

## Wyniki

### Analiza stopnia porażenia kolb kukurydzy przez *F.temperatum*

Badaniami objęto 120 genotypów kukurydzy wytypowanych do badań przez dwie stacje hodowlane (A i B). Doświadczenie było realizowane na terenie pól doświadczalnych Państwowego Instytutu Badawczego IHAR w Radzikowie, Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin oddział w Kobierzycach, gdzie ocenie poddawano odpowiednio 60, 60 i 120 obiektów. Zgodnie z założeniami podatność każdego genotypu na porażenie przez *F.temperatum* była oceniana w dwóch lokalizacjach.

Uzyskane wyniki stopnia porażenia kukurydzy zostały przedstawione w tabeli 1.1. Zakres zmienności cechy dla badanych genotypów wahał się od 1.30 (dla genotypu 105) do 4.35 w przypadku genotypu o numerze kodowym 66 .

Zaznaczył się istotny wpływ środowiska na stopień porażenia kolb przez *F.temperatum* (ryc. 1). Istotnie silniej kolby były porażane w Kobierzycach (2.73) i Smolicach (2.83) niż w Radzikowie (2.30). Formy flint kukurydzy były istotnie słabiej porażane niż dent. (ryc. 2). Stopień porażenia roślin wynosił odpowiednio 2.43 i 2.79. Zależność taką obserwowano w przypadku wszystkich trzech lokalizacji doświadczenia (ryc. 3), niezależnie od źródła pochodzenia (hodowli) materiału.

Stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli A (2.66) i B (2.57) różnił się nieznacznie, lecz różnica była statystycznie istotna (ryc. 5). W przypadku materiałów pochodzących z hodowli A zmienność porażenia kolb badanych genotypów wahała się od 1.30 dla genotypu o numerze kodowym 105 do 4.35 dla genotypu o numerze 66 (tab. 1.2). Formy flint pochodzące z tej hodowli były porażone w zakresie od 1.30 do 4.06 (ryc. 6), natomiast dent od 1.55 do 4.35 (ryc. 7).

Zakres zmienności badanej cechy dla materiałów pochodzących z hodowli B wahał się od wartości 1.80 dla genotypu o numerze kodowym 45 do 3.31 dla genotypów 12, 13, 24 (tab. 1.3). Formy flint pochodzące z tej hodowli były porażone w zakresie 1.8 – 3.12 (ryc. 8), natomiast dent od 1.98 do 3.31 (ryc. 9).

Tab. 1.1. Średni stopień porażenia genotypów kukurydzy przez *F.temperatum*

| Lp | Genotyp | Hodowla | Średni stopień porażenia |        | Lp  | Genotyp | Hodowla | Średni stopień porażenia |        |
|----|---------|---------|--------------------------|--------|-----|---------|---------|--------------------------|--------|
| 1  | 1       | B       | 3,18                     | ± 1,25 | 61  | 61      | A       | 2,72                     | ± 1,42 |
| 2  | 2       | B       | 2,83                     | ± 1,52 | 62  | 62      | A       | 3,48                     | ± 1,29 |
| 3  | 3       | B       | 3,00                     | ± 1,40 | 63  | 63      | A       | 3,54                     | ± 1,23 |
| 4  | 4       | B       | 3,07                     | ± 1,34 | 64  | 64      | A       | 2,76                     | ± 1,20 |
| 5  | 5       | B       | 2,46                     | ± 1,14 | 65  | 65      | A       | 3,07                     | ± 1,23 |
| 6  | 6       | B       | 1,97                     | ± 1,26 | 66  | 66      | A       | 4,35                     | ± 0,91 |
| 7  | 7       | B       | 2,81                     | ± 1,37 | 67  | 67      | A       | 3,37                     | ± 1,16 |
| 8  | 8       | B       | 2,85                     | ± 1,33 | 68  | 68      | A       | 2,88                     | ± 1,01 |
| 9  | 9       | B       | 3,06                     | ± 1,33 | 69  | 69      | A       | 3,42                     | ± 1,18 |
| 10 | 10      | B       | 2,59                     | ± 0,84 | 70  | 70      | A       | 2,42                     | ± 0,88 |
| 11 | 11      | B       | 2,80                     | ± 1,06 | 71  | 71      | A       | 1,96                     | ± 0,65 |
| 12 | 12      | B       | 3,32                     | ± 1,36 | 72  | 72      | A       | 1,68                     | ± 0,86 |
| 13 | 13      | B       | 3,32                     | ± 1,30 | 73  | 73      | A       | 3,31                     | ± 1,26 |
| 14 | 14      | B       | 2,43                     | ± 1,20 | 74  | 74      | A       | 2,83                     | ± 0,89 |
| 15 | 15      | B       | 2,10                     | ± 1,24 | 75  | 75      | A       | 3,94                     | ± 1,18 |
| 16 | 16      | B       | 2,29                     | ± 1,46 | 76  | 76      | A       | 1,86                     | ± 0,79 |
| 17 | 17      | B       | 2,54                     | ± 1,59 | 77  | 77      | A       | 1,55                     | ± 0,69 |
| 18 | 18      | B       | 2,77                     | ± 1,31 | 78  | 78      | A       | 1,82                     | ± 0,64 |
| 19 | 19      | B       | 3,00                     | ± 1,44 | 79  | 79      | A       | 3,09                     | ± 0,78 |
| 20 | 20      | B       | 2,61                     | ± 1,26 | 80  | 80      | A       | 2,16                     | ± 0,86 |
| 21 | 21      | B       | 2,81                     | ± 1,17 | 81  | 81      | A       | 1,88                     | ± 0,66 |
| 22 | 22      | B       | 3,08                     | ± 1,08 | 82  | 82      | A       | 3,82                     | ± 0,92 |
| 23 | 23      | B       | 3,00                     | ± 1,29 | 83  | 83      | A       | 2,87                     | ± 1,04 |
| 24 | 24      | B       | 3,32                     | ± 1,30 | 84  | 84      | A       | 2,33                     | ± 0,78 |
| 25 | 25      | B       | 3,09                     | ± 1,02 | 85  | 85      | A       | 2,83                     | ± 0,91 |
| 26 | 26      | B       | 2,42                     | ± 1,17 | 86  | 86      | A       | 1,69                     | ± 0,62 |
| 27 | 27      | B       | 3,12                     | ± 1,09 | 87  | 87      | A       | 2,30                     | ± 0,54 |
| 28 | 28      | B       | 3,06                     | ± 1,36 | 88  | 88      | A       | 2,77                     | ± 1,17 |
| 29 | 29      | B       | 3,27                     | ± 1,39 | 89  | 89      | A       | 2,92                     | ± 0,92 |
| 30 | 30      | B       | 2,72                     | ± 1,35 | 90  | 90      | A       | 2,16                     | ± 0,99 |
| 31 | 31      | B       | 1,93                     | ± 1,00 | 91  | 91      | A       | 2,22                     | ± 1,29 |
| 32 | 32      | B       | 2,31                     | ± 1,16 | 92  | 92      | A       | 3,35                     | ± 0,93 |
| 33 | 33      | B       | 1,84                     | ± 0,99 | 93  | 93      | A       | 3,16                     | ± 0,90 |
| 34 | 34      | B       | 2,03                     | ± 1,25 | 94  | 94      | A       | 2,70                     | ± 1,36 |
| 35 | 35      | B       | 2,60                     | ± 1,19 | 95  | 95      | A       | 3,12                     | ± 1,13 |
| 36 | 36      | B       | 2,05                     | ± 1,16 | 96  | 96      | A       | 2,14                     | ± 1,48 |
| 37 | 37      | B       | 2,54                     | ± 1,10 | 97  | 97      | A       | 1,41                     | ± 0,98 |
| 38 | 38      | B       | 2,63                     | ± 1,24 | 98  | 98      | A       | 2,53                     | ± 1,81 |
| 39 | 39      | B       | 2,13                     | ± 0,97 | 99  | 99      | A       | 1,84                     | ± 1,44 |
| 40 | 40      | B       | 3,12                     | ± 1,48 | 100 | 100     | A       | 4,07                     | ± 1,11 |
| 41 | 41      | B       | 2,66                     | ± 1,10 | 101 | 101     | A       | 2,29                     | ± 1,14 |

|    |    |   |      |   |      |     |     |   |      |   |      |
|----|----|---|------|---|------|-----|-----|---|------|---|------|
| 42 | 42 | B | 2,40 | ± | 1,47 | 102 | 102 | A | 2,22 | ± | 1,21 |
| 43 | 43 | B | 1,91 | ± | 0,88 | 103 | 103 | A | 3,23 | ± | 1,26 |
| 44 | 44 | B | 2,28 | ± | 1,07 | 104 | 104 | A | 2,50 | ± | 1,11 |
| 45 | 45 | B | 1,80 | ± | 0,96 | 105 | 105 | A | 1,30 | ± | 0,68 |
| 46 | 46 | B | 2,39 | ± | 1,16 | 106 | 106 | A | 2,80 | ± | 1,38 |
| 47 | 47 | B | 2,21 | ± | 1,07 | 107 | 107 | A | 1,97 | ± | 1,01 |
| 48 | 48 | B | 2,26 | ± | 1,03 | 108 | 108 | A | 2,03 | ± | 1,15 |
| 49 | 49 | B | 2,19 | ± | 1,11 | 109 | 109 | A | 3,31 | ± | 1,43 |
| 50 | 50 | B | 2,48 | ± | 1,12 | 110 | 110 | A | 3,87 | ± | 1,17 |
| 51 | 51 | B | 1,97 | ± | 0,93 | 111 | 111 | A | 2,51 | ± | 1,50 |
| 52 | 52 | B | 2,28 | ± | 0,80 | 112 | 112 | A | 3,06 | ± | 1,27 |
| 53 | 53 | B | 1,98 | ± | 1,19 | 113 | 113 | A | 2,32 | ± | 1,33 |
| 54 | 54 | B | 2,12 | ± | 1,22 | 114 | 114 | A | 2,40 | ± | 0,77 |
| 55 | 55 | B | 2,10 | ± | 1,23 | 115 | 115 | A | 2,53 | ± | 1,06 |
| 56 | 56 | B | 2,38 | ± | 0,90 | 116 | 116 | A | 3,23 | ± | 1,24 |
| 57 | 57 | B | 3,00 | ± | 1,12 | 117 | 117 | A | 3,17 | ± | 0,94 |
| 58 | 58 | B | 1,92 | ± | 1,06 | 118 | 118 | A | 3,21 | ± | 1,53 |
| 59 | 59 | B | 2,66 | ± | 1,18 | 119 | 119 | A | 2,21 | ± | 1,15 |
| 60 | 60 | B | 2,32 | ± | 1,06 | 120 | 120 | A | 1,69 | ± | 0,97 |

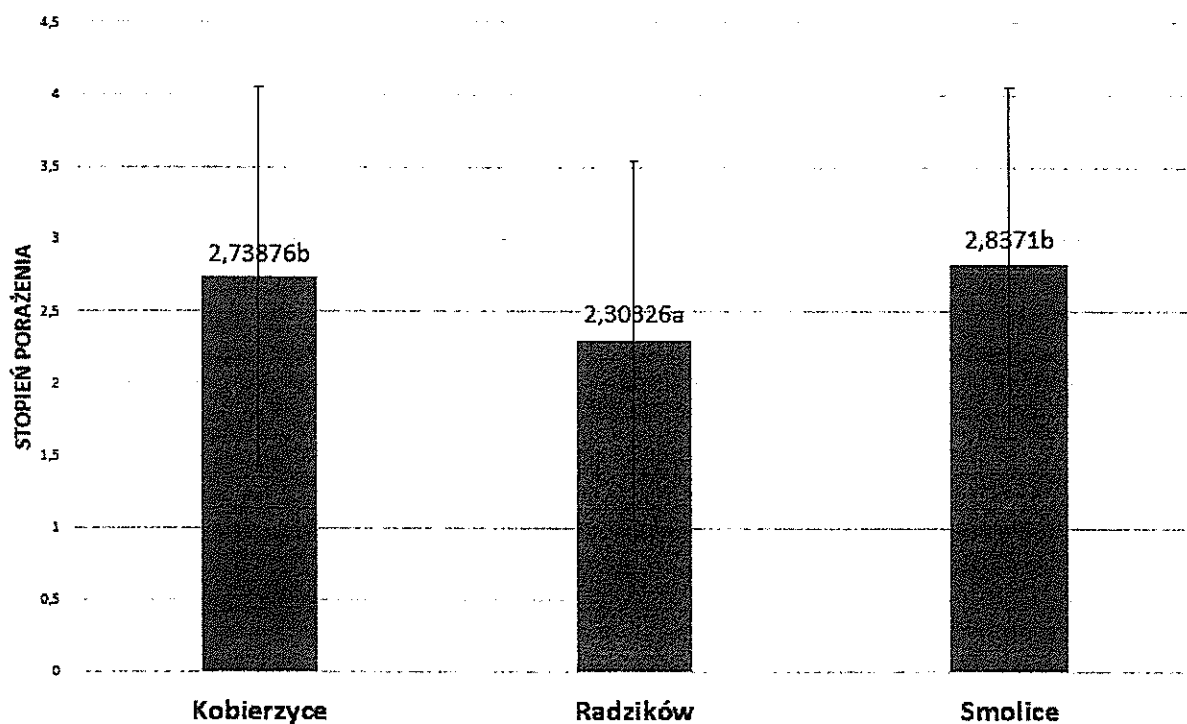
Tab. 1. 2. Stopień porażenia genotypów kukurydzy przez *F.temperatum*, wartości średnie dla materiałów hodowli A na podstawie oceny przeprowadzonej w Kobierzycach i Radzikowie

| Lp | GENOTYP | STOPIEŃ<br>PORAŻENIA  | Lp | GENOTYP | STOPIEŃ<br>PORAŻENIA  |
|----|---------|-----------------------|----|---------|-----------------------|
| 1  | 61      | 2,72 <sup>jr</sup>    | 31 | 91      | 2,22 <sup>dj</sup>    |
| 2  | 62      | 3,48 <sup>z-ad</sup>  | 32 | 92      | 3,35 <sup>s-ac</sup>  |
| 3  | 63      | 3,54 <sup>z-ac</sup>  | 33 | 93      | 3,16 <sup>pż</sup>    |
| 4  | 64      | 2,76 <sup>ju</sup>    | 34 | 94      | 2,70 <sup>ip</sup>    |
| 5  | 65      | 3,07 <sup>pż</sup>    | 35 | 95      | 3,12 <sup>pż</sup>    |
| 6  | 66      | 4,35 <sup>af</sup>    | 36 | 96      | 2,14 <sup>dh</sup>    |
| 7  | 67      | 3,37 <sup>w-ac</sup>  | 37 | 97      | 1,41 <sup>ab</sup>    |
| 8  | 68      | 2,88 <sup>nz</sup>    | 38 | 98      | 2,53 <sup>ho</sup>    |
| 9  | 69      | 3,42 <sup>z-ad</sup>  | 39 | 99      | 1,84 <sup>be</sup>    |
| 10 | 70      | 2,42 <sup>fn</sup>    | 40 | 100     | 4,07 <sup>ae-af</sup> |
| 11 | 71      | 1,96 <sup>cg</sup>    | 41 | 101     | 2,29 <sup>ek</sup>    |
| 12 | 72      | 1,68 <sup>ad</sup>    | 42 | 102     | 2,22 <sup>dj</sup>    |
| 13 | 73      | 3,31 <sup>s-ab</sup>  | 43 | 103     | 3,23 <sup>pż</sup>    |
| 14 | 74      | 2,83 <sup>lw</sup>    | 44 | 104     | 2,50 <sup>gn</sup>    |
| 15 | 75      | 3,94 <sup>ad-af</sup> | 45 | 105     | 1,30 <sup>a</sup>     |
| 16 | 76      | 1,86 <sup>be</sup>    | 46 | 106     | 2,80 <sup>kw</sup>    |
| 17 | 77      | 1,55 <sup>ac</sup>    | 47 | 107     | 1,97 <sup>cg</sup>    |
| 18 | 78      | 1,82 <sup>ae</sup>    | 48 | 108     | 2,03 <sup>ch</sup>    |
| 19 | 79      | 3,09 <sup>pż</sup>    | 49 | 109     | 3,31 <sup>s-ab</sup>  |
| 20 | 80      | 2,16 <sup>di</sup>    | 50 | 110     | 3,87 <sup>ab-af</sup> |
| 21 | 81      | 1,88 <sup>bf</sup>    | 51 | 111     | 2,51 <sup>gn</sup>    |
| 22 | 82      | 3,82 <sup>ab-af</sup> | 52 | 112     | 3,06 <sup>oż</sup>    |
| 23 | 83      | 2,87 <sup>lz</sup>    | 53 | 113     | 2,32 <sup>el</sup>    |
| 24 | 84      | 2,33 <sup>el</sup>    | 54 | 114     | 2,40 <sup>fm</sup>    |
| 25 | 85      | 2,83 <sup>lw</sup>    | 55 | 115     | 2,53 <sup>hn</sup>    |
| 26 | 86      | 1,69 <sup>ad</sup>    | 56 | 116     | 3,23 <sup>rż</sup>    |
| 27 | 87      | 2,30 <sup>el</sup>    | 57 | 117     | 3,17 <sup>pż</sup>    |
| 28 | 88      | 2,77 <sup>ju</sup>    | 58 | 118     | 3,21 <sup>pż</sup>    |
| 29 | 89      | 2,92 <sup>oż</sup>    | 59 | 119     | 2,21 <sup>dj</sup>    |
| 30 | 90      | 2,16 <sup>di</sup>    | 60 | 120     | 1,69 <sup>ad</sup>    |

