

Tytuł zadania:

Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Numer zadania:

16 (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa Dz. U. z 2015 r. poz. 1170 oraz Dz. U. z 2016 r. poz. 1614)

Okres realizacji zadania:

01 stycznia 2024 r. – 31 grudnia 2024 r.

Planowane nakłady w zł:

492 000,00

Zespół Badawczy:

Kierownik:

Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak

Wykonawcy:

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek

Prof. UPP dr hab. Jan Bocianowski

Prof. UPP dr hab. Łukasz Wolko

Prof. UPP dr hab. Janetta Niemann

Prof. UPP dr hab. Tomasz Kosiada

Prof. UPP dr hab. Danuta Kurasiak - Popowska

dr hab. Dorota Weigt

dr inż. Sylwia Mikołajczyk

dr inż. Tomasz Jamruszka

Dr inż. Karolina Jarzyniak

mgr Aleksandra Sobiech



Kontakt:

Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Tel. 61 848 76 80

e-mail: agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl

Osoba do kontaktu w razie nieobecności kierownika:

Prof. UPP dr hab. Kurasiak - Popowska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Tel. 61 848 76 70

e-mail: danuta.kurasiak-popowska@up.poznan.p

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.803.5.202



Cele zadania w 2024 roku

Hipoteza badawcza: Identyfikacja nowych markerów molekularnych (związanych z cechami struktury plonu i odpornością roślin na fuzarium) w oparciu o wyniki mapowania asocjacyjnego i fizycznego może wpłynąć na skrócenie cyklu hodowlanego i obniżenie kosztów hodowli



Temat badawczy	Cel badań	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Koszty realizacji tematu badawczego	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo ¹)
1.	Celem tematu badawczego 1 jest identyfikacja nowych markerów sprzężonych z genami warunkującymi plon ziarna dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego oraz optymalizacja procedur diagnostycznych, służących do identyfikacji 10 markerów molekularnych wytypowanych w 2023 roku sprzężonych z cechami struktury plonu	1 - 12	340 000, 00	Całkowicie
2.	Celem tematu badawczego 2 jest identyfikacja nowych markerów sprzężonych z genami warunkującymi odporność roślin kukurydzy na fuzarium dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego oraz optymalizacja procedur diagnostycznych, służących do identyfikacji 9 markerów molekularnych wytypowanych w 2023 roku sprzężonych z odpornością roślin na fuzarium	1 - 12	152 000,00	Całkowicie



Temat badawczy 1

Materiał i Metody

Materiał roślinny



Materiał roślinny w temacie badawczym 1 stanowiło 20 genotypów referencyjnych pochodzących z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. Zostały one wykorzystane do identyfikacji wytypowanych w 2023 roku markerów sprzężonych z wysokością plonu. Do analiz ekspresji genów wykorzystano 10 genotypów referencyjnych dobrze i słabo plonujących pochodzących z podanych powyżej spółek hodowlanych. W 2024 roku do sekwencjonowania nowej generacji zostało przesłanych ostatnie 186 mieszańców F1. Linie rodzicielskie i pozostałe mieszańce F1 analizowane były w poprzednich latach badań. Było to podyktowane wymogami dotyczącymi równomiernego rozłożenia środków finansowych w poszczególnych latach badań.



Temat badawczy 2

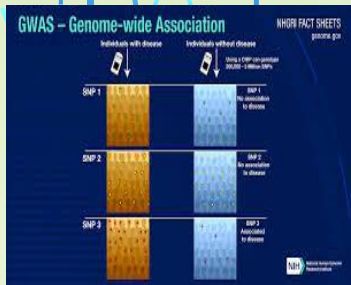
Materiał i Metody

Materiał roślinny

Materiał roślinny w temacie badawczym 2 stanowiło 20 genotypów referencyjnych pochodzących z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. Zostały one wykorzystane do identyfikacji wytypowanych w 2023 roku markerów sprzężonych z odpornością na fuzarium. Do analiz ekspresji genów wykorzystano 5 genotypów referencyjnych (4 odporne na fuzarium i 1 podatna na fuzarium jako kontrola negatywna). W 2024 roku do sekwencjonowania nowej generacji wysłano ostatnie 186 mieszańców F1. Linie rodzicielskie i pozostałe mieszańce F1 analizowane były w poprzednich latach badań. Było to podyktowane wymogami dotyczącymi równomiernego rozłożenia środków finansowych w poszczególnych latach badań.

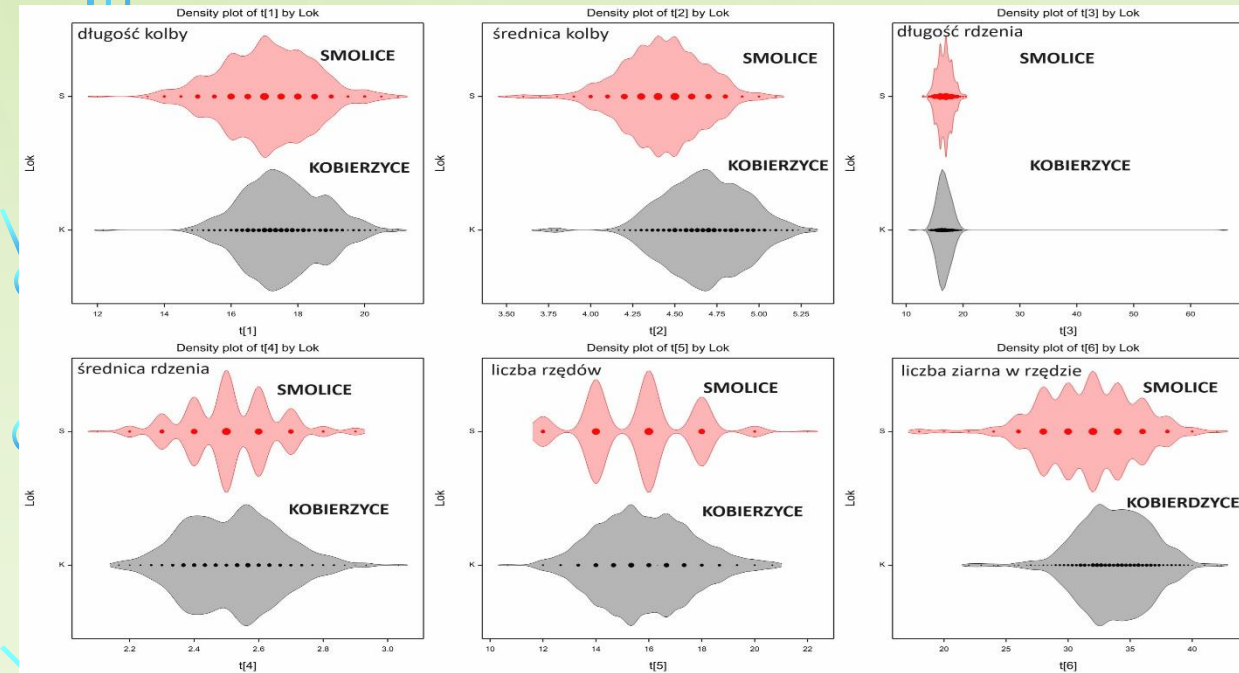
Metody wspólne dla obu tematów badawczych

