

Nr zadania: 33



**Poszukiwanie form kukurydzy o wysokiej
odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy
łodygi powodowane przez grzyby z rodzaju
Fusarium spp.**

**Kierownik: Dr. hab. Elżbieta Kochańska – Czembor, prof. nadzw. IHAR-PIB
Wykonawca: mgr. Seweryn Frasiński**

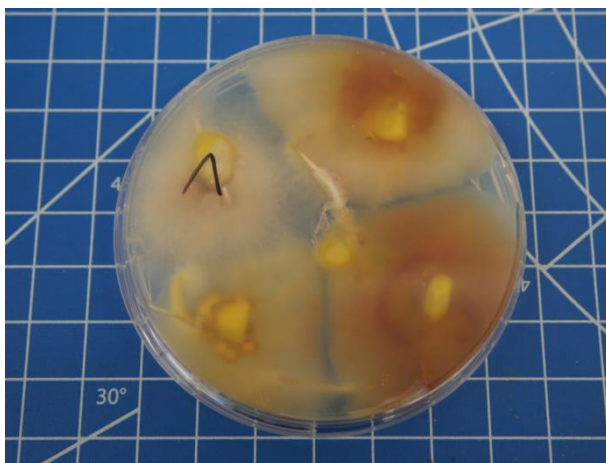
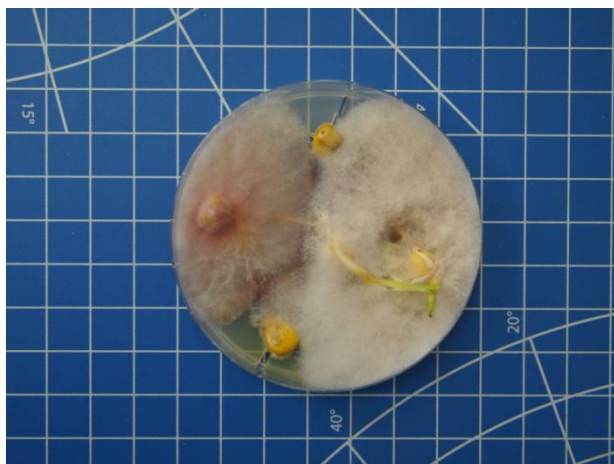
Wstęp - uzasadnienie prowadzonych badań

- **Fuzarioza kolb i zgorzel podstawy łodygi - choroby te mają wpływ nie tylko na plon uzyskiwanego ziarna lub zielonej masy, lecz w sposób istotny warunkują jego jakość.**
- **Metabolity wtórne grzybów z rodzaju *Fusarium* spp. są wysoce szkodliwe dla ludzi i zwierząt, powodując groźne choroby a nawet śmierć.**
- **Aby uzyskać postęp biologiczny dla stopnia odporności kukurydzy na te choroby, poszukiwanie źródeł odporności należy prowadzić jednocześnie z monitorowaniem populacji patogena na terenie kraju.**

