt., 2011; Yli-Mattila ir kt., 2017), tuo tarpu *F. asiaticum* dažniau aptinkama Azijoje (Shen ir kt., 2012; Zhang ir kt., 2012).

Pagrindiniais varpų fuzariozės sukėlėjais Europoje įvardijami *F. graminearum*, *F. avenaceum* ir *F. culmorum* rūšių grybai, tačiau *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* ir keletas kitų rūšių taip pat aptinkami VF pažeistose varpose ir grūduose (Bottalico ir Perrone, 2002; Kosiak ir kt., 2003). Pastaraisiais dešimtmečiais pastebėta, kad VF sukėlėjų struktūra smarkiai keičiasi, kartais pokytis išryškėja net per vieną augimo sezoną (Waalwijk ir kt., 2003). Ankstesniais metais *F. poae*, *F. avenaceum* ir *F. culmorum* rūšių grybai vyravo vėsesniuose pasaulio regionuose, o *F. graminearum* – šiltesniuose (Bottalico ir Perrone, 2002). Tačiau jau daugiau nei dešimtmetis stebimas *F. graminearum* išplitimas šiaurinėje Europoje - Olandijoje, Anglijoje (Waalwijk ir kt., 2003; Nicholson ir kt., 2003), Norvegijoje (Yli-Mattila, 2011), Švedijoje (Fredlund ir kt., 2008), Suomijoje (Yli-Mattila ir kt., 2008; Parikka ir kt., 2012a), Danijoje (Nielsen ir kt., 2011), Estijoje, Latvijoje (Supronienė ir kt., 2010 a) ir Lenkijoje (Stepien ir kt., 2008). Lietuvoje šio grybo smarkus išplitimas pastebėtas per pastaruosius penkerius metus (Sakalauskas ir kt., 2014). *F. graminearum* išplitimas į šiauresnius regionus siejamas su žemės dirbimo minimizavimu, glifosato naudojimu (Fernandez et al. 2005, 2007), tačiau labiausiai su gamtinėmis sąlygomis ir klimato atšilimu (Parikka ir kt., 2012a; b). Šie VF sukėlėjų struktūros pokyčiai išskėlė naujų ekologinių ir ekonominių problemų susijusių su padidintu grūdų produkcijos užterštumu mikotoksinu DON ir sėklų kokybės pablogėjimu (Bottalico, Perrone, 2002; Kosiak ir kt., 2003; Kazan ir kt. 2012; Mankevičienė ir kt., 2014). *F. graminearum* yra vienas svarbiausių VF sukėlėjų, kuris įtakoja grūdų užterštumą mikotoksinais didžiojoje dalyje Europos, JAV, Kanadoje, Azijoje (Jennings ir kt., 2004 a, b; Zeller ir kt., 2004; Ward ir kt., 2008; Talas ir kt., 2011; Yli-Mattila ir kt., 2017). Šios rūšies grybai neigiamai veikia augalo-šeimininko sėklų dygimą ir augalo vystymąsi. Išskiriami toksinai pažeidžia, o micelio fragmentai užkemša vandens indus, mažina vandens absorbciją ir medžiagų transportavimą. Šie fiziologiniai pakitimai neigiamai veikia augalo augimą bei biomasės kaupimą (Lugauskas ir kt., 2002; Brazauskienė ir Semaškienė, 2006; Webster ir Weber, 2007; Yli-Mattila ir kt., 2017).

1.2. *F. graminearum* patogenezė kviečių varpose

1.2.1. Infekcinės struktūros, varpų pažeidimo etapai ir sąlygos, fuzariozės požymiai

Varpų fuzariozę sukeltantis grybas *F. graminearum* žiemoja su grūdais ir dirvoje augalų liekanose bei ant javų šaknų bei pašaknio (Parry ir kt., 1995). *F. graminearum* plinta askosporomis ir konidijomis. Varpų fuzarioze kviečiai apsikrečia žydėdami (Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007; Mourellos ir kt., 2014; Pagnussatt ir kt., 2014; Vanagienė ir Baškys, 2009). Vasaros metu javams žydint, askosporos ir konidijos nuo augalų liekanų vėjo pagalba ir su lietaus purlais žydėjimo metu patenka ant varpų ir jas apkrečia. Grybo *Gibberella zeae* askosporos išlekia iš augalų liekanose eančių subrendusių peritecių. Vėjas pakelia aksosporas ir gali nunešti dideliais atstumais. *Gibberella zeae* grybas yra lytinė grybo *F. graminearum* stadija ir formuoja peritecius lauko sąlygomis (Bai ir Shaner, 1994;

Schmale III ir Bergstrom, 2003; Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007). *F. graminearum* grybui plisti susidaro palankios sąlygos, kai po javų išplaukėjimo vyrauja drėgni orai (santykinė oro drėgmė yra daugiau nei 75 %), kadangi varpų fuzariozės užkratą nuo pašaknio ant varpų perneša lietus (Mourellos ir kt., 2014; Pagnussatt ir kt., 2014; Brazauskienė ir Semaškienė, 2006). Patogenas patenka ant varpažvynių, iš varpažvynių grybienu perauga į varpos stagarėlį ir į grūdus. Virš pažeisto varpos stagarėlio, varpa išbala. Sergančios varpos vietomis arba ištaisai padengiamos rausva grybienu.

Patogeno sukelta varpų fuzariozės infekcija pasireiškia pirmine ir antrine infekcijomis javuose. Anksti įvykus pirminei infekcijai, ant lauke pasirodžiusių ligotų varpų gali formuotis konidijos, jas oro srovės išnešioja ir apkrečia sveikas varpas – tai antrinė infekcija. Ši infekcija svarbi tuo atveju, kai augalų žydėjimas yra netolygus, išstasas, formuojasi šalutiniai ūgliai, kurie žydi vėliau (Dabkevičius, Brazauskienė, 2007). Pažeista kviečių varpa ar jos dalis pabala. Pirmieji varpų fuzariozės požymiai pasimato gana greitai po žydėjimo, pieninės brandos tarpsniu arba vaškinės brandos pradžioje (Schmale III ir Bergstrom, 2003). Pirmiausia ant varpažvynių atsiranda vandeningų rusvų dėmių. Kai grybas kolonizuoja varpažvynius, dėl ankstyvos audinių žūties jie pabala (Vanagienė ir Baškys, 2009). Sveikieji varpažvyniai ant tos pačios varpos išlieka sveikos žalios spalvos. Gali būti pažeisti vos tik keli varpažvyniai, arba visa varpa (McMullen ir kt., 2012; Schmale III ir Bergstrom, 2003). Nuo varpažvynių, vėliau grybas plinta į varpos stagarėlį, jį pažeidžia, tokių būdu užkirsdamas kelią maisto medžiagoms patekti į virš pažeisto stagarėlio esančią varpos dalį. Stagarėlis prisijungimo vietoje patamsėja. Varpos dalis virš pažeisto stagarėlio pabala ir žūsta (Parry et al., 1995; McMullen et al., 1997) Virš pažeidimo varpa būna dažniausiai tuščia arba susiformavę *Fusarium* grybų pažeisti grūdai būna maži, baltos, rausvos spalvos ir susiraukšlėję. Dėl tuščių varpų prarandama dalis derliaus, pažeistų grūdų kokybė suprastėja. Laiko tarpas, kai ligos pažeistos varpos gerai pastebimos yra neilgas, nes pradėjus bręsti javams, ligos simptomai pasislepia (Ma ir kt. 2013; Supronienė ir kt., 2012b; Schmale III ir Bergstrom, 2003). Tuomet, dėl užsitęsusių drėgnų orų pavyksta atpažinti tik stipriai varpų fuzariozės pažeistas varpas, nes jos būna apsitraukusios rausvos, oranžinės arba baltos spalvos *Fusarium* grybų sporų mase, kuri susitelkusi palei varpažvynius arba varputėse (Parry et al., 1995; McMullen et al., 1997; Schmale III ir Bergstrom, 2003). Tačiau, kuomet orai vyrauja sausi tokių požymių neaptinkama. O kuomet orai išlieka šilti ir drėgni, sezono pabaigoje galima pamatyti ant varpų susiformavusius juodus taškelius – peritecius (perithecia) (Dufault ir kt., 2006; Manstretta ir Ross, 2016; Trail ir kt., 2017). Ankstesniais metais tokie požymiai buvo pastebimi šiltesnio klimato šalyse, tačiau 2016 metais jau buvo aptinkti ir Lietuvoje, tais metais oras laikėsi šiltas ir drėgnas ilgą laiką ir derliaus nuėmimas vėlavo (Jonaviciene ir kt., 2017; Manstretta ir Ross, 2016; Trail ir kt., 2017).

Varpų fuzariozės pažeistų miežių varpažvyniai būna šviesiai rudos spalvos. Tačiau miežiuose varpų fuzariozės požymiai nėra tokie ryškūs, nes liga dažniausiai išryškėja ant atskirų grūdų. Tik protrūkio metais liga gali apimti trečdalį, pusę ar net daugiau varpos (Schmale III ir Bergstrom, 2003).

F. graminearum micelio spalva kinta nuo šviesiai oranžinės iki geltonos ir nuo raudonai rudos iki oranžinės spalvos, kuri varijuoja priklausomai nuo terpės pH (Leslie ir Summerell, 2006). Makrokonidijos verpstės pjautuvo formos, labai mažai išlenktos, vienodo

storio per visą ilgį, su ryškia kojele (Nelson ir kt., 1983; Špokauskienė, 1989; Leslie ir Summerell, 2006). Formuoja chlamidosporas ir sprodochijuose – sporų masę, tačiau neturi mikrokonidijų. Lytinė stadija – *Gibberella zeae* Schewin (Petch) (Nelson ir kt., 1983; Leslie ir Summerell, 2006). Pagal morfologinius *Fusarium* grybų požymius negalima nustatyti ar jis gali gaminti toksiną ar ne (Murphy ir kt., 2006).

1.2.2. Patogeniškumo veiksniai, susiję su trichotecenų biosinteze, *F.graminearum* chemotipai ir jų identifikavimas, veiksniai įtakoiantys *F.graminearum* chemotipų struktūrą lauko populiacijoje

Svarbiausi *Fusarium* gaminami mikotoksinai yra trichotecenai (TRI) ir zearalenonas (ZEN) (Bottalico ir Perrone, 2002, Yli–Mattila, 2010). Pagal cheminę funkciją, TRI gali būti skiriami į dvi grupes: A tipo – T-2 / HT-2 toksinai, diacetokscirpenolis (DAS), monoacetokscirpenolį (MAS) ir kt, ir B tipo – deoksivalenolis (DON, arba vadinamas vomitoksinu)) ir nivalenolis (NIV) bei jų mono- ir di-acetilinto darinius (Bottalico, 1998, Yli–Mattila, 2010). DON yra dažniausiai paplitęs ir analizuojamas pasaulyje ir Lietuvoje *Fusarium* mikotoksinas. DON aptinkamas visame pasaulyje javų grūduose, ir siejamas su varpų fuzarioze (Lemmens ir kt., 2004; Heier ir kt., 2005; Bartkienė ir kt., 2008; Mankevičienė, 2010; Supronienė ir kt., 2012 b; Ma ir kt., 2013). DON ir jo metabolitai 3-acetil deoksinivalenolis (3ADON), 15-acetil deoksinivalenolis (15ADON) ir nivalenolis (NIV) yra svarbiausi B tipo trichotecenai (TRI), aptinkami varpų fuzariozės pažeistuose javų grūduose. Literatūros duomenimis, šios grupės toksinus sintetina *F. graminearum* rūšių kompleksas ir kitos artimai susijusios rūšys – *F. culmorum*, *F. cerealis* ir *F. pseudograminearum*. Grūduose NIV taip pat gali gaminti *F. poae* rūšies grybai (Jennings ir kt., 2004a, O'Donnell ir kt., 2000, Ward ir kt., 2008).

TRI vaidina svarbų vaidmenį grybų patogenezėje kaip virulentiškumo veiksniai. Virulentiškumas, taip pat vadinama agresyvumu, yra santykinis patogeno gebėjimas kolonizuoti ir padaryti žalą augalams. Agresyvumas yra kiekybinis ir sąlygojamas kelių genų. DON yra vienas iš veiksnių, turinčių įtakos agresyvumui (Baig ir kt., 2002; Foroud ir Eudes, 2009). DON dažniausiai sintetinas dviejų svarbiausių javų ligų sukėlėjų, tai *F. graminearum* Schwabe ir *F. culmorum* Sacc (Yazar, Omurtag, 2008; Wegulo, 2012).

Trichotecenai yra sintetini per kompleksinį biosintezės kelią ir yra užkoduoti trichotecenų (*Tri*) genų. *Fusarium* grybai gali produkuoti skirtingų rūšių toksinus pagrindiniame *TriI* klasteryje, kuris apima du pagrindinius reguliuojančius genus (TRI6 ir TRI10) ir daugumą biosintezės fermentų reikalingų trichotecenų gamybai (Pasquali ir Migheli, 2014).

F. graminearum grybų išplitimas tiek Lietuvoje, tiek kaimyninėse ir Skandinavijos šalyse lydimas ir mikotoksinų deoksinivalenolio (DON) bei zearalenono (ZEN) koncentracijų padidėjimu grūduose, dažnai viršijančių ES reglamentuose nustatytas leistinas ribas (Suproniene ir kt., 2012 b; Hofgaard ir kt., 2012; Parikka ir kt., 2012b).

Fusarium graminearum rūšies izoliatai priklausomai nuo sintetinio TRI yra skiriami į du tipus:: chemotipas I – izoliatai gaminantys deoksivalenolį (DON); chemotipas

II – izoliatai gaminantys nivalenolį (NIV) ir/arba 4-acetilvalenolį (4-ANIV). I (DON) chemotipas gali būti papildomai suskaidytas į du chemotipus: IA – izoliatai gaminantys 3-acetyldeoksivalenolį (3-ADON) ir IB – izoliatai gaminantys 15-acetyldeoksivalenolį (15-ADON) (Bottalico, 1998, Yli-Mattila, 2010).

TRI yra sintetinami sudėtingais biosintezės būdais. Ir jie yra koduojami *Tri* genų. Dauguma *Tri* genų yra klasteriuose, kurie yra vadinami *Tri* grupe. DON gamybą nulemia pagrindiniai *Tri* grupės genai – *Tri13* ir *Tri7*. Funkcionalūs *Tri13* ir *Tri7* genai nulemia NIV chemotipą. O nefunkcionalūs *Tri13* ir *Tri7* nulems vieną iš DON chemotipų. NIV sintezės metu šie genai yra atsakingi už oksigenacijos ir acetilinimo procesą, deguonį C-4 padėtyje (Liddell, 2003; Alexander ir kt., 2011).

Skirtinguose regionuose vyrauja skirtingų chemotipų *Fusarium graminearum* (Jennings ir kt. 2004b; Guo ir kt. 2008; Puri ir Zhong 2010; Pasquali ir kt., 2016; Yli-Mattila ir kt., 2017).

Paprastai NIV yra laikomas labiau toksišku žmonėms bei gyvūnams nei DON (Ryu ir kt., 1988). Tačiau DON yra labiau fitotoksiškas nei NIV (Ueno ir kt., 1985; Foroud ir Eudes, 2009). Didelė DON ir 3-ADON koncentracija slopina kviečių augimą ir yra toksiškesni, nei T-2 toksinas, HT-2 toksinas ir NIV (Eudes ir kt., 2001). Šie toksinai laikomi virulentiškumo veiksniais ir yra susiję su patogenų agresyvumu (Eudes ir kt., 2001; Baig ir kt., 2002; Foroud ir Eudes, 2009)

Mikotoksinų sintezė susijusi su mikromicetų gebėjimu adaptuotis prie įvairių aplinkos sąlygų ir mitybinių substratų (Chelkowski, 1991).

Chemotipavimas padeda įvertinti TRI gaminančių grybų toksigeniškumą, lauko populiacijų struktūrą ir, atsižvelgiant į aplinkiniuose kraštuose atliktus panašius tyrimus, prognozuoti pasikeitimus *Fusarium* grybų populiacijose detalčiau negu rūšies lygmenyje, kartu prognozuoti būsimo derliaus kokybę ir kiekybę. Užsienyje atlikti tyrimai rodo, kad 3ADON chemotipo *F. graminearum* izoliatai yra fitotoksiškesni, patogeniškesni, agresyviau pažeidžia kviečių daigelius ir intensyviau gamina DON negu 15ADON izoliatai. Be to, 3ADON chemotipo, *F. graminearum* izoliatai greičiau auga, anksčiau suformuoja plitimui skirtas struktūras – konidijas ir pradeda gaminti mikotoksinus. Tai leidžia manyti, kad jie yra pavojingesni tiek augalams, tiek žmonių ir gyvūnų sveikatai (Ward ir kt. 2008; Von der Ohe ir kt., 2010).

Fusarium rūšių identifikavimui naudojami klasikiniai mikrobiologiniai metodai yra gana riboti, norint atskirti labai artimas, pavyzdžiui, *F. graminearum* komplekso rūšis ir visiškai netinka norint atskirti tos pačios rūšies skirtingų chemotipų izolatus. Be to, *Fusarium* rūšių identifikavimas tradiciniais morfologiniais metodais atima daug laiko ir yra ne visada tikslus, nes be tiriamų objektų gausu ir kitų mikroorganizmų, kurie apsunkina *Fusarium* izoliatų išskyrimą ir išgryninimą. Pasaulyje jau du dešimtmečius augalų patogenų vertinimui, taikomas molekulinis tikrojo laiko polimerazės grandininės reakcijos metodas (TL PGR) (Hogg ir kt., 2007). Dėl ypatingo jautrumo ir specifiškumo šis diagnostikos metodas efektyvus jau ankstyvosiose augalų ligų pasireiškimo stadijose (McCourtney ir kt., 2003). *Fusarium* genties grybų ir B grupės TRI chemotipų producentų kokybiniam ir kiekybiniam įvertinimui šis metodas taip pat pradedamas taikyti vis plačiau (Yli-Mattila ir kt., 2008, 2011; Supronienė ir kt., 2010 a; Nielsen ir kt., 2011; Talas ir kt., 2011).

F. graminearum ir *F. culmorum* izoliatų tarpe 15ADON chemotipas vyrauja Jungtinėje Karalystėje (Jennings ir kt., 2004a, b), Austrijoje (Adler ir kt., 2002), Vokietijoje (Talas ir kt., 2011), Kinijoje (Yli-Mattila ir kt., 2010), 3ADON persvara pavieniais atvejais nustatyta Suomijoje (Jestoi ir kt., 2004, 2008), Norvegijoje (Langseth ir kt., 1999) ir šiaurės vakarų Rusijoje (Yli-Mattila ir kt., 2010). Duomenų apie TRI chemotipų pasiskirstymą, morfologinius, fiziologinius skirtumus, patogeniškumą, agresyvumą ir kitas savybes yra labai nedaug. Kanadoje Ward ir kt. (2008) nustatė, kad *F. graminearum* 3ADON chemotipo populiacijos atstovai formavo daugiau ir didesnių konidijų, produkavo daugiau DON bei pasižymėjo greitesniu micelio augimu nei 15ADON chemotipo populiacijos atstovai. Paskiausi tyrimai Norvegijoje parodė, kad vidutiniais duomenimis 3ADON chemotipo izoliatai pasižymėjo greitesniu augimu, tačiau 15ADON chemotipo izoliatai – didesniu agresyvumu kviečiams (Aamot ir kt., 2015). Yli-Mattila (2010) tyrimų duomenimis skirtingų TRI chemotipų pasiskirstymas labiausiai priklauso nuo geografinės padėties. Danijoje atlikti tyrimai rodo, kad chemotipų pasiskirstymas gali skirtis skirtingose javų rūšyse: kviečių ir kvietrugių *F. graminearum* populiacijose vyravo 15ADON producentai, miežių *F. graminearum* populiacijoje nustatyti visi trys chemotipai (Nielsen ir kt., 2012). Tačiau koreliacinė analizė parodė, kad NIV producentai kviečiuose ir kvietrugiuose koreliavo su *F. culmorum* biomase ir NIV mikotoksinu. Tuo tarpu miežiuose NIV producentai koreliavo su *F. graminearum*, tačiau NIV mikotoksinas koreliavo tik su *F. poae*, kas rodo, kad ši rūšis gali būti pagrindinis NIV mikotoksino producentas miežiuose. Atlikus daugiau panašių tyrimų, atsirastų daugiau galimybių interpretuoti tokius prieštarigus duomenis.

1.3. Cheminė ir biologinė *F. graminearum* infekcijos prevencija

Varpų fuzariozės plitimą yra ganėtinai sudėtinga numatyti ir kontroliuoti, todėl reikia pasitelkti ne vieną apsaugos priemonę, kad būtų efektyvu (Paul ir kt., 2008; Willyerd ir kt., 2011; McMullen ir kt., 2012). Planuojant apsaugos ir prevencines priemones, svarbu yra atsižvelgti į kelis veiksnius, tokius kaip oro temperatūra ir drėgnumas kviečių žydėjimo metu. Optimalu ligai neplisti, kai išsilaiko žemesnė temperatūra, bei sausi orai. Tuomet žymiai mažiau išplinta VF. Taip pat yra svarbu vykdyti tinkamą sėjomainą. Pasirinkus tinkamą sėjomainą – sumažėja ligos plitimas (Dill-Macky ir Jones, 2000; Schaafsma ir kt., 2005). Taikyti optimalų žemės dirbimą, todėl, kad VF užkratas lieka lauke ant augalų likučių dirvožemio paviršiuje, taipogi gali likti ir ant pikžolių (Schmale III ir Bergstrom, 2003; Landschoot ir kt., 2011; Pereyra and Dill-Macky, 2008; Reis ir Carmona, 2013.). Vėjas užkratą gali atnešti ir iš aplinkinių laukų (Maldonado-Ramirez ir kt., 2005; Schmale ir kt., 2006). VF išplitimą ženkliai sumažina ir fungicidų pasirinkimas ir panaudojimas optimaliu laiku. Dėl to, kad fungicidai nevisada būna efektyvūs, naudojant VF kontrolei (McMullen ir kt., 2012) yra daug dėmesio skiriama biologinei kontrolei, kuri yra naudojama kaip papildoma strategija varpų fuzariozės prevencijai (Schmale III; ir Bergstrom, 2003; Palazzini ir kt., 2017). Fungicidų poveikis *Fusarium* genties grybams priklauso nuo panaudotos veikliosios medžiagos, purškimo laiko ir normos, varpų fuzariozę sukėlusių *Fusarium* grybų rūšinės sudėties, taip pat nuo atskirų metų meteorologinių sąlygų (Fernandez ir kt., 2005; Ioos ir kt., 2005; Gaurilčikienė ir kt., 2011). Atskirais atvejais fungicidų poveikis būna labai mažas arba jo nebūna (Bayer ir kt., 2006; Gaurilčikienė ir kt.,

2011). Fungicidai, skirti VF kontrolei, sumažina ligos intensyvumą, taip pat ir DON kiekį grūduose (Palazzini, 2017). Triazolo pagrindu pagaminti fungicidai (metkonozolas, protiokonozolas, tebukonozolas) yra veiksmingi arba iš dalies veiksmingi, kuomet naudojami javų žydėjimo metu (Paul ir kt., 2008; Willyerd ir kt., 2011; McMullen ir kt., 2012). VF kontrolė, naudojant fungicidus yra sudėtinga tuo, kad reikia juos naudoti konkrečiu laiku – varpų žydėjimo metu, o taip pat dėl to, kad tinkamų VF kontrolei fungicidų pasirinkimas yra ribotas. Optimalu fungicidus naudoti ankstyvojo varpų žydėjimo metu (Rossi ir kt., 2001; Paul ir kt., 2008; Parikka ir kt., 2012a; Palazzini ir kt., 2017).

Taigi, norint pasiekti gerų apsaugos rezultatų optimalu rinktis kelis kontrolės metodus tuo pačiu metu. Tinkamas biologinių bei cheminių priemonių naudojimas gali pagerinti grūdų kokybę ir padidinti derlingumą. Todėl tarptautinė praktika sutelkė dėmesį į biologines sėklų apdorojimo priemones (Ga'ívez ir kt., 2007; Zotta ir kt., 2009). Šie produktai pasižymi antigrybinėmis savybėmis prieš VF sukėlėjus (Digaitiene ir kt., 2012). Biologiniai preparatai, turintys atimikrobines savybes yra perspektyvūs ir gali būti pritaikomi žemdirbystėje. Vieni svarbiausių junginių, kurie šiandien naudojami siekiant gauti saugius augalų apsaugos produktus – bakterijų išskiriami bakteriocinai. Lietuvoje tokios bakteriocinus gaminančios bakterijos, išskirtos iš ruginių raugų, pasižymėjo antigrybinėmis savybėmis ir prieš *F. culmorum*, *F. poae* ir kitus javų sėklose aptinkamus grybus (Digaitiene ir kt., 2012).

Ankstesniuose tyrimuose tirta biologinė *F. graminearum* kontrolė naudojant *Microsphaeropsis* sp. (Bujold ir kt., 2001), *Cryptococcus nodaensis* OH182.9, *Cryptococcus* sp. OH 71.4, *Cryptococcus* sp. OH 181.1 (Khan ir kt., 2004), *Bacillus subtilis* IB (Wang ir kt., 2007) preparatus suteikė vilties. Kai kuriuose tyrimuose sėkmingai buvo pasiekta *F. graminearum* biokontrolė žydėjimo metu, kur buvo panaudoti preparatai su šiomis bakterijomis: *B. subtilis* RC 218 ir *Brevibacillus* sp. RC 263 (Palazzini ir kt., 2016), *Cryptococcus flavescens* OH 182.9 (NRRL Y-30216) (Schisler ir kt., 2014), *B. subtilis* SG6 (Zhao ir kt., 2014). Taip pat buvo įvertintas biokontroliuojamų štamų naudojimas pasėliuose *Fusarium* grybų rūšies kontrolei, su šiomis bakterijomis: *Clonostachys rosea* (Luongo et al., 2005), *Pseudomonas fluorescens* MKB 158, *P. fluorescens* MKB 249, *P. frederiksborgensis* 202 (Khan ir Doohan, 2009), *C. rosea* 016, *C. rosea* 1457 (Palazzini ir kt., 2013), *C. rosea* ACM941 (Xue ir kt., 2014).

Manoma, kad antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių biopreparatų gamybos technologijų kūrimas ir pritaikymas būtų perspektyvus ekologinės žemdirbystės praktikoje.

Duomenų apie fungicidų ir kitų apsaugos priemonių efektyvumą prieš skirtingų TRI chemotipų producentus neaptikta. Tokia informaciją būtų ypač reikšminga kuriant apsaugos sistemą prieš tikslinius varpų fuzariozės sukėlėjus.

Mokslininkai susitelkę ieško atsparių veislių. Tūkstančiai veislių buvo dirbtinu būdu užkrėsti *F. graminearum*. Tačiau visiškai atsparių varpų fuzariozei javų veislių kol kas neišvesta (Schmale III ir Bergstrom, 2003). Yra išskirti penki veislių atsparumo VF tipai (Mesterházy 1995): I tipas – veislė yra atspari pirminei infekcijai (Schroeder ir Christensen, 1963); II tipas – yra atspari pirminės infekcijos plitimui nuo pirminės infekcijos vietos (Pettersson ir Aberg, 2003); III tipas – atspari grūdo (branduolio) infekcijai (Mesterházy, 1995); IV tipas – tolerantiška infekcijai (Schroeder ir Christensen, 1963); V tipas – atsparumas mikotoksinų kaupimui (Schmale III ir Bergstrom, 2003).

2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimų vieta:

Laboratorinės analizės atliktos Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialo Žemdirbystės instituto Atviros prieigos Žemės ir miškų jungtinių tyrimų centro Mikrobiologijos laboratorijoje bei Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus laboratorijoje.

Lauko eksperimentai vykdyti Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus sėjomainose.

Tyrimai vykdyti: 2014–2017 m.

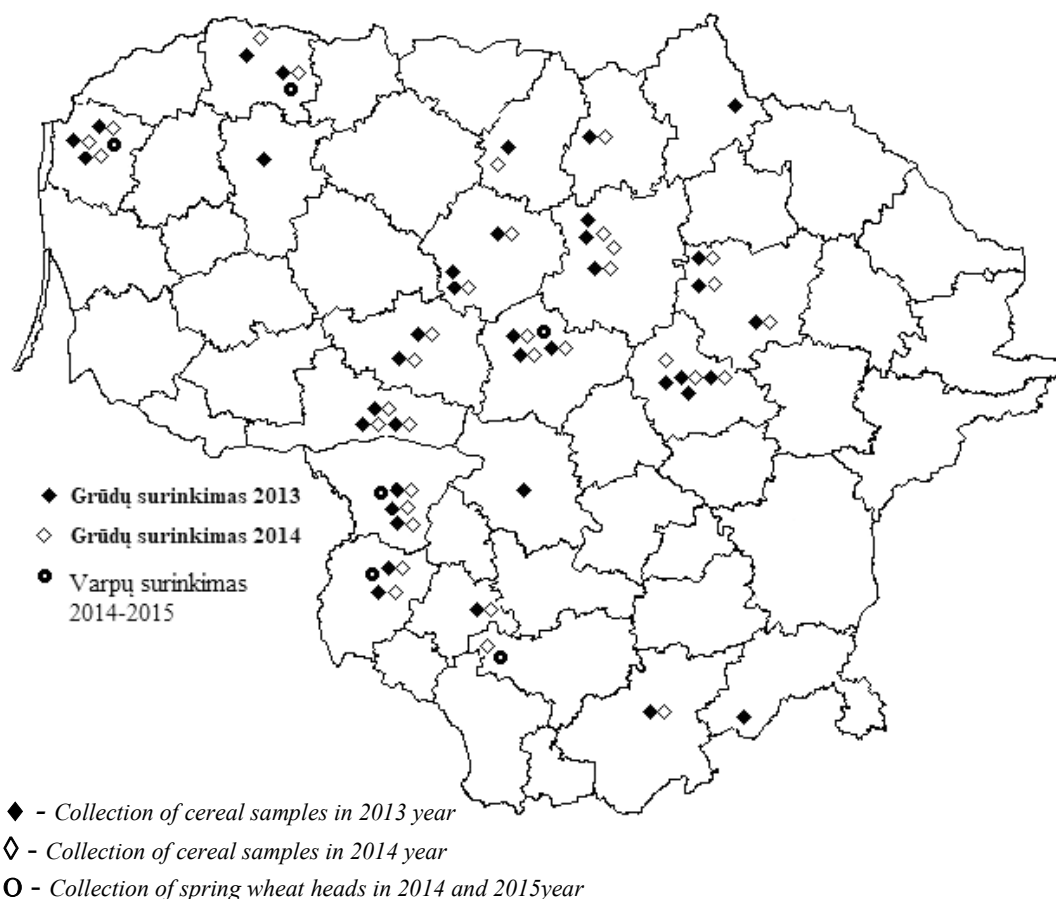
2.1. Ekspediciniai tyrimai

2.1.1. Grūdų mėginių surinkimas *F. graminearum* grybų išplitimo tyrimams

Grūdų ėminiai (pradiniai) imti pagal Tarptautinės sėklų tyrimo asociacijos (angl. *International Seed Testing Association* – ISTA, 2014) taisykles. Iš 12 skirtingų Lietuvos rajonų 49 komercinių ūkių 2013 ir 2014 m. surinkti 148 vasarinių ir žieminių kviečių grūdų mėginiai (1 pav.). Kiekviename rajone mėginiai imti vidutiniškai iš trijų ūkių, kiekviename ūkyje iš 3–5 skirtingų laukų. Iš kiekvieno lauko paimta apytiksliai po 1 kg grūdų iš karto po nukūlimo. Laboratoriniai mėginiai (apie 100 g) iki analizių atlikimo saugoti -20 °C temperatūroje.

2.1.2. Kviečių varpų surinkimas grybo *F. graminearum* populiacijos tyrimams

Kviečių varpos *F. graminearum* populiacijos tyrimams rinktos 2014 ir 2015 m. iš skirtingai vienas nuo kito nutolusių vasarinių kviečių laukų: 4 laukai išsidėstę po vieną Mažeikių, Kretingos, Vilkaviškio ir Alytaus rajonuose, 3 – Kėdainių rajono ribose (Krakėse, Beržuose ir Ažuolaičiuose) ir 2 Šakių rajone vienas šalia kito (1 pav.). Iš kiekvieno lauko atsitiktine tvarka surinkta po 60 varpų su aiškiais varpų fuzariozės požymiais, paimant po 20 varpų iš lauko pradžios, vidurio ir galo. Varpos surinktos pieninės brandos pabaigoje – vaškinės brandos pradžioje, kuomet varpų fuzariozės pažeidimai matomi geriausiai, į popierinius maišelius. Ant kiekvieno maišelio užrašyta informacija apie mėginį: data, vietovė, javų brandos tarpsnis ir kt. svarbi informacija. Mėginiai iki analizių atlikimo saugoti -20 °C temperatūroje.



1 pav. Vasarinių ir žieminių kviečių grūdų mėginių surinkimo vietos pažymėtos rombais, vasarinių kviečių varpų surinkimo rajonai pažymėti žiedais.

Fig. 1. The sampling points for spring and winter wheat grains in 2013 and 2014 year, and the sampling points for spring wheat heads in 2014 and 2015 year, in Lithuania.

2.2. Laboratariniai tyrimai

2.2.1. Trichotecenus produkuojančių *Fusarium* grybų identifikavimas ir išplitimo įvertinimas grūduose klasikiniiais mikrobiologiniais metodais

***Fusarium* spp. išplitimo grūduose įvertinimas agarizuotų terpių metodu.** Tirta po 120 grūdų iš kiekvieno mėginio. Grūdai prieš analizę 3 min sterilizuoti 1,0 % NaOCl tirpale, 3 kartus skalauti steriliame vandenyje; nusausinti ant sterilaus filtrinio popieriaus ir išdėlioti Petri lėkštelėse (po 10 grūdų kiekvienoje) ant bulvių dekstroizės agaro (PDA) terpės su Triton-X priedu (0,8 ml/L). *Fusarium* grybų pažeistų grūdų skaičius (%) vertintas po 7–14 parų inkubavimo termostate 25 ± 2 °C temperatūroje (Mathur, Kongsdal, 2003).