- 1. Doświadczenie polowe** – założone w dwóch miejscowościach (Smolice, Kobierzyce) na poletkach 10m²
- 2. Izolacja DNA** – wykonana przy użyciu aparatu Maxwell i kitu z firmy Promega
- 3. Genotypowanie** – z wykorzystaniem techniki DArTseq. Usługa wykonana w Diversity Arrays Technology
- 4. Mapowanie asocjacyjne** – z wykorzystaniem analizy GWAS
- 5. Mapowanie fizyczne** – z wykorzystaniem narzędzia bioinformatycznego Basic Local Alignment Search Tool
- 6. Analiza funkcjonalna sekwencji genów** – z wykorzystaniem narzędzia Blast2Go
- 7. Projektowanie starterów** – z wykorzystaniem programu Primer 3 Plus
- 8. Łańcuchowa reakcja polimerazy** – identyfikacja genów odporności na fuzarium oraz genów związanych z wielkością plonu u 15 odpornych i wrażliwych oraz 15 dobrze i słabo plonujących genotypów kukurydzy została przeprowadzona z wykorzystaniem zaprojektowanych, specyficznych starterów
- 9. Elektroforeza** – prowadzona była w 2% żelu agarozowym, w buforze 1x TBE.
- 10. Analizy qPCR**

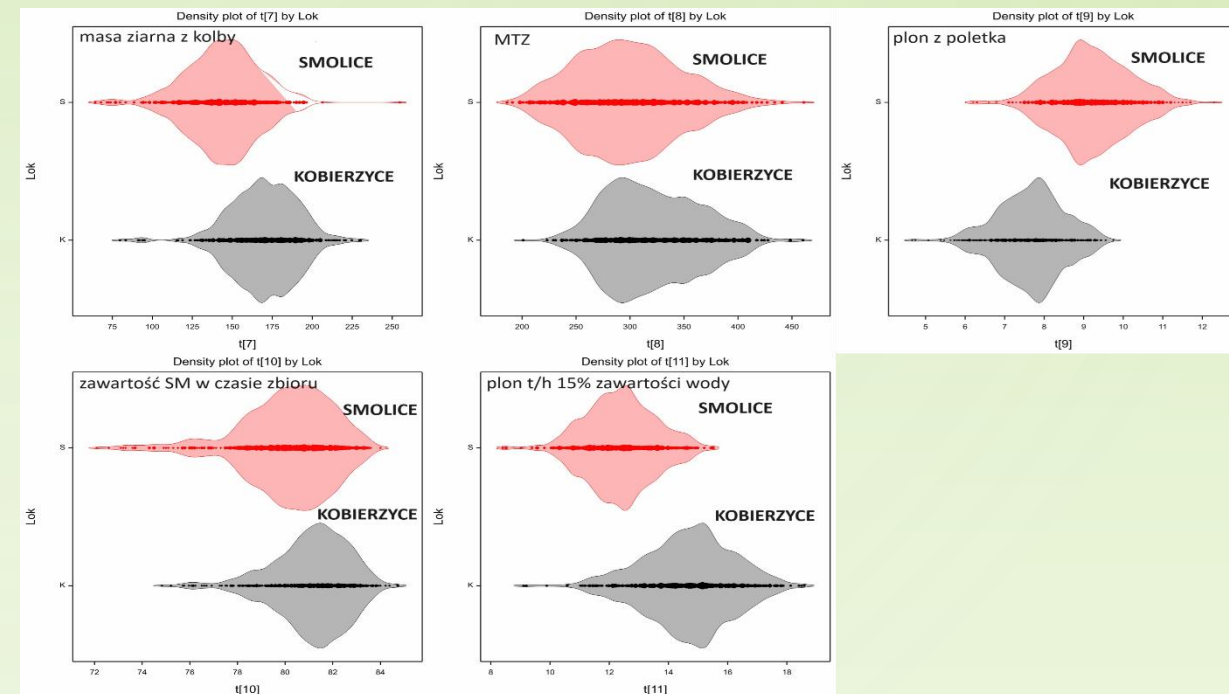


Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Doświadczenie polowe założone było w dwóch miejscowościach: Smolice 51° 42' 58.904" N 17° 13' 29.13" E oraz Kobierzyce 50° 58' 19.411" N 16° 55' 47.323" E, umożliwiło ono wykonanie i analizę pomiarów biometrycznych 500 mieszańców F₁. Pomiarów te zostały wykorzystane do mapowania asocjacyjnego. Po zbiorach prowadzone były obserwacje następujących cech struktury plonu: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów, liczba ziarna w rzędzie, masa ziarna z kolby, MTZ, plon z poletka, zawartość SM w czasie zbioru, plon t/h przy 15% zawartości wody. W celu zbadania rozkładu wszystkich analizowanych zmiennych w obu miejscowościach wykonano wykresy gęstości (Rys.1, Rys. 2). Figury na zamieszczonych wykresach gęstości obrazują, w jakich przedziałach skoncentrowane są wartości analizowanych cech np. długość kolby u większości analizowanych genotypów, w obu miejscowościach (Smolice, Kobierzyce) znajduje się w przedziale 16cm – 18cm, średnica kolby u większości analizowanych genotypów dla Smolic znajduje się w przedziale 4,25cm – 4,50cm a dla Kobierzyc 4,5cm – 4,75cm. (Rys. 1). Jak widać na załączonych wykresach rozkład analizowanych zmiennych różnił się pomiędzy miejscowościami dla: średnicy rdzenia, liczby rzędów, liczby ziarna w rzędzie, masy ziarna z kolby, plonu z poletka oraz plonu t/h przy 15% zawartości wody (Rys. 1 i Rys.2).



