

ELŻBIETA CZEMBOR
MAGDALENA MATUSIAK
ROMAN WARZECHA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Radzików

Poszukiwanie źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodyg metodą rodowodową*

Looking for sources of resistance to ear rot and stalk rot on the basis of the pedigree selection

Fuzarioza kolb kukurydzy oraz zgorzel podstawy łodygi należą do chorób kukurydzy, które mają wpływ nie tylko na plon uzyskiwanego ziarna lub zielonej masy, lecz w sposób istotny warunkują jego jakość. Hodowla i wykorzystanie w uprawie odmian odpornych są powszechnie uznane za najbardziej opłacalną i przyjazną środowisku metodę ochrony roślin, a do hodowli odpornościowej potrzebne są źródła odporności. Dlatego celem realizowanych prac było określenie skuteczności metody rodowodowej w poszukiwaniu nowych źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi jednocześnie w obrębie pul genowych o typie ziarna szklistym, zębokształtnym i pośrednim. Badania prowadzono w cyklu trzyletnim. Materiał roślinny stanowiły sześćdziesiąt trzy populacje pokolenia F_2 uzyskane na bazie krzyżowań odległych genetycznie linii wsobnych. Odporność najwcześniej kwitnących i zapylanych wsobnie roślin na fuzariozę kolb oceniano po zakażeniu sztucznym izolatami *Fusarium graminearum*. Odporność na zgorzel podstawy łodygi oceniano przy infekcji naturalnej. Analizując stopień odporności badanych populacji na fuzariozę kolb w obrębie materiału wyjściowego (pokolenie S_1) oraz materiału uzyskanego po trzech cyklach selekcji (pokolenie S_3) stwierdzono, że w obrębie form o ziarnie szklistym udział pojedynków o podwyższonej odporności był średnio wyższy o ok. 30%. Jednak dalsze badania w tym kierunku są potrzebne ze względu na fakt, że specyfika okrywy owocowo-nasiennej tych form istotnie wpływa na objawy fenotypowe stopnia porażenia. W obrębie populacji o ziarnie zębokształtnym udział genotypów o podwyższonej odporności na fuzariozę kolb był średnio od 10 do 15% wyższy w stosunku do materiałów wyjściowych. Duży postęp biologiczny uzyskano również dla zgorzeli podstawy łodygi. Materiały pokolenia S_3 były średnio o 10 dni wcześniejsze w stosunku do form wyjściowych. Stwierdzono dodatnią współzależność pomiędzy wczesnością a odpornością na fuzariozę kolb.

Słowa kluczowe: fuzarioza kolb, kukurydza, zgorzel podstawy łodygi, źródła odporności

* Wyniki badań uzyskane w ramach projektu finansowanego przez MRiRW w zakresie badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej (PBwPR) „Epidemiologia chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. na kukurydzy oraz poszukiwanie nowych źródeł odporności.”

Redaktor prowadzący: Barbara Zagdańska

Ear rots caused by *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* are some of the most economically significant diseases of maize occurring widely throughout maize growing regions of the world. Another very destructive disease in Central Europe is the stalk rot caused by *F. graminearum*. The major objective of this study was to determine effectiveness of the pedigree selection to develop improved maize flint and dent genotypes with increased resistance to the ear and stalk rots caused by *F. graminearum*. Sixty three maize populations were evaluated under field conditions. In each population group at least 170 the earliest flowering S_0 plants were self-pollinated and inoculated with *F. graminearum* into the developing kernels. Ear rot resistance was scored using 1–7 scale. Stalk rot resistance was evaluated under natural infection, where *F. graminearum* prevails, using 1–9 scale. All genotypes rated lower than 3 for ear rot and lower than 5 for stalk rot were selected to continue the selfing procedure. Phenotypic variation for ear rot, stalk rot resistance and flowering time were significant. Genetic gain obtained for ear rot and stalk rot was higher in the flint group than in the dent forms. For flint forms it was determined that frequency of genotypes belong to the S_3 generation and scored as a moderate resistant was about 30% higher than within S_1 generation. In the group of dent forms frequency of genotypes belong to the S_3 generation and scored as a moderate resistant was 15 - 20% higher than within S_1 generation. Materials of the S_3 generations were on average more than 10 days earlier than the S_0 . Positive correlation between ear rot resistance and flowering time was observed.

Key words: ear rot, maize, sources of resistance, stalk rot

WSTĘP

Kukurydza pod względem wysokości plonów zajmuje pierwsze miejsce na świecie. Jej udział w światowej powierzchni uprawy zbóż wynosi ponad 20%, a pod względem produkcji około 30%. Wyróżnia się wysokimi plonami ziarna powyżej 10 t/ha i około 20 t/ha suchej masy w uprawie na kiszonkę. W uprawie na ziarno kukurydza jest jedną z roślin uprawnych o najwyższej opłacalności, która wciąż daje możliwość zwiększenia plonów, a tym samym dochodów rolnika. Jest też rośliną, dla której hodowcy uzyskują znaczny postęp biologiczny. To, że tę roślinę można uprawiać obecnie w całej Polsce, zarówno na ziarno, jak i na kiszonkę z całych roślin jest zasługą także polskiej hodowli (Adamczyk i in., 1997, 2003). Jednym z ważniejszych czynników świadczących o jej wartości gospodarczej jest odporność na fuzariozę kolb. Choroba ta jest powodowana przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. Powoduje ona nie tylko straty w plonie ziarna ale przede wszystkim obniża jego jakość — ze względu na związki toksyczne produkowane przez te grzyby (Garcia i in., 2009; Logrieco i in., 2002).

Hodowla i wykorzystanie w uprawie odmian odpornych są powszechnie uznane za najbardziej opłacalną i przyjazną środowisku metodę ochrony roślin przed porażeniem przez choroby, co opisano również w pracach przeglądowych (Meissler i in., 2010; Vasileaidis i in., 2011, Zijlstra i in., 2011). Stosowanie fungicydów jest trudne i mało efektywne, ponieważ trudno jest ocenić nasilenie choroby. Ograniczenie występowania owadów i szkodników, które w trakcie żerowania uszkadzają kolby kukurydzy istotnie wpływa również na ograniczenie występowania fuzariozy kolb (Munkvold, 2003 a, 2003 b). Na szczególną uwagę zasługują odmiany z genem *Bt*, który pochodzi z bakterii *Bacillus thuringiensis* i jest odpowiedzialny za produkcję białka, które jest toksyczne dla szkodników, w tym omacnicy prosowianki (Papst i in., 2005). Jednak w Polsce, podobnie jak w wielu innych krajach Europy, uprawa tych odmian jest zakazana. Dobra Praktyka

Rolnicza obejmuje również Integrowaną Ochronę Roślin, a od dnia 1 stycznia 2014 r. będzie obowiązywał na terenie UE obowiązek stosowania jej zasad przez wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin.

Zarówno w trakcie badań prowadzonych w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie, jak i w doniesieniach literaturowych stwierdzono, że nie ma genotypów odpornych na fuzariozę kolb i znalezienie ich raczej nie będzie możliwe (Bartok i in., 2006, 2010; Czembor i in., 2013). Do hodowli odpornościowej potrzebne są źródła odporności. Wiadomo, że jako źródła odporności mogą być wykorzystywane różne materiały genetyczne w tym dzicy krewniaci kukurydzy, rasy, odmiany populacyjne, genetyczne i cytogenetyczne markery, odmiany syntetyczne i linie wsobne (Adamczyk, 1998, 1999; Czembor i in., 2011). Jednak z praktycznego punktu widzenia jedynie odmiany syntetyczne i nowe linie wsobne, uzyskane na bazie odmiennej puli genowej, niż posiadana, mogą poszerzyć zakres zmienności. Pozostałe źródła, szczególnie w przypadku kukurydzy, mogą być wykorzystywane jedynie w programach hodowlanych trwających wiele lat, dla poprawy takich cech jak wigor czy właśnie odporność na stresy.

