

STRESZCZENIE ZE SPRAWOZDANIA MERYTORYCZNEGO Z REALIZACJI ZADANIA NA RZECZ POSTĘPU BIOLOGICZNEGO W PRODUKCJI ROŚLINNEJ W 2024 ROKU

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

Opis tematów badawczych

Temat badawczy 1

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.

Cel tematu badawczego 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

Materiały 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.

Metody

Doświadczenie polowe, szklarniowe i w fitotronie

Doświadczenie z genotypami referencyjnymi (20) zostało założone w jednym powtórzeniu w szklarni należącej do Katedry Genetyki i Hodowli Roślin oraz w trzech powtórzeniach na polkach, w rolniczym gospodarstwie Dłoi należącym do UP w Poznaniu. Genotypy zostały wysiane na polkach o wielkości 10m², w układzie bloków losowanych kompletnych, w trzech powtórzeniach. Spośród 20 genotypów referencyjnych 10 zostało wysiane w fitotronie, w kontrolowanych warunkach. W szklarni i fitotronie rośliny zostały wysiane w donicach. W trakcie oraz po zakończeniu doświadczeń prowadzone były obserwacje cech morfologicznych. Po zbiorach prowadzone były obserwacje następujących cech struktury plonu: dł. kolby, średnica kolby, dł. rdzenia, średnica rdzenia, ilość rzędów, ilość ziarniaków w rzędzie oraz MTN.

Izolacja DNA

Izolacja DNA z 186 mieszańców F₁, które zostały przekazane do sekwencjonowania nowej generacji była prowadzona przy użyciu kitu z firmy Promega (w ubiegłych latach izolowane były linie rodzicielskie i pozostałe mieszańce). Izolacja DNA z 20 genotypów referencyjnych była prowadzona przy użyciu kitu z firmy A&A Biotechnology.

Izolacja mRNA

Izolacja RNA z 30 roślin referencyjnych (10 genotypów x 3 powtórzenia), które były poddawane analizie ekspresji genów, była prowadzona przy użyciu kitu z firmy Promega.

Genotypowanie

Genotypowanie zostało wykonane z wykorzystaniem technologii DArTseq, opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Sekwencjonowanie wykonano za pomocą platformy do

NGS, Illuminy, wg metodyki opisanej szczegółowo na stronie firmy Diversity Arrays Technology (<https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/>).

Mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem analizy GWAS

Za pomocą analizy GWAS zostało wykonane mapowanie asocjacyjne dla plonu oraz cech struktury plonu 186 mieszańców F₁ kukurydzy. Mapowanie to zostało wykonane na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania. Dane genotypowe zostały otrzymane z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiły wyniki polowe dotyczące wielkości plonu oraz cech struktury plonu.

Mapowanie fizyczne

Sekwencje markerów silicoDArT i SNP wybrane na podstawie analizy GWAS, zostały poddane analizie BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool), polegającej na przeszukiwaniu baz danych w celu znalezienia sekwencji o wysokiej homologii względem wybranych sekwencji markerów silicoDArT i SNP. Analizy te wykonane zostały w serwisie URGI (Unité de Recherche Génomique Info) z kompletnie sekwencjonowanym genomem kukurydzy. Program URGI posłużył do wskazania lokalizacji chromosomowych wyszukanych sekwencji podobnych do sekwencji analizowanych i wyznaczył ich lokalizację fizyczną.

Analiza funkcjonalna sekwencji genów

Analiza funkcjonalna wykonana została w programie Blast2GO. Analizie poddane zostały sekwencje wszystkich genów zlokalizowanych w obszarze chromosomów wyznaczonych na podstawie wykonanej analizy BLAST w serwisie URGI.

Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych polimorfizmów silicoDArT i SNP związanych z plonem i jego cechami

Dla każdego markera zaprojektowano pary starterów celem przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), przy czym jeden starter obejmował zidentyfikowany Indel lub SNP, a drugi był komplementarny do sekwencji sąsiadującej z analizowanym markerem. W przypadku identyfikacji SNP, polimorficzne pozycje nukleotydów zlokalizowano na końcu 3' odpowiedniego startera. Ponadto, aby zwiększyć różnicę w wydajności inicjacji amplifikacji pomiędzy sekwencjami markerowymi i niemarkerowymi zawierającymi różne SNP, przedostatni nukleotyd na końcu 3' każdego startera obejmującego SNP został zastąpiony odpowiednim niekomplementarnym nukleotydem zgodnie z Little (2021).

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Identyfikacja nowych markerów sprzężonych z genami związanymi z analizowanymi cechami struktury plonu została przeprowadzona z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Elektroforeza

Elektroforeza produktów reakcji PCR była prowadzona w 2 % żelu agarozowym, z dodatkiem 1 µl roztworu Midori Green, przez 2h pod napięciem 100 V. W celu identyfikacji mas molekularnych użyto marker wielkości prążków O'RangeRuler 50bp i 100bp firmy Fermentas. Wizualizacja rozdzielonych fragmentów DNA odbywała się z wykorzystaniem promieni UV i została zarejestrowana na zdjęciach cyfrowych z zastosowaniem systemu wizualizacji i dokumentacji żeli BIORAD.

