

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

Kierownik zadania: dr inż. Marcin Wit

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 (FKK) jest chorobą o złożonej etiologii. W kompleksie czynników sprawczych wymienia się szereg gatunków *Fusarium* w tym: *F.acuminatum*, *F.anthophilum*, *F.avenaceum*, *F.culmorum*, *F.equiseti*, *F.graminearum*, *F.oxysporum*, *F.poaie*, *F.proliferatum*, *F.subglutinans*, *F.sporotrichioides*, *F.tricinatum*, *F.verticillioides*. Grzyby te są znane ze swojej aktywności toksynotwórczej. O ile ocena znaczenia wymienionych gatunków była przedmiotem licznych analiz i opracowań, o tyle wiedza na temat porażenia kukurydzy (odmian, linii hodowlanych czy też genotypów) przez *Fusarium temperatum* jest fragmentaryczna. Znaczenie tego nowego patogena na świecie z uwagi na zagrożenie związane z występowaniem metabolitów wtórnych w porażonych kolbach było inspiracją do realizacji badań, których celem była:

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

Izolaty *F.temperatum* pochodziły z ziarniaków uzyskanych z kolb wykazujących objawy fuzariozy rozwijającej się w następstwie infekcji naturalnych. Izolację i identyfikację prowadzono z zastosowaniem standardowych metod mających zastosowanie w diagnostyce mykologicznej *Fusarium*. Wiarygodność diagnostyki była potwierdzana molekularnie. Analiza molekularna opierała się na sekwencjonowaniu *EF-1a* oraz β -tubuliny uznawanych za podstawowe markery barkodingu. Określono również frekwencję występowania dopełniających typów kojarzeniowych *MATI-1* i *MATI-2*. W badanej populacji izolatów *F.temperatum* wyniosła ona odpowiednio 42 do 28.

Profil metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez *F.temperatum* zbadano dla 70 izolatów, dla których biosyntezę metabolitów prowadzono na ziarniakach kukurydzy i ryżu. Analiza została przeprowadzona w kierunku występowania fumonizyn (FB_1 i FB_2), pochodnych heptadepsyptydowych (BEA i ENN) oraz ergosterolu (ERG). Na ziarniakach kukurydzy i ryżu żaden z przebadanych 70 izolatów grzyba nie wytwarzał fumonizyn.

Na ziarniakach ryżu i kukurydzy, spośród przebadanej populacji *F.temperatum* 60 izolatów syntetyzowało beauwerycynę (BEA). Na ryżu śladowe ilości eniatyn (ENN) zanotowano w przypadku 21 izolatów. Średni poziom BEA dla populacji przebadanych izolatów wynosił 425,35 ppm. Ilościowo na ryżu najwięcej BEA biosyntetyzował izolat PFt 264 (2073,70 ppm), najmniej izolaty: PFt 201, PFt 221, PFt 238, PFt 239, PFt 240, PFt 245, PFt 254, PFt 258, PFt 259 i PFt 261 (0,00 ppm). Najniższy poziom 12,24 ppm ergosterolu na ryżu zanotowano w przypadku izolatu PFt-221, zaś najwyższą wartość tego metabolitu 4110,64 ppm wykazał izolat o numerze PFt-234. Na kukurydzy śladowe ilości eniatyn (ENN) wykryto pośród 24 izolatów. Średni poziom BEA dla populacji przebadanych izolatów wynosił 121,52 ppm. Ilościowo na kukurydzy najwięcej BEA biosyntetyzował izolat PFt 234 (514,38 ppm), najmniej zaś izolaty: PFt 221, PFt 223, PFt 238, PFt 239, PFt 240, PFt 245, PFt 254, PFt 258, PFt 259 i PFt 261 (0,00 ppm). Najniższy poziom 2,14 ppm ergosterolu na kukurydzy zanotowano w przypadku izolatu PFt 240, zaś najwyższą wartość tego metabolitu 716,39 ppm wykazał izolat o numerze PFt 234.

Ocenę patogeniczności przeprowadzono metodą „toothpicks” dla 70 izolatów *F.temperatum*. 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 zróżnicowanie tej cechy w obrębie badanej populacji patogenów. Izolatami dającymi najbardziej rozległe zmiany na pędach inokulowanych roślin były: PFt-270, PFt-226, PFt-232, PFt-242 oraz PFt-218. Izolaty te użyte zostały do oceny podatności genotypów kukurydzy na *F.temperatum* w doświadczeniach polowych.