Analiza stopnia porażenia roślin na podstawie ocen fenotypowych po ich inokulacji oraz na podstawie analiz stopnia zawartości toksyn w próbkach ziarna jest trudna ze względu na fakt dużej zmienności pomiędzy izolatami w obrębie tego samego gatunku, pod względem ich agresywności, jak i zdolności do produkcji toksyn. Jednak wykazano, że prowadząc zakażenia sztucznie właściwie dobranym izolatem *F. graminearum* wyższa ocena fenotypowa stopnia odporności świadczy o mniejszej zawartości toksyn, i może być podstawą w pracach poszukiwania źródeł odporności zarówno na fuzariozę kolb, jak i na niższą zawartość toksyn (Mesterhazy i in., 2012; Czembor i in., 2013).

Celem realizowanych prac było określenie skuteczności metody rodowodowej w poszukiwaniu nowych źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi jednocześnie w obrębie pul genowych o typie ziarna szklistym, zęboksztalnym i pośrednim.

MATERIAŁY I METODY

Doświadczenia prowadzono na polach doświadczalnych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie w latach 2008–2010. Odporność populacji pokolenia F₂ na fuzariozę kolb oceniano po zakażeniu sztucznym kolb grzybami *Fusarium graminearum*. Odporność na zgorzel podstawy łodygi oceniano przy infekcji naturalnej. Nasiona wysiewano w siewie rzędownym, średnio 20 roślin w rzędzie, w terminie do 1 maja. Rozstawa pomiędzy roślinami w rzędzie wynosiła średnio 20 cm a pomiędzy rzędami 75 cm. Zastosowano nawożenie w dawce 200 kg/ha N, 80 kg/ha P₂O₅, 120 kg/ha K₂O.

Materiał roślinny

Materiał roślinny stanowiły sześćdziesiąt trzy populacje pokolenia F₂ należące do pięciu pul genowych o zróżnicowanym pochodzeniu i budowie ziarna. Materiały przekazane zostały przez Małopolską Hodowlę Roślin sp. z o.o. oraz Hodowlę Roślin Smolice sp. z o.o. i badano je jako osobne pule genowe. W ich skład wchodziły formy szkliste (flint), formy zęboksztalne (dent) oraz formy pośrednie (semident oraz flint/semident) (tab. 1).

Liczba populacji włączonych do badań w latach 2008–2010
Number of populations evaluated across 2008–2010

Pula genowa Gene pool	Typ ziarna Kernel type	Liczba populacji Number of populations	Liczba roślin Number of plants
1	szklisty — flint	19	248
2	szklisty — flint	7	97
3	zębokształtny — dent	22	294
4	zębokształtny — dent	4	106
5	pośredni — semident	5	69
6	pośredni — flint/ semident	6	96
Suma Total		63	910

Patogen

W badaniach wykorzystano 4 izolaty *F. graminearum* należące do kolekcji Pracowni Traw Pastewnych i Roślin Motylkowatych, IHAR — PIB w Radzikowie, najbardziej obficie zarodnikujące na pożywce PDA. Izolaty tworzące kolekcję zostały wyosobnione z prób ziarna, które pobrano w roku 2007. Pozyskano je zgodnie z procedurą opisaną w pracy Czembor i in. (2013). Odkazone powierzchniowo ziarniaki wykładano na pożywkę PDA, inkubowano pod światłem UV, a kultury o charakterystycznej dla *Fusarium* spp. barwie i kształcie zarodników izolowano na szalkach z pożywką PDA oraz SNA, tak aby dokonać identyfikacji metodą mikroskopową. Następnie przygotowano kultury jednozarodnikowe. Jednozarodnikowe kultury odszczepiano na pożywkę SNA i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu przygotowania inokulum. Przygotowując inokulum, izolaty po odszczepieniu na szalkach z pożywką PDA inkubowano tak jak poprzednio przez okres 3–4 tygodni. Następnie grzybnie zmywano i rozcieńczano płynną pożywką SNA (3 g agar / 1 wody), kontrolując ilość zarodników w powstałej zawieszynie (inokulum). Docelowe stężenie to 5×10^5 zarodników / ml.

Ocena fenotypowa stopnia odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi

Ocenę fenotypową stopnia odporności na fuzariozę kolb prowadzono po zakażeniach sztucznych kolb (inokulacji) w fazie dojrzałości pełnej wykorzystując skalę 1–7 opartą o procent ziarniaków z objawami porażenia: 1 = brak objawów; 2 = 1–3%, 3 = 4–10%; 4 = 11–25%; 5 = 26–50%; 6 = 51–75% and 7 = 76–100% (Reid, Hamilton, 1996 a; Reid i in., 1996 b).

Stopień odporności badanych mieszańców na zgorzel podstawy łodygi prowadzono przy infekcji naturalnej. Łodygi były krojone na wysokości 3 węzła. Używano skali 1–9 (1 — brak objawów choroby, 3 — zmiany chorobowe na pierwszym lub drugim węźle, 5 — zmiany chorobowe na pierwszym lub drugim węźle oraz pierwsze objawy rozkładu tkanek dwóch dolnych międzywęźli, 7 — silny rozkład trzech międzywęźli, ale widoczna tkanka rdzenia, 9 — całkowity rozkład tkanek) (Dolstra i in., 1993, Prończuk i in., 2007).

Test odpornościowy

W roku 2008 w obrębie każdej populacji do badań włączono średnio 13–14 roślin (łącznie 910 roślin). Przed kwitnieniem kwiatostanów żeńskich nakładano na nie izolatory plastikowe, aby nie doszło do przepyleń. Następnie prowadzono zapylenia wsobne i na

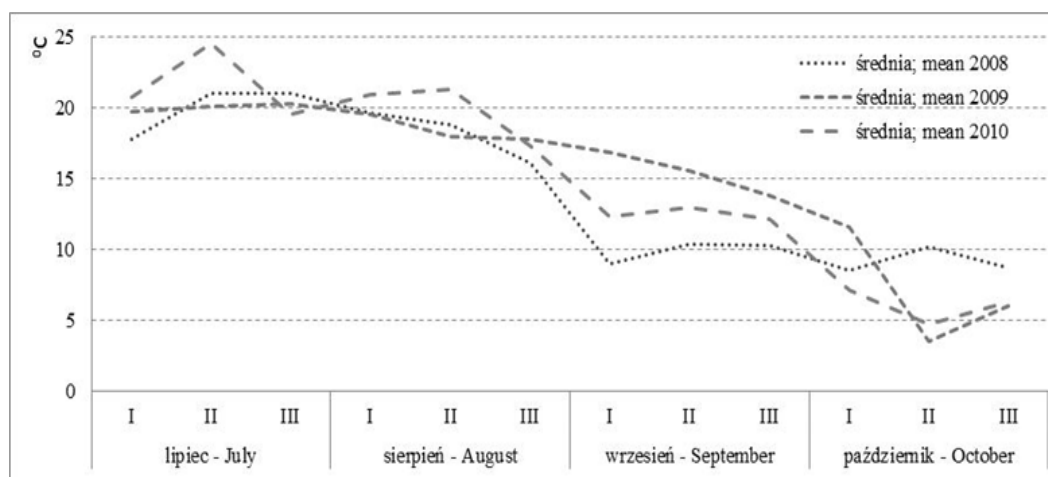
wykształcające się kolby zakładano izolatory pergaminowe. Przez 7–10 dni, od daty zapylenia wsobnych, kolby były zakażane sztucznie. Nakłuwano je bolcem zanurzonym w zawieszynie zarodników grzyba *F. graminearum* w dniach 7–10, od daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich, różnicując wielkość bolca w zależności od wielkości kolby. Ocenę stopnia porażenia prowadzono w fazie dojrzałości pełnej. Rośliny, których stopień porażenia kolb oceniono w zakresie 2–3 (poniżej 10% ziarniaków miało objawy porażenia) oraz stopień porażenia łodyg w zakresie 2–5 typowano jako potencjalne źródła odporności i włączano do kolejnego cyklu selekcji jako linie pokolenia S_1 . W roku 2009 w obrębie każdej linii pokolenia S_1 izolowano minimum 4 rośliny, zapylano je wsobnie, a kolby zakażano sztucznie. W fazie dojrzałości pełnej prowadzono ocenę fenotypową stopnia porażenia kolb i łodyg, a potencjalne źródła odporności typowano do kolejnego cyklu badań jako linie pokolenia S_2 . W roku 2010 badania prowadzono jak w roku poprzednim, uzyskując linie pokolenia S_3 .