Rys. 1. Wykresy gęstości obrazujące rozkład analizowanych zmiennych dla cech: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów i liczba ziarna w rzędzie.



Rys. 2. Wykresy gęstości obrazujące rozkład analizowanych zmiennych dla cech: masa ziarna z kolby, MTZ, plon z poletka, zawartość SM w czasie zbioru i plon t/h przy 15% zawartości wody.

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

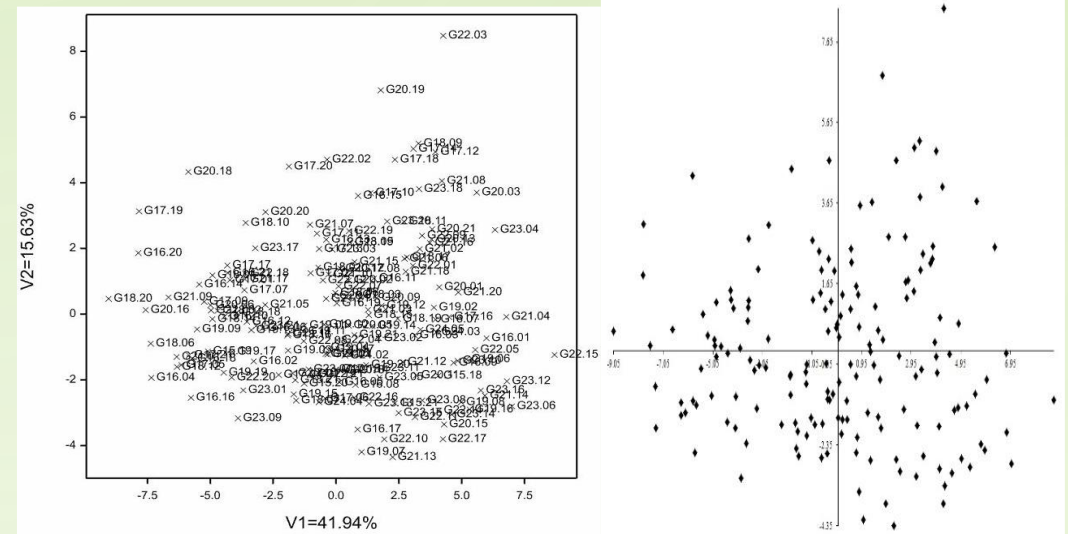
Przeprowadzono analizę wariancji pod kątem obserwowanych cech pomiędzy genotypami. Dla wszystkich cech zaobserwowano istotne zróżnicowanie pomiędzy genotypami. Analiza wariancji wykazała również istotne statystycznie zróżnicowanie dla wszystkich obserwowanych cech pomiędzy miejscowościami, w których było założone doświadczenie polowe (Tab. 1).

Tabela 4. Średnie kwadraty z analizy wariancji obserwowanych cech

Źródło zmienności	Mieszaniec	Błąd
Liczba stopni swobody	172	346
długość kolby [cm]	2.885 ***	0.4724
średnica kolby [cm]	0.08561 ***	0.01712
długość rdzenia [cm]	3.0157 ***	0.4496
średnica rdzenia [cm]	0.059356 ***	0.006924
liczba rzędów	7.5731 ***	0.7037
liczba ziaren w rzędzie	14.708 ***	2.741
masa ziarna z kolby [g]	608.9 ***	230.4
MTZ [g]	4994.3 ***	585.1
plon z poletka [kg]	1.4167 ***	0.2919
zawartość SM w czasie zbioru [%]	7.5033 ***	0.3281
plon t/ha 15% zawartość wody	4.304 ***	1.076
Fusarium kolb [skala 1-9]	0.393 ***	0.2004
Fusarium łodyg [%]	896.6 ***	400.4

*** $p < 0.001$

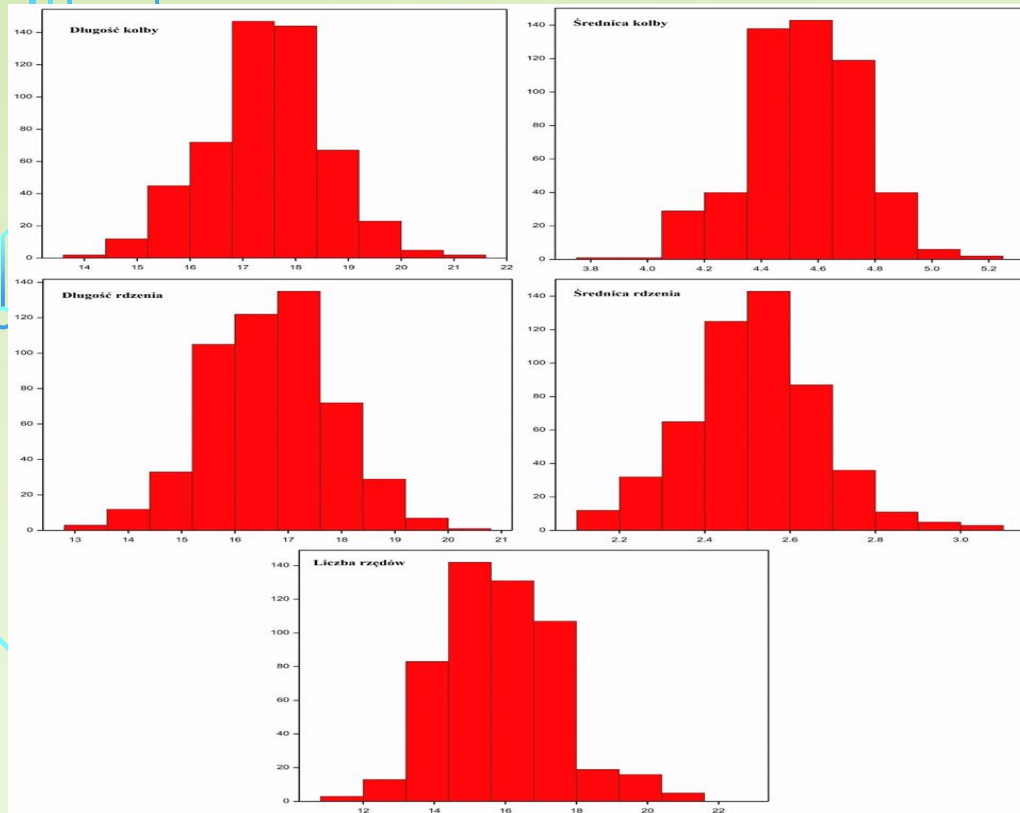
Aby określić relacje pomiędzy grupami zmiennych w zbiorze danych czyli obserwacji wielkości cech struktury plonu oraz plonu z poletka w obu miejscowościach zastosowano technikę wielowymiarową czyli analizę zmiennych kanonicznych. Wszystkie obserwowane cechy charakteryzowały się rozkładem normalnym. Można zauważyć, że niektóre formy mieszańcowe pod względem analizowanych cech odbiegają od średnich wartości cech dla analizowanej populacji (G22.03, G20.19, G20.18, G17.19, G16.20 oraz G18.20) (Rys. 3).



