

Anna Wenda – Piesik

Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy w Bydgoszczy

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

Katedra Podstaw Produkcji Roślinnej i Doświadczalnictwa

Opis osiągnięcia

Badania nad układem trój-troficznym: pszenica (*Triticum aestivum* L.) – ździeblarz pszeniczny (*Cephus cinctus* Norton) – *Fusarium* spp. w aspekcie naturalnego biologicznego zwalczania ździeblarza oraz reakcji roślin pszenicy na czynniki biotyczne i abiotyczne poprzez wydzielanie lotnych związków organicznych.

na podstawie cyklu monotematycznych publikacji

Bydgoszcz, 2012

Załącznik 2

Plan pracy:

Wstęp

Wykaz prac ze wskazaniem udziału procentowego i wkładu habilitanta

1. Charakterystyka entomopatogenicznych właściwości *Fusarium* spp. w oparciu o trójtroficzny układ: pszenica – ździeblarz pszeniczny – *Fusarium* spp.
 - 1.1 Wprowadzenie
 - 1.1.1 Stanowisko systematyczne *Cephus cinctus* Norton
 - 1.1.2 Zasięg występowania i różnicowanie gatunkowe ździeblarza pszenicznego
 - 1.1.3 Szkodliwość i straty gospodarcze powodowane przez ździeblarza pszenicznego
 - 1.1.4 Morfologia i cykl życiowy *Cephus cinctus* Norton
 - 1.1.5 Synchronizacja cyklu życiowego ździeblarza pszenicznego z rozwojem fuzaryjnej zgorzeli na pszenicy
 - 1.2 Osiągnięcia i wnioski
 - 1.3 Podsumowanie
2. Reakcja obronna pszenicy poprzez wydzielanie organicznych związków lotnych na porażenie przez *Fusarium* spp. oraz uszkodzenia spowodowane żerowaniem larw ździeblarza pszenicznego.
 - 2.1 Wprowadzenie
 - 2.2 Osiągnięcia i wnioski
 - 2.3 Podsumowanie
3. Wpływ wilgotności i światła na indukcję związków lotnych wydzielanych przez pszenicę porażoną *Fusarium* sp.
 - 3.1 Wprowadzenie
 - 3.2 Osiągnięcia i wnioski
 - 3.3 Podsumowanie

Literatura

Oświadczenia współautorów prac

Wstęp

Agrocenozy są zespołami bardzo złożonych współzależności pomiędzy przedstawicielami poszczególnych poziomów troficznych. Na ogół występują w nich związki antagonistyczne o charakterze eksploatacyjnym dotyczące relacji szkodnik-roślina oraz patogen-roślina.

Problem badawczy, który został podjęty w niniejszej rozprawie to współzależności występujące pomiędzy trzema gatunkami, z których każdy reprezentuje inny poziom troficzny; pszenica (*Triticum aestivum* L.) jako żywicielska roślina dla żdźbalarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) oraz dla nekrotroficznych patogenów z rodzaju *Fusarium*. Pojedyncze związki w tym układzie pomiędzy pszenicą a żdźbalarzem oraz pszenicą a *Fusarium* sp. są dość dobrze poznane, ponieważ w wielu regionach Świata agrofagi te powodują poważne straty gospodarcze. Całkowicie nowym zagadnieniem przedstawionym w niniejszej pracy jest antagonistyczna relacja pomiędzy grzybami z rodzaju *Fusarium* i żdźbalarzem pszenicznym.

W pierwszym rozdziale zostały przedstawione najważniejsze osiągnięcia z badań własnych pokazujące patogeniczną rolę gatunków z rodzaju *Fusarium* w układzie pszenica – żdźbalarz, czyli w układzie trój-troficznym. Pełna dokumentacja tych danych znajduje się w dwóch oryginalnych publikacjach naukowych. Ponadto, w jednej pracy o charakterze przeglądowym zostały przedstawione entomopatogeniczne właściwości grzybów z rodzaju *Fusarium*, co również w tej rozprawie wykorzystano. Zagadnienie entomopatogeniczności *Fusarium* sp. zostało rozpatrzone w aspekcie naturalnego biologicznego zwalczania żdźbalarza pszenicznego. Według Waage i Greathead (1988) naturalne biologiczne zwalczanie to spontaniczna aktywność występujących w środowisku rolniczym rodzimych gatunków antagonistycznych dla agrofagów, która odbywa się bez udziału człowieka. Uważa się, że jest ono największym i najważniejszym sektorem biologicznego zwalczania w rolnictwie.

Drugim aspektem prezentowanych w pracy badań nad układem trój-troficznym: pszenica-żdźbalarz-*Fusarium* sp. jest reakcja obronna roślin pszenicy na atak ze strony agrofagów poprzez wydzielanie lotnych związków organicznych. Aktywność chemicznej indukcji LZO pod wpływem porażenia przez zgorzelowe *Fusarium* spp. oraz uszkodzenia przez żdźbalarza została zbadana w sensie jakościowym i ilościowym. Zaprezentowane tutaj osiągnięcia i wnioski zostały zaczerpnięte z trzech oryginalnych prac naukowych.

Ostatni rozdział niniejszej rozprawy powstał w oparciu o wyniki zawarte w jednej publikacji i traktuje on o mechanizmie indukcji LZO u pszenicy pod wpływem czynników abiotycznych, tj. wilgotności gleby i intensywności światła w interakcji z porażeniem jej przez zgorzelowe gatunki z rodzaju *Fusarium*.

Zagadnienia chemicznego informowania się pomiędzy roślinami o zagrożeniu ze strony agrofagów są jest domeną ekologii biochemicznej i przypuszcza się, że w przyszłości będzie można ten potencjał wykorzystać w strategii ochrony roślin. Jest to kierunek zgodny z ogólnie przyjętą w Unii Europejskiej tendencją rozwoju rolnictwa zrównoważonego. Obecne regulacje prawne obowiązujące w krajach unii (Rozporządzenia nr 1107/2009 i Dyrektywa nr 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r.) nakazują od roku 2014 powszechne stosowanie metod integrowanych, z pierwszeństwem użycia metod niechemicznych i naturalnych w ochronie roślin w ich polowej produkcji. Stąd potrzeba badań nad naturalnymi metodami biologicznymi oraz nad wykorzystaniem LZO w strategiach ochrony roślin jest aktualna.

Prezentowane badania mają znaczenie przede wszystkim poznawcze i charakter interdyscyplinarny, gdzie *Fusarium* sp. stało się swoistym pomostem pomiędzy ich fitopatologicznym i entomologicznym tłem. W konsekwencji tych rozważań wyłoniła się nowa ekologiczna rola tych grzybów w układzie trój-troficznym pomiędzy pszenicą a żdzieblarzem pszenicznym. W badaniach nad problemem biochemicznej reakcji roślin pszenicy na atak ze strony agrofaga, pomocne okazały się zarówno techniki zbierania LZO oraz chromatografii gazowej ze spektrometrią mas.

W tym miejscu uprzejmie dziękuję Wszystkim P.T. Współautorom wyszczególnionych prac za udostępnienie laboratoriów i nowoczesnej aparatury do badań, a także za wsparcie merytoryczne i techniczno-organizacyjne. Bez udziału Państwa koncepcje do badań, które stanowią podstawę niniejszej rozprawy nie mogłyby zostać zrealizowane.

Wykaz prac ze wskazaniem udziału procentowego i wkładu habilitanta

- i. **Wenda - Piesik A.**, Morrill W.L., Grey W.E., Weaver D.K. 2006. Patogeniczne właściwości zgorzelowych fuzariów pszenicy dla ździeblarza pszenicznego. Prog. Plant Prot. 46 (1): 339-347. (udział 80%, koncepcja pracy, opracowanie metod badań, wykonanie doświadczeń polowych, współredagowanie pracy)
- ii. Piesik D., **Wenda - Piesik A.**, Weaver D.K., Morrill W.L. 2007. Influence of *Fusarium* crown rot disease on semiochemical production by wheat plants. J. Phytopathol. 155: 488-496. (udział 50%, koncepcja pracy, współudział w wykonaniu doświadczeń i redakcji pracy)
- iii. Piesik D., **Wenda - Piesik A.**, Weaver, Tulio B. Macedo, Wendell L. Morrill 2009. Influence of *Fusarium* and wheat stem sawfly infestation on volatile production by wheat plants. J. Plant Prot. Res. 49 (2): 167–174. (udział 70%, koncepcja pracy, współudział w wykonaniu doświadczeń i redakcji pracy)
- iv. **Wenda - Piesik A.**, Sun Z., Grey W. E., Weaver D. K., and Morrill W.L.. 2009. Mycoses of Wheat Stem Sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) Larvae by *Fusarium* spp. isolates. Environ. Entomol. 38 (2): 387-394. (udział 70%, koncepcja pracy, wykonanie doświadczeń, współredagowanie pracy)
- v. **Wenda - Piesik A.**, Piesik D., Ligor T., Buszewski B. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) from cereal plants infested with crown rot: their identity and their capacity for inducing production of VOCs in uninfested plants. Int. J. Pest Manage. 56 (4): 377-383. (udział 70%, koncepcja pracy, częściowe wykonanie doświadczeń, redakcja pracy)
- vi. **Wenda-Piesik A.** 2011. Volatile organic compound emissions by winter wheat plants (*Triticum aestivum* L.) under *Fusarium* spp. infestation and various abiotic conditions. Pol. J. Environ. Stud. 20 (5): 1335-1342.
- vii. **Wenda-Piesik A.** 2011. Entomopatogeniczne grzyby z rodzaju *Fusarium* i ich znaczenie w regulacji szkodliwych owadów. Post. Nauk Roln. 4: 35-48.

1. Charakterystyka entomopatogenicznych właściwości *Fusarium* spp. w oparciu o trój-troficzny układ: pszenica – żdzieblarz pszeniczny – *Fusarium* spp.

Niniejszy rozdział powstał na podstawie następujących artykułów:

Wenda-Piesik A., Morrill W.L., Grey W.E., Weaver D.K. 2006. Patogeniczne właściwości zgorzelowych fuzariów pszenicy dla żdzieblarza pszenicznego. Prog. Plant Prot. 46(1): 339-347.

Wenda-Piesik A., Sun Z., Grey W. E., Weaver D.K., and Morrill W.L. 2009. Mycoses of Wheat Stem Sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) Larvae by *Fusarium* spp. Isolates. Environ. Entomol. 38(2): 387-394.

Wenda-Piesik A. 2011. Entomopatogeniczne grzyby z rodzaju *Fusarium* i ich znaczenie w regulacji szkodliwych owadów. Post. Nauk Roln. 4: 35-48.

1.1. Wprowadzenie

Przedmiotami badań pierwszej części niniejszej rozprawy jest żdzieblarz pszeniczny *Cephus cinctus* Norton (*Hymenoptera: Cephidae*) i gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium* zasiedlające pszenicę. Badania nad powiązaniem pomiędzy pszenicą, żdzieblarzem pszenicznym i *Fusarium* spp. zostały wykonane na Uniwersytecie Stanowym Montany, w Bozeman, USA, w latach 2002-2003.

1.1.1. Stanowisko systematyczne *Cephus cinctus* Norton

Typ: *Arthropoda*; Gromada: *Insecta*; Rząd: *Hymenoptera*; Rodzina: *Cephidae*

Żdzieblarz pszeniczny to reprezentant rzędu błonkówek (*Hymenoptera*), rodziny żdzieblarzowatych (*Cephidae*). Do tej rodziny należy około 100 gatunków błonkówek z 11 - 15 rodzajów, których larwy żerują wewnątrz źdźbeł traw dzikich i uprawnych, w łodygach bylin, krzewów i drzew (Smith 1979, 1993, Tobias i Zinovjev 1994). W obrębie rodziny *Cephidae* plemię *Cephini* składa się z 50 - 60 gatunków, pokarmowo związanych tylko z trawami dzikimi i uprawnymi oraz w znacznej większości zamieszkującymi region palearktyczny.

1.1.2. Zasięg występowania i zróżnicowanie gatunkowe żdzieblarza pszenicznego

Gatunkiem dominującym w Europie (w tym w Polsce) jest *Cephus pygmaeus* L., którego nazywa się europejskim żdzieblarzem pszenicznym (z ang. *european wheat stem sawfly*), chociaż zasięg jego występowania to także Azja, Afryka i Północna Ameryka. W Ameryce Północnej dominuje *Cephus cinctus* Norton i *Trachelus tabidus* (F.), w Chinach natomiast przeważa *Cephus fumipennis* Eversmann (Naito i in. 1998, Chen i in. 2004). Geograficzne rozmieszczenie różnych gatunków żdzieblarza znajduje się w tabeli 1.