Analizy statystyczne

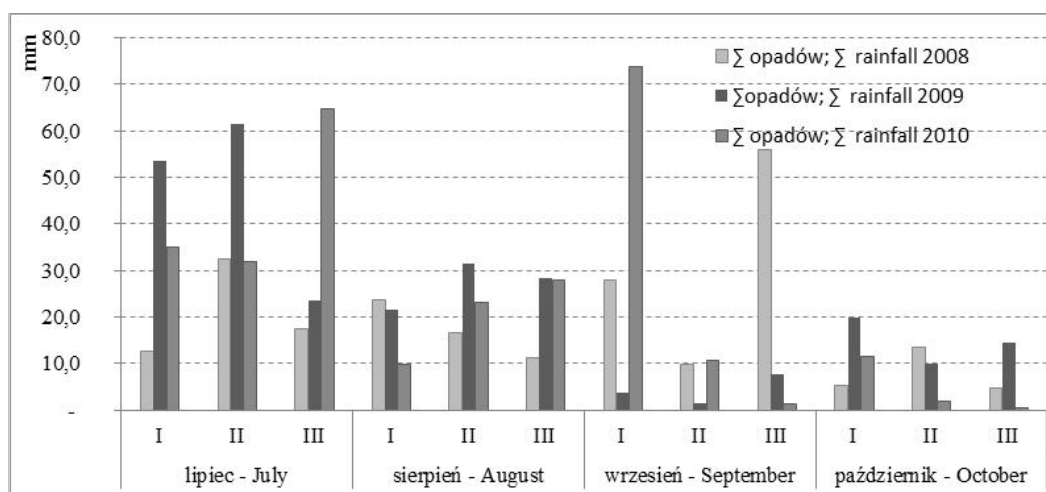
Do oceny istotności różnic pod względem cech: stopnia odporności na fuzariozę kolb po zakażeniu sztucznym i zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej oraz wczesności sześciu pul genowych oraz różnic pomiędzy pokoleniami należącymi do tej samej puli genowej na przestrzeni lat (pokoleń S_1 , S_2 i S_3 uzyskanych w 1, 2 i 3 roku badań) zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (czynnikami były pokolenia i pula genowa). Po odrzuceniu hipotezy, o braku różnic pomiędzy pulami genowymi, oraz pomiędzy pokoleniami S_1 , S_2 i S_3 należącymi do tych samych pul genowych na poziomie istotności 0,05, dla każdej uwzględnionej w badaniach cechy (odporność na fuzariozę kolb, odporność na zgorzel podstawy łodygi i wczesność), przeprowadzono wielocechową charakterystykę pokoleń S_1 , S_2 i S_3 z wykorzystaniem analizy czynnikowej metodą składowych głównych (PCA). Długość wektora przypisanego dla określonej cechy świadczy o jej mocy dyskryminacyjnej. Kąt nachylenia wektora określonej cechy do osi składowej głównej świadczy o współzależnościach pomiędzy nimi. Kąty nachylenia pomiędzy wektorami reprezentującymi poszczególne cechy świadczą o współzależnościach pomiędzy tymi cechami. Analizy danych przeprowadzono za pomocą programu InfoStat 1.6.

Warunki meteorologiczne

W opracowaniu wykorzystano pomiary temperatury powietrza na wysokości 2 m nad gruntem oraz pomiary opadów, które wykonano w latach 2008–2010 w Stacji Meteorologicznej w Radzikowie. Opracowano je jako średnie dekadowe wartości temperatur powietrza oraz dekadowe sumy opadów i przedstawiono w formie wykresów (rys. 1 i 2). Warunki meteorologiczne w trakcie trwania badań były bardzo zróżnicowane. Duże różnice pomiędzy latami stwierdzono zarówno dla średnich temperatur powietrza, jak i dla ilości opadów (rys. 1, 2).



Rys. 1. Średnie dekadowe temperatury powietrza w Radzikowie w latach 2008–2010
 Fig. 1. Mean decade temperatures in Radzików across 2008–2010



Rys. 2. Dekadowe sumy opadów w Radzikowie w latach 2008–2010
 Fig. 2. Decade total precipitation in Radzików during 2008–2010

Najwyższe średnie temperatury powietrza w lipcu i sierpniu były w 2010 roku. W drugiej dekadzie lipca różnice te wynosiły ok. 5°C. Jednak we wrześniu spadły i były niższe w stosunku do roku 2009. Średnie temperatury powietrza we wrześniu 2008 roku były średnio o ok. 5°C niższe niż w roku 2009. Różnice pomiędzy latami, w odniesieniu do ilości opadów w lipcu w zależności od dekady, sięgały ok. 40 mm/m². W pierwszej i drugiej dekadzie lipca najwięcej opadów odnotowano w 2009 roku, natomiast w trzeciej dekadzie tego miesiąca suma opadów była najwyższa w 2010 roku (ponad 60 mm/m²). W sierpniu różnice te nie były aż tak duże, natomiast we wrześniu rokiem najbardziej suchym był 2009

(suma opadów w poszczególnych dekadach nie przekraczała 10 mm/m²), podczas gdy w pierwszej dekadzie 2010 roku suma opadów przekroczyła 70 mm/m².

WYNIKI

Do badań włączono sześć pul genowych: dwie o ziarnie szklistym, czyli flint, dwie o ziarnie zębokształtnym, czyli dent oraz dwie to formy o ziarnie pośrednim, czyli semident i flint/semident). Materiały zróżnicowano pod względem stopnia odporności na fuzariozę kolb stosując zakażenia sztuczne (inokulację), zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej oraz wczesności.

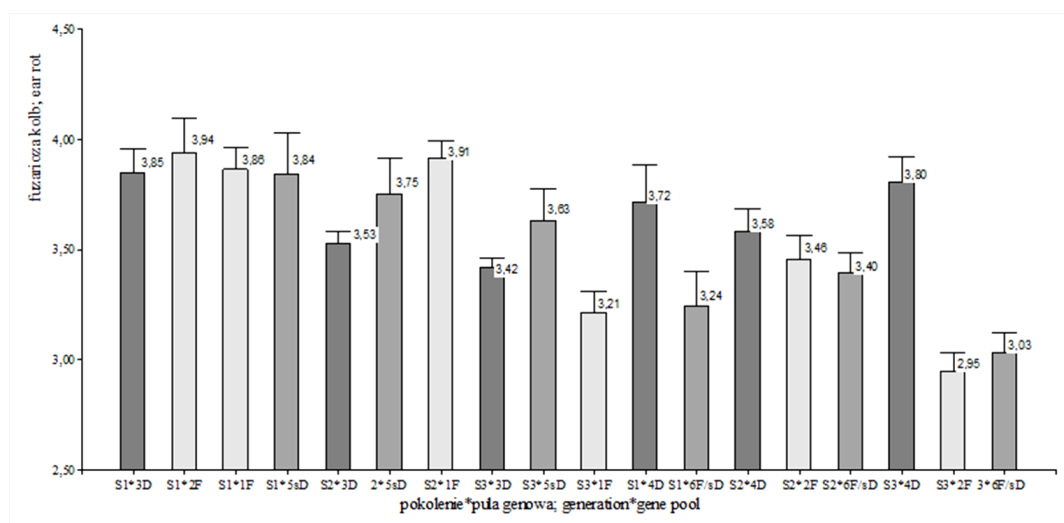
We wszystkich latach zakażenia sztuczne kolb pozwoliły na zróżnicowanie materiału roślinnego pod względem stopnia odporności na fuzariozę kolb (tab. 2).

