

***Fusarium temperatum* znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności**

Kierownik zadania: prof. dr hab. Wojciech Wakuliński

Zadanie nr 92 realizowane na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, dofinansowane na podstawie rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U., poz. 1170).

Fuzarioza kolb kukurydzy jest uważana za jeden z najważniejszych problemów w uprawie tej rośliny. Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu, uzyskiwaniem ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniu metabolitami wtórnymi *Fusarium* spp. Jest to choroba o złożonej etiologii a wśród czynników sprawczych wymienia się między innymi: *F.graminearum*, *F.culmorum*, *F.avenaceum*, *F.verticillioides*, *F.subglutinans*, *F.proliferatum*. O ile ocena znaczenia wymienionych gatunków była przedmiotem licznych analiz i opracowań, o tyle wiedza na temat porażenia kukurydzy (odmian, linii hodowlanych) przez *F.temperatum* jest fragmentaryczna.

Podjęte zostały badania, których celem była:

- Analiza populacji *F.temperatum* w zakresie cech istotnych w patogenezie i epidemiologii fuzariozy kolb kukurydzy
- Ocena linii hodowlanych *Z.mays* pod kątem zawartości amylozy w ziarniakach oraz podatności na porażenie przez *F.temperatum*
- Analiza zawartości profilu metabolitów wtórnych (mykotoksyn) występujących w materiale roślinnym porażonym przez *F.temperatum*

Izolaty *Fusarium temperatum* (70) pochodziły z ziarniaków uzyskanych z kolb kukurydzy wykazujących objawy fuzariozy rozwijającej się w następstwie infekcji naturalnych. Izolację i identyfikację *Fusarium* spp. prowadzono z wykorzystaniem standardowych metod mających zastosowanie w diagnostyce mykologicznej. Wiarygodność diagnostyki była potwierdzana molekularnie. Analiza molekularna opierała się na sekwencjonowaniu ITS, EF-1 α oraz β -tubuliny uznawanych za podstawowe markery barkodingu grzybów.

Profil metabolitów wtórnych biosyntetyzowanych przez *F.temperatum* zbadano dla 25 izolatów. Analiza została przeprowadzona w kierunku występowania fumonizyn (FB₁ i FB₂), pochodnych trichothecenowych (DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV) fuzarenonu oraz pochodnych heptadepsyptydowych (BEA i ENN).

Uzyskane wyniki wskazują, że za typowe dla tego gatunku należy uznać związki heptadepsydowe (BEA i ENN). Na ryżu średni poziom BEA dla populacji przebadanych izolatów wynosił 406 ppm oraz 81,78 ppm w przypadku ENN. Na drugim z zastosowanych podłoża (ziarniak kukurydzy) zdolność do biosyntezy związków heptadepsyptydowych (BEA i ENN) stwierdzono dla 24 z 25 przebadanych pod tym kątem izolatów *F.temperatum*. Wydajność biosyntezy BEA wahała się od 3,80 ppm do 112,7 ppm, natomiast ENN od 23,1 do 267,2 ppm. Niezależnie od zastosowanego podłoża żaden spośród przebadanych izolatów nie tworzył pochodnych trichothecenowych, w tym DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV a także fuzarenonu. Dalszych badań wymaga możliwość biosyntezy przez *F.temperatum* fumonizyn, której śladowe ilości stwierdzono w przypadku pojedynczego izolatu.

Dla 35 spośród 70 uzyskanych izolatów *F.temperatum* przeprowadzono ocenę patogeniczności metodą „toothpicks”. Inokulowane były 7 tygodniowe rośliny kukurydzy poprzez wprowadzenie w łodygę wykałaczką przerośniętej grzybnią badanego izolatu. Po okresie 2 tygodni od momentu inokulacji rośliny były ścinane, pędy krojone a rozmiar nekrozy mierzony. Aczkolwiek wszystkie izolaty powodowały zmiany chorobowe inokulowanych roślin, stwierdzono istotne

zróznicowanie tej cechy. Izolaty najsilniej patogeniczne (PFt-1, Pft-2, Pft-3, Pft-4 oraz Pft-5) zostały następnie wykorzystane w badaniach polowych, z zakresu oceny podatności materiału hodowlanego.