Tabela 1. Rozmieszczenie geograficzne żdzieblarzy (*Hymenoptera: Cephidae*) jako szkodników upraw zbożowych. (cyt. za Shanower i Hoelmer 2004).

Gatunek	Występowanie
<i>Cephus cinctus</i> Norton	Kanada, Rosja, Stany Zjednoczone
<i>C. pygmaeus</i> (L.)	Algieria, Austria, Belgia, Bułgaria, byłe państwa Jugosławii, Kanada, Kreta, Cypr, Czechy, Dania, Egipt, Estonia, Francja, Grecja, Hiszpania, Holandia, Iran, Irak, Izrael, Kazachstan, Kirgistan, Litwa, Maroko, Niemcy, Norwegia, Polska , Portugalia, Rumunia, Rosja, Stany Zjednoczone, Szwecja, Szwajcaria, Syria, Tadżykistan, Turcja, Turkmenistan, Ukraina, Uzbekistan, Węgry, Wielka Brytania, Włochy.
<i>C. fumipennis</i> Eversmann	Chiny, Mongolia, Uzbekistan, Kazachstan, Kirgistan, Syberia.
<i>C. cultratus</i> Eversmann	Rosja, Ukraina, Kirgistan, Kaukaz.
<i>Trachelus judaicus</i> (Konow)	Syria, Cypr, Izrael, Libia, Turcja.
<i>T. libanensis</i> (Andre')	Israel, Syria, Libia, Turcja.
<i>T. tabidus</i> (F.)	Algieria, Cypr, Egipt, Francja, Libia, Iran, Izrael, Hiszpania, Niemcy, Rosja, Szwecja, Stany Zjednoczone, Syria, Turcja, Włochy, Wielka Brytania.

1.1.3. Szkodliwość i straty gospodarcze powodowane przez żdzieblarza pszenicznego

Cephus cinctus Norton (*Hymenoptera: Cephidae*) jest szkodnikiem masowo występującym w Ameryce Północnej głównie na trawach i pszenicy. Po raz pierwszy został opisany przez Nortona w końcu XIX wieku, jako owad występujący na dzikiej pszenicy *Pascopyrum smithii* (Rydb.), stokłosie *Bromus inermis* Leyss. oraz na dzikim życie *Elymus cinereus* (Scribn. and Merr.) – (Norton 1872). W 1895 roku żdzieblarza znaleziono po raz pierwszy na plantacjach pszenicy jarej uprawianej w Manitobie (Ainslie 1929). Początkowo uważano, że *Cephus cinctus* Norton jest rodzimym gatunkiem Ameryki Północnej, jednak badania filogenetyczne dowiodły, że został on introdukowany do Ameryki Północnej z północno – wschodniej Azji (Ivie 2001). Gwałtowny wzrost populacji żdzieblarza, do roli najgroźniejszego obecnie szkodnika pszenicy w północnych rejonach USA jest skojarzony z kilkoma czynnikami produkcyjno-siedliskowymi: 1. zwiększeniem powierzchni monokulturowych upraw pszenicy, 2. wprowadzeniem pasowej uprawy tego gatunku (z ang. *summer-fallow practices*), 3. minimalizacją uprawy gleby polegającą na bezorkowym systemie, 4. wydłużającymi się okresami posusznej pogody (Holmes 1977, Morrill 1983). Jego występowanie prowadzi rokrocznie do bardzo dotkliwych strat w plonie ziarna. W samej

tylko Montanie pod koniec lat 90. oszacowano straty plonu na poziomie 25 mln dolarów każdego roku (Morrill i in. 1994). W latach suchych gradacje żdzieblarza powodują 100% uszkodzenia żdźbeł, co skutkuje 80% stratą plonu. W rejonach najbardziej dotkniętych występowaniem szkodnika (Montana, Dakota Północna, Alberta, Saskatchewan, Manitoba) roczne straty wynoszą około 150 mln dolarów¹ (Holmes 1982, Hartel i in. 2003, Weaver i in. 2004). Szkodliwość żdzieblarza jest także duża w niektórych rejonach Europy i Azji, a spodziewana jest również w Australii (Botha i in. 2004, Özberk i in. 2005).

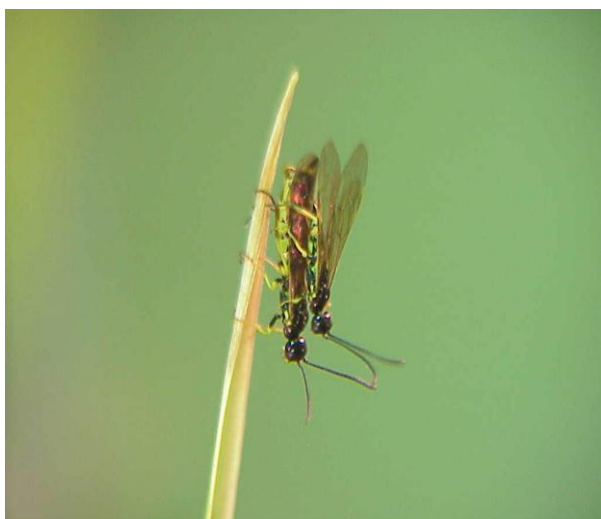
Pierwsze wzmianki o szkodliwości żdzieblarza pszenicznego (*Cephus pygmaeus* L.) w Polsce pochodzą z lat dwudziestych XX wieku, z obserwacji w okolicach Poznania, Puław i Warszawy (Ruszkowski 1950). Monitoring występowania żdzieblarza pszenicznego i jego szkodliwości był prowadzony w Polsce od 1966 do 1995 roku przez Wojewódzkie Stacje Kwarantanny i Ochrony Roślin, a dane przekazywano do IOR w Poznaniu. Z opracowania Gałęzewskiego i Rosiak (2009) wynika, że żdzieblarz pszeniczny występował na terenie całego kraju, głównie na pszenicy ozimej, wyrządzając maksymalną szkodliwość do 8,5% w skali województwa. Natomiast średnia krajowa w tym wieloleciu wyniosła od 1,0 do 2,5%, lokalnie odnotowywano nawet do 40% żdźbeł uszkodzonych w południowo-zachodniej Polsce. Wprowadzenie do uprawy krótkosłomych odmian pszenicy, a także tradycyjna uprawa orkowa gleby powodują, że od lat żdzieblarz nie wyrządza dotkliwych szkód w naszym kraju. Obecnie szkodnik ten nie znajduje się na liście internetowego systemu sygnalizacji agrofagów PIORiN.

1.1.4. Morfologia i cykl życiowy *Cephus cinctus* Norton

Żdzieblarz pszeniczny jest prymitywną błonkówką na tle innych gatunków tego rzędu, np. os, trzmieli czy szerszeni. Dorosłe mają około 10-15 mm długości, z wyraźnie zaznaczonym dymorfizmem płciowym, gdzie samice są większe od samców z pokładełkiem na ostatnim segmencie odwłoka. Pokładełko nie pełni funkcji żądła, a służy jedynie do składania jaj wewnątrz żdźbła, jego kształt przypomina piłę (z ang. saw), stąd wzięła się angielska nazwa 'sawfly' (Wallace i McNeal 1966). Dorosłe mają słabą zdolność poruszania się, można je łatwo zaobserwować i złapać w trakcie kopulacji lub składania jaj, kiedy trzymają się żdźbła zawsze zwrócone głową w dół. Larwa osiąga 1,5 cm długości, przybiera kształt litery S, jest blado biała lub żółtawa z wyraźnie zaznaczoną głową. Cykl życiowy żdzieblarza pszenicznego obejmuje jedno pokolenie w roku na roślinie żywicielskiej, którą

¹ Biorąc pod uwagę znaczny wzrost cen pszenicy przez ostatnich 10 lat obecnie szacuje się, że straty te są dwukrotnie większe.

jest trawa lub pszenica (Ainslie 1920). W rozwoju szkodnika wyróżnia się cztery fazy rozwojowe: jajo, larwa, poczwarka i dorosła błonkówka. Wszystkie fazy poza imago rozwijają się wewnątrz źdźbła i są zsynchronizowane z rozwojem rośliny żywicielskiej. Dorosłe błonkówki pojawiają się od maja do lipca (Weiss i in. 1990), samce wcześniej od samic pozostając na skrajach pól uprawnych, gdzie dochodzi do zapłodnienia (Holmes 1982) – (Fot. 1). Żdzieblarz jest haplo-diploidalnym gatunkiem, tzn. że samce posiadają jeden zestaw 9 chromosomów, zaś samice dwa zestawy tj. 18 chromosomów. Zapłodnienie nie jest konieczne do uzyskania jaj, ponieważ samice mogą składać niezapłodnione (haploidalne) jaja, z których powstanie potomstwo męskie lub zapłodnione (diploidalne) jaja, z których powstaną samice. W ten sposób gatunek kontroluje płeć swojego potomstwa (Morrill i in. 2000). Osobniki obydwu płci produkują specyficzne feromony, dzięki którym rozpoznają się podczas zapłodnienia (Bartelt i in. 2002). Samice mogą złożyć około 50 jaj pojedynczo do wewnątrz źdźbeł – (Fot. 2).



Fot. 1. Dorosłe osobniki żdzieblarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) in copula (źródło: własne).



Fot. 2. Samica żdzieblarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) w trakcie składania jaj (źródło: własne).

Inna samica może wybrać źdźbło, w którym już było złożone jajo, jednak tylko jedna larwa będzie żyła w takim źdźble, ze względu na kanibalizm (Seamans i in. 1944). Podatność pszenicy na atak błonówek żdzieblarza zaczyna się wraz z fazą strzelania w źdźbło (BBCH 31) i trwa aż do końca kwitnienia (BBCH 69). Larwa żyjąca wewnątrz źdźbła żywi się miękiszem i wiązkami naczyniowymi wędrując w dół i w górę przez okres miesiąca albo dłużej (Fot. 3). Przechodzi w tym czasie przez 4-5 stadia i osiąga około 13 mm długości i 2 mm średnicy. Kiedy zaatakowana roślina zaczyna zasychać larwa przesuwa się do podstawy

żdźbła i tworzy dookoła nacięcie w kształcie litery V, po czym zasklepia otwór resztkami tkanek rośliny i własnymi odchodami. Żdźbło jest wówczas odcięte od podstawy, co objawia się widocznym położeniem na polu. Wewnątrz kikuta larwa tworzy tzw. kolebkę hibernacyjną, która chroni ją oraz przyszłą poczwarkę przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi (Fot. 4). Podczas zimy diapauzujące larwy mogą wytrzymać nawet do -20°C (Morrill i in. 1993). Przepoczwarczenie następuje w kolebce hibernacyjnej na wiosnę, a faza poczwarki trwa 7-16 dni, po czym w maju wylatują na zewnątrz błonkówki. Diapauza trwa minimum 90 dni w 10°C i przy 12-15 % wilgotności powietrza (Holmes 1978). Błonkówki żdzieblarza mają słabe zdolności latania i nie przemieszczają się na zbyt duże odległości. Dlatego, największe nasilenie żdzieblarza i szkodliwość jest zawsze na brzegach pól i stopniowo ulega zmniejszeniu w kierunku środka pola (Runyon i in. 2001, Nansen i in. 2005).



Fot. 3. Larwa żerująca żdzieblarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) wewnątrz żdźbła pszenicy (źródło: własne).