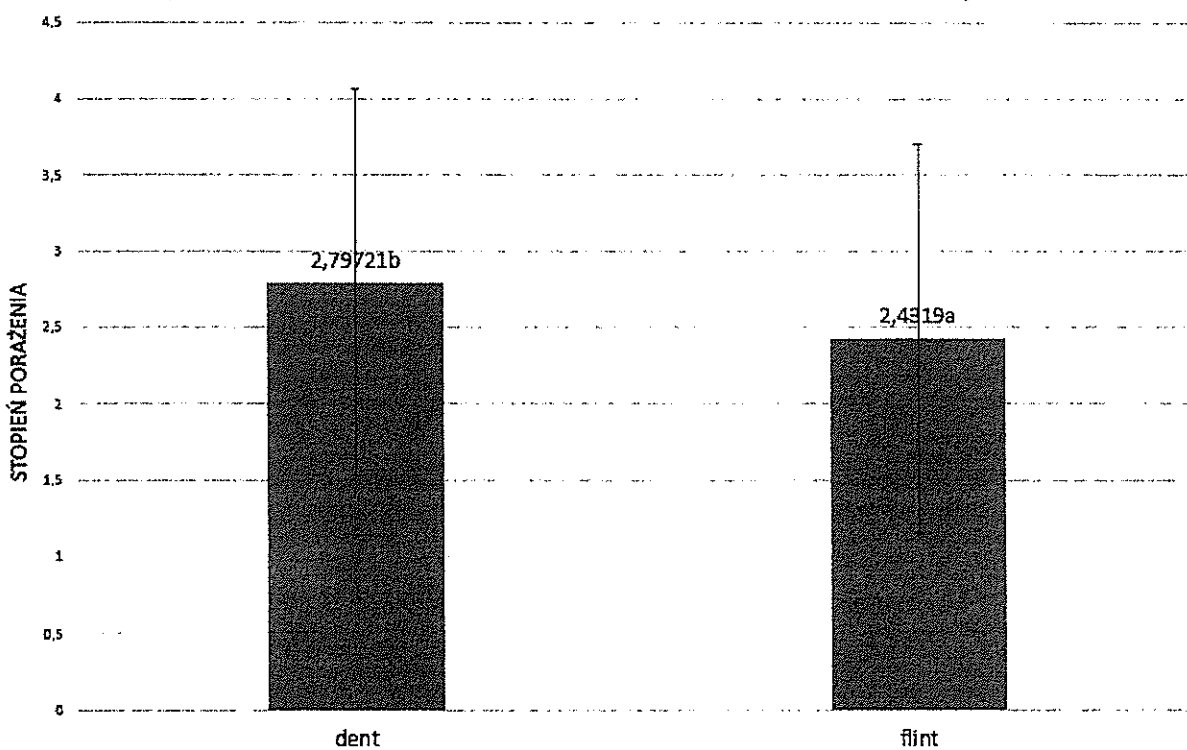
Tab. 1. 3. Stopień porażenia genotypów kukurydzy przez *F.temperatum*, wartości średnie dla materiałów hodowli B, na podstawie oceny przeprowadzonej w Smolicach i Radzikowie

| Lp | GENOTYP | STOPIEŃ<br>PORAŻENIA | Lp | GENOTYP | STOPIEŃ PORAŻENIA  |
|----|---------|----------------------|----|---------|--------------------|
| 1  | 1       | 3,18 <sup>or</sup>   | 31 | 31      | 1,93 <sup>ad</sup> |
| 2  | 2       | 2,83 <sup>ir</sup>   | 32 | 32      | 2,31 <sup>ai</sup> |
| 3  | 3       | 3,00 <sup>jr</sup>   | 33 | 33      | 1,84 <sup>ab</sup> |
| 4  | 4       | 3,07 <sup>lr</sup>   | 34 | 34      | 2,03 <sup>ae</sup> |
| 5  | 5       | 2,46 <sup>bl</sup>   | 35 | 35      | 2,60 <sup>eo</sup> |
| 6  | 6       | 1,97 <sup>ad</sup>   | 36 | 36      | 2,05 <sup>af</sup> |
| 7  | 7       | 2,81 <sup>ir</sup>   | 37 | 37      | 2,54 <sup>dn</sup> |
| 8  | 8       | 2,85 <sup>lr</sup>   | 38 | 38      | 2,63 <sup>fn</sup> |
| 9  | 9       | 3,06 <sup>lr</sup>   | 39 | 39      | 2,13 <sup>af</sup> |
| 10 | 10      | 2,59 <sup>en</sup>   | 40 | 40      | 3,12 <sup>nr</sup> |
| 11 | 11      | 2,80 <sup>hr</sup>   | 41 | 41      | 2,66 <sup>fo</sup> |
| 12 | 12      | 3,32 <sup>r</sup>    | 42 | 42      | 2,40 <sup>ak</sup> |
| 13 | 13      | 3,32 <sup>r</sup>    | 43 | 43      | 1,91 <sup>ac</sup> |
| 14 | 14      | 2,43 <sup>bj</sup>   | 44 | 44      | 2,28 <sup>ai</sup> |
| 15 | 15      | 2,10 <sup>af</sup>   | 45 | 45      | 1,80 <sup>a</sup>  |
| 16 | 16      | 2,29 <sup>ai</sup>   | 46 | 46      | 2,39 <sup>aj</sup> |
| 17 | 17      | 2,54 <sup>cn</sup>   | 47 | 47      | 2,21 <sup>ah</sup> |
| 18 | 18      | 2,77 <sup>gr</sup>   | 48 | 48      | 2,26 <sup>ai</sup> |
| 19 | 19      | 3,00 <sup>jr</sup>   | 49 | 49      | 2,19 <sup>ag</sup> |
| 20 | 20      | 2,61 <sup>eo</sup>   | 50 | 50      | 2,48 <sup>bm</sup> |
| 21 | 21      | 2,81 <sup>hr</sup>   | 51 | 51      | 1,97 <sup>ad</sup> |
| 22 | 22      | 3,08 <sup>lr</sup>   | 52 | 52      | 2,28 <sup>ai</sup> |
| 23 | 23      | 3,00 <sup>jr</sup>   | 53 | 53      | 1,98 <sup>ad</sup> |
| 24 | 24      | 3,32 <sup>r</sup>    | 54 | 54      | 2,12 <sup>af</sup> |
| 25 | 25      | 3,09 <sup>nr</sup>   | 55 | 55      | 2,10 <sup>af</sup> |
| 26 | 26      | 2,42 <sup>ak</sup>   | 56 | 56      | 2,38 <sup>ai</sup> |
| 27 | 27      | 3,12 <sup>nr</sup>   | 57 | 57      | 3,00 <sup>jr</sup> |
| 28 | 28      | 3,06 <sup>lr</sup>   | 58 | 58      | 1,92 <sup>ab</sup> |
| 29 | 29      | 3,27 <sup>pr</sup>   | 59 | 59      | 2,66 <sup>fo</sup> |
| 30 | 30      | 2,72 <sup>gp</sup>   | 60 | 60      | 2,32 <sup>ai</sup> |

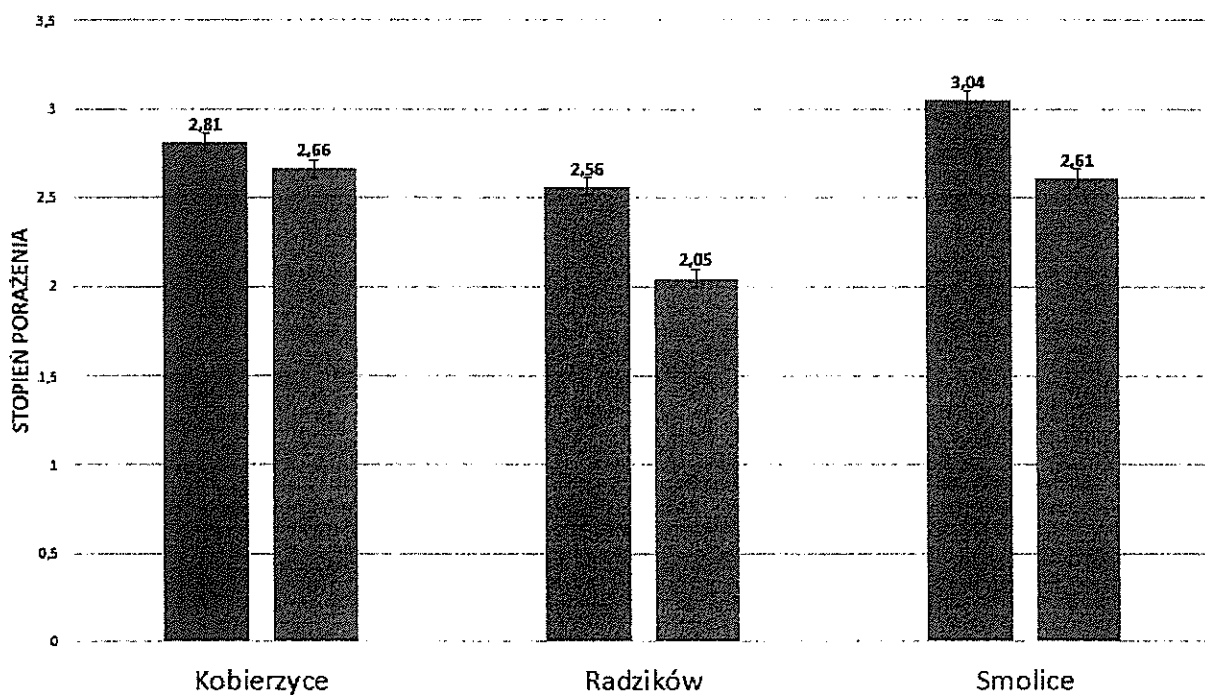
Ryc. 1. STOPIEŃ PORAŻENIA BADANYCH GENOTYPÓW KUKURYDZY PRZEZ *FUSARIUM temperatum* W TRZECH LOKALIZACJACH



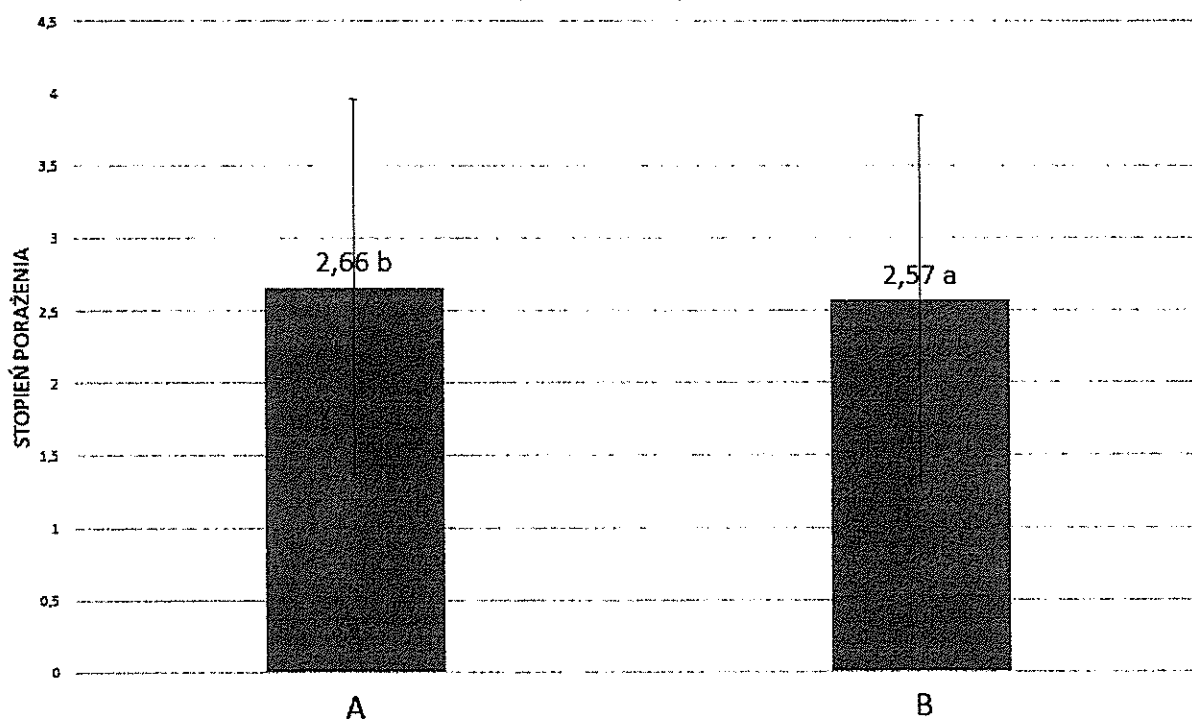
Ryc. 2. STOPIEŃ PORAŻENIA KUKURYDZY FORM FLINT I DENT PRZEZ *FUSARIUM temperatum*



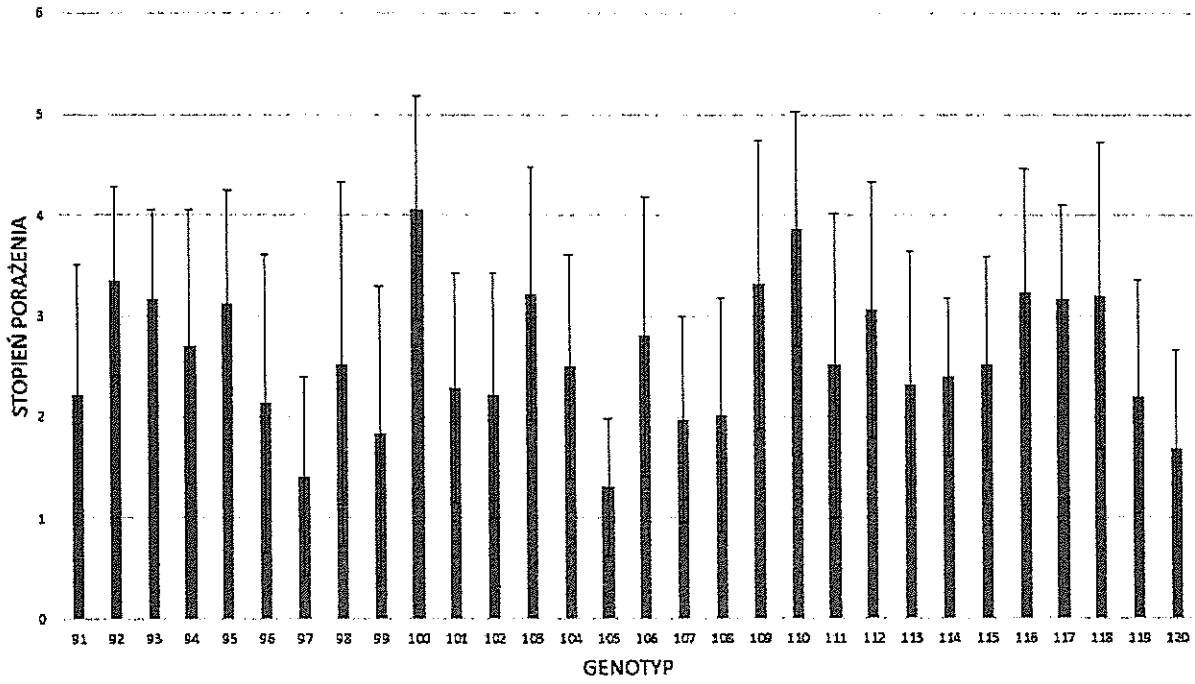
Ryc. 3. PORÓWNANIE STOPNIA PORAŻENIA FORM FLINT I DENT KUKURYDZY PRZEZ *FUSARIUM temperatum* W TRZECH LOKALIZACJACH