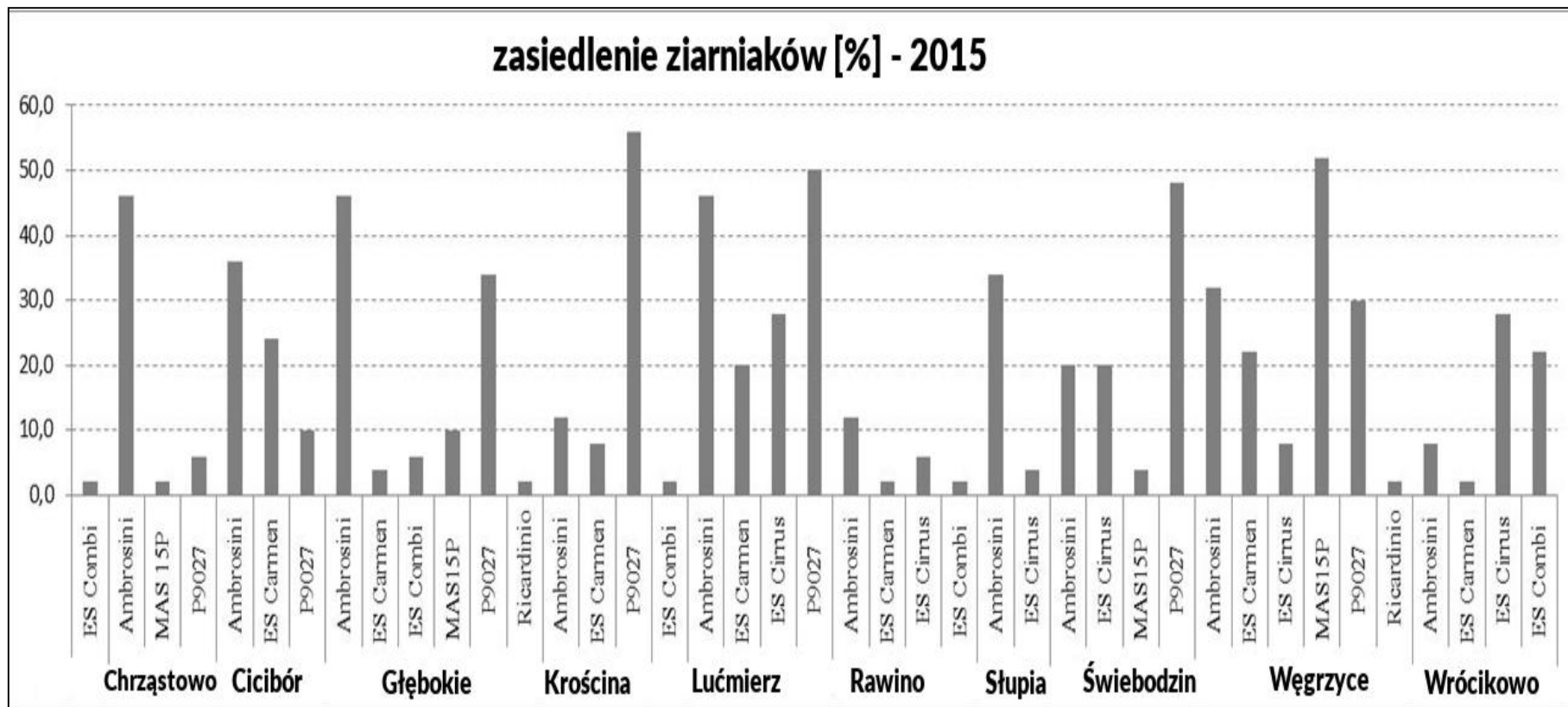
Wstęp - uzasadnienie prowadzonych badań

- **Badania nad epidemiologią grzybów z rodzaju *Fusarium* spp. występujących na terenie Polski oraz ocena zagrożenia skażenia ziarna toksynami fuzaryjnymi jest prowadzona w IHAR-PIB we współpracy z IGR-PAN w ramach Programu Wieloletniego finansowanego przez MRiRW.**
- **Badania prowadzone są dla prób pobranych z 10 lokalizacji (dla 4 odmian w każdej lokalizacji) – liczba wyosobnień 500. Stwierdzono, że główne gatunki zasiedlające ziarno kukurydzy w 2015 roku to (oznaczenia molekularne): *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. poae* oraz *F. temperatum*.**

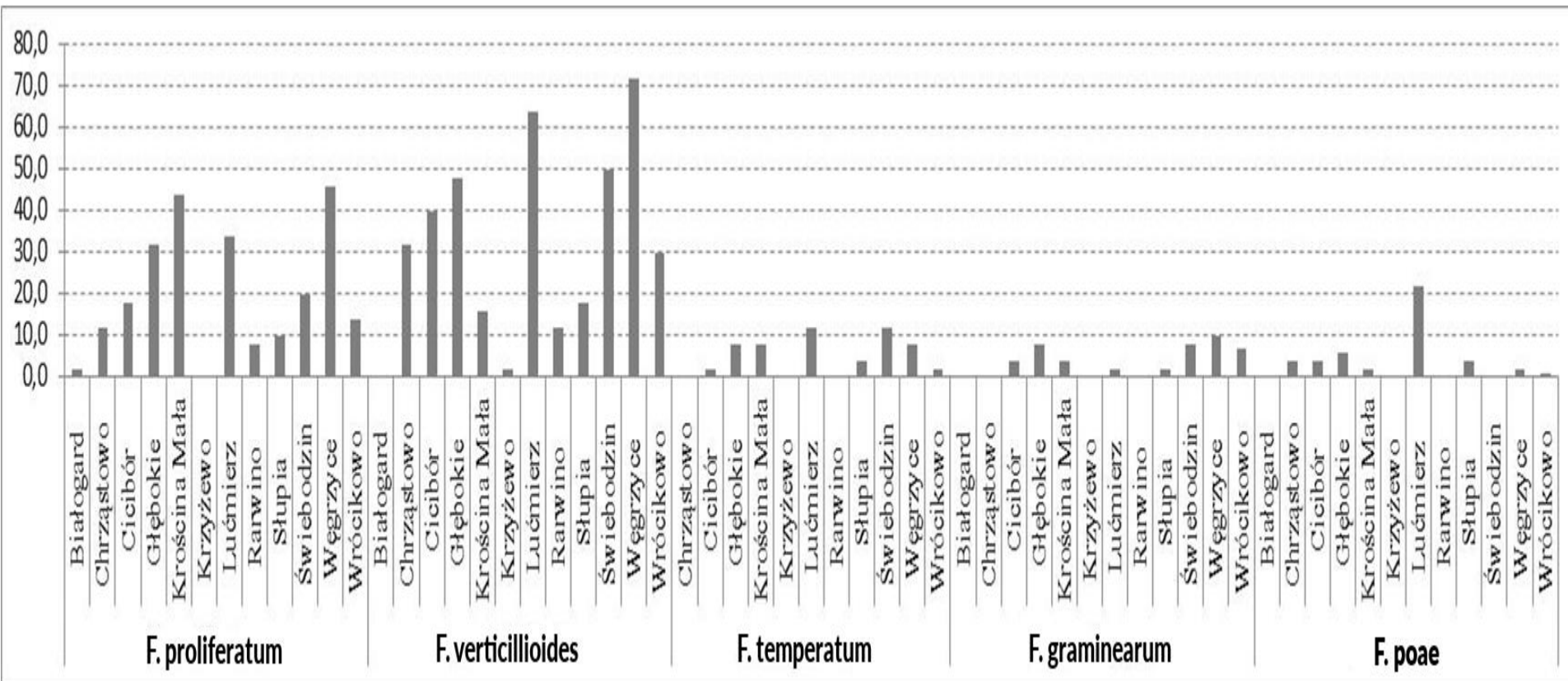
Monitorowanie zmian zdolności chorobotwórczych sprawców fuzariozy kolb (*Fusarium spp.*) poprzez określenie procentowego porażenia ziarniaków oraz określenie poziomu skażenia toksynami fuzaryjnymi



