

ELŻBIETA CZEMBOR
MAGDALENA MATUSIAK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Radzików

Dynamika rozwoju fuzariozy kolb kukurydzy powodowanej przez *Fusarium graminearum* oraz akumulacji deoksynivalenolu w ziarnie*

Kinetics of red ear rot of maize caused by *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol accumulation in the grain

Czerwona i różowa fuzarioza kolb kukurydzy powodowane przez grzyby rodzaju *Fusarium* wpływają ujemnie na wielkość plonu oraz jego jakość, ponieważ metabolity wtórne wytwarzane przez te grzyby powodują groźne choroby ludzi i zwierząt. W ostatnich latach obserwuje się nasilenie tej choroby również na plantacjach w Polsce. Celem bieżącej pracy było określenie różnic stopnia odporności elitarnych linii wsobnych kukurydzy na tzw. czerwoną fuzariozę kolb powodowaną przez *F. graminearum* na podstawie dynamiki rozwoju choroby oraz dynamiki gromadzenia deoksynivalenolu (DON) w ziarnie na przestrzeni czasu. Do badań włączono 7 linii wsobnych. Stopień odporności roślin zakażanych zawieszoną zarodnikami *F. graminearum* oraz tych, które rosły przy infekcji naturalnej oceniano w odstępach dziesięciodniowych (8 terminów), od fazy dojrzałości młeczonej do zbioru, używając skali 1–7. Zawartość DON oznaczono w próbach ziarna pobranych z linii najbardziej podatnej i charakteryzującej się wysoką odpornością, osobno w każdym terminie, metodą ELISA. Średnio, wraz z upływem czasu nasilenie choroby oraz zawartość DON w próbach ziarna rosło, a różnice pomiędzy terminami były istotne. Genotyp również miał istotny wpływ zarówno na rozwój choroby jak i na poziom skażenia DON. Średnio, po zakażeniach sztucznych nasilenie choroby było o 3 stopnie wyższe niż przy infekcji naturalnej a zakres zmienności stopnia porażenia kolb wahał się od 3,3 do 5,9. Na przykładzie większości linii (średnio podatne lub średnio odporne) można było stwierdzić, że pierwsze objawy choroby pojawiają się już 20 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich (pierwszy termin oceny), a największe różnice w nasileniu choroby rozpoczynają się po upływie 50 dni od daty kwitnienia. Próby ziarna pobrane z linii najbardziej odpornej nie były skażone DON nawet po zakażeniach sztucznych. Na przykładzie linii najbardziej podatnej stwierdzono, że akumulacja DON w ziarnie rozpoczęła się już po upływie 20 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich (pomiędzy pierwszym i drugim terminem) a największy wzrost zawartości tej toksyny zaobserwowano po upływie 50 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich.

* Praca magisterska nr 135299 wykonana przez M. Matusiak na kierunku Rolnictwo pt. „Badanie odporności linii wsobnych kukurydzy na fuzariozę kolb i akumulację deoksynivalenolu w ziarnie”; promotor dr hab. E. Kochańska-Czembor, prof. nadzw. IHAR-PIB, Radzików, 05-870 Błonie

Słowa kluczowe: deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*, fuzarioza kolb, kukurydza, mikotoksyny

Red and pink ear rots caused by *Fusarium* spp. are important factors affecting the grain yield and quality, mainly because of contamination of the grain with mycotoxins produced by the fungi. In Poland, ear rot is commonly caused by *F. graminearum* producing deoxynivalenol (DON) and zearalenone and also by *F. verticillioides*, producing fumonisins. It was observed that during the last years contamination with those toxins increased also in Poland. The aim of this study was to determine differences among maize inbred lines for ear rot resistance based on the kinetics of the disease progress as well as on the kinetics of DON accumulation in the grain. Seven inbred lines were included into this study. Their resistance levels after inoculation using *F. graminearum* and under natural infection were scored every 10 days from the plants at milk stage till harvesting time using 1–7 scale. DON content was determined in the grain samples collected from the most resistant and the most susceptible lines using ELISA test. The differences in the level of ear rot resistance and the DON contamination in the grain sampled in different times were significant. Also, differences among lines in their level of resistance and the ability to accumulate DON in the grain was determined. After inoculation, severity of the disease was on average about 3 degrees higher than under natural infection and it increased over time. Resistance levels after inoculation ranged from 3.3 to 5.9. On average, it was possible to observe that the first symptoms of the disease occurred 20 days after flowering time, and the largest disease progress was observed 50 days after flowering time. Kernel samples collected from the most resistant inbred line were not contaminated with DON even after inoculation. Kinetics of DON accumulation was described using grain samples collected from the most susceptible line. Samples collected already 20 days after flowering were contaminated with the mycotoxin and the largest increase of contamination was observed 50 days after flowering time.

Key words: deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*, ear rot, maize, mycotoxins

WSTĘP

Kukurydza należy do roślin o dużym znaczeniu gospodarczym zarówno w Polsce, jak i na całym świecie. Jest to roślina dająca wysoki plon zarówno przy uprawie na ziarno, jak i na kiszonkę. Wykorzystuje się ją również w przemyśle spożywczym, chemicznym, papierniczym, fermentacyjnym i farmaceutycznym. Stanowi surowiec do produkcji biopaliw, w związku z protokołem zawartym w Kioto mającym na celu ograniczeniem emisji gazów cieplarnianych.