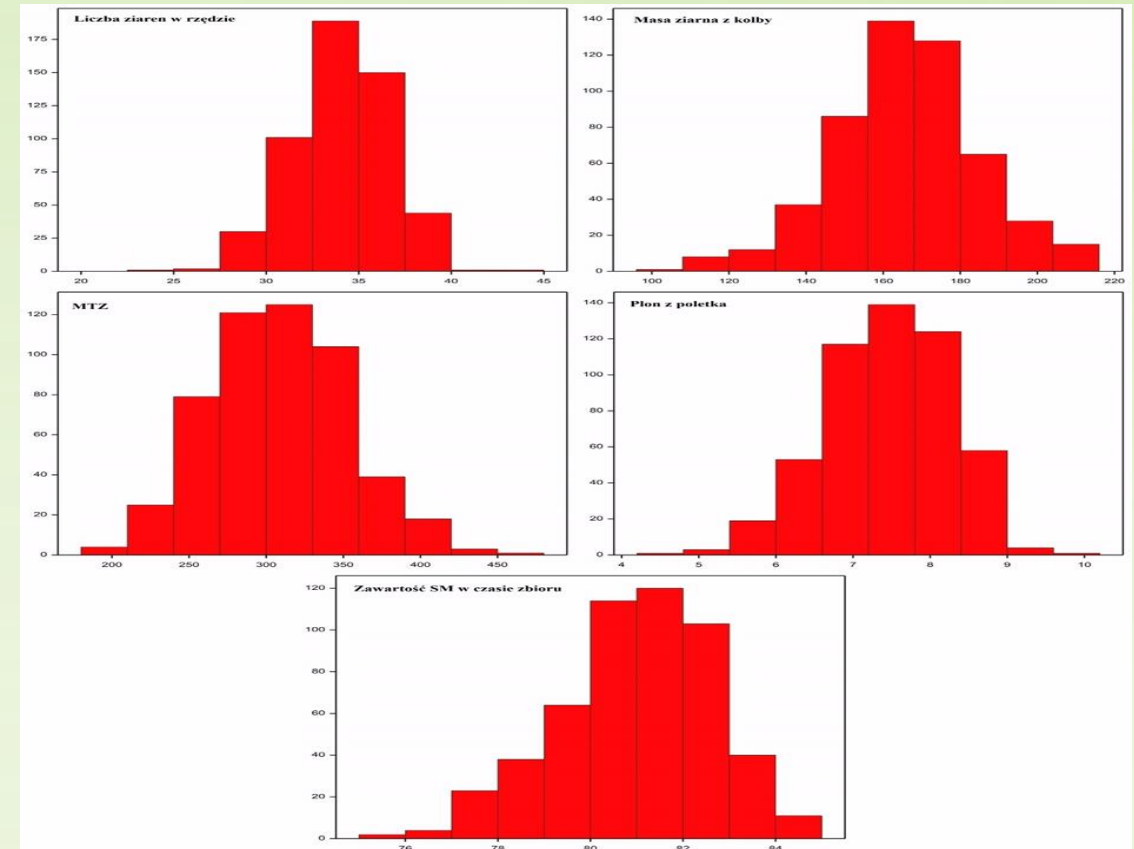
Rys. 3. Analiza zmiennych kanonicznych dla badanych cech.

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Wykorzystując dane z doświadczenia polowego prowadzonego w obu miejscowościach (Smolice i Kobierzyce) sprawdzono jaki jest rozkład analizowanych cech w obrębie badanej populacji. Analizy statystyczne wykazały, że dla wszystkich analizowanych cech w rozkład cech przyjmuje symetryczny kształt dzwonu, średnia i mediana były sobie równe (obie miary zlokalizowane były w środku rozkładu), 68% danych znajdowało się w przedziale do 1 odchylenia standardowego od średniej, 95% danych znajdowało się w przedziale do 2 odchylen standardowych od średniej, 99% danych znajdowało się w przedziale do 3 odchylen standardowych od średniej. Wobec powyższego można wywnioskować, że cechy charakteryzują się rozkładem normalnym a analizowanej populacji (Rys. 4 i Rys. 5).



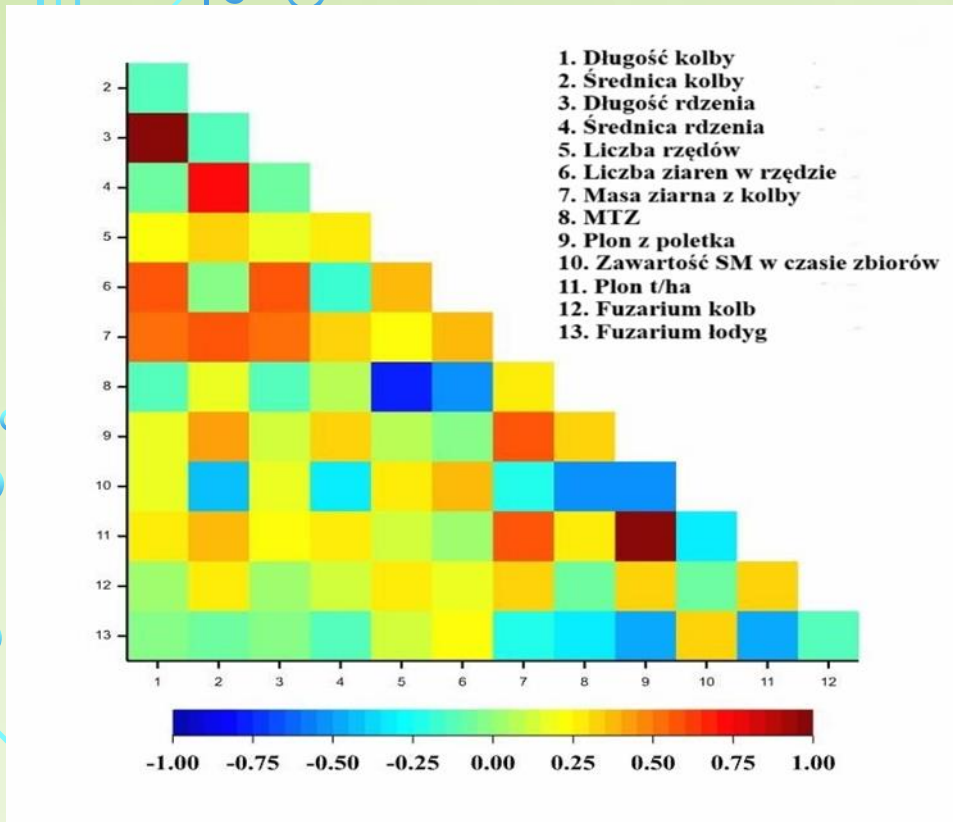
Rys. 4. Rozkład poszczególnych cech analizowanych w miejscowości Smolice.