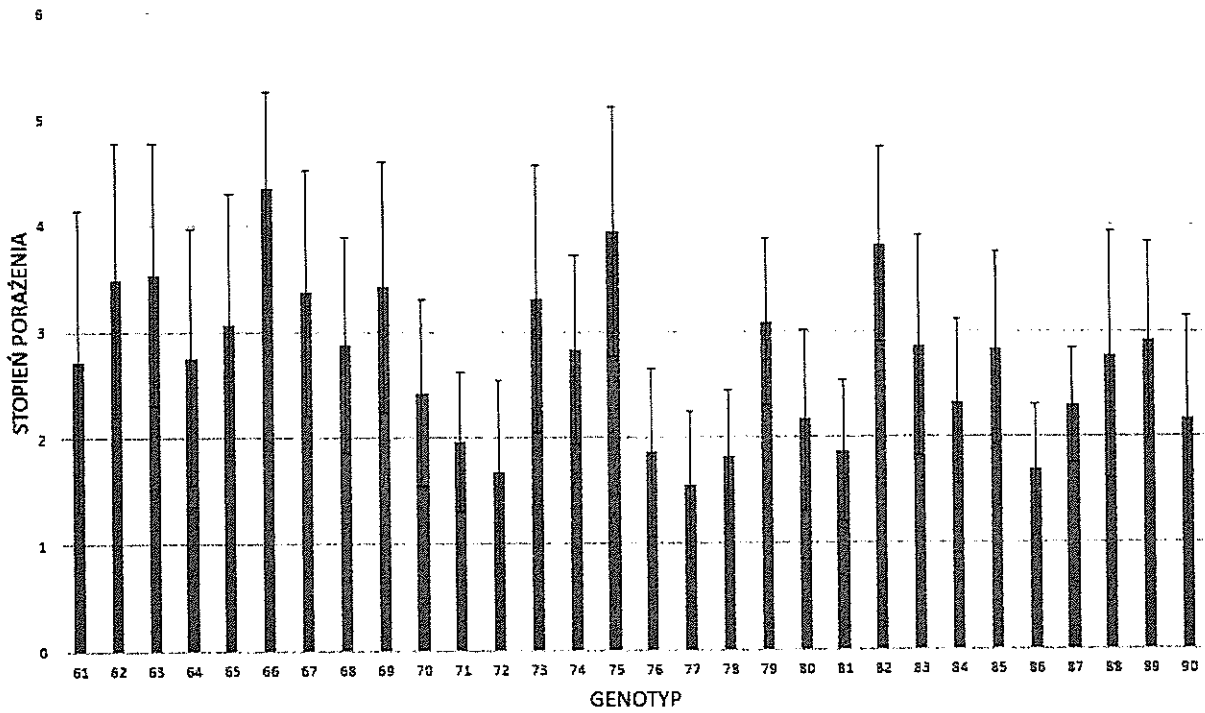
Ryc. 5. ŚREDNI STOPIEŃ PORAŻENIA KUKURYDZY PRZEZ *FUSARIUM temperatum* (HODOWLA A I B)



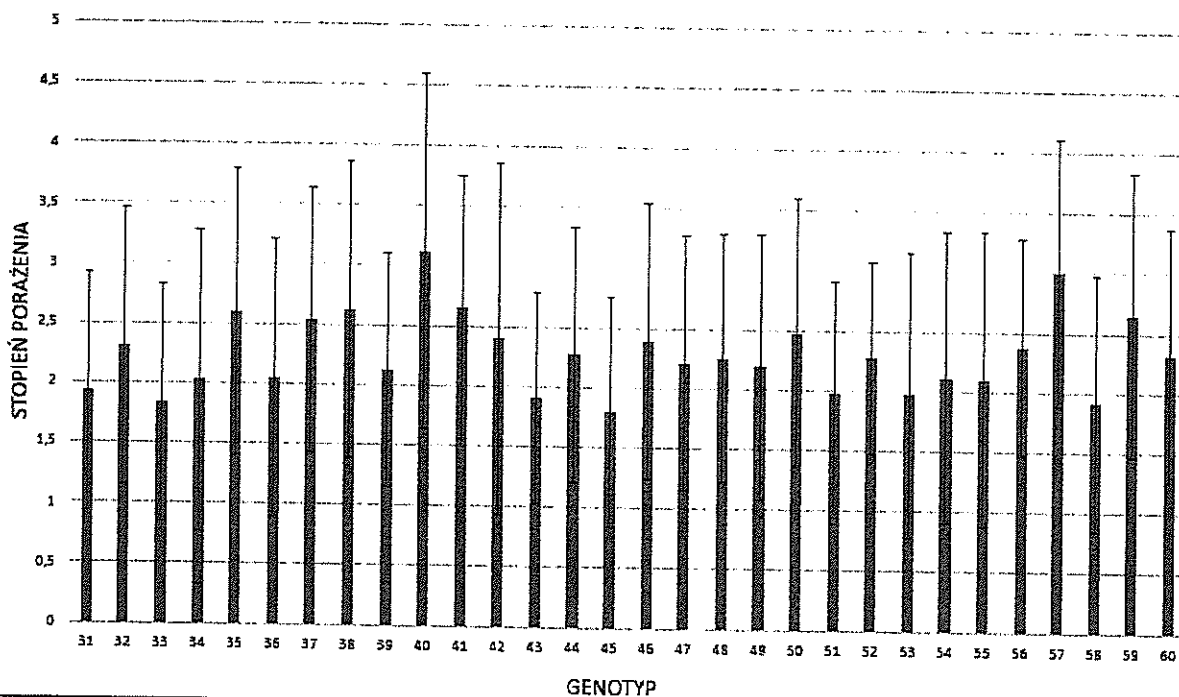
Ryc. 6. ŚREDNI STOPIEŃ PORAŻENIA GENOTYÓW KUKURYDZY FUSARIUM temperatum (HODOWLA A, TYP FLINT)



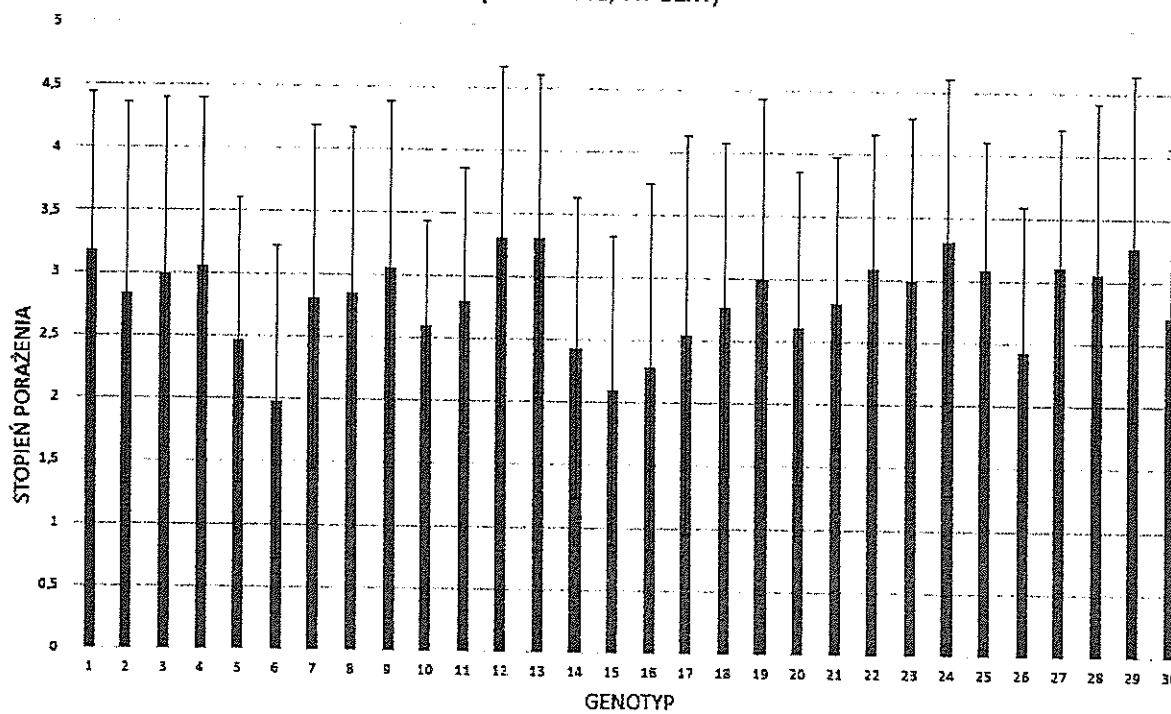
Ryc. 7. ŚREDNI STOPIEŃ PORAŻENIA GENOTYÓW KUKURYDZY FUSARIUM temperatum (HODOWLA A, TYP DENT)



Ryc. 8. ŚREDNI STOPIEŃ PORAŻENIA GENOTYÓW KUKURYDZY PRZEZ *FUSARIUM temperatum*  
(HODOWLA B, TYP FLINT)



Ryc. 9. ŚREDNI STOPIEŃ PORAŻENIA GENOTYÓW KUKURYDZY PRZEZ *FUSARIUM temperatum*  
(HODOWLA B, TYP DENT)



## **Dyskusja**

Fuzarioza kolb kukurydzy jest uważana za jeden z najważniejszych problemów w uprawie tej rośliny (White 1999). Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu, uzyskiwaniem ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniu metabolitami wtórnymi *Fusarium* spp (Wit i in. 2011). Jest to choroba o etiologii złożonej a wśród czynników sprawczych wymienia się min.: *F.graminearum*, *F.culmorum*, *F.avenaceum*, *F.verticillioides*, *F.subglutinans*, *F.proliferatum* (Bottalico 1998, Hussein i in. 2002, Logrieco i in. 2002, Dorn i in. 2009, Scaufflaire i in. 2011). O ile ocena podatności kukurydzy na porażenie przez wspomniane gatunki była i jest przedmiotem licznych analiz i opracowań gdyż są to gatunki znane od dawna, natomiast wiedza na temat porażenia kukurydzy (odmian, linii hodowlanych czy też genotypów) przez *F.temperatum* jest fragmentaryczna.

Przedstawione wyniki wskazują na zróżnicowaną podatność materiałów hodowlanych na porażenie a zmienność ocenianej cechy (podatność) miała charakter ciągły. Taki rozkład cechy jest charakterystyczny dla interakcji (pomiędzy gospodarzem a patogenem) o charakterze rasowo niespecyficznym i jest dość typowy dla porażenia roślin przez *Fusarium* spp. Utrudnia on w dużym stopniu jednoznaczne wyłonienie genotypów podatnych, mniej podatnych, odpornych.

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). Uwzględniając strukturę ziarniaków form dent i flint, uzyskane wyniki są zgodne z przyjętą wstępną hipotezą, aczkolwiek doniesienia literaturowe nie są w tym zakresie jednoznaczne. Loffler i in. (2010) donosił o większej podatności form flint niż dent, odmienne wyniki były prezentowane przez Wita i in. (2011), natomiast Hennigen i in. (2000) na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdził różnic istotnych w stopniu porażenia obydwu form (flint, dent) kukurydzy. Uwzględniając, że wśród polskich materiałów hodowlanych bardzo powszechne są formy pośrednie flint x dent, jednoznaczne wyjaśnienie wspomnianej zależności mogłoby być wartościowe.

Ponieważ przeprowadzone w roku 2015 badania oceny podatności obejmowały jedynie jeden sezon wegetacyjny, w dodatku o przebiegu warunków pogodowych odbiegających od przeciętnie występujących w kraju (bardzo wysoka temperatura, niewielka ilość opadów), niezbędna wydaje się kontynuacja prac w tym zakresie.

## **Wnioski**

- 1.1. Badane materiały hodowlane różnią się podatnością na porażenie przez *F.temperatum*
- 1.2. Formy dent są bardziej podatne na porażenie przez *F.temperatum* niż flint wśród badanych materiałów hodowlanych kukurydzy.

## Literatura

- Bottalico A., 1998: Fusarium disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *J. Plant Pathol.* 80: 85–103.
- Dorn B., Forrer H.R., Schürch S., Vogelgsang S., 2009: Fusarium species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 51–61.
- Hennigen M.R., Valente Soares L.M., Sanchez S., Di Benedetto N.M., Longhi A., Eyhe'rabide G., Torroba J., Zanelli M., 2000: Fumonisin in corn hybrids grown in Argentina for two consecutive seasons. In: *Proceeding of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phyto-Susceptibility of flint and dent maize ears...* 43 toxins, 21–25 May 2000, Guarujá, Brazil. Eds. W.J. De Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert, M. Sabino. IUPAC, Guarujá: 331–339.
- Hussein H.M., Christensen M.J., Baxter M., 2002: Occurrence and distribution of Fusarium species in maize fields in New Zealand. *Mycopathologia* 156: 25–30.
- Löffler M., Kessel B., Ouzunova M., Miedaner T., 2010: Population parameters for resistance to Fusarium graminearum and Fusarium verticillioides ear rot among large sets of early, mid-late and late maturing European maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 120: 1053–1062.
- Logrieco A., Bottalico A., Mulé G., Moretti A., Perrone G., 2003: Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 645–667.
- Scauflaire J., Mahieu O., Louveaux J., Foucart G., Renard F., Munaut F., 2011: Biodiversity of Fusarium species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* 131: 59–66.
- White D.G., 1999: *Compendium of maize diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul.
- Wit M., Warzecha R., Mirzwa-Mróż E., Jabłońska E., Ochodzki P., Waśkiewicz A., Wakuliński W. 2011. Susceptibility of flint and dent maize ears to *Fusarium* species. *Phytopathologia*. 60: 35-45.

### Mierniki dla tematu badawczego 1:

| Lp. | miernik <sup>2</sup>   | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
|-----|--|--|-------------------------------|
|     | Liczba genotypów objęta badaniami                                | 120                                      | 120                           |
|     | Liczba lokalizacji doswiadczeń infekcyjnych dla każdego genotypu | 2  | 2                             |
|     | Liczba powtórzeń biologicznych dla każdego genotypu              | 2  | 2                             |
|     | Liczba kolb tworzących powtórzenie biologiczne                   | 10                                       | 10                            |

<sup>2</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

### **3.2 Temat badawczy 2:** Analiza profilu metabolitów wtórnych (mykotoksyn) występujących w materiale roślinnym porażonym przez *Fusarium temperatum*.

#### **Cel tematu**

Celem badań jest przeprowadzenie ilościowej i jakościowej analizy metabolitów wtórnych wytwarzanych *in vivo* przez *F.temperatum*. Ponadto ziarniaki zostały poddane analizie zawartości amylopektyn/amylozy.

Cel został osiągnięty

#### **Material i metody**

Materiał roślinny zebrany w trakcie fenotypowania był przewożony do laboratorium a następnie analizowany w kierunku:

- dominujących metabolitów *F. temperatum*, które rozpoznano w badaniach *in vitro* tego patogena
- ergosterolu, którego poziom stanowi ilościowy marker plechy patogena w materiale roślinnym.
- amylozy/amylopektyn (obydwa związki tworzą skrobię, która jest podstawowym komponentem endospermu ziarniaków).