4 odmiany - 10 lokalizacji



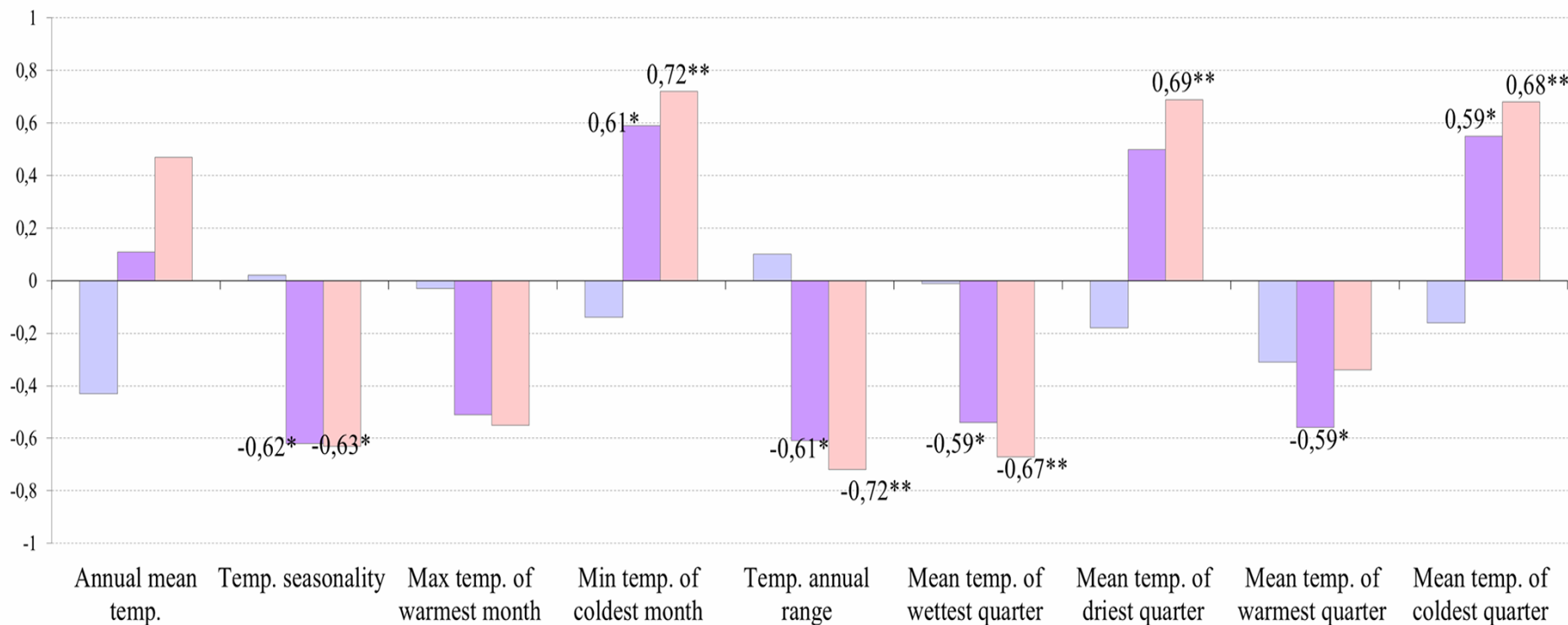
Dominujące gatunki w populacji *Fusarium* spp. na terenie Polski w 2015.



Stwierdzono istotne różnice pomiędzy genotypami i lokalizacjami dla zasiedlenia prób ziarna przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

Wykazano, że dopiero na podstawie danych historycznych warunków meteorologicznych można wnioskować o ich wpływie na populacje patogena

Correlation coefficient value



■ *F. verticillioides* ■ *F. temperatum* ■ *F. subglutinans*

Cel główny badań

Celem prowadzonych badań jest identyfikacja cech morfologicznych pełniących ważną rolę w procesie odpornościowym kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi powodowanych przez grzyby rodzaju *Fusarium* spp.