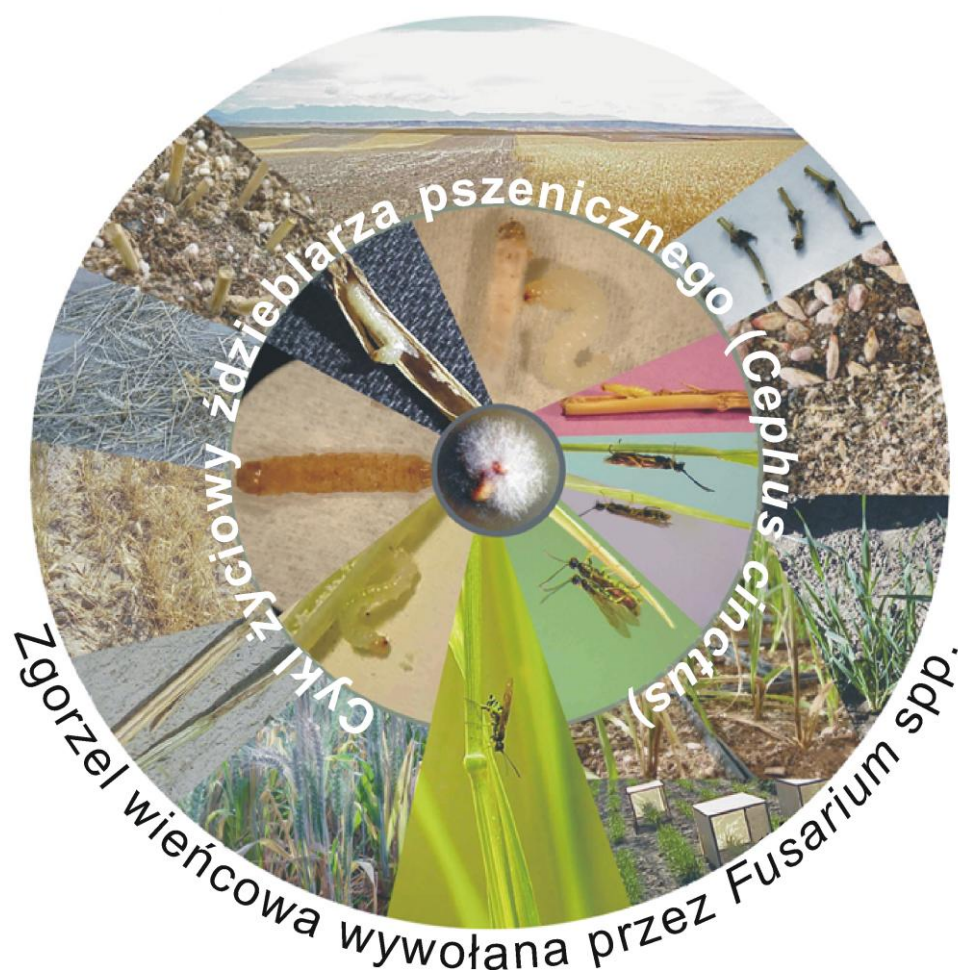


Fot. 4. Larwa diapauzująca w kolebce zimowej żdzieblarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) (źródło: własne).

1.1.5. Synchronizacja cyklu życiowego żdzieblarza pszenicznego z rozwojem fuzaryjnej zgorzeli na pszenicy

Gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium* żyjące w glebie mogą być saprotrofami (żywią się martwymi tkankami roślinnymi) lub patogenami roślin. W odniesieniu do rosnących roślin pszenicy jarej i ozimej infekcje glebowego pochodzenia powodowane przez różne struktury *Fusarium* spp. prowadzą do rozwoju takich objawów chorobowych jak: zgorzel siewek, zgorzel korzeni i różnych części pędu. W USA, Kanadzie oraz innych częściach Świata zespół objawów chorobowych powodowanych przez *Fusarium* spp. na dolnych częściach żdźbła pszenicy nazywa się zgorzelą wieńcową (z ang. *crown rot disease*) – (Fot. 5). Sprawcami tej choroby są przede wszystkim gatunki: *F. graminearum* Schwabe gr.1 (syn. *pseudograminearum*) i *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. (Cook 1980, Klaasen i in. 1991,

Luque i in. 2005). Zgorzel wieńcowa może rozwijać się od fazy siewki aż do końca wegetacji pszenicy. Na pochwie liściowej młodych roślin pojawiają się smugi miodowo-brązowego koloru w okolicy pierwszego kolanka, które ciągną się do drugiego a nawet trzeciego kolanka. Z czasem plamy stają się coraz ciemniejsze i zataczają pierścień wokół źdźbła. Na podstawie zbrunatniałych źdźbeł u roślin dojrzewających tworzą się także przebarwienia różowo-czerwonego koloru wskutek rozwoju grzybni powietrznej. Fuzaryjna zgorzel wieńcowa i larwa żdzieblarza pszenicznego współwystępują wewnątrz jednego żywiciela – pszenicy.



Rys. 1. Cykl życiowy żdzieblarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) na tle rozwoju fuzaryjnej zgorzeli pszenicy (źródło: opracowanie własne).

Larwa od chwili wyklucia z jaja schodzi w dół źdźbła, drążąc w nim kanał i żywiąc się tkankami miękkimi. Zatrzymuje się w okolicy pierwszego kolanka, gdzie przechodzi okres diapauzy zimowej. Jeśli tkanki miękkie, zwłaszcza w dolnych partiach rośliny są skolonizowane przez patogeniczne *Fusarium* spp., larwa spotyka się ze strukturami grzyba. Wraz z parenchymą mogą się one dostać do jej przewodu pokarmowego i spowodować zaburzenia w rozwoju i śmierć (Fot. 6). Jednak nie jest to jedyna możliwość kontaktu grzyba z larwą. Kutikula larwy bezpośrednio styka się ze ścianami spasożytowanego źdźbła, co daje

możliwość infekcji zewnętrznych oraz poprzez przetchlinki w kutikuli. W trakcie diapauzy larwa pozostaje w tzw. kolebce zimowej, która jest wyścielona cienką, pergaminową osłonką, zapewniającą jej szczelną ochronę przed wysychaniem. Infekcje w tym czasie są raczej mało prawdopodobne. Na grafie kołowym zaprezentowano dwa cykle rozwojowe – żdzieblarza pszenicznego oraz pszenicy, na której rozwija się fuzaryjna zgorzel wieńcowa (rys. 1).



Fot. 5. Objawy wieńcowej zgorzeli fuzaryjnej na pszenicy (źródło: własne).



Fot. 6. Martwe larwy żdzieblarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) wewnątrz chorego na zgorzel źdźbła pszenicy (źródło: własne).

Liczne gatunki z rodzaju *Fusarium* mają szczepy, które są patogeniczne w odniesieniu do zwierząt zarówno niższych, jak i wyższych. Wiedza na temat grzybów rodzaju *Fusarium* powiązanych z owadami stale się pogłębia, odkąd Booth (1971) sklasyfikował 15 gatunków w 10 sekcjach znalezionych na owadach, a 9 z nich uznał za patogeniczne w stosunku do owadów. W wykazie grzybów entomopatogenicznych Humbera (1992) znajduje się 13 gatunków *Fusarium* sp., opisanych jako patogeny owadów z rzędów: chrząszczy, muchówek, motyli, pluskwiaków równoskrzydłych i błonkówek. Najnowsze odkrycia istotnie przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat entomopatogenicznych gatunków *Fusarium* sp. jako i żywicielskich owadów – szkodników roślin uprawnych. Przegląd tej wiedzy znajduje się w pracy Wenda-Piesik (2011).

1.2. Osiągnięcia i wnioski

Kolekcjonowanie martwych larw żdzieblarza pszenicznego na ścierniskach po zbiorze pszenicy (*in situ*), w różnych hrabstwach stanu Montana, miało miejsce w latach 2001 i 2002. Materiał do badań stanowiło około 2 tys. martwych larw wyjętych z kikutów pszenicznych, świadczących o tym, że ich śmiertelność następowała w fazie diapauzy zimowej. Identyfikację grzybów z rodzaju *Fusarium* z martwych larw przeprowadzono dwójako; tradycyjnymi metodami polegającymi na izolacji grzybów na sztucznych podłożach oraz za

pomocą techniki PCR (skrót z ang. *Polymerase Chain Reaction*). Zidentyfikowano 5 gatunków: *F. graminearum* Schwabe Gr1 (syn. *pseudograminearum*), *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. acuminatum* Ell. i Ev. sensu Gordon, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. i *F. equiseti* (Corda) Sacc. sensu Gordon. Ogółem uzyskano 207 izolatów, wśród których najliczniej reprezentowanym gatunkiem (58,1 %) był *F. culmorum*. Natomiast *F. equiseti*, *F. avenaceum* i *F. graminearum* stanowiły od 14,3 do 11,5 % izolatów, zaś najmniej liczny (3,7 % izolatów) był gatunek *F. acuminatum*.

W celu zweryfikowania pierwszej hipotezy badawczej o patogeniczności *Fusarium* spp. w odniesieniu do diapauzujących larw żdzieblarza pszenicznego wykonano doświadczenia laboratoryjne (*in vitro*) polegające na bezpośredniej aplikacji zarodników konidialnych o różnym stężeniu na ciało żywych larw.

Wszystkie testowane izolaty okazały się co najmniej łagodnie patogeniczne w doniesieniu do diapauzujących larw żdzieblarza, które były traktowane zarodnikami konidialnymi w stężeniach od 10^4 do 10^8 zarodników w 1 cm^3 wody. Śmiertelność larw zależała od stężenia zarodników oraz od czasu, jaki upłynął od momentu aplikacji. Pierwsze martwe larwy notowano po 3 dniach, po czym następował raptowny wzrost śmiertelności aż do 13 dnia; w którym skumulowany procent martwych larw osiągał od 40 do 100 %. Larwy kontrolne, które traktowano wodą zaczynały zamierać dopiero w 9 dobie, a w każdym pojedynczym teście wykazywały dużo mniejszą skumulowaną śmiertelność (od 0 do 30 %) niż larwy traktowane zarodnikami. Bazując na wartościach LD_{50} (z ang. *lethal dose*) w 9 dobie testu stwierdzono, że największą wirulencją charakteryzuje się *F. culmorum* ($6,7 \times 10^3$) i *F. avenaceum* ($3,8 \times 10^4$). Najśłabszą wirulencję stwierdzono natomiast u *F. equiseti*, które potrzebowało stężenia $5,1 \times 10^7$ zarodników aby wywołać efekt śmiertelności u 50 % badanej populacji larw w 9 dobie. Z kolei wskaźnik LT_{50} (z ang. *lethal time*) informujący o liczbie dni, po których skumulowana śmiertelność larw wynosi 50 %, mieścił się w zakresie od 6 do 22 dni w zależności od stężenia zarodników i gatunku *Fusarium*. Na jego podstawie stwierdzono, że najszybszą reakcję letalną u 50 % osobników (6-7 dni) spowodowały gatunki *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. avenaceum* w stężeniu 10^8 .



Fot. 7. Typowe objawy zmian barwy oskórki i sztywnienia larw diapauzujących żdzieblarza pszenicznego pod wpływem zakażenia przez *F. avenaceum*, *F. culmorum* lub *F. graminearum* (źródło: własne).

Fot. 8. Rozwój mikoz na diapauzujących larwach żdźbilarza pszenicznego (*Cephus cinctus* Norton) po aplikacji zarodników konidialnych *Fusarium* spp. (źródło: własne).



Ponieważ zdrowa larwa żdźbilarza pszenicznego w trakcie diapauzy ma białokremowe zabarwienie i w trakcie poruszania się przybiera kształt litery S, notowano, jak zmienia się jej morfologia i zachowanie pod wpływem zakażenia przez badane izolaty. Po aplikacji zarodników konidialnych na ciało diapauzujących larw obserwowano szereg zmian wskazujących na specyficzny przebieg patogenezы fuzaryjnej. Zakażenie larw zarodnikami gatunków *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. avenaceum* powodowało raptowne zmiany w zabarwieniu integumentu z białozółtego w różowobrunatny (Fot. 7). Następnie larwy pokrywały się strzępkami grzybni, które wyrastały z przetchlinek oraz na powierzchni oskórka, zwłaszcza w przypadku zakażenia *F. culmorum* i *F.*

graminearum. Przebieg mikoz na podstawie intensywności przebarwiania ciała oraz wzrostu grzybni w czasie trwania testu (13 dni) został powiązany ze skumulowaną śmiertelnością diapauzujących larw (Fot. 8). Najbardziej oczywiste powiązanie rozwoju mikoz wraz ze śmiertelnością diapauzujących larw otrzymano dla gatunków *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. avenaceum*.

