

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 33.

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

Kierownik zadania: *dr hab. E. Kochańska-Czembor prof. IHAR-PIB*

#### Cel:

Identyfikacja cech morfologicznych i fenologicznych warunkujących odporność kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi oraz określenie ich efektywności w programach poszukiwania źródeł odporności na badane choroby.

Zakres merytoryczny zadania został osiągnięty przez realizację 3 tematów badawczych:

Temat badawczy 1. Identyfikacja cech morfologicznych i fenologicznych warunkujących odporność kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi.

#### Cele tematu badawczego 1

- (1) wykazanie różnic dla stopnia odporności linii podatnych i odpornych na fuzariozę kolb na podstawie dynamiki rozwoju choroby na przestrzeni czasu, zdolności do akumulacji toksyn na przestrzeni czasu i na podstawie odporności słupków na degradację po zakażeniach sztucznych oraz określenie współzależności pomiędzy tymi cechami a innymi cechami fenologicznymi i morfologicznymi roślin;
- (2) wykazanie różnic dla stopnia odporności linii podatnych i odpornych na zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych oraz określenie współzależności pomiędzy odpornością a innymi cechami fenologicznymi i morfologicznymi roślin.

#### Materiały i metody

Do badań włączono linie wsobne o zróżnicowanej odporności na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi: podatne i o podwyższonej odporności. W doświadczeniu założonym do badań nad fuzariozą kolb opisano morfologię kwiatostanów żeńskich (długość kolby, długość kanału słupków, długość osłupków nie pokrytych liśćmi okrywowymi, zawartość antocyjanu w słupkach). Genotypy reprezentowały 3 grupy wczesności. Kolby zakażano sztucznie poprzez iniekcję 1 ml zawiesiny zarodników *F. graminearum* a rośliny kontrolne, poprzez iniekcję wody destylowanej, 7–10 dni od daty kwitnienia. Ocenę stopnia porażenia kolb prowadzono w skali 1 - 7 w 4 terminach (od fazy dojrzałości mleczno-woskowej do fazy dojrzałości pełnej). Po ocenie, kolby zbierano, młócono, ziarno i osadki osobno mielono i przygotowywano próby do oznaczeń zawartości DON. W badaniach nad zgorzelą podstawy łodygi zakażano sztucznie łodygi patyczkami na których rośl grzyb *F. graminearum* przez okres ok. 2 tygodni. Łodygi były nakłuwane pomiędzy 2 a 3 międzywęźlem. Łodygi roślin kontrolnych były nakłuwane patyczkami czystymi. Porażenie łodyg i kolb oceniano w skali 1 – 9 w fazie dojrzałości pełnej, a następnie kolby zbierano, młócono i jak poprzednio przygotowywano próby mąki z ziarna i rozdrobnionych osadek do oznaczeń zawartości DON. Analizy zawartości DON dokonano za pomocą aparatu RIDA QUICK SCAN (analiza na bazie testu immunoenzymatycznego ELISA).

Dodatkowo w badaniach nad fuzariozą kolb określono odporność słupków na degradację w warunkach laboratoryjnych. W okresie kwitnienia kwiatostanów żeńskich pobrane zostały próby słupków i wyłożone na ligninę w szalkach, a następnie spryskane zawiesiną zarodników (kontrolne wodą) w warunkach laboratoryjnych. Po 10 dniach słupki zostały wysuszone w temp. 40°C a o odporności na degradację świadczyła różnica wagi pomiędzy kontrolą a tymi, na których rosła grzybnia grzyba.

Monitorując przebieg warunków atmosferycznych wykorzystano pomiary temperatury powietrza na wysokości 2 m nad gruntem oraz pomiary opadów od daty kwitnienia kwiatostanów męskich do fazy dojrzałości pełnej.

#### Wyniki i Dyskusja

W badaniach nad fuzariozą kolb stwierdzono istotne zróżnicowanie pomiędzy elitarnymi liniami wsobnymi zarówno pod względem cech morfologicznych i fenologicznych jak i stopnia odporności na fuzariozę kolb na przestrzeni czasu, kinetyki gromadzenia deoksyniwalenolu w ziarnie oraz odporności słupków na degradację w warunkach *in vitro*.