***Fusarium* grybų morfologinis identifikavimas.** Monokultūros išgrynintos pagal Leslie, Summerell (2006) aprašytus metodus ir augintos ant bulvių dekstroizės agaro (PDA) ir specializuota mitybos terpe (vok. *Spezieller Nährstoffarmer Agar* – SNA, Nirenberg, 1990) 25±2 °C temperatūroje 10–30 d. iki makrokonidijų suformavimo. Rūšys identifiкуotos remiantis Nelson ir kt. (1983) ir Leslie, Summerell (2006) apibūdintojais. Tolimesniems molekuliniais tyrimams atrinkti potencialūs trichotecenų producentai – *F. graminearum* izoliatai.

2.2.2. Trichotecenus produkuojančių *Fusarium* grybų identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas grūduose qTL PGR metodu

Grūdų homogenizavimas prieš DNR išskyrimą. Grūdai homogenizuoti naudojant Retsch M 301 (Retsch GmbH, Vokietija) malūną. Darbo eiga: Po 10 g kiekvieno grūdų mėginio supilta į užsukamus nerūdijančio plieno indelius, kartu su dviem 7 mm skersmens plieniniais šratais. Užsukus dangtelius indeliai šaldyti 5 min skystame azote. Išėmus iš azoto nedelsiant įtvirtinti malūno specialiuose laikikliuose ir 4 min purtyti 30 aps. per min greičiu. Susmulkinti iki miltų mėginiai plastikiniuose maišeliuose saugoti šaldiklyje (-20 °C) iki DNR išskyrimo.

DNR išskyrimas iš grūdų. DNR išskirta iš 0,1 g miltų mėginio, naudojant komercinį rinkinį „DNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). DNR išskyrimo procedūra atlikta remiantis gamintojų instrukcijomis. Darbo eiga: 200 µl mėginio sumaišyta su 400 µl lizavimo tirpalo (Lysis Solution), 2 µl Rnazės (RNase 10 mg/ml) ir inkubuota 10 min 65 °C temperatūroje. Įpilta 600 µl chloroformo, mėgintuvėliai pavartyti 3–5 kartus ir centrifuguota 2 min. Pipetės pagalba viršutinis suspensijos sluoksnis perkeltas į švarius mėgintuvėlius, įpilta po 800 µl nusodinimo tirpalo (Precipitation Solution); 1–2 min maišyta pavartant mėgintuvėlius kambario temperatūroje; centrifuguota 2 min; skystis nupiltas. Likę nuosėdos ištirpintos 100 µl NaCl tirpalo; užpilta 300 µl šalto etanolio (98 %) ir 10 min inkubuota šaldiklyje (-20 °C); tada centrifuguota 5 min; etanolis nupiltas. Nuosėdos dar vieną kartą praplautos 70 % šaltu etanoliumi; nupylus etanolį palikta 10–15 min, kad mėgintuvėliai pradžiūtų ir pilnai išsigaruoję etanolis. DNR ištirpinta 100 µl dejonizuoto H₂O. Iki PGR analizės DNR laikyta šaldytuve (+4 °C), ilgesniam saugojimui – šaldiklyje (-20 °C).

DNR kokybės patikrinimas. DNR kokybė patikrinta biofotometru ir elektroforeze 1,0 % agarozės gelyje.

DNR koncentracijos nustatymas biofotometru: DNR mėginys 0,5 ml talpos mėgintuvėlyje praskiestas dejonizuotu vandeniu (5 µl tiriamos DNR + 95 µl H₂O). Mėginys sumaišytas Vortex purtyklės pagalba. 100 µl paruošto mėginio įpilta į vienkartinę kiuvetę, kuri įdėta į specialią angą biofotometre. Prietaisu nustatyta DNR koncentracija 260 nm bangos ilgyje. PGR reakcijai DNR praskiesta ddH₂O, kad jos koncentracija būtų apie 20–50 ng/µl.

Elektroforezės vykdymo eiga: Pagamintas darbinis 1xTAE buferis: 40 ml 50xTAE buferio atskiesta distiliuotu vandeniu iki 2 litrų. Paruoštas 1,0 % agarozės gelis: pasvertas 1 g agarozės, subertas į kolbą ir pilta 100 ml paruošto 1xTAE buferio. Kaitinta mikrobangų krosnelėje kol susidarė skaidrus tirpalas. Geliui pravėsus iki 60 °C, įpilta 5 µl RedSafe dažo.

Gelis supiltas į rėmelius, kuriuose įdėtos šukutės. Sustingus geliui, šukutės atsargiai ištrauktos. Gelis su rėmeliu įdėtas į elektroforezės vonelę, užpildytą 0,5xTAE buferiu taip, kad šis apsemtų gelį.

Į kiekvieną šulinėlį užnešta po 1 µl tiriamos DNR sumaišytos lygiomis dalimis su bromfenolio mėliu. Į atskirą šulinėlį užnešta 6 µl molekulinės masės žymens. Leidžiant elektros srovę per gelį, DNR fragmentai juda nuo katodo link teigiamo poliaus – anodo. Elektroforezė vykdyta apie 1 val., esant 120 V/cm įtampai.

Gauti fragmentai analizuoti ir fotografuoti UV šviesoje, naudojant gelio vaizdų dokumentavimo sistemą LumiBIS. DNR mėginiai trumpam saugojimui laikyti +4 °C temperatūroje, ilgesniam nei 1 mėn. saugojimui – šaldiklyje (-20 °C).

TL PGR vykdymo sąlygos. Prieš ruošiant reakcijos mišinį, apskaičiuotas kiekvieno komponento kiekis planuojamam reakcijų skaičiui su 5 proc. rezervu. Reakcija vykdyta 96 šulinėlių mikroplokštelėse (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate) naudojant komercinį reakcijos mišinį su SybrGreen dažu (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, JAV), termocikleryje 7900HT Sequence Detection system (Applied Biosystems, JAV). Reakcijos tūris 12,5 µl: 6,25 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix; po 300 nM pradmenų (1 lentelė – priklausomai nuo tiriamo objekto); 0,4 µg/µl galvijų serumo albumino (bovine serum albumin – BSA, Thermo Fisher Scientific, Lietuva); 2,4 µl ddH₂O ir 2,5 µl tiriamo mėginio DNR. Genominė DNR išskirta iš grūdų prieš PGR praskiesta santykiu 1:20. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį supipetutuota po 10 µl PGR mišinio. Genominė DNR užnešta pagal iš anksto pasirengtą schemą (2 pav.). Kiekviena reakcija pakartota du kartus. Standartui naudota ankstesniuose tyrimuose molekuliniais tyrimo metodais patvirtinto izoliato DNR, neigiamai kontrolei (NK) – paruoštas reakcijos buferis be DNR. PGR temperatūrinis režimas: 2 min 50 °C; 10 min 95 °C; (15 s 95 °C; 1 min 62 °C) kartota 40 ciklų.

***Fusarium graminearum* DNR kiekybinis įvertinimas grūduose (Nicolaisen ir kt., 2009; Nielsen ir kt., 2012).** Grybų DNR kiekis grūdų mėginyje paskaičiuotas iš Ct reikšmių naudojant standartines kreives. Standartinei kreivei naudota TL PGR metodu patvirtinto *F. graminearum*, izoliatų DNR bei *F. graminearum* izoliatų DNR, TL PGR identifikuotų kaip 15ADON (A18.10), 3ADON (D40.1.1) ir NIV (G108) producentai. Pradinė DNR koncentracija ~ 20 ng, kreivei nubrėžti naudoti 6 taškai, skiedimo santykis 1:10.

Augalo DNR kiekio įvertinimui TL PGR reakcijos atliktos taip pat kaip grybams tik naudoti Plant EF1α pradmenys (1 lentelė). Standartinei kreivei reikalingas augalo DNR kiekis ng nustatytas analogiškai kaip *F. graminearum* tik naudojant iš sveikų kviečių lapų išskirtą DNR.

Turint įvertintą augalų DNR kiekį kiekviename mėginyje, *F. graminearum* duomenų normalizavimui apskaičiuojamas santykinis dydis išreikštas *F. graminearum* DNR pg / augalo DNR pg.

1 lentelė. TL PGR naudoti EF1 α pradžmenys

Table 1. Primers EF1 α used to Real Time PCR

Tyrimo objektas / Target	Pradmenys pavadinimas / Primer name	Seka (5'-3') / Sequence (5'-3')	Literatūros šaltinis / Reference
<i>F. graminearum</i>	FgramB379 fwd	CCATTCCCTGGGCGCT	Nicolaisen et al., 2009
	FgramB411 rev	CCTATTGACAGGTGGTTAGTGACTGG	
<i>3ADON</i>	3ADONfwd	AACATGATCGGTGAGGTATCGA	Nielsen et al., 2012
<i>F. graminearum</i>	3ADONrev	CCATGGCGCTGGGAGTT	
<i>15ADON</i>	15ADONfwd	GTTTCGATATTCATTGGAAAGCTAC	Nielsen et al., 2012
<i>F. graminearum</i>	15ADONrev	CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA	
<i>NIV</i>	NIVfwd	GCCCATATTCGCGACAATGT	Nicolaisen et al., 2009
<i>F. graminearum</i>	NIVrev	GGCGAACTGATGAGTAACAAAACC	
<i>Plant</i>	Hor1fwd	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC	Nicolaisen et al., 2009

	1	2	3	4	5	6
A	1(05)	9(05)	17(05)	4(06)	12(06)	20(06)
B	1(05)	9(05)	17(05)	4(06)	12(06)	20(06)
C	2(05)	10(05)	18(05)	5(06)	13(06)	gram 1:10
D	2(05)	10(05)	18(05)	5(06)	13(06)	gram 1:10
E	3(05)	11(05)	19(05)	6(06)	14(06)	gram 1:10 ²
F	3(05)	11(05)	19(05)	6(06)	14(06)	gram 1:10 ²
G	4(05)	12(05)	20(05)	7(06)	15(06)	gram 1:10 ³
H	4(05)	12(05)	20(05)	7(06)	15(06)	gram 1:10 ³
I	5(05)	13(05)	21(05)	8(06)	16(06)	gram 1:10 ⁴
J	5(05)	13(05)	21(05)	8(06)	16(06)	gram 1:10 ⁴
K	6(05)	14(05)	1(06)	9(06)	17(06)	gram 1:10 ⁵
L	6(05)	14(05)	1(06)	9(06)	17(06)	gram 1:10 ⁵
M	7(05)	15(05)	2(06)	10(06)	18(06)	gram 1:10 ⁶
N	7(05)	15(05)	2(06)	10(06)	18(06)	gram 1:10 ⁶
O	8(05)	16(05)	3(06)	11(06)	19(06)	NK
P	8(05)	16(05)	3(06)	11(06)	19(06)	NK

2 pav. 96 šulinėlių mikroplokštelės schema su mėginių išsidėstymo tvarka TL PGR
Fig. 2. Real-time PCR 96-well microplate scheme with sample location order

2.2.3. *F. graminearum* populiacijos tyrimai

***F. graminearum* išskyrimas iš varpų ir morfologinis identifikavimas.**

F. graminearum išskyrimui atskirta viena varputė iš varpos su aiškiais fuzariozės požymiais, dezinfekuota 10 min. 2 % natrio hipochlorito tirpale, nuskalauta steriliame distiliuotame vandenyje (ddH₂O), 10 min. mirkyta 0,8 % streptomicino tirpale, vėl nuskalauta steriliame distiliuotame vandenyje (ddH₂O) (Talas ir kt., 2011). Kiekviena varputė (po vieną) dėta į 2,5 cm skersmens Petri lėkštelę su specializuota mitybos terpe (SNA) papildyta 50 mg/l streptomicino. Lėkštelės su grybu užkrėstomis varputėmis inkubuotos tamsoje 24 ± 2 °C temperatūroje iki sporų masės suformavimo. Iš sporų masėje esančių makrokonidijų ddH₂O paruošta konidijų suspensija, kuri praskiesta nuo 100 iki 10000 ir daugiau kartų (priklausomai nuo konidijų koncentracijos suspensijoje, jų turi būti kuo mažiau) ir po 100 μl dviejų paskutinių skiedimų suspensijų, naudojant sterilius sklaidytuvus, paskleista į atskiras 9 cm skersmens Petri lėkšteles ant vandens agaro (WA) terpės paviršiaus. Vieną – dvi paras inkubuota 24 ± 2 °C temperatūroje, po to optiniu mikroskopu aptiktos iš pavienių sporų sudryškintos *Fusarium* spp. kolonijos perkeltos į naują 2,5 cm skersmens Petri lėkštelę su specializuota mitybos terpe. Po 2–3 dienų augimo keletas agaro fragmentų su miceliu perkelta į 2 ml Eppendorf tipo mėgintuvėlius su ddH₂O, kurie laikyti +4 °C temperatūroje kaip ilgalaikio saugojimo kolekcija (Leslie ir Summerell, 2006). Petri lėkštelė, kurioje augo grybas, palikta inkubuoti toliau iki sporų susiformavimo. Makrokonidijoms susiformavus, paruoštas prispausto lašo preparatas ir pagal konidijų morfologines savybes identifiukuota *Fusarium* rūšis (Leslie ir Summerell, 2006).

***F. graminearum* DNR išskyrimas ir identifikavimas TL PGR metodu.** Pagal morfologinius požymius identifiukuoti *F. graminearum* izoliatai DNR išskyrimui paimti iš Eppendorf mėgintuvėlių kolekcijos, saugomos +4 °C temperatūroje ir inkubuoti Petri lėkštelėse su PDA 7–8 paras 24 ± 2 °C temperatūroje. Grybo micelis (apie 0,1 g) mentelės pagalba atsargiai nugramdytas nuo terpės paviršiaus ir homogenizuotas piestelės pagalba skystame azote, porcelianinėje lėkštelėje. DNR išskyrimo procedūra ir PGR vykdymo sąlygos analogiškos kaip 2.2.2 skyriuje, tik *F. graminearum* DNR prieš PGR reakciją skiesta santykiui 1:100 ir nenaudota standartinė kreivė, nes atliktas tik kokybinis testas.

***F. graminearum* izoliatų chemotipų identifikavimas.** Molekuliniiais metodais partvirtintų *F. graminearum* izoliatų chemotipai nustatyti analogiškai kaip 2.2.2 skyriuje, tik *F. graminearum* DNR prieš PGR reakciją skiesta santykiui 1:100 ir nenaudota standartinė kreivė, nes atliktas tik kokybinis testas.

2.2.4. Skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų kolonijų ir konidijų morfologinių požymių įvertinimas

TL PGR metodu identifiukuoti skirtingų chemotipų *F. graminearum* izoliatai paimti iš Eppendorf mėgintuvėlių kolekcijos, saugomos +4 °C temperatūroje ir auginti ant bulvių dekstrozės agaro, specializuotos mitybos terpės (SNA) ir morkų agaro (MA) (*Carrot agar* – Leslie ir Summerell, 2006) terpių 15 °C, 20 °C ir 25 °C temperatūrose. Kiekvienas izoliatas

augintas 3 pakartojimais (po 3 Petri lėkšteles), bandymas pakartotas 2 kartus. Kiekvieną dieną matuotas kolonijų diametras siauriausioje ir plačiausioje vietoje (pirmą dieną pamatavus nusibrėžtos markeriu tiesės, kad visi matavimai būtų atliekami toje pačioje vietoje) ir apskaičiuotas vidurkis. kolonijų augimo greitis per parą įvertintas apskaičiuojant diametro skirtumą tarp dviejų gretutinių dienų. Po 10 dienų augimo ant PDA įvertinta kolonijų spalva iš viršaus ir iš apačios. Šeštą augimo dieną ant specializuotos augimo terpės 25 °C temperatūroje tamsoje išmatuotas kiekvieno izoliato 30 konidijų ilgis ir plotis (Leslie ir Summerell, 2006).

2.2.5. Skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų fenotipinių požymių įvertinimas

Tirtas *F. graminearum* skirtingų chemotipų izoliatų gebėjimas įsisavinti įvairius anglies ir azoto šaltinius. Eksperimente naudoti du 3ADON chemotipo izoliatai A (kamienas 18.10) ir B (45.4.1), 15ADON chemotipo izoliatas D (40.1.1) ir NIV chemotipo izoliatas G (108). Tyrime naudotos Biolog Phenotype Microarray 96 šulinėlių fenotipavimo mikroplokštelės PM1, PM2A (abi su skirtingais anglies šaltiniais) ir PM3B (su skirtingais azoto šaltiniais). Tyrimo eiga atlikta naudojantis mikroplokštelių Biolog gamintojo rekomenduojamu protokolu.

F. graminearum kolonijos augintos septynias paras ant PDA terpės, tuomet nuo lėkštelių nugramdytas micelis su konidijų mase ir paruoštas 62 % optinio pralaidumo inokuliatas Biolog IF-F inokuliacijos skystyje. 50 µl gautos suspensijos perkelta į 20ml IF-F – vandens tirpalo (4:1) ir juo inokuliuotos (po 100 µl į kiekvieną šulinėlį) fenotipavimo mikroplokštelės. PM3B mikroplokštei skirtas tirpalas dar papildytas 0,6 ml 32 M gliukozės ir 1,6 ml 1 M fosfato ir sulfato vandeniniais tirpalais, atitinkamai sumažinant gryno vandens tūrį juose. Inokuliuotos mikroplokštelės inkubuotos 5 paras 26 °C temperatūroje ir nuskaitytos Biolog MicroLOG mikroplokštelių skaitytuvu 590 nm bangos ilgyje. Gauti rezultatai vertinti + - sistema, kur + reiškia izoliato gebėjimą įsisavinti tam tikrą šaltinį, – ne.

2.2.6. Skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų patogeniškumas kviečiams

Tirtas septynių *F. graminearum* grybo kamienų: trys 3ADON (18.10, 26.10.3, 45.4.1), trys 15ADON (29.8.2, 32.7, 40.1.1) ir vienas NIV (108) chemotipų, patogeniškumas skirtingų veislių vasariniams ir žieminiams kviečiams taikant atskirtų lapelių testą *in vitro* (angl. „detached leaf assay“, Kumar ir kt., 2011) ir varpų krėtimo testą kviečių žydėjimo metu *in vivo* (Haidukowski ir kt., 2005).

Inokulianto paruošimas. *F. graminearum* izoliatai inokuliatui auginti ant specializuotos mitybos terpės (SNA) 25 ± 2 °C temperatūroje 7 paras. Sporų suspensija ruošta į lėkšteles pilant po 10 ml sterilaus distiliuoto vandens (ddH₂O) ir grybo micelį nugrandant nuo terpės paviršiaus L formos sklaidytuvu. Gauta suspensija perfiltruota per sterilų medvilninį tvarstį. Sporų koncentracija įvertinta hemocitometro kameroje. Darbinė koncentracija *in vitro* testui paruošta 1x10⁶ sporų ml⁻¹, *in vivo* testui 0,6 x10⁴ sporų ml⁻¹.

Lapelių paruošimas ir inokuliacija. Tyrimams pasirinktos keturios žieminių – ‘SW Magnifik’, ‘Skagen’, ‘Kovas DS’, ‘Famulus’; ir penkios vasarinių – ‘Hamlet’, ‘Tybalt’, ‘Vanek’, ‘Diskett’, ‘Triso’ kviečių veislės. Kviečių sėklos prieš pasėjant 5 min. sterilintos 3 proc. NaOCl tirpale, tris kartus skalautos ddH₂O ir paliktos išdžiūti laminare ant sterilaus filtravimo popieriaus. Į sterilias Petri lėkšteles su sudrėkintu filtravimo popieriumi išdėliota po 20 vnt. sėklų. Lėkštelės su sėklomis inkubuotos kambario temperatūroje tamsoje vieną parą. Normaliai sudryškusios, fitopatogenų nepažeistos sėklos perkeltos į 9x9x13 dydžio vazonėlius užpildytus autoklavuota žeme. Į kiekvieną vazonėlį sėta po 9 vnt. sėklų, po 10 vazonėlių kiekvienai veislei. Augalai auginti šiltnamyje 5 savaites, 20 °C temperatūroje, esant 70 % santykinei drėgmei ir dirbtiniam 16 val. per parą apšvietimui.

Patogeniškumo tyrimams naudoti antro ir trečio lapelių 4 cm ilgio segmentai iš vidurinės lapo dalies. Kviečių lapeliai ties viduriu pažeisti pipetės antgalio smaigaliu lengvai paspaudžiant ir išdėliojami po 4 vnt. į sterilias Petri lėkšteles su 0,5 proc. vandens agaru papildyto 10 mg l⁻¹ kinetinu. Pažeidimo vietose užlašinama po 5 µl skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų sporų suspensijos. Kiekvienas tyrimo variantas atliktas 3 pakartojimais (3 lėkštelės) (kiekvienam variantui po 12 lapelių). Tyrimas kartotas 3 kartus. Kontroliniame variante lapeliai inokuliuoti 5 µl ddH₂O. Petri lėkštelės su užkrėstais lapeliais inkubuotos kambario temperatūroje. Nekrozės dydis matuotas 3 paras nuo pažeidimo pasirodymo. Matuotas nekrotinių dėmių ilgis ir skersmuo (Kumar ir kt., 2011).

Lauko eksperimento vykdymo sąlygos. Lauko eksperimentui parinktos vasarinių kviečių veislės ‘Diskett’ ir ‘Tybalt’. Eksperimentas vykdytas 2015 ir 2016 m. Bandyminių laukelių dydis 1,5 x 1,5 = 2,25 m². Abiejų veislių varpos inokuliuotos skirtingų *F. graminearum* chemotipų sporų suspensijomis (koncentracija 0,6 x 10⁴ sporų ml⁻¹) tą pačią dieną, kad išvengtų meteorologinių sąlygų skirtumo. Krėtimo dieną ‘Diskett’ veislė buvo žydėjimo vidurio (BBCH 65), ‘Tybalt’ žydėjimo pradžios (BBCH 63) fenologinėje fazėje. Kiekvieno paruošto preparato kiekis skirtas 1 m² buvo 40 ml, 1 laukeliui teko po 90 ml (Haidukowski ir kt., 2005). Kontroliniu variantu buvo *F. graminearum* neužkrėsti laukeliai. Kiekvienas tyrimo variantas pakartotas tris kartus, pakartojimai lauke išdėstyti atsitiktine tvarka.

Bandymo schema

Veislės:

1. Diskett
2. Tybalt

Skirtingų chemotipų *F. graminearum* izoliatų suspensijos augalų krėtimui:

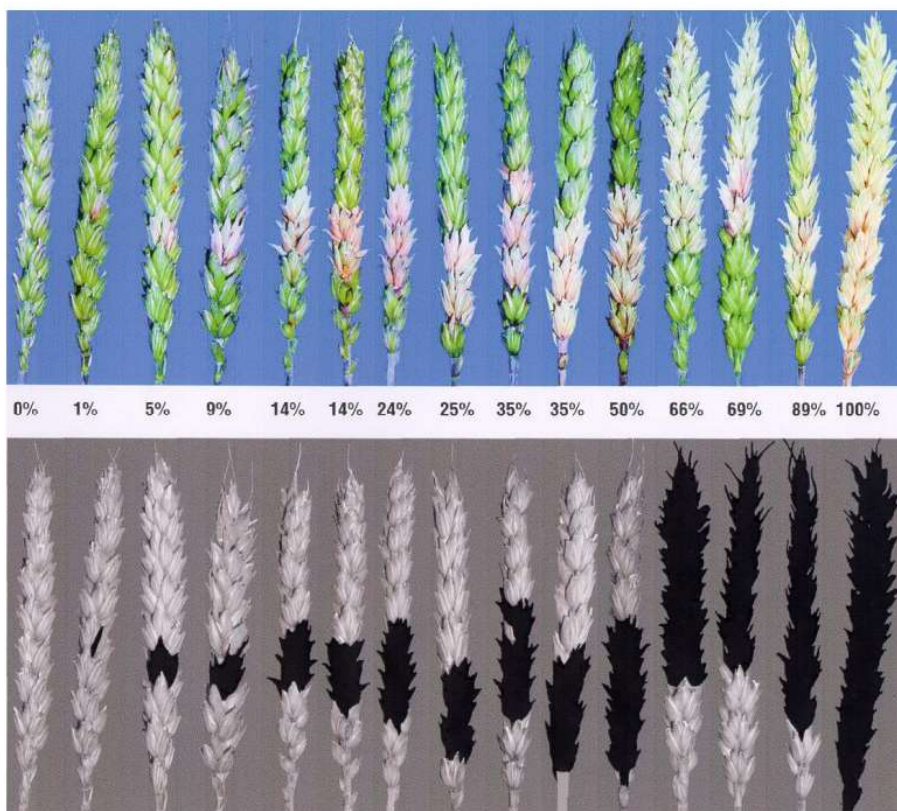
1. K – Kontrolė
2. A – 3ADON chemotipas (kamienas 18.10)
3. B – 3ADON chemotipas (kamienas 45.4.1)
4. C – 3ADON chemotipas (kamienas 26.10.3)
5. D – 15ADON chemotipas (kamienas 40.1.1)
6. E – 15ADON chemotipas (kamienas 32.7)
7. F – 15ADON chemotipas (kamienas 29.8.2)
8. G – NIV chemotipas (kamienas 108)

Laukelių išdėstymo planas:

1-1(K)	2-2(A)	3-3(B)	4-4(C)	5-5(D)	6-6(E)
7-4(C)	8-7(F)	9-5(D)	10-6(E)	11-8(G)	12-2(A)
13-2(A)	14-8(G)	15-1(K)	16-7(F)	17-3(B)	18-4(C)
19-7(F)	20-3(B)	21-8(G)	22-5(D)	23-1(K)	24-6(E)

F. graminearum patogeniškumas vasariniams kviečiams įvertintas pagal varpų fuzariozės išplitimo ir intensyvumo lygį bei grūdų derliaus kokybinius rodiklius.

Vertinimo rodikliai. Varpų fuzariozės išplitimas ir intensyvumas vertintas pieninės brandos pabaigoje (BBCH77) – vaškinės brandos pradžioje (BBCH 83–85) naudojantis Engle ir kitų (2003) aprašyta skale (3 pav.), kiekviename laukelyje apžiūrint po 100 varpų atsitiktine tvarka (Hollingsworth ir kt., 2006). Derliaus nuėmimo metu paimti grūdų mėginiai, nustatytas vizualiai matomų fuzariozės pažeistų grūdų kiekis (standartas LST EN 15587), 1000 grūdų svoris, drėgnis ir kokybės parametrai grūdų analizatoriumi „Infratec“.



3 pav. Varpų fuzariozės vertinimo skalė (Engle ir kt., 2003)

Fig. 3. *Fusarium head blight assessment scale* (Engel et al., 2003)

2.2.7. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų jautrumo fungicidams nustatymas *in vitro*

Tirtas septynių *F. graminearum* grybo kamienų: trys 3ADON (18.10, 26.10.3, 45.4.1), trys 15ADON (29.8.2, 32.7, 40.1.1), ir vienas NIV (108) chemotipo, jautrumas javų varpų fuzariozės kontrolei naudojamoms triazolų grupės fungicidų veikliosioms medžiagoms: tebukonazolui, metkonazolui ir protiokonazolui. Tyrime naudotos 96 šulinėlių mikroplokštelės (šulinėlio tūris 300 μ l) ir neagarizuota minimali *Fusarium* terpė (FMM) (Leslie ir kt., 2006). FMM terpė papildyta fungicidais, kurių didžiausia koncentracija buvo 1 μ M ir mažinta dvigubais skiedimais iki 1/512 μ M. Fungicidai tirpinti ir skiesti 96 % etanolium, kurio koncentracija visuose praskiedimuose buvo lygi 4 % nuo viso terpės tūrio. Tyrime naudotos 2 neigiamos kontrolės: 100 % FMM terpė ir 96 % FMM terpės – 4 % etanolio tirpalas. Tyrimo variantų išsidėstymas mikroplokštelėje parodytas 4 pav. Vertinta minimali *F. graminearum* augimą inhibuojanti pasirinktų fungicidų koncentracija (MIK).

NK	NK	NK	1/64 μ M	1/64 μ M	1/64 μ M	1/16 μ M	1/16 μ M	1/16 μ M	1/4 μ M	1/4 μ M	1/4 μ M
NK+Et	NK+Et	NK+Et	1/128 μ M	1/128 μ M	1/128 μ M	1/32 μ M	1/32 μ M	1/32 μ M	1/8 μ M	1/8 μ M	1/8 μ M
1 μ M	1 μ M	1 μ M	1/256 μ M	1/256 μ M	1/256 μ M	1/64 μ M	1/64 μ M	1/64 μ M	1/16 μ M	1/16 μ M	1/16 μ M
1/2 μ M	1/2 μ M	1/2 μ M	1/512 μ M	1/512 μ M	1/512 μ M	1/128 μ M	1/128 μ M	1/128 μ M	1/32 μ M	1/32 μ M	1/32 μ M
1/4 μ M	1/4 μ M	1/4 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1/256 μ M	1/256 μ M	1/256 μ M	1/64 μ M	1/64 μ M	1/64 μ M
1/8 μ M	1/8 μ M	1/8 μ M	1/2 μ M	1/2 μ M	1/2 μ M	1/512 μ M	1/512 μ M	1/512 μ M	1/128 μ M	1/128 μ M	1/128 μ M
1/16 μ M	1/16 μ M	1/16 μ M	1/4 μ M	1/4 μ M	1/4 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1/256 μ M	1/256 μ M	1/256 μ M
1/32 μ M	1/32 μ M	1/32 μ M	1/8 μ M	1/8 μ M	1/8 μ M	1/2 μ M	1/2 μ M	1/2 μ M	1/512 μ M	1/512 μ M	1/512 μ M

Metkonazolas / *Metconazole* Protiokonazolas / *Prothioconazole*

Tebukonazolas / *Tubeconazole*

NK – neigiama kontrolė / *negative control*; NK+Et – neigiama kontrolė su 4 % etanolio / *negative control with 4% ethanol*

4 pav. Tyrimo variantų išsidėstymas 96 šulinėlių mikroplokštelėje – *F. graminearum* augimą inhibuojančios minimalios metkonazolo, protiokonazolo ir tebukonazolo koncentracijos nustatymui.

Fig. 4. The location of the study options in a 96-well microplate is to detect the minimum concentration of metconazole, prothioconazole and tebuconazole inhibiting growth of *F. graminearum*.

F. graminearum izoliatai prieš eksperimentą auginti ant agarizuotos specializuotos mitybos terpės (SNA) septynias paras 25 °C temperatūroje. Inokuliatui ruošti nuplaunant grybo micelį su sporų mase nuo lėkštelių sterilia FMM terpe. Koncentracijos suvienodintos iki 70 % optinio tankio matuojant drumstomačiu (turbidimetru). Gauti inokuliatui išpilstyti į mikroplokšteles po 25 µl į kiekvieną šulinėlį ir užpilti po 100 µl grynos FMM terpės, FMM ir etanolio ar FMM ir etanolio su jame ištirpintais fungicidais tirpalu. Visi tyrimo variantai ištirti 3 pakartojimais.

Inokuliuotos mikroplokštelės inkubuotos 25 °C temperatūroje 10 parų, tada atliktas vizualus MIK nustatymas. Bandyje net ir labai nežymus mikromiceto augimas lyginant su kontrole vertintas kaip teigiamas, fungicidų koncentracijos įtaka *F. graminearum* izoliatų augimui nematuota, nustatyta tik visiškai augimą slopinanti koncentracija, (t. y. MIK).

2.3. Cheminių ir biologinių preparatų veiksmingumas prieš *F. graminearum* *in vivo*

F. graminearum jautrumas fungicidiniams preparatams ir potencialios biologinės kontrolės priemonėms nustatytas dirbtinai sukeltos žieminių ir vasarinių kviečių javų varpų fuzariozės infekcijos sąlygomis LAMMC Žemdirbystės instituto bandyminiuose laukuose 2015 ir 2016 m. Dirbtinei infekcijai naudotas 3ADON chemotipo *F. graminearum* izoliatas 26.10.3, kuris buvo vienas iš jautriausių fungicidų poveikiui *in vitro* eksperimente. Dirbtinis užkrėtimas atliktas žieminių kviečių veislėje ‘SW Magnifik’ ir vasarinių kviečių veislėse ‘Diskett’ ir ‘Tybalt’. *F. graminearum* 26.10.3 jautrumas tirtas fungicidui Juventus (BASF; veiklioji medžiaga metkonazolas, 90g l⁻¹) ir VU GMF Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kolekcijos *B. subtilis* bakterijų kamienų MBK-a3 ir MBK-r4 į triptono sojų agarą terpę išskiriamiesiems metabolitams. *B. subtilis* bakterijų kamienų MBK-a3 ir MBK-r4 poveikis prieš *F. graminearum* buvo nustatytas ankstesniuose tyrimuose (Sakalauskas ir kt., 2014).

Lauko eksperimento vykdymo sąlygos. Žieminių kviečių laukelių dydis 1,5 x 7,5 = 11,25 m², vasarinių – 1,5 x 10,0 = 15,0 m². Apsaugos priemonės nuo varpų fuzariozės panaudotos ‘SW Magnifik’ ir ‘Diskett’ žydėjimo viduryje (BBCH 65), ‘Tybalt’ – žydėjimo pradžioje (BBCH 63), kviečių varpos inokuliuotos *F. graminearum* sporų suspensija praėjus parai nuo apsaugos priemonių panaudojimo. Fungicido metkonazolo naudota gamintojo rekomenduojama norma – 1 l ha⁻¹. Kiekvieno paruošto preparato kiekis skirtas 1 m² buvo 40 ml, 1 laukeliui žieminiuose kviečiuose faktiškai teko po 450 ml, vasariniuose kviečiuose po 600 ml. Inokuliatui išpurškimo ir fungicidų panaudojimo sąlygos pritaikytos pagal Haidukowski et al., 2005. Kontroliniu variantu buvo *F. graminearum* užkrėsti ir apsaugos priemonėmis nepurkšti laukeliai. Kiekvienas variantas pakartotas keturis kartus, pakartojimai išdėstyti atsitiktine tvarka.