Tabela 2

Analiza wariancji dla stopnia odporności na fuzariozę kolb po zakażeniu sztucznym i zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej oraz wczesności pul genowych o ziarnie szklistym, zębokształtnym i pośrednim na podstawie doświadczenia prowadzonego w latach 2008–2010
Fixed model analysis of variance for the resistance level of gene pools for ear rot after inoculation and stalk rot under natural infection and for their maturity time based on data from the trial carried out during 2008–2010

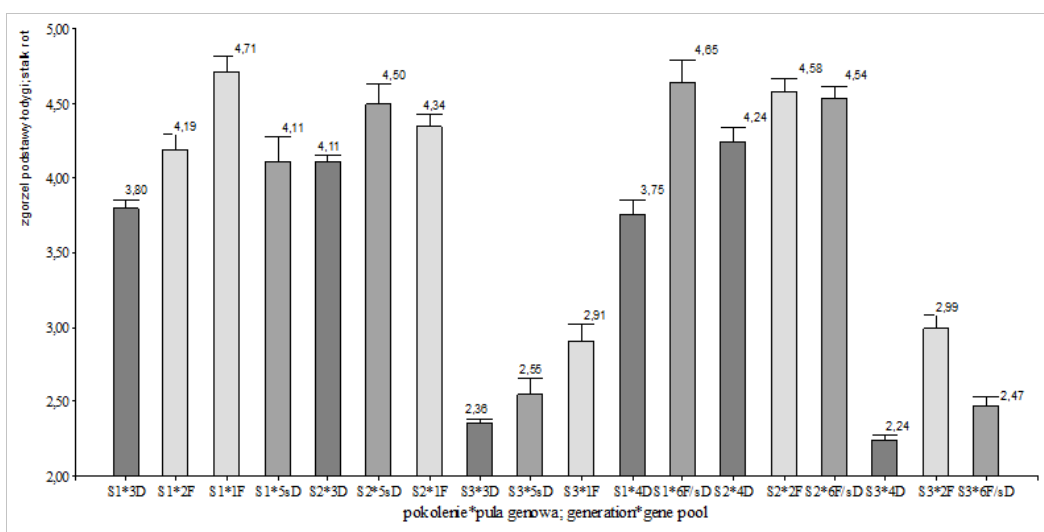
Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody DF	Średni kwadrat odchyleń Mean Square	wartość F F- value	wartość p p - value
Fuzarioza kolb — Ear rot				
Rok — year	2	52,81	19,68	<0,0001
Pula genowa — gene pool	5	17,6	6,56	<0,0001
Rok*pula genowa — year*gene pool	10	10,92	4,07	<0,0001
Błąd — error	5453	2,68		
Zgorzel podstawy łodygi — Stalk rot				
Rok — year	2	1449,45	922,89	<0,0001
Pula genowa — gene pool	5	56,49	35,97	<0,0001
Rok*pula genowa — year*gene pool	10	10,24	6,52	<0,0001
Błąd — error	5454	1,57		
Wczesność — Maturity				
Rok — year	2	32343,63	2049,63	<0,0001
Pula genowa — gene pool	5	10316,8	653,78	<0,0001
Rok*pula genowa — year*gene pool	10	398,84	25,27	<0,0001

Nasilenie zgorzeli podstawy łodygi przy infekcji naturalnej było również wystarczająco duże, aby stwierdzić istotne różnice dla stopnia odporności na tą chorobę. Wartości średnie tych cech dla pokoleń S₁, S₂ i S₃ poszczególnych pul genowych przedstawiono w formie rysunków 3 i 4.



Rys. 3. Wartości średnie i błąd standardowy stopnia odporności na fuzariozę kolb pokoleń S1, S2 i S3 pul genowych (2 o ziarnie szklistym: 1F i 2F, 2 o ziarnie zębokształtnym: 3D i 4D oraz 2 o ziarnie pośrednim: 5sD i 6F/sD) badanych w latach 2008–2010

Fig. 3. Mean values and standard error of levels of resistance to ear rot S1, S2 i S3 generations of 6 gene pools (2 flint: 1F and 2F; 2 dent: 3D and 4D and, 5 sD: semident and 6F/sD: flint/semident) evaluated during 2008–2010



Rys. 4. Wartości średnie i błąd standardowy stopnia odporności na zgorzel podstawy łodygi pokoleń S1, S2 i S3 6 pul genowych (2 o ziarnie szklistym: 1F i 2F, 2 o ziarnie zębokształtnym: 3D i 4D oraz 2 o ziarnie pośrednim: 5sD i 6F/sD) badanych w latach 2008–2010

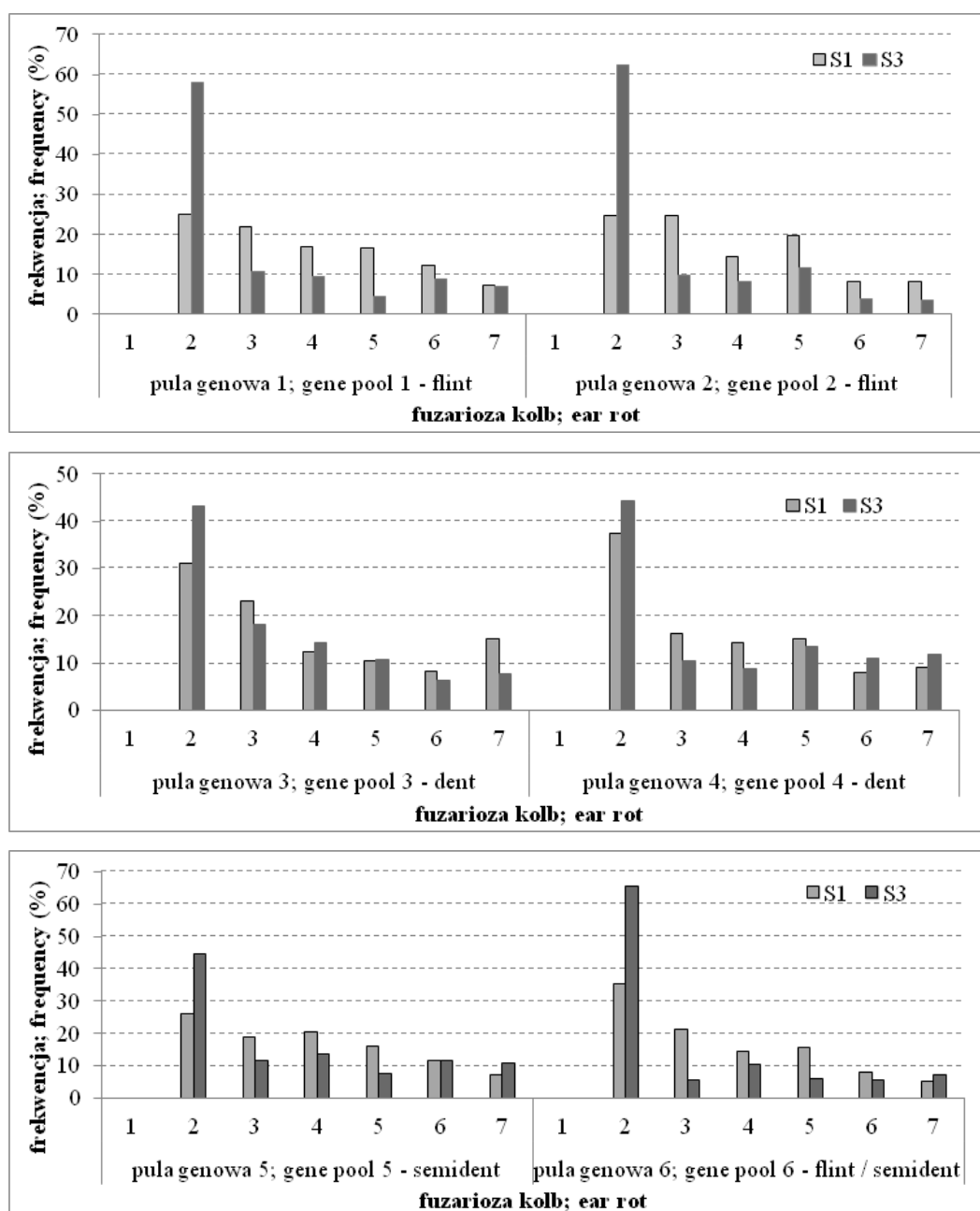
Fig. 4. Mean values and standard error of levels of resistance to stalk rot S1, S2 i S3 generations of 6 gene pools (2 flint: 1F and 2F; 2 dent: 3D and 4D and, 5 sD: semident and 6F/sD: flint/semident) evaluated during 2008–2010