Rys. 5. Rozkład poszczególnych cech analizowanych w miejscowości Kobierzyce.

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Dla doświadczeń założonych w Smolicach i Koberzycach analizowano korelacje pomiędzy obserwowanymi cechami. Wykazano, że najsilniej dodatnio skorelowane były ze sobą: plon z poletka i plon z hektara (98%), długość kolby i długość rdzenia (97%), liczba ziaren w rzędzie i MTZ (75%), średnica kolby i średnica rdzenia (71%), długość rdzenia i liczba ziaren w rzędzie (56%) (Rys. 5 i Tab. 7).



Rys. 5. Mapa ciepła przedstawiająca korelacje pomiędzy analizowanymi cechami struktury plonu w Smolicach i Koberzycach

	t[1]	t[2]	t[3]	t[4]	t[5]	t[6]	t[7]	t[8]	t[9]	t[10]	t[11]	t[12]
t[1]	-											
t[2]	0.12	-										
t[3]	0.97	0.15	-									
t[4]	-0.1	0.71	0.07	-								
t[5]	0.21	0.33	0.19	0.29	-							
t[6]	0.55	0.04	0.56	0.18	0.37	-						
t[7]	0.51	0.59	0.5	0.32	0.24	0.36	-					
t[8]	0.11	0.16	0.11	0.1	0.75	0.53	0.28	-				
t[9]	0.19	0.42	0.15	0.3	0.07	0.04	0.57	0.34	-			
t[10]	0.18	0.41	0.17	0.34	0.26	0.39	0.21	0.53	0.51	-		
t[11]	0.25	0.37	0.2	0.26	0.14	0.04	0.58	0.25	0.98	0.33	-	
t[12]	0.05	0.25	0.02	0.15	0.27	0.18	0.33	0.07	0.32	-0.1	0.33	-
t[13]	0.04	0.09	0.04	0.11	0.1	0.21	0.21	0.31	0.48	0.32	0.45	0.14
	***	**	*									

Tab. 7. Korelacje pomiędzy analizowanymi cechami struktury plonu w Smolicach i Koberzycach.

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

W oparciu o zidentyfikowane markery molekularne SNP i SilicoDArT wykonano dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy 186 analizowanymi mieszaneckami (Rys. 7). Na dendrogramie można wyróżnić 7 wyraźnie zaznaczonych grup podobieństwa. Pierwsza grupa obejmuje 23 genotypy od numeru G21.17 do G16.09, druga grupa obejmuje 21 genotypów od numeru G18.11 do G20.11. W skład trzeciej grupy wchodzi 27 genotypów od numeru G22.10 do G22.15, w skład czwartej grupy wchodzi 29 genotypów od numeru G19.21 do G22.01. Piątą grupę stanowi 26 genotypów od numeru G22.06 do G23.01, szóstą grupę stanowi 18 genotypów od numeru G19.04 do G20.06. W skład siódmej ostatniej grupy wchodzi 29 genotypów od numeru G19.02 do G21.05. Do krzyżowań heterozyjnych najlepiej dobierać genotypy należące do różnych grup podobieństwa genetycznego (Rys. 7).



Rys 7. Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne pomiędzy analizowanymi genotypami

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Tabela 9. Markery molekularne SilicoDArT i SNP istotnie związane z analizowanymi cechami struktury plonu w miejscowościach Kobierzyce i Smolice (istotne powiązania wybrane przy $p < 0,001$ z poprawką na wielokrotne testowanie metodą Benjamini-Hochberg)

Cecha	Liczba markerów SilicoDArT i SNP	Efekt			Procent wyjaśnianej zmienności			LOD		
		Min.	Max.	Średnia	Min.	Max.	Średnia	Min.	Max.	Średnia
długość kolby [cm]	6564	-0,88	0,905	-0,03	1,7	19,1	8,33	1,34	8,96	4,17
średnica kolby [cm]	2636	-0,153	0,152	-0,01	1,7	16,9	3,87	1,3	7,93	2,26
długość rdzenia [cm]	1983	-0,979	1,151	-0,002	1,7	11,8	2,67	1,3	5,65	1,74
średnica rdzenia [cm]	3698	-0,1026	0,1051	0,006	1,7	11,3	2,93	1,3	5,43	1,86
liczba rzędów	6960	-2,119	2,064	-0,066	1,7	42,1	20,96	1,3	11	8,17
liczba ziaren w rzędzie	6721	-2,423	2,522	-0,073	1,7	30,9	13,71	1,3	11	6,57
masa ziarna z kolby [g]	1490	-12,98	10,1	-1,35	1,7	16,5	3,41	1,3	7,74	2,06
MTZ [g]	6616	-56,04	56,45	1,27	1,7	47,8	24,54	1,3	11	8,77
plon z poletka [kg]	1237	-0,659	0,573	-0,015	1,7	17,4	3,66	1,3	8,18	2,17
zawartość SM w czasie zbioru [%]	6857	-1,595	1,847	-0,01	1,7	32,7	12,4	1,3	11	5,97
plon t/ha 15% zawartość wody	1114	-1,048	0,976	-0,04	1,7	15,5	3,56	1,3	7,32	2,13
Łącznie	45 876									

W wyniku sekwencjonowania nowej generacji otrzymano łącznie 45 876 istotnych dla plonu i cech struktury plonu markerów molekularnych SilicoDArT i SNP. Aby określić przydatność zidentyfikowanych markerów zastosowano $MAF > 0.25$ oraz liczbę obserwacji brakujących $< 10\%$ (Tab.9). Najwięcej markerów w obu miejscowościach (Smolice i Kobierzyce) związanych było z: liczbą rzędów (6 960), zawartością SM w czasie zbioru (6 616), liczbą ziarna w rzędzie (6 721), MTZ (6 616) oraz długością kolby (6 564). Najmniej markerów w obu miejscowościach związanych było z plonem t/ha przy 15% zawartości wody (1 114) oraz plonem z poletka (1 237). W celu zawężenia liczby markerów do mapowania fizycznego spośród wszystkich istotnych wybrano 10, które były związane z tymi samymi cechami w obu miejscowościach (Kobierzyce i Smolice) (Tab. 10).