Bandyimo schema

Veislės:

1. Diskett
2. Tybalt
3. Magnific

VF apsaugos priemonės:

1. K – Kontrolė
2. J – Metkonazolas
3. B1 – *B. subtilis*, kamienas MBK-a3
4. B2 – *B. subtilis*, kamienas MBK-r4

Laukelių išdėstymo planas:

1-1(K)	2-2(J)	3-3(B1)	4-4(B2)
5-3(B1)	6-4(B2)	7-1(K)	8-2(J)
9-4(B2)	10-3(B1)	11-2(J)	12-1(K)
13-2(J)	14-1(K)	15-4(B2)	16-3(B1)

Inokulianto paruošimas. Inokulianto paruošimui *F. graminearum* 26.10.3 kamienas augintas Petri lėkštelėse ant SNA terpės penkias paras 25 °C temperatūroje. Po penkių parų lėkštelės nuplautos ddH₂O ir konidijų suspensija perkošta per sterilų medvilninį tvarstį tam, kad būtų pašalinti micelio fragmentai. Sporų koncentracija suspensijoje nustatyta hemocitometriniame kameroje. Koncentracija žieminiams kviečiams buvo 0,6 x 10⁴ sporų ml⁻¹, vasariniams kviečiams – 1,0 x 10⁴ sporų ml⁻¹. Laukeliui reikalingas inokulianto kiekis apskaičiuotas kaip ir apsaugos priemonėms – 40 ml 1 m².

Bakterinių preparatų paruošimas. Bakterijų į augimo terpę išskiriamų metabolitų poveikis VF pasireiškimui įvertintas paruošus beląstelinį skystoje terpėje augintų bakterijų kultūrų supernatantą. Tam MBK-a3 ir MBK-r4 bakterijų kamienai Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų institute auginti 22–24 val. iki stacionarios augimo tarpsnio triptono sojų agaro terpėje orbitinėje purtyklėje esant 30 °C temperatūrai ir 130 aps/min purtyklės greičiui. Užauginta bakterijų kultūra centrifuguota 15 min 10000 aps/min greičiu, supernatantas nupiltas ir perfiltruotas pašalinant likusias bakterijų ląsteles. Prieš purškiant gautą bakterijų supernatantą bakterinis preparatas skiestas santykiu 1:2.

Varpų fuzariozės išplitimas ir intensyvumas vertintas pieninės brandos pabaigoje (BBCH77) – vaškinės brandos pradžioje (BBCH 83-85) naudojantis Engle ir kitų (2003) aprašyta skale (3 pav.), kiekviename laukelyje apžiūrint po 100 varpų atsitiktine tvarka (Hollingsworth ir kt., 2006). Derliaus nuėmimo metu paimti 2 kg grūdų mėginiai, nustatytas vizualiai matomų fuzariozės pažeistų grūdų kiekis (standartas LST EN 15587), 1000 grūdų svoris, drėgnis ir kokybės parametrai grūdų analizatoriumi „Infratec“.

2.4. Meteorologinės sąlygos

Meteorologinės sąlygos apibūdintos remiantis LHTM Dotnuvos meteorologinėmis stoties duomenimis, registruotais Akademijoje 2015 ir 2016 metais (2 lentelė).

2015 metais vidutinė birželio ir liepos mėnesių temperatūra buvo 0,6–0,7 °C žemesnė už vidutinę daugiametę. O rugpjūčio mėnesį 2,9 °C aukštesnė, nei įprasta. Birželio mėnesį 57,5 % iškrito mažiau kritulių, nei įprasta, liepos mėnesį 23,5 % mažiau, o rugpjūtį 92,4 % mažiau.

Vidutinė 2016 metų birželio mėnesio temperatūra buvo 1,8 °C aukštesnė už vidutinę daugiametę, liepos mėnesio – 0,7 °C aukštesnė, o rugpjūčio – 0,2 °C aukštesnė. Birželio mėnesį 68,9 % iškrito mažiau kritulių, nei įprasta, liepos mėnesį – 43,0 % mažiau, o rugpjūčio – 50,1 % mažiau.

Abiejais metais oro sąlygos buvo nepalankios VF plitimui. Lyginant abu metus tarpusavyje, 2016 metų oro sąlygos buvo nepalankesnės nei 2015 metų.

2 lentelė. Vidutinė mėnesio oro temperatūra ir kritulių kiekis, skirtingais tyrimų metais

Table 2. Average monthly air temperature and average monthly precipitation in different years of research

Mėnuo / Month	Temperatūra °C / Temperature °C		Krituliai mm / Precipitations mm	
	Vidutinė per mėnesį/ Average monthly	Vidutinė daugiametė/ Historic average	Per mėnesį / Per month	Daugiametis vidurkis / Historic average
2015				
Birželis / June	15,1	15,7	26,3	61,9
Liepa / July	17,1	17,8	57,6	75,3
Rugpjūtis / August	19,7	16,8	5,6	73,4
2016				
Birželis / June	17,5	15,7	19,1	61,5
Liepa / July	18,5	17,8	42,7	74,9
Rugpjūtis / August	17,0	16,8	36,4	73,0

2.5. Tyrimų duomenų statistinė analizė

Tyrimų duomenys apdoroti dispersinės analizės metodu. Statistinei analizei apskaičiuoti vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai skaičiuoti MS Excel programa. Mažiausias esminis skirtumas R_{05} paskaičiuotas naudojant programą ANOVA (Tarakanovas, Raudonius, 2003).

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR APITARIMAS

3.1. *Trichotecenus* produkuojančių *Fusarium* grybų išplitimas Lietuvoje užaugintuose vasarinių ir žieminių kviečių grūduose

Šio tyrimo tikslas buvo identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti vyraujančias TRI produkuojančių *Fusarium* grybų rūšis Lietuvoje užaugintų kviečių grūduose.

Vidutiniais 2013 ir 2014 metų duomenimis *Fusarium* grybai buvo labiau išplitę vasarinių kviečių grūduose – 43,0 %, nei žieminių – 16,1 % (3 lentelė).

3 lentelė. Lietuvoje užaugintų žieminių ir vasarinių kviečių grūdų užsikrėtimas *Fusarium* rūšies grybais, 2013 ir 2014 m.

Table 3. Infections in winter and summer wheat grains harvested in Lithuania with *Fusarium* species in 2013 and 2014 years

		<i>Fusarium</i> grybų pažeistų grūdų skaičius, % The number of grains damaged by <i>Fusarium</i> , %					
<i>Fusarium</i> spp.	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. avenaceum</i>	Kiti / Other <i>Fusarium</i>	
Vasariniai kviečiai, 2013 m., n = 64 <i>Spring wheat, 2013, n = 64</i>							
Vid./Avg.	45,3	12,3	0,2	4,3	3,2	18,1	9,8
Sx	3,4	1,6	0,1	0,7	0,4	1,7	1,8
Min	0	0	0	0	0	0	0
Max	96,7	49,2	1,7	25,8	10	60	112,5
Vasariniai kviečiai, 2014 m., n = 54 <i>Spring wheat, 2014, n = 54</i>							
Vid./Avg.	40,7	15,0	0,5	12,0	5,1	10,2	1,6
Sx	3,6	2,9	0,1	2,4	1,0	1,5	0,5
Min	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Max	100,0	95,0	5,8	79,2	42,5	50,0	18,3
Žieminiai kviečiai, 2013 m., n = 15 <i>Winter wheat, 2013., n = 15</i>							
Vid./Avg.	23,4	2,6	0,2	3,9	3,1	13,1	3,4
Sx	6,4	0,6	0,1	0,9	1,4	4,3	1,0
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	90,0	6,7	2,0	13,3	20,0	60,7	10,8
Žieminiai kviečiai, 2014 m., n = 15 <i>Winter wheat, 2014, n = 15</i>							
Vid./Avg.	8,7	1,8	0,1	1,8	0,6	3,7	0,5
Sx	2,7	1,0	0,1	1,4	0,4	1,8	0,4
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	39,2	8,3	0,8	14,2	3,3	19,2	3,4

n – mėginių skaičius / number of samples

F. graminearum vasariniuose kviečiuose pažeidė vidutiniškai 13,7 %, žieminiuose – 2,2 % grūdų. 2013 metais vasarinių kviečių grūdus daugiausia pažeidė *F. avenaceum* – vid.

18,1 %, ir *F. graminearum* – vid. 12,3 %, o 2014 m. *F. graminearum* – vid. 15,0 %, *F. Poae* – vid. 12,0 % ir *F. avenaceum* – vid. 10,2 %. Žieminių kviečių grūduose abejais metais vyravo *F. avenaceum*: 2013 m. vid. 13,1 %; 2014 m. vid. 3,7 %.

Iš B grupės TRI producentų grūduose aptiktos *F. graminearum*, *F. culmorum* ir *F. poae* rūšys. Vasariniuose kviečiuose vyravo *F. graminearum* – vid. 13,7 %; *F. poae* – vid. 8,2 %; *F. culmorum* – vid. 0,4 %, o žieminiuose – nežymiai *F. poae* – vid. 2,9 %; *F. graminearum* – vid. 2,2 %, *F. culmorum* – vid. 0,2 % (3 lentelė).

Taikant qTL-PGR metodą grūdų mėginiuose nustatytas *F. graminearum* DNR kiekis (išreikštas pg grybo DNR/μg augalo DNR) (4 lentelė). Panašūs tyrimų rezultatai kaip šie, gauti vertinat morfologiniais metodais. 2013 m. kviečių grūduose aptikti didesni *F. graminearum* DNR kiekiai nei 2014 m. 2013 m. *F. graminearum* DNR kiekiai vasarinių kviečių grūduose buvo didesni 7,4 karto (102,2 pg ng⁻¹) nei žieminių kviečių grūduose (13,9 pg ng⁻¹), o 2014 m. – 3,2 karto. Nustatyta *F. graminearum* DRN kiekio ir *F. graminearum* pažeistų grūdų kiekio nustatyta koreliacija teigiama, patikima, bet silpna – $r = 0,294^{**1}$.

4 lentelė. *F. graminearum* DNR vidutinis kiekis (pg grybo DNR/μg augalo DNR) vasarinių ir žieminių kviečių grūduose 2013 ir 2014 m.

Table 4. *Quantity of F. graminearum DNA (pg fungus DNA / μg plant DNA) in spring and winter wheat grains in 2013 and 2014*

Rodikliai /Indicators		<i>F. graminearum</i> DNR /DNA (pg) per plant DNR /DNA (μg)	
		2013 m./2013	2014 m./2014
V. kviečiai/ <i>Spring wheat</i>	Vid./Avg	102,2	23,0
	Sd	21,6	5,3
	Min	0,0	0,0
	Max	1068,6	182,5
n tirtų / <i>n investigated</i>		64	50
n teigiamų / <i>n positive</i>		63	49
Ž. kviečiai/ <i>Winter wheat</i>	Vid./Avg	13,9	7,2
	Sd	4,3	4,0
	Min	0,1	0,01
	Max	54,6	58,8
n tirtų / <i>n investigated</i>		15	15
n teigiamų / <i>n positive</i>		15	15

n – mėginių skaičius / *number of samples*

Apibendrinimas

Šio tyrimo metu identifikuotos ir kiekybiškai įvertintos vyraujančios trichotecenus produkuojančių *Fusarium* grybų rūšys Lietuvoje užaugintų kviečių grūduose. 2013 ir 2014 m. *Fusarium* grybai pažeidė vidutiniškai 43,0 % vasarinių ir 16,1% žieminių kviečių grūdų. Šie duomenys sutampa su Suproniene ir kt. (2010a) publikuotais tyrimais, kurie taip pat parodė, kad *Fusarium* pažeistų grūdų kiekis vasarinių javų grūduose buvo gerokai

didesnis (vidutiniškai 44,5 % 2005 m. ir 19,4 % 2006 m.) nei žieminių javų grūduose (vidutiniškai 9,5 % 2005 m. ir 8,4 % 2006 m.).

Klasikiniais mikrobiologiniais metodais įvertinus bendrą *Fusarium* grybų infekcijos lygį bei rūšinę sudėtį, iš potencialių DON, 3ADON, 15ADON ir NIV producentų grūduose aptiktos *F. graminearum*, *F. culmorum* ir *F. poae* rūšys, tai sutampa su literatūros šaltinių duomenimis, kad šios grupės toksinus sintetina *F. graminearum* rūšių kompleksas ir kitos artimai susiję rūšys tokios kaip *F. culmorum*, *F. cerealis* ir *F. pseudograminearum* (O'Donnell ir kt., 2000, 2004; Bennett, Klich, 2003; Goswami, Kistler, 2004; Starkey ir kt., 2007; Yazar ir kt., 2008). NIV grūduose taip pat gali gaminti *F. poae* rūšies grybai (Bottalico, Perrone, 2002; Yli-Mattila, 2010).

Šio tyrimo metu *F. graminearum* identifikuotas kaip pagrindinis TRI producentas kviečiuose. Užsienio tyrėjų atlikti tyrimai taip pat rodo, kad *F. graminearum* yra labiausiai paplitusi rūšis visame pasaulyje (Schilling ir kt., 1996; Ward ir kt., 2008; Boutigny ir kt., 2011; Yli-Mattila ir kt., 2017). Tuo tarpu 2005 ir 2006 m. Lietuvoje atlikti tyrimai rodo, kad 36 komecinių veislių javų grūduose *F. poae* buvo vyraujanti trichotecenus produkuojančių *Fusarium* rūšių tarpe, o *F. graminearum* DNR – visiškai neaptikta (Suproniene ir kt., 2010a).

3.2. *F. graminearum* chemotipai, jų išplitimas ir pasiskirstymas vasarinių ir žieminių kviečių grūduose

Priklausomai nuo gaminamo mikotoksino, B tipo TRI producentai skiriami į chemotipus: NIV ir DON bei jo derivatų – 3-acetildeoksinivalenolio (3ADON) ir 15-acetildioksinivalenolio (15ADON). Chemotipavimas leidžia įvertinti TRI izoliatų toksigeniškumą, lauko populiacijų struktūrą, prognozuoti pasikeitimus *Fusarium* spp. populiacijose detaliau nei rūšies lygmeniu bei numatyti NIV ir DON derivatų susikaupimo tikimybę grūdinėje žaliavoje.

Šiuolaikiniai molekuliniai metodai yra daug efektyvesni ir greitesni tiksliam patogenų identifikavimui ir chemotipavimui. Naudoti 105 *F. graminearum* izoliatai chemotipavimo TL-PGR metodo optimizavimui, ir specifiniai 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų pradmenys. Dauguma chemotipų identifikuoti iki 29 ciklo slenksčio (Ct) reikšmės (5 lentelė).

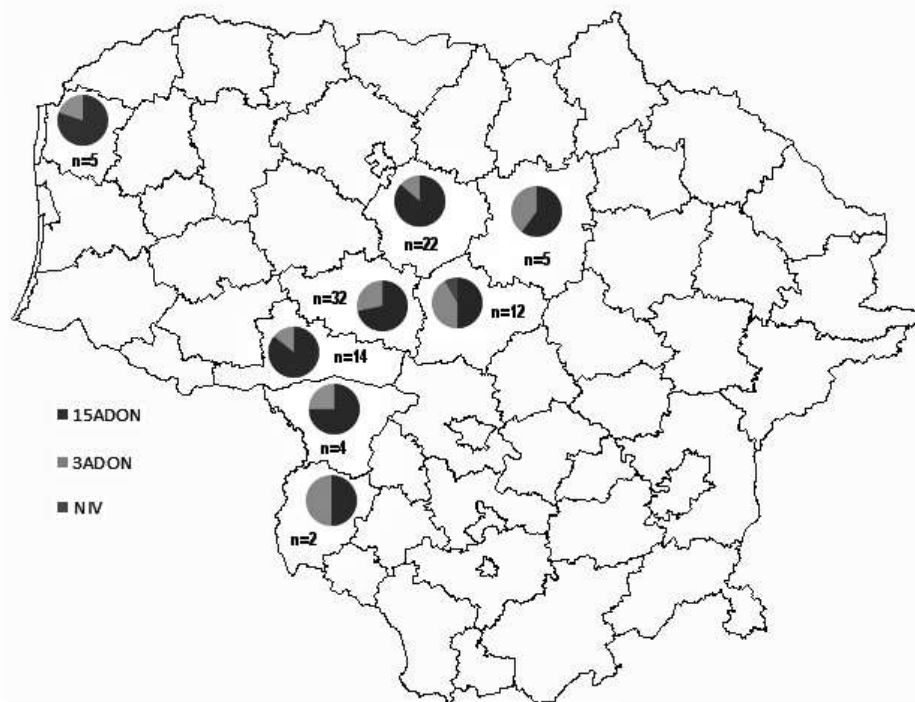
5 lentelė. Gynų *F. graminearum*, 15ADON, 3ADON ir NIV chemotipų kultūrų identifikavimo TL PGR rezultatai

Table 5. *F. graminearum* 15ADON, 3ADON and NIV chemotype identification in pure cultures by using real time PCR

Ct reikšmė / Ct meaning	Teigiamų mėginių / Positive samples, %			
	<i>F. graminearum</i>	15ADON	3ADON	NIV
≤ 29	99,0	64,8	20,0	1,0
30–37	1,0	6,7	5,7	0,0
38–40	0,0	1,9	1,1	0,0
Neigiamų mėginių / Negative samples, %	0,0	26,7	73,3	99,0

Chemotipavimo tyrimų metu nustatyta, kad 73,3 % *F. graminearum* izoliatų yra potencialūs 15ADON producentai, 26,7 % – 3ADON producentai, ir tik 1,0 % – NIV producentai.

Įvertinus chemotipų pasiskirstymą priklausomai nuo izoliato kilmės regiono dėšningumų nepastebėta (5 pav.).



5 pav. *F. graminearum* izoliatų regioninis pasiskirstymas priklausomai nuo chemotipo. n – tirtų mėginių skaičius

Fig 5. Regional distribution of *F. graminearum* isolates depending on the chemotype. n - number of samples tested

Grynų *F. graminearum* kultūrų tarpe 15ADON chemotipas neabejotinai buvo vyraujantis, tačiau TRI chemotipų producentų įvertinimas homogenizuotuose grūduose atskleidė kiek kitokį vaizdą – juose nustatytas 3ADON aptikimo dažnis toks pat didelis kaip ir 15ADON (6 lentelė, 6 pav.).

Didžiojoje dalyje vasarinių kviečių grūdų mėginių (89 % – 2013 ir 60 % – 2014) ir 40 % žieminių kviečių grūdų mėginių aptikta abiejų – 15ADON ir 3ADON chemotipų *F. graminearum* DNR (7 pav.). NIV chemotipo *F. graminearum* DNR aptikta tik 2013 m. 6–7 % grūdų mėginių, kuriuose taip pat buvo aptikta ir kitų dviejų chemotipų producentų. Vien tik 15ADON chemotipo producentų aptikimo dažnis labai išsiskyrė 2013 m. – šio chemotipo DNR aptikta tik 6 % vasarinių, tačiau net 40 % žieminių kviečių grūdų mėginių. 2014 m. vasarinių ir žieminių kviečių grūduose 15ADON chemotipo producentų aptikimo dažnis buvo panašus (16 % ir 13 %). Vien tik 3ADON chemotipo *F. graminearum* DNR

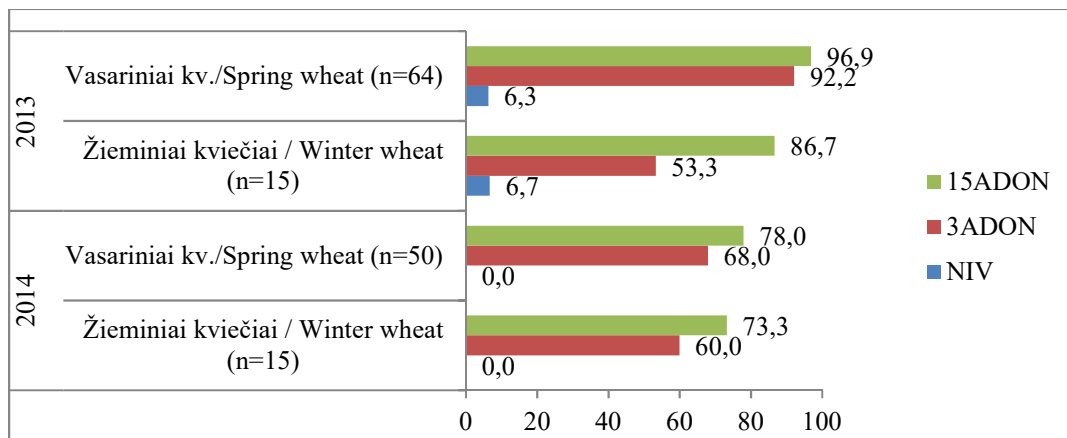
aptikta 5–8 % vasarinių kviečių ir 2013 m. žieminių kviečių grūdų mėginių. 2014 m. 3ADON chemotipo DNR aptikimo dažnis žieminių kviečių grūdų mėginiuose siekė 20 %.

6 lentelė. 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų DNR kiekis (pg grybo DNR/μg augalo DNR) vasarinių ir žieminių kviečių grūduose 2013 ir 2014 m.

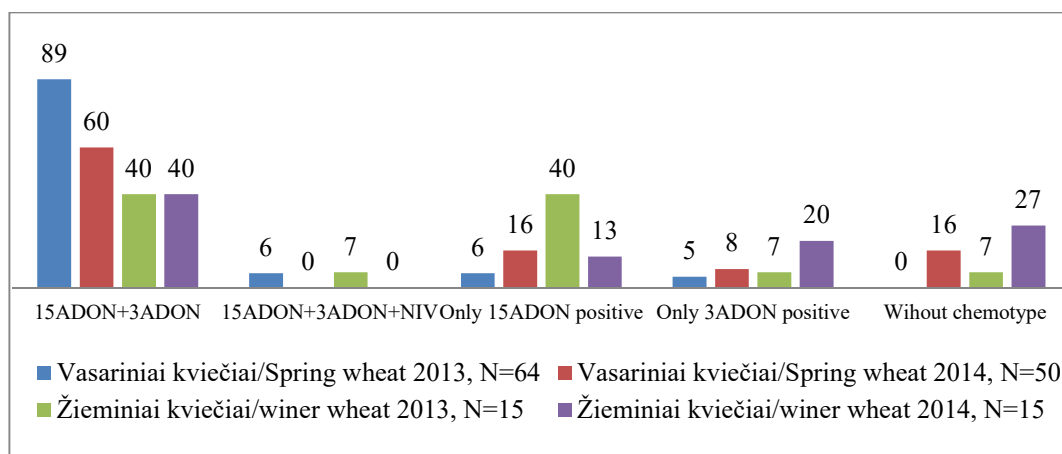
Table 6. Quantity of 3ADON, 15ADON and NIV chemotypes DNA (pg fungus DNA/μg plant DNA) in spring and winter wheat grains in 2013 and 2014

Rodikliai / Indicators		2013 m. / 2013			2014 m./ 2014		
		15 ADON	3 ADON	NIV	15 ADON	3 ADON	NIV
Vas. kviečiai/ <i>Spring wheat</i>	Vid./Avg	97,1	4174,7	4,9	14,5	405,9	0,0
	Sd	43,9	1265,6	3,1	6,5	113,7	0,0
	Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	2090,4	62862,8	177,5	283,2	3059,4	0,0
n tirtų / n investigated		64	64	64	50	50	50
n teigiamų / n positive		55	59	4	36	35	0
Žiem. kviečiai/ <i>Winter wheat</i>	Vid./Avg	0,6	359,0	33,3	0,7	190,7	0,0
	Sd	0,3	209,4	33,3	0,5	94,9	0,0
	Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	4,6	3146,2	499,9	7,5	1234,6	0,0
n tirtų / n investigated		15	15	15	15	15	15
n teigiamų / n positive		9	8	1	6	10	0

n – mėginių skaičius / number of samples



6 pav. Skirtingų chemotipų *F. graminearum* DNR aptikimo dažnis kviečių grūduose
Fig 6. Detection frequency of diferent chemotypes of *F. graminearum* DNA in wheat grains



7 pav. Chemotipų pasiskirstymas vasarinių ir žieminių kviečių grūdų mėginiuose 2013 ir 2014 m. išreikštas teigiamų mėginių skaičiumi, %

Fig 7. Distribution of chemotypes in spring and winter wheat grain samples in 2013 and 2014, expressed as positive number of samples, %

Koreliaciniai ryšiai tarp *Fusarium* aptikimo dažnio bei *F. graminearum* ir 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų DNR kiekio ng/μg augalo DNR žieminių ir vasarinių kviečių grūduose parodė, kad *F. graminearum* yra vienas iš galimų 15ADON ir 3ADON chemotipų šaltinių Lietuvoje išaugintų kviečių grūduose, tačiau mažai siejamas su NIV chemotipo producentais (7 lentelė).

7 lentelė. Koreliaciniai ryšiai tarp *Fusarium* aptikimo dažnio bei *F. graminearum* ir 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų DNR kiekio ng/μg augalo DNR, žieminių ir vasarinių kviečių grūduose, 2013 ir 2014 m.

Table 7. Correlation between *Fusarium* detection frequency and *F. graminearum* and 3ADON, 15ADON and NIV chemotype DNA in ng / μg plant DNA in winter and spring wheat grains, 2013 and 2014 year.

Rodikliai / Indicators	<i>Fusarium</i> spp., %	<i>F. graminearum</i>	15 ADON	3 ADON
<i>Žieminiai kviečiai / Winter wheat, 2013 ir 2014, n=30</i>				
<i>F. graminearum</i>	.716**			
15 ADON	.460*	.782**		
3 ADON	.253	.585**	.158	
NIV	.106	.110	-.035	-.083
<i>Vasariniai kviečiai / Spring wheat, 2013 ir 2014, n=114</i>				
<i>F. graminearum</i>	.917**			
15 ADON	.162	.373**		
3 ADON	.764**	.826**	.092	
NIV	.155	.155	-.001	.101

** žymi statistiškai patikimą koreliacinę ryšį ($p < 0,01$), * žymi statistiškai patikimą koreliacinę ryšį ($p < 0,05$)

** indicates a statistically significant correlation ($p < 0.01$), * indicates a statistically significant correlation ($p < 0.05$)

Apibendrinimas

Chemotipavimo tyrimų metu nustatyta, kad 73,3 % *F. graminearum* izoliatų yra potencialūs 15ADON producentai, 26,7 % – 3ADON producentai, ir 1,0 % – NIV producentai. Įvertinus chemotipų pasiskirstymą priklausomai nuo izoliato kilmės regiono dėsningumą nepastebėta. Grynų *F. graminearum* kultūrų tarpe 15ADON chemotipas neabejotinai buvo vyraujantis, tačiau TRI chemotipų producentų įvertinimas homogenizuotuose grūduose atskleidė kiek kitokį vaizdą – juose nustatytas 3ADON aptikimo dažnis toks pat didelis (69,8 %), kaip ir 15ADON (78,3 %).

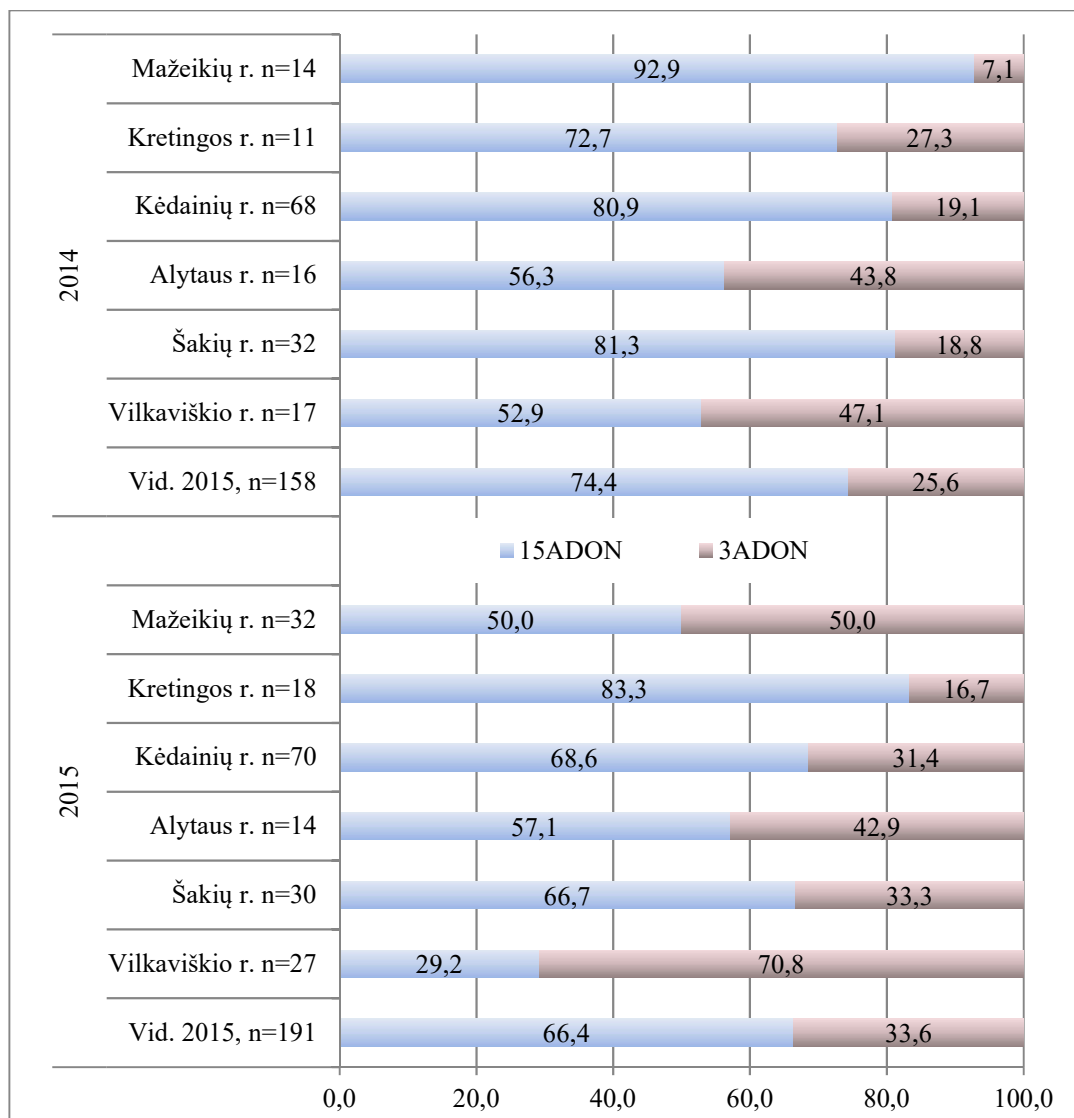
Lyginant šiuos duomenis su anksčiau šiaurinėje Europos dalyje atliktomis didelės apimties studijomis matyti, kad grynų *F. graminearum* kultūrų chemotipų pasiskirstymas Lietuvoje panašesnis į Vokietijoje atliktų tyrimų rezultatus – dominuoja 15ADON producentai, labai maža dalis NIV producentų (Talas ir kt., 2011). D. Britanijoje atliktais tyrimais nustatyta daug didesnė NIV producentų dalis (25 %), bet dominuojantis chemotipas taip pat 15ADON (Jennings ir kt., 2004 a,b). Esminis skirtumas nuo šių dviejų studijų yra didesnis 3ADON chemotipo aptikimo dažnis – šis chemotipas Europoje tiek grynų kultūrų, tiek grūdų mėginiuose aptinkamas gana negausiai ir yra dažnesnis Pietryčių Azijoje ir rytinėje Šiaurės Amerikos dalyje (Becher ir kt., 2013).

3.3. *F. graminearum* chemotipų struktūra skirtingose Lietuvos vietose išsidėsčiusiuose vasarinių kviečių laukuose

Iš surinktų 2014 ir 2015 metais varpų *F. graminearum* išskirtuose izoliatuose (158 izoliatai 2014 m., 191 – 2015 m.) NIV chemotipo producentų neaptikta. Vidutiniais 2014 metų duomenimis 15ADON chemotipo *F. graminearum* kamienų buvo aptikta 3 kartus daugiau nei 3ADON chemotipo, o 2015 m. du kartus daugiau nei 3ADON chemotipo (8 pav.). *F. graminearum* populiacijų struktūra chemotipų atžvilgiu įvairavo ne tik tarp tyrimo metų ir skirtingų rajonų (8 pav.), bet ir vietovių (9 pav.) bei gretimų laukų (10 pav.).

Lyginant tris laukus Kėdainių rajone – daugiausia aptikta 15 ADON chemotipo *F. graminearum* kamienų. 2014 m. chemotipų pasiskirstymas visose vietovėse panašus, tačiau 2015 m. *F. graminearum* chemotipų struktūra skiriasi, ypač Ažuolaičių lauke (9 pav.).