Do weryfikacji drugiej hipotezy badawczej odnośnie patogeniczności *Fusarium* spp. w stosunku do larw żerujących wewnątrz źdźbła pszenicy (*in vivo*) przeprowadzono doświadczenia wazonowe i polowe, w których sprowokowano zakażenie żywicielskiej pszenicy poprzez inokulację gleby (lub podłoża) patogenicznymi izolatami *Fusarium* spp. Zakażenie pszenicy 5 gatunkami *Fusarium*, których patogeniczność w stosunku do larw

ździeblarza zbadano w warunkach *in vitro*, miało na celu sprawdzenie, czy również w warunkach *in vivo* owa patogeniczność wystąpi. Jest to zgodne z regułami Kocha, dotyczącymi badań diagnostycznych na potwierdzenie patogeniczności drobnoustrojów. Według trzeciej reguły Kocha powinno się doprowadzić do zakażenia osobników w naturalnych warunkach ich życia, co w przypadku ździeblarza pszenicznego ma miejsce wewnątrz źdźbła pszenicy. W doświadczeniach wazonowych użyto inokulum tych samych izolatów gatunków *Fusarium*, które przebadano na larwach diapauzujących. Śmiertelność larw żerujących w pszenicy jarej 'McNeal' określono w dwóch terminach tj. w 56 i 76 dniu od złożenia jaj przez samice do wewnątrz źdźbeł, co odpowiadało fazom rozwojowym pszenicy: BBCH 55 (kłoszenie) i BBCH 75 (dojrzałość mleczna). Śmiertelność larw żerujących wewnątrz źdźbeł zakażonych wyniosła od 58 do 79 % w fazie kłoszenia oraz od 59 do 93 % w fazie dojrzałości mlecznej pszenicy. Ogólnie najczęściej martwych larw stwierdzano w przypadku porażenia pszenicy przez *F. graminearum* Gr1 i *F. culmorum* (89 – 93 %), mniej martwych larw znajdowano w źdźbłach porażonych przez *F. avenaceum* i *F. equiseti* (77 – 78 %) a istotnie najmniej przez *F. acuminatum* (58 %). Wszystkie przypadki martwych larw zostały zdiagnozowane poprzez re-izolowanie tych samych gatunków *Fusarium*, które użyto do zakażenia pszenicy. Podobnie postępowano z zakażonymi roślinami, z których wyizolowano również te same izolaty grzybów. Doświadczenia polowe na pszenicy jarej 'McNeal' wykonano w Stacji Badawczej Arthur H. Post Field Research Laboratory należącej do MSU w Bozeman, Montana. Poprzez wprowadzenie do gleby inokulum trzech gatunków: *F. graminearum* Gr1, *F. culmorum* i *F. acuminatum* zbadano patogeniczność w odniesieniu do żerujących larw ździeblarza pszenicznego i do pszenicy. Największy odsetek martwych larw stwierdzono na obiektach, gdzie wprowadzono inokulum *F. graminearum* Gr1 i *F. culmorum*, odpowiednio 49 % i 45 %. Ponadto śmiertelność larw ździeblarza była ponad dwukrotnie wyższa w tych roślinach, które były bardzo silnie porażone zgorzelą. Zakażenie pszenicy *F. acuminatum* skutkowało około 10 % śmiertelnością larw żerujących, tj. na poziomie kontroli (bez inokulum). We wszystkich przypadkach martwych larw izolowano te same szczepy *Fusarium*, którymi były zakażone rośliny.

1.3. Podsumowanie

Dwa spośród badanych gatunków *Fusarium*, tj. *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. i *F. graminearum* Schwabe Gr1 (syn. pseudograminearum) to wyróżniające się agresywnością patogeny w stosunku do żerujących i diapauzujących larw ździeblarza pszenicznego,

co znalazło potwierdzenie we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach. *F. equiseti* (Corda) Sacc. sensu Gordon i *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. są także patogeniczne dla larw żdźbalarza, chociaż mniej agresywne od poprzednich. Funkcję, jaką pełnią badane gatunki *Fusarium* w odniesieniu do pszenicy i żdźbalarza pszenicznego można nazwać współpatogenicznością. Rola tych gatunków w naturalnej regulacji żdźbalarza jest trudna do oszacowania bez stałego monitoringu. Nie można wykluczyć, że uda się w przyszłości odkryć takie izolaty *Fusarium* spp., które będą wykazywać tylko własności entomopatogeniczne, a nie będą fitopatogeniczne.

2. Reakcja obronna pszenicy poprzez wydzielanie organicznych związków lotnych na porażenie przez *Fusarium* spp. oraz uszkodzenia spowodowane żerowaniem larw żdźbalarza pszenicznego.

Niniejszy rozdział powstał na podstawie następujących artykułów:

Piesik D., **Wenda-Piesik A.**, Weaver D.K., Morrill W.L. 2007. Influence of *Fusarium* crown rot disease on semiochemical production by wheat plants. J. Phytopathol. 155: 488-496.

Piesik D., **Wenda-Piesik A.**, D.K. Weaver, T.B. Macedo, W.L. Morrill 2009. Influence of *Fusarium* and wheat stem sawfly infestation on volatile production by wheat plants. J. Plant Prot. Res. 49(2): 167 – 174.

Wenda-Piesik A., D. Piesik, T. Ligor, B. Buszewski. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) from cereal plants infested with crown rot: their identity and their capacity for inducing production of VOCs in uninfested plants. Inter. J. Pest. Manag. 56(4): 377-383.

2.1. Wprowadzenie

Rośliny, chociaż tego nie widać gołym okiem, nie pozostają biernymi ofiarami² swoich agresorów, tj. owadów uszkadzających ich organy oraz patogenów żyjących ich kosztem. Natura wyposażyła rośliny w szereg mechanizmów obronnych, a jednym z nich jest możliwość indukcji chemicznej obrony poprzez wydzielanie lotnych związków organicznych (LZO). Zasadnicza rola tych związków to:

- odstraszenie szkodników roślinożernych,
- przywabianie wrogów naturalnych agresorów roślinnych,
- przywabianie zapylaczy (głównie owadów),
- komunikacja wewnątrzgatunkowa, a także międzygatunkowa (Dudareva i Pichersky 2008).

Faktem jest, że 90% naturalnej emisji LZO jest związana z roślinami, gdzie dominują oczywiście drzewa, a w szczególności drzewa z Amazonii (Maffei 2010). LZO są uwalniane przez liście, kwiaty i owoce do atmosfery oraz przez korzenie do ziemi. O ile uwalnianie zapachów kwiatowych jest uwarunkowane ontogenetycznie, to spektrum i ilość LZO

² Pojęcie „bierna ofiara” w odniesieniu do rośliny zaatakowanej zaczerpnięto z pracy De Vos i Jander (2010).

uwalnianych przez wegetatywne organy roślin zmienia się drastycznie pod wpływem różnych stresów (Heil 2008). Niektóre LZO są uwalniane natychmiast po uszkodzeniu tkanki liścia (Arimura i in. 2005), inne natomiast, jak salicylan metylu czy monoterpény (limonen, linalol, β -ocimen) lub seskwiterpény (jak kariofilen czy farnezen) są uwalniane po pewnym czasie, zwykle po upływie 24h od uszkodzenia tkanek (Dudareva i in. 2006, Pichersky i in. 2006).

Przy obecnie dostępnej nowoczesnej aparaturze służącej do kolekcjonowania związków lotnych VCS (z ang. *volatile collection system*) oraz chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS) identyfikacja LZO, śledzenie ich biosyntezy i mechanizmu uwalniania są możliwe nawet w odniesieniu do śladowych ilości tych związków w emitowanej przez roślinę mieszaninie. Chemicznie LZO należą do grup:

- bardzo dużej grupy terpenoidów (homo-, mono-, di- i seskwiterpény),
- pochodnych kwasów tłuszczowych,
- związków aromatycznych (jak salicylan metylu lub indol),
- alkanów, alkenów, alkoholi, estrów, aldehydów i ketonów (Arimura i in. 2009, Wu i Baldwin 2009). Dotychczas wyizolowano 1700 związków z ponad 90 rodzin, które stanowią 1% wszystkich wtórnych metabolitów roślinnych (Pichersky i Gershenzon 2002).

Istnieją dwa typy obrony roślin przed agrofagami; bezpośredni i pośredni. Bezpośredni typ jest związany z produkcją repelentów, które odstraszały wrogie organizmy (Kessler i Baldwin 2002), pośredni natomiast jest związany z emisją związków o charakterze atraktantów, które nie wpływają na zachowanie szkodnika lecz przywabiają jego wrogów naturalnych (Chen 2008). Kompozycja uwalnianych LZO przez rośliny zależy od różnych czynników, takich jak: pojedyncze uszkodzenie mechaniczne lub dłużej utrzymujący się mechaniczny stres (Mithöfer i in. 2005), żerowanie owadów (Paré i Tumlinson 1996) czy składanie jaj przez owady (Hilker i Meiners 2002). Małe stężenia związków zielonego liścia, emitowane przez rośliny nieuszkodzone mogą być atraktantami dla roślinożerców, jak to wykazał Piesik (2008) w przypadku skrzypionki zbożowej przywabianej przez pszenicę emitującą aldehyd (Z)-3-heksenal i octan (Z)-3-heksenylu. Natomiast duże stężenia tych samych substancji mogą działać repelentnie na chrząszcze i larwy skrzypionki zbożowej.

Aktywność uwalniania związków lotnych pod wpływem porażenia przez grzyby patogeniczne była przedmiotem badań Lacy Costello i in. (2001) na ziemniaku porażonym przez *Phytophthora infestans* (sprawca zarazy ziemniaczanej) oraz *Fusarium coeruleum* (sprawca suchej zgnilizny). Zidentyfikowano ponad 50 LZO, które zdaniem autorów mogą służyć wczesnemu wykrywaniu chorób rozwijających się na bulwach ziemniaka

w przechowalniach³. LZO są także aktywne w odniesieniu do patogenów grzybowych i udowodniono, że w niektórych przypadkach mogą hamować wzrost grzybni dzięki antybiotycznym właściwościom (Alvarez-Castellanos i in. 2001). Zjawisko to zostało przebadane na różnych gatunkach roślin i ich patogenach. Na pomidorze, zakażanym przez *Botrytis cinerea* (sprawca szarej pleśni) odkryto, że chore liście emitowały kilkanaście LZO, a wśród nich były m.in.: 2-heksenal, 2-nonenal, 2-karen, β -kariofilen, które w testach *in vitro* hamowały wzrost grzybni *B. cinerea* (He i in. 2006), podobnie jak 2-heksenal, 3-heksenal i 3-heksenol powodowały zahamowanie infekcji rzodkiewnika (*Arabidopsis*) przez *B. cinerea* (Kishimoto i in. 2005). Inhibicyjny wpływ na rozwój grzybni *Aspergillus parasiticus* stwierdzono także dla oktanalu i heksanalu – związków emitowanych przez kukurydzę (Wright i in. 2000), natomiast rozwój *Sclerotium rolfii* (sprawca białej pleśni) był hamowany przez linalol, salicylan metylu i octan 3-heksenylu – związki emitowane przez rośliny orzecha ziemnego (Cordoza i in. 2002). Uwalnianie LZO przez rośliny pszenicy, których organy zostały celowo zainfekowane *Fusarium* spp. było także przedmiotem badań niniejszej rozprawy, a główną przesłanką tych badań jest poszukiwanie metod w ramach ekologii biochemicznej wzmagania obrony bezpośredniej lub pośredniej roślin przed agrofagami.

Wiele uwagi w badaniach nad rolą LZO w relacji roślina-agrofag poświęca się także indukcji tych związków u osobników zdrowych, które żyją w sąsiedztwie roślin zagrożonych. Nazywa się to informowaniem chemicznym⁴, lub komunikacją chemiczną (z ang. *signaling*)⁵ pomiędzy roślinami. Zdrowe rośliny potrafią odczytywać informację chemiczną nadaną przez osobniki porażone lub uszkodzone i „zinterpretować” ją, jako instrukcję do podjęcia własnej obrony (Ton i in. 2007). Rośliny nie są nieme i głuche jak by się wydawało. Pierwsze doniesienia o „mówiących drzewach” miały miejsce w latach 80. kiedy zaobserwowano, że pewien gatunek wierzby (*Salix sitchensis*) rosnący w pobliżu zaatakowanych przedstawicieli tego samego gatunku jest zdecydowanie bardziej odporny na atak szkodnika niż rośliny rosnące w oddali (Rhoades 1983). Podobnie pewien gatunek topoli (*Populus x euroamericana*) znacznie wzmocnił swoją obronę rosnąc na terytorium, gdzie były także inne drzewa tego gatunku lecz zaatakowane przez szkodniki. Od tego czasu zaczęto postulować teorię, że drzewa zaatakowane ostrzegają swoich zdrowych sąsiadów (Baldwin i Schultz 1983). Ugruntowanie się, (ang. *priming*) linii obrony przed agrofagami przez rośliny nie

³ Związki lotne emitowane przez chore bulwy miałyby być wychwytywane przez tzw. elektroniczne nosy (z ang. *e-nose*) w przechowalniach.

⁴ Pojęcie „informacji chemicznej” zaczerpnięte zostało z pracy Bezemer i van Dam (2005).

⁵ w pracy na temat signalingu Baldwin i in. (2006) używa nawet sformułowania „podśluch” w odniesieniu do roślin zdrowych, które odbierają informację chemiczną zawartą w LZO wysyłanych przez rośliny uszkodzone.

uszkodzone jest bardzo korzystne z punktu widzenia ograniczania potencjalnych kosztów energetycznych, jakie rośliny ponoszą w chwili indukcji obrony. Rośliny, które prawidłowo odbierają sygnały zawarte w LZO realizują obronę przed agrofagami w taki sposób, jakby same były już zaatakowane (Heil i Bueno 2007). Różne może być pochodzenie stresu (biotyczny i abiotyczny), który powoduje uwalnianie się LZO przez tzw. emitery. Natomiast to, w jakiej postaci sygnał będzie odebrany przez roślinę - odbiorcę zależy od spektrum związków, ilości ich uwalniania oraz od czasu, w jakim sygnał jest przekazywany. Lotne związki o lżejszej masie cząsteczkowej (takie jak np. etylen, metanol) bardzo szybko uwalniają się z powierzchni rośliny i łatwo ulegają rozproszeniu w powietrzu zanim dotrą do innej rośliny. Natomiast związki o cięższej masie i przez to słabszej lotności mogą pełnić większą rolę w komunikacji między roślinami, gdyż dłużej dyfundują w powietrzu i pewniej trafiają do innych roślin. Do tych substancji należą: alkohole terpenowe, jasmonian metylu, salicylan metylu i cała grupa związków zielonego liścia (z ang. skrót *GLV* – *green leaf volatiles*) (Thistle i in. 2004).