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Wnioski (opisać jak w publikacji)

1. Obserwacje fenotypowe pozwoliły zaobserwować istotne zróżnicowanie pomiędzy genotypami. Analiza wariancji wykazała również istotne statystycznie zróżnicowanie dla wszystkich obserwowanych cech pomiędzy miejscowościami, w których było założone doświadczenie polowe.
2. Analiza zmiennych kanonicznych wykazała, że wszystkie obserwowane cechy charakteryzowały się rozkładem normalnym. Można zauważyć, że niektóre genotypy mieszańcowe pod względem wartości obserwowanych cech odbiegały od średnich wartości cech dla analizowanej populacji (G22.03, G20.19, G20.18, G17.19, G16.20 oraz G18.20).
3. Dla doświadczeń założonych w Smolicach i Kobierzycach analizowano korelacje pomiędzy obserwowanymi cechami. Wykazano, że najsilniej dodatnio skorelowane były ze sobą: plon z poletka i plon z hektara (98%), długość kolby i długość rdzenia (97%), liczba ziaren w rzędzie i MTZ (75%), średnica kolby i średnica rdzenia (71%), długość rdzenia i liczba ziaren w rzędzie (56%).
4. W wyniku sekwencjonowania nowej generacji otrzymano łącznie 45 876 istotnych dla plonu i cech struktury plonu markerów molekularnych SilicoDArT i SNP. Najwięcej markerów w obu miejscowościach (Smolice i Kobierzyce) związanych było z: liczbą rzędów (6 960), zawartością SM w czasie zbioru (6 616), liczbą ziarna w rzędzie (6 721), MTZ (6 616) oraz długością kolby (6 564). Najmniej markerów w obu miejscowościach związanych było z plonem t/ha przy 15% zawartości wody (1 114) oraz plonem z poletka (1 237).
5. W oparciu o zidentyfikowane markery molekularne SNP i SilicoDArT wykonano dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy 186 analizowanymi mieszańcami. Na dendrogramie można wyróżnić 7 wyraźnie zaznaczonych grup podobieństwa. Do krzyżowań heterozyjnych najlepiej dobierać genotypy należące do różnych grup podobieństwa genetycznego.

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 1 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Wnioski (opisać jak w publikacji)

6. Spośród 45 876 markerów SilicoDArT i SNP istotnie związanych z analizowanymi cechami struktury plonu i plonem wybrano 10, które były istotne, dla tych samych cech w obu miejscowościach (Kobierzyce i Smolice).

7. Spośród 10 istotnych markerów 3 (27435, 26607 i 56891) różnicowały analizowane genotypy wysoko i nisko plonujące. W przypadku markera numer 27435 specyficzny produkt amplifikacji o wielkości 396pz pojawił się u 7 genotypów wysoko plonujących (1wp, 2wp, 4wp, 5wp, 6wp, 7wp oraz 10wp) oraz 2 nisko plonujących (3np oraz 7np). Z kolei w przypadku markera numer 26607 specyficzny produkt amplifikacji o wielkości 180pz pojawił się u 5 genotypów wysoko plonujących (2wp, 3wp, 4wp, 6wp oraz 7wp) a także 2 nisko plonujących (3np oraz 7np). Analiza markera numer 56891 wykazała, że specyficzny produkt amplifikacji o wielkości 192pz pojawił się u wszystkich genotypów wysoko plonujących i u trzech genotypów niskoplonujących (4np, 5np oraz 10np).

8. W ramach zadania 1 analizowano ekspresję 6 genów kandydujących wewnątrz, których zlokalizowane zostały wyselekcjonowane w 2022 roku markery molekularne: Cinnamoyl-CoA reductase 1 (*CCR*), WAT1-related protein At1g09380 (*Arabidopsis* *WAT1*), Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit (*EIF3C*), RNA polymerase II transcriptional coactivator KELP (*KELP 0*), Aspartate aminotransferase (*AAT*). Dwa geny, *CCR1* i *AAT*, miały istotny wpływ na plon ocenianych genotypów w ciągu trzech lat obserwacji. Procent zmienności plonu wyjaśniony znormalizowaną ekspresją genu *CCR1* wynosił 11,40% w 2022 r., 15,30% w 2023 r. i 15,60% w 2024 r. W przypadku genu *AAT* procenty wynosiły: 23,10% w 2022 r., 13,20% w 2023 r. i 22,80% w 2024 r. (Tabela 10). Ponadto gen *SUT1* miał również istotny wpływ na plon kukurydzy, przy wielkości efektu 0,33, wyjaśniając 10,00% zmienności plonu wśród genotypów.

9. Stwierdzono, że poziomy transkryptów czterech genów, mianowicie LOC103639851 (marker 14506), LOC100285609 (marker 3233), LOC100282625 (marker 11657) i LOC541615 (marker 12812) był zwiększony w ziarnie między innymi w owocni/aleuronie, bielmie, zarodku i kielkujących ziarnach. Ekspresja LOC100285609 (marker 3233) była również zwiększona w międzywęźlach, podczas gdy ekspresja LOC541615 (marker 12812) była zwiększona w korzeniach. Ekspresja genu LOC100282883 (marker 16703) była zwiększona głównie w międzywęźlach.