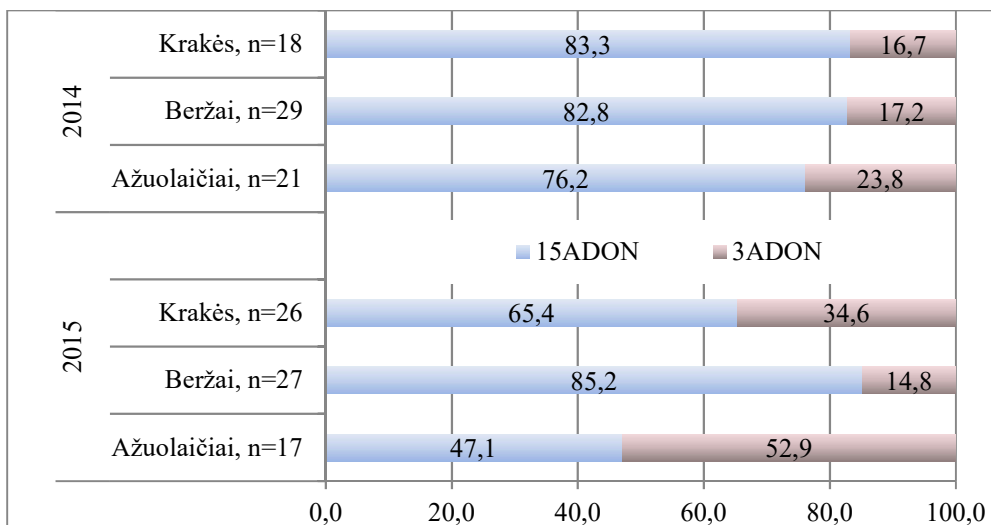
Kretingos rajone abejais metais 15ADON chemotipo *F. graminearum* kamienų buvo aptikta tris kartus daugiau nei 3ADON chemotipo. Tuo tarpu Vilkaviškio rajone 15ADON chemotipas vyravo nežymiai (8 pav.).



8 pav. *F. graminearum* 15ADON ir 3ADON chemotipų kamienų regioninis pasiskirstymas vasarinių kviečių pasėliuose 2014 ir 2015 m, n – tirtų izoliatų skaičius

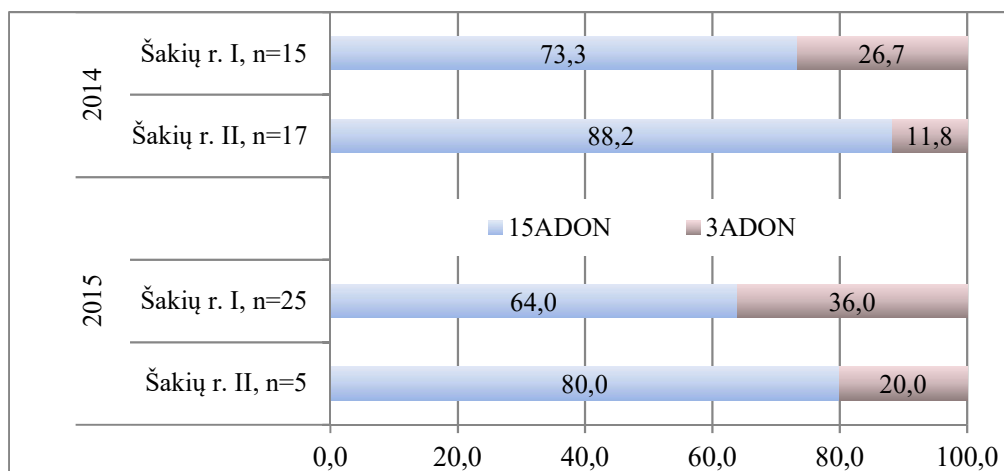
Fig. 8. *F. graminearum* 15ADON and 3ADON chemotype strains in spring wheat crops 2014 and 2015 year, n - number of isolates tested

F. graminearum chemotipų struktūra gretimuose pasėliuose abejais tyrimų metais nustatyta gana panaši: antrame lauke stebimas apie 15 proc. 15ADON chemotipo pranašumas lyginant su pirmu lauku (10 pav.).



9 pav. *F. graminearum* 15ADON ir 3ADON chemotipų kamienu pasiskirstymas Kėdainių rajono vasarinių kviečių pasėliuose 2014 ir 2015 m., n – tirtų izoliatų skaičius

Fig. 9. Distribution of *F. graminearum* 15ADON and 3ADON chemotype strains in Kedainiai district in spring wheat fields in 2014 and, n - number of isolates tested



10 pav. *F. graminearum* 15ADON ir 3ADON chemotipų kamienu pasiskirstymas Šakių rajono dviejuose gretimuose vasarinių kviečių pasėliuose 2014 ir 2015 m., n – tirtų izoliatų skaičius.

Fig. 10. Distribution of *F. graminearum* 15ADON and 3ADON chemotype strains in the two neighboring summer wheat crops in Šakiai district in 2014 and 2015 year, n - number of isolates tested.

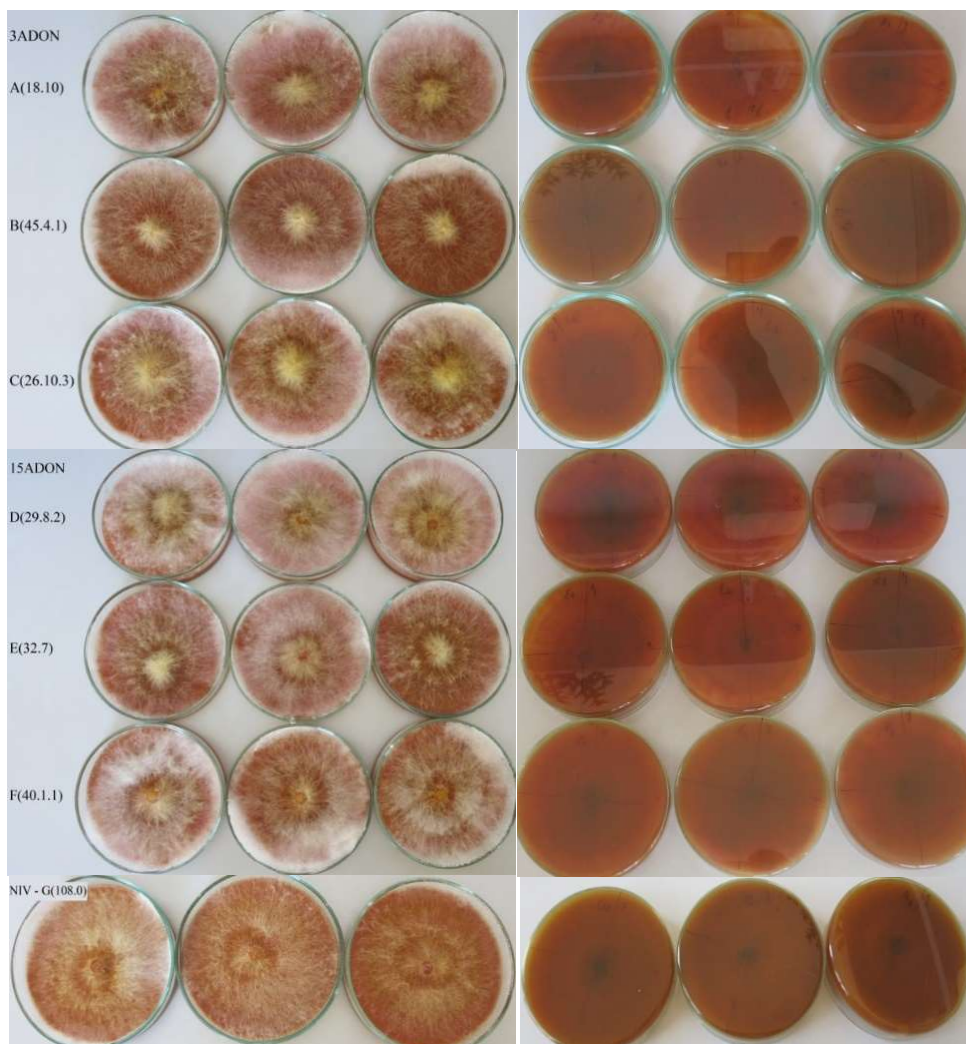
Apibendrinimas

2014 ir 2015 m. tirtuose skirtingose Lietuvos vietose išsidėsčiusiuose vasarinių kviečių laukuose nustatėme, kad vidutiniškai tarp visų iš varpų išskirtų *F. graminearum* izoliatų dominavo 15ADON producentai, kurie sudarė vid. 70 %. 3ADON producentų aptikta beveik 2 kartus mažiau – 30 %. NIV producentų neaptikta, panašiai kaip Vokietijoje, kur iš 338 *F. graminearum* izoliatų aptikti tik keturi NIV produkuojantys izoliatai (Talas ir kt., 2011). Šie tyrimai patvirtina 2013–2014 metais mūsų atliktų tyrimų rezultatus, kurie aptarti 3.2 skyriuje, kad vasariniuose kviečiuose dominuoja 15ADON chemotipo *F. graminearum* kamienai. Savo tyrimuose pastebėjome, kad *F. graminearum* chemotipų struktūra įvairavo ne tik tarp tyrimo metų ir skirtingų rajonų, bet ir vietovių bei gretimų laukų. Talas ir kt. (2011) kaip ir mes savo tyrimuose rinko varpų fuzariozės pažeistas varpas iš skirtingų Vokietijos vietovių, tačiau jų tyrimų duomenys, priešingai nei mūsų, rodo, kad *F. graminearum* chemotipų struktūra buvo gana panaši visose vietovėse. *F. graminearum* chemotipų struktūros svyravimai atskirais tyrimų metais išryškinti Nielsen ir kt. (2012) atliktuose tyrimuose Danijoje. Jie nustatė, kad visų rūšių javų grūduose surinkuose 1957–2000 metais dominavo 3ADON chemotipas, o 15ADON producentų dominavimas prasidėjo po 2000. Įdomu tai, kad 2003–2007 metais surinktuose miežių, rugių, kvietrugių ir avižų mėginiuose 3ADON chemotipas vis dar buvo vyraujantis ir tik kviečių grūduose šiuo laikotarpiu jau stebimas 15ADON producentų dominavimas. Remiantis literatūros analize, tikėtina, kad mūsų pastebėti skirtumai tarp atskirų vietovių yra įtakoti ne tik meteorologinių sąlygų, bet ir pirminio infekcijos šaltinio (sėklų ir augalinių liekanų užkrėstumo), agrotecheninių bei varpų fuzariozės kontrolės priemonių.

3.4. Skirtingų chemotipų izoliatų morfologiniai ir fenotipiniai požymiai, jautrumas fungicidams ir patogeniškumas kviečiams *in vitro*

3.4.1. Skirtingų chemotipų izoliatų morfologiniai ir fenotipiniai požymiai

F. graminearum 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų kolonijų morfologiniai požymiai (micelio struktūra, kolonijos spalva iš viršaus ir apačios) vertinti ant PDA terpės (11 pav.) Skirtingų chemotipų izoliatų micelio spalva ir struktūra nesiskyrė. Kolonijų augimo greitis vertintas ant trijų terpių (bulvių dekstrozės terpės – PDA, specializuotos mitybos terpės – SNA ir morkų agarų terpės – MA) bei trijose skirtingose temperatūrose (15 °C, 20 °C ir 25 °C). Greičiausiai kolonijos augo ant MA terpės lėčiausiai ant SNA (8 lentelė). Kolonijų augimo greitis didėjo kylant inkubavimo temperatūrai. Vidutiniais tyrimų duomenimis spartesniu augimu išsiskyrė *F. graminearum* 3ADON chemotipo kamienas B (45.4.1) ir 15ADON chemotipo kamienas F (40.1.1) 25 °C temperatūroje.



11 pav. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų kolonijų morfologiniai požymiai. Kolonijos augintos ant PDA terpės 25 °C temperatūroje 7 dienas

Fig. 11. *Morphological features of F. graminearum 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains colonies. Colonies were grown on a PDA medium at 25 °C for 7 days*

Makrokonidijų ilgis ir plotis matuotas šeštą dieną kolonijose augintose ant specializuotos mitybos terpės +25 °C tamsoje. Ilgiausiomis konidijomis pasižymėjo NIV chemotipo *F. graminearum* izoliatas G (108.0) bei 15ADON chemotipo izoliatai E (32.7) ir F (40.1.1) (9 lentelė), storiausiomis - NIV chemotipo izoliatas G (108.0) ir 3ADON chemotipo izoliatas A (18.10).

8 lentelė. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų kolonijų augimo greitis (vidutinis kolonijos skersmens padidėjimas per parą, cm) priklausomai nuo mitybos terpės ir inkubavimo temperatūros

Table 8. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains colonies growth rate (mean increase in colony diameter per day, cm) depending on nutrient medium and incubation temperature

Tyrimo variantai / Research options		PDA				SNA				MA			
		I	II	III	Vid/ Avg	I	II	III	Vid/ Avg	I	II	III	Vid/ Avg
15°C													
3ADON	18.10	0,2	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	1,0	1,0	1,0	1,0
	45.4.1	0,5	0,6	0,5	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	26.10.3	0,6	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	1,0	1,0	0,9	1,0
15ADON	29.8.2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,1	0,2	1,1	1,1	1,2	1,1
	32.7	0,5	0,4	0,5	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	40.1.1	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,2	0,3	0,3	1,1	1,1	1,1	1,1
NIV	108.0	0,7	0,4	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	1,1	1,1	1,1	1,1
20°C													
3ADON	18.10	1,2	1,2	1,2	1,2	0,9	0,8	0,9	0,9	1,9	1,9	1,9	1,9
	45.4.1	1,1	1,3	1,1	1,2	1,0	1,2	0,9	1,0	1,8	1,8	1,8	1,8
	26.10.3	0,8	1,0	0,9	0,9	0,5	0,6	0,5	0,5	1,9	1,8	1,8	1,8
15ADON	29.8.2	0,8	1,1	0,9	0,9	0,5	0,6	0,5	0,5	1,8	1,8	1,8	1,8
	32.7	1,0	1,2	1,0	1,1	0,7	1,4	1,0	1,0	2,1	2,1	2,1	2,1
	40.1.1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	2,0	2,6	2,0	2,2
NIV	108.0	0,6	0,8	0,9	0,8	1,0	0,8	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0
25°C													
3ADON	18.10	1,0	0,5	0,5	0,7	1,4	1,2	1,0	1,2	2,2	2,2	2,3	2,2
	45.4.1	0,9	1,3	1,4	1,2	1,6	2,0	1,1	1,6	1,9	2,0	2,0	2,0
	26.10.3	0,6	0,9	0,7	0,7	1,5	1,3	1,3	1,4	2,2	2,2	2,2	2,2
15ADON	29.8.2	1,3	1,3	0,9	1,2	1,1	1,4	1,0	1,2	2,0	2,0	2,0	2,0
	32.7	1,0	1,1	1,3	1,1	0,9	1,0	0,8	0,9	2,0	2,1	2,1	2,1
	40.1.1	1,5	1,3	1,3	1,4	1,3	1,6	1,2	1,4	2,4	2,3	3,4	2,7
NIV	108.0	1,8	1,4	1,4	1,5	0,7	0,7	0,9	0,8	2,7	2,7	2,8	2,7
Veiksny A (terpės) / Factor A (medium)				F=797,78**					P=0,000000				
Veiksny B (temperatūros) / Factor B (temperature)				F=624,27**					P=0,000000				
Veiksny C (izoliatai) / Factor C (isolates)				F=10,76**					P=0,000000				
Sąveika AxB / Interaction AxB				F=19,19**					P=0,000000				
Sąveika AxC / Interaction AxC				F=4,18**					P=0,000017				
Sąveika BxC / Interaction BxC				F=4,47**					P=0,000006				
Sąveika ABC / Interaction ABC				F=5,16**					P=0,000000				

.*.* žymi statistinį patikimumą ($p < 0,01$)

** denotes statistical reliability ($p < 0.01$)

Tirtas *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų izoliatų gebėjimas įsisavinti skirtingus anglies ir azoto šaltinius. Tirti du 3ADON chemotipo izoliatai A (kamienas 18.10) ir B (45.4.1), 15ADON chemotipo izoliatas D (40.1.1) ir NIV chemotipo izoliatas G (108). Anglies ir azoto šaltiniais pasirinktos komercinės Biolog Phenotype Microarray 96 šulinėlių fenotipavimo mikroplokštelės PM1, PM2A (abi su skirtingais anglies šaltiniais) ir PM3B (su skirtingais azoto šaltiniais).

9 lentelė. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų makrokonių ilgis ir plotis matuotas 6 dienas ant SNA terpės +25 laipsnių temperatūroje tamsoje augintose kolonijose.

Table 9. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains macroconidia length and width measured after 6 days on SNA medium at +25 ° C in dark grown colonies

Tyrimo variantai / Research options		Konidijų ilgis / Length of conidia	Konidijų plotis / Width of conidia
3ADON	A 18.10	43,43	5,29*
	B 45.4.1	40,92**	4,69*
	C 26.10.3	39,68**	4,55**
15ADON	D 29.8.2	37,99**	4,74
	E 32.7	45,52*	4,69*
	F 40.1.1	46,73**	5,63**
NIV	G 108.0	47,92**	5,23
Vid. / Avg.		43,17	4,98
F _{akt}		12,96**	8,22**
P		0,000000	0,000000

* - statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,05$ tikimybės lygiu, ** - statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,01$.

* - statistically significant differences $p \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $p \leq 0.01$

Tyrimų rezultatai pateikiami 1 priede. Šio tyrimo metu nustatyta, kad *F. graminearum* chemotipas aiškios įtakos mikromiceto metaboliniam aktyvumui neturi – abu 3ADON chemotipo kamienai tarpusavyje nebuvo panašesni, nei su 15ADON ir NIV chemotipų kamienais.

Apibendrinimas

Mūsų tyrmuose tirti *F. graminearum* izoliatų morfologiniai požymiai: kolonijų struktūra, spalva, augimo greitis ir konidijų dydis, rodo, kad ryšių tarp grybo chemotipo ir morfologinių požymių nėra. Liu ir kt. (2017) taip pat nustatė, kad 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų morfologiniai požymiai esmingai nesiskyrė. Tačiau Norvegijoje atlikti tyrimai parodė, kad vidutiniais duomenimis 3ADON chemotipo izoliatai pasižymėjo greitesniu augimu (Aamot ir kt., 2015). Kanadoje atliktuose tyrmuose nustatyta, kad *F. graminearum* 3-ADON chemotipo kamienai gausiau sporuliuoja, suformuoja didesnes makrokonidijas bei pagamina didesnę DON kiekį nei 15-ADON chemotipo kamienai (Ward ir kt., 2008). Kinijoje pastebėta, kad *F. graminearum* kompleksui priskiriamos rūšies – *F. asiaticum* 3-ADON chemotipo kamienai pakeitė NIV chemotipo kamienus ir produkavo daugiau ir didesnių konidijų bei kolonijos pasižymėjo greitesniu augimu (Zhang ir kt., 2010, 2012). Šie autoriai manė, kad stebimi fenotipiniai skirtumai gali suteikti populiacijoms pranašumą, didinant išplitimo arealą ir keičiant populiacijos struktūrą.

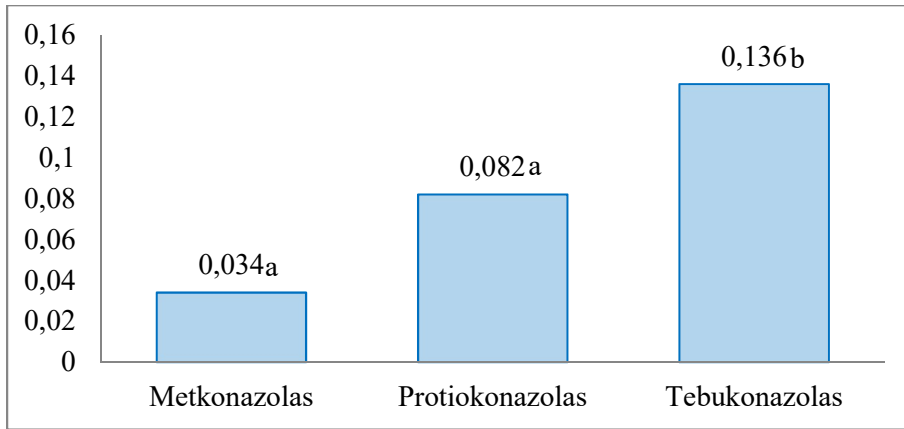
Tyrimo metu pastebėjome, kad kai kurių *F. graminearum* izoliatų micelio spalva šiek tiek kito nuo šviesiai oranžinės iki geltonos ir nuo raudonai rudos iki oranžinės, kuri kaip pastebi Leslie ir Summerell (2006) gali varijuoti priklausomai nuo terpės pH.

F. graminearum maistinių medžiagų metabolizmo apibūtinimas atskleidė potencialius trichotecenų biosintezės induktorius (Gardiner ir kt., 2009). Nustatyta, kad augalų arginino-poliamino biosintezės proceso produktai gali turėti įtakos trichoteceno biosintezės atsiradimui infekcijos metu. Savo tyrime norėjome nustatyti ar pagal skirtingų anglies ir azoto šaltinių metabolizmą galima diferencijuoti *F. graminearum* chemotipus. Tačiau tyrimų metu nustatyta, kad *F. graminearum* chemotipas įtakos metaboliniam aktyvumui neturi – pagal skirtingų šaltinių įšavinimą abu 3ADON chemotipo kamienai tarpusavyje nebuvo panašesni, nei su 15ADON ir NIV chemotipų kamienais. Publikuotų panašių tyrimų aptikti nepavyko.

3.4.2. Skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienų jautrumas fungicidams *in vitro*

In vitro tyrimai parodė, kad visi tirti *F. graminearum* izoliatai buvo jautriausi metkonazolo poveikiui, vidutinė minimali inhibuojanti koncentracija (MIK) 0,03 μM , atspariausi – tebukonazolui, vidutinė MIK 0,14 μM . Jautrumas protiokonazolui buvo tarpinis, vidutinė MIK 0,1 μM (12 pav.). Tirti izoliatai išsiskyrė pagal jautrumą atskiriems fungicidams, bet visais atvejais išliko ta pati jautrumo tendencija – visų *F. graminearum* kamienų metkonazolo MIK buvo mažiausia, tebukonazolo didžiausia. Protiokonazolo MIK 4 iš 7 tyrimo variantų buvo lygi tebukonazolo MIK, viename variante – lygi metkonazolo MIK, ir dviem atvejais tarpinė tarp metkonazolo ir tebukonazolo.

MIK, μM



12 pav. *F. graminearum* micelio augimą inhibuojanti minimali skirtingų fungicidų koncentracija (MIK)

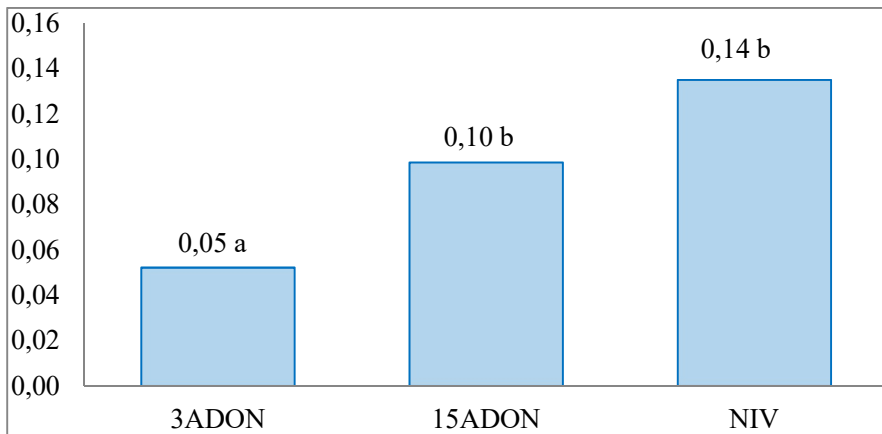
Fig. 12. Minimum inhibitory concentration (MIC) of different fungicide inhibiting *F. graminearum* mycelium growth

*Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,01$).

*Different letters indicate the essential differences between the variations ($p < 0.01$)

15ADON chemotipo izoliatai vidutiniškai buvo atsparesni visiems fungicidams už 3ADON chemotipo izoliatus. NIV chemotipo *F. graminearum* 108 kamieno fungicidų MIK buvo didesnės už 3ADON ir artimos 15ADON (13 pav.). Atskirų *F. graminearum* kamienų MIK nustatymo mikroplokštelių vaizdai pateikti 14 pav. a–g. Raudona linija žymi kiekvieno fungicido MIK ribą (pagal 15 pav.).

MIK, μM

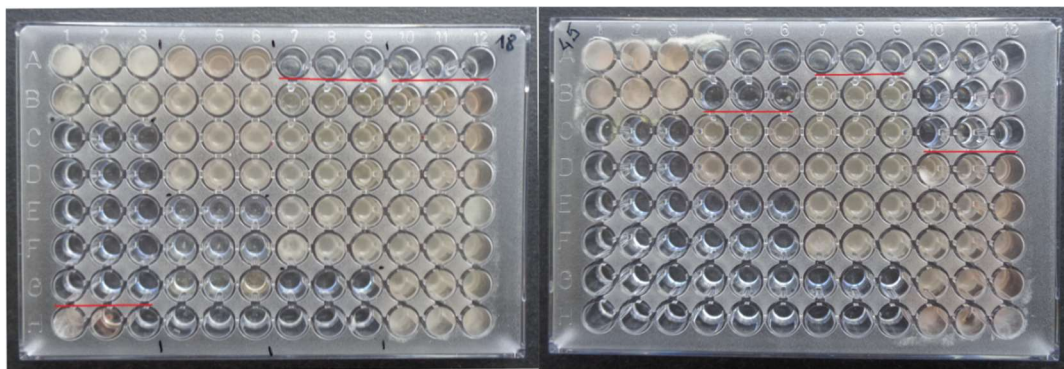


13 pav. Fungicidų minimali inhibuojanti koncentracija (MIK) skirtingų *F. graminearum* chemotipų kamienams

Fig. 13. Minimum inhibitory concentration (MIC) fungicides for different *F. graminearum* chemotype strains

*Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,01$).

*Different letters indicate the essential differences between the variations ($p < 0.01$)



14 a ir b pav. Metkonazolo, protiokonazolo ir tebukonazolo minimali inhibuojanti koncentracija (MIK) *F. graminearum* 3ADON chemotipo kamienams 18.10 ir 45.4.1

Fig. 14 a and b. Minimum inhibitory concentration (MIC) of metconazole, prothioconazole and tebuconazole to *F. graminearum* 3ADON chemotype strains 18.10 and 45.4.1



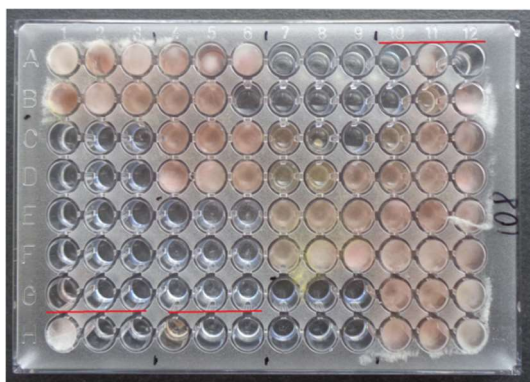
14 c ir d pav. Fungicidų MIK *F. graminearum* kamienams 26.10.3 (3ADON chemotipas) ir 29.8.2 (15ADON chemotipas)

Fig. 14 c and d. MIC of fungicides to *F. graminearum* strains 26.10.3 (3ADON chemotype) and 29.8.2 (15ADON chemotype)



14 e ir f pav. Fungicidų MIK *F. graminearum* 15ADON chemotipas kamienams 32.7 ir 40.1.1

Fig. 14 e and f. MIC of fungicides to *F. graminearum* 15ADON chemotype strains 32.7 and 40.1.1



14 g pav. Fungicidų MIK *F. graminearum* NIV chemotipo kamienui 108
Fig. 14 g. MIC of fungicides to *F. graminearum* NIV chemotype strain 108

Apibendrinimas

Tebukonazolas, metkonazolas ir protiokonazolas yra naudojami javų apsaugai nuo varpų fuzariozės. Protiokonazolas pasižymi ypač geru efektyvumu, naudojamas ir Lietuvoje, ir kaimyninėse valstybėse – Latvijoje ir Lenkijoje. Pastaraisiais metais pasaulyje atsiranda nuomonių, kad tebukonazolo efektyvumas lauko sąlygomis prieš varpų fuzariozės sukėlėjus darosi nepakankamas (McMullen et al., 2012). *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų jautrumo metkonazolui, protiokonazolui ir tebukonazolui *in vitro* tyrimai parodė, kad visi septyni tirti *F. graminearum* izoliatai buvo jautrūs naudotiems fungicidams, tačiau jautriausi jie buvo metkonazolo poveikiui, vidutinė minimali inhibuojanti koncentracija (MIK) 0,03 μM , atspariausi – tebukonazolui, vidutinė MIK 0,14 μM . Jautrumas protiokonazolui buvo tarpinis, vidutinė MIK 0,1 μM . Mūsų tyrimuose tirti izoliatai išsiskyrė pagal jautrumą skirtingiems fungicidams, bet visais atvejais išliko ta pati jautrumo tendencija – visų *F. graminearum* kamienų metkonazolo MIK buvo mažiausia, tebukonazolo didžiausia. Ivic ir kt. (2011) tyrimai taip pat parodė, kad metkonazolo MIK reikšmė buvo mažesnė už tebukonazolo. Šiuos tyrimuose efektyviausiai *F. graminearum* augimą slopino prochloralazas. Vidutiniais duomenimis, 15ADON chemotipo izoliatų augimui slopinti reikėjo didesnės tirtų veikliųjų medžiagų koncentracijos nei 3ADON chemotipo izoliatams. Japonijoje atlikti tyrimai su didesniu izoliatų skaičiumi nei naudota mūsų tyrimuose parodė, kad metkonazolo MIK reikšmės buvo panašios abiem *F. graminearum* ir *F. asiaticum* rūšims, o skirtumai tarp 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų buvo statistiškai nepatikimi (Tateishi ir kt., 2010).

3.4.3. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumas skirtingų veislių žieminiams ir vasariniams kviečiams *in vitro*

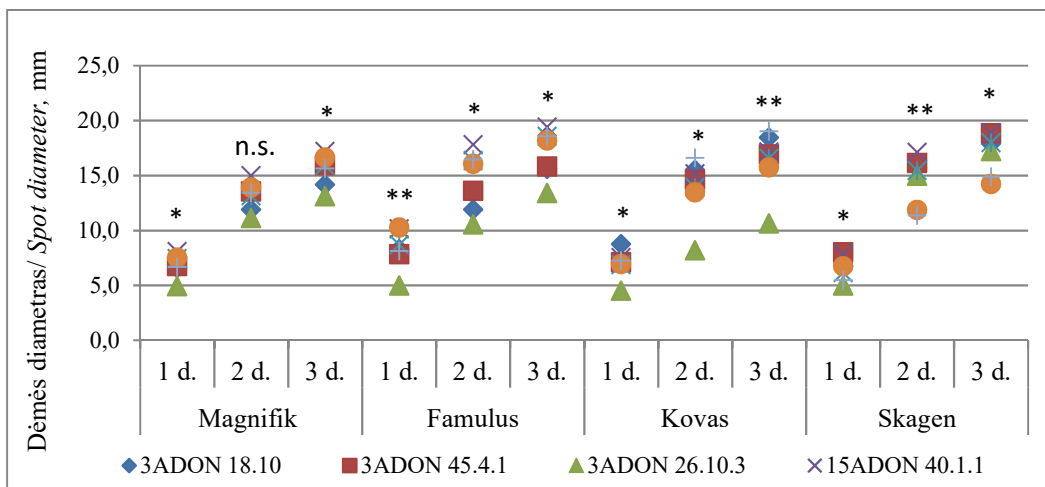
F. graminearum skirtingų chemotipų kamienų patogeniškumas *in vitro* įvertintas naudojant atskirtų lapelių testą. Keturių žieminių kviečių veislių ir penkių vasarinių kviečių veislių lapeliai inokuliuoti vienu metu. Chlorozės (daugeliu atveju ir nekrozės) dėmės (tamsios, ovalios formos vandeningos dėmės) pasirodė po 24 val. nuo užkrėtimo (15 pav.).



15 pav. *F. graminearum* infekcijos požymiai ant infekuotų kviečių lapų po 24 val. nuo užkrėtimo

Fig. 15. Symptoms of *F. graminearum* infection on infected wheat leaves after 24 hours from infection

Visi *F. graminearum* izoliatai iniciavo nekrozės pažeidimų atsiradimus tirtiems žieminių ir vasarinių kviečių augalų lapeliams. Ant kontrolinių lapelių – inokuliuotų vandeniu – nekrozė neišsivystė. Skirtingų chemotipų patogeniškumas žieminiams kviečiams buvo panašus, tačiau pastebėti skirtumai tarp tų pačių chemotipų skirtingų izoliatų (16 pav.). Mažiausiu patogeniškumu žieminiams kviečiams pasižymėjo 3ADON chemotipo 26.10.3 kamienas, tarp kitų izoliatų patogeniškumo statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta (16 pav., 10 lentelė).



16 pav. Skirtingų žieminių kviečių veislių atsparumas *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų infekcijai. * – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,05$ tikimybės lygiu, ** – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,01$

Fig. 16. The resistance of different winter wheat varieties to the infection of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains. * - statistically significant differences $p \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $p \leq 0.01$

10 lentelė. *F. graminearum* chemotipų kamienų įtaka žieminių kviečių lapelių pažeidimui

Table 10. Influence of *F. graminearum* chemotype strains on winter wheat leaf damage

Chemotipas/ <i>Chemotype</i>	Kamienas / <i>Strain</i>	Dėmių diametras / <i>Diameter of spots, mm</i>		
		24 val. po užkrėtimo / 24 h <i>after inoculation</i>	48 val. po užkrėtimo / 48 h <i>after inoculation</i>	72 val. po užkrėtimo / 72 h <i>after inoculation</i>
3ADON	18.10	7,6 bcd	13,8 b	16,5 bcd
	45.4.1	7,5 bcd	14,5 bcd	16,9 bcd
	26.10.3	4,9 a	11,2 a	13,6 a
15ADON	40.1.1	8,4 d	16,3 d	18,2 d
	32.7	7,3 bcd	14,7 bcd	17,3 bcd
	29.8.2	7,9 bcd	13,8 b	16,2 b
NIV	108	6,9 b	14,5 bcd	17,1 bcd

Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,05$).