Materiał badawczy do badań z zakresu podatności *Zea mays* na porażenie przez *Fusarium temperatum* stanowiły linie kukurydzy *Zea mays* ssp. *indentata* (dent) oraz *Zea mays* ssp. *indurata* (flint). Doświadczenie zostało założone na terenie pól doświadczalnych IHAR w Radzikowie, Hodowli Roślin Smolice (HRS) i Małopolskiej Hodowli Roślin Oddział w Kobierzycach (MHROK). W badaniach uwzględniono ogółem 120 genotypów, każdy wysiany w dwóch miejscowościach. Inokulum w doświadczeniu infekcyjnym stanowiła zawiesina zarodników o mianie 10^6 / ml, wprowadzana do kolb metodą „nail punch”. Inokulację kukurydzy przeprowadzano w fazie R2 jej rozwoju. Stopień porażenia inokulowanych kolb kukurydzy szacowano w fazie dojrzałości zbiorczej w oparciu o 6 punktową skalę.

Zakres zmienności analizowanej cechy wahał się od 1.30 do 4.35. Stwierdzono istotny wpływ środowiska na stopień porażenia kolb przez *F.temperatum*. Istotnie silniej kolby były porażane w Kobierzycach (2.73) i Smolicach (2.83) niż w Radzikowie (2.30). Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowaną podatność materiałów hodowlanych na porażenie a zmienność porażenia miała charakter ciągły. Taki rozkład cechy jest typowy dla interakcji gospodarz patogen o charakterze rasowo nispecyficznym a zatem dość typowym przy ocenie porażenia roślin przez *Fusarium* spp. Formy flint kukurydzy były istotnie słabiej porażane niż dent a stopień ich porażenia wynosił odpowiednio 2.43 i 2.79. Zależność taką obserwowano w przypadku wszystkich trzech lokalizacji doświadczenia, niezależnie od źródła pochodzenia (hodowli) materiału. Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie mniejszej podatności na porażenie form flint niż dent. W sezonie 2015 wyniki takie uzyskano w doświadczeniach inokulacyjnych we wszystkich trzech lokalizacjach (Kobierzyce, Smolice i Radzików).

Określenie procentowego udziału amylozy w ogólnej zawartości skrobi przeprowadzono dla 240 prób ziarniaków kukurydzy pochodzących z doświadczeń założonych na terenie pól doświadczalnych Hodowli Roślin Smolice (60 prób) Sp. z o. o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin oddział w Kobierzycach (60 prób) oraz Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin IHAR Radzików (120 prób). Zakres zmienności tej cechy wahał się od 19,55% do 35,55% i od 20,29% do 35,00% odpowiednio dla form typu flint i dent, przy średnim udziale amylozy w strukturze skrobi odpowiednio: 28,58% i 27,54%.

Ziarniaki kukurydzy pochodzące z doświadczeń inokulacyjnych analizowano także pod kątem zawartości ergosterolu oraz metabolitów wtórnych *F.temperatum*. W porażonych ziarniakach stwierdzono występowanie pochodnych heptadepsydowych – beauwerycyny (BEA) i eniatyny (ENN). Średni poziom tych związków wynosił odpowiednio 8,57 i 11,77 ppm. Czynniki wpływającymi w sposób istotny na poziom wspomnianych metabolitów był genotyp oraz środowisko. Stwierdzono także występowanie istotnej korelacji pomiędzy zawartością BEA i ENN (0,55) oraz ergosterolu i BEA (0,47).

W podsumowaniu

- Analizy sekwencji EF-1 α oraz β tubuliny pozwalają na jednoznaczną diagnostykę *F.temperatum*
- Gatunek *F.temperatum* jest istotnym producentem pochodnych z grupy heptadepsypeptydów i istnieje duże ryzyko zanieczyszczenia tymi metabolitami kolb kukurydzy w warunkach infekcji naturalnej
- Słabo rozpoznaną cechą pozostaje zdolność do biosyntezy fumonizyn przez *F.temperatum*
- Istnieje znaczące zróżnicowanie podatności materiałów hodowlanych kukurydzy na porażenie przez *F.temperatum* a wyraźną tendencją jest silniejsze porażenie form dent niż flint