Średnio, po zakażeniach sztucznych nasilenie choroby było o 3 stopnie wyższe niż przy infekcji naturalnej. Zakres zmienności dla stopnia porażenia kolb zakażanych sztucznie wahał się od 2,0 do

5,53. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że zarówno przy infekcji naturalnej jak i po zakażeniach sztucznych kolb zawartość DON w osadkach kolb była znacznie wyższa niż w próbach ziarna. Przy infekcji naturalnej, w próbach ziarna pobranych z roślin na początku fazy mleczno-woskowej, później mleczno-woskowej i wioskowej (odpowiednio termin 1, 2 i 3) nie stwierdzono zawartości DON, a w próbach pobranych w fazie dojrzałości pełnej zawartość tej toksyny była niska (średnio 0,4 ppm). W próbach ziarna pobranych z zakażonych sztucznie kolb zawartość DON była znacznie wyższa, i w zależności od terminu zbioru wahała się średnio w zakresie 9,2 (początek fazy mleczno-woskowej) do 74,8 ppm (faza dojrzałości pełnej). W zależności od genotypu zakres zmienności zawartości DON w próbach ziarna pobranych z roślin w fazie dojrzałości pełnej wahał się od 0,0 do 252,5 ppm. W osadkach pobranych z roślin rosnących przy infekcji naturalnej zawartość DON w fazie dojrzałości wioskowej wahała się w zakresie od 0,0 do 23,9 ppm a w fazie dojrzałości pełnej od 4,8 do 113,3 ppm, Wysoką zawartość DON w osadkach kolb zakażonych sztucznie stwierdzono już na początku fazy mleczno-woskowej roślin (w zależności od genotypu od 8,8 do 304,0 ppm). W fazie dojrzałości pełnej zakres zmienności dla zawartości DON w osadkach był bardzo szeroki od 12,6 do 1522,8 ppm (świadczą to o istotnym wpływie genotypu na tę cechę). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że próby ziarna pobrane z linii najbardziej odpornej nie były skażone DON nawet po zakażeniach sztucznych. Na przykładzie linii najbardziej podatnej stwierdzono, że akumulacja DON w ziarnie rozpoczęła się już po upływie 20 dni od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich (pomiędzy 1 i 2 terminem ocen) a największy wzrost zawartości tej toksyny zaobserwowano po upływie 50 dni od daty kwitnienia. Badania dotyczące dynamiki gromadzenia fumonizyny FB<sub>1</sub> prowadzone przez Wit i in. (2010) wykazały, że istotny wzrost zawartości tej toksyny zaobserwowano w okresie późniejszym, po 35 dniu od zakażeń sztucznych *F. verticillioides*. Natomiast największy wzrost zawartości nastąpił podobnie jak w bieżących badaniach - po upływie 49 dni. W pracy Wit i in. (2010) współzależności pomiędzy stopniem porażenia kolb a poziomem skażenia prób ziarna fumonizynami były dodatnie. Również w bieżącej pracy współzależności pomiędzy stopniem porażenia linii podatnej przez *F. graminearum* a poziomem skażenia prób ziarna pobranych z tej linii DON były dodatnie. Perkowski i in. (1991) opisali dodatnie współzależności pomiędzy skażeniem ziarna pszenicy DON a liczbą ziaren porażonych przez *F. graminearum*.

Współzależność pomiędzy stopniem porażenia kolb przez *F. graminearum* a poziomem skażenia prób ziarna i osadek była dodatnia i statystycznie istotna. Wykazano również dodatnie współzależności pomiędzy ocenami fenotypowymi fuzariozy kolb, zawartością DON w ziarnie i osadkach a długością znamion słupków, które nie były przykryte liśćmi okrywowymi. Ujemne współzależności wystąpiły pomiędzy ocenami fenotypowymi fuzariozy kolb, zawartością DON w ziarnie i osadkach a zawartością antocyjanu w znamionach słupków.