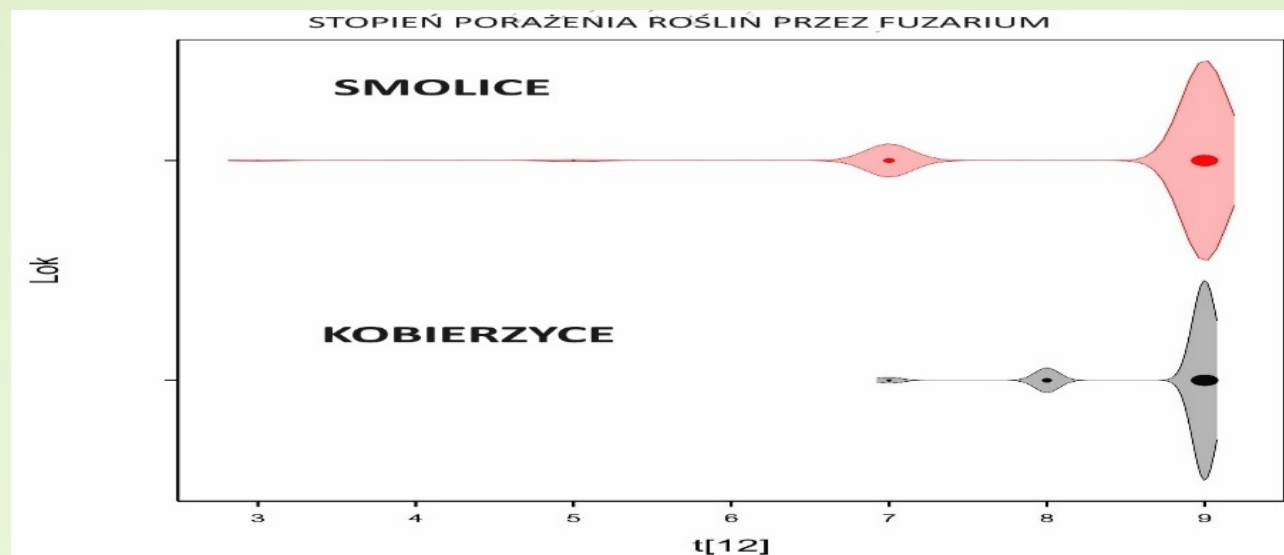
10. Aby potwierdzić istotność uzyskanych wyników metodą qPCR w tym samym czasie przeprowadzona analiza z wykorzystaniem metody ddPCR. W wyniku przeprowadzonych analiz genami, które wykazywały wyższą ekspresję w przypadku genotypów wysoko plonujących były tak samo jak w przypadku analiz qPCR: Cinnamoyl-CoA reductase 1 (*CCR1*) oraz aspartate aminotransferase 1 (*AAT*). Dodatkowo wyższą ekspresję w przypadku genotypów wysoko plonujących zaobserwowano dla genu eukaryotic translation initiation factor 3 subunit c (*EIF3C*).

MIERNIKI DLA TEMATU BADAWCZEGO 1

L.p.	Miernik ²	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów referencyjnych, na których będą testowane nowo zidentyfikowane w 2023 roku markery SilicoDArT i SNP związane z cechami struktury plonu.	20	20
2.	Liczba genotypów referencyjnych, które będą poddawane analizie ekspresji wybranych genów.	10	10
3.	Liczba mieszańców F ₁ poddanych sekwencjonowaniu nowej generacji, z którego wyniki zostaną wykorzystane do mapowania asocjacyjnego i fizycznego.	186	186
4.	Liczba wyselekcjonowanych w 2024 roku markerów związanych z cechami struktury plonu, dla których w 2025 roku będą podjęte próby opracowania warunków PCR i multiplex PCR.	10	10

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 2 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Doświadczenie polowe założone było w dwóch miejscowościach: Smolice 51° 42' 58.904" N 17° 13' 29.13" E oraz Kobierzycy 50° 58' 19.411" N 16° 55' 47.323" E, umożliwiło wykonanie obserwacji stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium. Obserwacje te zostały wykorzystane do mapowania asocjacyjnego. W celu analizy badanej zmiennej w obu miejscowościach wykonano wykresy gęstości (Rys.1). Figury na zamieszczonych wykresach gęstości obrazują, w jakich przedziałach skoncentrowane są wartości analizowanej cechy. W Smolicach najczęściej genotypów posiada odporność na poziomie 7 i 9 (w skali 9°; 1 – wrażliwe, 9 – odporne) natomiast w Kobierzycach najczęściej genotypów charakteryzuje się odpornością na poziomie 8 i 9 (Rys. 1).



Rys. 1. Wykresy gęstości obrazujące rozkład analizowanej zmiennej (stopień odporności roślin kukurydzy na fuzarium).

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 2 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

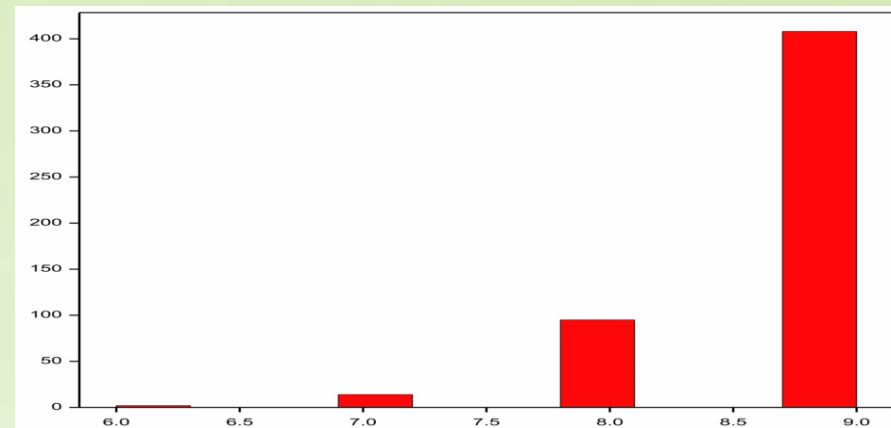
Przeprowadzono analizę wariancji pod kątem stopnia porażenia obserwowanych cech pomiędzy genotypami. Dla obydwu cech (fuzarium kolb i fuzarium łodyg) zaobserwowano istotne różnicowanie pomiędzy genotypami. Analiza wariancji wykazała również istotne statystyczne różnicowanie dla wszystkich obserwowanych cech pomiędzy miejscowościami, w których było założone doświadczenie polowe (Tab. 3).