Choroby w sposób istotny wpływają na wielkość i jakość plonu ziarna oraz zielonej masy kukurydzy. Do grupy najważniejszych z nich należy fuzarioza kolb powodowana przez grzyby rodzaju *Fusarium* spp. (Shepherd i in., 1996; Perkowski 2000; Logrieco i in., 2002; Voss i in., 2006). W Polsce, w zależności od rejonu kraju i przebiegu warunków atmosferycznych, głównymi sprawcami tej choroby są gatunki: *Fusarium graminearum*, produkujący mykotoksyny deoksynivalenol i zearalenon oraz *F. verticillioides*, produkujący fumonizyny (Czembor i in., 2012; Góral i in., 2014; Wit i in., 2007). Określono skład gatunkowy grzybów rodzaju *Fusarium* spp. oraz oceniono zagrożenie zanieczyszczenia ziarna kukurydzy tymi mykotoksynami w latach 2008–2013. Uwzględniono 14 lokalizacji położonych w 4 rejonach Polski: południowo-zachodnim, południowo-wschodnim, centralnym i zachodnim. Na uwagę zasługuje fakt, że badania te wykazały również, że w populacji *Fusarium* spp. zasiedlającej ziarno kukurydzy na terenie Polski występuje nowy gatunek, *F. temperatum*, zidentyfikowany po raz pierwszy w Belgii w 2011 roku przez Scaufflaire i in. (2011, 2012). Zostało to opisane w pracy Czembor i in.

(2014). Mykotoksyny produkowane przez grzyby rodzaju *Fusarium* spp. w ilości przekraczającej normy określone dla krajów UE [(EC) No 1126/2007] dyskwalifikują ziarno do dalszego przetwórstwa, ponieważ stanowi to zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Wśród zwierząt gospodarskich szczególnie narażone na ich działanie są zwierzęta monogastryczne. Związki te gromadzone są w różnych tkankach powodując m. in. wymioty, uszkodzenia szpiku kostnego, anemie, zmiany w narządach wewnętrznych, zmniejszenie łaknienia, spadek masy ciała, zaburzenia rozwoju ciąży (Chełkowski i in., 1989; Logrieco i in., 2002, 2004; Perkowski, 2000; Rotter i in., 1996; Shepard i in., 1996; Ueno, 1980; Vincelli i Parker, 1995). Badania prowadzone na terenie Polski przez Państwową Inspekcję Sanitarną w latach 2004–2006 potwierdziły, że skażenie w wybranych produktach spożywczych przekroczyło dopuszczalne normy (Rybińska i in., 2008); potwierdziły to również badania Czembor i in. (2012).

Za najbardziej opłacalną i przyjazną środowisku metodę ochrony roślin przed czynnikami chorobotwórczymi uważa się wykorzystanie w uprawie odmian odpornych (Meissle i in., 2010; Zijlstra i in., 2011). Dlatego coraz większą wagę przywiązuje się do selekcji materiałów wyjściowych wykorzystywanych w hodowli pod względem odporności na fuzariozę kolb (Czembor i in., 2013a; Mesterhazy i in., 2012). O stopniu porażenia decyduje przede wszystkim stopień odporności rośliny, agresywność patogena oraz czynniki klimatyczne. Ważną rolę pełni morfologia roślin: wysokość, budowa ziarniaka, kolby (budowa osadki kolby, liczba liści okrywowych i ścisłość ich przylegania, odporność słupków na rozkład po infekcji, położenie kolby na łodydze, ilość związków polifenolowych) (Presello i in., 2011 a). Po zakażeniach sztucznych kolb zróżnicowanie materiału jest większe nawet przy mniej sprzyjających warunkach środowiskowych dla rozwoju patogena, co wpływa pozytywnie na efektywność selekcji (Clements i in., 2003; Czembor i in., 2005, 2011b, 2013b; Mesterhazy, 1989, 2002; Presello i in., 2005, 2011 b; Reid, 1996 a,b,c). Nadal dyskutowane jest zagadnienie, czy wysoka odporność danego genotypu na porażenie przez grzyby rodzaju *Fusarium* wiąże się również brakiem zdolności tego genotypu do gromadzenia mykotoksyn (Mesterhazy i in., 2012).

Celem pracy było określenie odporności elitarnych linii wsobnych kukurydzy na czerwoną fuzariozę kolb oraz określenie akumulacji toksyn fuzaryjnych w ziarnie poprzez zbadanie: (1) kinetyki rozwoju choroby oraz (2) kinetyki gromadzenia deoksyniwalenolu w ziarnie zarówno przy infekcji naturalnej, jak i po zakażeniach sztucznych *F. graminearum*.

MATERIAŁY I METODY

Kinetykę rozwoju choroby oraz akumulacji deoksyniwalenolu w ziarnie badano na 7 elitarnych liniach wsobnych kukurydzy przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych zawiesiną wodną zarodników *F. graminearum*.

Materiał roślinny

W badaniach wykorzystano elitarne linie wsobne (poziom wsobności F₉) pochodzące spółek: Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. — Grupa IHAR oraz Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Linie te obejmowały trzy formy o ziarnie zębkształtnym (typu dent),

jedną formę o ziarnie szklistym (typu flint), jedną formę IDT, jedną formę SSS oraz jedną o nieznanym pochodzeniu.

Doświadczenia założono na polach doświadczalnych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie. Nasiona wysiewano w siewie rzędownym, średnio 20 roślin w rzędzie. Rozstawa pomiędzy roślinami w rzędzie wynosiła średnio 20 cm, a pomiędzy rzędami 75 cm; stosowane nawożenie to: 200 kg/ha N, 80 kg/ha P₂O₅, 120 kg/ha K₂O.

Przebieg warunków meteorologicznych

Dane dotyczące wysokości temperatury i wielkości opadów uzyskano ze stacji meteorologicznej w IHAR — PIB. Odczytu pomiaru dokonywano na wysokości 2 m od ziemi.