Kluczową rolę w systemicznym rozprzestrzenianiu się chemicznego sygnału wewnątrz rośliny odgrywają trzy hormony roślinne, tj. kwas jasmonowy (skrót JA), etylen i kwas salicylowy (skrót SA). Uważa się, że JA indukuje chemiczną obronę przed nekrotroficznymi patogenami (o szerokim spektrum gospodarzy) np. grzyba *B. cinerea*, podczas gdy w przypadku biotrofów (pasożytów bezwzględnych) np. bakterii *Pseudomonas syringae* odpowiedź roślin odbywa się za pośrednictwem SA, który prowadzi do biosyntezy specyficznych białek PR (ang. Pathogenesis Related) i metabolitów wtórnych takich jak fitoaleksyny hamujących skutecznie rozwój patogena i kolonizację tkanek roślinnych.⁶ (Huang i in. 2003, Glazebrook 2005, Hwe i in. 2009, Macioszek i in. 2009). Praktyczne zastosowanie komunikacji chemicznej między roślinami budzi szereg wątpliwości, ale też daje niesamowicie wiele inspiracji do dalszych badań. Rośliny, które byłyby w stanie się same obronić przed owadami roślinożernymi lub grzybami patogenicznymi musiałyby być genetycznie zmienione. W pracy Baldwina i in. (2006) znajdujemy propozycje pewnych rozwiązań w oparciu o „wyciszone” lub „wygłuszone” genetycznie rośliny pełniące funkcję emiterów ściśle określonych związków lotnych, które wprowadzone do łąnu roślin uprawnych mogłyby pełnić rolę nowoczesnego systemu ostrzegania przed agrofagami. W ostatnich latach dokonano ogromnego postępu w identyfikacji genów i enzymów zaangażowanych w biosyntezę LZO (Dudareva i Pichersky 2008).

⁶ Obrona roślin przed patogenami za pośrednictwem kwasu salicylowego jest znana jako system nabytej odporności (ang. skrót SAR = systemic acquired resistance).

2.2. Osiągnięcia i wnioski

W badaniach własnych wchodzących w zakres niniejszej rozprawy wiele uwagi poświęcono rozpoznaniu patogeniczności wybranych izolatów *Fusarium* spp. w stosunku do amerykańskiej i polskiej odmiany pszenicy jarej, z których kolekcjonowano LZO. Stwierdzano, że intensywność objawów zgorzeli wieńcowej była zróżnicowana dla gatunków z rodzaju *Fusarium* oraz przybierała zmienny obraz pomiędzy młodocianymi fazami wzrostowo-rozwojowymi a dojrzałą pszenicą, lecz badane odmiany miały zbliżoną podatność. W fazach 14-16 i 32-34 BBCH indeksy chorobowe (ICH) wskazywały na podobną szkodliwość gatunków uszeregowanych w kolejności malejącej: *F. graminearum* Gr1, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* i *F. acuminatum*. Za najbardziej szkodliwy gatunek, od fazy siewki aż do fazy dojrzałości pełnej pszenicy uznano *F. graminearum* Gr 1 (ICH w każdej fazie wynosiły 100 %). *F. culmorum*, choć istotnie słabiej porażał pszenice niż *F. graminearum* Gr1, to już od fazy strzelania w źdźbło powodował silne objawy zgorzeli wieńcowej, czego wyrazem były indeksy na poziomie 70 %. Groźnym patogenem okazał się również *F. equiseti*, który w fazie siewki i strzelania w źdźbło nie wykazywał szkodliwości, za to w fazie 84 BBCH spowodował 100 % ICH, tak jak *F. graminearum* Gr1. Porażenie przez *F. avenaceum* przybiegało łagodnie; ICH dla pszenicy wzrastał średnio o 25 % od fazy siewki do dojrzałości pełnej, pozostając na poziomie 47-50 %. Natomiast zakażenie *F. acuminatum* powodowało niewielkie porażenie pszenicy w fazie siewki (ICH 12-29 %), i równie niewielkie około 30% w fazie jej dojrzałości. Szkodliwość badanych gatunków była także badana w kontekście zmian w cechach decydujących o produkcyjności pszenicy jarej. W odniesieniu do roślin zdrowych, porażenie pszenicy przez *F. graminearum* Gr1 spowodowało najsilniejsze skrócenie kłosa na źdźble głównym oraz na źdźbłach bocznych, a także zmniejszenie masy ziarna z kłosa na źdźble głównym. Podobną reakcję pszenicy zanotowano w przypadku porażenia przez *F. culmorum* i *F. avenaceum* polegającą na zmniejszeniu produkcji masy ziarna z kłosa głównego.

W dwóch pracach omawianych w tym rozdziale (Piesik i in. 2007 i Piesik i in. 2009), badano wpływ porażenia przez pojedyncze gatunki z rodzaju *Fusarium* na wydzielanie LZO przez amerykańską odmianę pszenicy jarej 'Mc Neal'. Natomiast w pracy Wenda-Piesik i in. (2010) badano wpływ infekcji mieszanej powodowanej przez trzy gatunki, tj. *F. graminearum* Gr1, *F. culmorum* i *F. avenaceum* na porażenie polskiej odmiany pszenicy jarej 'Bombona' oraz na wydzielanie LZO przez rośliny porażone i rośliny zdrowe rosnące w sąsiedztwie

porażonych. Metodycznie ujednolicono fazę we wszystkich badaniach, w której kolekcjonowano LZO na pszenicy do 32 BBCH.

W pierwszej pracy (Piesik i in. 2007) kolekcję LZO przeprowadzano trzykrotnie, począwszy od dnia kiedy pszenica jara osiągnęła fazę 32 BBCH, następnie po 2 i po 4 dniach. Związki kolekcjonowano przez 2 godziny (od 8 rano) w 6 oddzielnych przedziałach czasowych oraz przez 10 godzin w ciągu dnia i w nocy. Taki schemat miał na celu rozpoznanie aktywności wydzielania przez pszenicę metabolitów z grupy terpenoidów sygnalizujących o jej porażeniu. Infekcja wywołana przez pięć gatunków *Fusarium* powodowała istotnie największe wydzielanie przez pszenicę terpenoidów: linalolu, tlenku linalolu i β -farnezanu w porównaniu do roślin zdrowych (bez infekcji *Fusarium* spp.) w pierwszym dniu ich kolekcjonowania. Produkcja związków lotnych zmniejszała się wraz z upływem czasu, zaś w ciągu dnia obserwowano ich wzmożone wydzielanie w ciągu 6 godzin do południa i zupełny brak wydzielania w nocy. Spektrum i ilość poszczególnych związków były pod wpływem gatunku *Fusarium* i współdziałania porażenia z czasem kolekcjonowania związków. W przypadku linalolu ogólnie największą produkcję w ciągu 3. dniowej kolekcji trwającej po 10 h otrzymywano z roślin zainfekowanych przez *F. culmorum* (średnia 13,4 ng), tj. ponad 12. krotnie większą niż z roślin kontrolnych. Istotnie mniejszą, aczkolwiek kilkakrotnie przekraczającą poziom kontroli, produkcję otrzymywano z roślin porażonych przez pozostałe gatunki, od 2,32 ng – średnia dla *F. graminearum* do 7,18 ng – średnia dla *F. acuminatum*. Wydzielanie β -farnezanu okazało się także ściśle powiązane z gatunkiem porażającym pszenicę jarą, ponieważ rejestrowano go tylko u roślin zakażonych przez *F. culmorum* (średnia z 3 dniowej kolekcji po 10 h wyniosła 6,75 ng). Natomiast produkcja trzeciego wykrytego na pszenicy jarej terpenoidu tj. tlenku linalolu była istotnie mniejsza od innych związków i dość niestabilna w układzie poszczególnych patogenów pszenicy. Na przykład, z roślin porażonych przez *F. acuminatum* i *F. equiseti* nie udało się go wykryć podczas 2 h kolekcjonowania, dopiero w znacznych ilościach był gromadzony podczas 10 h kolekcji.

Wydzielanie tych samych związków oraz dwóch innych – β -kariofilenu i 4-heptanonu stanowiło przedmiot badań w drugiej pracy (Piesik i in. 2009). Pszenica jara była pod wpływem porażenia przez *Fusarium* spp. oraz uszkodzeń spowodowanych żerowaniem larw żdźblikarza pszenicznego, a kolekcjonowanie związków prowadzono w 1, 3 i 5 dniu od rozpoczęcia fazy 32 BBCH. Chociaż każdy z tych związków był w istotnie większych ilościach produkowanych przez rośliny porażone/uszkodzone niż kontrolne, to jednak wpływ

czynników doświadczalnych uwidocznił się w przypadku β -kariofilenu, 4-heptanonu i linalolu. Najsilniejsze wydzielanie β -kariofilenu stwierdzono pierwszego dnia pod wpływem porażenia przez *F. culmorum* i trzeciego dnia pod wpływem porażenia przez *F. graminearum* w ilościach odpowiednio 1,37 i 1,69 ng h⁻¹. Natomiast wydzielanie 4-heptanonu istotnie wzrastało, równomiernie pod wpływem porażenia przez różne gatunki *Fusarium*, od pierwszego do piątego dnia kolekcji osiągając 0,80 ng h⁻¹. Linalol miał największy udział w mieszaninie wszystkich substancji, a jego ilość zmieniała się w czasie kolekcji oraz pod wpływem porażenia przez różne *Fusarium* spp. i uszkodzeń ździeblarza. Najbardziej stabilne, chociaż nie największe, wydzielanie linalolu miało miejsce u roślin uszkodzonych przez larwy ździeblarza i porażonych przez *F. equiseti*, które utrzymywało się na poziomie 13,2 ng w trakcie całej trzydniowej kolekcji. U roślin nieuszkodzonych żerowaniem larw ździeblarza produkcja linalolu była zmienna w dniach i w zależności od gatunku zgorzelowego *Fusarium*. Rośliny porażone *F. equiseti* wydzielaly największą jego ilość trzeciego dnia kolekcji – 87,9 ng, natomiast rośliny porażone *F. graminearum* pierwszego dnia – 24,7 ng. W pracy tej poddano także badaniom stan larw *C. cinctus* żerujących w źdźbłach pszenicy. Stwierdzono 100% śmiertelność larw w źdźbłach pszenicy zainfekowanych przez *F. graminearum* i *F. equiseti* oraz 30% śmiertelność w źdźbłach zainfekowanych przez *F. culmorum*. Mniejszą aktywność LZO uwalnianych z roślin chorych i uszkodzonych przez ździeblarza można tłumaczyć tym, że skoro larwy zamierały wewnątrz źdźbła przed osiągnięciem fazy 32 BBCH, to roślina już nie emitowała sygnału do otoczenia.

Do badań nad przekazywaniem sygnału chemicznego przez rośliny porażone mieszaniną trzech gatunków zgorzelowych *Fusarium* użyto bardzo zapachowej odmiany pszenicy jarej ‘Bombona’ (Wenda-Piesik i in. 2010). W ciągu kolekcji trwających 4 h wykryto 12 substancji, spośród których 3 związki były także w śladowych ilościach wydzielane przez rośliny zdrowe. Związki te, w przeważającej liczbie należące do grupy GLV powstają w kilku szlakach metabolicznych i mają różne fizyko-chemiczne parametry. Dominującymi w mieszaninie wykrytych zapachów były: octan (Z)-3-heksenylu (skrót (Z)-3-HAL), aldehyd (Z)-3-heksenal (skrót (Z)-3-HAL) i alkohol (Z)-3-heksenol (skrót (Z)-3-HOL) – wszystkie trzy są produktami ścieżki biochemicznej lipoksygenazy, wyższych kwasów tłuszczowych. Ponadto, pszenica wydzielala duże ilości linalolu i (Z)-ocimenu – produktów szlaku deoksyksylulozy-5-fosforanu (DOXP) oraz octan benzylu (skrót BAC) – w procesie szlaku fenylopropanoidowego. W fazie 31 BBCH, 48 h przed zbadaniem spektrum i ilości wydzielanych LZO przez porażoną pszenicę jarą ‘Bombona’, dostawiono rośliny tej samej

odmiany nieporażone przez *Fusarium* według następującego schematu: 1 m i 3 m odległości od rośliny-emitera do rośliny-odbiorcy całkowicie odkrytego, 1 m i 3 m odległości od emitera do odbiorcy z jednym odkrytym liściem oraz 1 m odległości od emitera do całkowicie zakrytego odbiorcy. Rośliny nieporażone przez *Fusarium*, które przez dwie doby znajdowały się w sąsiedztwie (1-3 m) roślin chorych i miały co najmniej jeden liść odkryty wydzielały podobne spektrum LZO, co pszenica chora. Natomiast rośliny całkowicie zasłonięte, w odległości 1 m od roślin chorych, wydzielały tylko te substancje, które stwierdzono w roślinach kontrolnych. Ilości wydzielanych substancji u roślin, które odebrały informację chemiczną od chorej pszenicy były mniejsze niż u roślin-emiterów, jednakże proporcje pomiędzy różnymi grupami pochodzenia związków były podobne. W sąsiedztwie roślin chorych te, które były najbliżej i miały całkowitą powierzchnię dostępną wydzielały istotnie więcej LZO niż rośliny bardziej oddalone (3 m) i odsłonięte oraz oddalone i częściowo tylko dostępne.