#### **Analiza mykotoksyn i ergosterolu**

Po osiągnięciu dojrzałości zbiorczej kolby kukurydzy były transportowane do laboratorium a następnie dosuszane i młócone. Frakcję ziarniaków z wyraźnymi objawami porażenia rozdrabniano i poddawano analizie pod kątem zawartości ergosterolu oraz metabolitów (mykotoksyn) *F.temperatum*, które rozpoznano w badaniach z zakresu biosyntezy mykotoksyn w warunkach *in vitro* tego patogena. (Skrining metabolitów biosyntetyzowanych przez *F.temperatum* jest przedmiotem tematu 3). Badania Scauflaire i in. (2012) wskazują, że *F.temperatum* posiada zdolność biosyntezy beauwerycyny. Dane na temat możliwości biosyntezy innych mykotoksyn są niejednoznaczne, wskazują na jakościową zmienność w populacji gatunku. Procedury analizy mykotoksyn oraz ergosterolu będą zgodne ze stosowaną metodyką ich oznaczania w trakcie realizacji tematu badawczego 3, dotyczącego biosyntezy *F.temperatum* w warunkach *in vitro*.

#### **Analiza zawartości amylozy/amylopektyn**

Analiza zawartości amylopektyn/amylozy w skrobi przeprowadzano wykorzystując do tego celu „Megazyme assay kit”. W teście tym badaną próbkę skrobi zawiesza się w sulfotlenku dwumetylu (DMSO). Z roztworu usuwa się następnie lipidy poprzez strącenie skrobi etanolem. Wytrąconą skrobię zawiesza się następnie w buforze octanowym, z którego amylopektynę wytrąca się konkwaliną. Zawarta w supernatancie amyloza jest hydrolizowana do D-glukozy a następnie oznaczana spektrofotometrycznie (Wit 2012).

#### **Procedura analizy ergosterolu.**

Ergosterol jest podstawowym związkiem sterolowym błon cytoplazmatycznych grzybów i jest standardowo traktowany jako marker (jakościowy i ilościowy) obecności plechy grzybów. Zawartość ergosterolu

oceniano zgodnie z metodyką przedstawioną w pracy Younga (1995). Metoda ta przewiduje ekstrakcję ergosterolu w metanolewym roztworze wodorotlenku sodowego w warunkach promieniowania mikrofalowego. Zmydlony ergosterol zobojętnia się kwasem solnym a następnie ekstrahuje z roztworu pentanem. Uzyskane próbki odparowuje się do sucha i w takiej postaci pozostawia do momentu analizy. Analiza ergosterolu była przeprowadzona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosując chromatograf Shimadzu. Rozdział był przeprowadzony na kolumnie RP C18, z detekcją UV przy 282nm.

### *Wyniki*

Analizę zawartości amylozy przeprowadzono w ziarniakach kukurydzy 60 genotypów hodowli A i 60 genotypów hodowli B. Ogółem pod kątem zawartości amylozy przebadano 240 prób 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).

- Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków materiałów hodowli A, pochodzących z doświadczenia założonego w Kobierzycach przedstawia tabela 2.1. Zakres zmienności cechy dla badanych genotypów tej hodowli typu flint wahał się od 22.69% (dla genotypu 105) do 32.22% w przypadku genotypu o numerze kodowym 166, natomiast w przypadku ziarniaków typu dent od 23.23% do 30.00%. Średni udział amylozy w ziarniakach kukurydzy typu flint był wyższy (27.02%) niż w ziarniakach testowanych genotypów typu dent (26.82%), jednak przy  $\alpha = 0.05$  nie stwierdzono różnic istotnych pomiędzy tymi wartościami.
- W ziarniakach genotypów kukurydzy pochodzących z hodowli B, pochodzących z doświadczenia założonego w Smolicach, stwierdzony udział amylozy przedstawia tabela 2.2. Istotnie większy udział amylozy występował w formach flint (29.86%) niż dent (28.28%). Zakres zmienności badanej cechy dla form kukurydzy typu flint wahał się od 19.55% do 35.55% a w przypadku form kukurydzy typu dent od 21.81% do 35.39%.
- Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków materiałów hodowli A, pochodzących z doświadczenia założonego w Radzikowie przedstawia tabela 2.3. Zakres zmienności cechy dla badanych genotypów tej hodowli typu flint wahał się od 23.11% (dla genotypu 92) do 35.07% w przypadku genotypu o numerze kodowym 102, natomiast w przypadku ziarniaków typu dent od 20.29% (genotyp 90) do 31.48% (genotyp 82).
- Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków materiałów hodowli B, pochodzących z doświadczenia założonego w Radzikowie przedstawia tabela 2.4. Zakres zmienności cechy dla badanych genotypów tej hodowli typu flint wahał się od 21.87% (dla genotypu 33) do 34.73% w przypadku genotypu o numerze kodowym 46, natomiast w przypadku ziarniaków typu dent od 23.92% (genotyp 14) do 34.61% (genotyp 18).

Tabela 2.1 Analiza zawartości amylozy w ziarniakach genotypów kukurydzy hodowli A, Kobierzyce 2015

| lp | genotyp | typ   | udział amylozy [%] |   |      | lp | genotyp | typ  | udział amylozy [%] |   |      |
|----|---------|-------|--------------------|---|------|----|---------|------|--------------------|---|------|
| 1  | 91      | flint | 28,59              | ± | 0,52 | 1  | 61      | dent | 27,04              | ± | 0,48 |
| 2  | 92      | flint | 28,99              | ± | 1,02 | 2  | 62      | dent | 27,72              | ± | 1,66 |
| 3  | 93      | flint | 24,67              | ± | 2,00 | 3  | 63      | dent | 27,12              | ± | 0,71 |
| 4  | 94      | flint | 24,62              | ± | 0,88 | 4  | 64      | dent | 29,25              | ± | 0,65 |
| 5  | 95      | flint | 26,35              | ± | 1,48 | 5  | 65      | dent | 24,84              | ± | 0,25 |
| 6  | 96      | flint | 28,19              | ± | 0,58 | 6  | 66      | dent | 25,40              | ± | 0,69 |
| 7  | 97      | flint | 25,38              | ± | 0,41 | 7  | 67      | dent | 29,85              | ± | 0,23 |
| 8  | 98      | flint | 23,28              | ± | 0,77 | 8  | 68      | dent | 26,42              | ± | 0,46 |
| 9  | 99      | flint | 26,47              | ± | 0,70 | 9  | 69      | dent | 27,09              | ± | 0,74 |
| 10 | 100     | flint | 26,91              | ± | 0,54 | 10 | 70      | dent | 26,09              | ± | 0,52 |
| 11 | 101     | flint | 25,73              | ± | 1,60 | 11 | 71      | dent | 27,52              | ± | 0,55 |
| 12 | 102     | flint | 28,39              | ± | 1,29 | 12 | 72      | dent | 23,23              | ± | 0,98 |
| 13 | 103     | flint | 23,81              | ± | 0,72 | 13 | 73      | dent | 26,97              | ± | 0,58 |
| 14 | 104     | flint | 25,23              | ± | 0,85 | 14 | 74      | dent | 26,38              | ± | 0,33 |
| 15 | 105     | flint | 22,70              | ± | 1,11 | 15 | 75      | dent | 24,66              | ± | 0,90 |
| 16 | 106     | flint | 26,49              | ± | 0,91 | 16 | 76      | dent | 26,45              | ± | 0,60 |
| 17 | 107     | flint | 28,76              | ± | 2,30 | 17 | 77      | dent | 23,39              | ± | 0,49 |
| 18 | 108     | flint | 30,24              | ± | 1,81 | 18 | 78      | dent | 27,65              | ± | 0,99 |
| 19 | 109     | flint | 26,61              | ± | 0,60 | 19 | 79      | dent | 27,84              | ± | 1,27 |
| 20 | 110     | flint | 26,29              | ± | 0,56 | 20 | 80      | dent | 25,71              | ± | 0,52 |
| 21 | 111     | flint | 27,16              | ± | 0,63 | 21 | 81      | dent | 27,51              | ± | 1,14 |
| 22 | 112     | flint | 25,86              | ± | 0,52 | 22 | 82      | dent | 25,50              | ± | 0,44 |
| 23 | 113     | flint | 31,14              | ± | 0,62 | 23 | 83      | dent | 30,01              | ± | 0,47 |
| 24 | 114     | flint | 27,37              | ± | 0,75 | 24 | 84      | dent | 26,45              | ± | 1,85 |
| 25 | 115     | flint | 30,77              | ± | 0,68 | 25 | 85      | dent | 29,39              | ± | 0,44 |
| 26 | 116     | flint | 32,23              | ± | 1,59 | 26 | 86      | dent | 25,50              | ± | 0,56 |
| 27 | 117     | flint | 23,67              | ± | 0,54 | 27 | 87      | dent | 29,25              | ± | 0,72 |
| 28 | 118     | flint | 29,32              | ± | 0,54 | 28 | 88      | dent | 24,08              | ± | 0,59 |
| 29 | 119     | flint | 27,40              | ± | 1,71 | 29 | 89      | dent | 29,28              | ± | 0,75 |
| 30 | 120     | flint | 28,84              | ± | 1,00 | 30 | 90      | dent | 27,05              | ± | 0,65 |

Tabela 2.2 Analiza zawartości amylozy w ziarniakach genotypów kukurydzy hodowli B, Smolice 2015

| lp | genotyp | typ   | udział amylozy [%] |   |      | lp | genotyp | typ  | udział amylozy [%] |   |      |
|----|---------|-------|--------------------|---|------|----|---------|------|--------------------|---|------|
| 1  | 31      | flint | 29,31              | ± | 0,41 | 1  | 1       | dent | 29,26              | ± | 0,50 |
| 2  | 32      | flint | 28,84              | ± | 0,73 | 2  | 2       | dent | 31,26              | ± | 0,51 |
| 3  | 33      | flint | 30,13              | ± | 0,84 | 3  | 3       | dent | 27,95              | ± | 0,71 |
| 4  | 34      | flint | 19,55              | ± | 0,36 | 4  | 4       | dent | 30,36              | ± | 0,46 |
| 5  | 35      | flint | 26,44              | ± | 0,84 | 5  | 5       | dent | 29,45              | ± | 0,59 |
| 6  | 36      | flint | 20,43              | ± | 0,42 | 6  | 6       | dent | 27,60              | ± | 0,37 |
| 7  | 37      | flint | 25,61              | ± | 0,51 | 7  | 7       | dent | 32,65              | ± | 0,29 |
| 8  | 38      | flint | 23,68              | ± | 0,52 | 8  | 8       | dent | 26,11              | ± | 0,50 |
| 9  | 39      | flint | 27,50              | ± | 0,66 | 9  | 9       | dent | 28,70              | ± | 0,45 |
| 10 | 40      | flint | 27,49              | ± | 1,01 | 10 | 10      | dent | 30,95              | ± | 1,47 |
| 11 | 41      | flint | 25,69              | ± | 0,59 | 11 | 11      | dent | 30,68              | ± | 3,37 |
| 12 | 42      | flint | 28,96              | ± | 0,81 | 12 | 12      | dent | 26,20              | ± | 0,95 |
| 13 | 43      | flint | 31,68              | ± | 0,73 | 13 | 13      | dent | 28,72              | ± | 0,55 |
| 14 | 44      | flint | 35,74              | ± | 0,95 | 14 | 14      | dent | 22,39              | ± | 1,42 |
| 15 | 45      | flint | 32,35              | ± | 0,67 | 15 | 15      | dent | 21,82              | ± | 0,66 |
| 16 | 46      | flint | 32,21              | ± | 1,61 | 16 | 16      | dent | 26,87              | ± | 0,84 |
| 17 | 47      | flint | 35,95              | ± | 0,45 | 17 | 17      | dent | 25,84              | ± | 0,45 |
| 18 | 48      | flint | 30,85              | ± | 0,50 | 18 | 18      | dent | 26,48              | ± | 2,38 |
| 19 | 49      | flint | 32,78              | ± | 0,42 | 19 | 19      | dent | 27,27              | ± | 0,48 |
| 20 | 50      | flint | 31,93              | ± | 0,45 | 20 | 20      | dent | 26,98              | ± | 0,34 |
| 21 | 51      | flint | 29,79              | ± | 0,48 | 21 | 21      | dent | 26,45              | ± | 0,45 |
| 22 | 52      | flint | 31,66              | ± | 0,84 | 22 | 22      | dent | 30,80              | ± | 0,64 |
| 23 | 53      | flint | 30,90              | ± | 0,56 | 23 | 23      | dent | 26,61              | ± | 0,92 |
| 24 | 54      | flint | 30,23              | ± | 0,60 | 24 | 24      | dent | 26,16              | ± | 1,03 |
| 25 | 55      | flint | 33,64              | ± | 0,84 | 25 | 25      | dent | 28,38              | ± | 0,30 |
| 26 | 56      | flint | 35,55              | ± | 1,15 | 26 | 26      | dent | 35,39              | ± | 0,77 |
| 27 | 57      | flint | 30,37              | ± | 1,02 | 27 | 27      | dent | 29,94              | ± | 1,10 |
| 28 | 58      | flint | 33,45              | ± | 0,58 | 28 | 28      | dent | 31,98              | ± | 0,88 |
| 29 | 59      | flint | 32,54              | ± | 0,67 | 29 | 29      | dent | 30,84              | ± | 0,34 |
| 30 | 60      | flint | 28,69              | ± | 0,27 | 30 | 30      | dent | 25,18              | ± | 1,07 |

Tabela 2.3 Analiza zawartości amylozy w ziarniakach genotypów kukurydzy hodowli A, Radzików 2015

| lp | genotyp | typ   | udział amylozy [%] |   |      | lp | genotyp | typ  | udział amylozy [%] |   |      |
|----|---------|-------|--------------------|---|------|----|---------|------|--------------------|---|------|
| 1  | 91      | flint | 28,49              | ± | 2,85 | 1  | 61      | dent | 29,97              | ± | 1,69 |
| 2  | 92      | flint | 23,11              | ± | 1,14 | 2  | 62      | dent | 24,82              | ± | 1,99 |
| 3  | 93      | flint | 23,11              | ± | 1,14 | 3  | 63      | dent | 31,39              | ± | 4,01 |
| 4  | 94      | flint | 29,46              | ± | 1,83 | 4  | 64      | dent | 25,43              | ± | 1,07 |
| 5  | 95      | flint | 31,31              | ± | 0,88 | 5  | 65      | dent | 23,32              | ± | 2,10 |
| 6  | 96      | flint | 27,49              | ± | 0,77 | 6  | 66      | dent | 28,69              | ± | 1,69 |
| 7  | 97      | flint | 26,65              | ± | 0,60 | 7  | 67      | dent | 29,87              | ± | 1,34 |
| 8  | 98      | flint | 30,27              | ± | 0,96 | 8  | 68      | dent | 24,82              | ± | 4,52 |
| 9  | 99      | flint | 29,97              | ± | 1,35 | 9  | 69      | dent | 24,64              | ± | 2,00 |
| 10 | 100     | flint | 23,74              | ± | 1,11 | 10 | 70      | dent | 27,81              | ± | 1,57 |
| 11 | 101     | flint | 29,13              | ± | 1,03 | 11 | 71      | dent | 24,33              | ± | 1,65 |
| 12 | 102     | flint | 35,07              | ± | 1,36 | 12 | 72      | dent | 23,77              | ± | 0,78 |
| 13 | 103     | flint | 33,75              | ± | 1,60 | 13 | 73      | dent | 24,69              | ± | 1,41 |
| 14 | 104     | flint | 26,94              | ± | 1,57 | 14 | 74      | dent | 20,87              | ± | 2,63 |
| 15 | 105     | flint | 23,42              | ± | 3,00 | 15 | 75      | dent | 27,10              | ± | 1,91 |
| 16 | 106     | flint | 26,40              | ± | 2,84 | 16 | 76      | dent | 26,95              | ± | 1,12 |
| 17 | 107     | flint | 24,59              | ± | 1,77 | 17 | 77      | dent | 22,96              | ± | 1,97 |
| 18 | 108     | flint | 27,75              | ± | 1,73 | 18 | 78      | dent | 26,77              | ± | 2,19 |
| 19 | 109     | flint | 25,32              | ± | 2,00 | 19 | 79      | dent | 24,45              | ± | 1,72 |
| 20 | 110     | flint | 27,12              | ± | 0,93 | 20 | 80      | dent | 26,28              | ± | 1,79 |
| 21 | 111     | flint | 23,46              | ± | 1,39 | 21 | 81      | dent | 25,76              | ± | 1,61 |
| 22 | 112     | flint | 28,54              | ± | 0,67 | 22 | 82      | dent | 31,48              | ± | 2,25 |
| 23 | 113     | flint | 28,74              | ± | 1,01 | 23 | 83      | dent | 25,66              | ± | 1,64 |
| 24 | 114     | flint | 26,60              | ± | 0,22 | 24 | 84      | dent | 26,30              | ± | 1,97 |
| 25 | 115     | flint | 28,68              | ± | 0,69 | 25 | 85      | dent | 26,25              | ± | 3,66 |
| 26 | 116     | flint | 34,14              | ± | 2,14 | 26 | 86      | dent | 26,44              | ± | 1,09 |
| 27 | 117     | flint | 27,56              | ± | 1,37 | 27 | 87      | dent | 20,62              | ± | 1,68 |
| 28 | 118     | flint | 28,69              | ± | 1,16 | 28 | 88      | dent | 25,15              | ± | 0,64 |
| 29 | 119     | flint | 29,74              | ± | 0,54 | 29 | 89      | dent | 20,72              | ± | 0,58 |
| 30 | 120     | flint | 31,00              | ± | 1,09 | 30 | 90      | dent | 20,29              | ± | 0,86 |