Materiał badawczy do badań z zakresu podatności *Zea mays* na porażenie przez *F.temperatum* stanowiły linie kukurydzy *Zea mays* ssp. *indentata* (dent) oraz *Zea mays* ssp. *indurata* (flint). Doświadczenie było realizowane

w 2017 roku, na terenie pól doświadczalnych IHAR (PIB) w Radzikowie, Hodowli Roślin Smolice (HRS) i Małopolskiej Hodowli Roślin Oddział w Kobierzycach (MHROK), gdzie ocenie poddawano odpowiednio 120, 60 i 60 obiektów. Zgodnie z założeniami podatność każdego genotypu na porażenie przez *F.temperatum* była oceniana w dwóch lokalizacjach. 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 dla badanych genotypów wahał się od 0,90 do 4,22. Stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzyce (2,21) i HRS Smolice (1,83) różnił się nieznacznie, lecz różnica ta była istotna statystycznie. Stwierdzono istotny wpływ środowiska na stopień porażenia kolb kukurydzy przez *F.temperatum*. Istotnie silniej kolby były porażane w Kobierzycach (2,22) i Radzikowie (2,01), niż w Smolicach (1,82). 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 niespecyficznym, a zatem dość typowym przy ocenie porażenia roślin przez *Fusarium* spp. Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie mniejszej podatności na porażenie form flint niż dent, a stopień ich porażenia wynosił odpowiednio 1,90 i 2,17. Zależność taką obserwowano w przypadku dwóch lokalizacji doświadczenia tj. Smolice i Radzików. Porażenie form flint i dent wynosiło odpowiednio w Smolicach 1,57 i 2,29, Radzikowie 1,94 i 2,10. Natomiast średni stopień porażenia form flint i dent w Kobierzycach wynosił odpowiednio 2,25 i 2,20, lecz różnica ta nie była istotna statystycznie.

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 (PIB) Radzików (120 prób). Zakres zmienności tej cechy wahał się od 24,38% do 38,78% i od 21,46% do 39,50%, odpowiednio dla form typu flint i dent.

Ziarniaki kukurydzy pochodzące z doświadczeń inokulacyjnych analizowano także pod kątem zawartości beauwerycyny (BEA) oraz ergosterolu (ERG). Łącznie analizami objęto 240 prób ziarniaków pochodzących z doświadczeń polowych prowadzonych na terenie wyżej wymienionych lokalizacji. W porażonych ziarniakach stwierdzono występowanie beauwerycyny. W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 8,06 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 6,96 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 4,20 ppm i 3,60 ppm, odpowiednio dla dwóch wyżej wymienionych lokalizacji. W materiałach hodowli Kobierzyce średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 7,42 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 5,08 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość BEA wynosiła 6,91 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 7,80 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość ergosterolu w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 23,37 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 23,84 ppm (doświadczenie w Radzikowie), natomiast w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 13,70 ppm i 13,18 ppm, odpowiednio dla doświadczeń zlokalizowanych w Smolicach i Radzikowie. W materiałach hodowli Kobierzyce w próbach ziarniaków kukurydzy typu dent średnia zawartość ERG wynosiła 18,57 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 15,11 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego związku wynosiła 16,01 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 21,75 ppm (doświadczenie w Radzikowie).

W podsumowaniu

- Sekwencje *EF-1α* oraz β tubuliny umożliwiają jednoznaczną diagnostykę *F.temperatum*
- Występowanie idiomorfów *MATI-1* i *MATI-2* wśród izolatów *F.temperatum* wskazuje na potencjalną możliwość występowania *in-vivo* teleomorfy badanego gatunku
- Gatunek *F.temperatum* jest istotnym producentem pochodnych beauwerycyny oraz eniatyn, istnieje zatem duże ryzyko zanieczyszczenia tymi metabolitami kolb kukurydzy w warunkach infekcji naturalnej
- Dość skąpe i sprzeczne doniesienia literaturowe w zakresie spektrum biosyntetyzowanych metabolitów przez *F.temperatum* wskazują na potrzebę kontynuowania prac w tym zakresie
- *F.temperatum* jest gatunkiem, którego patogeniczność jest porównywalna z gatunkami *Fusarium* spp., których występowanie powoduje istotne lub bardzo istotne straty w produkcji roślin zbożowych
- Istnieje znaczące zróżnicowanie podatności materiałów hodowlanych kukurydzy na porażenie przez *F.temperatum* a wyraźną tendencją jest silniejsze porażenie form dent niż flint