Pobranie materiału roślinnego do izolacji

Materiał roślinny pobrano z roślin znajdujących się w fitotronie. Materiał stanowiło 10 genotypów referencyjne kukurydzy (5 dobrze plonujących oraz 5 słabo plonujących). Genotypy wysiane zostały w trzech powtórzeniach biologicznych. Łącznie wysianych zostało 30 rośliny (10 genotypów referencyjnych × 3 powtórzenia).

Izolacja mRNA

Do izolacji mRNA wykorzystano kit Maxwell® RSC Plant RNA Kit z firmy Promega. Izolacja wykonana została zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Koncentracja mRNA sprawdzona była za pomocą spektrofotometru DeNovix.

Synteza cDNA

Synteza cDNA przeprowadzona była przy użyciu zestawu iScript cDNA Synthesis Kit z firmy BIO-RAD.

Analiza ekspresji z wykorzystaniem reakcji qPCR

Materiałem badawczym było 30 prób otrzymanego wcześniej cDNA z fragmentów mRNA. Startery zostały zaprojektowane bazując na sekwencjach wybranych genów kandydujących. Reakcja RT-qPCR przeprowadzona była za pomocą zestawu iTaq Universal SYBR Green Supermix przy użyciu urządzenia CFX Connect Real-Time PCR Detection System z firmy BIO-RAD dostępnego w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

Metoda HRM-PCR

Analiza HRM rozpoczęła się od reakcji PCR, w której nastąpiła amplifikacja zdefiniowanego regionu DNA, będącego przedmiotem badań, w obecności barwnika wiążącego się z dsDNA.

Wyniki

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.

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, G18.20 oraz G22.15).

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%).

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), wartością 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 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 heterozygicznych najlepiej dobierać genotypy należące do różnych grup podobieństwa genetycznego.

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).

Spośród 10 istotnych markerów wytypowanych w 2023 roku 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).

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.

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.

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*).

Temat badawczy 2

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.

Cel tematu badawczego 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

Materiały 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.

Metody

Doświadczenie polowe, szklarniowe i w fitotronie

Doświadczenie z genotypami referencyjnymi (20) zostało założone w jednym powtórzeniu w szklarni należącej do Katedry Genetyki i Hodowli Roślin oraz w trzech powtórzeniach

na poletkach, w rolniczym gospodarstwie Dłóń należącym do UP w Poznaniu. Genotypy zostały wysiane na poletkach o wielkości 10m², w układzie bloków losowanych kompletnych, w trzech powtórzeniach. Spośród 20 genotypów referencyjnych 5 zostało wysiane w fitotronie, w kontrolowanych warunkach. W szklarni i fitotronie rośliny zostały wysiane w donicach. W trakcie oraz po zakończeniu doświadczeń prowadzone były obserwacje stopnia porażenia roślin przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Izolacja DNA

Izolacja DNA z ostatnich 186 mieszańców F₁, które zostały przekazane do sekwencjonowania nowej generacji była prowadzona przy użyciu kitu z firmy Promega (w ubiegłych latach izolowane były linie rodzicielskie i pozostałe mieszańce). Izolacja DNA z 20 genotypów referencyjnych była prowadzona przy użyciu kitu z firmy A&A Biotechnology.

Izolacja mRNA

Izolacja RNA z 75 roślin referencyjnych (5 genotypów x 3 powtórzenia biologiczne x 5 czasów), które były poddawane analizie ekspresji genów, była prowadzona przy użyciu zestawu odczynników z firmy Promega. Do analiz ekspresji rośliny były pobierane przed inokulacją oraz 6h, 12h, 24h i 48h po inokulacji. Łącznie analizowano 75 prób.

Genotypowanie

Genotypowanie wykonano z wykorzystaniem technologii DArTseq, opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Sekwencjonowanie za pomocą platformy do NGS, Illuminy odbywało się wg metodyki opisanej szczegółowo na stronie firmy Diversity Arrays Technology (<https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/>).

Mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem analizy GWAS

Za pomocą analizy GWAS zostało wykonane mapowanie asocjacyjne dla plonu oraz cech struktury plonu 186 mieszańców F₁ kukurydzy. Mapowanie to zostało wykonane na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania (fenotypowanie dla analizowanych w 2024 roku 186 mieszańców F₁ odbyło się w roku 2022 i 2023). Dane genotypowe zostały otrzymane z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiły wyniki polowe dotyczące stopnia porażenia roślin przez grzyby z fodzaju *Fusarium*.