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

Nekrozės dėmių plitimas ant žieminių kviečių lapelių priklausė nuo veislės (11 lentelė). Praėjus 24 val. nuo *F. graminearum* infekcijos didžiausios pažeidimų dėmės nustatytos ant žieminių kviečių veislės ‘Famulus’ lapelių, tačiau per kitas dvi dienas pažeidimai ant šios veislės lapelių beveik susilygino su ‘Skagen’ ir ‘Kovas DS’ veislių. Atspariausi *F. graminearum* infekcijai išliko ‘SW Magnifik’ lapeliai.

11 lentelė. Žieminių kviečių genotipo įtaka *F. graminearum* infekcijos sukeltiems pažeidimams

Table 11. Influence of winter wheat genotype on damages caused by *F. graminearum* infection

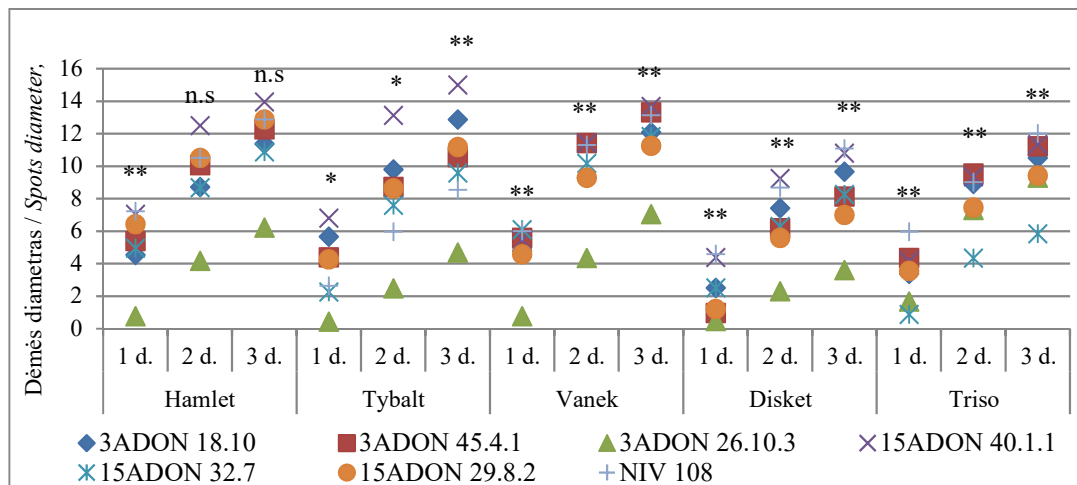
Veislė / <i>Variety</i>	Dėmių diametras / <i>Diameter of spots, mm</i>		
	24 val. po užkrėtimo / 24 h <i>after inoculation</i>	48 val. po užkrėtimo / 48 h <i>after inoculation</i>	72 val. po užkrėtimo / 72 h <i>after inoculation</i>
SW Magnifik	6,9 a	13,2 a	15,5 a
Famulus	8,4 b	14,7 c	17,1 bc
Kovas DS	7,0 a	13,9 abc	16,4 abc
Skagen	6,6 a	14,7 abc	17,2 c

Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,05$).

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

Vasariniuose kviečiuose pažeidimų dėmių skirtumai taip pat išryškėjo tarp atskirų izoliatų, bet ne tarp chemotipų (17 pav., 12 lentelė). Taip pat kaip ir žieminiuose mažiausias

pažeidimų dėmės ant lapelių suformavo 3ADON 26.10.1 kamienas, išskirtinai didžiausias dėmės suformavo 15ADON kamienas 40.1.1.



17 pav. Skirtingų vasarinių kviečių veislių atsparumas *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų infekcijai. * ir ** – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,05$ ir $p \leq 0,01$ tikimybės lygiu

Fig. 17. The resistance of different spring wheat varieties to the infection of *F. graminearum* 3ADON, 15ADON and NIV chemotype strains. * and ** - statistically significant differences at $p \leq 0,05$ and $p \leq 0,01$

12 lentelė. *F. graminearum* chemotipų įtaka vasarinių kviečių lapelių pažeidimui

Table 12. Influence of *F. graminearum* chemotype on spring wheat leaf damage

Chemotipas / Chemotype	Kamienas / Strain	Dėmių diametras / Diameter of spots, mm		
		24 val. po užkrėtimo / 24 h after inoculation	48 val. po užkrėtimo / 48 h after inoculation	72 val. po užkrėtimo / 72 h after inoculation
3ADON	18.10	4,2 bcd	8,8 c	11,3 cd
	45.4.1	4,1 bcd	9,2 c	11,1 cd
	26.10.3	0,8 a	4,1 a	6,2 a
15ADON	40.1.1	5,6 d	11,1 d	13,0 e
	32.7	3,3 b	7,4 b	9,3 b
	29.8.2	4,0 bcd	8,3 bc	10,3 bc
NIV	108	5,3 bcd	9,1 c	11,5 d

Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,05$)

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

Tarp vasarinių kviečių genotipų atsparumo *F. graminearum* infekcijai, taip pat nustatyti statistiškai patikimi skirtumai. Mažiausios (vid. 8,4 mm) pažeidimų dėmės

susiformavo ant 'Diskett' veislės lapelių, didžiausios (11,8 mm) ant 'Vanek' veislės lapelių (13 lentelė).

13 lentelė. Vasarinių kviečių genotipo įtaka *F. graminearum* infekcijos sukeltiems pažeidimams

Table 13. Influence of spring wheat genotype on damages caused by *F. graminearum* infection

Veislė / <i>Variety</i>	Dėmių diametras / <i>Diameter of spots, mm</i>		
	24 val. po užkrėtimo / <i>24 h after inoculation</i>	48 val. po užkrėtimo / <i>48 h after inoculation</i>	72 val. po užkrėtimo / <i>72 h after inoculation</i>
Hamlet	5,2 e	10,0 d	11,5 cd
Tybalt	3,8 bc	8,0 b	10,3 bcd
Vanek	4,8 cde	9,6 d	11,8 d
Diskett	2,4 a	6,5 a	8,4 a
Triso	3,4 ab	8,0 b	9,9 b

Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,05$).

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

Apibendrinimas

Atlikus *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumo skirtingų veislių žieminiams ir vasariniams kviečiams *in vitro* tyrimą nustatyta, kad nekrozės dėmių plitimas ant lapelių esmingai priklausė nuo žieminių ir vasarinių kviečių genotipo. Tačiau skirtingų chemotipų patogeniškumas žieminiams ir vasariniams kviečiams pasireiškė panašiai – skirtumai išryškėjo tarp atskirų izoliatų, bet ne tarp chemotipų. Žieminiuose ir vasariniuose kviečiuose mažiausias pažeidimų dėmes ant lapelių suformavo 3ADON 26.10.1 kamienas, didžiausias – 15ADON kamienas 40.1.1. Liu ir kt. 2017 tyrimais nustatė, kad tarp *F. graminearum* 3ADON ir 15ADON chemotipų kamienų agresyvumo kviečiams esminių skirtumų nebuvo, tačiau tirto NIV chemotipo patogeniškumas buvo esmingai mažesnis. Šiaurės Amerikoje ir Kanadoje atlikti tyrimai rodo, kad 3ADON chemotipo *F. graminearum* izoliatai yra fitotoksiškesni, patogeniškesni ir agresyviau pažeidžia kviečių daigelius ir intensyviau gamina deoksisvalenolį negu 15ADON izoliatai (Ward ir kt. 2008; Von der Ohe ir kt., 2010). Paskiausi tyrimai Norvegijoje parodė, kad vidutiniais duomenimis 15ADON chemotipo izoliatai – didesniu agresyvumu kviečiams nei 3ADON chemotipo (Aamot ir kt., 2015). Kinijoje taip pat pastebėta, kad *F. graminearum* kompleksui priskiriamos rūšies – *F. asiaticum* 3-ADON chemotipo kamienai buvo agresyvesni kviečiams nei NIV chemotipo (Zhang ir kt., 2010, 2012).

3.4.4. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumas skirtingų veislių vasariniams kviečiams *in vivo*

F. graminearum chemotipų patogeniškumas lauko sąlygomis vertintas vasarinių kviečių veislėse ‘Diskett’ ir ‘Tybalt’. Tyrimai parodė, kad tirti *F. graminearum* izoliatai, nepriklausomai nuo chemotipo, padidino varpų fuzariozės išplitimą ir intensyvumą, vizualiai matomų *Fusarium* – pažeistų ir *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekį bei turėjo neigiamos įtakos ‘Diskett’ veislės 1000 grūdų masei (14 ir 15 lentelės).

14 lentelė. Varpų fuzariozės (VF) išplitimas, intensyvumas ir *Fusarium* – pažeistų grūdų skaičius (%) vasariniuose kviečiuose 2015 m.

Table 14. Incidence and severity of *Fusarium* head blight (FHB) and number of *Fusarium* - damaged grains (%) in spring wheat in 2015 year

Tyrimo variantai / Treatments		VF išplitimas, % / FHB incidente, %		VF intensyvumas, % / FHB severity, %		VF pažeistų grūdų, % / FHB damaged grain, %	
		‘Diskett’	‘Tybalt’	‘Diskett’	‘Tybalt’	‘Diskett’	‘Tybalt’
Kontrolė/ Control	Nekrėsta/ not infected	15,3 a	14,7 a	0,5 a	0,4 a	0,0 a	0,1 a
3ADON	A (18.10)	44,0 d	27,3 b	23,5 bcd	6,7 b	2,1 bc	2,2 bcd
	B (45.4.1)	42,7 cd	38,0 cde	26,1 cd	13,1 d	2,8 bc	3,0 cd
	C (26.10.3)	40,0 bcd	46,0 e	22,2 bcd	15,9 d	3,1 bc	3,1 d
15ADON	D (40.1.1)	41,3 cd	32,7 bc	25,1 cd	7,8 b	2,3 bc	2,6 cd
	E (32.7)	31,3 b	29,3 bc	19,9 bcd	7,7 b	2,7 bc	2,2 bcd
	F (29.8.2)	44,0 cd	33,3 bc	26,2 d	6,9 b	3,1 c	2,8 cd
NIV	G (108)	34,0 bcd	34,7 bc	15,6 b	7,1 b	1,4 abc	1,4 b

Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,05$)

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

Didesniu agresyvumu VF išplitime ir intensyvume ‘Tybalt’ veislėje pasižymėjo 3ADON chemotipo kamienai 26.10.3 ir 45.4.1 (15 lentelė). ‘Diskett’ veislėje esminių skirtumų tarp varpų fuzariozės pasireiškimo neišryškėjo, tačiau 1000 grūdų masę statistiškai patikimai mažino visi trys 3ADON chemotipo kamienai bei 15ADON kamienas 40.1.1.

Apibendrinimas

F. graminearum 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumo kviečiams *in vivo* tyrimu nustatyta, kad visi *F. graminearum* izoliatai, nepriklausomai nuo chemotipo, padidino varpų fuzariozės išplitimą ir intensyvumą, *Fusarium* – pažeistų ir *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekį bei turėjo neigiamos įtakos ‘Diskett’ veislės 1000 grūdų masei. Tačiau skirtumai labiau išryškėjo tarp atskirų izoliatų, o ne tarp chemotipų. Von der Ohe ir kt., 2010 tyrimais nustatė, 3ADON chemotipo, *F. graminearum* izoliatai kelia didesnę riziką maisto saugai, tačiau 3ADON ir 15ADON vidutinis agresyvumas ir chemotipų gamyba buvo panašūs.

15 lentelė. Vasarinių kviečių ‘Diskett’ ir ‘Tybalt’ veislių užkrėtimo 3ADON, 15ADON ir NIV *F. graminearum* chemotipų kamienais įtaka *Fusarium* spp. ir *F. graminearum* infekuotų grūdų kiekiui bei 1000 grūdų svoriui, 2015 m.

Table 15. Influence of infection of 3ADON, 15ADON and NIV *F. graminearum* chemotype strains on spring wheat ‘Diskett’ ir ‘Tybalt’ grain infection with *Fusarium* spp. and *F. graminearum* and 1000 grain weight, in 2015 year

Tyrimo variantai / Treatments		Infekuotų grūdų kiekis / Grain infection %				1000 grūdų svoris, g / 1000 grain weight, g	
		<i>Fusarium</i> spp.		<i>F. graminearum</i>			
		‘Diskett’	‘Tybalt’	‘Diskett’	‘Tybalt’	‘Diskett’	‘Tybalt’
Kontrol/ Control	Nekrėsta/ Not infected	10,0 a	2,7 a	6,0 a	2,0 a	39,5 c	44,4 abc
3ADON	A (18.10)	32,7 b	28,0 bcd	27,3 bc	24,7 bcde	37,4 a	45,4 c
	B (45.4.1)	28,7 b	35,3 bcd	25,3 bc	33,3 de	37,0 a	44,1 abc
	C (26.10.3)	35,3 b	31,3 bcd	30,0 bc	30,7 cde	37,3 a	43,6 abc
15ADON	D (40.1.1)	38,0 c	37,3 d	31,3 c	35,3 e	36,5 a	44,6 abc
	E (32.7)	24,0 b	31,3 bcd	18,7 abc	29,33 cde	37,5 abc	44,1 abc
	F (29.8.2)	30,7 b	21,3 b	26,7 bc	12,7 ab	37,8 abc	43,0 a
NIV	G (108)	24,0 b	23,3 bcd	20,7 bc	16,0 abc	38,0 abc	45,0 bc

Skirtingos raidės žymi esminius skirtumus tarp variantų ($p < 0,05$)

Different letters indicate the significant differences between the treatments ($p < 0.05$)

3.5. Cheminių ir biologinių kontrolės priemonių efektyvumas prieš dirbtinai lauko sąlygomis inicijuotą varpų fuzariozę kviečiuose

Žieminiai ir vasariniai kviečiai buvo inokuliuoti *F. graminearum* ir buvo panaudoti apsaugos produktai: Metkonazolas, *B. subtilis* kamienų MBK-a3 ir MBK-r4. VF išplitimas ir intensyvumas bei *Fusarium* – pažeistų ir *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekis statistiškai patikimai sumažėjo laukeliuose, kuriuose žieminių ir vasarinių kviečių apsaugai nuo varpų fuzariozės naudotas fungicidas metkonazolas (16, 18 ir 19 lentelės).

Bakterinis preparatas MBK-a3 statistiškai patikimai mažino VF išplitimą ir intensyvumą bei *Fusarium* – pažeistų grūdų kiekį vasarinių kviečių ‘Diskett’ veislėje, VF intensyvumą – vasarinių kviečių ‘Tybalt’ veislėje taip pat *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekį žieminių kviečių ‘SW Magnifik’ veislėje. Bakterinis preparatas MBK-r4 statistiškai patikimai mažino tik *Fusarium* – pažeistų grūdų kiekį ‘Diskett’ veislėje ir *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekį ‘SW Magnifik’ veislėje. Esminį grūdų derliaus padidėjimą sąlygojo tik vasarinių kviečių pasėliuose panaudotas fungicidas metkonazolas (17 ir 20 lentelės).

16 lentelė. Varpų fuzariozės (VF) išplitimas ir intensyvumas (%) žieminių kviečių veislėje ‘SW Magnifik’ pieninės brandos pabaigoje (BBCH 77) bei *Fusarium* – pažeistų ir *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekis (%) po derliaus nuėmimo.

Table 16. *Fusarium head blight (FHB) incidence and severity (%) in the winter wheat ‘SW Magnifik’ at the end of maturity (BBCH 77), Fusarium-damaged and F. graminearum-infected grain (%) after harvest*

Tyrimo variantai / <i>Treatments</i>	VF išplitimas/ <i>FHB incidente, %</i>			VF intensyvumas <i>/ FHB severity, %</i>			<i>Fusarium</i> -pažeistų grūdų / <i>Fusarium</i> - damaged grain, %			<i>F. graminearum</i> -infekuotų grūdų / <i>F. graminearum</i> - infected grain, %		
	2015	2016	Vid. / <i>Avg.</i>	2015	2016	Vid. / <i>Avg.</i>	2015	2016	Vid. / <i>Avg.</i>	2015	2016	Vid. / <i>Avg.</i>
Kontrolė/ <i>Control</i>	32,1	19,85	25,9	8,8	1,8	5,3	0,77	2,54	1,7	18,8	35,8	27,3
Metconazole	26,5	9,3	17,9**	4,1	0,3	2,2**	0,37	0,82	0,6**	3,0	3,5	3,3**
MBK-a3	32,5	21,5	27,0	9,78	1,8	5,8	0,78	2,57	1,7	14,3	24,5	19,4**
MBK-r4	32,3	18,3	25,3	9,0	1,2	5,1	0,74	2,59	1,7	11,3	19,5	15,4**
Vid.	30,8	17,2**		7,9	1,2**		0,7	2,1**		11,8	20,8**	
F metų / <i>F year</i>			**			**			**			**
F variantų / <i>F treatment</i>			**			**			**			**
F metų x variantų / <i>F year x treatment</i>			n.s.			n.s.			**			*

* – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,05$ tikimybės lygiu, ** – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,01$, n.s. – statistiškai nepatikima

* - statistically significant differences $p \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $P \leq 0.01$, n.s. – statistically insignificant

17 lentelė. Fungicido metkonazolo ir *B. subtilis* kamienų MBK-a3 ir MBK-r4 įtaka žieminių kviečių veislės ‘SW Magnifik’ grūdų derliui ir 1000 grūdų svoriui

Table 17. *Influence of fungicide metconazole and B. subtilis strains MBK-a3 and MBK-r4 to winter wheat crop ‘SW Magnifik’ harvest and to 1000 grains weight*

Variantai / <i>Treatment</i>	1000 grūdų svoris/ <i>1000 grain weight, g</i>				Grūdų derlius / <i>Grain yield, t ha⁻¹</i>			
	2015	2016	Vid. / <i>Avg</i>	F variantų / <i>F treatment</i>	2015	2016	Vid. / <i>Avg</i>	F variantų / <i>F treatment</i>
Kontrolė/ <i>Control</i>	36,6	44,4	40,5		9,3	6,1	7,7	
Metconazole	36,6	44,5	40,5	n.s.	9,7	6,2	7,9	n.s.
MBK-a3	36,3	45,8	41,0		9,2	5,9	7,5	
MBK-r4	36,3	45,4	40,8		9,2	5,8	7,5	
Vid. / Avg	36,4	45,0**			9,4	6,0**		
F fakt.	$F_{\text{metų}} / F_{\text{year}}$ **		$F_{\text{metų x variantų}} / F_{\text{year x treatment}}$ n.s.		$F_{\text{metų}} / F_{\text{year}}$ **		$F_{\text{metų x variantų}} / F_{\text{year x treatment}}$ n.s.	

* – statistiškai patikimi skirtumai $P \leq 0,05$ tikimybės lygiu, ** – statistiškai patikimi skirtumai $P \leq 0,01$, n.s. – statistiškai nepatikima. * - statistically reliable differences $P \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $P \leq 0.01$, n.s. – statistically unreliable.

18 lentelė. Varpų fuzariozės (VF) išplitimas ir intensyvumas (%) vasarinių kviečių veislėje ‘Tybalt’ pieninės brandos pabaigoje (BBCH 77).

Table 18. *Fusarium head blight (FHB) incidence and severity (%) in the spring wheat crop ‘Tybalt’ at the end of maturity (BBCH 77).*

Tyrimo variantai / <i>Treatments</i>	VF išplitimas/ <i>FHB incidente, %</i>			VF intensyvumas/ <i>FHB severity, %</i>		
	2015	2016	Vid./ Avg	2015	2016	Vid. / Avg
Kontrolė / <i>Control</i>	36,7	38,8	37,7	11,3	3,5	7,4
Metconazole	25,3	30,5	27,9*	3,7	1,9	2,8**
MBK-a3	32,0	35,5	33,8	5,9	2,7	4,3**
MBK-r4	38,0	31,8	34,9	10,0	2,2	6,1
Vid. / Avg	33,0	34,1		7,7	2,6	
$F_{metų} / F_{year}$	n.s.			**		
$F_{variantų} / F_{treatment}$	*			**		
$F_{metų \times variantų} / F_{year \times treatment}$	n.s.			**		

* – statistiškai patikimi skirtumai $P \leq 0,05$ tikimybės lygiu, ** – statistiškai patikimi skirtumai $P \leq 0,01$, n.s. – statistiškai nepatikima. * - statistically significant differences $P \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $P \leq 0.01$, n.s. – statistically insignificant

19 lentelė. Varpų fuzariozės (VF) išplitimas ir intensyvumas (%) vasarinių kviečių veislėje ‘Diskett’ pieninės brandos pabaigoje (BBCH 77) bei *Fusarium* – pažeistų ir *F. graminearum* – infekuotų grūdų kiekis (%) po derliaus nuėmimo

Table 19. *Fusarium head blight (FHB) incidence and severity (%) of the spring wheat ‘Diskett’ at the end of maturity (BBCH 77). Fusarium-damaged and F. graminearum-infected grain (%) after harvest.*

Tyrimo variantai / <i>Treatment</i>	VF išplitimas/ <i>FHB incidente, %</i>			VF intensyvumas / <i>FHB severity, %</i>			<i>Fusarium</i> -pažeistų grūdų / <i>Fusarium-damaged grain, %</i>			<i>F. graminearum</i> -infekuotų grūdų / <i>F. graminearum-infected grain, %</i>		
	2015	2016	Vid. / Avg	2015	2016	Vid. / Avg	2015	2016	Vid. / Avg	2015	2016	Vid. / Avg
Kontrolė/ <i>Control</i>	48,7	39,5	44,1	28,0	8,1	18,0	1,5	12,4	7,0	36,0	76,0	56,0
Metconazole	25,7	27,3	26,5	7,6	4,1	5,8**	0,2	7,1	3,6**	8,7	51,3	30,0**
MBK-a3	41,0	34,3	37,6*	23,2	6,3	14,8*	0,9	10,2	5,5**	28,7	72,3	50,5
MBK-r4	43,3	36,5	39,9	24,4	8,0	16,2	1,6	8,9	5,2**	32,7	83,0	57,8
Vid. / Avg	39,7	34,4*	37,0	20,8	6,6**	13,7	1,0	9,8	5,3	26,5	70,6**	48,6
$F_{metų} / F_{year}$	n.s.			**			**			**		
$F_{variantų} / F_{treatment}$	**			**			**			**		
$F_{metų \times variantų} / F_{year \times options}$	*			**			**			n.s.		

20 lentelė. Fungicido metkonazolo ir *Bacillus subtilis* kamienų MBK-a3 ir MBK-r4 įtaka vasarinių kviečių veislės 'Diskett' grūdų derliui ir 1000 grūdų svoriui

Table 20. Influence of fungicide metconazole and *Bacillus subtilis* strains MBK-a3 and MBK-r4 to spring wheat 'Diskett' yield and to 1000 grains weight

Variantai / Treatment	1000 grūdų svoris/ 1000 grain weight, g				Grūdų derlius/ Grain yield, t ha ⁻¹			
	2015	2016	Vid. / Avg	F _{variantų / F_{treatment}}	2015	2016	Vid. / Avg	F _{variantų / F_{treatment}}
Kontrolė / Control	38,0	29,7	33,8	n.s.	5,1	5,2	5,1	*
Metconazole	39,0	29,4	34,2					
MBK-a3	38,7	30,5	34,6					
MBK-r4	38,4	29,7	34,1					
Vid. / Avg	38,5	29,8**	34,2		5,2	5,3	5,2	
F _{fakt}	F _{metų / F_{year} **}		F _{metų x variantų / F_{year x options} n.s.}		F _{metų / F_{year} n.s.}		F _{metų x variantų / F_{year x options} *}	

* – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,05$ tikimybės lygiu, ** – statistiškai patikimi skirtumai $p \leq 0,01$, n.s. – statistiškai nepatikima

* - statistically significant differences $p \leq 0.05$, ** - statistically significant differences $p \leq 0.01$, n.s. – statistically insignificant

Apibendrinimas

Cheminių ir biologinių kontrolės priemonių efektyvumo prieš dirbtinai lauko sąlygomis inicijuotą varpų fuzariozę kviečiuose tyrimo metu nustatyta, kad varpų fuzariozės išplitimą, intensyvumą ir pažeistų grūdų kiekį (%) vasariniuose kviečiuose patikimai sumažino apsaugai naudotas tik fungicidas metkonazolas. Priešgrybinis *Bacillus sp.* bakterijų kamienų MBK-a3 ir MBK-r4 aktyvumas buvo nustatytas anstesniuose tyrimuose *in vitro* (Sakalauskas ir kt., 2014). Tačiau, bendrosios šio tyrimo išvados parodė, kad *Bacillus sp.* bakterijų kamienai MBK-a3 ir MBK-r4 negali būti naudojami biokontrolėi prieš *F. graminearum in vivo*, nors bakterinių preparatų poveikis buvo teigiamas, tačiau dažniausiai statistiškai nepatikimas, todėl reikia ieškoti efektyvesnių kamienų. *Bacillus sp.* kamienų potencialas biokontrolėje prieš *Fusarium* grybus buvo pademonstruotas ankstesniuose tyrimuose (Marten ir kt., 2000; Cavaglieri ir kt., 2005; Sun ir kt., 2011; Yuan ir kt., 2012; Prashar ir kt., 2013).

IŠVADOS

1. 2013 ir 2014 m. *Fusarium* grybai pažeidė vidutiniškai 43,0 % vasarinių ir 16,1 % žieminių kviečių grūdų. Iš potencialių DON, 3ADON, 15ADON ir NIV producentų grūduose aptiktos *F. graminearum*, *F. culmorum* ir *F. poae* rūšys. Vasariniuose kviečiuose *F. graminearum* vyravo – aptiktas vidutiniškai 13,7 %, žieminiuose kviečiuose buvo antras – aptiktas 2,2 % grūdų. 2013 m. *F. graminearum* DNR kiekiai vasarinių kviečių grūduose buvo didesni 7,4 karto ($102,2 \text{ pg ng}^{-1}$) nei žieminių kviečių grūduose ($13,9 \text{ pg ng}^{-1}$), o 2014 m. – 3,2 karto.
2. Chemotipavimo tyrimu nustatyta, kad vasarinių kviečių grūduose aptiktų *F. graminearum* izoliatų tarpe 73 % yra potencialūs 15ADON, 26 % – 3ADON ir tik 1 % – NIV producentas. Kiekybinis chemotipų producentų homogenizuotuose grūduose įvertinimas qTL PGR metodu parodė, kad 3ADON aptikimo dažnis yra toks pat didelis (69,8 %), kaip ir 15ADON (78,3 %). Skirtingose Lietuvos vietose išsidėsčiusiuose vasarinių kviečių laukuose *F. graminearum* populiacijos struktūra chemotipų atžvilgiu įvairavo ne tik tarp skirtingų rajonų ir tyrimo metų, bet ir vietovių bei gretimų laukų. Potencialūs 15ADON producentai sudarė vid. 66 %, 3ADON producentai – 34 %, o NIV producentų neaptikta.
3. *F. graminearum* izoliatų morfologinių (kolonijų struktūra, spalva, augimo greitis ir konidijų dydis) ir fenotipinių (gebėjimo įsavinti skirtingus anglies ir azoto šaltinius) požymių rezultatai rodo, kad chemotipas neįtakoja grybo morfologinių požymių ir metabolizmo.
4. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų kamienų patogeniškumo žieminiams ir vasariniams kviečiams tyrimais nustatyta, kad visi tirti izoliatai inicijavo ligos požymius, tačiau skirtumai labiau išryškėjo tarp skirtingų izoliatų, o ne tarp chemotipų. Testus atliekant *in vitro* nekrozės dėmių plitimas ant lapelių esmingai priklausė nuo žieminių ir vasarinių kviečių genotipo. Atlikus tyrimus *in vivo*, nustatyta, kad didesnis vizualiai matomų varpų fuzariozės pažeistų grūdų skaičius ir *F. graminearum* infekcijos lygis buvo užkrėstų vasarinių kviečių grūduose nei neužkrėstų. Veislės ‘Diskett’ vasariniuose kviečiuose nustatyta neigiama *F. graminearum* įtaka grūdų svoriui, ypač 3ADON chemotipo izoliatais užkrėstuose laukeliuose.
5. *F. graminearum* 3ADON, 15ADON ir NIV chemotipų izoliatų jautrumo metkonazolui, protiokonazolui ir tebukonazolui tyrimas *in vitro* parodė, kad mažiausia minimali inhibuojanti koncentracija ($0,03 \mu\text{M}$) buvo panaudojus metkonazolo, didžiausia ($0,14 \mu\text{M}$) – tebukonazolo veikliąsias medžiagas. Protiokonazolo veikliosios medžiagos mažiausia minimali inhibuojanti koncentracija buvo $0,1 \mu\text{M}$. Vidutiniais duomenimis chemotipo 15ADON izoliatų augimui slopinti reikėjo didesnės tirtų veikliųjų medžiagų koncentracijos nei 3ADON chemotipo izoliatams.
6. Varpų fuzariozės išplitimą, intensyvumą ir *Fusarium*-pažeistų grūdų kiekį (%) vasariniuose kviečiuose patikimai sumažino apsaugai naudotas fungicidas metkonazolas. Bakterinių preparatų poveikis buvo teigiamas, tačiau dažniausiai statistiškai nepatikimas, todėl tirtų kamienų javų apsaugai nuo varpų fuzariozės nerekomenduojama naudoti.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aamot H.U., Ward T.J., Brodal G., Vralstad T., Larsen G.B., Klemsdal S., S., Elameen A., Uhlig S., Hofgaard I.S. Genetic and phenotypic diversity within the *Fusarium graminearum* species complex in Norway. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3): 501–519.
2. Adler A., Lew H., Brunner S., Oberforster J., Hinterholzer J., Kullnig Gradinger C.M., Mach R.L., Kubicek C.P. 2002. *Fusaria* in Austrian cereals – change in species and toxins spectrum. *Journal of Applied Genetics*, 43 A: 11-16.
3. Alexander N. J., McCormick S. P., Waalwijk C., Van der Lee T., Proctor R. H. 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 485-495.
4. Alexander N.J, Proctor R.H., McCormick S.P. 2009. Genes, gene clusters and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28: 198-215.
5. Bai G. H., Desjardins A. E., Plattner R. D. 2002. Deoxynivalenol nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, 15:91-98.
6. Bai G. H., Shaner G. 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease*, 78: 760-765
7. Bartkienė E., Juodeikienė G., Vidmantienė D. 2008. Deoksinivalenolio įvertinimas kviečiuose akustiniu metodu ir raugų įtaka jo koncentracijai kvietinės duonos gamybos procese. *Maisto chemija ir technologija*, 42 (1): 5–12
8. Bayer M., Klix M.B., Klink H., Verreet J.A. 2006. Quantifying the effects of previous crop, tillage, cultivar and triazole fungicides on the deoxynivalenol content of wheat grain - a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(6): 241-246.
9. Bennett W. J., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3): 497-516
10. Bottalico A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80: 85-103.
11. Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 611–624.
12. Boutigny A.L., Ward T.J., Van Coller G.J., Flett B., Lamprecht S.C., O'Donnell K., Viljoen A. 2011. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology* 48:914–20.
13. Brazauskienė I., Semaškienė R. 2006. Lauko augalų ligos ir kenkėjai. *Akademija: Lietuvos žemdirbystės institutas*, 275.
14. Brazauskienė I., Semaškienė R. 2006. Lauko augalų ligos ir kenkėjai. *Akademija: Lietuvos žemdirbystės institutas*, 275 p.
15. Bujold I., Paulitz T. C., Carisse O. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Disease*, 85: 977–984.

16. Bukantis A. 1994. Lietuvos klimatas. Vilnius, Vilniaus Universiteto leidykla, 187.
17. Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M. I., Chulze S., Etcheverry M., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156: 748–754.
18. Chelkowski J. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: Chelkowski J (ed), *Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Developments in Food Science (Vol 26)*. Amsterdam: Elsevier, 1991: 217–227.
19. Dabkevičius Z., Sinkevičienė J., Semaškienė R., Šaluchaitė A. 2005. Fungal infection of the Lithuania-grown spring barley seed. *Žemdirbystė: mokslo darbai*, 92 (4): 106–119.
20. Dabkevičius Z.; Brazauskienė I. 2007. Augalų patologija. Akademija, 493 p.
21. Digaitiene A., Hansen A., Juodeikiene G., Eidukonyte D., Josephsen J. 2012. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 732–742.
22. Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cerealis. *European Journal of Plant Pathology* 109:755–768.
23. Dufault, N. S., De Wolf, E. D., Lipps, P. E., Madden, L. V. 2006. Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Disease*, 90: 637-644
24. Eckard S., Wettstein E.F., Forrer R.H., Vogelgsang S. 2011. Incidence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Silage Maize. *Toxins*, 3: 949–967.
25. Engle J.S., Lipps P.E., Mills D. 2003. *Fusarium* head blight severity scale for winter wheat. Bulletin AC-48-03, Extension Factsheet, Ohio State University.
26. Eriksen G.S., Alexander J. 1998. *Fusarium* toxins in cereals - a risk assessment. TemaNord report 502. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark, 502.
27. Eudes F., Comeau A., Rioux S., Collin J. 2001. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight (*Fusarium graminearum*) development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23 (3):318-322.
28. Fernandez M.R., Selles F., Gehl D., DePauw R.M. & Zentner R.P. 2005. Crop production factors associated *Fusarium* head blight in spring wheat in Eastern Saskatchewan. *Crop Science*, 45: 1908-1916.
29. Foroud N. A., Eudes F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Science*, 10: 147-173.
30. Fredlund E., Gidlund A., Olsen M., Börjesson T., Spliid N.H.H., Simonsson M. 2008. Method for the evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels *Journal of Microbiological Methods*, 73: 33-40.
31. Gaurilčikienė I., Mankevičienė A., Supronienė S. 2011. The effect of fungicides on rye and triticale grain contamination with *Fusarium* fungi and mycotoxins. *Žemdirbystė=Agriculture*, 98(1): 19–26.