Rozkład liczebności pojedynków o określonym stopniu porażenia kolb oceniano bonitacyjnie w skali 1–7, stopień odporności na zgorzel podstawy łodygi również oceniano bonitacyjnie w skali 1–9, a wczesność oceniano jako liczbę dni od daty siewu do daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich, co pozwoliło w sposób bardzo dokładny śledzić postęp genetyczny jaki uzyskano dla tych cech na przestrzeni 3 lat.

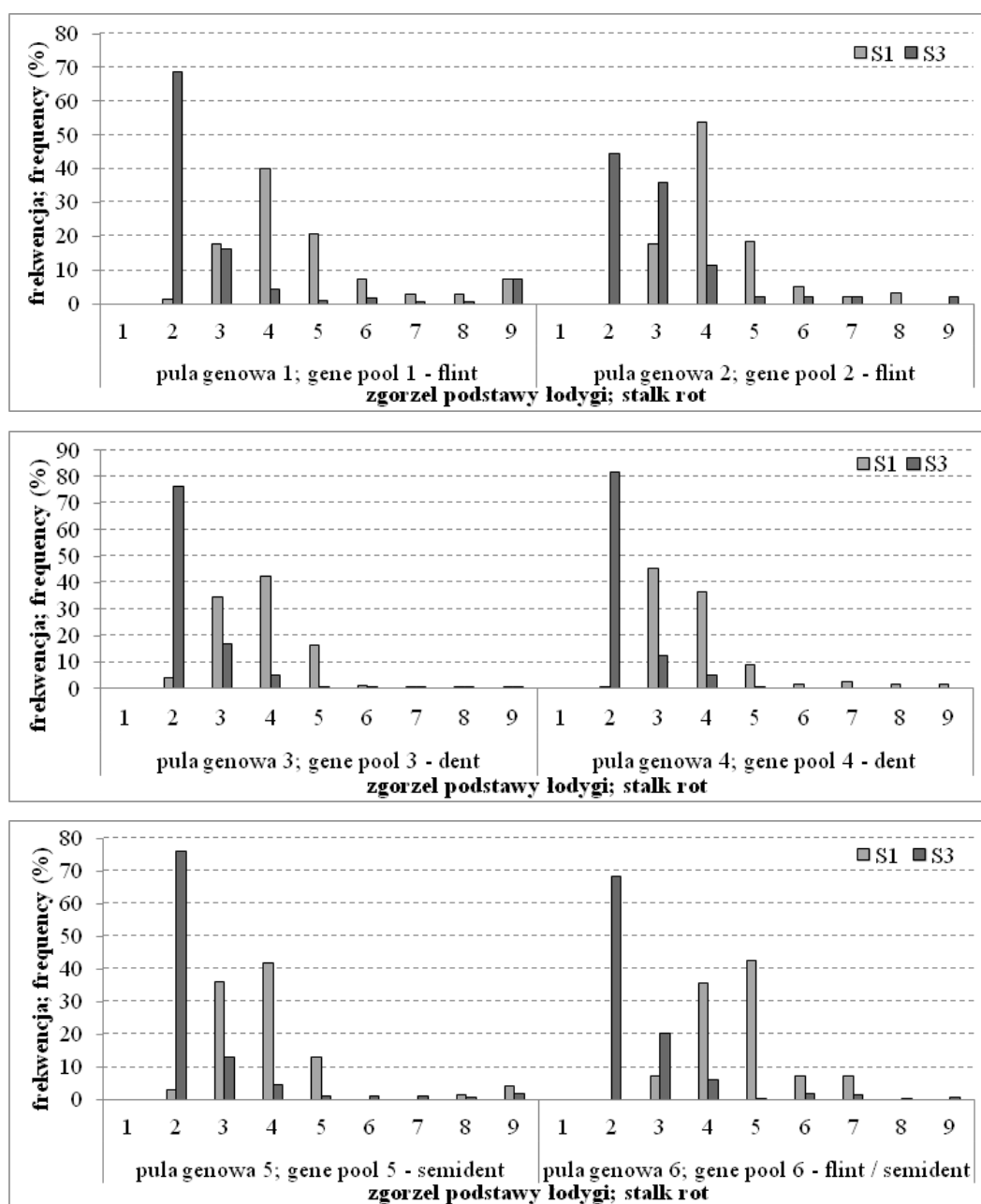
Analizując rozkład liczebności dla stopnia odporności na fuzariozę kolb wykazano, że w populacjach wyjściowych (pokolenie S_1) należących do 1 i 2 puli genowej o typie ziarna szklistym oraz do puli genowej 5 o typie ziarna pośrednim liczba pojedynków, których stopień odporności na fuzariozę kolb po zakażeniu sztucznym grzybem *F. graminearum* oceniono na 2 (do 3% ziarniaków z objawami porażenia) była zbliżona i wynosiła ok. 25% (rys. 5). W grupie populacji o ziarnie szklistym liczba pojedynków, których stopień odporności oceniono na 3 (4–10% ziarniaków z objawami porażenia) była podobna i wynosiła również ok. 25%. Liczba genotypów ocenionych w zakresie 4–7 wahała się od 20% (pojedynki ocenione na 5 w populacji 2) do 7% (pojedynki ocenione na 7 w pulach genowych 1 i 2). W obrębie materiału uzyskanego po dwóch cyklach selekcji (pokolenie S_3) udział pojedynków o bardzo niewielkim stopniu porażenia wynosił ok. 70% w tym porażenie ok. 60% roślin było bardzo małe (zostało ocenione na 2). W populacjach o typie ziarna zęboksztalnym liczba pojedynków o podwyższonym stopniu odporności była wyższa niż w grupie form o ziarnie szklistym. Liczba pojedynków, których stopień odporności na fuzariozę kolb oceniono na 2 wynosiła odpowiednio 30% wszystkich badanych w puli genowej 3 oraz 35% w puli genowej 4. W obrębie pokolenia S_3 liczba pojedynków o podwyższonej odporności była ok. 10% wyższa w stosunku do populacji wyjściowych.