Patogen

Do badań wykorzystano jednozarodnikową kulturę *F. graminearum* należącą do kolekcji Pracowni Traw Pastewnych i Roślin Motylkowatych, IHAR — PIB w Radzikowie. Została wyosobniona z prób nasion kukurydzy pobranych z poletek doświadczalnych i scharakteryzowanych w trakcie wcześniejszych badań pod względem tempa wzrostu na pożywkach sztucznych i agresywności w warunkach polowych. Odkażone powierzchniowo ziarniaki wykładano na pożywkę PDA. Szalki inkubowano w ciemności, a następnie pod światłem UV w celu stymulacji zarodnikowania. Kultury o charakterystycznych cechach morfologicznych dla *Fusarium* spp. (barwa i kształt zarodników) izolowano na szalki z pożywką PDA i SNA, tak aby móc dokonać identyfikacji metodą mikroskopową i przygotować kulturę jednozarodnikową na wodnym agarze.

Do przygotowania inokulum wykorzystano izolat *F. graminearum* obficie zarodnikujący na pożywce PDA w warunkach laboratoryjnych. Izolat po odszczepieniu na szalki Petriego z pożywką PDA inkubowano przez okres 3–4 tygodni w temp. 20°–22°C. Następnie zarodniki zmywano i rozcieńczano płynną pożywką SNA (3 g agaru / 1 wody), kontrolując ilość zarodników w powstałym roztworze. Inokulację wykonano zawiesiną o stężeniu 5×10^5 zarodników / ml.

Test odpornościowy i ocena fenotypowa stopnia odporności na fuzariozę kolb

Zakażenia sztuczne przeprowadzono po mechanicznym uszkodzeniu ziarniaków 10–12 dni od daty kwitnienia kwiatostanów męskich (faza początkowej dojrzałości mlecznej BBCH 73), poprzez iniekcję 1 ml zawiesiny zarodników *F. graminearum* na wysokości 1/3 od podstawy kolby wykorzystując do tego celu strzykawkę czterokanałową. Ocenę fenotypową stopnia odporności badanych linii wsobnych przeprowadzono w fazach dojrzałości mlecznej, woskowej i pełnej — 8 terminów dla każdej linii w odstępach, co 10 dni od daty zakażeń sztucznych. Do oceny fenotypowej stopnia porażenia kolb wykorzystano skalę 1–7, w której odpowiednio: 1 = brak objawów porażenia; 2 = 1–3%, 3 = 4–10%; 4 = 11–25%; 5 = 26–50%; 6 = 51–75% i 7 = 76–100% (Reid i in., 1996).

Oznaczanie zawartości deoksyniwalenolu

Zebrane kolby suszono, a następnie młócono. Próby ziarna zmielono blenderem laboratoryjnym, a następnie domielono młynkiem laboratoryjnym IKA A 11 basic na mąkę i poddano analizie na obecność deoksyniwalenolu. Analizy dokonano za pomocą aparatu

RIDA QUICK SCAN (analiza na bazie testu immunoenzymatycznego ELISA). Pomiaru ilościowego dokonano w zakresie 250–5000 ppb. Naważono 4 g mąki, dodawano 40 ml roztworu buforującego, a następnie energicznie wytrząsano przez 4 min. Ekstrakt odstawiono na 4 min i z nad osadu mąki pipetą pobierano 4 ml roztworu który czyszczono na filtrze, jakim był sącdek z bibuły. Do analizy wykorzystano 100µl przesącza, który pipetą przeniesiono na pasek testowy. Po 5 minutach odczytano wynik za pomocą aparatu RIDA QUICK SCAN. Jeżeli zawartość DON przekraczała 5000 ppb roztwór rozcieńczano buforem i prowadzono kolejne oznaczenie

Od pierwszej dekady lipca do pierwszej dekady sierpnia średnia temperatura powietrza wahała się w granicach 20°C. W drugiej dekadzie sierpnia temperatura powietrza wynosiła około 18°C i stopniowo spadała osiągając w trzeciej dekadzie września 10°C. Najmniejszą liczbą opadów charakteryzował się lipiec gdzie łączna suma opadów wyniosła około 23 mm. Największą ilość opadów odnotowano w drugiej dekadzie września i porównywalnie do niej w pierwszej dekadzie sierpnia. Znaczną ilość opadów odnotowano także w trzeciej dekadzie sierpnia i pierwszej dekadzie września.

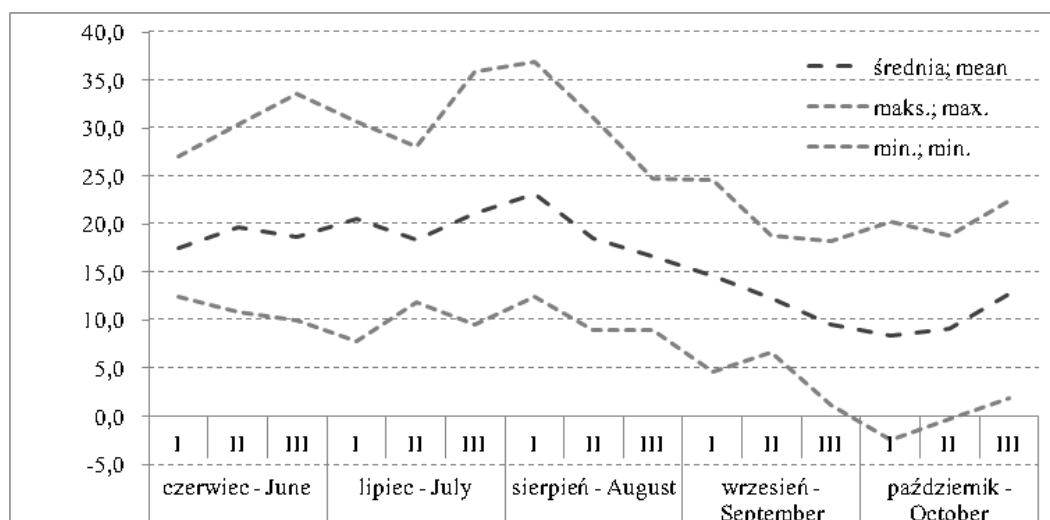
Analizy statystyczne

Doświadczenia zakładano w układzie losowanych bloków. Do oceny istotności różnic dla ocen stopnia odporności na fuzariozę kolb oraz zawartości DON w próbkach ziarna pobranych z linii wsobnych rosnących przy infekcji naturalnej oraz po zakażeniu sztucznym zastosowano dwuczynnikowa analizę wariancji. Po odrzuceniu hipotezy, o braku różnic pomiędzy obiektami, dokonano szczegółowego porównania obiektów pod względem odporności na fuzariozę kolb, zgorzel podstawy łodygi oraz zawartości toksyn w próbkach ziarna przy użyciu testu Fishera najmniejszej istotnej różnicy. Analizę danych przeprowadzono za pomocą programu InfoStat.