Tabela 2.4 Analiza zawartości amylozy w ziarniakach genotypów kukurydzy hodowli B, Radzików 2015

| lp | genotyp | typ   | udział amylozy [%] |   |      | lp | genotyp | typ  | udział amylozy [%] |   |      |
|----|---------|-------|--------------------|---|------|----|---------|------|--------------------|---|------|
| 1  | 31      | flint | 31,67              | ± | 0,77 | 1  | 1       | dent | 27,64              | ± | 1,13 |
| 2  | 32      | flint | 28,04              | ± | 1,71 | 2  | 2       | dent | 33,22              | ± | 1,55 |
| 3  | 33      | flint | 21,87              | ± | 2,11 | 3  | 3       | dent | 29,93              | ± | 0,50 |
| 4  | 34      | flint | 33,22              | ± | 0,74 | 4  | 4       | dent | 28,52              | ± | 1,25 |
| 5  | 35      | flint | 28,75              | ± | 0,58 | 5  | 5       | dent | 25,41              | ± | 2,00 |
| 6  | 36      | flint | 26,44              | ± | 0,73 | 6  | 6       | dent | 30,78              | ± | 2,03 |
| 7  | 37      | flint | 27,60              | ± | 0,64 | 7  | 7       | dent | 28,93              | ± | 0,94 |
| 8  | 38      | flint | 30,47              | ± | 0,72 | 8  | 8       | dent | 28,65              | ± | 5,45 |
| 9  | 39      | flint | 33,44              | ± | 0,59 | 9  | 9       | dent | 26,91              | ± | 0,79 |
| 10 | 40      | flint | 30,35              | ± | 0,38 | 10 | 10      | dent | 28,58              | ± | 3,28 |
| 11 | 41      | flint | 32,94              | ± | 0,58 | 11 | 11      | dent | 24,80              | ± | 1,04 |
| 12 | 42      | flint | 28,62              | ± | 1,23 | 12 | 12      | dent | 24,85              | ± | 1,59 |
| 13 | 43      | flint | 28,19              | ± | 0,45 | 13 | 13      | dent | 28,77              | ± | 1,00 |
| 14 | 44      | flint | 30,20              | ± | 1,45 | 14 | 14      | dent | 23,92              | ± | 1,24 |
| 15 | 45      | flint | 25,61              | ± | 1,62 | 15 | 15      | dent | 27,34              | ± | 1,46 |
| 16 | 46      | flint | 34,73              | ± | 0,44 | 16 | 16      | dent | 30,67              | ± | 2,36 |
| 17 | 47      | flint | 26,03              | ± | 0,57 | 17 | 17      | dent | 32,39              | ± | 0,88 |
| 18 | 48      | flint | 31,27              | ± | 1,33 | 18 | 18      | dent | 34,61              | ± | 0,78 |
| 19 | 49      | flint | 31,88              | ± | 0,72 | 19 | 19      | dent | 29,48              | ± | 2,33 |
| 20 | 50      | flint | 27,88              | ± | 1,82 | 20 | 20      | dent | 30,79              | ± | 0,97 |
| 21 | 51      | flint | 32,96              | ± | 0,85 | 21 | 21      | dent | 33,98              | ± | 1,06 |
| 22 | 52      | flint | 27,91              | ± | 1,01 | 22 | 22      | dent | 33,03              | ± | 1,59 |
| 23 | 53      | flint | 25,88              | ± | 0,40 | 23 | 23      | dent | 31,26              | ± | 2,25 |
| 24 | 54      | flint | 33,43              | ± | 2,09 | 24 | 24      | dent | 30,55              | ± | 1,78 |
| 25 | 55      | flint | 27,39              | ± | 0,88 | 25 | 25      | dent | 32,51              | ± | 2,89 |
| 26 | 56      | flint | 28,72              | ± | 0,89 | 26 | 26      | dent | 27,31              | ± | 1,87 |
| 27 | 57      | flint | 32,11              | ± | 0,93 | 27 | 27      | dent | 27,68              | ± | 0,67 |
| 28 | 58      | flint | 26,45              | ± | 1,69 | 28 | 28      | dent | 28,42              | ± | 2,36 |
| 29 | 59      | flint | 32,01              | ± | 0,34 | 29 | 29      | dent | 32,28              | ± | 0,57 |
| 30 | 60      | flint | 28,16              | ± | 4,53 | 30 | 30      | dent | 30,13              | ± | 0,87 |

Analizę zawartości ergosterolu oraz metabolitów *F.temperatum* – pochodnych heptadepsydowych (BEA oraz ENN) przeprowadzono w ziarniakach kukurydzy 60 genotypów hodowli „A” i 60 genotypów hodowli „B” 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).

Zawartość badanych matabolitów dla materiałów pochodzącychz hodowli „B” oraz „A” przedstawiają odpowiednio Tab.2.5 i Tab.2.6.

#### **W materiałach hodowli „B” średnia zawartość BEA:**

- w próbach kukurydzy typu dent pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w: Smolicach wynosiła 11,70 ppm, i wahała się od 0,86 do 103 ppm  
Radzikowie wynosiła 5,92 ppm i wahała się od 0,56 do 23,58 ppm
- w próbach kukurydzy typu flint pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w: Smolicach wynosiła 15,07 ppm, i wahała się od 0,71 do 35 ppm  
Radzikowie wynosiła 9,79 ppm i wahała się od 0,46 do 22,75 ppm

#### **W materiałach hodowli „B” średnia zawartość ENN**

- w próbach kukurydzy typu dent pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w Smolicach wynosiła 14,84 ppm, i wahała się od 2,27 do 36,23 ppm  
Radzikowie wynosiła 9,58 ppm i wahała się od 1,47 do 23,55 ppm
- w próbach kukurydzy typu flint pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w Smolicach wynosiła 22,28 ppm, i wahała się od 2,1 do 48,9 ppm  
Radzikowie wynosiła 14,49 ppm i wahała się od 1,37 do 31,79 ppm

#### **W materiałach hodowli „A” średnia zawartość BEA**

- w próbach kukurydzy typu dent pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w Kobierzycach wynosiła 7,08 ppm, i wahała się od 1 do 23,32 ppm  
Radzikowie wynosiła 6,32 ppm i wahała się od 0,72 do 21,11 ppm
- w próbach kukurydzy typu flint pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w Kobierzycach wynosiła 7,28 ppm, i wahała się od 0,0 do 59,83 ppm  
Radzikowie wynosiła 5,39 ppm i wahała się od 0,0 do 19,7 ppm

#### **W materiałach hodowli „A” średnia zawartość ENN**

- w próbach kukurydzy typu dent pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w Kobierzycach wynosiła 11,03 ppm, i wahała się od 3,32 do 19,43ppm  
Radzikowie wynosiła 8,71 ppm i wahała się od 2,00 do 18,4 ppm
- w próbach kukurydzy typu flint pochodzących z doswiadczenia w zrealizowanego w Kobierzycach wynosiła 7.39 ppm, i wahała się od 3,38 do 19,43 ppm  
Radzikowie wynosiła 5,54 ppm i wahała się od 2,44 do 12,1 ppm

Tab 2.5 Zawartość ergosterolu oraz metabolitów *F.temperatum* (BEA i ENN) w ziarniakach genotypów kukurydzy hodowli B, pochodzących z doświadczenia przeprowadzonego w Smolicach i Radzików

| GENOTYP | typ | SMOLICE    |           |           | RADZIKÓW   |           |           |
|---------|-----|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
|         |     | ERGO (ppm) | BEA (ppm) | ENN (ppm) | ERGO (ppm) | BEA (ppm) | ENN (ppm) |
| 1       | f   | 3,50       | 18,81     | 31,66     | 2,28       | 12,23     | 20,58     |
| 2       | f   | 4,70       | 16,32     | 37,38     | 3,06       | 10,61     | 24,30     |
| 3       | f   | 6,10       | 15,27     | 35,42     | 3,97       | 9,93      | 23,02     |
| 4       | f   | 3,80       | 15,54     | 33,98     | 2,47       | 10,10     | 22,09     |
| 5       | f   | 11,30      | 22,84     | 35,75     | 7,35       | 14,85     | 23,24     |
| 6       | f   | 2,20       | 5,25      | 29,07     | 1,43       | 3,41      | 18,90     |
| 7       | f   | 2,30       | 8,20      | 13,60     | 1,50       | 5,33      | 8,84      |
| 8       | f   | 1,20       | 2,30      | 10,10     | 0,78       | 1,50      | 6,57      |
| 9       | f   | 5,70       | 15,90     | 21,00     | 3,71       | 10,34     | 13,65     |
| 10      | f   | 12,40      | 34,00     | 44,70     | 8,06       | 22,10     | 29,06     |
| 11      | f   | 5,30       | 11,40     | 12,50     | 3,45       | 7,41      | 8,13      |
| 12      | f   | 2,50       | 17,30     | 13,10     | 1,63       | 11,25     | 8,52      |
| 13      | f   | 3,20       | 7,30      | 13,70     | 2,08       | 4,75      | 8,91      |
| 14      | f   | 8,90       | 35,00     | 23,80     | 5,79       | 22,75     | 15,47     |
| 15      | f   | 11,80      | 23,10     | 32,30     | 7,67       | 15,02     | 21,00     |
| 16      | f   | 16,30      | 22,30     | 24,40     | 10,60      | 14,50     | 15,86     |
| 17      | f   | 12,30      | 15,60     | 19,20     | 8,00       | 10,14     | 12,48     |
| 18      | f   | 3,10       | 3,90      | 12,30     | 2,02       | 2,54      | 8,00      |
| 19      | f   | 1,10       | 6,80      | 2,10      | 0,72       | 4,42      | 1,37      |
| 20      | f   | 3,70       | 2,90      | 5,80      | 2,41       | 1,89      | 3,77      |
| 21      | f   | 5,30       | 21,20     | 20,30     | 3,45       | 13,78     | 13,20     |
| 22      | f   | 14,50      | 12,40     | 48,90     | 9,43       | 8,06      | 31,79     |
| 23      | f   | 6,10       | 17,90     | 24,20     | 3,97       | 11,64     | 15,73     |
| 24      | f   | 1,30       | 4,50      | 3,60      | 0,85       | 2,93      | 2,34      |
| 25      | f   | 0,70       | 0,70      | 3,10      | 0,46       | 0,46      | 2,02      |
| 26      | f   | 1,90       | 5,90      | 12,30     | 1,24       | 3,84      | 8,00      |
| 27      | f   | 7,60       | 27,70     | 12,80     | 4,94       | 18,01     | 8,32      |
| 28      | f   | 13,10      | 23,00     | 33,20     | 8,52       | 14,95     | 21,58     |
| 29      | f   | 17,80      | 29,00     | 37,30     | 11,57      | 18,85     | 24,25     |
| 30      | f   | 12,10      | 9,80      | 21,10     | 7,87       | 6,37      | 13,72     |
| 31      | d   | 1,85       | 2,95      | 7,75      | 1,20       | 1,92      | 5,03      |
| 32      | d   | 3,64       | 7,16      | 11,30     | 2,37       | 4,65      | 7,34      |
| 33      | d   | 5,33       | 6,81      | 11,33     | 3,47       | 4,42      | 7,36      |
| 34      | d   | 7,58       | 10,98     | 13,88     | 4,92       | 7,14      | 9,02      |
| 35      | d   | 7,73       | 9,90      | 10,72     | 5,03       | 6,43      | 6,97      |
| 36      | d   | 4,88       | 7,24      | 13,54     | 3,17       | 4,71      | 8,80      |
| 37      | d   | 7,52       | 10,39     | 18,95     | 4,89       | 6,75      | 12,32     |
| 38      | d   | 20,59      | 36,27     | 36,23     | 9,20       | 23,58     | 23,55     |
| 39      | d   | 11,14      | 17,84     | 25,32     | 7,24       | 11,60     | 16,46     |
| 40      | d   | 20,35      | 103,59    | 26,95     | 11,20      | 9,30      | 17,51     |
| 41      | d   | 11,93      | 25,85     | 22,04     | 7,76       | 16,80     | 14,33     |
| 42      | d   | 6,94       | 3,92      | 10,77     | 4,51       | 3,80      | 7,00      |
| 43      | d   | 2,90       | 4,50      | 13,54     | 1,89       | 2,93      | 8,80      |
| 44      | d   | 1,95       | 2,55      | 7,28      | 1,27       | 1,65      | 4,73      |
| 45      | d   | 1,61       | 0,86      | 9,40      | 1,05       | 0,56      | 6,11      |
| 46      | d   | 2,35       | 3,39      | 7,65      | 1,53       | 2,20      | 4,97      |
| 47      | d   | 1,43       | 1,85      | 8,99      | 0,93       | 1,20      | 5,85      |
| 48      | d   | 2,46       | 5,73      | 9,57      | 1,60       | 3,72      | 6,22      |
| 49      | d   | 3,72       | 2,31      | 8,69      | 2,42       | 1,50      | 5,65      |
| 50      | d   | 3,67       | 8,89      | 16,42     | 2,39       | 5,78      | 10,67     |
| 51      | d   | 1,06       | 2,81      | 7,67      | 0,69       | 8,20      | 12,10     |
| 52      | d   | 1,74       | 2,22      | 9,04      | 1,13       | 1,44      | 5,88      |
| 53      | d   | 1,53       | 0,86      | 9,51      | 1,00       | 0,56      | 6,18      |
| 54      | d   | 1,32       | 3,14      | 9,26      | 1,40       | 4,10      | 7,20      |
| 55      | d   | 1,29       | 1,82      | 2,27      | 0,84       | 1,18      | 1,47      |
| 56      | d   | 4,80       | 21,73     | 28,72     | 3,12       | 14,12     | 18,67     |
| 57      | d   | 5,23       | 23,66     | 22,32     | 3,40       | 15,38     | 14,51     |
| 58      | d   | 0,82       | 2,85      | 19,82     | 0,53       | 1,85      | 8,20      |
| 59      | d   | 0,87       | 5,82      | 22,90     | 0,57       | 1,80      | 9,30      |
| 60      | d   | 4,20       | 13,20     | 23,54     | 2,73       | 8,58      | 15,30     |