Duży postęp biologiczny stwierdzono dla stopnia odporności na zgorzel podstawy łodygi. Analizując stopień odporności badanych populacji w obrębie materiału wyjściowego (pokolenie S_1) oraz materiału uzyskanego po dwóch cyklach selekcji (pokolenie S_3) stwierdzono, że w obrębie form o ziarnie szklistym udział pojedynków o bardzo niewielkim stopniu porażenia wahał się w zakresie od 40% (2 pula genowa) do 70% (1 pula genowa) (rys. 6). Liczebność w pozostałych grupach była jednocześnie dużo niższa. Formy wyjściowe należące do drugiej puli genowej były bardziej podatne w stosunku pierwszej puli genowej. Podobne zależności stwierdzono w grupach form o typie ziarna zęboksztalnym i pośrednim. Średnio, stopień odporności form semident był zbliżony do form tworzących drugą pulę genową o ziarnie szklistym. Pokolenie S_1 populacji tworzących 3 pule genową o typie ziarna zęboksztalnym były bardziej odporne w stosunku do form należących do puli genowej 4. Ale również w obu z nich postęp genetyczny był bardzo duży.

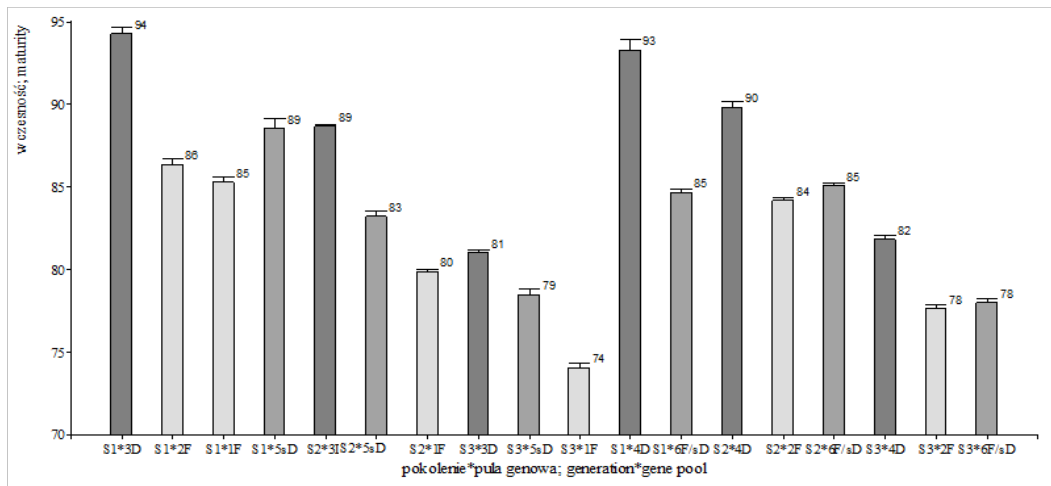
Materiały pokolenia S_3 były znacznie wcześniejsze w stosunku do populacji wyjściowych. Wartości średnie tej cechy pokoleń S_1 , S_2 i S_3 poszczególnych pul genowych przedstawiono na rysunku 7. Okres od daty siewu do daty kwitnienia kwiatostanów żeńskich był krótszy o 7 dni (w obrębie form o ziarnie szklistym) do 13 dni (w obrębie form o ziarnie zęboksztalnym). Postęp biologiczny dla tej cechy uzyskano uwzględniając w obrębie populacji wyjściowej S_0 , a następnie w obrębie linii pokoleń S_1 i S_2 pojedynki najwcześniej kwitnące.



Rys. 5. Udział genotypów w obrębie pokolenia S₁ (materiał roślinny wyjściowy) oraz w obrębie pokolenia S₃ (materiał roślinny po 3 cyklach selekcji) w grupach o różnym stopniu odporności na fuzariozę kolb po zakażeniach sztucznych ocenianym w skali 1–7
 Fig. 5. Frequency of genotypes belonging to the S₁ generation and to the S₃ generation (after 3 years of the selection) in groups with different levels of ear rot resistance scored using 1–7 scale

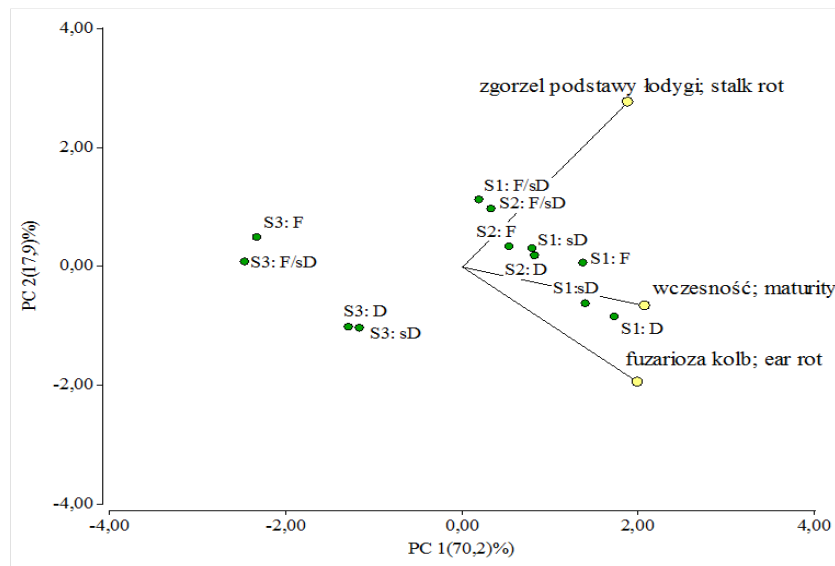


Rys. 6. Udział genotypów w obrębie pokolenia S₁ (materiał roślinny wyjściowy) oraz w obrębie pokolenia S₃ (materiał roślinny po 3 cyklach selekcji) o określonym stopniu odporności na zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej ocenianym w skali 1–9
 Fig. 6. Frequency of genotypes belonging to the S₁ generation and to the S₃ generation (after 3 years of the selection) with different levels of stalk rot resistance scored under natural infection using 1–9 scale



Rys. 7. Wartości średnie i błąd standardowy dla wczesności pokoleń S₁, S₂ i S₃ 6 pul genowych (2 o ziarnie szklistym: 1F i 2F, 2 o ziarnie zębokształtnym: 3D i 4D oraz 2 o ziarnie pośrednim: 5sD i 6F/sD) badanych w latach 2008–2010

Fig. 7. Mean values and standard error for levels of maturity time in S₁, S₂ i S₃ generations of 6 gene pools (2 flint: 1F and 2F; 2 dent: 3D and 4D and, 5 sD: semident and 6F/sD: flint/semident) evaluated during 2008–2010



Rys. 8. Relacje pomiędzy pokoleniami S₁, S₂ i S₃ form o ziarnie szklistym (F), zębokształtnym (D) oraz pośrednim (F/sD i sD) w układzie dwóch pierwszych składowych głównych wyodrębnionych na bazie danych stopnia odporności na fuzariozę kolb po zakażeniach sztucznych, stopnia odporności na zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej oraz wczesności

Fig. 8. Relationships between S₁, S₂ and S₃ generations flint (F), dent (D), semident (sD), flint/semident (F/sD) forms based on the data obtained for ear rot resistance after inoculation, stalk rot resistance under natural infection and flowering time

Podsumowując, można stwierdzić, że uwzględniając pojedynki najwcześniej kwitnące poszukiwanie źródeł odporności na fuzariozę kolb po zakażeniach sztucznych oraz na zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej metodą rodowodową można uzyskać zadawalający postęp biologiczny dla wszystkich tych cech jednocześnie (rys. 8). Największe różnice dla stopnia odporności na fuzariozę kolb i wczesności jednocześnie stwierdzono dla materiałów o ziarnie szklistym (formy flint). W grupie form o ziarnie zębokszałtnym oraz pośrednim, różnice te były również istotne. Drugi rok badań (uzyskanie pokolenia S₂ i jego ocena) był rokiem przejściowym, gdy różnice pomiędzy pokoleniem S₁ badanym w 2008 roku a S₂ badanym w roku 2009 nie były tak istotne.