Cele szczegółowe na 2016 rok

Lp.	CEL	Czy cel został zrealizowany
1	Identyfikacja cech fenotypowych roślin pełniących ważną rolę w procesie odpornościowym kukurydzy na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi	TAK
2	Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg (Cykl I)	TAK
3	Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg wspomaganą opisem cech fenotypowych roślin (Cykl II)	TAK

Zakres merytoryczny zadania został osiągnięty poprzez:

Temat badawczy 1

- **Identyfikacja cech fenotypowych pełniących ważną rolę w procesie odpornościowym kukurydzy na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi**

Temat badawczy 2

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia zkażanych sztucznie kolb (Cykl I)**

Temat badawczy 3

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg wspomaganą opisem cech fenotypowych roślin (Cykl II)**

Cel Tematu badawczego 1

Charakterystyka pokoleń F_1 oraz ich form rodzicielskich pod względem stopnia odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych oraz opis wybranych cech fenotypowych roślin potencjalnie mających wpływ na rozwój chorób

Cele zostały osiągnięte w 100%

Czyli: interakcja gospodarz x patogen

Mierniki dla Tematu badawczego 1

➤ *interakcja gospodarz x patogen*

Lp.	miernik	wartość miernika planowana	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba testów fitopatologicznych polowych	2	2
2	Liczba badanych genotypów	38	38
3	Liczba opisanych cech fenotypowych	8	8
4	Liczba prób przebadanych na zawartość DON	228	228

Opis cech morfologicznych i fenologicznych gospodarza

- **wczesność (liczba dni od daty siewu do daty kwitnienia kwiatostanów męskich,**
- **morfologia kwiatostanów żeńskich:**
- **długość kolby (cm),**
- **długość kanału od końca rdzenia kolby do końca liści okrywowych (cm),**
- **długość słupków nie pokrytych liśćmi okrywowymi (cm),**
- **zbitość liści okrywowych (skala 1 – 5; 1 luźne)**
- **zawartość antocyjanu w słupkach, rdzeniu kolby i łodygach (skala 1- 5, w której 1 oznacza brak antocyjanu, 3 – formy pośrednie, 5 – intensywne zabarwienie)**
- **wysokość roślin**
- **typ ziarna**



Temat badawczy 1 – interakcja genotyp x patogen

Testy fitopatologiczne – in vivo

Fuzarioza kolb

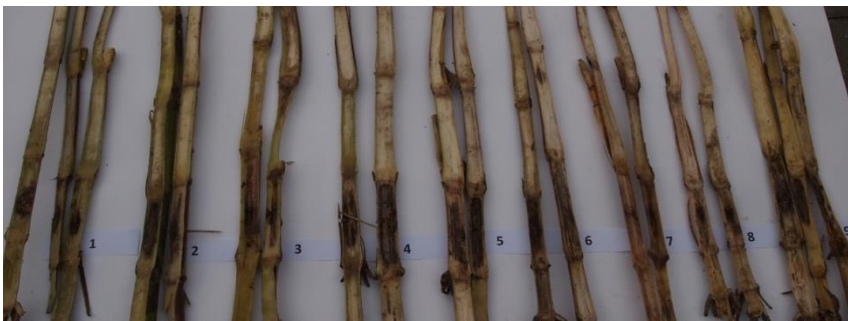
- namnażanie grzyba – pożywka PDA
- przygotowanie zawiesiny zarodników - inokulum
- zakażenia sztuczne - inokulacja - 10-12 dni od kwitnienia kwiatostanów męskich
- ocena fenotypowa porażenia kolb - w skali 1-7



Zgorzel podstawy łodygi

- namnażanie grzyba – na patyczkach (odkażane w wysokiej temperaturze), na których rósł grzyb *F. graminearum* przez okres ok. 2 tygodni.
- zakażenia sztuczne – pomiędzy 2 i 3 międzywęźlem
- ocena fenotypowa łodyg w skali 1-9

Ocena fenotypowa porażenia łodyg oraz kolb prowadzona była w fazie dojrzałości pełnej.