Tab 2.6 Zawartość ergosterolu oraz metabolitów *F.temperatum* (BEA i ENN) w ziarniakach genotypów kukurydzy hodowli A, pochodzących z doświadczenia przeprowadzonego w Kobierzycach i Radzikowie

| Genotyp | typ | KOBIERZYCE |           |           | RADZIKÓW   |           |           |
|---------|-----|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
|         |     | ERGO (ppm) | BEA (ppm) | ENN (ppm) | ERGO (ppm) | BEA (ppm) | ENN (ppm) |
| 61      | d   | 6,49       | 1,75      | 7,51      | 3,20       | 2,30      | 6,20      |
| 62      | d   | 39,99      | 11,37     | 15,20     | 16,10      | 8,19      | 8,90      |
| 63      | d   | 30,97      | 7,29      | 15,88     | 25,20      | 7,10      | 14,80     |
| 64      | d   | 4,59       | 1,46      | 11,61     | 2,10       | 1,90      | 5,20      |
| 65      | d   | 18,74      | 4,44      | 15,20     | 8,20       | 4,10      | 11,50     |
| 66      | d   | 36,11      | 12,85     | 6,76      | 26,00      | 9,25      | 5,30      |
| 67      | d   | 8,79       | 2,86      | 10,15     | 14,10      | 1,40      | 6,80      |
| 68      | d   | 24,92      | 13,00     | 16,37     | 25,10      | 9,36      | 14,20     |
| 69      | d   | 33,95      | 12,75     | 17,01     | 18,10      | 13,60     | 10,70     |
| 70      | d   | 3,72       | 1,00      | 13,76     | 2,30       | 0,72      | 9,91      |
| 71      | d   | 11,19      | 6,03      | 14,46     | 8,60       | 3,20      | 8,50      |
| 72      | d   | 7,58       | 2,54      | 11,78     | 5,46       | 1,40      | 8,30      |
| 73      | d   | 40,47      | 11,41     | 19,43     | 25,10      | 11,30     | 12,20     |
| 74      | d   | 71,49      | 22,40     | 16,34     | 23,10      | 21,10     | 18,40     |
| 75      | d   | 12,83      | 2,34      | 12,71     | 12,10      | 1,69      | 9,15      |
| 76      | d   | 13,81      | 2,15      | 15,04     | 9,94       | 1,00      | 10,83     |
| 77      | d   | 14,18      | 3,90      | 16,14     | 12,10      | 2,90      | 8,70      |
| 78      | d   | 9,13       | 1,59      | 13,78     | 6,58       | 1,50      | 9,92      |
| 79      | d   | 13,31      | 3,10      | 12,13     | 14,10      | 2,90      | 8,10      |
| 80      | d   | 35,96      | 15,09     | 14,54     | 23,10      | 14,10     | 13,20     |
| 81      | d   | 11,93      | 2,18      | 5,74      | 10,20      | 4,70      | 6,30      |
| 82      | d   | 58,60      | 23,32     | 5,68      | 42,19      | 15,10     | 12,30     |
| 83      | d   | 34,10      | 17,32     | 5,54      | 21,00      | 17,20     | 3,99      |
| 84      | d   | 5,60       | 1,34      | 4,65      | 4,03       | 0,97      | 2,00      |
| 85      | d   | 13,80      | 2,23      | 4,56      | 14,50      | 3,00      | 12,10     |
| 86      | d   | 11,10      | 1,79      | 5,92      | 5,20       | 2,30      | 4,26      |
| 87      | d   | 23,30      | 4,61      | 9,55      | 14,20      | 3,32      | 6,87      |
| 88      | d   | 34,70      | 9,05      | 5,57      | 21,60      | 9,70      | 5,20      |
| 89      | d   | 18,70      | 10,14     | 4,84      | 12,90      | 12,20     | 4,60      |
| 90      | d   | 4,50       | 1,19      | 3,32      | 2,10       | 2,30      | 3,10      |
| 91      | f   | 9,50       | 2,33      | 3,52      | 6,84       | 4,30      | 2,53      |
| 92      | f   | 21,10      | 15,61     | 6,88      | 13,20      | 9,40      | 4,95      |
| 93      | f   | 3,10       | 0,78      | 5,04      | 3,70       | 5,20      | 3,63      |
| 94      | f   | 6,80       | 2,51      | 7,08      | 4,90       | 1,81      | 5,10      |
| 95      | f   | 30,20      | 16,32     | 6,49      | 20,70      | 11,75     | 4,67      |
| 96      | f   | 4,60       | 1,76      | 7,46      | 2,80       | 2,40      | 5,37      |
| 97      | f   | 3,10       | 0,69      | 6,13      | 2,90       | 0,50      | 4,41      |
| 98      | f   | 22,70      | 11,06     | 7,53      | 16,34      | 12,10     | 5,42      |
| 99      | f   | 3,10       | 1,11      | 4,97      | 2,23       | 0,80      | 3,58      |
| 100     | f   | 31,20      | 19,30     | 9,58      | 22,46      | 13,89     | 6,90      |
| 101     | f   | 4,30       | 1,09      | 7,27      | 3,10       | 2,10      | 5,24      |
| 102     | f   | 4,10       | 1,59      | 13,60     | 2,95       | 1,15      | 9,80      |
| 103     | f   | 32,40      | 11,59     | 9,14      | 23,33      | 8,35      | 6,58      |
| 104     | f   | 13,20      | 5,39      | 8,73      | 9,50       | 3,88      | 6,29      |
| 105     | f   | 4,50       | 0,70      | 7,45      | 3,24       | 2,40      | 5,37      |
| 106     | f   | 15,80      | 5,30      | 5,40      | 7,20       | 11,50     | 12,10     |
| 107     | f   | 15,60      | 3,08      | 11,77     | 11,23      | 2,22      | 8,48      |
| 108     | f   | 1,50       | 0,70      | 4,02      | 1,08       | 0,51      | 2,89      |
| 109     | f   | 10,40      | 1,85      | 7,25      | 7,49       | 1,33      | 7,80      |
| 110     | f   | 132,10     | 59,83     | 13,75     | 31,50      | 19,70     | 9,90      |
| 111     | f   | 15,50      | 4,49      | 6,48      | 11,16      | 3,23      | 4,67      |
| 112     | f   | 19,40      | 7,75      | 5,17      | 13,97      | 5,58      | 9,40      |
| 113     | f   | 10,30      | 3,76      | 7,75      | 7,42       | 10,30     | 5,58      |
| 114     | f   | 2,30       | 0,00      | 7,90      | 1,66       | 0,00      | 5,69      |
| 115     | f   | 5,30       | 1,09      | 3,38      | 3,82       | 0,79      | 2,44      |
| 116     | f   | 10,30      | 2,77      | 6,46      | 7,42       | 2,00      | 4,65      |
| 117     | f   | 19,80      | 9,30      | 9,40      | 9,10       | 5,30      | 5,70      |
| 118     | f   | 66,00      | 22,14     | 11,73     | 22,70      | 15,94     | 8,45      |
| 119     | f   | 11,40      | 3,22      | 6,37      | 8,21       | 2,32      | 4,59      |
| 120     | f   | 3,60       | 1,43      | 4,19      | 2,59       | 1,03      | 3,02      |

## Dyskusja

Skrobię tworzą dwa podstawowe komponenty amylopektyna i amyloza. Amylopektyna posiada strukturę krystaliczną i jest dominującym składnikiem stanowiąc przeciętnie 70-80% skrobi. Pozostałą część 20-30% stanowi amyloza (Li i in. 2008), posiada ona budowę amorficzną i pomimo, że jej udział w strukturze bielma jest znacznie mniejszy w istotnym stopniu decyduje o właściwościach fizycznych ziarniaków w tym twardości (Dombrink-Kurtzman i Knutson 1997). Blandino i in. (2010) stwierdzili m.in. występowanie istotnej korelacji pomiędzy udziałem amylozy a udziałem tzw twardego endospermu (0,50) i zawartości białka (0,68). Cechy te mogą wpływać na stopień ich porażenia przez patogeny. Wit (2012) analizując zależność pomiędzy udziałem amylozy w ziarniakach czterech odmian botanicznych kukurydzy (*Zea mays* var. *indentata*, *Zea mays* var. *indurata*, *Zea mays* var. *evarta* oraz *Zea mays* var. *saccharata*) a ich podatnością na porażenie przez *Fusarium verticillioides* stwierdził występowanie istotnych korelacji pomiędzy tymi cechami. Wartość współczynnika korelacji wahała się od -0,55 do -0,74 w zależności od sezonu wegetacyjnego.

W przypadku materiałów hodowlanych, które były przedmiotem analizy w roku 2015, stwierdzono występowanie jedynie tendencji mniejszej podatności form flint niż dent na porażenie przez *F.temperatum*, przy jednoczesnym większym udziale amylozy w endospermie ziarniaków typu flint.

Literatura na temat występowania metabolitów wtórnych *F.temperatum* w materiale roślinnym (in-vivo) jest bardzo skromna. Ogranicza się do pracy Wang i in 2014. Stwierdzili oni występowanie w kolbach kukurydzy inokulowanych izolatami *F.temperatum* jedynie Fumonizyny FB1 w zakresie stężeń ( 0,72 do 23,40 µg/g) oraz Fumonizyny FB2 w zakresie stężeń od 6,42 do 165,37 µg/g. Autorzy nie stwierdzili w ogóle występowania związków heptadepsyptydowych (beauwerycyny eniatyn), które jak wynika z dotychczasowych badań są dominującymi metabolitami *F.temperatum* biosyntetyzowanymi in vitro, co przedstawiono w dyskusji tematu 3.

## Wnioski

- 2.1 Formy flint charakteryzują się większym udziałem amylozy w strukturze skrobi niż dent
- 2.2 Istotny wpływ na zawartość amylozy w skrobi mają warunki środowiska
- 2.3 Istnieje duże ryzyko zanieczyszczenia kompleksem metabolitów heptadepsyptydowych (BEA i ENN) kolb kukurydzy porażanych przez *F.temperatum*.

## Literatura

Blandino M., Mancini M., Peila A., Rolle L., Vanara F., Reyneri A. 2010. Determination of maize kernel hardness: comparison of different laboratory tests to predict dry-milling performance. J.Sci. Food Agric. 90. 19870 – 1878.

Blandino M., Reyneri A. 2007. Comparison between normal and waxy maize hybrids for fusarium-toxin contamination in NW Italy. Maydica 52 (2): 127-134.

Dombrink-Kurtzman M.A., Knutson C.A. 1997. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. Cereal Chem. 74(6): 776-780

Jane J., Ao Z., Duvick S.A., Wiklund M., Yoo S.-H., Wong K.-S., Gardner C. 2003. Structures of amylopectin and starch granules: How are they synthesized? *J. Appl. Glycosci.* 50 (2):167-172.

Li L., Jiang H., Campbell M., Blanco M., Jane J. 2008. Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. *Carbohydrate Polymers.* 74(3): 396-404.

Scauflaire J., Gourgue M., Callebaut A., Munaut F. 2012. *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *Eur J Plant Pathol* 133: 911-922.

Wang J.H., Zhang J.B., Li H.P., Gong A.D., Xue S., Agboola R.S., Liao Y.C. 2014. Molecular identification, mycotoxin production and comparative pathogenicity of *Fusarium temperatum* isolated from maize in China. *J Phytopathol.* 162:147-157.

Wit M. 2012. Znaczenie *Fusarium verticillioides* w etiologii fuzariozy kolb kukurydzy. Praca doktorska 206pp.

Young J.C. 1995. Microwave-assisted extraction of the fungal metabolites ergosterol and total fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 43(11): 2904-2910.

#### Mierniki dla tematu badawczego 2:

| Lp. | miernik <sup>3</sup>                                     | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
|-----|--|--|-------------------------------|
| 1   | Liczba analizowanych genotypów ziarniaków                | 120                                      | 120                           |
| 2   | Liczba powtórzeń   | 2  | 2                             |
| 3   | Liczba analizowanych mykotoksyn i ergosterolu            | 3  | 3                             |
| 4   | Liczba prób analizowanych pod kątem amylozy/amylopektyny | 2x120                                    | 2x120                         |

<sup>3</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

### 3.3 Temat badawczy 3 Analiza populacji *F.temperatum* w zakresie cech istotnych w patogenezie i epidemiologii fuzariozy kolb kukurydzy

#### Cel tematu

Ocena patogeniczności, spektrum biosyntezyzowanych metabolitów oraz zmienności populacji *F.temperatum*

Cel został osiągnięty

#### Material i metody

A. pozyskanie izolatów *F.temperatum* do badań z zakresu spektrum biosyntezyzowanych metabolitów, patogeniczności i zmienności. Izolaty pochodziły z ziarniaków uzyskanych z kolb wykazujących objawy fuzariozy rozwijającej się w następstwie infekcji naturalnych. Izolacja i identyfikacja była/jest prowadzona z zastosowaniem standardowych metod mających zastosowanie w diagnostyce *Fusarium* (Kwaśna i in. 1991). Wiarygodność diagnostyki była/jest potwierdzana molekularnie, co w przypadku *F.temperatum* (z uwagi na jego podobieństwo do innych gatunków *Fusarium* z sekcji *Liseola*) jest działaniem nieodzownym. Analiza molekularna opierała się na sekwencjonowaniu ITS, EF-1 $\alpha$  oraz  $\beta$ -tubuliny uznawanych za podstawowe markery barkodingu. Zmienność badanej populacji określano na podstawie cech molekularnych.

B. analiza spektrum biosyntezyzowanych metabolitów *F.temperatum* prowadzono w oparciu o ziarniaki kukurydzy i ryżu stanowiące podłoże, na którym w warunkach in-vitro prowadzono hodowlę patogena. Podłoże w ilości 50 g, po doprowadzeniu do wilgotności 45% a następnie zautoklawowaniu zaszczepiano zawiesiną zarodników o mianie 10<sup>6</sup>. Hodowla prowadzono w 750 ml kolbach Erlenmeyera przez dwa tygodnie. Po tym czasie przerośnięte przez *F.temperatum* podłoże liofilizowano. Zliofilizowany materiał zabezpieczano w torebkach polietylenowych i przechowywano do czasu analizy w temperaturze -75°C. Analizę spektrum biosyntezyzowanych metabolitów *F.temperatum* prowadzono w kierunku identyfikacji: fumonizyn, pochodnych trichotecenowych, związków heptadepsydowych oraz ergosterolu. Analizie poddawano izolaty o przebadanej patogeniczności i różnych wartościach tej cechy.

- Analiza fumonizyn - Ekstrakcja fumonizyn była prowadzona mieszaniną metanolu i wody (3 +1, V/V) z próbek materiału uprzednio rozdrobnionego. Ekstrakty po przefiltrowaniu będą następnie oczyszczane na kolumnach jonowymiennych SAX i zbierane do fiolek. Uzyskany eluent następnie odparowano do sucha i przechowywano do momentu analizy w temperaturze 4°C. Analiza fumonizyn B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> była przeprowadzana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosując chromatograf cieczowy HP 1050 wyposażony w detektor fluorescencyjny. Po przeprowadzeniu fumonizyn w pochodne o-ftaldialdehydowe (OPA), rozdział był prowadzony na kolumnie RP C18.

- Procedura analiz trichotecenów B (DON, 3-AcDON, 15-AcDON, NIV, FUS-X) -Ekstrakcja trichotecenów B prowadzono z użyciem wodnego roztworu acetonitrylu (84:16 v/v) z próbek rozdrobnionego ziarna. Ekstrakty po przefiltrowaniu oczyszczano na kolumnkach SPE TRICH 227

(Romerlab) i zbierane do fiolek. Uzyskany eluent odparowano do sucha i przechowywano do momentu analizy w temperaturze 4°C. Analizę trichotecenów przeprowadzano metodą chromatografii gazowej stosując chromatograf gazowy wyposażony w detektor wychwytu elektronów (GC-ECD). Po przeprowadzeniu mykotoksyn do pochodnych silylowych i naniesieniu do komory nastrykowej rozdział był prowadzony na kolumnie MS-5, 30 m w gradiencie temperatur 165 – 310°C.

- Procedura analiz pochodnych hepatadepsdowych - Ekstrakcję prowadzono z użyciem metanolu z próbek materiału uprzednio rozdrobnionego. Ekstrakty po przefiltrowaniu zateżano i oczyszczano na kolumnkach SPE C18 i zbierane do fiolek. Uzyskany eluent odparowano do sucha i przechowywano do momentu analizy w temperaturze 4°C. Analizę przeprowadzano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosując chromatograf cieczowy HP 1050 wyposażony w detektor UV-VIS przy długości fali 205 nm. Rozdział był prowadzony na kolumnie RP C18 , 250 x 4,6 mm, o wielkości ziarna 5 mikrometrów w systemie izokratycznym, stosując jako eluent roztwór acetonitrylu w wodzie (65:35 v/v).

C. Ocena patogeniczności izolatów *F.temperatum* została przeprowadzona metodą „toothpicks” będącą adaptacją metody opisaną przez Scauflaire i in. (2012). Inokulowane były 7 tygodniowe rośliny kukurydzy poprzez wprowadzenie w łodygę wykałaczką przerośniętej grzybnią *F.temperatum*. Po okresie 2 tygodni od momentu inokulacji rośliny były ścinane, pędy krojone a rozmiar nekrozy mierzony. Doświadczenie przeprowadzono przy 10 krotnym powtórzeniu dla każdego izolatu. Ocenie patogeniczności poddawano izolaty *F.temperatum*, których tożsamość gatunkowa została molekularnie potwierdzona.