WYNIKI

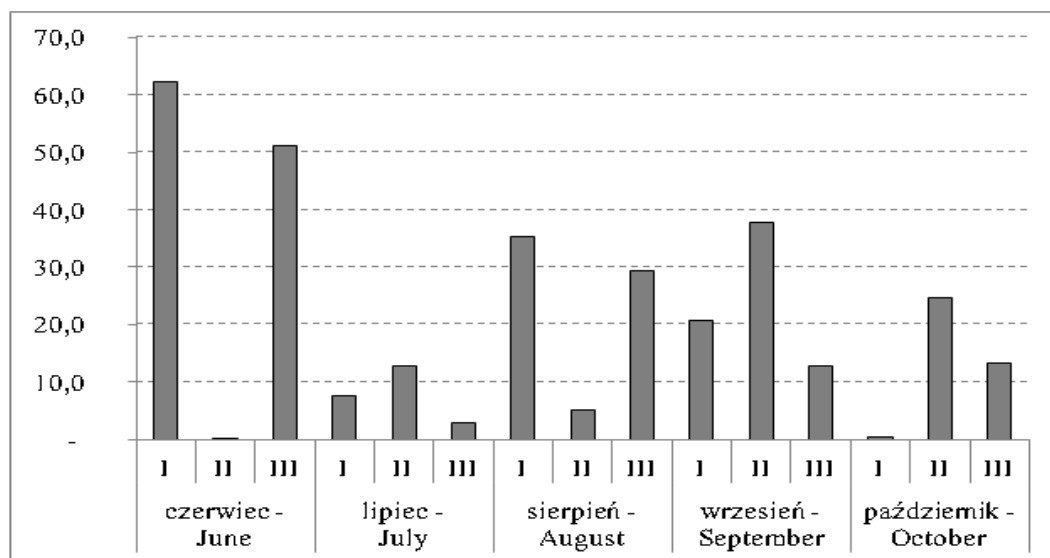
Przebieg warunków pogodowych

Dane meteorologiczne przedstawiono na wykresie, jako średnie dekadowe temperatur (rys. 1) i dekadowe sumy opadów (rys. 2). Od pierwszej dekady lipca do pierwszej dekady sierpnia średnia temperatura powietrza wahała się w granicach 20°C. W drugiej dekadzie sierpnia temperatura powietrza wynosiła około 18°C i stopniowo spadała osiągając w trzeciej dekadzie września 10°C. Najmniejszą liczbą opadów charakteryzował się lipiec gdzie łączna suma opadów wyniosła około 23 mm. Największą ilość opadów odnotowano w drugiej dekadzie września i porównywalnie do niej w pierwszej dekadzie sierpnia. Znaczną ilość opadów odnotowano także w trzeciej dekadzie sierpnia i pierwszej dekadzie września.



Rys. 1. Średnie, minimalne i maksymalne dekadowe temperatury powietrza w Radzikowie od czerwca do października w roku 2013

Fig. 1. Average, minimum and maximum decade temperatures in Radzików, from June to October 2013



Rys. 2. Dekadowe sumy opadów w Radzikowie od czerwca do października w roku 2013

Fig. 2. Total precipitation in Radzików in decades from June to October in 2013

Warunki pogodowe sprzyjały rozwojowi *F. graminearum* i dzięki temu można było śledzić zarówno rozwój choroby, jak i akumulację deoksyniwalenolu na przestrzeni czasu.

Metodą dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano istotne różnice pomiędzy obiektami pod względem badanych cech (tab. 1).

Tabela 1

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla stopnia odporności linii wsobnych na fuzariozę kolb oraz zdolności do gromadzenia DON w ziarnie przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych *Fusarium graminearum*

Fixed model analysis of variance for ear rot resistance and DON accumulation in grain under natural infection and after inoculation *Fusarium graminearum*

Zmienna variable	Fuzarioza kolb — Ear rot						
	liczba stopni swobody df	zakażane sztucznie — inoculation			infekcja naturalna — natural infection		
		śr. kw. odchyłeń MS	wartość F F value	wartość P P value	śr. kw. odchyłeń MS	wartość F F value	wartość P P value
1	2	3	4	5	6	7	8
Termin — date	7	18,4	94,68	<0,0001	6,07	43,62	<0,0001
Linia — line	6	15,23	78,38	<0,0001	3,63	26,07	<0,0001
Termin*linia	42	0,69	3,56	<0,0001	0,43	3,06	<0,0001
Błąd — error	112	0,19			0,14		
					DON		
Termin — date	7	519,51	6,56	0,0001	7,46	1,63	0,1627
Linia — line	1	3339	42,17	<0,0001	39,2	8,57	0,0063
Termin*linia	7	519,51	6,56	0,0001	7,46	1,63	0,1627
Błąd — error	32	79,17			4,57		

Ocena porażenia kolb zakażanych sztucznie oraz przy infekcji naturalnej

Stopień porażenia kolb wszystkich badanych linii wsobnych zależał w sposób istotny od terminu oceny i zbioru, przy czym po zakażeniach sztucznych nasilenie choroby było średnio o 3 stopnie wyższe a rozwój choroby był bardziej dynamiczny niż przy infekcji naturalnej (tab. 2). W zależności od terminu oceny, średni stopień porażenia kolb zakażanych sztucznie zawiesiną zarodników *F. graminearum* wahał się od 3,4 (termin 1, czyli 20 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich, początek dojrzałości mlecznej — BBCH 73) do 5,9 (termin 8, czyli 90 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich, pełna dojrzałość — BBCH 89). Największe różnice dla tej cechy odnotowano pomiędzy terminami 2 i 3 oraz 3 i 4 (tab. 2).