2.3. Podsumowanie

Stwierdzono, że pszenica jara porażona przez różne gatunki zgorzelowe *Fusarium* spp. wydziela LZO w ilościach znacznie przekraczających poziom wydzielania u roślin zdrowych. Aczkolwiek, odmiany pszenicy mogą mieć zróżnicowaną zapachowość naturalną, w konsekwencji czego jakość i ilość LZO jest także zmienna u odmian pod wpływem porażenia przez *Fusarium* spp. Terpenoidami, które powtarzalnie ujawniają się pod wpływem porażenia przez *Fusarium* spp. są linalol, tlenek linalolu oraz β -kariofilen. U odmian zapachowych, które produkują GLV można stwierdzić także wzmożone wydzielanie alkoholi, aldehydów i octanów. Te substancje są odbierane przez rośliny zdrowe rosnące w sąsiedztwie roślin chorych, które również zaczynają je wydzielać. Nie wiadomo jeszcze, dlaczego pszenica wydziela określone związki pod wpływem porażenia grzybowego, ani w jaki sposób mogłyby się one jej przydać w obronie przed patogenem. Należy jednak przypuszczać, że potencjalna obrona przed rozprzestrzenieniem się fuzaryjnej zgorzeli odbywa się za pośrednictwem kwasu jasmonowego, tak jak w przypadku innych patogenów nekrotroficznych. Fakt, że pszenica podejmuje wysiłek, aby chemicznie sygnalizować otoczenie o swoim porażeniu nie może być pusto brzmiącym wołaniem.

3. Wpływ wilgotności i światła na indukcję związków lotnych wydzielanych przez pszenicę porażoną *Fusarium* sp.

Niniejszy rozdział powstał na podstawie artykułu:

Wenda-Piesik A. 2011. Volatile organic compound emissions by winter wheat plants (*Triticum aestivum* L.) under *Fusarium* spp. infestation and various abiotic conditions. Pol. J. Environ. Stud. 20(5): 1335-1342.

3.1. Wprowadzenie

Niezależnie od stresów pochodzenia biotycznego, powodujących uszkodzenia tkanek roślinnych, w konsekwencji których rośliny podejmują chemiczną obronę wydzielając LZO, stres pochodzenia abiotycznego może również powodować u nich wydzielanie tych samych związków. Jest wiele udokumentowanych prac na temat stresogennych czynników abiotycznych i ich wpływu na wydzielanie metabolitów lotnych u roślin zarówno dwuliściennych jak i jednoliściennych. Najwięcej uwagi poświęcono wpływowi takich czynników abiotycznych jak: zmiana temperatury otoczenia (Gouinguene i Turlings 2002), dostępność składników odżywczych, głównie azotu i fosforu (Schmelz i in. 2003, Teuber i in. 2008), zasolenie i odczyn gleby (Vallat i in. 2005, Loreto i Delfine 2000) oraz wilgotność powietrza i gleby (Ebel i in. 1995, Vickers i in. 2009). Indukcja emisji LZO jest rozumiana jako zaprogramowana reakcja rośliny na złagodzenie negatywnych konsekwencji stresu⁷. Przykładem związku, który pomaga roślinom łagodzić stres termiczny i oksydacyjny jest izopren. Transgenicznie zmienione rośliny, które produkują zwiększone ilości tego związku, lub samo opryskiwanie roślin izoprenem powoduje, że łatwiej znoszą one stres wysokiej temperatury i oksydacji poprzez podniesienie wskaźnika fotosyntezy i zmniejszenie stopnia uszkodzeń komórkowych (Sharkey i in. 2008).

Ponieważ w agrocenozach pól uprawnych biotop jest zespołem różnych czynników fizyko-chemicznych, trudno jest wyodrębnić wpływ pojedynczego abiotycznego czynnika, np. obniżenia wartości pH gleby, na wydzielanie LZO przez uprawianą roślinę. Wiadomym jest, że obniżona wartość ta upośledza przyswajanie jonów biogennych potrzebnych roślinie, co roślina zasygnalizuje poprzez emisję LZO. Ponadto, niskie wartości pH mogą wpływać na wytworzenie ruchomego glinu (metal toksycznego dla roślin), którego obecność także indukuje emisję LZO. Efekty stresów abiotycznych mogą się na siebie nakładać lub maskować nawzajem, tak jak to przedstawił w pracy Vuorinen i in. (2004b) w odniesieniu do

⁷ W przeglądzie Holopainen i Gershenzon (2010) pt. „Multiple stress factors and the emission of plant VOCs” znajduje się obszerny opis funkcji, jakie pełnią związki lotne wydzielane pod wpływem różnych stresów.

wpływu CO₂⁸. Każdy czynnik abiotyczny w natężeniu odstającym od optymalnego dla danego gatunku rośliny powoduje u niej zaburzenia w procesach bio-chemicznych i bio-fizycznych. Są jednak takie czynniki, które już w niewielkich odstępstwach powodują drastyczny wzrost wydzielania metabolitów, w tym związków lotnych. Do takich czynników należy ozon, który w wartościach przekraczających dzienne stężenie 33 ppb na godzinę w powietrzu łąnu staje się fitotoksyczny. Chroniczne narażenie roślin na niewielkie podniesienie koncentracji ozonu indukuje emisję takich związków jak: octan (Z)-3-heksenylu, alkohol 1,3-pentenol i homoterpen C₁₁ (E)-4,8-dimetyl-1,3,7-nona-trien (skrót DMNT) przez fasolę limeńską (*Phaseolus lunatus*) (Vuorinen i in. 2004a). W naturalnym siedlisku oraz w agrocenozach rośliny jednocześnie doświadczają niekorzystnego oddziaływania różnego rodzaju czynników abiotycznych i biotycznych. Liczne prace eksperymentalne nad interakcjami pomiędzy czynnikami biotycznymi (najczęściej uszkodzenia przez owady roślinożerne) oraz abiotycznymi wskazują, że kierunek zmian w emisji LZO może być addytywny, przeciwny lub multiplikatywny (Holopainen i Gershenzon 2010). Odnosnie gatunków zbożowych najwięcej uwagi poświęcono kukurydzy i jej reakcji na jednoczesny wpływ uszkodzeń spowodowanych żerowaniem gąsienic i wysokiej temperatury. Kombinacja tych dwóch czynników stresowych spowodowała addytywny efekt na większą produkcję LZO niż pojedynczo działający każdy z czynników (Gouinguene i Turlings 2002). Na temat wcześniej już wspomnianego ozonu prowadzono także badania mające na celu porównanie indukcji LZO u fasoli limeńskiej pod wpływem podwyższonego stężenia ozonu z uszkodzeniami przez szkodliwe roztocza. Stwierdzono tutaj ten sam kierunek reakcji, a ponadto wykazano, że związki uwalniane pod wpływem ozonu bądź roztoczy jednakowo przywabiają wrogów naturalnych szkodliwych roztoczy. Autorzy nazwali to adaptacyjną koewolucją, bowiem ozon nie zakłócał komunikacji chemicznej pomiędzy uszkodzoną rośliną a przywabianymi sprzymierzeńcami (Vuorinen i in. 2004a). Natomiast przeciwny kierunek reakcji stwierdzono u rzepaku pod wpływem długotrwałego stosowania podwyższonych dawek ozonu i owadów uszkadzających rośliny. Ozon zredukował emisję LZO pod wpływem żerowania owadów na rzepaku; prawdopodobnie degradując ich struktury w gazowej fazie reakcji chemicznej (Himanen i in. 2009). Ciekawe wytłumaczenie addytywnego oddziaływania czynników stresowych takich jak: wysoka temperatura, ozon lub intensywność światła znajduje się w pracy Vickers i in (2009). Te trzy czynniki stresowe oddziałują na rośliny podobnie,

⁸ Autorzy uważają, że podwyższona koncentracja CO₂ w powietrzu w łąnie bezpośrednio i pośrednio (poprzez podniesienie temperatury) wywołuje podwyższoną emisję LZO u roślin kapustnych. Efekty te nakładają się na siebie i trudno jest oszacować ich niezależny wpływ.

powodując u nich wzmożone reakcje biochemiczne polegające na produkcji reaktywnych form tlenu (z ang. skrót ROS) takich jak jony tlenu czy nadtlenu. Z kolei niektóre lotne związki są bardzo silnie wydzielane pod wpływem tychże form tlenu i to tłumaczy jeszcze większą (multiplikatywną) ich produkcję przy jednocześnie działających na roślinę różnych czynnikach. Są już także doniesienia dotyczące jednoczesnego działania na rośliny dwóch biotycznych czynników stresogennych, takich jak patogen i szkodnik, oraz reakcji żywiciela na nie poprzez wydzielanie LZO. Dotychczas przebadano m.in. kukurydzę, której siewki były porażone przez *Setosphaeria turcica* (północna plamistość liści kukurydzy) oraz larwy *Spodoptera littoralis* (sówka bawełnowka egipska). Infekcja grzybowa przy jednoczesnym żerowaniu larw powodowała zmniejszenie, o około 50 %, ilości wydzielanych LZO w porównaniu do sytuacji, gdy tylko larwy uszkadzały tkanki roślinne, chociaż spektrum związków było takie samo. Domniemany mechanizm tej zmniejszonej emisji pochodzi z indukowania przeciwnych szlaków biochemicznych; kwasu salicylowego (SA) - po infekcji grzybowej, który redukuje szlak kwasu jasmonowego (JA) – typowego dla uszkodzeń owadów (Rostas i in. 2006). Niektóre typy żerowania owadów indukują wydzielanie tych samych substancji, co infekcja grzybowa, i dlatego współdziałanie tych uszkodzeń ma addytywny a nawet multiplikatywny wpływ na emisję LZO przez żywiciela. Dotyczy to np. uszkodzeń przez mszyce i inne owady kłująco-ssące, w wyniku których następuje indukcja salicylanu metylu (potoczna nazwa olejek wintergrinowy) i farnezeny, typowych metabolitów szlaku SA, który uaktywnia się w roślinach po infekcji biotroficznych grzybów (Dicke i in. 2009).

W strefie klimatu umiarkowanego warunki pogodowe w trakcie wegetacji roślin uprawnych są poddane sezonowej zmienności i ustabilizowanie ich bezpośredniego wpływu na kondycję roślin jest bardzo trudne. Pszenica jest przykładem ważnej gospodarczo rośliny o długim cyklu przebiegającym w dwóch lub w czterech zmiennych porach roku⁹. Światło i woda są dla niej bardzo ważnymi czynnikami siedliskowymi, a ich niedobór (lub nadmiar) może powodować silne zaburzenia w rozwoju.