DYSKUSJA

Fuzarioza kolb kukurydzy oraz zgorzel podstawy łodygi należą do chorób kukurydzy, które mają wpływ nie tylko na plon uzyskiwanego ziarna lub zielonej masy, lecz w sposób istotny warunkują jego jakość. Sprawcami są metabolity wtórne grzybów z rodzaju *Fusarium* spp., które są wysoce szkodliwe dla ludzi i zwierząt, powodując groźne choroby a nawet śmierć. Jak wspomniano, nie ma genotypów odpornych na fuzariozę kolb oraz na akumulację toksyn, a znalezienie ich raczej nie będzie możliwe (Mesterhazy i in., 2012). W Polsce głównym sprawcą zgorzeli podstawy łodygi jest *F. graminearum*, natomiast fuzariozy kolb *F. graminearum* (produkujący deoksyniwalenol — DON i zearalenon — ZEA) oraz *F. verticillioides* (produkujący fumonizyny) (Czembor i in., 2013). Dla ludzi mikotoksyny są szkodliwe nawet w niskich stężeniach, ponieważ szybko wchłaniają się do krwi i nie są usuwane z organizmu, lecz kumulowane. Skutki w postaci chorób ujawniają się dopiero po kilku lub kilkunastu latach. U zwierząt przeżywających toksyny w dużym stopniu zostaną rozłożone, a mimo to mają szkodliwy wpływ na zwierzę.

W ostatnich latach w Polsce obserwuje się wzrost poziomu skażenia ziarna kukurydzy oraz jej pochodnych szczególnie deoksyniwalenolem, przez co jakość produktów żywnościowych i pasz uzyskiwanych jest niższa (Czembor, Matusiak, 2013). Wpływa na to wzrost powierzchni uprawy tego gatunku, a co za tym idzie zmiany w stosowanym dotychczas płodozmianie.

Rozwój hodowli odpornościowej metodami klasycznymi jest ściśle związany z dostępnością źródeł odporności, a także opiera się na wiedzy dotyczącej interakcji pomiędzy rośliną — patogenem, z uwzględnieniem zróżnicowanych warunków środowiska. Dotychczas stosowane metody hodowlane, są pracochłonne i długotrwałe, ponieważ prowadzone są tylko w warunkach polowych. Trudno jest znaleźć warunki środowiskowe, które w sposób zadawalający różnicowałyby badany materiał na przestrzeni lat. Dlatego konieczne jest stosowanie zakażeń sztucznych, które muszą być prowadzone w warunkach polowych (próby zakażeń sztucznych w warunkach szklarniowych nie powiodły się; Mesterhazy i in., 2012).

Brak jest wielu doniesień literaturowych dotyczących poszukiwania źródeł odporności w pierwszych etapach, zarówno metodami klasycznymi w warunkach polowych jak i z wykorzystaniem markerów molekularnych. Markery molekularne są wykorzystywane w programach hodowli odpornościowej wielu gatunków roślin.

Jednak w przypadku kukurydzy prace te nie są aż tak zaawansowane, jak na przykład dla pszenicy, a interakcja pomiędzy kukurydzą a tymi patogenami jest bardziej skomplikowana. Wciąż brak jest jednoznacznych doniesień opisujących efektywne dla tej cechy QTL. Wiadomo, że odporność kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. uwarunkowana jest poligenicznie, co zostało wykazane przez zespoły m.in., Eller i in. (2008 b), Ali i in. (2005), Zhi-Min Li i in. (2011), Robertson-Hoyt i in. (2006 c) oraz Presello i in. (2011 a, b).

Jedną z metod klasycznych wykorzystywanych do poszukiwania źródeł odporności na fuzariozę kolb jest metoda rodowodowa. Brak jest w literaturze doniesień opisujących skuteczność tej metody w pierwszych etapach dla materiałów wykorzystywanych w programach hodowlanych prowadzonych na terenie Europy. Efektywność tej metody została opisana dla materiałów wykorzystywanych w Ameryce Północnej i Południowej (Presello i in., 2005, 2011 a; Reid i in., 2001 a, b, 2003). 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). Celem bieżących badań było porównanie skuteczności tej metody w różnych grupach pochodzeniowych kukurydzy, różniących się typem ziarna tzn. w obrębie form o ziarnie szklistym, zębokształtnym i pośrednich. Wykazano, że uwzględniając w programach hodowlanych pojedynki najwcześniej kwitnące poszukiwanie źródeł odporności na fuzariozę kolb po zakażeniach sztucznych oraz na zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej metodą rodowodową można uzyskać zadawalający postęp biologiczny dla wszystkich tych cech jednocześnie. Największe różnice pomiędzy stopniem odporności na fuzariozę kolb i wczesności jednocześnie stwierdzono dla materiałów o ziarnie szklistym (formy flint). Jednak szczególnie dla tej grupy roślin należy badania kontynuować. Formy te są szczególnie trudne do oceny stopnia porażenia kolb przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp., ponieważ często objawy są mało widoczne ze względu na specyfikę okrywy owocowo-nasiennej ziarniaka, która jest bardziej twarda niż form zębokształtnych. Różnice dla podatności na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. pomiędzy formami o ziarnie szklistym i zębokształtnym zostały wstępnie opisane również w pracy Czembor, Ochodzki (2009). W grupie form o ziarnie zębokształtnym oraz pośrednim, różnice te były również istotne. Drugi rok badań (uzyskanie pokolenia S_2 i jego ocena) był rokiem przejściowym, gdy różnice pomiędzy pokoleniem S_1 badanym w 2008 roku a S_2 badanym w roku 2009 nie były tak istotne. Potwierdziło to badania prowadzone przez Presello i in., (2005, 2010, 2011) oraz Reid i in., (2001a, b, 2003), które obejmowały bardzo odległe genetycznie formy od materiałów włączonych do bieżących badań.

Dla linii pokolenia S_3 uzyskanego po 3 cyklach selekcji powinna zostać opisana ogólna i specyficzna zdolność kombinacyjna. Badania takie nie były dotychczas prowadzone dla chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. Mesterhazy i in., (2012) wskazuje, że ogólna i swoista zdolność kombinacyjna dla stopnia odporności na fuzariozę kolb oraz zgorzel podstawy łodygi może być różna.

WNIOSKI

1. Metoda rodowodowa pozwala na uzyskanie postępu biologicznego dla wczesności, stopnia odporności na fuzariozę kolb po zakażeniach sztucznych i na zgorzel podstawy łodygi przy infekcji naturalnej jednocześnie w obrębie populacji kukurydzy o typie ziarna szklistym, zębokształtnym i pośrednim.
2. Na podstawie ocen fenotypowych stopnia porażenia kolb po zakażeniach sztucznych *F. graminearum* stwierdzono, że w grupie form o ziarnie szklistym częstotliwość występowania form o podwyższonej odporności jest średnio o 30% wyższa niż w obrębie form wyjściowych, a w grupie o ziarnie zębokształtnym średnio do 20% wyższa w stosunku do form wyjściowych.
3. Materiały pokolenia S₃ kukurydzy były średnio o 10 dni wcześniejsze w stosunku do form wyjściowych.
4. Stwierdzono dodatnią współzależność pomiędzy wczesnością kukurydzy a jej stopniem odporności na fuzariozę kolb.