32. Gardiner D.M., Kazan K., Manners J.M, 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biology*, 46(8):604-13.
33. Goswami R. S., Kistler H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6): 515-525.
34. Guo X. W., Fernando W. G. D., Seow-Brock H. Y. 2008. Population structure chemotype diversity and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Disease*, 92: 756-762.
35. Haidukowski M., Pascale M., Perrone G., Pancaldi D., Campagna C., Visconti A. 2005. Effect of fungicides on *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 191–198.
36. Hartl D. L., Clarc A. G. 2007. Principles of populations. Sineaur Associates Press, 4:652.
37. Heier T.; Jain S. K.; Kogel K. H.; Pons-Kühnemann. 2005. Influence of N – fertilization and Fungicide Strategies on *Fusarium* Head Blight Severity and Mycotoxin Content in Winter Wheat. *Journal of Phytopathology*, 153 (9): 551-557
38. Hofgaard I. S., Aamot H.U., Klemsdal S., Elen O., Jestoy M., Brodal G. 2010. Occurrence of *Fusarium* spp. and mycotoxins in Norwegian wheat and oats . Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar, 23-25 November 2010, Sky, Norway, p. 9.
39. Hofgaard I. S., Seehusen T., U. Abrahamsen, Razzaghian J., Le V. H., Elen O., Riley H., Strand E. and Brodal G. 2012. Effects of tillage practice, crop rotation and fungicide treatment on the development of *Fusarium* spp. and mycotoxins in oats and spring wheat // Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar, 13-15 November 2012, Uppsala, Sweden, p. 16.
40. Hogg A. C., Johnston R. H., Dyer A. T. 2007. Applying Real-Time Quantitative PCR to *Fusarium* Crown rot of wheat. *Plant Disease*, 91: 1021-1028.
41. Hollingsworth C. R., Motteberg C. D., Thompson W. G. 2006. Assessing fungicide efficacies for the management of *Fusarium* head blight on spring wheat and barley. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2006-0906-01-RS.
42. International Rules for Seed Testing 2014. Chapter 2: Sampling. – ISTA, Bassersdorf, Switzerland, 2014, 40 p.
43. Ioos R., Belhadj A., Menez M., Faure A. 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection*, 24: 894-902.
44. Ivić D., Sever Z., Kuzmanovska B. 2011. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Pesticidi i fitomedicina*, 26 (1): 35-42.
45. Jennings P., Coates M. E., Turner J. A., Chandler E. A. Nicholson P. 2004a. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathology*, 53: 182–190.
46. Jennings P., Coates M. E., Walsh K., Turner J. A., Nicholson P. 2004b. Determination of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium*

graminearum isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53: 643-652.

47. Jestoi M., Paavanen-Huhtala S., Parikka S., Yli-Mattila T. 2008. In vitro and in vivo mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41: 545-558.

48. Jestoi M., Paavanen-Huhtala S., Uhlig S., Rizzo A., Yli-Mattila T., 2004a. Mycotoxins and cytotoxicity of *Finnish Fusarium* strains grown on rice cultures. Cauty S.M., Boring T., Wardwell J., Ward R.W. (eds.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight; incorporating the 8 th European Fusarium seminar 2004*, 11-15: 405-409.

49. Jestoi M., Rokka M., Yli-Mattila T., Parikka P., Rizzo A., Peltonen K. 2004b. The presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grain samples. *Food Additives and Contaminants*, 21: 794-802.

50. Jonavičiene A., Suproniėne S., Semaškiene R., Ramanauskiene J. 2017. *Gibberella zeae* on cereal grains in Lithuania. Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar (NJF seminar 494), 9-10 March, Ryga, Latvia, p. 32

51. Kazan K., Gardiner D., Manners J. 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular plant pathology*, 13 (4): 399–413.

52. Khalil S., Alsanıus B. W. 2009. Utilisation of Carbon Sources by *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* Species as Determined by Biolog® Microplate Assay. *The Open Microbiology Journal*, 3: 9-14.

53. Khan M.R., Doohan F.M. 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. *Biological Control*. 48: 42–47.

54. Khan N.I., Schisler D.A., Boehm M.J., Lipps P.E., Slininger P.J. 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*. 29: 245–255.

55. Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Thrane U. 2003. The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science*, 53: 168–176.

56. Kumar K. , Xi K., Turkington T. K., Tekauz A., Helm J. H., Tewari J. P. 2011. Evaluation of a detached leaf assay to measure *fusarium* head blight resistance components in barley. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33 (3): 364-374.

57. Kushiro M. 2008. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 2127–2145.

58. Landschoot S., Audenaert K., Waegeman W., Pycke B., Bekaert B., De Baets B., Haesaert G. 2011. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. *Crop Protection* 30: 1297–1305.

59. Langseth W., Bernhoft A., Rundberget T., Kosiak B., Gareis M. 1999. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144: 103–113.
60. Lawley R., Curtis L., Davis J. 2008. The Food Safety Hazard Guidebook, 433. <https://books.google.lt/books?id=6msoDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=lt#v=onepage&q&f=false>. Prieiga per internetą 2016-06-17.
61. Lazauskas S., Dabkevičius Z. 1997. Žieminių kviečių ligotumo ir derlingumo priklausomumas nuo azoto trąšų ir fungicidų lengvo priemolio dirvožemyje. *Žemdirbystė. Lietuvos žemdirbystės instituto mokslo darbai*, 57: 124-151
62. Lemmens M., Haim K., Lew H., Ruckenbauer P. 2004. The effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat. *Journal of Phytopathology*, 152: 1-8
63. Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 388 p.
64. Liddell C.M. 2003. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard K.J., Bushnell W.R., Eds.; American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, 35–43.
65. Liu Y., Sun H., Li W., Xia Y., Deng Y., Zhang A., Chen H. 2017. Fitness of three chemotypes of *Fusarium graminearum* species complex in major winter wheat-producing areas of China. *PLoS ONE*, 12(3), e0174040. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174040>
66. Lõiveke H., Ilumäe E., Laitamm H. 2004. Microfungi in grain and grain feeds and their potential toxicity. *Agronomy Research*, 2(2): 195–205.
67. Lugauskas A., Raila A., Zvicevičius E., Railienė M., Novošinskas H. 2007. Factors determining accumulation of mycotoxin producers in cereal grain during harvesting. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14 (1): 173–186.
68. Lugauskas A.; Krasauskas A.; Repečkienė J. 2004. Ekologiniai veiksniai, lemiantys mikromicetų paplitimą ant javų grūdų ir sojų sėklų ekologija. *Ekologija*, 2., 21 - 32.
69. Luongo L., Galli M., Corazza L., Meekes E., Haas L.D., Plas C.L.V.D., Köhl J. 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 229–242.
70. Ma B.L., Subedi K.D., Xue A.G., Voldeng H.D. 2013. Crop management effects on *Fusarium* head blight, *fusarium*-damaged kernels and deoxynivalenol concentration of spring wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 36: 717-730
71. Mankevičienė A. 2010. Mycotoxins in Lithuanian Cereals and Grain Products. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons / eds. Rai Mahendra and Varma Ajit. – Springer, Berlin, Heidelberg*, 147–162.
72. Mankevičienė A., Butkutė B., Dabkevičius Z., Supronienė S. 2007a. *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14 (1): 103-107.

73. Mankevičienė A., Butkutė B., Gaurilčikienė I., Dabkevičius Z., Supronienė S. 2011. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control*, 22: 970-976.
74. Mankevičienė A., Dabkevičius Z., Supronienė S., Mačkinitė R. 2007b. Mikroskopinių grybų plitimo ir mikotoksinų kiekio žeminių kviečių grūduose priklausomumas nuo jų nuėmimo laiko. *Žemdirbystė: mokslo darbai*, 94 (3): 162–175.
75. Mankevičienė A., Jablonskytė-Raščė D., Maikštėnienė S. 2014. Occurrence of mycotoxins in spelt and common wheat grain and their products. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 31: 132–138
76. Manstretta V., Ross V. Effects of Temperature and Moisture on Development of *Fusarium graminearum* Perithecia in Maize Stalk Residues. 2016. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (1): 184–191.
77. Marshall A, Cowan S., Edwards S., Griffiths I., Howarth C., Langdon T., White E. 2013. Crops that feed the world 9. Oats a cereal crop for human and livestock feed with industrial applications. *Food Science*, 5: 13–33.
78. Marten P., Smalla K., Berg G., 2000. Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 463–471.
79. Mathur S.B., Kongsdal O. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland, p. 427.
80. Mayer S., Engelhart S., Kolk A., Blome H., 2008. The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin Research*, 3 (24): 151–164.
81. McCourtney H. A., Foster S. J., Fraaije B. A. 2003. Ward E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, 59: 129-142.
82. McDonald B. A., Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349 – 379.
83. McMullen M., Bergstrom G., De Wolf E. *et al.* 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: fusarium head blight. *Plant Disease*, 96: 1712–1728.
84. McMullen M., Jones R., Gallenberg D. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81: 1340-1348.
85. Mesterházy Á. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114 (5):377-386.
86. Mesterházy Á. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (7): 675-684.
87. Miedaner T.; Schilling A.G.; Geiger H.H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *Journal of Phytopathology*, 149(11-12): 641-648.

88. Moretti N.A. 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proceedings for Natural Sciences Matica Srpska Novi Sad., 117: 7–13.
89. Mourellos C.A., Malbran I., Balatti P.A., Ghiringhelli P.D., Lori G.A. 2014. Gramineous and non-gramineous weed species as alternative hosts of *Fusarium graminearum*, causal agent of Fusarium head blight of wheat, in Argentina. Crop Protection 65:100–104.
90. Murphy A. P., Hendrich S., Landgren C., Bryant M. C. 2006. Food Mycotoxins: An Update. JFS R: Concise Reviews/Hypotheses in Food Science. Journal of food science, 5: 71.
91. Nelson P. E., Tousson T.A., Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. 193.
92. Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J. 1994. Taxonomy, biology and clinical aspect of *Fusarium* species. Clinical Microbiology Review 7 (4):479–504.
93. Nicholson P., Chandler E., Draege R. C., Gosman N. E., Simpson D. R., Thomsett M., Wilson A. H. 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi, 109 (7): 691 – 703.
94. Nicolaisen M., Supronienė S., Nielsen L. K., Lazzaro I., Spliid N. H., Justesen A. F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. Journal of Microbiological Methods, 76: 234-240.
95. Nielsen L. K., Jensen J. D., Nielsen G. C., Jensen J. E., Spliid N. H., Thomsen I. K., Justesen A. F., Collinge D. B., Jørgensen L. N. 2011. *Fusarium* Head Blight of Cereals in Denmark: Species Complex and Related Mycotoxins. Phytopatology, 101 (8): 960 – 969.
96. Nielsen L.K., Jensen J.D., Rodríguez A., Jørgensen L.N., Justesen A.F. 2012. The *Fusarium* Head Blight complex in Danish small grain cereals –Trichothecene genotypes and *Microdochium* species complex. Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar, 13-15 November, Uppsala, Sweden, 17.
97. Nirenberg H.I. 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. Studies in Mycology, 32: 91-101.
98. O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D. M., Kistler H.C., Aoki T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* 41:600–623. Zhang H., Van der Lee T., Waalwijk C., Chen W. Xu J., Zhang Y., Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* Species Complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS ONE*, 7, e31722.
99. O'Donnell K., Geiser D.M., Aoki T. 2004. Species recognition and identification of agriculturally important Fusaria: Current status and future prospects. Proceedings for the 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10), Tsukuba, Japan., 233-238.
100. O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of

Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97: 7905-7910.

101. O'Donnell K., Ward T.J., Aberra D., Kistler H.C., Aoki T., Orwig N., Kimura M., Bjørnstad Å., Klemsdal S.S. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. Fungal Genetics and Biology 45:1514–1522.

102. Pagnussatt F.A., Del Ponte E.M., Garda-Buffon J., Badiale-Furlong E. 2014. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. Pesticide Biochemistry and Physiology 108:21–26. Vanagienė J., Baškys D. Augalų apsauga – Vilnius: [s. n.], 2009, 104 p.

103. Palazzini J.M., Alberione E., Torres A., Donat C., Köhl J., Chulze S. 2016. Biological control of *Fusarium graminearum* sensu stricto, causal agent of *Fusarium* head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. Biological Control. 94: 56–61.

104. Palazzini J.M., Groenenboom-de Haas B.H., Torres A.M., Köhl J., Chulze S.N. 2013. Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. on wheat stubble in Argentina. Plant Pathology, 62: 859–866.

105. Parikka P., Hakala K. and Tiilikkala K. 2012a. Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. Food Additives and Contaminants: Part A., 29(10): 1543–1555.

106. Parikka P., Rämö S., Hietaniemi V., Alakukku L., Känkänen H. 2012b. The effect of agronomic practices on *Fusarium* infection and mycotoxins on oats and barley. Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar, 13-15 November 2012, Uppsala, Sweden, p. 20.

107. Parry D., Jenkinson P., McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. Plant Pathology, 44 (2): 207-238.

108. Pasquali M., Beyer M., Logrieco A., Audenaert K., Balmas V., Basler R., Boutigny A-L., Chrpová J., Czembor E., Gagkaeva T., González-Jaén M.T., Hofgaard I.S., Köycü N.D., Hoffmann L., Levic J., Marin P., Miedaner T., Migheli Q., Moretti A., Müller M.E.H., Munaut F., Parikka P., Pallez-Barthel M., Piec J., Scauflaire J., Scherm B., Stankovic S., Thrane U., Uhlig S., Vanheule A., Yli-Mattila T., Vogelgsang S., 2016. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. Frontiers in Microbiology, 7: 406.

109. Pelczar M. J., Bard R.C., Burnett G. W., Conn H. J., DeMoss R. D., Evans E. E., Weiss F. A., Jennison M. W., McKee A. P., Riker A. J., Warren J., Weeks O. B. 1957. Manual of microbiology methods, 334.

110. Pereyra S.A., Dill-Macky R. 2008. Colonisation of residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum. Plant Disease 92:800–807.

111. Pettersson H., Aberg L. 2003. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. Food Control, 14: 229– 232.

112. Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S., 2013. Isolation and characterization of *Bacillus sp* with *In-vitro* antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* from rhizosphere of tomato. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15: 1501-1512.
113. Puri K. D., Zhong S. 2010. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. *Phytopathology* 100: 1007-1014.
114. Ragab M.M.M., Ashour A.M.A., Abdel-Kader M.M., El-Mohamady R., Abdel-Aziz A. 2012. In Vitro Evaluation of Some Fungicides Alternatives Against *Fusarium Oxysporum* the Causal of Wilt Disease of Pepper (*Capsicum annum L.*). *International Journal of Agriculture ant Forestry*, 2 (2): 70-77.
115. Ramirez M.L., Chulze S., Magan N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Int. Journal of Food Microbiology* 106:291–296.
116. Reis E.M., Carmona M.A. 2013. Integrated Disease Management of Fusarium Head Blight. *Fusarium Head Blight in Latin America*, 159-173.
117. Roháčik T., Hudec K. 2005. Influence of agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12(1):39–45.
118. Roháčik T., Hudec K. 2007. Fungal Infection of Malt Barley Kernels in Slovak Republic. *Plant Protect*, 43 (3): 86-93.
119. Ruckebauer P.; Buerstmayr H.; Lemmens M. 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium spp.*). *Euphytica*, 119(1-2):121-127.
120. Ryu J., Ohtsubo K., Izumiyama N., Nakamura K., Tanaka T., Yamamura H., Ueno Y. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundam Appl Toxicol*, 11:38–47.
121. Sakalauskas S., Kačergius A., Janušauskaitė D., Čitavičius D. 2014. Bacteria with a broad-spectrum of antagonistic activity against pathogenic fungi of cereals. *Zemdirbyste-Agriculture*, 2: 185-192.
122. Sakalauskas S., Stumbrienė K., Supronienė S., Švėgžda P. 2014. Changes in *Fusarium* Link species composition from Lithuanian wheat grain in years 2005–2007 to 2011–2013. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture* 32:45–50
123. Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic L., Miller J.D., Hooker D.C. 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Plant Pathology* 23:279–285.
124. Schilling T.F., Piotrowski T., Grandel H., Brand M., Heisenberg C.P., Jiang Y.J., Beuchle D., Hammerschmidt M., Kane D.A., Mullins M.C., van Eeden F.J., Kelsh R.N., Furutani-Seiki M., Granato M., Haffter P., Odenthal J., Warga R.M., Trowe T., Nüsslein-Volhard C. 1996. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish. I. Branchial arches. *Development (Cambridge, England)*, 123: 329-344.
125. Schisler D.A., Core A.B., Boehm, M.J., Horst L., Krause C., Dunlap C.A., Rooney A.P., 2014. Population dynamics of the *Fusarium* head blight biocontrol agent *Cryptococcus flavescens* OH 182.9 on wheat anthers and heads. *Biological Control*. 70: 17–27.

126. Schmale III D.G., Bergstrom G.C. 2003. *Fusarium* head blight (FHB) or scab. <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx>. Prieiga per internetą 2015-04-17.
127. Schroeder H. W., Christensen J. J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53: 831-838.
128. Shen C.M., Hu Y.C., Sun H.Y., Li W., Guo J.H., Chen H.G. 2012. Geographic distribution of trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* species complex in major winter wheat production areas of China. *Plant Disease* 96:1172–1178.
129. Schmale III D. G., Leslie J. F., Zeller K. A., Saleh A. A., Shields E. J., Bergstrom G. C. 2006. Genetic Structure of Atmospheric Populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 96 (9): 1021 – 1026.
130. Špokauskienė O. 1989. Varpinių javų mikromicetai Lietuvoje, 228.
131. Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Tóth B., Varga J., O'Donnell K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1191-1204.
132. Stepień L., Popiel D., Koczyk G., Cehlakowsky J. 2008. Wheat-infecting *Fusarium* species in Poland – their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. *Journal of Applied Genetics*, 49: 433-441.
133. Sun J.B., Peng M., Wang Y.G., Zhao P.J., Xia Q.Y., 2011. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against fusarium wilt and induction of defense related enzymes in banana. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (5): 509-515.
134. Supronienė S., Justesen A. F., Nicolaisen M., Mankevičienė A., Dabkevičius Z., Semaškienė R., Leistrumaitė A. 2010 a . Distribution of trichothecene and zearalenone producing *Fusarium* species in grain of different cereal species and cultivars grown under organic farming conditions in Lithuania. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17: 79-86.
135. Supronienė S., Mankevičienė A., Kadžienė G., Kačergius A., Feizienė D., Feiza V., Semaškienė R., Dabkevičius Z., Tamošiūnas K. 2012a. The impact of tillage and fertilization on *Fusarium* infection and mycotoxin production in wheat grains. *Zemdirbystė-Agriculture*, 99 (3): 265–272
136. Supronienė S., Mankevičienė A., Treikale O., Lōiveke H. 2010 b. The occurrence of *Fusarium* and mycotoxins in cereals in the Baltic Countries. *Book of abstract of Nordic Baltic Fusarium seminar*, Ski, Norway, p. 7.
137. Supronienė S., Semaškienė R., Mankevičienė A., Jonavičienė A. 2012b. *Fusarium* spp. occurrence in spring wheat grain in Lithuania during 2011-2012. *Book of abstract of Nordic Baltic Fusarium seminar*, 13-15 November 2012, Uppsala, Sweden, p. 19.
138. Surai P. F., Mezes M. 2005. Mycotoxins and immunity: theoretical consideration and practical applications. *Praxis Veterinaria*, 53 (1–2): 71–88.
139. Šurkus J.; Gaurilčikienė A. 2002. Žemės ūkio augalų kenkėjai, ligos ir jų apskaita. *Akademija: Lietuvos žemdirbystės institutas*, 345.

140. Talas F., Parzies H. K., Miedaner T. 2011. Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum* sensu stricto populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 131: 39-48.
141. Trail F., Xu H., Loranger R., Gadoury D. 2017. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia*, 94 (2), 181-189
142. Ueno Y., Hsieh D. P. H. 1985. The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology* 14: 99-132.
143. Von der Ohe C., Gauthier V., Tamburic-Ilincic L., Brule-Babel A., Fernando W. G. D., Clear R., Ward T. J., Miedaner T. 2010. A comparison of aggressiveness and deoxynivalenol production between Canadian *Fusarium graminearum* isolates with 3-acetyl and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes in field-grown spring wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 407–417.
144. Waalwijk C., Kastelein P., De Vries I., Kerényi Z., Van der Lee T., Hesselink T., Köhl J. and Kema G. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109:743–754.
145. Wang J., Liu J., Chen H., Yao J. 2007. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76: 889–894.
146. Ward T.J., Clear R., Rooney A., O'Donnell K., Gaba D., Patrick S., Starkey D., Gilbert J., Geiser D., Nowicki T. 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 473-484.
147. Webster J., Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, 842.
148. Wegulo S.N. 2012. Factors Influencing Deoxynivalenol Accumulation in Small Grain Cereals. *Toxins*, 4 (12): 1157-1180.
149. Windels C.E. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90: 17–21.
150. Xue A.G., Chen Y.H., Sant'anna S.M.R., Voldeng H.D., Fedak G., Savard M.E., Längle T., Zhang J.X., Harman G.E. 2014. Efficacy of CLO-1 biofungicide in suppressing perithecial production by *Gibberella zeae* on crop residues. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36: 161–169
151. Yazar S., Omurtag Z.G. 2008. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 2062–2090.
152. Yli-Mattila T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1): 7-18.
153. Yli-Mattila T. 2011. Detection of Trichothecene-producing *Fusarium* Species in Cereals in Northern Europe and Asia. *Agronomy Research*, 9: 521-526.
154. Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C., O'Donnell K., 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a

newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101:841–852.

155. Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Parikka P., Hietaniemi V., Jestoi M., Gagkaeva T., Sarlin T., Haikara A., Laaksonen S., Rizzo A. 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland and Russia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41: 243-260.

156. Yli-Mattila T., Rämö S., Tanner R., Loiveke H., Hietaniemi V. 2011. *Fusarium* DNA levels as compared to mycotoxin levels in Finnish and Estonian grain samples. *Plant Breeding and Seed Science*, 64: 131-140.

157. Yli-Mattila T.; Rämö S.; Hussien T.; Rauvola M.; Hietaniemi V., Kaitaranta J. 2017. Different grain grinding methods affect detection of *Fusarium graminearum* DNA and mycotoxins. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(1): 167-174.

158. Yuan J., Raza W., Shen Q., Huang Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (16): 5942–5944.

159. Zain E. M. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15: 129-144.

160. Zeller K. A., Bowden R. L., Leslie J. F. 2004. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from the United States. *Molecular Ecology*, 13: 563-571.

161. Zhang H., Zhang Z., van der Lee T., Chen W.Q., Xu J., Xu J.S., Yang L., Yu D., Waalwijk C., Feng J. 2010. Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3ADON producers in southern China. *Phytopathology*, 100 (4): 328-336.

162. Zhang H., Van der Lee T., Waalwijk C., Chen W., Xu J., Xu J., et al, 2012, Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates, *PloS One*, 7(2): e31722

163. Zhao Y., Selvaraj J.N., Xing F., Zhou L., Wang Y., Song H., Tan X., Sun L., Sangare L., Folly Y.M.E., Liu Y. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *Plos One*, 9 (3).

Naudoti standartai

LST EN 15587 „Grūdai ir jų produktai. Priemaišų nustatymas minkštuosiuose kviečiuose (*Triticum aestivum* L.), kietuosiuose kviečiuose (*Triticum durum* Desf.), rugiuose (*Secale cereale* L.) ir pašariniuose miežiuose (*Hordeum vulgare* L.)“

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Leidinyje, referuojamame ir turinčiame citavimo indeksą duomenų bazėje „Clarivate Analytics Wb of Science“:

Suproniene S., Sakalauskas S., Stumbriene K., Zvirdauskiene R., Svegzda P. 2016. Variances in trichothecene chemotype distribution in Lithuanian wheat grain and within pure culture *Fusarium graminearum* isolated from the same grain samples. *European Journal of Plant Pathology*, 144 (2): 371–381.

Recenzuojamame periodiniame leidinyje:

Sakalauskas S., Stumbriene K., Suproniene S., Svegzda P. 2014. Changes in *Fusarium* Link species composition from Lithuanian wheat grain in years 2005–2007 to 2011–2013. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, 32 (327): 45–50.

Santraukos Lietuvoje ir užsienyje rengtų mokslinių konferencijų leidiniuose:

1. Stumbriene K., Suproniene S., Semaskiene R., Gudiukaite R., Svegzda P., Jonaviciene A. Effectiveness of bacterial strains MBK-a3 and MBK-r4 on *Fusarium* head blight of winter and spring wheat caused by artificial infection // Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar 494, 9 – 10 kovas 2017, Riga, Latvia, p. 58.

2. Stumbriene K., Suproniene S., Gudiukaite R., Semaskiene R. Efficacy of selected *Bacillus subtilis* strains against fusarium head blight of wheat caused by artificial infection // Book of abstract of Open Readings 2017 seminar, 14 – 17 kovas 2017, Vilnius, p. 369.

3. Stumbriene K., Suproniene S., Sakalauskas S., Svegzda P., Zvirdauskiene R. B Trichothecene Distribution in Lithuania Wheat Grain // Book of abstract of Open Readings 2016 seminar, 15–18 kovas 2016, Vilnius, p. 151.

4. Sakalauskas S., Supronienė S., Stumbrienė K., Švėgžda P, Chemotyping of the FHB pathogens in Lithuanian spring wheat grain // Book of abstract of XVIII International Plant Protection Congress, 24-27 August 2015, Berlin, Germany, P NEDP 32, p. 724.

5. Suproniene S., Sakalauskas S., Stumbriene K., Svegzda P., Mankevičienė A., Fedaravičiute S. The distribution of Type B trichothecene producers in Lithuanian wheat // Book of programme and abstract of Symposium „Power of fungi and mycotoxins in health and disease 2015“, 20–23 September, 2015 Šibenik, Croatia.

6. Supronienė S., Stumbrienė K., Sakalauskas S., Mankevičienė A., Jonavičienė A., Švėgžda P. Distribution of the trichothecene genotypes in spring and winter wheat // Book of abstract of Nordic Baltic *Fusarium* seminar, 18–19 lapkritis 2014, Helsikis, Suomija, p. 14.

Variances in trichothecene chemotype distribution in Lithuanian wheat grain and within pure culture *Fusarium graminearum* isolated from the same grain samples

Skaidre Supronienė · Simonas Sakalauskas ·
Karina Stumbrienė · Renata Zvirdauskiene ·
Povilas Svegzda

Accepted: 21 September 2015
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2015

Abstract The *Fusarium* head blight emerged as the main disease of wheat in Lithuania in 2012. The chemotype diversity of FHB pathogens was not investigated prior that time. In this study chemotype determination of pure *F. graminearum* cultures, the main cause of FHB in wheat, isolated from grain and chemotype detection rates in homogenized grain were compared. A total of 105 pure culture *F. graminearum* isolates from 2013 and 144 homogenized wheat grain samples from 2013 and 2014 were analysed for presence and quantification of 15ADON, 3ADON and NIV chemotype DNA. Results show that 15ADON chemotype was clearly dominant in pure culture isolates, but not in homogenized grain, where 3ADON incidence was almost as high. Also the results allow dismissal of other toxigenic *Fusarium* species, *F. culmorum*, as either a source of NIV or the main source of 3ADON chemotype DNA in grain.

Keywords *Fusarium* · Chemotype · Incidence · Real-time PCR · Quantification

Introduction

Fusarium head blight (FHB) of wheat in Lithuania reached epidemic scale in 2012 and persisted as a major problem in wheat growing areas in 2013 and 2014, especially affecting spring wheat. FHB is caused mainly by *Fusarium graminearum* Schwabe and to less extent *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw., and *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett (Becher et al. 2013). *F. graminearum* has been very rarely isolated from wheat grain prior to 2012 during the annual internal grain mycobiota surveys, but was found in significant numbers since then (Supronienė et al. 2010, Supronienė et al. 2011, Supronienė et al. 2012; Sakalauskas et al. 2014).

FHB is associated with grain contamination by B type trichothecene mycotoxins – nivalenol (NIV), and deoxynivalenols (DON) acetylated derivatives 3ADON and 15ADON (Alexander et al. 2011). Based on the structure of B trichothecene synthesis regulation genes, *Fusarium* strains usually produce one B type trichothecene – NIV, 3ADON or 15ADON – and thus are grouped into respective chemotypes (Miller et al. 1991; Becher et al. 2013). *F. graminearum* strains of different chemotypes vary by physiological characteristics, including growth rate, mycotoxin production and aggressiveness (Ward et al. 2008; Zhang et al. 2012).

Major part of the *Fusarium* chemotype determination studies are conducted on fungi isolated from FHB affected plants. This approach is inevitable when the

S. Supronienė (✉) · S. Sakalauskas · K. Stumbrienė ·
R. Zvirdauskiene · P. Svegzda
Institute of Agriculture, Lithuanian Research Centre for
Agriculture and Forestry, Studentu str. 15A, LT-53362
Akademija, Kaunas distr., Lithuania
e-mail: skaidre@lzi.lt

study is also concerned with problems of *F. graminearum* population genetics where obtaining pure culture isolates is crucial (Ward et al. 2008; Talas et al. 2011). Varying traits of different chemotype *F. graminearum* isolates have influence on chemotype distribution in fields and may have on their isolation rate.

The other analysis of chemotype composition approach involves direct detection of chemotype-specific gene sequences in plant material – grain, infected heads – without isolating the fungus itself (Nielsen et al. 2011, 2012). It eliminates the possibility of overlooking presence of the particular chemotype which may or may not be isolated, but is useless for population genetics analyses where pure fungal cultures are obligatory. Also direct chemotype detection in plant material may not be sufficient to accurately indicate which *Fusarium* species is the source of particular chemotype detected, as the same chemotype usually may be attributed to more than one species (Nielsen et al. 2012; Becher et al. 2013; Pasquali and Migheli 2014).

The distribution of *F. graminearum* chemotypes varies throughout the world: 3ADON is dominant in Asia and parts of USA and Canada, 15ADON – in major part of North America, and NIV – in Japan and Southern USA (Becher et al. 2013). In Europe variability of *F. graminearum* chemotypes is somewhat higher and presumably is under constant shift, but there is a trend of 15ADON chemotype being dominant, while the 3ADON and NIV chemotypes were nowhere found to dominate European *F. graminearum* field populations (Pasquali and Migheli 2014).

Since the recent manifestation of FHB in Lithuanian wheat is associated with *F. graminearum*, the first objective of this study was to assess the diversity of *F. graminearum* isolates from grain by determining their chemotype and obtain the fungal cultures which would be used as a standard for detection of chemotype in grain samples. The other major objective was to evaluate the presence of different chemotypes in homogenized grain samples without isolation of pure cultures, which would enable us to compare if the analysis of pure culture isolates accurately represents the distribution of chemotypes in wheat. By achieving the stated objectives we would establish the start point from which changes in *F. graminearum* chemotype composition could be monitored, since the FHB problem in wheat is likely to persist.

Materials and methods

Grain sampling locations

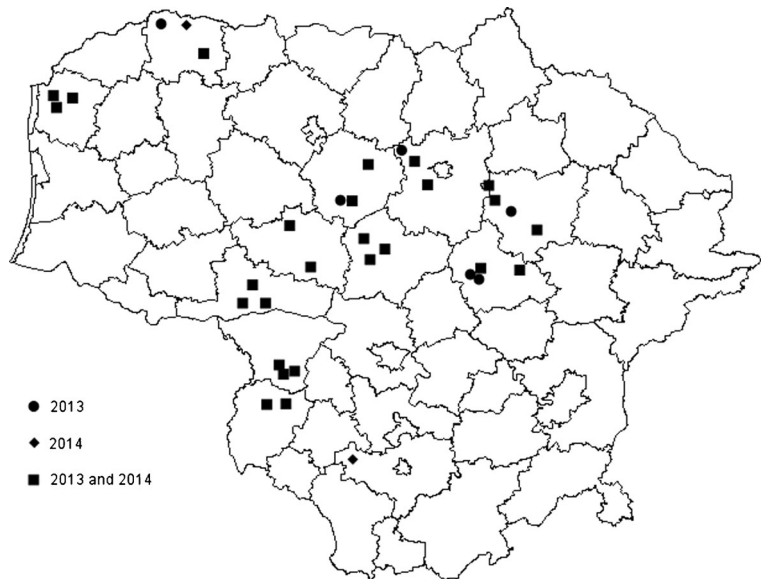
Spring and winter wheat grain samples were collected from 12 administrative districts in the wheat growing areas of Lithuania in 2013 and 2014. A total of 114 spring wheat (64 in 2013 and 50 in 2014) and 30 winter wheat (15 in each year) grain samples from different fields were collected (Fig. 1). The grain was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and defrosted to room temperature prior to the analyses.

Isolation and identification of pure *F. graminearum* and *F. culmorum* cultures

Wheat grain samples from 2013 year with the highest internal *Fusarium* infection levels (annual survey data; not presented) from eight regions were selected for isolation of pure *F. graminearum* and *F. culmorum* cultures. 200 surface-sterilized seeds per sample were plated on a Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (Leslie and Summerell 2006) and incubated at $24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ in dark until formation of sporodochia. *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates were preliminary identified by examining morphological characteristics of macroconidia (Leslie and Summerell 2006). Macroconidial masses of isolates identified as *F. graminearum* and *F. culmorum* were transferred onto 2 % water agar and spread on the surface; germinated single-spore cultures were picked and sub-cultured onto SNA (Talas et al. 2011).