## **Wyniki**

### **A/ Analiza molekularna izolatów *F.temperatum***

Izolaty do badań pochodziły z ziarniaków uzyskanych z kółb wykazujących objawy fuzariozy rozwijającej się w następstwie infekcji naturalnych. Próby ziarniaków pochodziły z Radzikowa, Piotrkowa Borowskiego, Głuchowa oraz Skrzelewa. Ziarniaki wykładano na podłoże PDA w szalkach petriego, a po uzyskaniu wzrostu plechy, grzybnię o cechach *Fusarium* spp pasażowano na skosy. Wstępną identyfikację uzyskanych izolatów, przeprowadzano na podłożu SNA. Z izolatów o cechach *F. temperatum* wyprowadzano kultury jednozarodnikowe, które stanowiły podstawę do badań molekularnych.

Pełną charakterystykę molekularną z zastosowaniem technik barkodingu DNA tj procedurę przewidzianą w projekcie, przeprowadzono dla 70 izolatów *F. temperatum*. Jako barkody DNA wykorzystano markery o uznanej skuteczności w identyfikacji gatunkowej workowców z rzędu Hypocreales: Internal Transcribed Spacers (ITS), Translation Elongation Factor 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) oraz fragment genu kodującego  $\beta$ -tubulinę. W celu zamplifikowania tych fragmentów genomu grzybów całkowite DNA izolatów *F.temperatum* poddawano reakcji amplifikacji z wykorzystaniem starterów specyficznych (White i in.,1990; O'Donnell i in.,1998; O'Donnell i Cigelnik, 1997). Zestawienie starterów zastosowanych

w doświadczeniach, ich sekwencje oraz odpowiadające im wielkości amplifikowanego fragmentu DNA przedstawia Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Charakterystyka starterów wykorzystanych do diagnostyki molekularnej izolatów *F. temperatum*.

| Marker                        | Nazwa startera | Seqwencja startera           | Wielkość amplikonu | Źródło                     |
|-------------------------------|----------------|------------------------------|--------------------|----------------------------|
| Elongation Factor 1- $\alpha$ | EF1            | 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3'   | 680 pz             | O'Donnell i in., 1998      |
|                               | EF2            | 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'  |                    |                            |
| $\beta$ -tubulina             | T1             | 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'  | 1220 pz            | O'Donnell i Cigelnik, 1997 |
|                               | T22            | 5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'  |                    |                            |
| Internal Transcribed Spacers  | its5           | 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' | 890 pz             | White i in., 1990          |
|                               | its4           | 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'   |                    |                            |

Reakcje amplifikacji prowadzono w termocyklerach Applied Biosystems: 2720 Thermal Cycler (96 Well) oraz Veriti 96 Well Thermal Cycler. Na każdą próbę sporządzano 20  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej o składzie przedstawionym w Tabeli 3.2. Zastosowane warunki reakcji dla poszczególnych markerów zestawiono w Tabeli 3.

Rozdział produktów amplifikacji prowadzono w żelu agarozowym o stężeniu 1,3 % z dodatkiem barwnika fluoryzującego (bromku etydy) w buforze TBE (bufor Tris, kwas borowy, EDTA, pH 8,0). Elektroforezie poddawano 5  $\mu$ l produktu amplifikacji.

Tabela 3.2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

| Składnik mieszaniny     | Objętość     |
|-------------------------|--------------|
| sterylna woda           | 14,0 $\mu$ l |
| 10X Taq Buffer          | 2,0 $\mu$ l  |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 1,6 $\mu$ l  |
| 10mM dNTP Mix           | 0,2 $\mu$ l  |
| starter forward         | 0,2 $\mu$ l  |
| starter reverse         | 0,2 $\mu$ l  |
| polimeraza Taq          | 0,2 $\mu$ l  |
| DNA                     | 1,6 $\mu$ l  |

Tabela 3.3 Warunki reakcji PCR dla poszczególnych markerów

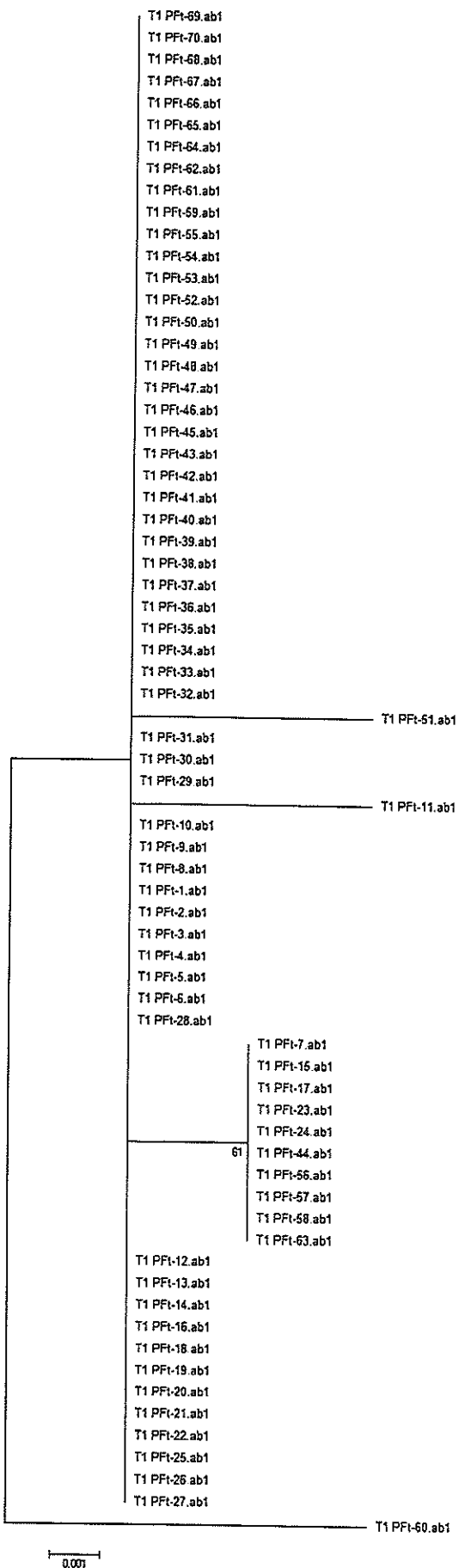
| Etapy reakcji PCR                              | Marker         |                    |                |                    |                   |                    |
|--|----------------|--------------------|----------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|  | ITS            |                    | EF-1 $\alpha$  |                    | $\beta$ -tubulina |                    |
| Wstępna denaturacja                            | 5 minut, 94 °C |                    | 5 minut, 94 °C |                    | 5 minut, 94 °C    |                    |
| Denaturacja                                    |                | 30 sekund<br>94 °C |                | 30 sekund<br>95 °C |                   | 35 sekund<br>94 °C |
| Przyłączanie starterów                         | 40<br>cykli    | 30 sekund<br>52 °C | 40<br>cykli    | 45 sekund<br>58 °C | 40<br>cykli       | 55 sekund<br>54 °C |
| Synteza nici komplementarnych                  |                | 30 sekund<br>72 °C |                | 75 sekund<br>72 °C |                   | 90 sekund<br>72 °C |
| Końcowe wydłużanie syntetyzowanego odcinka DNA | 7 minut, 72 °C |                    | 7 minut, 72 °C |                    | 7 minut, 72 °C    |                    |

Uzyskane amplikony oczyszczano i sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Biochemii i Biofizyki przy Państwowej Akademii Nauk. Uzyskane sekwencje Internal Transcribed Spacers (ITS), Translation Elongation Factor 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) i  $\beta$ -tubuliny analizowano z wykorzystaniem programów bioinformatycznych (MEGA 6.0 oraz DNA Baser 3.2.5). Przynależność do gatunku weryfikowano za pomocą algorytmu BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) w oparciu o minimum 95% homologie uzyskanych sekwencji względem dostępnych w GenBank sekwencji izolatów gatunku *F. temperatum* (Tab. 3.4) Do analiz wybierano wyłącznie fragmenty sekwencji ITS, EF-1 $\alpha$  i  $\beta$ -tubuliny o wysokiej jakości odczytu, których długość wyniosła odpowiednio: 325 pz, 298 pz oraz 424 pz. Na podstawie przygotowanych przyrównań / dopasowań (ang. *alignment*) sekwencji wykonano analizę filogenetyczną za pomocą metody największej wiarygodności (Maximum Likelihood, ML) kolejno dla wszystkich trzech analizowanych regionów EF-1 $\alpha$  (Ryc. 3.1), ITS yc. 3.2),  $\beta$ -tubulina (Ryc. 3.3).

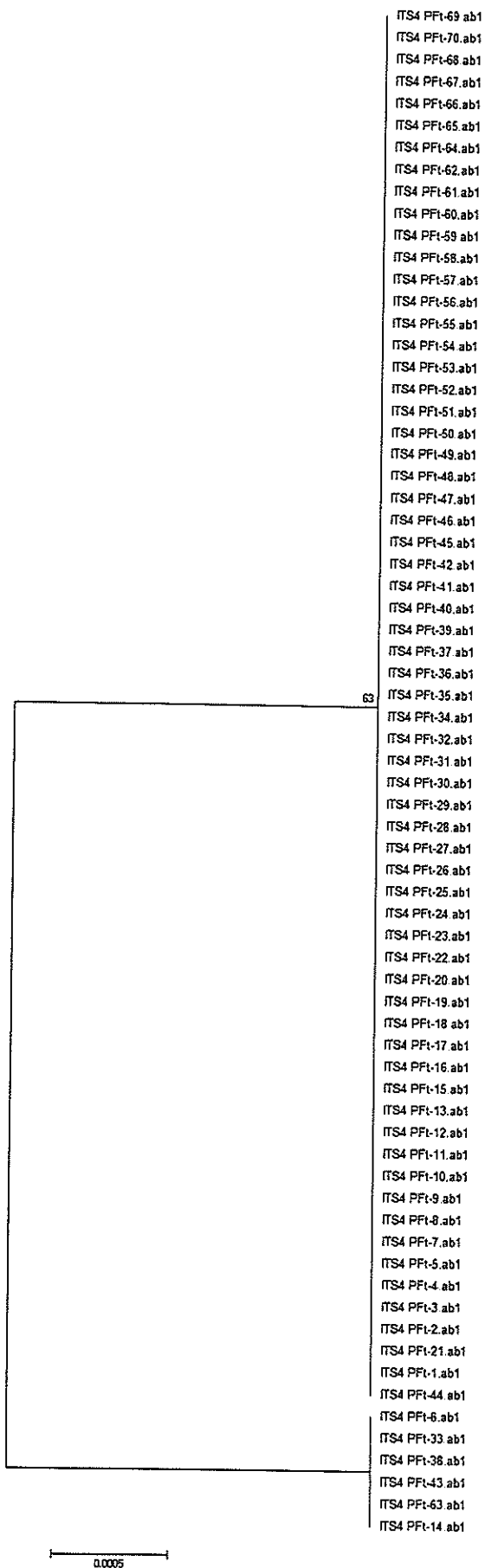
Tab. 3.4 Homologia uzyskanych sekwencji względem dostępnych w GenBank sekwencji izolatów gatunku *F. temperatum*

| IZOLAT | BLAST EF |                        |          | BLAST ITS            |                        |          | BLAST B-tubulina       |                        |          |                      |
|--------|----------|------------------------|----------|----------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------------------|
|        | %        | Sekwencja homologiczna | Gatunek  | %                    | Sekwencja homologiczna | Gatunek  | %                      | Sekwencja homologiczna | Gatunek  |                      |
| 1      | Pft-1    | 99,5%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,7%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 2      | Pft-2    | 99,8%                  | JX987069 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 3      | Pft-3    | 99,9%                  | KR108793 | <i>F. temperatum</i> | 99,4%                  | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%                 | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 4      | Pft-4    | 99,5%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 5      | Pft-5    | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 99,7%                  | KR051410 | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 6      | Pft-6    | 99,8%                  | KC964119 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP760063 | <i>F. proliferatum</i> | 99,5%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 7      | Pft-7    | 97,0%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 8      | Pft-8    | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,2%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 9      | Pft-9    | 97,2%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 96,7%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 10     | Pft-10   | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,7%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 11     | Pft-11   | 99,8%                  | KM583803 | <i>F. temperatum</i> | 99,8%                  | EU821492 | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 12     | Pft-12   | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 13     | Pft-13   | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KR051410 | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%                 | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 14     | Pft-14   | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 99,8%                  | AB374083 | <i>F. sacchari</i>     | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 15     | Pft-15   | 99,6%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 16     | Pft-16   | 99,8%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 99,9%                  | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%                 | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 17     | Pft-17   | 99,6%                  | KC964119 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 98,5%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 18     | Pft-18   | 99,1%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KR051410 | <i>F. temperatum</i>   | 99,8%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 19     | Pft-19   | 99,8%                  | KT447150 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 20     | Pft-20   | 98,8%                  | KC964119 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 21     | Pft-21   | 98,1%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 99,9%                  | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,4%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 22     | Pft-22   | 98,6%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 23     | Pft-23   | 99,7%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 99,6%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 24     | Pft-24   | 99,8%                  | KM583803 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KR051410 | <i>F. temperatum</i>   | 99,7%                  | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 25     | Pft-25   | 99,4%                  | KC964119 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%                 | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 26     | Pft-26   | 99,8%                  | KC964119 | <i>F. temperatum</i> | 100,0%                 | KR051410 | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%                 | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |
| 27     | Pft-27   | 99,1%                  | KC964112 | <i>F. temperatum</i> | 99,9%                  | KP003948 | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%                 | KC964135 | <i>F. temperatum</i> |