Przy infekcji naturalnej zakres zmienności tej cechy wahał się od 1,4 (termin 1) do 2,9 (termin 8). Stwierdzono, że rozwój choroby na przestrzeni czasu w sposób istotny zależał od genotypu. W grupie siedmiu badanych linii wsobnych, linia 10U charakteryzowała się najwyższą odpornością (średni stopień porażenia we wszystkich terminach 3,5 przy zakresie zmienności od 2,9 do 4,0). Natomiast najbardziej podatną była linia 67D, której średni stopień odporności oceniono na 6,1. W pierwszym terminie (10 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich) stopień odporności tej linii został oceniony na 3,4, w drugim terminie już na 5,0, w trzecim terminie na 5,7 a w następnych terminach powyżej 6,0. Również przy infekcji naturalnej linia ta była bardziej podatna niż pozostałe badane, a jej stopień odporności wahał się od 1,4 do 4,1 (w 8 terminie). Po zakażeniach sztucznych, średni stopień odporności pozostałych badanych linii wahał się w granicach 4,5–5,3 a przy infekcji naturalnej w granicach 1,7–2,3.

Tabela 2
Stopień porażenia kolb linii wsobnych przez *Fusarium graminearum* w poszczególnych fazach rozwoju roślin po zakażeniach sztucznych oraz przy infekcji naturalnej
Ear rot level caused by *Fusarium graminearum* after inoculation and under natural infection in subsequent phases of plant growth

Liczba dni od daty kwitnienia Days number from flowering time*	Linia wsobna Inbreed line														Średnia Mean	
	10U		67D		29F		30IDT		32SSS		68D		90D		zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection
	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection	zakaze- nie sztuczne inocula- tion	infekcja natural- na natural infection		
20 (1)	3,2 ^{ab}	1,3 ^{ab}	3,4 ^a	1,8 ^{ab}	3,4 ^a	1,1 ^a	3,6 ^a	1,6 ^a	3,3 ^a	1,6 ^a	3,0 ^a	1,3 ^{ab}	3,5 ^a	1,4 ^a	3,3 ^a	1,4 ^{ab}
30 (2)	3,1 ^{ab}	1,0 ^a	5,0 ^b	1,6 ^{ab}	3,9 ^a	1,0 ^a	3,8 ^{ab}	1,4 ^a	3,3 ^a	1,7 ^a	2,8 ^a	1,1 ^a	3,5 ^a	1,4 ^a	3,6 ^b	1,3 ^a
40 (3)	2,9 ^a	1,4 ^{ab}	5,7 ^c	1,4 ^a	5,2 ^b	1,9 ^{bc}	4,4 ^{bc}	1,8 ^a	4,2 ^b	2,0 ^{ab}	3,4 ^a	1,2 ^a	4,3 ^b	1,7 ^{ab}	4,3 ^c	1,6 ^{bc}
50 (4)	3,6 ^{bc}	1,6 ^{ab}	6,7 ^d	2,2 ^{abc}	5,7 ^b	1,7 ^b	4,7 ^c	1,6 ^a	4,3 ^b	2,1 ^{ab}	4,8 ^b	1,1 ^a	4,8 ^{bc}	1,8 ^{ab}	4,9 ^d	1,7 ^c
60 (5)	3,5 ^{abc}	1,7 ^b	6,8 ^{de}	2,7 ^{bc}	5,3 ^b	2,4 ^{de}	5,5 ^{de}	1,9 ^{ab}	4,3 ^b	2,3 ^{bc}	5,6 ^{bc}	1,9 ^c	4,8 ^{bc}	1,7 ^{ab}	5,1 ^d	2,1 ^d
70 (6)	4,0 ^c	1,5 ^{ab}	7,0 ^e	3,0 ^{cd}	5,9 ^{bc}	2,6 ^e	4,9 ^{cd}	1,8 ^a	5,3 ^c	2,3 ^{bc}	5,8 ^{bc}	1,8 ^{bc}	5,1 ^{cd}	1,9 ^b	5,4 ^e	2,2 ^d
80 (7)	3,7 ^{bc}	1,4 ^{ab}	6,9 ^{de}	4,0 ^d	6,7 ^d	2,2 ^{cd}	5,8 ^e	2,3 ^{bc}	5,2 ^c	2,7 ^c	5,6 ^{bc}	2,6 ^d	5,3 ^{cd}	2,1 ^b	5,6 ^{ef}	2,5 ^e
90 (8)	3,8 ^{bc}	1,8 ^b	7,0 ^e	4,1 ^d	6,6 ^{cd}	2,7 ^e	6,0 ^e	2,8 ^c	6,1 ^d	4,0 ^d	6,0 ^c	2,8 ^d	5,7 ^d	2,1 ^b	5,9 ^f	2,9 ^f
\bar{x}	3,47	1,46	6,07	2,62	5,34	1,96	4,83	1,91	4,51	2,32	4,61	1,73	4,62	1,75	4,78	1,97
S.D.	14,36	0,37	1,26	1,15	1,21	0,64	0,9	0,48	0,99	0,76	1,41	0,7	0,87	0,36	0,91	0,53
CV (%)	0,5	25,27	20,7	43,91	22,6	32,67	18,6	25,33	21,94	32,86	30,61	40,38	18,71	20,81	18,96	27,07
NIR																
LSD	0,717	0,585	0,263	1,140	0,778	0,371	0,693	0,4944	0,638	0,5069	1,1977	0,6051	0,7518	0,5221	0,194	0,139
Fischer																
$\alpha=0,05$																

* Zakażenia sztuczne prowadzono 10 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich — inoculation time 10 days after flowering time
W nawiasach podano termin oceny i zbioru prób ziarna — scoring time and samples collection time are in the parenthesis

Na przykładzie większości linii (średnio podatne lub średnio odporne 29F, 30IDT, 32SSS, 68D) wykazano, że statystycznie istotne różnice dla stopnia porażenia kolb rozpoczynają się pomiędzy 2 i 3 terminem oceny (czyli po upływie 30 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich), a największe zróżnicowanie rozpoczyna się pomiędzy 5 i 6 terminem (czyli po upływie 60 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich) (tab. 2).