W badaniach nad zgorzelą podstawy łodygi zarówno przy infekcji naturalnej jak i po zakażeniach sztucznych łodyg stwierdzono istotne różnice dla stopnia odporności na fuzariozę kolb jak i na zgorzel podstawy łodygi. Jednak ze względu na duże występowanie omacnicy proso-wianki wyniki nie były powtarzalne. Wstępnie można potwierdzić, że metoda zakażeń sztucznych łodyg była skuteczna i istotnie wpłynęła na stopień porażenia łodyg. Kolby roślin, których łodygi były zakażane sztucznie były bardziej porażone w stosunku do roślin kontrolnych.

#### Wnioski

1. Stwierdzono istotny wpływ terminu oceny oraz genotypu na stopień porażenia roślin. Zarówno po zakażeniach sztucznych jak i przy infekcji naturalnej w miarę upływu czasu nasilenie choroby rosło, jednak przy infekcji naturalnej różnice były niewielkie.
2. Stwierdzono istotny wpływ genotypu i terminu zbioru prób ziarna na poziom ich skażenia deoksyniwaleolem na przestrzeni czasu.
3. Stwierdzono dodatnią współzależność pomiędzy stopniem odporności roślin na porażenie przez *F. graminearum* a poziomem skażenia prób ziarna pobranych w poszczególnych terminach.
4. Wykazano również dodatnie współzależności pomiędzy ocenami fenotypowymi fuzariozy kolb, zawartością DON w ziarnie i osadkach a długością znamion słupków, które nie były przykryte liśćmi okrywowymi.
5. Ujemne współzależności wystąpiły pomiędzy ocenami fenotypowymi fuzariozy kolb, zawartością DON w ziarnie i osadkach a zawartością antocyjanu w znamionach słupków.
6. Stwierdzono duże różnice pomiędzy genotypami dla zawartości suchej masy w zielonej masie znamion słupków.

## Literatura

Czembor E., Matusiak M. Dynamika rozwoju fuzariozy kolb powodowanej przez *Fusarium graminearum* oraz kinetyka gromadzenia deoksyniwalenolu w ziarnie na przestrzeni czasu. Biul. IHAR. w recenzji.

Czembor E., Matusiak M., Ochodzki P. 2013a. Odporność mieszańców kukurydzy na fuzariozę kolb przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych *Fusarium graminearum* i *F. verticillioides* w Polsce w latach 2008–2009. Biuletyn IHAR 270, 55-73.

Czembor E., Matusiak M., Warzecha R. 2013b. Poszukiwanie źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi metodą rodowodową. Biuletyn IHAR 269: 123-139.

Waśkiewicz A., Wit M., Goliński P., Chełkowski J., Warzecha R., Ochodzki P., Wakuliński W. 2012. Kinetics of fumonisin B<sub>1</sub> formation in maize ears inoculated with *Fusarium verticillioides*. Food Addit. Cont. 29(11): 1752–1761.

Wit M., Ochodzki P., Warzecha R., Wakuliński W. 2007. Znaczenie *Fusarium Verticillioides* (Sacc.) Nirenberg w etiologii fuzariozy kolb kukurydzy. Biuletyn IHAR 245: 171-180.

Wit M., Waśkiewicz A., Goliński P., Chełkowski J., Warzecha R., Ochodzki P., Wakuliński W. 2010. Występowanie fumonizyny w ziarniakach i rdzeniach kolb kukurydzy inokulowanych *Fusarium Verticillioides*. Prog. Plant Protection/ Post. Ochr. Roślin 50(4): 1832-1836.

