

# ***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 § 9 ust. 1 i ust. 6 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, z późn. zm.).

Fuzarioza kolb kukurydzy jest uważana za jeden z najważniejszych problemów w uprawie tej rośliny. Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu, uzyskiwaniu ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniu metabolitami wtórnymi *Fusarium* spp. Jest to choroba o złożonej etiologii, a wśród czynników sprawczych wymienia się między innymi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* i *Fusarium proliferatum*. O ile ocena znaczenia wymienionych gatunków była przedmiotem licznych analiz i opracowań, o tyle wiedza na temat porażenia kukurydzy (odmian, linii hodowlanych) 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  $\beta$ -*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 35 do 35.

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 heksadepsyptydowych ( $BEA$  i  $ENN$ ) oraz ergosterolu ( $ERG$ ). W obrębie analizowanej populacji *F.temperatum*, dla 5. izolatów, na każdym z zastosowanych podłoży (ziarniaki ryżu i kukurydzy) wykryto śladowe ilości fumonizyny  $FB_1$ .

Wśród 70. analizowanych izolatów *F.temperatum*, na ziarniakach ryżu i kukurydzy bowerycyne syntetyzowało odpowiednio 66 i 69 izolatów. Na ryżu, średni poziom tego metabolitu wynosił 812,01 ppm, zaś na kukurydzy 140,98 ppm. Ilościowo na podłożu ryżowym najwięcej  $BEA$  biosyntetyzował izolat Pft 348 (3582,55 ppm), najmniej zaś izolat Pft 309 (1,55 ppm). Na ziarniakach kukurydzy najwięcej  $BEA$  produkował izolat Pft 326 (761,25 ppm), najmniej natomiast izolat Pft 313 (4,28 ppm).

Na ryżu, wśród 70. analizowanych izolatów *F.temperatum*, 50 izolatów syntetyzowało eniatynę A1 ( $ENN A1$ ). Średni poziom  $ENN A1$  dla populacji przebadanych izolatów wynosił 37,09 ppm. Na podłożu ryżowym 19 izolatów tworzyło eniatynę A ( $ENN A$ ). Średni poziom tego metabolitu dla populacji przebadanych izolatów grzyba wynosił 5,27 ppm. Ponadto 11 izolatów *F.temperatum* produkowało eniatynę B ( $ENN B$ ). Średni poziom  $ENN B$  dla populacji przebadanych izolatów wynosił 3,51 ppm. Pośród 70. analizowanych izolatów *F.temperatum* 57 izolatów syntetyzowało eniatynę B1 ( $ENN B1$ ), której średni poziom wynosił 48,81 ppm. Na ryżu średni poziom ergosterolu dla populacji przebadanych izolatów wynosił 181,22 ppm. Najwyższy poziom (428,10 ppm)  $ERG$  zanotowano w przypadku izolatu Pft 333, zaś najniższy poziom tego metabolitu (15,70 ppm) wykazał izolat o numerze Pft 338.

Na ziarniakach kukurydzy wszystkie izolaty biosyntetyzowały eniatynę A1 ( $ENN A1$ ). Średni poziom  $ENN A1$  dla populacji przebadanych izolatów wynosił 52,18 ppm. Pośród 70. analizowanych izolatów *F.temperatum* 17 izolatów produkowało eniatynę A ( $ENN A$ ). Średni poziom  $ENN A$  dla populacji przebadanych izolatów wynosił 24,74 ppm. Ponadto 18 izolatów *F.temperatum* tworzyło eniatynę B ( $ENN B$ ). Średni poziom tego metabolitu dla populacji przebadanych izolatów wynosił 72,74 ppm. Wśród 70. izolatów *F.temperatum*, 11 izolatów tworzyło eniatynę B1 ( $ENN B1$ ). Średni poziom  $ENN B1$  wynosił 30,84 ppm. Na kukurydzy średni poziom ergosterolu dla populacji przebadanych izolatów wynosił 282,28 ppm. Najniższy poziom (29,20 ppm) ergosterolu zanotowano w przypadku izolatu Pft 326, zaś najwyższą wartość tego metabolitu (761,40 ppm) wykazał izolat o numerze Pft 350.

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-349, Pft-362, Pft-363, Pft-352 i Pft-322. 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* var. *indentata* (dent) oraz *Zea mays* var. *indurata* (flint). Doświadczenie było realizowane w 2018 roku, na terenie pól doświadczalnych IHAR (PIB) w Radzikowie, Hodowli Roślin Smolice (HRS) i Małopolskiej Hodowli Roślin Oddział w Kobierzycach (MHR), 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<sup>6</sup>/ 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 0,54 do 2,88. Stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzycy (1,56) i HRS Smolice (1,39) 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 (1,64) i Smolicach (1,51), niż w Radzikowie (1,38). 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 niepecyficznym, 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 1,38 i 1,57. Zależność taką obserwowano w przypadku trzech lokalizacji doświadczenia tj. Smolice, Kobierzycy i Radzików. Porażenie form dent i flint wynosiło odpowiednio: 1,58 i 1,43 (w Smolicach), 1,45 i 1,30 (w Radzikowie) oraz 1,81 i 1,47 (w Kobierzycach) i różnice w trzech lokalizacjach doświadczenia były istotne 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 24,59% do 41,13% i od 22,23% do 40,43%, odpowiednio dla form typu flint i dent.

Ziarniaki kukurydzy pochodzące z doświadczeń inokulacyjnych analizowano także pod kątem zawartości bowerycyny (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 bowerycyny. W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 3,3 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 6,5 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 6,3 ppm i 7,6 ppm, odpowiednio dla dwóch wyżej wymienionych lokalizacji. W materiałach hodowli Kobierzycy średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 7,7 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 5,2 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość BEA wynosiła 6,4 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 5,5 ppm (doświadczenie w Radzikowie).

W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość ergosterolu w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 10,9 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 11,2 ppm (doświadczenie w Radzikowie), natomiast w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 19,6 ppm i 9,7 ppm, odpowiednio dla doświadczeń zlokalizowanych w Smolicach i Radzikowie. W materiałach hodowli Kobierzycy w próbach ziarniaków kukurydzy typu dent średnia zawartość ERG wynosiła 25,8 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 11,4 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego związku wynosiła 23,0 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 12,3 ppm (doświadczenie w Radzikowie).

#### W podsumowaniu

- Sekwencje *EF-1a* oraz *β tubuliny* umożliwiają jednoznaczną diagnostykę *F.temperatum*
- Występowanie idiomorfów *MAT1-1* i *MAT1-2* wśród izolatów *F.temperatum* wskazuje na potencjalną możliwość występowania *in-vivo* teleomorfy badanego gatunku
- Gatunek *F.temperatum* jest istotnym producentem pochodnych bowerycyny 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.