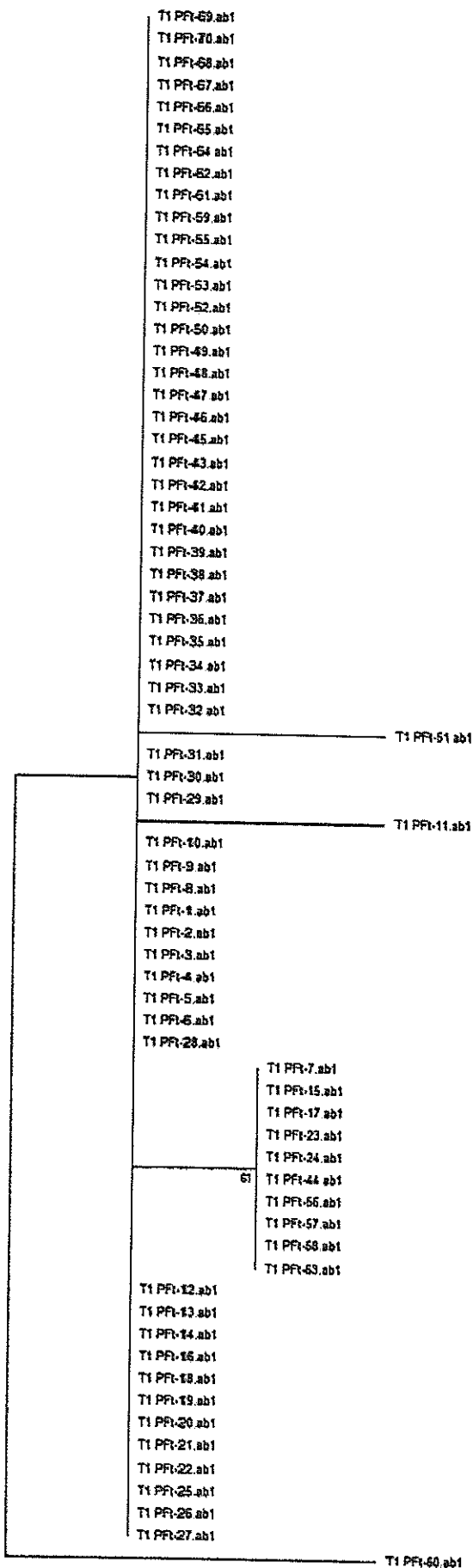
| IZOLAT |         | BLAST EF |                        |                        | BLAST ITS |                        |                        | BLAST B-tubulina |                        |                      |
|--------|---------|----------|------------------------|------------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------------|------------------------|----------------------|
|        |         | %        | Sekwencja homologiczna | Gatunek                | %         | Sekwencja homologiczna | Gatunek                | %                | Sekwencja homologiczna | Gatunek              |
| 28     | PfFt-28 | 99,5%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 29     | PfFt-29 | 97,9%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | JQ885453               | <i>Fusarium sp.</i>    | 99,7%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 30     | PfFt-30 | 99,3%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 31     | PfFt-31 | 98,5%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 32     | PfFt-32 | 99,8%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 99,7%     | EU272500               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 33     | PfFt-33 | 96,5%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP760063               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 34     | PfFt-34 | 99,6%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 35     | PfFt-35 | 99,9%    | KM583803               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 36     | PfFt-36 | 98,7%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 79,5%     | KP760063               | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 37     | PfFt-37 | 99,5%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%     | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 38     | PfFt-38 | 97,3%    | KP336409               | <i>F. subglutinans</i> | 97,1%     | KP760063               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 39     | PfFt-39 | 98,8%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%     | HQ631057               | <i>Fusarium sp.</i>    | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 40     | PfFt-40 | 99,2%    | KT447150               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 41     | PfFt-41 | 99,5%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 42     | PfFt-42 | 99,8%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 98,1%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 43     | PfFt-43 | 99,8%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP760063               | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 44     | PfFt-44 | 99,8%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 99,6%     | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 99,2%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 45     | PfFt-45 | 99,8%    | KT447150               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 99,6%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 46     | PfFt-46 | 99,3%    | KM583803               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 47     | PfFt-47 | 99,0%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 99,0%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 48     | PfFt-48 | 99,5%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 49     | PfFt-49 | 99,7%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%     | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 99,6%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 50     | PfFt-50 | 95,7%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,7%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 51     | PfFt-51 | 99,6%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,1%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 52     | PfFt-52 | 99,2%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 53     | PfFt-53 | 99,8%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 54     | PfFt-54 | 97,7%    | JX987074               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,5%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 55     | PfFt-55 | 99,8%    | JX987074               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 56     | PfFt-56 | 99,9%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,7%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 57     | PfFt-57 | 99,4%    | HM067686               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,8%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 58     | PfFt-58 | 99,5%    | KC964119               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 59     | PfFt-59 | 99,1%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 60     | PfFt-60 | 99,9%    | KM583803               | <i>F. temperatum</i>   | 99,9%     | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 97,4%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 61     | PfFt-61 | 99,0%    | KR108793               | <i>F. temperatum</i>   | 99,8%     | KC179826               | <i>F. temperatum</i>   | 99,8%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 62     | PfFt-62 | 97,5%    | KC964112               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 63     | PfFt-63 | 96,8%    | KM583803               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP760063               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 64     | PfFt-64 | 98,9%    | JX987074               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 65     | PfFt-65 | 99,9%    | KT447150               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,9%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 66     | PfFt-66 | 99,9%    | KT447150               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,7%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 67     | PfFt-67 | 99,9%    | KR108793               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KR051410               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 68     | PfFt-68 | 99,9%    | KR108793               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 99,3%            | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 69     | PfFt-69 | 99,8%    | KM583803               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |
| 70     | PfFt-70 | 99,8%    | KR108793               | <i>F. temperatum</i>   | 100,0%    | KP003948               | <i>F. proliferatum</i> | 100,0%           | KC964135               | <i>F. temperatum</i> |



Ryc. 3.1 Drzewo filogenetyczne obliczone za pomocą metody największej wiarygodności (Maximum Likelihood, ML) dla EF.



Ryc. 3.2 Drzewo filogenetyczne obliczone za pomocą metody największej wiarygodności (Maximum Likelihood, ML) dla sekwencji ITS.



Ryc. 3.3 Drzewo filogenetyczne obliczone za pomocą metody największej wiarygodności (Maximum Likelihood, ML) dla  $\beta$ -tubuliny.

## B/ Profil metabolitów wtórnych biosyntetyzowanych przez *Fusarium temperatum*

Profil metabolitów wtórnych biosyntetyzowanych przez izolaty *F.temperatum* przedstawia tabela 3.5. W badaniach uwzględniono 25 izolatów wspomnianego gatunku dla których biosyntezę metabolitów prowadzono na dwóch podłożach tj. ziarniakach, kukurydzy oraz ryżu. Analiza została przeprowadzona w kierunku występowania fumonizyn (FB1 i FB2), pochodnych trichothecenowych (DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV) fuzarenonu oraz pochodnych heptadepsyptydowych (BEA i ENN).

Na ryżu, żaden z przebadanych 25 izolatów *F.temperatum* nie wytwarzał fumonizyn, pochodnych trichothecenowych oraz fuzarenonu. Spośród przebadanych izolatów *F.temperatum* wszystkie tworzyły BEA i ENN. Średni poziom BEA dla populacji przebadanych izolatów wynosił 406 ppm. Ilościowo najwięcej BEA biosyntetyzował izolat Pft 11 (1300 ppm), najmniej izolat Pft 28 (0.2 ppm). Średni poziom ENN dla populacji przebadanych izolatów wynosił 81,78 ppm. Ilościowo najwięcej ENN biosyntetyzował izolat Pft 21 (647 ppm), najmniej izolat Pft 23 (3,9 ppm).

Zbliżone wyniki uzyskano analizując profil biosyntetyzowanych metabolitów na kukurydzy. Spośród 25 przebadanych izolatów *F.temperatum* zdolność do biosyntezy fumonizyny FB1 i FB2 stwierdzono w przypadku jednego izolatu Pft-31. Poziom tych pochodnych (fumonizyny FB1 i FB2) był bardzo niski i wynosił odpowiednio: 2.0 i 0.24 ppm.

Żaden spośród przebadanych izolatów nie tworzył na kukurydzy pochodnych trichothecenowych, w tym DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV a także fuzarenonu. Zdolność do biosyntezy związków heptadepsyptydowych (BEA i ENN) stwierdzono dla 24 z 25 przebadanych pod tym kątem izolatów *F.temperatum*, rozwijających się na kukurydzy. Wydajność biosyntezy BEA wahała się od 3,80 ppm do 112,7 ppm natomiast ENN od 23,1 do 267,2 ppm przy średniej 128,6 ppm.

Tab. 3.5. Profil metabolitów wtórnych *F.temperatum* biosyntetyzowanych na dwóch podłożach: ryżu i kukurydzy. Wydajność (średnia z dwóch powtórzeń) podana w [ppm]

| Lp | Pft | Podłoże | B1 | B2 | DON | 3AcDON | 15AcDON | NIV | FUS | BEA     | ENN    | ERG    |
|----|-----|---------|----|----|-----|--------|---------|-----|-----|---------|--------|--------|
| 1  | 14  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 13.43   | 125.76 | 91.34  |
| 2  | 25  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 9.64    | 98.06  | 157.21 |
| 3  | 13  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 6.98    | 30.19  | 93.37  |
| 4  | 33  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 9.25    | 225.38 | 142.93 |
| 5  | 34  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 36.57   | 161.46 | 59.66  |
| 6  | 16  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 32.28   | 80.97  | 21.20  |
| 7  | 8   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 184.39  | 55.18  | 29.30  |
| 8  | 11  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 578.48  | 17.68  | 17.16  |
| 9  | 23  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 692.73  | 35.00  | 50.53  |
| 10 | 30  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 938.94  | 28.04  | 144.06 |
| 11 | 7   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 1300.15 | 16.96  | 127.53 |
| 12 | 15  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 1136.21 | 131.79 | 187.35 |
| 13 | 6   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 851.67  | 33.93  | 115.47 |
| 14 | 12  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 9.89    | 86.61  | 95.88  |
| 15 | 9   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 800.45  | 15.63  | 138.60 |
| 16 | 27  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 830.61  | 19.02  | 79.78  |
| 17 | 21  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 392.73  | 41.25  | 34.71  |
| 18 | 2   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 5.30    | 29.46  | 61.69  |
| 19 | 28  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 0.20    | 65.80  | 18.59  |
| 20 | 31  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 678.40  | 48.20  | 222.90 |
| 21 | 29  | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 159.00  | 647.00 | 95.87  |
| 22 | 4   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 6.28    | 16.55  | 9.46   |
| 23 | 1   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 187.41  | 3.91   | 58.04  |
| 24 | 3   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 1076.14 | 10.71  | 258.51 |
| 25 | 5   | ryż     | -  | -  | -   | -      | -       | -   | -   | 225.00  | 20.09  | 70.27  |

| Lp | Pft | Podłoże   | B1  | B2   | DON | 3AcDON | 15AcDON | NIV | FUS | BEA    | ENN    | ERG    |
|----|-----|-----------|-----|------|-----|--------|---------|-----|-----|--------|--------|--------|
| 1  | 14  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 13.43  | 125.76 | 83.82  |
| 2  | 25  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 9.64   | 98.06  | 39.49  |
| 3  | 13  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 6.98   | 30.19  | 48.50  |
| 4  | 33  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 9.25   | 225.38 | 85.82  |
| 5  | 34  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 36.57  | 161.46 | 51.82  |
| 6  | 16  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 32.28  | 80.97  | 54.62  |
| 7  | 8   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 16.30  | 215.10 | 62.86  |
| 8  | 11  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 44.50  | 198.40 | 16.90  |
| 9  | 23  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 77.40  | 151.70 | 17.74  |
| 10 | 30  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 12.80  | 51.10  | 14.31  |
| 11 | 7   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 3.80   | 66.20  | 14.94  |
| 12 | 15  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 11.50  | 80.20  | 50.71  |
| 13 | 6   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 37.70  | 259.40 | 54.14  |
| 14 | 12  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 112.00 | 267.20 | 143.45 |
| 15 | 9   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 112.70 | 162.00 | 43.80  |
| 16 | 27  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 21.10  | 23.10  | 41.42  |
| 17 | 21  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 10.20  | 154.20 | 184.32 |
| 18 | 2   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 10.48  | 198.96 | 186.46 |
| 19 | 28  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 15.30  | 171.30 | 101.21 |
| 20 | 31  | kukurydza | 2.2 | 0.24 | -   | -      | -       | -   | -   | 0.00   | 0.00   | 179.22 |
| 21 | 29  | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 24.80  | 68.20  | 57.05  |
| 22 | 4   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 89.18  | 118.58 | 181.39 |
| 23 | 1   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 13.43  | 109.88 | 142.82 |
| 24 | 3   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 94.66  | 68.28  | 97.31  |
| 25 | 5   | kukurydza | -   | -    | -   | -      | -       | -   | -   | 28.75  | 129.88 | 36.38  |

„-” nie stwierdzono

C/ Ocena patogeniczności izolatów

Ocenę patogeniczności przeprowadzono dla 35 izolatów *F.temperatum* (Tab. 3.6). Stwierdzono istotne zróżnicowanie tej cechy w obrębie badanej populacji patogenów. Izolatami dającymi najbardziej rozległe zmiany na pędach inokulowanych roślin były izolaty Pft-1, Pft-2, Pft-3, Pft-4 oraz Pft-5. Stanowiły one podstawę do badań podatności genotypów kukurydzy przez *F.temperatum*.

Tab. 3.6 Ocena patogeniczności izolatów *F. temperatum*

| IZOLAT | SZ <sup>1</sup> | OS <sup>2</sup> | DL <sup>3</sup> | OS <sup>2</sup> | IND <sup>4</sup> | OS <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Pft-1  | 0.608 ±         | 0.161           | 1.985 ±         | 0.439           | 1.195 ±          | 0.371           |
| Pft-2  | 0.693 ±         | 0.133           | 2.029 ±         | 0.995           | 1.350 ±          | 0.552           |
| Pft-3  | 0.706 ±         | 0.173           | 2.106 ±         | 0.229           | 1.484 ±          | 0.404           |
| Pft-4  | 0.787 ±         | 0.239           | 1.960 ±         | 0.304           | 1.548 ±          | 0.578           |
| Pft-5  | 0.713 ±         | 0.250           | 2.906 ±         | 0.748           | 2.017 ±          | 0.722           |
| Pft-6  | 0.515 ±         | 0.146           | 1.208 ±         | 0.384           | 0.634 ±          | 0.285           |
| Pft-7  | 0.538 ±         | 0.126           | 1.394 ±         | 0.345           | 0.759 ±          | 0.291           |
| Pft-8  | 0.628 ±         | 0.174           | 1.511 ±         | 0.332           | 0.973 ±          | 0.381           |
| Pft-9  | 0.656 ±         | 0.197           | 1.488 ±         | 0.744           | 0.988 ±          | 0.520           |
| Pft-10 | 0.640 ±         | 0.118           | 1.560 ±         | 0.277           | 0.999 ±          | 0.251           |
| Pft-11 | 0.633 ±         | 0.264           | 1.600 ±         | 0.778           | 1.000 ±          | 0.529           |
| Pft-12 | 0.685 ±         | 0.219           | 1.392 ±         | 0.536           | 1.005 ±          | 0.595           |
| Pft-13 | 0.676 ±         | 0.182           | 1.582 ±         | 0.664           | 1.059 ±          | 0.418           |
| Pft-14 | 0.693 ±         | 0.187           | 1.533 ±         | 0.279           | 1.069 ±          | 0.339           |
| Pft-15 | 0.693 ±         | 0.273           | 1.586 ±         | 0.632           | 1.084 ±          | 0.397           |
| Pft-16 | 0.750 ±         | 0.165           | 1.450 ±         | 0.295           | 1.091 ±          | 0.340           |
| Pft-17 | 0.629 ±         | 0.127           | 1.807 ±         | 0.746           | 1.097 ±          | 0.334           |
| Pft-18 | 0.778 ±         | 0.330           | 1.461 ±         | 0.409           | 1.115 ±          | 0.441           |
| Pft-19 | 0.664 ±         | 0.145           | 1.671 ±         | 0.492           | 1.127 ±          | 0.518           |
| Pft-20 | 0.663 ±         | 0.161           | 1.637 ±         | 0.550           | 1.136 ±          | 0.653           |
| Pft-21 | 0.700 ±         | 0.235           | 1.600 ±         | 0.415           | 1.137 ±          | 0.521           |
| Pft-22 | 0.683 ±         | 0.175           | 1.650 ±         | 0.380           | 1.152 ±          | 0.483           |
| Pft-23 | 0.775 ±         | 0.161           | 1.500 ±         | 0.398           | 1.162 ±          | 0.374           |
| Pft-24 | 0.807 ±         | 0.339           | 1.520 ±         | 0.557           | 1.179 ±          | 0.838           |
| Pft-25 | 0.692 ±         | 0.189           | 1.692 ±         | 0.417           | 1.199 ±          | 0.508           |
| Pft-26 | 0.744 ±         | 0.255           | 1.600 ±         | 0.296           | 1.201 ±          | 0.510           |
| Pft-27 | 0.679 ±         | 0.219           | 1.807 ±         | 0.470           | 1.242 ±          | 0.559           |
| Pft-28 | 0.733 ±         | 0.150           | 1.650 ±         | 0.385           | 1.243 ±          | 0.456           |
| Pft-29 | 0.725 ±         | 0.167           | 1.725 ±         | 0.276           | 1.245 ±          | 0.323           |
| Pft-30 | 0.836 ±         | 0.180           | 1.500 ±         | 0.412           | 1.280 ±          | 0.571           |
| Pft-31 | 0.781 ±         | 0.180           | 1.631 ±         | 0.285           | 1.289 ±          | 0.421           |
| Pft-32 | 0.765 ±         | 0.318           | 1.753 ±         | 0.285           | 1.293 ±          | 0.731           |
| Pft-33 | 0.735 ±         | 0.130           | 1.752 ±         | 0.457           | 1.295 ±          | 0.453           |
| Pft-34 | 0.667 ±         | 0.265           | 1.760 ±         | 0.471           | 1.151 ±          | 0.483           |
| Pft-35 | 0.617 ±         | 0.212           | 2.200 ±         | 0.768           | 1.407 ±          | 0.763           |

<sup>1</sup>SZ – szerokość nekrozy [cm] powstałej po inokulacji pędu *F.temperatum*

<sup>2</sup>OS – odchylenie standardowe

<sup>3</sup>DL – długość nekrozy [cm] powstałej po inokulacji pędu *F.temperatum*

<sup>4</sup>IND – indeks porażenia SZ\*DL