Temat badawczy 2. Określenie efektu połączenia kilku cech, potencjalnie świadczących o stopniu odporności na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi w jednym genotypie oraz określenie wpływu form ojcowskich i matczyńskich na stopień odporności potomstwa – określenie efektu addytywnego i ogólnej zdolności kombinacyjnej dla fuzariozy kolb i zgorzeli podstawy łodygi,

Cele szczegółowe realizowane w bieżącym roku to uzyskanie pokolenia F<sub>1</sub> metodą krzyżowań prostych pomiędzy liniami podatnymi i odpornymi osobno na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi, które będzie postawą do realizacji tematu w kolejnych latach

### Materiały i metody

W krzyżowaniach uwzględniono elitarne linie wsobne, których pierwsza grupa została scharakteryzowana w ramach zadania 1 w bieżącym sezonie wegetacyjnym, a druga grupa zostanie scharakteryzowana w sezonie wegetacyjnym 2015.

Zarówno do badań nad fuzariozą kolb jak i nad zgorzelą podstawy łodygi, krzyżowania prowadzono w układach: podatna x podatna, podatna x o podwyższonej odporności, o podwyższonej odporności x podatna, o podwyższonej odporności x o podwyższone odporności. Uwzględniono również zróżnicowanie morfologiczne roślin pod względem cech potencjalnie świadczących o stopniu odporności.

### Wyniki i Dyskusja

Wprawdzie łącznie wykonano 56 krzyżowań, jednak ze względu na fakt, że w obrębie niektórych kombinacji nie uzyskano wystarczającej liczby nasion, krzyżowania będzie należało powtórzyć, lub zastąpić innymi. Innym ograniczeniem, uniemożliwiającym prowadzenie krzyżowań w układzie każda linia z każdą, stał się fakt, że należy uwzględnić nie tylko zróżnicowanie dla stopnia odporności na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi oraz cech morfologicznych, które potencjalnie mogą o tym świadczyć, ale również pochodzenie materiału tzn: stworzyć osobne bloki dla materiałów o typie ziarna szklistym, zębokształtnym, IDT i Lancaster. Krzyżowania dodatkowe zostaną przeprowadzone w Meksyku w sezonie wegetacyjnym 2014/2015 a pokolenie F<sub>1</sub> włączone do badań w kolejnym sezonie wegetacyjnym 2015 w warunkach Polski.

Brak jest doniesień literaturowych w zakresie uzyskania ewentualnego efektu heterozji dla stopnia odporności na fuzariozę kolb lub zgorzel podstawy łodygi oraz cech morfologicznych, które mogą o tym świadczyć czy zdolności kombinacyjnej.

Temat badawczy 3 Określenie efektywności zidentyfikowanych cech morfologicznych roślin mogących pełnić rolę w procesie odpornościowym kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi w programach poszukiwania źródeł odporności na badane choroby

Celem tematu jest porównanie efektywności poszukiwania źródeł odporności na FK i ZP metodą rodowodową tylko na podstawie ocen fenotypowych stopnia odporności z efektywnością poszukiwania źródeł odporności na FK i ZP w oparciu o oceny fenotypowe stopnia odporności i o cechy morfologiczne roślin

### Materiały i metody

Materiałem roślinnym były linie pokolenia S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> oraz populacje pokolenia S<sub>0</sub>. Łącznie wysiano w siewie rzędownym 1888 linii pokolenia S<sub>2</sub> oraz 583 linie pokolenia S<sub>1</sub>, które zostały wytypowane jako potencjalne źródła odporności w sezonie wegetacyjnym 2012 i 2014. Najwcześniej kwitnące

rośliny zostały zaizolowane i zapylone wsobnie. W badaniach nad fuzariozą kolb były one zakażone zawieszoną zarodników grzyba *F. graminearum* (zgodnie z metodyką opisaną dla tematu 1; średnio minimum 3 rośliny w obrębie każdej linii pokoleń S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> oraz 25 w obrębie populacji S<sub>0</sub>). Oceniano fenotypowo stopień odporności na fuzariozę kolb w fazie dojrzałości pełnej (wykorzystując skalę bonitacyjną 1 – 7). W badaniach nad zgorzelą podstawy łodygi zakażano sztucznie łodygi zapylonych wsobnie roślin (zgodnie z metodyką opisaną w temacie 1). Dodatkowo w bieżącym roku wykonano krzyżowania proste, uzyskano pokolenie F<sub>1</sub>, które po rozmnożeniu w roku następnym będzie materiałem wyjściowym do dalszych badań nad efektywnością poszukiwania źródeł odporności w oparciu o oceny fenotypowe stopnia odporności oraz cechy morfologiczne roślin, zidentyfikowane w trakcie realizacji Zadania 1 i 2 jako te, które potencjalnie na nią wpływają.