DNA extraction from pure *Fusarium* cultures and grain

For DNA extraction *Fusarium* isolates were grown on PDA for 1–2 weeks. Grain samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen using a ball mill (Retsch). Genomic DNA was extracted from fresh mycelium or 100 mg homogenized grain using FastDNA Kit (MP Biomedicals). DNA concentration was measured by Biophotometer (Eppendorf) and by electrophoresis in 1 % agarose gel with MassRuller DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) as a standard. Extracted genomic DNA of pure *Fusarium* cultures was diluted tenfold for real-time PCR.

Fig. 1 Grain sample collection sites in 2013 and 2014

Identity confirmation and chemotype determination of pure *Fusarium* cultures

Identity of isolated pure *F. graminearum* and *F. culmorum* cultures was confirmed by real-time PCR using primer sets for amplification of EF1 α gene sequences (Nicolaisen et al. 2009). For 3ADON, 15ADON or NIV chemotype prediction specific primer sets for TRI12 gene sequences were used (Nielsen et al. 2012). All primers used in this study are listed in Table 1.

Quantification of *Fusarium* and chemotype DNA in grain samples

Overall *Fusarium*, *F. graminearum*, *F. culmorum* species and potential 15ADON, 3ADON and NIV producers were quantified in wheat grain samples from 11 regions by quantitative real-time PCR (qPCR). Ten-fold dilution series of pure *F. graminearum* and *F. culmorum* (verified by real-time PCR) and *F. graminearum* strains identified as potential producers of 15ADON (strain A18.10), 3ADON (strain

Table 1 qPCR primers used in this study

Target	Primer name	Sequence (5' → 3')	Reference
<i>F. graminearum</i>	FgramB379fwd	CCATTCCTGGGCGCT	Nicolaisen et al. 2009
	FgramB411rev	CCTATTGACAGGTGGTTAGTGACTGG	
<i>F. culmorum</i>	FculC561fwd	CACCGTCATTGGTATGTTGTCACT	Nicolaisen et al. 2009
	FculC614rev	CGGGAGCGTCTGATAGTCG	
3ADON	3ADONf	AACATGATCGGTGAGGTATCGA	Nielsen et al. 2012
	3ADONr	CCATGGCGCTGGGAGTT	
15ADON	15ADONfwd	GTTTCGATATTCATTGGAAAAGCTAC	Nielsen et al. 2012
	15ADONrev	CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA	
NIV	NIVf	GCCCATATTCGCGACAATGT	Nielsen et al. 2012
	NIVr	GGCGAACTGATGAGTAACAAAACC	
Plant EF1 α	Hor1f	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC	Nicolaisen et al. 2009
	Hor2r	GGCCCTTGTAACAGTCAAGGT	
Fusarium (overall)	FusEF14fwd	CCACGTCGACTCTGGCAAG	Yang et al. 2010
	FusEF125rev	CGCACTGGTAGATCAAGTGACC	

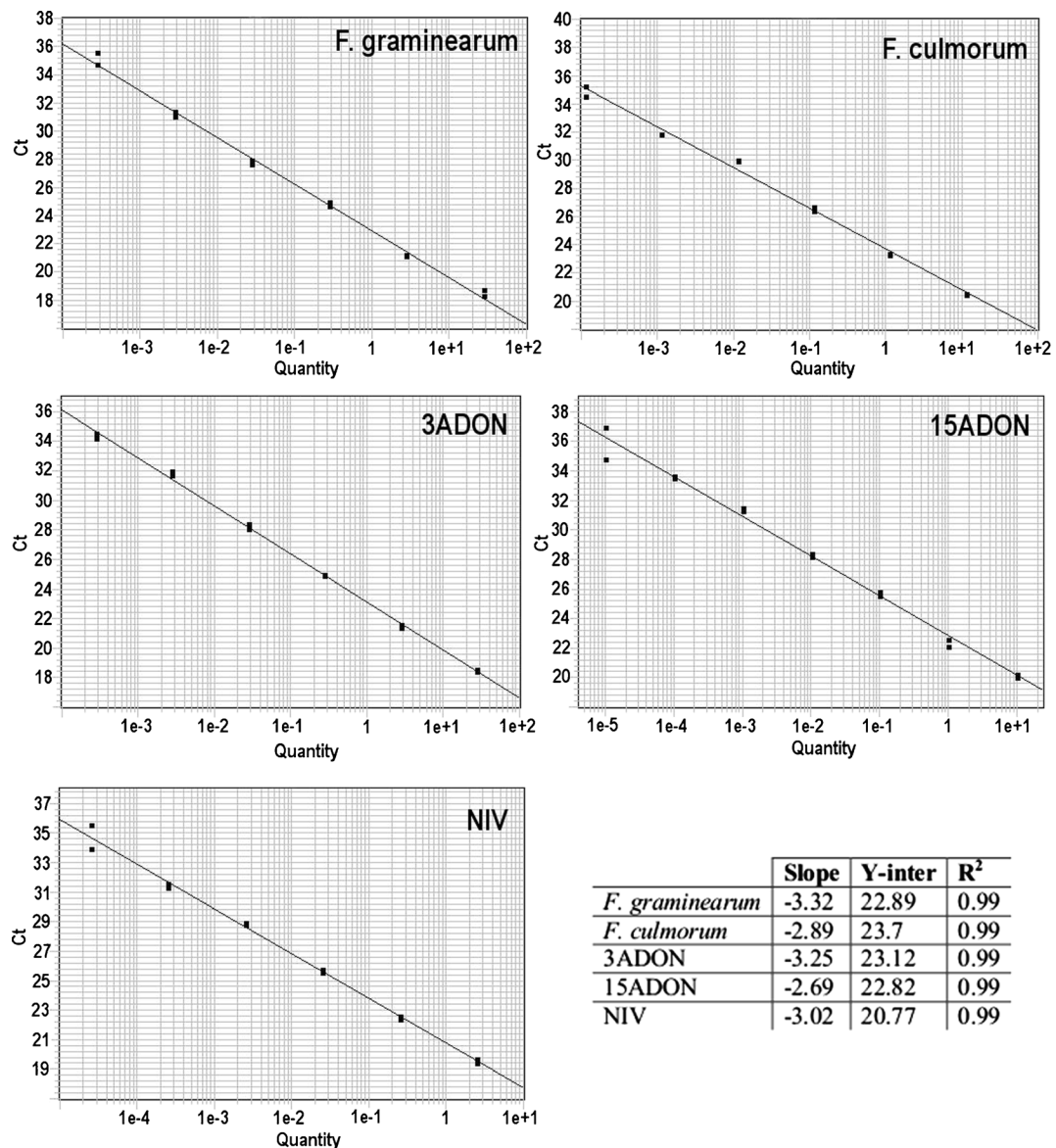


Fig. 2 Standard curves

D40.1.1) and NIV (strain G108) DNA were used for standard curves (Fig. 2). A plant assay was performed according to Nicolaisen et al. (2009) and the values given as the amount of fungal DNA per amount of plant DNA.

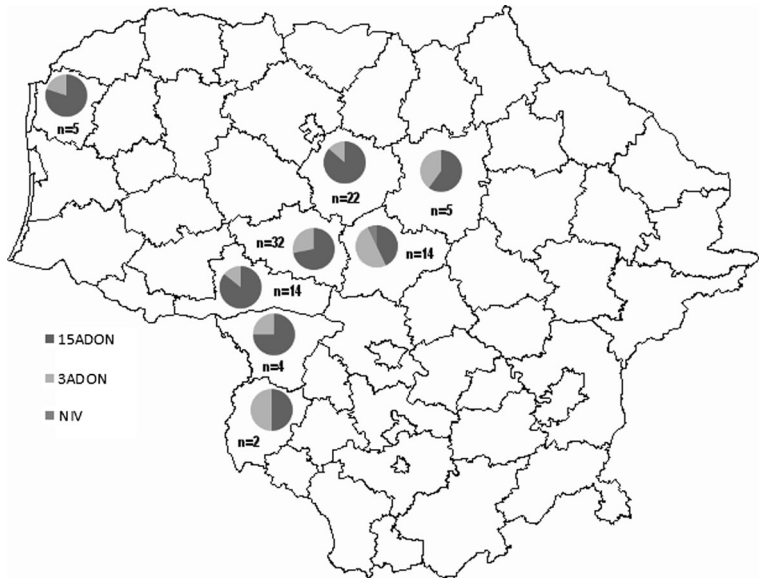
qPCR conditions

qPCR was carried out in a total volume of 12.5 μ l: 6.25 μ l 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer (Metabion international AG), 0.4 μ g/ μ l bovine serum albumin (BSA)

(Thermo Fisher Scientific) and 2.5 μ l twenty-fold diluted template DNA. All samples were duplicated. Reactions were done on a 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following cycling protocol: 2 min at 50 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s and 62 $^{\circ}$ C for 1 min followed by dissociation curve analysis at 60 to 95 $^{\circ}$ C.

qPCR data was visualized by SDS 2.4 software (Applied Biosystems). A positive qPCR result under Ct 35 threshold was taken as true for detection of both *Fusarium* species and chemotype genes in grain samples (Nielsen et al. 2012).

Fig. 3 Distribution of chemotypes in pure culture *F. graminearum* isolates by region



Basic statistic and correlation analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20.

Results

Isolation of pure *F. graminearum* and *F. culmorum* cultures

A total of 105 *Fusarium* isolates were identified as *F. graminearum* by morphological methods and then confirmed by real-time PCR analysis using species

specific primer set. Nine of these were isolated from winter and the remaining 96 from spring wheat.

Two *F. culmorum* strains were isolated from spring wheat, their identity confirmed by morphology and species specific real-time PCR.

Chemotype determination in pure *F. graminearum* and *F. culmorum* cultures

All nine winter wheat *F. graminearum* isolates were found to be of 15ADON chemotype. Of the 96 spring wheat *F. graminearum* isolates 70 (73 %) were of

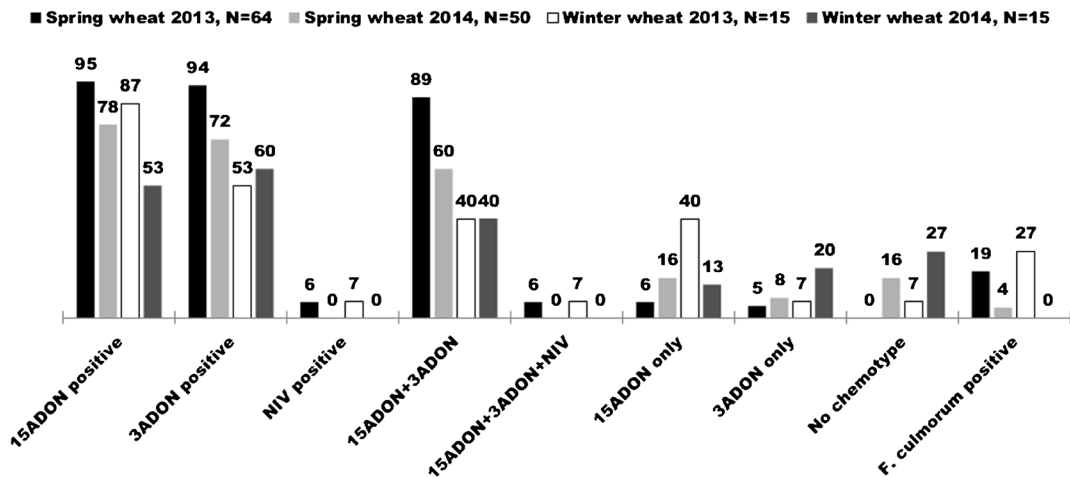


Fig. 4 Distribution of chemotypes, % of positives, in homogenized grain samples by year and by crop

15ADON chemotype, 25 (26 %) of 3ADON and one (1 %) of NIV chemotype. Both *F. culmorum* strains were found to be of 3ADON chemotype. Distribution of *F. graminearum* chemotypes by region is presented in Fig. 3.

Chemotype incidence in grain

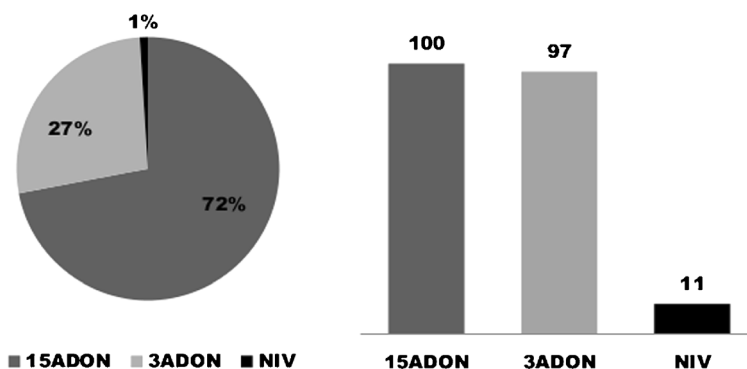
F. graminearum specific gene sequences were detected in all grain samples on both years. In eight of 114 (7 %) spring wheat grain samples and in four of 30 (13 %) winter wheat grain samples no DNA of either chemotype was detected. In all these negative samples *F. culmorum* was absent. All *F. culmorum* positive grain samples also contained both 15ADON and 3ADON chemotypes, and in no 15ADON negative but 3ADON positive sample *F. culmorum* DNA was detected. The distribution (%) of chemotypes in grain by year and by crop is presented in Fig. 4.

Comparison of pure culture *Fusarium* chemotype determination (PC) and chemotype incidence in homogenized grain (HG) results collected from the same eight districts in 2013 was performed (Fig. 5). The 15ADON chemotype was present in all grain samples from which isolation of pure cultures was done, 3ADON chemotype in all but one spring wheat sample (97 %), NIV chemotype – in four spring wheat samples (11 %).

Quantification of *Fusarium* and chemotype DNA in wheat

The minimum, maximum and mean amounts and 95 % CI values of species or genotype DNA adjusted to the amount of plant DNA in the samples is presented in Table 2. Large variations were detected between and within spring and winter sample groups.

Fig. 5 Comparison of chemotype composition of pure culture isolates from spring wheat grain and of chemotype incidence in homogenized spring wheat grain



Correlation analysis

High degree linear correlations were detected between *F. graminearum* and 3ADON, *F. graminearum* and 15ADON and *F. culmorum* and 3ADON in spring wheat grain (Table 3).

Strong correlations between quantities of *F. graminearum* and 15ADON, and *F. graminearum* and 3ADON were observed in winter wheat in 2013. Correlations between *F. culmorum* and either of the chemotypes in winter wheat were missing in 2013 or not applicable in 2014 (as there were no *F. culmorum* positive winter wheat samples in 2014). The NIV chemotype DNA was detected in too few grain samples for correlation analyses to be of acceptable probability levels.

High degree linear correlations between quantities of *F. graminearum* and 3ADON ($r = 0.862$, $p < 0.01$), *F. culmorum* and 3ADON ($r = 0.658$, $p < 0.01$), and between *F. graminearum* and 15ADON ($r = 0.339$, $p < 0.05$) were detected in spring wheat samples from which pure *Fusarium* cultures were isolated. Due to insufficient number of positive samples the correlation analyses for winter wheat could not be conducted.

Discussion

The pure culture *F. graminearum* isolates used in this study were obtained from harvested grain rather than FHB affected wheat heads as in similar studies (Talas et al. 2011, Jennings et al. 2004). It is likely that more *F. graminearum* isolates could be obtained from FHB damaged wheat heads than from harvested grain, but 107 isolates is a representative number when compared

Table 2 Quantitative data on *F. graminearum*, *F. culmorum*, 3ADON, 15ADON and NIV DNA in grain samples, ng/μg plant DNA

Target	Crop	% of positives	min	max	mean	±95 % CI
<i>F. graminearum</i>	S	100	<1	2671	169	64
	W	100	<1	147	26	15
<i>F. culmorum</i>	S	23	8	3053	1002	628
	W	13	1	50	13	39
3ADON	S	82	<1	1723	87	53
	W	57	<1	108	15	13
15ADON	S	89	<1	36,956	1069	978
	W	80	<1	132	12	13
NIV	S	6	46	444	196	297
	W	3	500	500	500	.*

S – spring wheat, W – winter wheat; ±95 % CI – 95 % confidence interval

* – not applicable as single NIV positive winter wheat sample was detected

to similar studies conducted worldwide (Pasquali and Migheli 2014).

Primers used for identification of *F. culmorum* were shown to cross-react with gene sequences from other *Fusarium* species *F. cerealis* (Nicolaisen et al. 2009). The later species is yet to be detected in Lithuanian wheat by culture methods, therefore we assume that all *F. culmorum*-positive grain has not contained *F. cerealis* DNA. Moreover, *F. cerealis* so far has been associated only with NIV chemotype presence in grain, although this species was not studied extensively (Nielsen et al. 2012; Becher et al. 2013). In our study no NIV positive grain sample was also positive for *F. culmorum* (or *F. cerealis* for that matter). This is cannot be the conclusive evidence for *F. cerealis* non-presence in Lithuanian wheat, but taking into account the high degree of correlation between *F. culmorum* and 3ADON quantities in those grain samples from which pure *Fusarium* cultures were isolated, the possibility of substantial *F. cerealis* DNA quantities in grain seems very low.

The primers for chemotype quantification in grain were specially designed to avoid cross-reactivity and therefore 3ADON and NIV primers have slightly lower amplification efficiency than 15ADON primers (Nielsen et al. 2012). This shows in the quantification data (Table 3), where DNA quantities amplified by 15ADON primers have broader range in comparison to those amplified by 3ADON and NIV.

In our study *F. graminearum* isolates seem to be respecting the overall trend of chemotype distribution in Europe: 15ADON is the dominating chemotype in

regard to 3ADON and NIV, but the actual proportions of 15ADON/3ADON/NIV are somewhat shifted towards the 3ADON chemotype (Pasquali and Migheli 2014). The results are similar to those reported by Audenaert et al. (2009), but in latter study only *F. graminearum* isolates from winter wheat were analysed.

All three chemotypes were detected in *F. graminearum* isolates from spring wheat, which indicates considerable

Table 3 Correlations between presence and quantity of overall *Fusarium*, *F. graminearum*, *F. culmorum* and particular chemotype DNA in homogenized grain samples

	Fus	Fgr	15A	3A	NIV
Winter wheat, 2013 and 2014, N = 30					
Fgr	0.716**				
15A	0.460*	0.782**			
3A	0.253	0.585**	0.158		
NIV	0.106	0.110	−0.035	−0.083	
Fcu	0.203	−0.054	−0.077	−0.044	−0.037
Spring wheat, 2013 and 2014, N = 114					
Fgr	0.917**				
15A	0.162	0.373**			
3A	0.764**	0.826**	0.092		
NIV	0.155	0.155	−0.001	0.101	
Fcu	0.511**	0.414**	0.041	0.428**	−0.037

Fus-overall *Fusarium*, *Fgr*-*Fusarium graminearum*, *15A*-15ADON chemotype, *3A*-3ADON chemotype, *NIV*-NIV chemotype, *Fcu*-*Fusarium culmorum*

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

diversity in Lithuanian spring wheat *F. graminearum* populations in 2013, on the second year of FHB outbreak. The spatial chemotype distribution by region from which grain was collected shows that both 15ADON and 3ADON chemotypes were present in all regions (Fig. 3). Since there are no data on the chemotype of *F. graminearum* strains isolated from grain prior to 2013, there is no way to know what chemotypes were present in Lithuania before that time, or if the FHB outbreak in 2012 was initiated by any particular *F. graminearum* chemotype group. Previous studies show that shifts in chemotype composition of *F. graminearum* populations may occur and many of those were reported to be directed towards the increase of more aggressive 3ADON chemotype (Guo et al. 2008; Ward et al. 2008, Zhang et al. 2012), so 15ADON might have been even more prevalent in 2012.

Comparison of chemotype determination of pure *F. graminearum* cultures and chemotype detection in homogenized grain samples shows variance in proportions at which different chemotypes were detected (Fig. 5). Reasons why the chemotype prediction results of pure culture *F. graminearum* isolates are shifted towards 15ADON isolates are unclear. Based the obtained data, we were able to dismiss *F. culmorum* species as either the source of NIV, or the main source of 3ADON chemotype DNA in homogenized grain samples. For one, no *F. culmorum* DNA was present in NIV positive grain, and as for 3ADON, percentage of *F. culmorum* positive grain was several times lower (13 % in both spring and winter wheat) than that of 3ADON positive (84 % and 57 % respectively). Also statistical analyses show higher degree correlation between 3ADON and *F. graminearum* in homogenized spring ($r = 0.83$) and winter ($r = 0.59$) wheat grain than between 3ADON and *F. culmorum* in spring ($r = 0.43$) and winter ($r = -0.04$) wheat. This indicates that *F. culmorum* could be associated only with the lesser part of 3ADON chemotype in spring wheat and is not a source of 3ADON in winter wheat (Table 3).

All 5 NIV chemotype DNA containing grain samples were from 2013. The presence of this chemotype could not be attributed to *F. culmorum* grain infection as all these samples were *F. culmorum* negative. Therefore NIV chemotype is also likely to originate from *F. graminearum*, and at the moment this group of pathogens poses no threat to wheat as it was not detected in 2014 in grains from the same farms where it was present just 1 year earlier.

Table 4 Co-occurrence of 3ADON and 15ADON chemotypes in homogenized grain samples

Sample	Crop	Ct 3	Sd	Ct 15	Sd
1*	S	32.3	1.0	35.5	0.6
2*	S	32.0	0.8	36.7	0.3
5*	S	30.8	0.4	35.2	0.7
7*	S	34.2	0.4	34.2	0.9
8*	S	32.6	0.5	32.3	0.3
9*	S	33.8	0.5	33.9	0.7
12*	S	33.3	0.4	34.5	1.0
13*	S	30.6	0.2	35.9	0.2
16*	S	34.1	0.2	36.2	0.8
18*	S	37.1	1.0	32.0	0.4
19*	S	33.1	0.7	34.3	0.1
20*	S	31.4	0.1	33.0	0.2
21*	S	30.1	0.4	31.7	0.3
22*	S	30.4	1.0	31.1	0.4
23*	S	29.4	0.2	33.4	0.6
24*	S	33.2	0.9	33.7	0.4
25*	S	30.9	0.8	29.0	0.0
26*	S	29.9	0.0	28.1	0.1
27*	S	29.8	0.2	32.9	0.6
28*	S	36.2	0.7	30.9	0.7
29*	S	26.1	0.2	27.9	0.3
30*	S	27.3	0.1	30.0	0.4
31*	S	29.2	0.2	31.2	0.4
32*	S	28.0	0.3	28.1	0.4
33*	S	28.1	0.2	36.1	0.1
35*	S	27.9	0.5	30.4	0.4
37*	S	31.1	0.8	28.8	0.1
39*	S	28.6	0.2	28.2	0.3
40*	S	24.9	0.1	27.8	0.1
41*	S	25.8	0.0	27.0	0.1
42*	S	25.8	0.2	26.4	0.5
43*	S	36.1	0.5	36.1	0.5
44*	S	24.8	1.0	24.4	0.1
45*	S	29.1	0.9	29.7	0.3
46*	S	26.4	0.2	24.3	0.0
47*	S	28.5	0.1	31.5	0.5
48*	S	29.3	0.0	32.5	0.3
49*	S	28.3	0.1	30.3	0.7
50*	S	28.6	0.8	29.2	0.0
51*	S	27.1	0.2	28.0	0.2
53*	S	28.1	0.1	33.2	0.3
54*	S	29.8	0.2	27.4	0.5
55*	S	25.6	0.3	25.0	0.1
56*	S	36.5	0.7	26.6	0.4

Table 4 (continued)

Sample	Crop	Ct 3	Sd	Ct 15	Sd
57*	S	34.3	0.7	32.9	0.5
59*	S	33.3	0.1	32.6	0.6
61*	S	27.6	0.2	33.0	0.5
62*	S	25.8	0.2	27.0	0.3
63*	S	34.7	1.0	36.7	0.9
7E*	S	28.9	0.2	30.2	0.3
21E*	S	28.7	0.5	32.0	0.3
26E*	S	30.8	0.5	31.1	0.0
46E*	S	37.8	0.9	34.9	0.9
47E*	S	29.2	0.1	32.4	0.1
55E*	S	33.8	0.5	33.1	0.2
56E*	S	34.1	0.8	37.2	0.4
11*	W	31.4	0.2	33.4	0.2
15*	W	30.4	0.0	34.3	1.0
17*	W	34.1	0.2	33.4	0.4
36*	W	33.3	0.3	34.3	0.2
52*	W	28.6	0.2	29.7	0.4
65*	W	28.0	0.2	29.1	0.2
1**	S	31.3	0.9	30.6	0.3
2**	S	29.4	0.0	30.5	0.1
3**	S	31.9	0.6	31.4	0.0
7**	S	32.6	0.1	30.8	0.3
9**	S	33.9	0.4	33.1	1.0
10**	S	29.7	0.2	30.9	0.2
11**	S	28.9	0.0	31.1	0.8
12**	S	34.5	0.0	34.5	0.6
14**	S	27.3	0.2	32.7	0.9
15**	S	33.3	0.6	33.8	1.3
18**	S	33.6	0.1	29.6	0.4
19**	S	28.8	0.0	27.2	0.4
21**	S	28.9	0.0	27.9	0.4
22**	S	35.2	0.8	27.9	0.2
23**	S	31.8	0.0	27.5	0.0
25**	S	31.7	0.2	32.8	0.1
26**	S	35.4	0.6	32.4	0.5
29**	S	32.4	0.1	31.7	0.0
30**	S	28.6	0.0	30.9	0.5
31**	S	35.2	0.6	31.4	0.0
32**	S	28.0	0.1	28.4	0.2
34**	S	32.9	0.1	36.8	0.7
35**	S	34.3	0.3	33.6	0.2
36**	S	35.7	0.5	34.4	0.1
38**	S	31.9	0.4	30.2	0.6
39**	S	32.7	0.1	35.9	0.4

Table 4 (continued)

Sample	Crop	Ct 3	Sd	Ct 15	Sd
48**	S	27.4	0.9	33.3	0.1
57**	S	32.7	0.1	28.7	0.0
58**	S	34.1	0.3	33.5	0.0
59**	S	32.7	0.7	32.0	0.3
5**	W	32.3	0.4	35.4	0.5
17**	W	32.2	0.6	35.2	1.2
24**	W	32.9	0.2	38.3	0.6
52**	W	30.4	0.3	32.0	0.3
61E**	W	38.1	0.7	36.4	0.4

Other *Fusarium* species than *F. graminearum* or *F. culmorum* are known to produce B type trichothecene mycotoxins and therefore harbour the genes for their production (Nielsen et al. 2012; Becher et al. 2013). Some of them (e. g., *F. equiseti*) are easily distinguishable by morphological features and constitute negligible part of overall *Fusarium* grain infection in Lithuania, and therefore can be dismissed as substantial contributors to total quantities of chemotype DNA in grain. *F. poae* has been isolated at significant rates from Lithuanian winter wheat, but this species is associated with NIV production in cereals (Salas et al. 1999; Jestoi et al. 2008) and in our study only one winter wheat grain sample was found to be NIV positive.

The situation is much more complicated with the species of *Fusarium graminearum* complex (*Fg* complex), as they cannot be readily distinguished by morphological features (O'Donnell et al. 2004). The species specific primers we have been using in our study are supposed to detect nine of 11 species of the *Fg* complex, and the two species not covered by these primers (*F. cortaderiae* and *F. brasiliicum*) are endemic to South America (Nicolaisen et al. 2009). The nine detectable species by real-time PCR primers we have been using also have their geographical restrictions, and only *F. graminearum* sensu stricto seems not to be limited to regions outside Europe (Wang et al. 2011). This means unlikely presence of other *Fg* complex species in Lithuanian wheat grain, and, as they are hard to distinguish even when grown in pure culture, all detected quantity of *F. graminearum* DNA in grain was assigned to *F. graminearum* species without further details, just like it was done in the study by Nicolaisen et al. (2009).

The high incidence of 15ADON and 3ADON chemotypes in grain samples does not correspond to the results of the chemotype determination of pure cultures. Both 15ADON and 3ADON chemotypes are widespread in harvested grain, their incidence being higher in spring than winter wheat (88 % and 84 % in spring wheat, 70 % and 57 % in winter wheat, respectively). Regarding the pure culture chemotype determination results, 15ADON could be described as “dominant” in regard to 3ADON, but their incidence in grain samples indicates 3ADON is just as widespread as 15ADON is. Co-occurrence of 3ADON and 15ADON chemotypes in grain samples is high (Table 4), which indicates that 15ADON somehow may be easier to isolate than 3ADON fungi. A recent study on phenotypic traits of different *F. graminearum* chemotypes by Aamot et al. (2015) shows that 15ADON chemotype strains are more aggressive than 3ADON, which may explain why 15ADON is more often isolated from infected plant-heads, but the same study suggests that 15ADON grows slower than 3ADON on PDA at 20 °C and 25 °C, which contradicts our pure culture isolation results, where grain were plated on PDA and grown at 25 °C, but still 15ADON strains were dominant among those isolated. Some North American studies (Ward et al. 2008; Guo et al. 2008) indicate that aggressiveness levels of chemotypes are the other way around, with 3ADON strains considered to be the more aggressive ones. These contradictions suggest that genes encoding phenotypic traits for aggressiveness and growth rate that could have impact on isolation frequency of particular chemotype (either from infected heads or harvested grain) are not linked with trichothecene synthesis genes.

Acknowledgments The research was funded by the Lithuanian Research Council through the National Research Programme „Healthy and Safe Food“, grant number SVE-09/2014 (TRICHEMOTIPAI).

References

- Aamot, H. U., Ward, T. J., Brodal, G., Vrålstad, T., Larsen, G. B., Klemsdal, S. S., Elameen, A., Uhlig, S., & Hofgaard, I. S. (2015). Genetic and phenotypic diversity within the *Fusarium graminearum* species complex in Norway. *European Journal of Plant Pathology*, *142*, 501–519.
- Alexander, N. J., McCormick, S. P., Waalwijk, C., van der Lee, T., & Proctor, R. H. (2011). The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, *48*, 485–495.
- Audenaert, K., Van Broeck, R., Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., Höfte, M., & Haesaert, G. (2009). *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology*, *125*, 445–458.
- Becher, R., Miedaner, T. & Wirsal, S. G. R., (2013). Biology, Diversity, and Management of FHB-Causing *Fusarium* Species in Small-Grain Cereals. In F. Kempken (Ed.) *The Mycota XI. Agricultural Applications*, 2nd edition (pp.199–241). Berlin: Springer Verlag.
- Guo, X. W., Fernando, W. G. D., & Seow-Brock, H. Y. (2008). Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Disease*, *92*, 756–762.
- Jennings, P., Coates, M. E., Walsh, K., Turner, J. A., & Nicholson, P. (2004). Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, *53*, 643–652.
- Jestoi, M. N., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., & Yli-Mattila, T. (2008). In vitro and in vivo mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *41*, 545–558.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual*. Ames: Blackwell Publishing.
- Miller, J. D., Greenhalgh, R., Wang, Y. Z., & Lu, M. (1991). Trichothecene chemotypes of 3 *Fusarium* species. *Mycologia*, *83*, 121–130.
- Nicolaisen, M., Supronienė, S., Nielsen, L. K., Lazzaro, I., Spliid, N. H., & Justesen, A. F. (2009). Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, *76*, 234–240.
- Nielsen, L. K., Jensen, J. D., Nielsen, G. C., Jensen, J. E., Spliid, N. H., Thomsen, I. K., Justesen, A. F., Collinge, D. B., & Jørgensen, L. N. (2011). *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology*, *101*, 960–969.
- Nielsen, L. K., Jensen, J. D., Rodríguez, A., Jørgensen, L. N., & Justesen, A. F. (2012). *TRI2* based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, *157*, 384–392.
- O'Donnel, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C., & Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, *41*, 600–623.
- Pasquali, M., & Migheli, Q. (2014). Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 164–182.
- Sakalaukas, S., Stumbrienė, K., Supronienė, S., & Švėgžda, P. (2014). Changes in *Fusarium* Link species composition from Lithuanian wheat grain in years 2005–2007 to 2011–2013. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, *32*, 45–50.

- Salas, B., Steffenson, B. J., Casper, H. H., Tacke, B., Prom, L. K., Fetch, T. G., & Schwarz, P. B. (1999). *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease*, 83, 667–674.
- Supronienė, S., Justesen, A. F., Nicolaisen, M., Mankevičienė, A., Dabkevičius, Z., Semaškienė, R., & Leistrumaitė, A. (2010). Distribution of trichothecene and zearalenone producing *Fusarium* species in grain of different cereal species and cultivars grown under organic farming conditions in Lithuania. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17, 79–86.
- Supronienė, S., Mankevičienė, A., & Gaurilčikienė, I. (2011). The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and their associated mycotoxins in naturally infected winter wheat grain. *Plant Breeding and Seed Science*, 64, 123–130.
- Supronienė, S., Mankevičienė, A., Kadžienė, G., Kačergius, A., Feiza, V., Feizienė, D., Semaškienė, R., Dabkevičius, Z., & Tamošiūnas, K. (2012). The impact of tillage and fertilization on *Fusarium* infection and mycotoxin production in wheat grains. *Zemdirbyste-Agriculture*, 99, 265–272.
- Talas, F., Parzies, H. K., & Miedaner, T. (2011). Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum sensu stricto* populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 39–48.
- Wang, J.-H., Ndoye, M., Zhang, J.-B., Li, H.-P., & Liao, Y.-C. (2011). Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins*, 3, 1020–1037.
- Ward, T. J., Clear, R. M., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D. E., Gilbert, J., Geiser, D. M., & Nowicki, T. W. (2008). An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 473–484.
- Yang, F., Jensen, J. D., Spliid, N. H., Svensson, B., Jacobsen, S., Jørgensen, L. N., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., & Finnie, C. (2010). Investigation of the effect of nitrogen on severity of *Fusarium* head blight in barley. *Journal of Proteomics*, 73, 743–752.
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Zhang, Y., & Feng, J. (2012). Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PloS One*, 7, e31722.