Kinetyka akumulacji DON w ziarnie

Kinetykę akumulacji deoksynivalenolu w ziarnie kukurydzy na przestrzeni czasu badano wykorzystując próby pobrane z dwóch linii, o podwyższonej odporności i podatnej — po ocenie fenotypowej stopnia porażenia w każdym terminie osobno; wyniki zamieszczono w tabeli 3.

Tabela 3

Zawartość DON w próbach ziarna pobranych z linii wsobnych po zakażeniach sztucznych *Fusarium graminearum* i przy infekcji naturalnej w kolejnych fazach rozwoju roślin
Average DON contamination in grain samples collected from two inbred lines after inoculation by *Fusarium graminearum* and under natural infection in subsequent phases of plant development

Liczba dni od daty kwitnienia Number of days after flowering time *	Zawartość DON [ppm] DON accumulation [ppm]			
	linia wsobna 10U — inbred line 10U		linia wsobna 67D — inbred line 67D	
	zakażenie sztuczne inoculation	infekcja naturalna natural infection	zakażenie sztuczne inoculation	infekcja naturalna natural infection
20	0	0	0 ^a	0,0 ^a
30	0	0	0,83 ^a	0,0 ^a
40	0	0	3,81 ^a	0,91 ^{ab}
50	0	0	11,31 ^{ab}	6,13 ^b
60	0	0	12,05 ^{ab}	3,18 ^{ab}
70	0	0	18,61 ^{ab}	0,0 ^a
80	0	0	32,32 ^b	0,81 ^a
90	0	0	54,51 ^c	3,43 ^{ab}
Średnia Average	0	0	16680	1810
S.D.	0	0	20,65	3,3
CV (%)	0	0	123,69	182,71
NIR — LSD (Fischer $\alpha=0,05$)	Ni	Ni	21,781	5,235

* Zakażenia sztuczne 10 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich

* Inoculation 10 days after flowering time

Jeden genotyp to opisana linia 10U o podwyższonej odporności na fuzariozę kolb i drugi genotyp to opisana linia 67D jako forma podatna. Różnice dla tej cechy pomiędzy terminami można było śledzić na linii podatnej 67D. W próbach ziarna pobranych z linii 10U, zarówno z kolb zakażanych sztucznie jak i pobranych z roślin rosnących przy infekcji naturalnej, nie stwierdzono występowania DON (poziom skażenia 0 ppm). Próby ziarna pobrane z linii 67D w 1 terminie (po upływie 20 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich) również nie zawierały DON. Proces akumulacji rozpoczął się pomiędzy 1 i 2 terminem, i w próbach ziarna pobranych 30 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich zawartość DON wynosiła 0,83 ppm, a następnie zawartości toksyny w ziarnie wzrosła do 3,81 w 3 terminie (40 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich). Jednak różnice pomiędzy terminami 1, 2 i 3 były nieistotne statystycznie. Największe różnice pomiędzy

terminami wystąpiły pomiędzy 5 (12,05 ppm), 6 (18,61 ppm), 7 (32,32 ppm) i 8 (54,51 ppm) terminami zbioru. Poziom skażenie prób ziarna pobranych z roślin rosnących przy infekcji naturalnej był dużo niższy, i mało stabilny w porównaniu z próbami ziarna pobranymi z kolb zakażanych sztucznie. W pierwszym, drugim i szóstym terminie zawartość toksyny wyniosła 0 ppb, w 8 terminie 1,71 ppm. Średnia zawartość DON w próbach ziarna wyniosła 1,81 ppm.

DYSKUSJA

Bieżące badania prowadzono między innymi ze względu na fakt, że odporność roślin kukurydzy na porażenie przez grzyby *Fusarium* spp. nie jest równoznaczna z odpornością do akumulacji toksyn produkowanych przez te patogeny (Mesterhazy i in., 2012; Czembor, obserwacje własne).

Zakażenia sztuczne kolb prowadzone po mechanicznym uszkodzeniu ziarniaków były skuteczne, wyniki były powtarzalne i pozwoliły na zróżnicowanie badanego materiału. Potwierdza to dotychczasowe wyniki badań (Czembor i in., 2013 a; Reid i in., 1993; Mesterhazy i in., 2012). Dynamika rozwoju fuzariozy kolb po zakażeniach sztucznych *F. verticillioides* w warunkach Polski została opisana przez zespół Wit i in. (2010) oraz Waśkiewicz i in. (2012). Autorzy oceniali porażenie kolb w odstępach siedmiodniowych używając skali 0–5 (0 oznaczało brak objawów choroby). Nasilenie choroby było mniejsze, niż w bieżących badaniach. Wykazano, że średni stopień porażenia kolb po zakażeniach sztucznych wahał się od 1,0 do 1,8 od 7 do 21 dni od daty zakażeń sztucznych (które były prowadzone 5 dni po kwitnięciu kwiatostanów żeńskich) oraz w zakresie 2,1 do 2,8 od 28 do 56 dni prowadzenia badań.