3.2. Osiągnięcia i wnioski

Badania będące podstawą niniejszej rozprawy dotyczyły kontrolowanych warunków wilgotności i światła, gdzie w zakresie obydwu czynników abiotycznych wprowadzono poziomy stresogenne dla pszenicy ozimej. Był to poziom 40 % polowej pojemności wodnej (ppw), który spowodował stres suszy, oraz $65 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, który spowodował stres niskiego

⁹ Mowa o formach uprawnych pszenicy, u jarej formy pszenicy cykl zamyka się w dwóch porach roku, u ozimej w czterech.

natężenia światła. Reakcja pszenicy na te stresowe warunki została określona poprzez liczbę źdźbeł oraz produkcję suchej masy roślin pszenicy ozimej. Ponadto, w obydwu doświadczeniach wprowadzono kontrolowaną infekcję zgorzelową uzyskaną poprzez inokulację gleby trzema gatunkami *Fusarium* tj. *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. avenaceum*. Zdrowe rośliny pszenicy narażone na stres suszy lub niedoboru światła produkowały podobną liczbę źdźbeł 2,2-2,8 i miały suchą masę w zakresie 1,70-1,76 g na roślinę, podczas gdy w optymalnych zakresach tych czynników były to odpowiednio 4,1-4,9 źdźbeł i 3,13-5,64 g s.m. na roślinę. Chore na zgorzel rośliny wyraźnie słabiej się krzewiły od zdrowych i stąd też miały gorsze wskaźniki masy. Ponadto, dodatkowy stres choroby zgorzelowej okazał się niewspółmiernie dotkliwy wraz ze stresem świetlnym, czego dowodem była bardzo mała produkcja suchej masy przez pojedynczą roślinę – 0,77 g. W warunkach niedoboru światła ICH osiągnął ponad 80 %. Tymczasem, przy bardzo wysokiej wilgotności (tj. 80 % ppw), gdzie stwierdzono również wysokie wartości indeksu chorobowego – 70 %, rośliny pszenicy wykształcały około 4 źdźbeł i 3,12 g s.m. Stąd wniosek, że zaburzenia we wzroście i rozwoju pszenicy w jej początkowych fazach znacznie szybciej powstają w wyniku niedoborów wody i światła niż pod wpływem zgorzeli fuzaryjnej, jednak choroba ta istotnie pogłębia działanie stresu abiotycznego.

Odpowiedzią roślin pszenicy ozimej na stres suszy i zgorzeli fuzaryjnej była wzmożona produkcja LZO. W sumie wykryto 9 substancji na pszenicy ozimej ‘Tonacja’: trzy należące do terpenoidów: linalol, β -kariofilen i β -farnezen oraz 6 należących do grupy związków zielonego liścia: (Z)-3-heksenal, (E)-2-heksenal, (Z)-3-heksenol, (E)-2-heksenol oraz octan 1-heksylu i octan (Z)-3-heksenyli. Całkowita emisja LZO mierzona w ng na 1 g s.m. rośliny w ciągu godziny wynosiła od 4,09 do 610,4. Rośliny zdrowe, rosnące w warunkach stresu suszy (40 % ppw), emitowały 65,9 ng, podczas gdy chore na zgorzel fuzaryjną w tych samych warunkach braku wody uwalniały 139,3 ng LZO. W miarę wzrostu wilgotności podłoża, poprzez 60 aż do 80 % ppw, któremu towarzyszyło silniejsze porażenie przez *Fusarium* sp., ilość uwalnianych LZO zwiększała się odpowiednio do 435,6 i 610,4 ng. Jest to wyraźny dowód, że rośliny pszenicy będące w dobrej kondycji, tzn. niecierpiące stresu suszy, ale zaatakowane przez patogena grzybowego mają duży potencjał do indukowania systemu obrony chemicznej. Natomiast chore i upośledzone w rozwoju, z powodu braku wody mają ten potencjał znacznie mniejszy. Stosunek dwóch grup LZO, tj. terpenoidów do związków zielonego liścia był względnie stały w poszczególnych obiektach z fuzaryjną zgorzelą i wynosił 38:62. Oznacza to, że na produkcję 1 ng terpenoidów przypada 1,6 ng pozostałych

substancji. Ponadto stwierdzono brak uwalniania terpenoidów przez pszenicę ozimą pod wpływem stresu suszy.

Odnosnie wpływu natężenia światła na produkcję LZO przez pszenicę potwierdziły się wcześniejsze doniesienia, że stres braku światła hamuje produkcję metabolitów zapachowych, natomiast zwiększanie intensywności światła indukuje emisję GLV, wcale natomiast nie indukuje terpenoidów. Rośliny zdrowe, w zakresie najmniejszego natężenia światła, tj. $65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ emitowały tylko dwie substancje, tj. (Z)-3-heksenal i octan (Z)-3-heksenylu w ilości 10,9 ng, podczas gdy w warunkach $295 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ilość uwalnianych związków przez rośliny zdrowe była dwukrotnie wyższa, a w ich spektrum wykryto 6 substancji zielonego liścia. Te badania potwierdziły również bardzo silną interakcję pomiędzy działaniem czynnika świetlnego i biotycznego stresu powodowanego zgorzelą fuzaryjną. W odróżnieniu jednak od interakcji zgorzeli z suszą, gdzie ten wpływ miał charakter addytywny, w przypadku światła i zgorzeli można mówić nawet o działaniu multiplikatywnym na indukcję LZO u pszenicy ozimej. Dowodem na to są bardzo wysokie wartości (ponad 1300 ng) całkowitej produkcji terpenoidów i związków zielonego liścia przy $295 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ i porażeniu przez *Fusarium* sp.

3.3. Podsumowanie

To, w jaki sposób można by LZO w przyszłości wykorzystać w strategii ochrony roślin przed agrofagami w dużej mierze wiąże się z rozszerzeniem badań o nowe aspekty w obrębie problemu samoregulacji rośliny na stres biotyczny i abiotyczny. Potrzebna jest tu ingerencja na poziomie genetycznego uwarunkowania metabolizmu określonych szlaków, w wyniku których będą indukowane LZO pełniące pożądane funkcje repelentne, atraktantne lub łagodzące stres. Na świecie są już prowadzone badania w oparciu o hodowlę roślin transgenicznych, które mogą się bronić przed agrofagami dzięki chemicznym substancjom wydzielanym w celu przywabiania wrogów naturalnych ich szkodników albo odstraszenia tych szkodników lub też łagodzić stres różnego pochodzenia abiotycznego (poprzez izopren). Niniejsze badania wpisują się w ten trend ekologii biochemicznej mającej na celu poszukiwania nowych rozwiązań w ochronie roślin. Główny przedmiot tych badań – grzyby zgorzelowe z rodzaju *Fusarium* są stosunkowo łatwe w hodowli i w zakażaniu roślin, dlatego mogą służyć jako modelowy czynnik w przyszłych próbach nad kontrolowaniem indukcji LZO.

4. Literatura

1. Ainslie C.N. 1920. The western grass-stem sawfly. U.S. Department of Agriculture, Bulletin 841.
2. Ainslie C.N. 1929. The western grass-stem sawfly: a pest of small grains. Washington, D.C., U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin 157.
3. Alvarez-Castellanos P.P., Bishop C.D., Pascual-Villalobos M.J. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry* 57: 99–102.
4. Arimura G., Kost C., Boland W. 2005 Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 91–111.
5. Arimura G., Matsui K. Takabayashi J. 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.* 50: 911-23.
6. Baldwin I.T., Halitschke R., Paschold A., Von Dahl C.C., Preston C.A. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science* 311: 812–815.
7. Baldwin I.T., Schultz J.C. 1983. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage; evidence for communication between plants. *Science* 221: 277–279.
8. Bartelt R.J., Cossè A.A., Petroski R.J., Weaver D.K. 2002. Cuticular hydrocarbons and novel alkenediol diacetates from wheat stem sawfly (*Cephus cinctus*) natural oxidation to pheromone components. *J. Chem. Ecol.* 28: 385-405.
9. Bezemer T.M., Van Dam N.M. 2005. Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends Ecol. Evol.* 20: 617–624.
10. Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237 pp.
11. Botha J., Hardie D., Casella F. 2004. Sawflies: The Wheat stem sawfly *Cephus cinctus* and relatives. Government of Western Australia. Department of Agriculture Factsheet No. 12/2004.
http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/pw/ins/pp/gc/fs012_2004.pdf
12. Cardoza Y.J., Alborn H.T., Tumlinson J.H. 2002. In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *J. Chem. Ecol.* 28: 161-174.
13. Chen M.S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Sci.* 15: 101–114.

14. Chen S., Hoelmer K.A., Chen H., Liu A., Shanower T.G. 2004. A review of wheat stem sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) research in China. *J. Agr. Urban Entomol.* 21: 249-256.
15. Cook R.J. 1980. *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 64: 1061-1066.
16. De Vos M, Jander G. 2010. Volatile communication in plant–aphid interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 366–371.
17. Dicke M., van Loon J.J.A., Soler R. 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat. Chem. Biol.* 5: 317–324.
18. Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 417-440.
19. Dudareva N., Pichersky E. 2008. Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr. Opin. Biotech.* 19: 181-189.
20. Ebel R.C., Mattheis J.P., Buchanan D.A. 1995. Drought stress of apple-trees alters leaf emissions of volatile compounds. *Physiol. Plantarum* 93: 709–712.
21. Gałęzewski M., Rosiak K. 2009. Żdzieblarz pszeniczny (*Cephus pygmaeus* L.) na przestrzeni wielolecia w Polsce. *Prog. Plant Prot.* 49: 1179-1182.
22. Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205-227.
23. Gouinguene S.P., Turlings T.C.J. 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol.* 129: 1296–1307.
24. Hartel K.D., Frederick B.A., Shanower T.G. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in wheat stem sawfly *Cephus cinctus* and cross-species amplification in related species. *Mol. Ecol. Notes* 3: 85-87.
25. He P.Q., Tian L., Chen K.S., Hao L.H., Li G.Y. 2006. Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. and its resistance to *Botrytis cinerea* Pers. by burdock oligosaccharide. *J. Integr. Plant Biol.* 48: 550–557.
26. Heil M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* 178: 41-61.
27. Heil M., Bueno J.C.S. 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5467–5472.
28. Hilker M., Meiners T. 2002. Induction of plant responses towards oviposition and feeding of herbivorous arthropods: a comparison. *Entomol. Exp. Appl.* 104: 181-192.
29. Himanen S.J., Nerg A.M., Nissinen A., Pinto D.M., Steward C.N., Poppy G.M., Holopainen J.K. 2009. Effects of elevated carbon dioxide and ozone on volatile

- terpenoid emissions and multitrophic communication of transgenic insecticidal oilseed rape (*Brassica napus*). *New Phytol.* 181: 174–186.
30. Holmes N.D. 1977. The effect of the wheat stem sawfly, *Cephus cinctus* (Hymenoptera: Cephidae) on the yield and quality of wheat. *Can. Entomol.* 109: 1591-1598.
 31. Holmes N.D. 1978. The wheat stem sawfly. *P. Annu. Meet. Entomol. Soc. Alberta*, 2-13.
 32. Holmes N.D. 1982. Population dynamics of the wheat stem sawfly, *Cephus cinctus* (Hymenoptera: Cephidae), in wheat. *Can. Entomol.* 114: 775-788.
 33. Holopainen J.K., Gershenzon J. 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. Review. *Trends Plant Sci.* 15: 176-184.
 34. Huang J., Cardoza Y.J., Schmelz A.A., Raina R., Engelberth J., Tumlinson J.H. 2003. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217: 767-775.
 35. Humber R.A. 1992. Collection of entomopatogenic fungal cultures: catalog of strains. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Bulletin ARS-110.
 36. Hwe-Su Y., Heil M., Adame-Alvarez M.R., Ballhorn D.J., Choong-Min R. 2009. Airborn induction and priming of plant defenses against bacterial pathogen. *Plant Physiol.* 151: 2152-2161.
 37. Ivie M.A. 2001. On the geographic origin of the wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae): a new hypothesis of introduction from northeastern Asia. *Am. Entomol.* 47: 84-97.
 38. Kessler A., Baldwin I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 299–328.
 39. Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R., Takabayashi J. 2005. Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1093–1102.
 40. Klaasen J.A., Matthee F.N., Marasas W.F.O., Schalkwyk D.J. 1991. Comparative isolation of *Fusarium* species from plant debris in soil and wheat stubble and crowns at different locations in the southern and western Cape. *Phytophylactica* 23: 299-307.
 41. Lacy Costello B.P.J., Evans P., Ewen R.J. 2001. Gas chromatographymass spectrometry analyses of volatile organic compounds from potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans* or *Fusarium coeruleum*. *Plant Pathol.* 50: 489–496.
 42. Loreto F., Delfine S. 2000. Emission of isoprene from salt stressed *Eucalyptus globulus* leaves. *Plant Physiol.* 123: 1605–1610.