Changes in *Fusarium* Link Species Composition From Lithuanian Wheat Grain in Years 2005-2007 to 2011-2013

Simonas Sakalauskas, Karina Stumbriene*, Skaidre Suproniene, Povilas Svegza

Laboratory of Microbiology Open Access Joint Research Centre for Agriculture and Forestry,
 Studentu 15A, Akademija, Kaunas distr., Lithuania

Abstract. Changes in *Fusarium* species composition from naturally contaminated spring and winter wheat grain from the years 2005-2007 to 2011-2013 are presented. In general, *Fusarium* infection spring wheat grain was much more frequent than in winter wheat. In 2005-2007 *F. avenaceum* was dominant in both crops, with *F. sporotrichioides*, *F. poae* and *F. culmorum* isolated at lower levels, and *F. graminearum*, *F. tricinctum*, *F. equiseti* and *F. oxysporum* were occasionally found on both spring and winter wheat. In 2011-2013, *F. avenaceum* lost its dominating status among *Fusarium* isolates in both crops, but the species composition of most frequently isolated fusaria in spring and winter wheat was quite different: *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* and *F. avenaceum* constituted the major part of fusaria isolated from spring wheat grain, while in winter wheat *F. poae*, *F. sporotrichioides* and the declining *F. avenaceum* were dominant.

Key words: *Fusarium*, spring wheat, winter wheat, grain infection.

Introduction

Fungi of genus *Fusarium* are the major plant pathogens of wheat and other small grain cereals, causing *Fusarium* head blight (FHB), root rot and seedling blight. Different *Fusarium* species vary in their contribution to yield loss and, especially, to grain contamination with mycotoxins, as particular species are able to produce mycotoxins of variable plant and animal toxicity levels.

Fusarium avenaceum and to lesser extent *F. poae*, *F. culmorum* and *F. sporotrichioides* were regarded as dominant species in Northern Europe (Uhlir, Jestoi & Parikka, 2007; Yli-Mattila, 2010). Other species, such as *F. equiseti*, *F. oxysporum* and *F. tricinctum* do not constitute a significant part of *Fusarium* isolated from wheat (Kačergius, Drik, Mankevičienė & Suproniene, 2008; Mačkinaitė & Kačergius, 2005; Mačkinaitė, Kačergius, Lugauskas & Repečkienė, 2006; Mankevičienė, Supronienė, Dabkevičius & Mačkinaitė, 2007; Supronienė *et al.*, 2012). In recent years the situation is changing with *F. graminearum*, one of the most harmful species in regard to mycotoxin production, establishing in the region (Yli-Mattila, 2010).

Fusarium species vary in their distribution, way of spreading, host specificity, pathogenicity level, toxicity to humans and animals, and other biological and ecological characteristics. Therefore, dominant *Fusarium* species in wheat are subject to crop type (spring or winter), crop kind, weather conditions and fungicide usage.

Of the species most often isolated from Lithuanian wheat, *F. avenaceum*, *F. culmorum*,

F. poae, *F. sporotrichioides* and *F. tricinctum* are commonly found in temperate regions of the world. *F. graminearum*, *F. equiseti* and *F. oxysporum* are considered to be cosmopolitan with no obvious geographical inclinations (Leslie & Summerel, 2006). *F. avenaceum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* are primarily regarded as soil saprophytes or weak pathogens and secondary invaders (Chelkowski, Manka, Kwasna, Visconti & Golinski 1989; Leslie & Summerel, 2006), though *F. avenaceum* is known to cause FHB – one of the most destructive wheat diseases (Kang, Zingen-Sell & Bucjenauer, 2005). Of the rest, only *F. sporotrichioides* not commonly known to cause FHB, and due to its ability to grow at extremely low temperatures is more likely to be associated with saprophytic way of life and is regarded as a weak pathogen (Leslie & Summerel, 2006). Toxicity is another important trait of *Fusarium* species: *F. tricinctum*, *F. oxysporum* and *F. avenaceum* are not associated with toxicity to humans and animals and lack the *tri5* gene, necessary for production of trichothecene mycotoxins (Tan & Niessen, 2003). Strains of *F. poae* were reported to produce nivalenol (NIV), but their toxicity generally regarded as low (Grabarkiewicz-Szczesna, Foremska, Kostecki, Golinski & Chelkowski, 1999; Leslie & Summerel, 2006). *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. equiseti* are all known as ZEA producers, but there is a significant diversity of synthesized trichothecenes among these species: *F. culmorum* produces DON, *F. graminearum* – DON and NIV, *F. sporotrichioides* – T-2 toxin, and *F. equiseti* – T-2 and NIV (Marasas *et al.*, 1984;

* Corresponding Author's email:
 Karina_stumbriene@yahoo.com

Kokkonen et al., 2010). Production of mycotoxins results in these species being connected with animal toxicoses, moreover, *F. oxysporum* and *F. equiseti* are known as human pathogens (Goldschmied, Friedman & Block, 1993).

Considering the variable physiological characteristics, the study of changes in *Fusarium* species composition and its connections to environmental conditions and agricultural practices might offer new insights for minimising damage to wheat caused by *Fusarium*.

Materials and Methods

Wheat grain samples: winter and spring wheat grain samples for analyses were collected during harvesting in the years 2005-2007 and 2011-2013 from field trials in Institute of Agriculture and commercial fields in Lithuania. A total of 277 samples was collected. (Table 1).

Grain samples were analysed in Plant Pathology and Protection Department and Laboratory of Microbiology of Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

For the laboratory analyses, grain samples of 1kg were taken and kept in a freezer at -20°C until the conduction of experiments. The agar plate method

was used for internal grain infection estimation. Grain was de-frosted up to room temperature and surface-sterilized for 3 minutes in 1 % NaOCl before plating into Petri-dishes containing potato dextrose agar (PDA: 250 g potatoes, 10 g glucose, 14 g agar, 1L of distilled water) and incubated for 7–8 days at 25±2°C in dark (Mathur & Kongsdal, 2003). Fungal grain infection incidence was expressed in percentage. The overgrown *Fusarium* colonies were isolated, purified and identified according to Nelson, Toussoun, & Marasas (1983) and Leslie & Summerell (2006).

Data analysis was done by comparing average values of two 3-year periods: 2005-2007 and 2011-2013.

Results

Dominant *Fusarium* species tend to vary between spring and winter wheat, and 2005-2007 and 2011-2013 year periods. 35.33% of spring wheat grain was infected with *Fusarium* in 2005-2007 (Fig. 1). *F. avenaceum* being clearly dominant species among these isolates, infecting 17.63% of grain (Fig. 2). Other frequently isolated *Fusarium* was 3 to 4 times less abundant: *F. culmorum* was isolated from 5.73% of grain, *F. sporotrichioides* – 4.47%, and *F. poae* – 4.37%. *F. tricinctum* and *F. equiseti* were

Table1

No. of wheat samples collected for analysis each year

Year	No. of spring wheat samples	No. of winter wheat samples
2005-2007	44	102
2011-2013	79	52

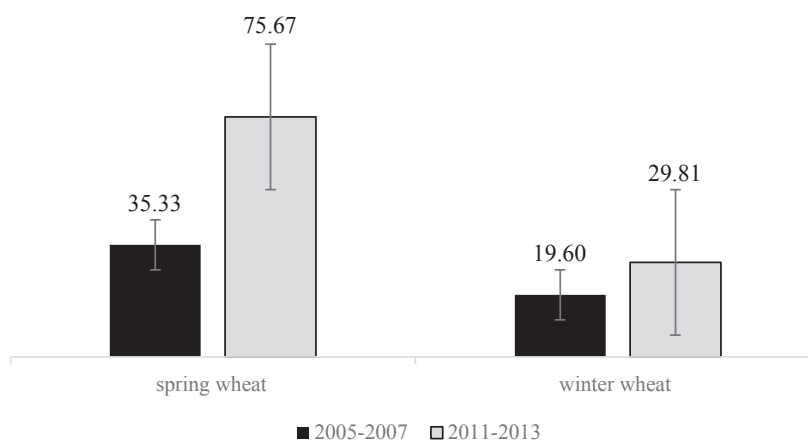


Fig.1. Total count of *Fusarium* infected grain, %.

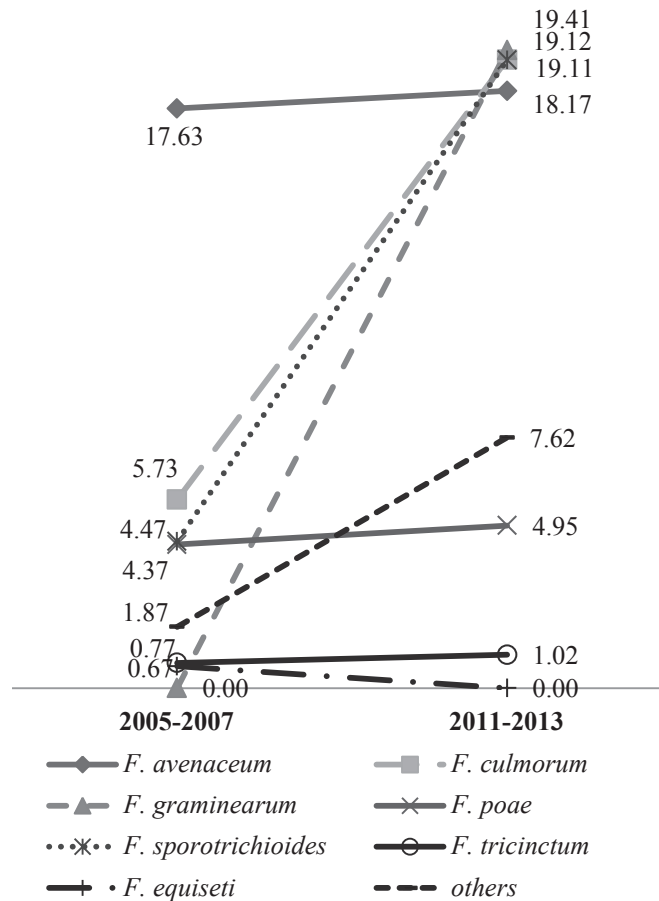


Fig. 2. Changes in *Fusarium* species composition in spring wheat from the years 2005-2007 to 2011-2013, %.

even less common with 0.77% and 0.67% infected grain, respectively. Only solitary *F. oxysporum* and *F. graminearum* isolates were detected in several samples, with overall count of these species being negligible.

In 2011-2013 total part of *Fusarium* infected spring wheat grain increased to 75.67% (Fig. 1). This was mostly conditioned by an increase of *F. graminearum* (up to 19.41% infected grain), *F. sporotrichioides* (19.12%) and *F. culmorum* (19.11%), also the part of unidentified “other” fusaria rose to 7.62% (Fig. 2). Incidence of *F. avenaceum*, *F. poae* and *F. tricinatum* did not change significantly (to 18.17%, 4.95% and 1.02%, respectively), while only very few isolates *F. oxysporum* and *F. equiseti* were detected.

An average of 19.3% of winter wheat grain was infected with *Fusarium* in the years 2005-2007 (Fig. 1). *F. avenaceum* was also clearly dominant species with the incidence of 12.9% grain (Fig. 3). Other species were considerably less frequent: *F. poae* was found on 1.77%, *F. sporotrichioides* – 1.57,

F. culmorum – 0.57, and *F. tricinatum* on 0.33% of grain. *F. graminearum*, *F. equiseti* and *F. oxysporum* had very low occurrence. Other species were isolated from 1.97% of grain.

In the years 2011-2013 *Fusarium* fungi were isolated from 29.81% of grain (Fig. 1), the rise in infection incidence in most part associated with the rise of *F. poae* (isolated from 10.17% of grain) and *F. sporotrichioides* (8.14%) (Fig. 3). Incidence of *F. avenaceum* dropped almost twice to 6.77%. Changes in other *Fusarium* species occurrence were not that drastic: *F. graminearum* increased to 2.2%, *F. culmorum* – 2.16%, *F. tricinatum* – 1.87%, and *F. equiseti* to 0.04% of grain. Incidence of other fusaria on winter wheat grain remained similar as in 2005-2007.

Discussion

An increase in total *Fusarium* incidence from 2005-2007 to 2011-2013 was obvious in both spring and winter wheat, but in spring wheat this rise was

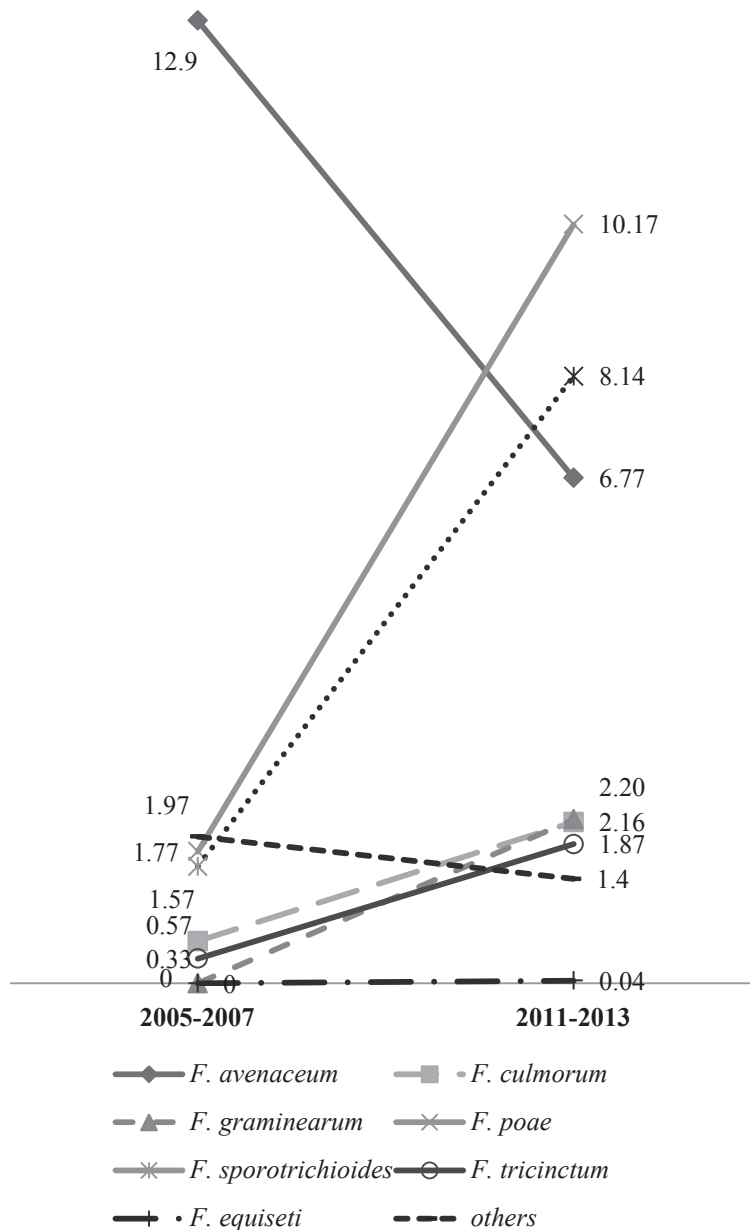


Fig. 3. Changes in *Fusarium* species composition in winter wheat from years 2005-2007 to 2011-2013, %.

especially steep with total count of *Fusarium* infected grain doubling. Generally, *Fusarium* infection level remained much higher in spring than in winter wheat in both time periods: 2005-2007 and 2011-2013.

There was only one dominant *Fusarium* species in both spring and winter wheat in the years 2005-2007, that is *F. avenaceum*. In this regard, the situation was similar to other parts of Northern Europe (Lõiveke, 2006; Treikale, Priekule, Javoisha, & Lazareva, 2010; Uhlig, Jestoi & Parikka, 2007). Other *Fusarium* species had much lower incidence on wheat grain,

and the presently dreaded spring wheat pathogen *F. graminearum* was rarely isolated.

The situation changed substantially in the years 2011-2013. In spring wheat grain there were now 4 dominant species of *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* and *F. avenaceum*. From agricultural point of view this change in species composition is very adverse, since incidence of fungi associated with toxicoses (*F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. culmorum*) and FHB (*F. graminearum* and *F. culmorum*) rather than those

of weak toxicity and pathogenicity (*F. poae* and *F. avenaceum*) has increased notably, considering the reports of *Fusarium* commonly isolated from wheat in Northern Europe (Yli-Mattila, 2010; Treikale, Priekule, Javoisha, & Lazareva, 2010).

F. poae, *F. sporotrichioides* and *F. avenaceum* could be regarded as dominant species in winter wheat in the years 2011-2013, although last one is in decline. Considering also that increase in overall incidence of *Fusarium* is slower than in spring wheat, the situation with winter crops seems somewhat better: there is only one reportedly toxigenic species of *F. sporotrichioides* among 3 dominant, and the incidence of only species commonly associated with FHB, *F. avenaceum*, is falling. The rise in incidence of toxigenic *Fusarium* in winter wheat was relatively slow, and the part of grain infected with unknown *Fusarium* species is not increasing – it could mean that no new kind of *Fusarium* infection is spreading in these crops.

Conclusions

1. The pattern of *Fusarium* species composition between periods of years 2005-2007 and 2011-2013 changed substantially in both spring and winter wheat with one dominant species of *F. avenaceum* being replaced by several dominant species.
2. An obvious increase of *F. sporotrichioides* was recorded in both spring and winter wheat between 2005-2007 and 2011-2013, while incidence dynamics of other species was dissimilar between spring and winter wheat.
3. Incidence increase of both total *Fusarium* and particular species was notably lower in winter wheat than in spring wheat.
4. Incidence increase in total *Fusarium* counts in spring wheat was in major part contributed by phytopathogenic and toxigenic species: *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, while in winter wheat – by relatively weak pathogens and toxin producers: *F. avenaceum*.

References

1. Chelkowski, J., Manka, M., Kwasna, H., Visconti, A. & Golinski, P. (1989). *Fusarium sporotrichioides* (Corda) Sacc. and *Fusarium poae* Wollenw.: cultural characteristics, toxigenicity and pathogenicity towards cereals. *Journal of Phytopathology*, 124: 155-161. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1989.tb04910.x.
2. Goldschmied, R. A., Friedman, J. & Block, C. S. (1993). *Fusarium* spp. isolated from non-ocular sites: a 10 year experience at an Israeli general

hospital. *Journal de Mycologie Medicale* 3: 99-102.

3. Grabarkiewicz-Szczesna, J., Foremska, E., Kostecki, M., Golinski, P. & Chelkowski, J. (1999). Trichothecene accumulation in kernels of corn inoculated with *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. *Nahrung*, 43: 330-332. DOI:10.1002/(SICI)1521-3803(19991001)43:5<330::AID-FOOD330>3.0.CO;2-4.
4. Kačergius, A., Drik, I., Mankevičiene, A., Suproniene, S. (2008). Distribution of fusaria in Lithuanian food grains in 2005-2007. // In Fourth Hungarian Conference of Mycology. Debrecen, Hungary. – ISSN 1217-8950, 2008, vol. 55 (No. 2), 204-205.
5. Kang, Z., Zingen-Sell, I. & Bucjenauer, H. (2005). Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 19-28. DOI: 10.1007/s10658-004-1983-9.
6. Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P. & Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 143: 17-25. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.015.
7. Leslie, J.F. & Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. – Blackwell Publishing, Iowa, USA Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006, 388.
8. Lõiveke, H. (2006). Incidence of *Fusarium* spp. on several field crops in Estonia and their toxicity towards *Bacillus stearothermophilus*. *Agronomy Research*, 4: 273-280.
9. Mačkinaitė, R. & Kačergius, A. (2005). Distribution of micromycetes, the potential mycotoxin producers, in stored wheat grains. *Botanica Lithuanica*, 11 (2): 111–118.
10. Mačkinaitė, R., Kačergius, A., Lugauskas, A. & Repečkienė, J. (2006). Contamination of cereal grain by *Fusarium* micromycetes and their mycotoxins under Lithuanian climatic conditions. *Ekologija*, 52 (3): 71–79. DOI: <http://dx.doi.org/10.6001/ekologija.vi3.1093>.
11. Mankevičienė, A., Supronienė, S., Dabkevičius, Z. & Mačkinaitė, R. (2007). The occurrence of fungi and mycotoxyn content in winter wheat grain in relation to harvesting time. *Zemdirbyste-Agriculture*, 94 (3): 162–175.
12. Marasas, W. F. O., Nelson, P. E. & Toussoun, T. A. (1984). *Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology*. University Park, Pennsylvania, USA: The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

13. Mathur, S. B. & Kongsdal, O. (2003). Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. ISTA, Copenhagen, Denmark: ISTA, 425.
14. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. University Park, Pennsylvania, USA: The Pennsylvania State University Press, University Park.193.
15. Supronienė, S., Mankevičienė, A., Kadžienė, G., Kačergius, A., Feiza, V., Feizienė, D., Semaškienė, R., Dabkevičius, Z., Tamošiūnas, K. (2012). The impact of tillage and fertilization on *Fusarium* infection and mycotoxin production in wheat grains. *Žemdirbystė (Agriculture)*, 99 (3): 265-272.
16. Tan, M.-K. & Niessen, L. M. (2003). Analysis of DNA ITS sequences to determine genetic relationship among, and provide basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research*, 107: 811-821.
17. Treikale, O., Priekule, I., Javoisha, B. & Lazareva, L. (2010) *Fusarium* head blight: distribution in wheat in Latvia. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 75 (4): 627-634.
18. Uhlig, S., Jestoi, M. & Parikka, P. (2007). *Fusarium avenaceum* – the North European situation. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 17-24. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.021.
19. Yli-Matilla, T. (2010). Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1): 7-18. DOI: 10.4454/jpp.v92i1.10.

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovei dr. Skaidrei Supronienei už disertacijos tematikos pasiūlymą, kantrybę, supratimą, palaikymą, už idėjas, kritines pastabas, už paramą vykdant disertacinio darbo tyrimus, už patarimus rengiant mokslines publikacijas ir ruošiant disertaciją, už suteiktas konsultacijas, už naudingus patarimus, už skatinimą dalyvauti mokslinėje veikloje, bei darbo konsultantei dr. Romai Semaškienei už patarimus ir pastabas.

Dėkoju LAMMC Žemdirbystės instituto Augalų patologijos ir apsaugos skyriui už suteiktą galimybę pasinaudoti įranga.

Dėkoju LAMMC Žemdirbystės instituto Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus mokslo darbuotojai dr. Akvilei Jonavičienei už pagalbą įrengiant ir prižiūrint lauko eksperimentus.

Nuoširdžiai dėkoju LAMMC ŽI Atviros prieigos žemės ir miškų jungtinių tyrimų centro Mirobiologijos laboratorijos kolektyvui už palaikymą, bendradarbiavimą, vertingus patarimus ir supratimą.

Dėkoju VU GMF Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedrai už bendradarbiavimą.

Dėkoju LAMMC ŽI direktoriui Gintarui Brazauskui už supratimą ir palaikymą. Taip pat savo draugei dr. Vitai Tilvikienei už paskatinimą studijuoti doktorantūroje ir supratimą, bei palaikymą.

Esu dėkinga savo šeimai.

PRIEDAI

I priedais (trys lentelės). Skirtingų *F. graminearum* izoliatų gebėjimas įsavinti anglies (PM1 ir PM2A) ir azoto (PM3B) šaltinius Biolog Phenotype Microarray 96 šulinėlių fenotipavimo mikroplokštelėse. Didžiosios raidės mikroplokštelės langeliuose žymi, kurių šaltinių neįsavana *F. graminearum* izoliatai: A (kamenas 18.10, 3ADON chemotipas), B (45.4.1, 3ADON chemotipas), D (40.1.1, 15ADON chemotipas) ir G (108, NIV chemotipas)

I attachment (three tables). Different ability of *F. graminearum* isolates to absorb sources of carbon (PM1 and PM2A) and nitrogen (PM3B) in Biolog Phenotype Microarray 96 wells phenotyping microplates. The boxes of the large lettering microplate indicate which sources of *F. graminearum* isolates are absent: A (strain 18.10, 3ADON chemotype) and B (45.4.1, 3ADON chemotype), D (40.1.1, 15ADON chemotype) and G (108, NIV chemotype)

1 lentelė. PM1 MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 L- Arabinose	A3 N-Acetyl- DGlucosa mine	A4 D- Sacchari c Acid	A5 Succini c Acid	A6 D- Galactos e	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D- Alanine	A10 D- Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
ABDG			D	D							D
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L- Fucose Acid	B5 D- Glucuro nic	B6 D- Gluconic Acid	B7 D,L- α - GlycerolPh osphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
AG	B					B	D		B	D	G
C1 D- Glucose- 6- Phosphate	C2 D- Galactonic Acid- γ - Lactone	C3 D,L- Malic Acid	C4 D- Ribose	C5 Tween 20	C6 L- Rhamnos e	C7 D- Fructose	C8 Acetic Acid	C9 α -D- Glucose	C10 Maltose	C11 D- Melbiose	C12 Thymidine
AG	ABD			B		G					
D-1 L- Asparagin e	D2 D- Aspartic Acid	D3 D- Glucosami nic Acid	D4 1,2- Propane diol	D5 Tween 40	D6 α - Keto- Glutaric Acid	D7 α -Keto- Butyric	D8 α - Methyl- DGalactoside	D9 α -D- Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
G	G	A				B				G	D

1 lentelės tęsinys PM1 MicroPlate™ Carbon Sources

E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----

L- Glutamine	m-Tartaric Acid	D- Glucose- 1- Phosphate	D- Fructose -6- Phosphate	Tween 80	α - Hydroxy Glutaric Acid- γ - Lactone	α -Hydroxy Butyric Acid	β -Methyl- DGlucoside	Adonitol	Maltotriose	2-Deoxy Adenosine	Adenosine
G	AG	B					G		G		G
F1 Glycyl-L- Aspartic Acid F5 Fumaric Acid	F2 Citric Acid B	F3 m-Inositol G	F4 D- Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid F9 Glycolic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G	B	G			BD		A				B
G1 Glycyl- LGlutamine Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L- Threonine	G5 L- Alanine	G6 L- Alanyl- Glycine	G7 Acetoacetic	G8 N-Acetyl- β - DMannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
	D		G	D	G	G	B			B	A
H1 Glycyl- L-Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m- Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D- Psicose	H6 L- Lyxose	H7 Glucuronic amide	H8 Pyruvic Acid	H9 L- Galactonic Acid- γ - Lactone	H10 D- Galacturonic Acid	H11 Phenylethylamine	H12 2- Aminoethanol
D			D		DG	BDG	ABD	D	G	DG	ABD

2 lentelė. PM2A MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 Chondroitin Sulfate C	A3 α-Cyclodextrin	A4 β-Cyclodextrin	A5 γ-Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
ABDG	D	G	G			G		ABDG	D	BD	G
B1 N-Acetyl-DGalactosamine	B2 N-Acetylneuraminic Acid	B3 β-D-Allose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabinol	B7 L-Arabinol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D-Ribose	B10 i-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-0-β-D-Galactopyranosyl-D-Arabinose
ABD	ABD	ADG		D				DG	A	DG	
C1 Gentiobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Malitol	C6 α-Methyl-D-Glucoside	C7 β-Methyl-D-Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 β-Methyl-D-Glucuronic Acid	C10 α-Methyl-D-Mannoside	C11 β-Methyl-D-Xyloside	C12 Palatinose
	ABD	B		D		D	ABD	G	AB		
D1 D-Raffinose	D2 Salicin	D3 Sedoheptulosan	D4 L-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turanose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D-Glucosaminitol	D10 γ-Amino Butyric Acid	D11 δ-Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
G		BD					A	A	D		
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Glucosamine	E6 2-Hydroxy Benzoic Acid	E7 4-Hydroxy Benzoic Acid	E8 β-Hydroxy Butyric Acid	E9 γ-Hydroxy Butyric Acid	E10 α-Keto-Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 5-Keto-D-Gluconic Acid
DG		B						B			G

2 lentelės tęsinys. PM2A MicroPlate™ Carbon Sources

F1 D- Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Methylbionic Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D- Ribono-1,4- Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D- Tartaric Acid	F12 L- Tartaric Acid
ABDG	D	B	BD	AD		AG			G	ABG	BD
G1 Acetamide	G2 L- Alaninamide	G3 N- Acetyl- LGlutamic Acid	G4 L- Arginine	G5 Glycine	G6 L- Histidine	G7 L- Homoserine	G8 Hydroxy- LProline	G9 L- Isoleucine	G10 L- Leucine	G11 L- Lysine	G12 L- Methionine
ABDG		D		B		DG		D	D	ABDG	BDG
H1 L- Ornithine	H2 L- Phenylalanine	H3 L- Pyroglutamic Acid	H4 L- Valine	H5 D,L- Carnitine	H6 Sec- Butylamine	H7 D,L- Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3- Butanediol	H11 2,3- Butanedione	H12 3- Hydroxy 2- Butanone
A	D		D	BG	ABDG	ABG	G	ADG		ABDG	ABDG

3 lentelė. PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
ABDG											
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
				D							D
D1 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
D				D							
E1 Histamine	E2 β-Phenylethylamine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D-Glucosamine	E12 N-Acetyl-D-Galactosamine
F1 N-Acetyl-D-Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine

3 lentelės tęsinys. PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources

G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L- α- Amino- NButyric Acid	G8 γ- Amino- NButyric Acid	G9 ε- Amino- NCaproic Acid	G10 D,L-α- AminoCaprylic Acid	G11 δ- Amino- NValeric Acid	G12 α- Amino- NValeric Acid
H1 Ala- Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala- Glu	H4 Ala- Gly	H5 Ala- His	H6 Ala- Leu	H7 Ala- Thr	H8 Gly- Asn	H9 Gly- Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly- Met	H12 Met- Ala
A	D		D					D	G		AD
									B		A

GYVENIMO APRAŠYMAS (CV)

Karina Stumbrienė

El. paštas: karina.stumbriene@gmail.com

Gimimo data: 1978 06 11

Išsilavinimas

2013–2017 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro filialo Žemdirbystės instituto, Atviros prieigos Žemės ir miškų jungtinio tyrimų centro Mikrobiologijos laboratorijos, Žemės ūkio mokslų srities, Agronomijos mokslo krypties doktorantė. Disertacijos tema „Grybo *Fusarium graminearum* populiacijos tyrimai Lietuvoje. Vadovė dr. Skaidrė Supronienė;

2005–2007 m. Lietuvos žemės ūkio universitetas (nuo 2011 m. Aleksandro Stulginskio universitetas), įgytas mechanikos inžinerijos magistro laipsnis;

1999–2005 m. Lietuvos žemės ūkio universitetas (nuo 2011 m. Aleksandro Stulginskio universitetas), įgytas mechanikos inžinerijos bakalauro laipsnis.

Profesinė patirtis

2014–2017 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro filialo Žemdirbystės instituto, Atviros prieigos Žemės ir miškų jungtinio tyrimų centro Mikrobiologijos laboratorija, jaunesnioji mokslo darbuotoja.

2006–2014 m. UAB „Germeda“, projektuotoja;

Kvalifikacijos tobulinimas

- 2016 04 11–13 – Elektroninio mikroskopo Quanta 650 naudojimo kursai
- 2016 01 08 – seminaras „Scientific Writing“. ASU
- 2016 01 07 – seminaras „Animal Welfare and Food Quality. Organic Farming ant Welfare“. ASU
- 2015 10 – kursai „Elektroninio mikroskopo Quanta 650 naudojimas“. LAMMC
- 2014 09 30 – konferencija „Mokslo dienos 2014“, „Thermo Fisher Scientific“. Kaunas
- 2013 11 13–15 – mokymai „Biolog Microbial Identification Training“. LAMMC
- 2013 10 21–25 – mokymai „Programavimo pagrindai ir taikomoji statistika su R programa žemės ūkiui“. LAMMC
- 2013 10 – projekto „Universitetinių žinių ir technologijų perdavimo gebėjimų stiprinimas (UniGeb)“ mokymai „Unifikuotos ir unikalios mokslinės metodikos inovatyviems žemės ir miškų mokslų tyrimams“ (Nr. VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-007). LAMMC (42 val.)

Dalyvavimas mokslo programose bei projektuose

- 2014–2015 m. projektas „Trichotecenus produkuojančių *Fusarium* spp. chemotipų sudėtis javuose, jų patogeniškumas ir kontrolė“ (registracijos Nr. SVE-14023) pagal Nacionalinę mokslo programą „Sveikas ir saugus maistas“; vykdytoja.
- 2014–2015 m. LR ŽŪM remiamas Žemės ūkio, maisto ūkio ir žuvininkystės MTTV projektas „Pluoštinių kanapių kaip priešsėlio įtakos javų ligų ir kenkėjų plitimo kontrolei tyrimai“; vykdytoja.

PAGRINDINIAI MOKSLO DARBAI

Straipsniai leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą duomenų bazėje „Clarivate Analytics Web of Science“

- Suproniene S., Sakalauskas S., **Stumbriene K.**, Zvirdauskiene R., Svegzda P. 2016. Variances in trichothecene chemotype distribution in Lithuanian wheat grain and within pure culture *Fusarium graminearum* isolated from the same grain samples. *European Journal of Plant Pathology*, 144 (2): 371–381. **IF – 1,478 (2016)**

Straipsniai recenzuojamuose periodiniuose leidiniuose

- Sakalauskas S., **Stumbriene K.**, Suproniene S., Svegzda P. 2014. Changes in *Fusarium* Link species composition from Lithuanian wheat grain in years 2005–2007 to 2011–2013. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, 32 (327): 45–50 DOI: 10.2478/plua-2014-0002.

Mokslo populiarinimo straipsniai

- **Stumbrienė K.**, Supronienė S., Mankevičienė A., Gruzdevienė E., Švėgzda P. 2015. Ar kanapės tinkamas kviečių priešėlis? *Mano ūkis*, Nr. 6, p. 30–32.
- Supronienė S., Sakalauskas S., **Stumbrienė K.**, Švėgzda P., Žvirdauskienė R. 2015. Kad grūdai būtų sveiki. *Mano ūkis*, Nr. 4, p. 24–28.