Z1. Cel 1: Morfologia roślin – fuzarioza kolb

Oznaczanie zawartości DON



1g mąki +40 ml buforu



Wytrząsanie - 4 min



Filtrowanie 4ml roztworu



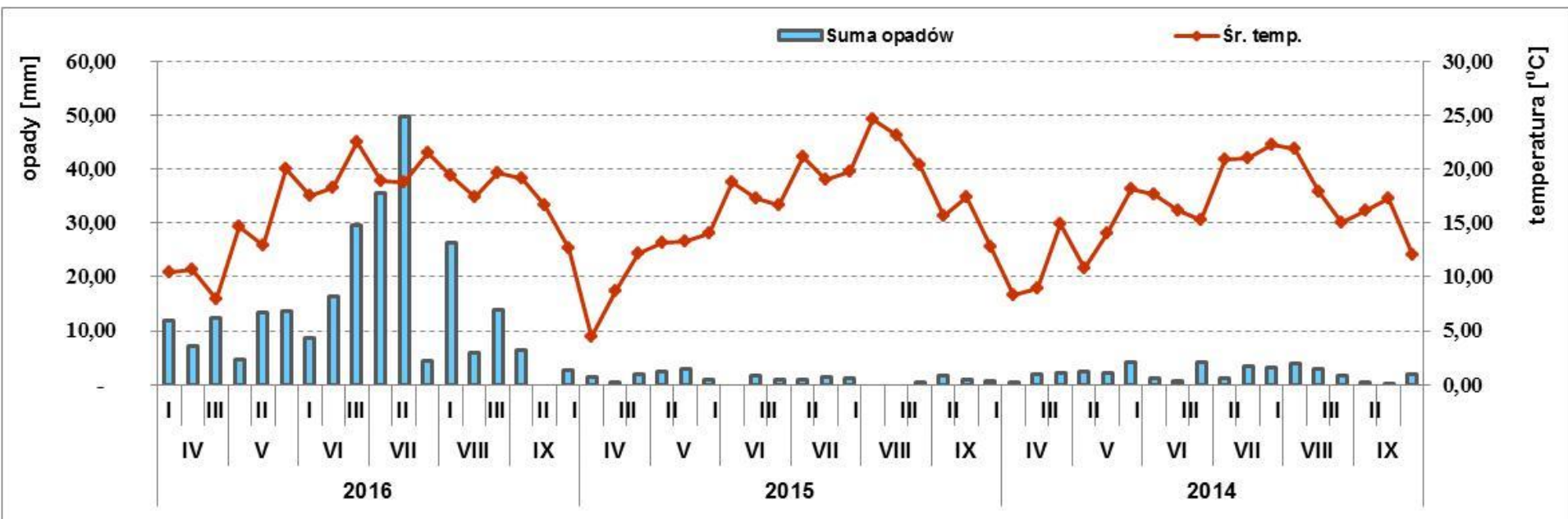
Odczyt zawartości DON



100µl przesącza na pasek testowy – 5 min



Rys. 1. Średnie dekadowe temperatury powietrza oraz suma opadów (kwiecień - wrzesień) w roku 2016 na tle lat 2015 – 2014.