Mapowanie fizyczne

Sekwencje markerów silicoDArT i SNP wybrane na podstawie analizy GWAS, zostały poddane analizie BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool), polegającej na przeszukiwaniu baz danych w celu znalezienia sekwencji o wysokiej homologii względem wybranych sekwencji markerów silicoDArT i SNP. Analizy te wykonane zostały w serwisie URGI (Unité de Recherche Génomique Info) z kompletnie sekwencjonowanym genomem kukurydzy.

Analiza funkcjonalna sekwencji genów

Analiza funkcjonalna wykonana została w programie Blast2GO. Analizie poddane zostały sekwencje wszystkich genów zlokalizowanych w obszarze chromosomów wyznaczonych na podstawie wykonanej analizy BLAST w serwisie URGI. Celem było uzyskanie informacji o biologicznej funkcji sekwencji genów znajdujących się w wyznaczonym rejonie chromosomów.

Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych polimorfizmów silicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Dla każdego markera zaprojektowano pary starterów reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), przy czym jeden starter obejmował zidentyfikowany Indel lub SNP, a drugi był komplementarny do sekwencji sąsiadującej z analizowanym markerem. W przypadku identyfikacji SNP, polimorficzne pozycje nukleotydów zlokalizowano na końcu 3' odpowiedniego startera. Ponadto, aby zwiększyć różnicę w wydajności inicjacji amplifikacji pomiędzy sekwencjami markerowymi i niemarketowymi zawierającymi różne SNP, przedostatni nukleotyd na końcu 3' każdego startera obejmującego SNP został zastąpiony odpowiednim niekomplementarnym nukleotydem zgodnie z Little (2021).

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Identyfikacja nowych markerów sprzężonych z genami związanymi z odpornością roślin kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* została przeprowadzona z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Elektroforeza

Elektroforeza produktów reakcji PCR była prowadzona w 2 % żelu agarozowym, z dodatkiem 1 µl roztworu Midori Green, przez 2 h pod napięciem 100 V. W celu identyfikacji mas molekularnych użyto marker wielkości prążków O'RangeRuler 50bp i 100bp firmy Fermentas. Wizualizacja rozdzielonych fragmentów DNA odbywała się z wykorzystaniem promieni UV i została zarejestrowana na zdjęciach cyfrowych z zastosowaniem systemu wizualizacji i dokumentacji żeli BIORAD.

Założenie doświadczenia w fitotronie

Doświadczenie zostało założone w kontrolowanych warunkach w fitotronie. Materiałem roślinnym użytym do badań było 5 genotypów referencyjnych kukurydzy (4 odporne na fuzarium oraz 1 podatny na fuzarium jako kontrola negatywna). Genotypy wysiane zostały w trzech powtórzeniach biologicznych i zebrane w 5 terminach czasowych. Łącznie analizowanych było 75 roślin (5 genotypów referencyjnych × 3 powtórzenia biologiczne × 5 punktów czasowych).

Izolacja mRNA

Do izolacji mRNA wykorzystany został zestaw odczynników Maxwell® RSC Plant RNA Kit z firmy Promega. Izolacja wykonana była zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Koncentracja mRNA sprawdzona była za pomocą spektrofotometru DeNovix.

Synteza cDNA

Synteza cDNA przeprowadzona była przy użyciu zestawu iScript cDNA Synthesis Kit z firmy BIO-RAD.

Analiza ekspresji z wykorzystaniem reakcji qPCR

Materiałem badawczym było 75 prób otrzymanego wcześniej cDNA z fragmentów mRNA. Startery zostały zaprojektowane bazując na sekwencjach wybranych genów kandydujących. Reakcja RT-qPCR przeprowadzona była za pomocą zestawu iTaq Universal SYBR Green Supermix przy użyciu urządzenia CFX Connect Real-Time PCR Detection System z firmy BIO-RAD dostępnego w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

Metoda HRM-PCR

Analiza HRM rozpoczęła się od reakcji PCR, w której nastąpiła amplifikacja zdefiniowanego regionu DNA, będącego przedmiotem badań, w obecności barwnika wiążącego się z dsDNA.

Ocena przynależności gatunkowej patogenicznego grzyba

W sezonie wegetacyjnym z roślin kukurydzy z objawami fuzariozy były pobierane fragmenty roślin celem dokonania izolacji patogenów powodujących objawy chorobowe.

Wyniki

W celu analizy badanej zmiennej w obu miejscowościach wykonano wykresy gęstości, które obrazują, w jakich przedziałach skoncentrowane są wartości analizowanej cechy. W Smolicech najwięcej genotypów posiada odporność na poziomie 7 i 9 (w skali 9°; 1 – wrażliwe, 9 – odporne) natomiast w Kobierzycach najwięcej genotypów charakteryzuje się odpornością na poziomie 8 i 9.

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.

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).

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.

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.

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).

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).

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*.