W bieżących badaniach wykazano również, że rozwój choroby w sposób istotny zależał od genotypu. Świadczy to, że w warunkach Polski analiza objawów fenotypowych fuzariozy kolb po zakażeniach sztucznych *F. graminearum* umożliwia właściwe różnicowanie materiału, co zapewnia wysoką efektywność selekcji form odpornych. Selekcja z wykorzystaniem *F. graminearum* prowadzona jest również w warunkach klimatycznych innych krajów europejskich (Mesterhazy i in., 2012), jak również Kanady (Reid i in., 1993, 1996 a). Natomiast warunki atmosferyczne krajów Ameryki Południowej, a także Europy Południowej sprzyjają rozwojowi *F. verticillioides*; objawy choroby po zakażeniach sztucznych zawiesiną zarodników tego patogena w sposób bardziej właściwy różnicują materiał roślinny niż po zakażeniach *F. graminearum* (Presello i in., 2005, 2011 a, b).

Na przykładzie linii najbardziej podatnej stwierdzono, że akumulacja DON w ziarnie rozpoczęła się już po upływie 20 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich (pomiędzy 1 i 2 terminem ocen), a największy wzrost zawartości tej toksyny zaobserwowano po upływie 50 dni od daty kwitnienia. Natomiast badania dotyczące dynamiki gromadzenia fumonizy FB₁ prowadzone przez Wit i in. (2010) wykazały, że istotny wzrost zawartości tej toksyny zaobserwowano w okresie późniejszym, po 35 dniu od zakażeń sztucznych *F. verticillioides*. Największy wzrost zawartości nastąpił, podobnie jak w bieżących badaniach — po upływie 49 dni. W pracy Wit i in. (2010) współzależności pomiędzy

stopniem porażenia kolb a poziomem skażenia prób ziarna fumonizynami były dodatnie. Również w bieżącej pracy współzależności pomiędzy stopniem porażenia linii podatnej przez *F. graminearum* a poziomem skażenia prób ziarna pobranych z tej linii DON były dodatnie; podobnie opisali Perkowski i in. (1991) dodatnie współzależności pomiędzy skażeniem ziarna pszenicy DON a liczbą ziaren porażonych przez *F. graminearum*.

Na zdolność akumulacji toksyn w ziarnie istotny wpływ ma genotyp. Również w bieżących badaniach próby ziarna pobrane z linii najbardziej odpornej nie były skażone DON nawet po zakażeniach sztucznych. Dlatego pomimo dodatnich współzależności pomiędzy objawami fenotypowymi choroby a zdolnością do akumulacji toksyn w ziarnie ocena fenotypowa może być podstawą selekcji w początkowych etapach poszukiwania źródeł odporności zarówno na fuzariozę kolb jak i na niższą zawartość toksyn. Jednak końcowy etap selekcji powinien być wspomagany oceną zdolności genotypu do akumulacji toksyn w ziarnie.

WNIOSKI

1. Wykazano istotną zależność pomiędzy terminem oceny oraz genotypem, a stopniem porażenia kolb kukurydzy przez *Fusarium graminearum*, wywołujące czerwoną fuzariozę kolb. Zarówno po zakażeniach sztucznych jak i przy infekcji naturalnej w miarę upływu czasu nasilenie choroby rosło.
2. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy genotypem oraz terminem zbioru prób ziarna, a ilością deoksyniwalenolu na przestrzeni czasu.
3. Stopień odporności roślin na porażenie przez *Fusarium graminearum* jest ściśle związany z poziomem zawartości deoksyniwalenolu w próbach ziarna pobranych w poszczególnych terminach.

LITERATURA

- Clements M. J., Kleinschmidt C. E., Maragos C. E., Pataky J. K., White D. G. 2003. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisation contamination of corn. *Corn Dis.* 87: 147 — 153.
- Chełkowski, J. 1989. Mycotoxins associated with corn cob fusariosis. In: Chełkowski J. (ed.) *Fusarium — mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam: 53 — 62.
- Czembor E., Warzecha R., Adamczyk J., Kurczyk Z. 2005. Wytwarzanie materiałów wyjściowych kukurydzy o podwyższonej odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi. *Biul. IHAR* 236: 203 — 213.
- Czembor E., Presello D., Warzecha R., Adamczyk J., Wójcik K. 2011 b. Responses of pedigree selection for ear and stalk rot resistance in F₂, F₃ and F₄ generations of maize. *Book of Abstracts Conference "Sustainable use of pesticides and integrated pest management in East-Central Europe and the Baltics"*, Radzikow, Poland, 4-6. 09.2011: 63 p.
- Czembor E., Ochodzki P., Sowa S., Grelewska K., Adamczyk J., Wojcik K. 2012. *Fusarium* complex, Mycotoxins and Biomass Content in Grain Samples Collected in Poland Across 2008–2011. *Proc. Mycored North America, Ottawa, Kanada, 2012, 24-28.06.2012*.
- Czembor E., Matusiak M., Ochodzki P. 2013 a. Odporność mieszańców kukurydzy na fuzariozę kolb przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych *Fusarium graminearum* i *F. verticillioides* w Polsce w latach 2008 – 2009. *Biul. IHAR*: 270: 55 — 73.
- Czembor E., Matusiak M., Warzecha R. 2013 b. Poszukiwanie źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodyg metodą rodowodową. *Biul. IHAR* 269: 123 — 139.