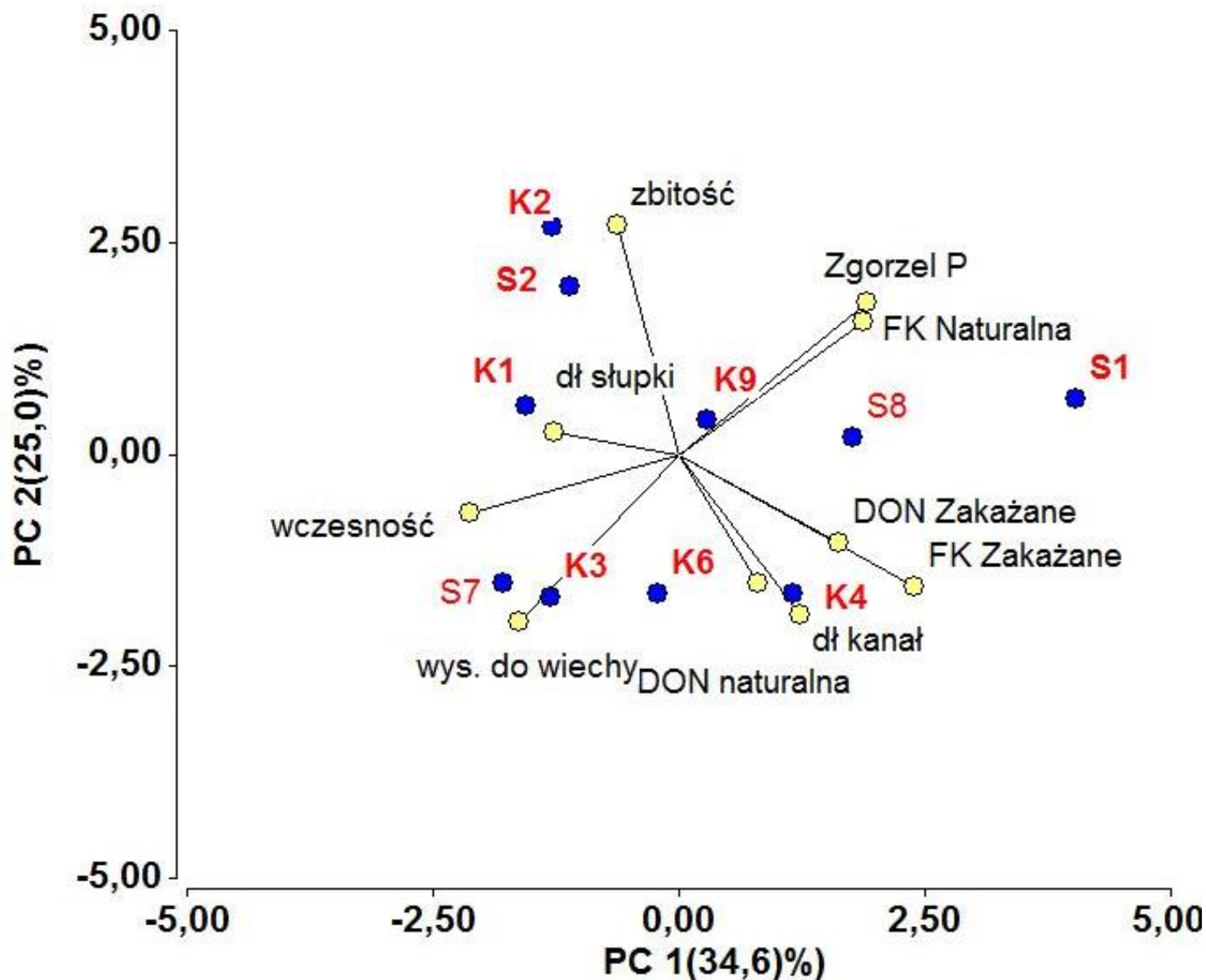
WYNIKI - Temat badawczy 1

Wykazano istotne statystycznie wartości korelacji prostych pomiędzy określonymi cechami morfologicznymi kolby, ocenami fenotypowymi fuzariozy kolb, zawartością DON w ziarnie przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych dla linii (jako zestawu różnicującego)

ZMIENNA		zakażenia sztuczne		infekcja naturalna		zgorzel podstawy
		FK	DON	FK	DON	
zakażenia sztuczne	DON	0,71				
infekcja naturalna	FK	0,41				
	DON	0,46				
zgorzel podstawy				0,57		
wysokość rośliny						-0,81
wczesność		-0,53		-0,6		-0,57
morfologia kolby	zbitość liści okrywowych*	-0,55	-0,53			
	długość słupków (cm)	-0,43				
	długość kanału (cm)	0,63			0,58	

* zbitość liści okrywowych opisana w skali 1-3, gdzie 3 oznacza dużą zbitość

Relacje pomiędzy liniami różnicującymi (oraz rodzicielskimi mieszańców) w układzie składowych głównych ; oraz współzależności pomiędzy badanymi cechami a stopniem odporności i zawartością DON



- Efekty heterozji dla FK, DON, ZP oraz cech morfologicznych i fenologicznych roślin wpływających na porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium* spp.
- wariant: dwie formy rodzicielskie podatne
- $H > 35\%$

		Wczesność*	zakażane sztucznie		zgorzel podstawy	wys. do wiechy	Morfologia		
			FK	DON			zbitość liści okryw.	dł słupki	dł kanału
1	F27	88,33	3,4	13,01	4,2	241	4,0	9,5	5,1
	K6	101,67	5,1	154,67	3,47	203	3,2	5,3	3,3
	K4	92,67	5,8	42,43	5,4	204	3,7	7,3	9,1
	efekt heterozji w stosunku do średniej	-9,1%	-38,6%	-86,8%	-5,3%	18,3%	15,3%	51,5%	-17,0%
2	F28	92,67	2,4	8,08	3,87	241	4,0	10,7	4,2
	K4	92,67	5,8	42,43	5,4	204	3,7	7,3	9,1
	K6	101,67	5,1	154,67	3,47	203	3,2	5,3	3,3
	efekt heterozji w stosunku do średniej	-4,6%	-56,1%	-91,8%	-12,7%	18,4%	15,3%	70,1%	-32,3%

- Efekty heterozji dla FK, DON, ZP oraz cech morfologicznych i fenologicznych roślin wpływających na porażenia grzybami z rodzaju Fusarium spp.
- Wariant: oba komponenty należały do grupy średnioodpornych
- H < 20%, średnio H=-11%
- Nie stwierdzono różnic, czy komponentem rodzicielskim matecznym była forma podatna / o podwyższonej odporności czy forma ojcowska.

		Wczesność*	Zakażane sztucznie		Zgorzel podstawy	wys.	Morfologia		
			FK	DON			zbitość liści okryw.	dł słupki	dł kanału
1	F29	100	2,9	23,89	5,33	208			
	K1	100	3,9	84,6	3,92	174	4,0	8,3	3,5
	K2	100	2,9	20	6,36	163	5,0	7,3	3,7
	efekt heterozji	0,0%	-13,9%	-54,3%	3,7%	23,6%			
2	F30	98,67	2,9	6,73	5,53	208			
	K2	100	2,9	20,00	6,36	163	5	7,28	3,69
	K1	100	3,9	84,60	3,92	174	4	8,28	3,47
	efekt heterozji	-1,3%	-13,1%	-87,1%	7,6%	23,6%			