#### Wyniki i Dyskusja

Łącznie do badań włączono 1888 linii pokolenia S<sub>2</sub> oraz 583 linie pokolenia S<sub>1</sub>. Rośliny, których stopień porażenia kolb po zakażeniach sztucznych kolb oceniony został w zakresie 2–3/4 (poniżej 10% ziarniaków z objawami porażenia) wytypowane zostały jako potencjalne źródła odporności na fuzariozę kolb, natomiast rośliny, których stopień porażenia łodyg po zakażeniach sztucznych oceniono w zakresie 1 – 4 (w skali 1 – 9) wytypowane zostały jako potencjalne źródła odporności na zgorzel podstawy łodygi. Wysokie temperatury w drugiej połowie lipca (maksymalne powyżej 35°C) spowodowały, że efektywność zapyleń w grupie materiałów średnio późnych i późnych była niska. Jest to spowodowane m. in. faktem, że uzyskano duży postęp hodowlany pod względem redukcji wielkości wiechy kwiatostanów męskich, które m. in. zacierają łan. Wraz z uwsobnieniem materiału, redukcja wiech pogłębia się. Łącznie z grupy roślin pokolenia S<sub>1</sub> do dalszych badań wytypowano 316 roślin jako pokolenie S<sub>2</sub> oraz z pokolenia S<sub>2</sub> - 1430 roślin jako pokolenie S<sub>3</sub>.

Brak jest w literaturze doniesień opisujących skuteczność metody rodowodowej w poszukiwaniu źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi. Efektywność tej metody została opisana dla materiałów wykorzystywanych w Ameryce Północnej i Południowej. W ramach projektów realizowanych w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie – PIB w latach 2002–2005 wykazano wstępnie, że metoda rodowodowa umożliwia uzyskanie postępu biologicznego dla stopnia odporności na te choroby (Czembor i in., 2005, 2011a, 2011b, 2013a). Jednak w żadnej z tych prac nie uwzględniono cech morfologicznych roślin, potencjalnie świadczących o stopniu odporności na badane choroby, co jest planowane do realizacji w kolejnych latach.

#### Wnioski

1. Metoda rodowodowa pozwala na uzyskanie postępu biologicznego dla stopnia odporności na fuzariozę kolb po zakażeniach sztucznych
2. W kolejnych latach realizacji projektu należy zwrócić uwagę na fakt, że okres kwitnienia kwiatostanów męskich uległ znacznemu skróceniu.

#### Literatura

- Czembor E., Warzecha R., Adamczyk J., Kurczych Z. 2005. Wytwarzanie materiałów wyjściowych kukurydzy o podwyższonej odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi. Biuletyn IHAR 236: 203-213.
- Czembor E., Presello D., Adamczyk J., Wójcik K. 2011a. Enhancing disease resistance to *Fusarium* by using exotic genotypic variability” Book of Abstracts ISM Conference “Strategies to reduce the impact of mycotoxins in a global context”, 18-18.11, p. 116.
- Czembor E., Presello D., Warzecha R., Adamczyk J., Wójcik K. 2011b. Responses of pedigree selection for ear and stalk rot resistance in F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> generations of maize. Book of Abstracts Conference “Sustainable use of pesticides and integrated pest management in East-Central Europe and the Baltics”, Radzikow, Poland, 4-6. 09.2011, p. 63
- Czembor E., Matusiak M., Warzecha R. 2013a. Poszukiwanie źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodyg metodą rodowodową. Biuletyn IHAR, 269: 123-139.