- Czembor E., Stępień Ł., Waśkiewicz A. 2014. *Fusarium temperatum* as a new species causing ear rot in Poland. Plant Disease, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1184-PDN>.
- Góral T., Czembor E., Ochodźki P., Walentyn-Góral D., Matusiak M. 2014. Monitoring zmian składu gatunkowego w populacji *Fusarium* spp. oraz ocena zagrożenia skażeniem ziarna pszenicy i kukurydzy mikotoksynami fuzaryjnymi. In: Ulepszanie Roślin dla Zrównoważonych AgroEkoSystemów, Wysokiej Jakości Żywności i Produkcji Roślinnej na Cele Nieżywnościowe. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR. Red. Edward Arseniuk, Nr 48 (całość 408 s.): 279 — 290.
- Logrieco A., G. Mule, A. Moretti, A. Bottalico, 2002: Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 108: 597 — 609.
- Logrieco A., Visconti A. 2004. An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Meissle M., Mourn P., Musa T., Bigler F., Pons X., Vasileiadis V.P., Otto S., Antichi D., Kiss J., Pálinkás Z., Dorner Z., van der Weide R., Groten J., Czembor E., Adamczyk J., Thibord J.-B., Melander B., Cordsen Nielsen G., Poulsen R.T., Zimmermann O., Verschwele A., Oldenburg E., 2010. Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects, Journal of Applied Entomology, 134 (5): 357 — 375.
- Mesterhazy A. 1989. Progress in breeding of wheat and corn genotypes not susceptible to infection by *Fusaria*. In: J. Chełkowski (ed.) *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam: 357 — 386.
- Mesterhazy A. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. Eur. J. Plant Pathol. 108: 675 — 684.
- Mesterhazy A., Lemmens M., Reid L. M. 2012. Breeding for resistance to ear rot caused by *Fusarium* spp. in maize — a review. Plant Breeding, 131: 1 — 19.
- Perkowski J., Chełkowski J., Błażczak P., Snijders C.H., Wakuliński W. 1991. A study of the correlation between the amount of deoxynivalenol in grain of wheat and triticale and percentage of *Fusarium* damaged kernels. Mycotoxin Research 7 (2): 102 — 114.
- Perkowski J. 2000. Nutritional aspects and health consequences of mycotoxins occurrence. In: *Mycotoxins and dioxins and the environment*. Bydgoszcz: 29 — 38.
- Presello D. A., Reid L.M., Butler G., Mather D. E. 2005. Pedigree selection for *Gibberella* ear rot resistance in maize populations. Euphytica 143: 1 — 8.
- Presello D.A., Fauguel C.M., Rodríguez, Giomi, Sampietro D.A., Iglesias J., Fernández. 2011a. Traits associated to ear rot and mycotoxin contamination caused by *Fusarium* spp. Book of Abstracts ISM Conference Strategies to reduce the impact of mycotoxins in a global context.
- Presello D. A., Pereyra A. O., Iglesias J., Fauguel C. M., Sampietro D. A., Eyherabide G. H. 2011 b. Responses to selection of S5 inbreds for broad-based resistance to ear rots and grain mycotoxin contamination caused by *Fusarium* spp. in maize. Euphytica 178: 23 — 29.
- Reid L.M., Spaner D., Mather D.E., Bolton A.T., Hamilton R.I. 1993. Resistance of maize hybrids and inbred lines following silk inoculation with Tyree isolates of *Fusarium graminearum*. Plant Disease, 77: 1248 — 1251.
- Reid L.M., Hamilton R. I., Mather D. E. 1996 a. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. Technical Bulletin 1996- 5E. Eastern Cereal and Oilseed Research Centre. Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada: 40 pp.
- Reid L. M., Hamilton R.I. 1996 b. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. Can. J. Plant. Pathol. 18: 279 — 285.
- Reid L. M., Hamilton R.I., Mather D. E. 1996 c. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada Technical Bulletin., Publication: 196-205.
- Rotter B. A., Prelusky D. B., Pestka J. J. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Journal of Toxicology and Environmental Health 48 (1): 1 — 34.
- Rybińska K., Postupolski J., Ledzion E., Kurpińska-Jaworska J., Szczęsna M. 2008. Programy monitoringowe realizowane przez Państwową Inspekcję Sanitarną w zakresie zanieczyszczenia wybranych środków spożywczych miko toksynami. Roczn. PZH 59 (1): 1 — 7.

- Scauflaire J., Gourgue M., Munaut F. 2011. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 103, 586–597.
- Scauflaire J., Godet M., Gourgue M., Lienard C., Munaut F. 2012. A multiplex real-time PCR method using hybridization probes for the detection and the quantification of *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum* and *F. verticillioides*. *Fungal Biology*, 116: 1073 — 1080.
- Shephard G. S., Thiel P. G., Stockenstrom S., Sydenham E. W. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.* 79: 671 — 687.
- Ueno Y. 1980. Toxicological evaluation of trichothecene mycotoxins. Natural toxins. Eaker D., Wadstrm T. (eds), Pergamon Press, Oxford, New York: 663 — 671.
- Vincelli P., Parker G. 1995. Mycotoxins in corn produced by fusarium fungi. University of Kentucky, College of Agriculture, ID-121.
- Voss K. A., Gelineau-van Waes J.B., Riley R. T. 2006. Fumonisions: current research trends in developmental toxicology. *Mycotoxin Res.* 22: 61 — 69.
- Waškiewicz A., Wit M., Goliński P., Chełkowski J., Warzecha R., Ochodzki P., Wakuliński W. 2012. Kinetics of fumonisin B₁ formation in maize ears inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Food Addit. Cont.* 29 (11): 1752 — 1761.
- Wit M., Ochodzki P., Warzecha R., Wakuliński W. 2007. Znaczenie *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg w etiologii fuzariozy kolb kukurydzy. *Biul. IHAR.* 245: 171 — 180.
- Wit M., Waškiewicz A., Goliński P., Chełkowski J., Warzecha R., Ochodzki P., Wakuliński W. 2010. Występowanie fumonizyny w ziarniakach i rdzeniach kolb kukurydzy inokulowanych *Fusarium verticillioides*. *Prog. Plant Protection/ Post. Ochr. Roślin.* 50 (4): 1832 — 1836.
- Zijlstra C., Lund, I., Justesen A., Nicolaisen M., Bianciotto V., Posta K., Balestrini R., Przetakiewicz A., Czembor E., van de Zande J. 2011. Combining novel monitoring tools and precision application technologies for integrated high-tech crop protection in the future (a discussion document). *Pest Manag. Sci.* 67: 616 — 625.