●Komponenty wariancyjne met. MIVQUE(0) oraz współczynniki odziedziczalności odporności na fuzariozę kolb, zawartości DON, zgorzel podstawy łodygi oraz cech morfologicznych i fenologicznych roślin wpływających na porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium* spp

	zakażenia sztuczne		Infekcja naturalna	Zgorzel P	wysokość rośliny	Morfologia kolby		
	FK	DON	FK			zbitość	dł słupki	dł kanał
1R1	0,010	1587,910	0,067	2,602	90,943	0,141	3,299	3,701
2R2	0,230	186,660	0,040	1,642	37,414	0,050	1,347	0,656
Błąd	0,281	3363,950	0,065	7,346	24,654	0,324	0,390	5,100
n	30	30	30	30	30	24	30	30
h^2_{ns}	0,963	0,941	0,980	0,945	0,994	0,934	0,997	0,962

Wnioski – temat badawczy 1

- Po zakażeniach sztucznych współzależności pomiędzy ocenami fenotypowymi a zawartością DON były wysoko istotne, dodatnie ($0,77^{***}$, $p=0,001$).
- Jeżeli dwa komponenty rodzicielskie były podatne lub bardzo podatne na fuzariozę kolb (oceny fenotypowe) to efekt heterozji dla tej cechy był wysoki (powyżej 30% dla ocen fenotypowych)
- Jednen z komponentów rodzicielskich był podatny na fuzariozę kolb a drugi scharakteryzowano jako o podwyższonej odporności - efekt heterozji w zakresie 20% - 30%.
- W grupie kombinacji gdy oba komponenty należały do grupy średnioodpornych to efekt heterozji nie przekraczał wartości $H=-20\%$
- Nie stwierdzono różnic, czy komponentem rodzicielskim matecznym była forma podatna / o podwyższonej odporności czy forma ojcowska.
- Współczynniki odziedziczalności w wąskim sensie zarówno dla stopnia odporności na fuzariozę kolb określoną na podstawie ocen fenotypowych jak i na podstawie zawartości DON w próbach ziarna jak i cech fenotypowych i fenologicznych roślin z nią powiązanych były wysokie: wartość h^2_{ns} w zakresie 0,937 – 0,980
- Najlepszym wskaźnikiem stopnia odporności na fuzariozę kolb jest zawartość DON a cechy fenotypowe mogą wspomagać proces selekcji
- Długość kanału od rdzenia do końca liści okrywowych oraz długość słupków statystycznie istotnie wpływała na porażenie kolb





Temat badawczy 2

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia zakażanych sztucznie kolb (Cykl I)**

Lp.	miernik	wartość miernika planowana	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba linii pokoleń S2 i S3	950	950
2	Liczba roślin badanych w obrębie linii pokoleń S2 i S3	średnio 2-3	2-3
3	Liczba linii pokoleń S4	200	200
4	Liczba prób przebadanych na zawartość DON	80	80

Temat badawczy 2

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia zakażanych sztucznie kolb (Cykl I)**

Materiał roślinny

- **200 linii pokoleń S4, oraz 950 linii pokoleń S2, S3. Linie S2 (450 linii) i S3 (500 linii)**
- **potomstwo zapylanych wsobnie roślin, których kolby zakażano sztucznie grzybem *F. graminearum*, a następnie na podstawie ocen porażenia wytypowano do dalszych badań jako potencjalne źródła odporności w latach poprzednich.**

Temat badawczy 2

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia zakażanych sztucznie kolb (Cykl I)**

Metody

- **Kolby zakażane** zawiesiną zarodników grzyba *F. graminearum* (zgodnie z metodyką opisaną dla Tematu badawczego 1; średnio 2–3 rośliny w obrębie każdej linii pokoleń S_2 i S_3).
- **Ocena odporności** na fuzariozę kolb w fazie dojrzałości pełnej - rośliny, których stopień porażenia kolb oceniony został w zakresie 2–3 (poniżej 10% ziarniaków z objawami porażenia) wytypowano jako potencjalne źródła odporności i włączone do badań w roku następnym.
- Ponieważ w bieżącym roku nasilenie choroby było bardzo duże, dla niektórych populacji zbierano kolby również przy ocenie 4 (jako rezerwa).

WYNIKI – Temat badawczy 2

Efektywność selekcji w obrębie pokoleń S_2 i S_3 - różnice świadczą jaki postęp biologiczny można uzyskać dla fuzariozy kolb poprzez selekcję cykliczną

pokolenie	liczba roślin włączonych do badań	liczba roślin ocenionych po zakażeniu kolb	liczba roślin o podwyższonej odporności	efektywność selekcji (%)
S_3	1050	863	459	53,2
S_2	870	737	227	30,8