Tabela 3. Średnie kwadraty z analizy wariancji dla stopnia porażenia kukurydzy przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

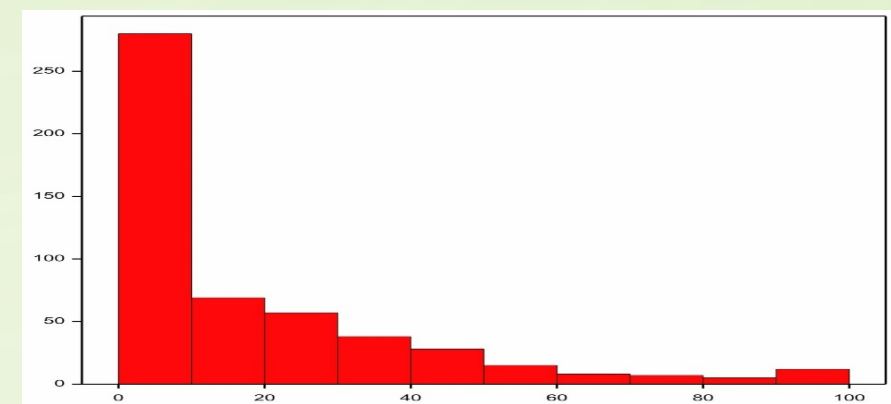
Źródło zmienności	Mieszaniec	Błąd
Liczba stopni swobody	172	346
Fuzarium kolb [skala 1-9]	0.393 ***	0.2004
Fuzarium łodyg [%]	896.6 ***	400.4

*** $p < 0.001$

Wykorzystując dane z doświadczenia polowego prowadzonego niezależnie w obu miejscowościach (Smolice i Kobierzyce) sprawdzono jaki jest rozkład stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium w obrębie badanej populacji. Podobnie jak w roku 2023 analizy statystyczne wykazały, że w przypadku tej cechy mamy do czynienia z rozkładem Poissona odwróconym.



Rysunek 2. Rozkład stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium (kolby).



Rysunek 3. Rozkład stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium (łodygi).

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 2 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

1. W celu analizy badanej zmiennej w obu miejscowościach wykonano wykresy gęstości, które obrazują, w jakich przedziałach skoncentrowane są wartości analizowanej cechy. W Smolicach najczęściej genotypów posiada odporność na poziomie 7 i 9 (w skali 9^o; 1 – wrażliwe, 9 – odporne) natomiast w Kobierzycach najczęściej genotypów charakteryzuje się odpornością na poziomie 8 i 9.
2. Dla obydwu cech (fuzarium kolb i fuzarium łodyg) zaobserwowano istotne zróżnicowanie pomiędzy genotypami. Analiza wariancji wykazała również istotne statystycznie zróżnicowanie dla wszystkich obserwowanych cech pomiędzy miejscowościami, w których było założone doświadczenie polowe.
3. Analiza korelacji wykazała, że w przypadku fuzarium kolb najsilniej dodatnio skorelowane z tą chorobą były następujące cechy: masa ziarna z kolby (33%), plon t/ha (33%), plon z poletka (32%), liczba rzędów (27%) oraz średnica kolby (25%). Jeżeli chodzi o fuzarium łodyg najsilniej dodatnio skorelowane z tą chorobą były: plon z poletka (48%), plon t/ha (45%), MTZ (32%) a także zawartość suchej masy (31).
4. W oparciu o zidentyfikowane markery molekularne SNP i SilicoDArT wykonano dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy 186 analizowanymi mieszańcami. Na dendrogramie można wyróżnić 7 wyraźnie zaznaczonych grup podobieństwa. Pierwsza grupa obejmuje 23 genotypy od numeru G21.17 do G16.09, druga grupa obejmuje 21 genotypów od numeru G18.11 do G20.11. W skład trzeciej grupy wchodzi 27 genotypów od numeru G22.10 do G22.15, w skład czwartej grupy wchodzi 29 genotypów od numeru G19.21 do G22.01. Piątą grupę stanowi 26 genotypów od numeru G22.06 do G23.01, szóstą grupę stanowi 18 genotypów od numeru G19.04 do G20.06. W skład siódmej ostatniej grupy wchodzi 29 genotypów od numeru G19.02 do G21.05. Do krzyżowań heterozyjnych najlepiej dobierać genotypy należące do różnych grup podobieństwa genetycznego.

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 2 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Wnioski

5. W wyniku sekwencjonowania nowej generacji otrzymano łącznie 6 709 istotnych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium*. Spośród 6 709 markerów 5 714 markerów związanych było odpornością na fuzarium kolb, a 995 z odpornością na fuzarium łodyg.
6. Spośród 6 709 markerów SilicoDArT i SNP istotnie związanych z odpornością roślin kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* wybrano 10, które były istotne w obu miejscowościach (Kobierzyce i Smolice).
7. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że na 10 badanych markerów wytypowanych w 2023 roku, 1 marker (20376) różnicował genotypy odporne i wrażliwe na fuzarium. Specyficzny produkt amplifikacji o wielkości 657pz pojawił się u wszystkich genotypów odpornych oraz w ośmiu genotypach wrażliwych (1w, 2w, 4w, 5w, 6w, 7w, 9w i 11w).
8. Wstępne analizy statystyczne wykazały, że gen Putrescine hydroxycinnamyltransferase (LOC103649226) charakteryzował się najwyższym poziomem ekspresji po inokulacji. Wyniki w przypadku tego genu pokrywają się z wynikami z roku 2023 co wskazuje na istotną rolę genu Putrescine hydroxycinnamyltransferase (LOC103649226) w reakcji odpornościowej na stres związany z porażeniem roślin przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

MIERNIKI DLA TEMATU BADAWCZEGO 2

L.p.	Miernik ²	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów referencyjnych, na których będą testowane nowo zidentyfikowane w 2023 roku markery SilicoDArT i SNP związane z odpornością na fuzarium.	20	20
2.	Liczba genotypów referencyjnych, które będą poddawane analizie ekspresji wybranych genów.	5	5
3.	Liczba mieszańców F ₁ poddanych sekwencjonowaniu nowej generacji, z którego wyniki zostaną wykorzystane do mapowania asocjacyjnego i fizycznego.	186	186
4.	Liczba wyselekcjonowanych w 2024 roku markerów związanych z odpornością roślin na grzyby z rodzaju Fusarium, dla których w 2025 roku będą podjęte próby opracowania warunków PCR i multiplex PCR.	10	10

Wyniki i Wnioski – temat badawczy 2 Zadanie nr 16. Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	1. Tomkowiak A.*, Jamruszka T.*, Bocianowski J., Sobiech A., Jarzyniak K., Lenort M., Mikołajczyk S., Żurek M. Transcriptomic Characterization of Genes Harboring Markers Linked to Maize Yield. <i>Genes</i> 2024, 15(12), 1558; https://doi.org/10.3390/genes15121558 TEMAT BADAWCZY 1 Punktacja wg MNiSW: 100 IF: 2,8	Publikacja oryginalna**	1	1