43. Luque A.G., Pioli R., Bonel B., Alvarez E.P. 2005. Cellulolytic fungi populations in stubble and soil as affected by agricultural management practices. *Biol. Agric. Hortic.* 23: 121-142.
44. Macioszek V.K., Łaźniewska J., Kononowicz A.K. 2009. Mutanty *Arabidopsis* w badaniach odpowiedzi obronnej roślin na grzyby nekrotroficzne. *Postępy Biologii Komórki* 36: 153-161.
45. Maffei M.E. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *S. Afr. J. Bot.* 76: 612-631.
46. Mithöfer A., Wanner G., Boland W. 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on Lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol.* 137: 1160-1168.
47. Morrill W.L. 1983. Early history of cereal grain insect pests in Montana. *B. Entomol. Soc. America* 29: 24-28.
48. Morrill W.L., Gabor J.W., Weaver D.K., Kushnak G.D., Irish, N.J. 2000. Effect of host plant quality on the sex ratio and fitness of female wheat stem sawflies (*Hymenoptera: Cephidae*). *Environ. Entomol.* 29: 195-199.
49. Morrill W.L., Gabor J.W., Wichman D. 1993. Mortality of the wheat stem sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) at low temperatures. *Environ. Entomol.* 22: 1358-1361.
50. Morrill W.L., Kushnak G.D., Bruckner P.L., Gabor J.W. 1994. Wheat stem sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) damage, rates of parasitism, and overwinter survival in resistant wheat lines. *J. Econ. Entomol.* 87: 1373-1376.
51. Naito T., Smith D.R., Huang F.S. 1998. Records of *Cephidae* (*Hymenoptera*) from China and Southeastern Asia, with two New species of *Janus* Stephens. *Jpn. J. Syst. Entomol.* 4: 237-242.
52. Nansen C., Payton M.E., Runyon J.B., Weaver D.K., Morrill W.L., Sing S.E. 2005. Preharvest sampling plan for larvae of the wheat stem sawfly, *Cephus cinctus* (*Hymenoptera: Cephidae*), in winter wheat fields. *Can. Entomol.* 137: 602-614.
53. Norton E. 1872. Notes on North American *Tenthredinidae* with descriptions of new species. *T. Am. Entomol. Soc.* 4: 77-86.
54. Özberk İ., Atlı A., Yücel A., Özberk F. Coşkun Y. 2005. Wheat stem sawfly (*Cephus pygmaeus* L.) damage; impacts on grain yield, quality and marketing prices in Anatolia. *Crop Prot.* 24: 1054-1060.
55. Paré P.W., Tumlinson J.H. 1996. Plant volatile signals in response to herbivore feeding. *Fla. Entomol.* 79: 93-103.
56. Pichersky E., Gershenzon J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 237-243.

57. Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808–811.
58. Piesik D. 2008. Wpływ żerowania larw i chrząszczy skrzypionki zbożowej (*Oulema melanopus* L., *Coleoptera: Chrysomelidae*) na wydzielanie lotnych związków organicznych przez pszenicę (*Triticum aestivum* L. emden. Fiori at Paol.) oraz reakcja imagines na te komponenty. Rozprawa habilitacyjna, Rozprawy 131, UT-P, Bydgoszcz, 88 ss.
59. Rhoades D.F. 1983. Herbivore population dynamics and plant chemistry. In: *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems*. R.F. Denno, M.S. McClure (eds.). Academic Press, New York, 155-220 pp.
60. Rostás M., Ton J., Mauch-Mani B., Turlings T.C.J. 2006. Fungal infection reduces herbivore-induced plant volatiles of maize but does not affect naive parasitoids. *J. Chem. Ecol.* 32: 1897–1909.
61. Runyon J.B., Hurley R.L., Morrill W.L., Weaver D.K. 2001. Distinguishing adults of *Bracon cephi* and *Bracon lissogaster* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of the wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae). *Can. Entomol.* 133: 215-217.
62. Ruszkowski J. 1950. Fauna roślinożerna łąnów zbożowych w Polsce w okresie dwudziestolecia 1919-1939. *Annales UMCS, Lublin – Polonia, Supplementum II, Sectio E*, 95 ss.
63. Schmelz E.A. Alborn H.T., Engelberth J., Tumlinson J.H. 2003. Nitrogen deficiency increases volicitin – induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. *Plant Physiol.* 133: 295–306.
64. Seamans H.L., Manson G.F., Farstad C.W. 1944. The effect of the wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Nort.) on the heads and grains of infested stems. *Ontario Entomol. Soc. Annu. Rep.* 75: 10-15.
65. Shanower T.G., Hoelmer K.A. 2004. Biological control of wheat stem sawflies: past and future. *J. Agric. Urban Entomol.* 21: 197-221.
66. Sharkey T.D. Wiberley A.E., Donohue A.R. 2008. Isoprene emission from plants: Why and how. *Ann. Bot. - London* 101: 5–18.
67. Smith D.R. 1979. Superfamily *Cephoidea*. In: *Catalog of Hymenoptera in America north of Mexico*, Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 133-137.
68. Smith D.R. 1993. Systematics, life history, and distribution of sawflies. In: *Sawfly life history adaptations to woody plants*. Academic Press, 1-32 pp.
69. Teuber M., Zimmer I., Kreuzwieser J., Ache P., Polle A., Rennenberg H., Schnitzler J.P. 2008. VOC emissions of Grey poplar leaves as affected by salt stress and different N sources. *Plant Biol.* 10: 86–96.

70. Thistle H.W., Peterson H., Allwine G., Lamb B., Strand T., Holsten E.H., Shea P.J. 2004. Surrogate pheromone plumes in three forest trunk spaces: composite statistics and case studies. *Forest Sci.* 50: 610-625.
71. Tobias V.I., Zinovjev A.G. 1994. Family Cephidae – stem sawflies. In: Keys to insects of the European Part of the USSR, vol. III. *Hymenoptera*, Part VI Symphyta, Leiden, 377-387 pp.
72. Ton J. D'Alessandro M., Jourdie V., Jakab G., Karlen D., Held M., Mauch-Mani B., Turlings T.C.J. 2007. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.* 49: 16–26.
73. Vallat A., Gu H.N., Dorn S. 2005. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry* 66: 1540–1550.
74. Vickers C.E., Gershenzon J., Lerdau M.T., Loreto F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat. Chem. Biol.* 5: 283–291.
75. Vuorinen T., Nerg A.M., Holopainen J.K. 2004 a. Ozone exposure triggers the emission of herbivore-induced plant volatiles, but does not disturb tritrophic signalling. *Environ. Pollut.* 131: 305–311.
76. Vuorinen T., Reddy G.V.P., Nerg A.M., Holopainen J.K. 2004 b. Monoterpene and herbivore-induced emissions from cabbage plants grown at elevated atmospheric CO₂ concentration. *Atmos. Environ.* 38: 675–682.
77. Waage J.K., Greathead D.J. 1988. Biological control: challenges and opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 318: 111–128.
78. Wallace L.E., McNeal F.H. 1966. Stem sawflies of economic importance in grain crops in the United States. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin 1350: 1-50.
79. Weaver D.K., Sing S.E., Runyon J.B., Morrill W.L. 2004. Potential impact of cultural practices on wheat stem sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) and associated parasitoids. *J. Agric. Urban Entomol.* 21: 271-287.
80. Weiss M.J., Riveland N.R., Reitz L.L., Olson T.C. 1990. Influence of resistant and susceptible cultivar blends of hard red spring wheat on wheat stem sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) damage and wheat quality parameters. *J. Econ. Entomol.* 83: 255-259.
81. Wright M.S., Greene-McDowelle D.M., Zeringue H.J., Bhatnagar D., Cleveland T.E. 2000. Effects of volatile aldehydes from *Aspergillus* - resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin biosynthesis. *Toxin* 38: 1215–1223.
82. Wu J., Baldwin I.T. 2009. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ.* 32: 1161-1174.

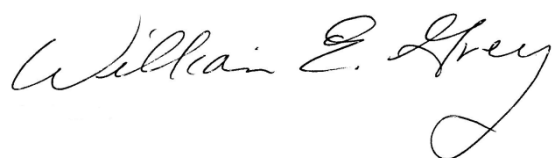
Bydgoszcz, 13.03.2012



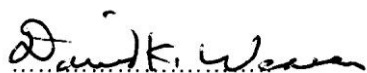
Declaration

We, as employees of Montana State University, do fully authorize all signing of copyright authority on “Wenda - Piesik A., Morrill W.L., Grey W.E., Weaver D.K. 2006. Patogeniczne właściwości zgorzelowych fuzariów pszenicy dla żdzieblarza pszenicznego. Prog. Plant Prot. 46(1): 339-347” to the lead author. We are the co-authors on this paper. We are aware that this paper will be involved in the habilitation process of Anna Wenda – Piesik. We also acknowledge that Anna Wenda – Piesik’s contribution to this article is 80%.

William E. Grey input in the paper is 10% and consisted in participation in fungal isolation and inoculation methods.

Handwritten signature of William E. Grey in black ink.

David. K. Weaver input in the paper is 5% and consisted in participation in data analysis.

Handwritten signature of David K. Weaver in black ink.

Wendell L. Morrill input in the paper is 5% and consisted in participation in visual assessment of the sawfly disease in field trials.

Handwritten signature of Wendell L. Morrill in black ink.

Declaration

We do fully authorize all signing of copyright authority on “Piesik D., Wenda - Piesik A., Weaver D.K., Morrill W.L. 2007. Influence of *Fusarium* crown rot disease on semiochemical production by wheat plants. J. Phytopathol. 155: 488-496” to the lead author. We are the co-authors on this paper and we are aware that this paper will be involved in the habilitation process of Anna Wenda – Piesik. We also acknowledge that Anna Wenda – Piesik’s contribution to this article is 50%.

Dariusz Piesik input in the paper is 35% and consisted in participation in volatile organic compounds collection and GC-MS experimentation as well as the text preparation for publication.



Wendell L. Morrill input in the paper is 5% and consisted in preparation text for publication.



David K. Weaver input is 10% and consisted in participation in analysis of results and volatiles collection methods.



Declaration

We do fully authorize all signing of copyright authority on “Piesik D., Wenda - Piesik A., Weaver D.K., Macedo T. B., Morrill W. L. 2009. Influence of *Fusarium* and wheat stem sawfly infestation on volatile production by wheat plants. J. Plant Prot. Res. 49(2): 167–174” to the lead author. We are the co-authors on this paper. We are aware that this paper will be involved in the habilitation process of Anna Wenda – Piesik. We also acknowledge that Anna Wenda – Piesik’s contribution to this article is 70%.

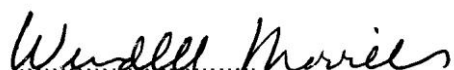
Dariusz Piesik input in the paper is 10% and consisted in participation in volatile organic compounds collection.



David K. Weaver input in the paper is 10% and consisted in participation in GC-MS methods.



Wendell L. Morrill input in the paper is 5% and consisted in preparation of the text for publication.



Thulio B. Macedo input in the paper is 5% and consisted in participation in statistical analysis of data.



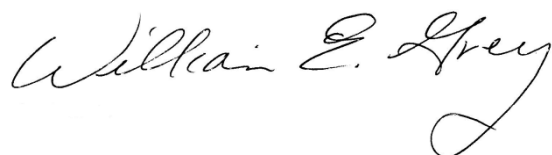
Declaration

We do fully authorize all signing of copyright authority on “Wenda - Piesik A., Sun Z., Grey W. E., Weaver D. K., and Morrill W.L. 2009. Mycoses of Wheat Stem Sawfly (*Hymenoptera: Cephidae*) Larvae by *Fusarium* spp. Isolates. *Environ. Entomol.* 38(2) 387-394” to the lead author. We are the co-authors on this paper and we are aware that this paper will be involved in the habilitation process of Anna Wenda – Piesik. We also acknowledge that Anna Wenda – Piesik’s contribution to this article is 70%.

Zhitao Sun input in the paper is 10% and consisted in participation in statistical analysis of data.

Handwritten signature of Zhitao Sun in black ink.

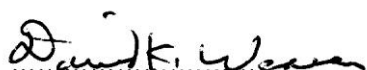
William E. Grey input in the paper is 10% and consisted in participation in bioassay of fungal severity and PCR amplification.

Handwritten signature of William E. Grey in black ink.

Wendell L. Morrill input in the paper is 5% and consisted in participation in text preparation.

Handwritten signature of Wendell L. Morrill in black ink.

David K. Weaver input in the paper is 5% and consisted in participation in text preparation and submission to the journal.

Handwritten signature of David K. Weaver in black ink.

Declaration

We do fully authorize all signing of copyright authority on “Wenda - Piesik A., Piesik D., Ligor T., Buszewski B. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) from cereal plants infested with crown rot: their identity and their capacity for inducing production of VOCs in uninfested plants. Int. J. Pest Manage. 56 (4): 377-383.” to the lead author. We are the co-authors on this paper and we are aware that this paper will be involved in the habilitation process of Anna Wenda – Piesik. We also acknowledge that Anna Wenda – Piesik’s contribution to this article is 70%.

Dariusz Piesik input in the paper is 10% and consisted in participation in volatile organic compounds collection.



Tomasz Ligor input in the paper is 10% and consisted in participation in GC-MS methods.



Bogusław Buszewski input in the paper is 10% and consisted in participation in text preparation for publication.