WYNIKI – Temat badawczy 2

Liczba obiektów pokolenia S4 scharakteryzowanych jako wysokoodporne, o podwyższonej odporności, średniopodatne i podatne na podstawie ocen fenotypowych stopnia porażenia po zakażeniach sztucznych (200 obiektów) oraz na podstawie zawartości DON (80 obiektów)

grupa	zakres ocen fenotypowych	liczba obiektów na podstawie ocen fenotypowych	grupa na podstawie zawartości DON (mg/kg)					Razem
			wysoko odporne	podwyż. odporność	średnio odporne	średnio podatne	podatne	
			<100	100-200	201-300	301-400	>400	
wysokoodporne	1,1 - 2,0	24	5	-	1	-	-	6
o podwyższonej odporności	2,1 - 3,0	71	16	9	9	2	5	41
średnioodporne	3,1 - 4,0	55	6	7		2	7	22
średniopodatne	4,1 - 5,0	37	1	1	5	3	1	11
podatne	5,1 - 6,0	13	-	-	-	-	-	0
Razem		200	28	17	15	7	13	80

WYNIKI – Wnioski Temat badawczy 2

- **Wykorzystanie w programach hodowlanych form o podwyższonej odporności i niskiej zdolności do kumulacji toksyn w ziarnie i osadkach pozwala uzyskać postęp hodowlany dla tych cech.**
- **Najlepszym wskaźnikiem stopnia odporności na fuzariozę kolb jest zawartość DON w osadkach a cechy fenotypowe mogą wspomagać proces selekcji**

- Wstępnie można stwierdzić, że uwzględniając tylko oceny fenotypowe stopnia porażenia kolb, metoda rodowodowa może pozwolić na uzyskanie postępu biologicznego dla stopnia odporności na fuzariozę kolb. Dobór form rodzicielskich jest to proces długotrwały, musi być prowadzony po zakażeniach sztucznych *Fusarium graminearum* i na przestrzeni wielu lat.
- Efektywność jest różna w zależności od populacji – i dlatego najważniejszym etapem jest właściwy wybór form rodzicielskich

Temat badawczy 3

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg wspomaganą opisem cech fenotypowych roślin (Cykl II)**

Lp.	miernik	wartość miernika planowana	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba populacji S0 w badaniach nad fuzariozą kolb	75	75
2	Liczba populacji S0 w badaniach nad zgorzelą podstawy łodygi	75	75
3	Liczba opisanych cech fenotypowych + odporność	5	5

Cel tematu badawczego

- **Celem tematu jest określenie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny porażenia kolb lub łodyg po zakażeniach sztucznych wspomaganą opisem cech fenotypowych roślin w obrębie populacji S0**

Temat badawczy 3

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg wspomaganą opisem cech fenotypowych roślin (Cykl II)**

Materiał roślinny

- **Do badań mających na celu określenie efektywności poszukiwania źródeł odporności na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi metodą rodowodową, w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg oraz cechy fenotypowe roślin włączono:**
- **75 populacji S0 do badań nad fuzariozą kolb oraz**
- **75 populacji S0 do badań nad zgorzelą podstawy łodygi (m. in. rozmnożone w roku ubiegłym pokolenie F1).**

W obrębie każdej populacji uwzględniono średnio 10 roślin w każdym bloku (osobno dla badań nad fuzariozą kolb i zgorzelą podstawy łodygi).

Temat badawczy 3

- **Badanie efektywności poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny stopnia porażenia kolb lub łodyg wspomaganą opisem cech fenotypowych roślin (Cykl II)**

Metody

- **Opis cech fenotypowych roślin**
- **W opisie uwzględniono następujące cechy: (1) wczesność, (2) typ ziarna, (3) długość kanału od końca rdzenia kolby do końca liści okrywowych (4) zawartość antocyjanu w kolbie: słupkach, rdzeniu (5) zawartość antocyjanu w łodydze**

Testy fitopatologiczne – jak poprzednio

Wyniki

Populacje włączone do badań były bardzo podatne na porażenie *F. graminearum*.

- Oceniano 674 roślin – dla 65 stopień porażenia oceniono na 2 lub 3 (do 10% powierzchni z objawami choroby) co jest założeniem, że takie obiekty są typowane są do dalszych badań. (co stanowi 10% badanych)
- Dlatego podjęto decyzję, że również kolby, których porażenie oceniono na 4 (25% powierzchni z objawami choroby) były zbierane (ze 115 roślin).
- W badaniach nad zgorzelą podstawy łodygi łącznie oceniano 745 roślin i do dalszych badań wytypowano 549 (stopień odporności na zgorzel podstawy łodygi po zakażeniach sztucznych oceniony w zakresie 2 – 5 w skali 1 – 9, a fuzarioza kolb przy infekcji naturalnej oceniona na 2 lub 3).
- Opisuując morfologię kolb stwierdzono istotne różnice pomiędzy populacjami dla długości słupków, kanału od końca rdzenia do końca liści okrywowych oraz długości kolbowej.

pokolenie	liczba roślin ocenionych po zakażeniu	liczba roślin o podwyższonej odporności	efektywność selekcji (%)
S₀ FK	674	65	9,6
S₀ ZP	745	549	74,7



**Dziękuję
za uwagę**