LITERATURA

- Adamczyk J. 1991. Breeding value of collected maize open pollinated varieties and synthetics. Plant Genetic Res. Conservation, Reports 1986–1990, Radzików: 57 — 58.
- Adamczyk J. 1998. Przegląd metod hodowli kukurydzy i ich skuteczność w praktyce. Biul. IHAR 208: 123 — 130.
- Adamczyk J. 1999. Oszacowanie wartości hodowlanej odmian populacyjnych i syntetycznych kukurydzy (*Zea mays* L.). Biul. IHAR 209: 223 — 245.
- Adamczyk J., Królikowski Z. 1997. U progu 45- lecia polskiej hodowli mieszańców kukurydzy — dorobek i perspektywy. W: Hodowla Roślin — materiały z I Krajowej Konferencji. Poznań, 19–20 XI 1997: 61 — 64.
- Adamczyk J., Cygert H., Czajczyński J. 2003. 50 lat hodowli kukurydzy mieszańcowej w Polsce — dorobek i perspektywy. Biul. IHAR 230: 423 — 431.
- Adamczyk J., Rogacki J., Cygert H. 2010. Postęp w hodowli kukurydzy w Polsce. Artykuł przeglądowy. Acta Sci. Pol., Agricultura 9 (4): 85 — 91.
- Ali M. L., Taylor J. H., Jie L., Sun G., William M., Kasha K. J., Reid L. M., Pauls K. P. 2005. Molecular mapping of QTLs for resistance to Gibberella ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. Genome 48: 521 — 533.
- Bartok T., Szecsi A., Szekeres A., Mesterhazy A., Bartok M. 2006. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin - like compounds by reversed phase - high - performance liquid chromatography/electrospray ionization - ion - trap mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 20: 1 — 17.
- Bartok T., Tolgyesi L., Szekeres A., Varga M., Bartha R., Szecsi A., Bartok M., Mesterhazy A. 2010. Detection and characterization of twenty - eight isomers of fumonisin B1 (FB1) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reserved phase high performance liquid chromatography/electrospray ionization time of flight and ion trap mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 24: 35 — 42.
- Czembor E., Ochodzki P. 2009. Resistance of flint and dent maize forms for colonization by *Fusarium* spp. and mycotoxin contamination. Maydica 54: 263 — 267.
- Czembor E., Warzecha R., Adamczyk J. 2005. Wytwarzanie materiałów wyjściowych o podwyższonej odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi. Biul. IHAR 236: 203 — 214.
- Czembor E., Presello D., Adamczyk J., Wójcik K. 2011. 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: 116.

- Czembor E., Waśkiewicz A., Stępień L. 2013. Genetic variation for ear rot resistance and mycotoxin content of Polish maize elite inbred lines after inoculation with *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*. Book of abstract. European *Fusarium* Seminar, Bordoux, Francia, 2013.
- Dolstra O., Marton C., Menzi M., Mohr I., Plienegger D. I., Prończuk M. 1993. Evaluation of recurrent selection for stalk rot resistance in a synthetic maize population. Proc. of Maize and Sorghum. Eucarpia XVIth Conference, June 6–9 1993, Bergamo, Italy: 1 — 7.
- Eller M. S., Robertson-Hoyt L. A., Payne G. A., Holland J. B. 2008 b. Grain yield and *Fusarium* ear rot of maize hybrids developed from lines with varying levels of resistance. *Maydica* 53: 231 — 237.
- García D., Ramos A. J., Sanchis V., Mariñ S. 2009. Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiol.* 26: 757 — 769.
- Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 597 — 609.
- Meissler M., Mouron P., Musa T., Bigler F., Pons X., Vasileiadis V.P., Otto S., Antichi D., Kiss J., Pálinkás, Z., Dörner Z., van der Weide R., Groten J., Czembor E., Adamczyk J., Thibord J-B., Melander B., Cordsen Nielsen G., Poulsen R. T., Zimmermann O., Verschwele A., Oldenburg E. 2010. Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects, *Journal of Applied Entomology*, 34 (5): 357 — 375.
- Mesterhazy A., Lemmens M., Reid L. M. 2012. Breeding for resistance to ear rot caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. *Plant Breeding* 131: 1 — 19.
- Munkvold G. P. 2003 a. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 705 — 713.
- Munkvold G. P. 2003 b. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 99—116.
- Pestka J. J., Bondy G. S. 1994. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: Miller J. D., Trenholm H. L. (eds), *Mycotoxins in grain: Compounds other than Aflatoxin*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.: 339 — 358.
- Papst C., Utz H. F., Melchinger A. E., Eder J., Magg T., Klein D., Bohn M. 2005. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non — Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agron. J.* 97: 219 — 224.
- Presello D. A., Reid L. M., Butler G., Mather D. E. 2005. Pedigree selection for Gibberella ear rot resistance in maize populations. *Euphytica* 143: 1 — 8.
- Presello D. A., Pereyra A. O., Iglesias J., Fauguel C. M., Sampietro D. A., Eyherabide G. H. 2011 a. Responses to selection of S₅ inbreds for broad — based resistance to ear rots and grain mycotoxin contamination caused by *Fusarium* spp. in maize. *Euphytica* 178: 23 — 29.
- Presello D. A., Fauguel C. M., Rodríguez Giomi, S. D. A., Iglesias J., Fernández. 2011 b. Traits associated to ear rot and mycotoxin contamination caused by *Fusarium* spp. Book of abstracts ISM Conference “Strategies to reduce the impact of mycotoxins in a global context”.
- Prończuk M., Bojanowski J., Warzecha R., Laudański Z. 2007. Badania nad odpornością kukurydzy na zgorzel podstawy łodyg. Część I. Ocena podatności odmian mieszańcowych w warunkach infekcji naturalnej. *Biul. IHAR* 245: 155 — 169.
- Reid L. M., Hamilton R. I. 1996 a. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration, and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 279 — 285.
- Reid L. M., Hamilton R. I., Mather D. E. 1996 b. Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot. *Agriculture and Agri - Food Canada Technical Bulletin.*, Publication: 196 — 205.
- Reid L. M., McDiarmid G., Parker A. J., Woldemariam T. 2003. CO441 corn inbred line. *Can. J. Plant Sci.* 83: 79 — 80.
- Reid L. M., McDiarmid G., Parker A. J., Woldemariam T., Hamilton R. I. 2001 a. CO388 and CO389 corn inbred lines. *Can. J. Plant Sci.* 81: 457 — 459.
- Reid L. M., McDiarmid G., Parker A. J., Woldemariam T., Hamilton R. I. 2001 b. CO430, CO431 and CO432 corn inbred lines. *Can. J. Plant Sci.* 81: 283 — 284.

- Robertson-Hoyt L. A., Jines M. P., Balint-Kurti P. J., Kleinschmidt C. E., White D. G., Payne G. A., Maragos C. M., Molnar T. L., Holland J. B. 2006 c. QTL mapping for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Sci.* 46: 1734 — 1743.
- Vasileiadis V. P., Otto S., Sattin M., Palinkás Z., Veres A., Bán R. Kiss J., Pons X., Kudsk P., Weide R., Czembor E., Moonen C., Kiss J. 2011. Crop protection in European maize — based cropping systems: Current practices and recommendations for innovative Integrated Pest Management. *Agricultural Systems* 104: 533 — 540.
- Zijlstra, C., Lund, I., Justesen A., Nicolaisen M., Bianciotto V., Posta K., Balestrini R., Przetakiewicz A., Czembor E., van de Zande J. 2011. Combining novel monitoring tools and precision application technologies for integrated high-tech crop protection in the future (a discussion document). *Pest Manag. Sci.* 67: 616 — 625.
- Zhi-Min, Jun-Qiang, Rui-Xia Wang, Jia-Fa, Xiao-Dong, Wei Chen, Wei-Bing, Hua-Fang, Xiao-Dongi, Zong-Liang, Jian-Yu. 2011. A new QTL for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *J. Appl. Genetics* 52: 403 — 406.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy serdecznie dziękują pracownikom Małopolskiej Hodowli Roślin sp. z o.o. oraz Hodowli Roślin Smolice sp. z o.o. za udostępnienie materiału wyjściowego oraz wskazówki merytoryczne w trakcie prowadzenia badań.