

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

Kierownik zadania: dr inż. Marcin Wit

Badania podstawowe zrealizowane na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, dofinansowane na podstawie § 9 ust. 1 pkt 1 oraz zadania nr 92 w załączniku nr 8, do 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 (FKK) stanowi jeden z najważniejszych problemów w uprawie tego zboża. Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu, uzyskiwaniu ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniu metabolitami wtórnymi *Fusarium* spp. W kompleksie 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. Patogen ten należy do kompleksu *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). Jego znaczenie 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 *MAT1-1* i *MAT1-2*. W badanej populacji izolatów *F.temperatum* wyniosła ona odpowiednio 26 do 24.

Profil metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez *F.temperatum* zbadano dla 50. izolatów, dla których biosyntezę metabolitów prowadzono na ziarniakach ryżu. Analiza została przeprowadzona w kierunku występowania fumonizyn (FB₁ i FB₂), pochodnych heksadepsyptydowych (BEA i ENN) oraz ergosterolu (ERG). Wszystkie izolaty syntetyzowały bowerycynę (BEA). Średni poziom tego metabolitu wynosił 1056,1 ppm. Ilościowo najwięcej BEA biosyntetyzował izolat PFT-403 (2131,4 ppm), najmniej zaś izolat PFT-415 (19,9 ppm). W obrębie analizowanej populacji grzyba 49. izolatów produkowało eniatynę A1. Średni poziom tego metabolitu wynosił 33,5 ppm i oscylował w przedziale 8,3 – 140,3 ppm. Eniatyny B i B1 syntetyzowało odpowiednio 19. i 23. izolaty *F.temperatum*. Średni poziom ENN B wynosił 12,7 ppm. Ilościowo najwięcej ENN B produkował izolat PFT-437 (41,5 ppm), najmniej zaś izolat PFT-417 (1,3 ppm). Średni poziom ENN B1 dla populacji przebadanych izolatów wynosił 21,6 ppm. Ilościowo najwięcej ENN B1 biosyntetyzował izolat PFT-407 (81,4 ppm), najmniej zaś izolat PFT-432 (2,3 ppm). Żaden z przebadanych 50. izolatów patogena nie wytwarzał eniatyny A oraz fumonizyn. Średni poziom ergosterolu dla populacji przebadanych izolatów wynosił 580,2 ppm. Najwyższy poziom (1360,4 ppm) ergosterolu zanotowano w przypadku izolatu PFT-422, zaś najniższy poziom tego metabolitu (102,5 ppm) wykazał izolat o numerze PFT-442.

Ocenę patogeniczności przeprowadzono metodą „toothpicks” dla 50. 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-450, PFT-449, PFT-437, PFT-416 i PFT-444. 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 2019 roku, na terenie pól doświadczalnych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 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 10^6 / 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 0,74 do 2,95. Stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzycy (1,42) i HRS Smolice (1,33) różnił się znacznie i 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 (1,43), niż w Radzikowie (1,21). 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 1,32 i 1,43. Zależność taką obserwowano w przypadku trzech lokalizacji doświadczenia tj. Smolice, Kobierzycy i Radzików. Porażenie form dent i flint wynosiło odpowiednio: 1,56 i 1,29 (w Smolicach), 1,25 i 1,16 (w Radzikowie) oraz 1,64 i 1,63 (w Kobierzycach). Różnice w dwóch lokalizacjach doświadczenia (Smolice i Radzików) były istotne statystycznie

Określenie procentowego udziału amylozy w ogólnej zawartości skrobi przeprowadzono dla wybranych 160 prób ziarniaków kukurydzy, pochodzących z doświadczeń założonych na terenie pól doświadczalnych Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR (40 prób), Małopolskiej Hodowli Roślin Oddział w Kobierzycach (40 prób) oraz Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin IHAR -PIB w Radzikowie (80 prób). Zakres zmienności tej cechy wahał się od 21,52% do 38,06% i od 20,67% do 36,65%, 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 wybranych 160 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 5,56 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 0,94 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 9,17 ppm i 2,26 ppm, odpowiednio dla dwóch wyżej wymienionych lokalizacji. W materiałach hodowli Kobierzycy średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 3,81 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 1,49 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość bowerycyny wynosiła 7,56 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 2,16 ppm (doświadczenie w Radzikowie).

W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość ergosterolu w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 20,15 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 8,26 ppm (doświadczenie w Radzikowie), natomiast w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 24,15 ppm i 12,18 ppm, odpowiednio dla doświadczeń zlokalizowanych w Smolicach i Radzikowie. W materiałach hodowli Kobierzycy w próbach ziarniaków kukurydzy typu dent średnia zawartość ERG wynosiła 24,51 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 11,16 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego związku wynosiła 31,02 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 13,57 ppm (doświadczenie w Radzikowie).

W podsumowaniu

- Sekwencje *EF-1 α* oraz *β tubuliny* umożliwiają jednoznaczny 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 bowerycyny oraz eniatyn, istnieje zatem duże ryzyko zanieczyszczenia tymi metabolitami kolb kukurydzy w warunkach infekcji naturalnej
- *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 genotypów kukurydzy na porażenie przez *F.temperatum*, a wyraźną tendencją jest silniejsze porażenie form dent niż flint, co jest optymistyczne z punktu widzenia hodowli
- Struktura endospermu ma istotny wpływ na porażenie ziarniaków przez *F.temperatum* oraz zawartość bowerycyny