



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii



Bartosz Nowak

**Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów
związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej *Zea mays***

Multivariate analysis of molecular mechanisms associated with yield in
common maize *Zea mays*

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk Rolniczych

w dyscyplinie Rolnictwo i Ogrodnictwo

Doctoral thesis in Agriculture sciences

in the Agriculture and Horticulture discipline

Promotor:

Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak

Poznań, 2024

Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru

1. **Nowak B.**, Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P., Bocianowska M., 2022. The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi10.3390/ijms232314865>.

Punktacja MNiSW (2021): 140 **IF (2021): 5,600**

2. Tomkowiak A., **Nowak B.**, Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022. The use of DArTseq technology to identify new SNP and SilicoDArT markers related to the yield-related traits components in maize. *Genes*, vol. 13 (iss. 5), art. 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>.

Punktacja wg MNiSW (2021): 100 **IF (2021): 3,500**

3. **Nowak B.**, 2023. Wykorzystanie metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy. *Fragm. Agron.* 40(1) 2023, 25–32; doi: 10.26374/fa.2023.40.3.

Punktacja MNiSW (2022): 40

4. **Nowak B.**, Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P. Ł., Spychała J., Jamruszka T.. 2024. Identification and analysis of candidate genes associated with yield structure traits and maize yield using next-generation sequencing technology. *Genes* vol. 15 (iss. 1), art. no. 56 ; <https://doi.org/10.3390/genes15010056>.

Punktacja MNiSW (2023): 100 **IF (2023): 3,500**

Łączna liczba punktów MNiSW dla artykułów wchodzących w skład zbioru wynosi **380**.

Łączny współczynnik IF dla artykułów wchodzących w skład zbioru wynosi **12,600**.

Wykaz pozostałych artykułów naukowych, nie wchodzących w skład zbioru

1. Sobiech A., Tomkowiak A., **Nowak B.**, Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J. 2022. Associative and physical mapping of markers related to Fusarium in maize resistance, obtained by next-generation sequencing (NGS). *Int. J. Mol. Sci.* vol. 23 (iss. 11), art. no. 6105. <https://doi.org/10.3390/ijms23116105>.

Punktacja MNiSW (2021): 140 **IF (2021): 5,600**

2. Sobiech A., Tomkowiak A., Bocianowski J., **Nowak B.**, Weigt D., Kurasiak-Popowska D., Kwiatek M.T., Mikołajczyk S., Niemann J., Szewczyk K. 2022. Application Marker-Assisted Selection (MAS) and Multiplex PCR Reactions in Resistance Breeding of Maize (*Zea mays* L.). *Agriculture* 2022, 12(9), 1412; <https://doi.org/10.3390/agriculture12091412>.

Punktacja MNiSW (2021): 100 **IF (2021): 3,600**

3. Sobiech A., Tomkowiak A., Bocianowski J., Szymańska G., **Nowak B.**, Lenort M. 2023. Identification and analysis of candidate genes associated with maize fusarium cob resistance using next-generation sequencing technology. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 16712. <https://doi.org/10.3390/ijms242316712>

Punktacja MNiSW (2022): 140 **IF (2022): 5,600**

Łączna liczba punktów MNiSW dla pozostałych artykułów, nie wchodzących w skład zbioru wynosi **380**.

Łączny współczynnik IF dla pozostałych artykułów, nie wchodzących w skład zbioru wynosi **14,800**.

Łączna liczba punktów MNiSW dla wszystkich artykułów naukowych wynosi **760**

Łączny współczynnik IF dla wszystkich artykułów naukowych wynosi **27,400**

Serdeczne podziękowania dla Zarządu Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz pracowników Działu Hodowli Kukurydzy za umożliwienie przeprowadzenia pracy badawczej oraz wszelką życzliwość i wsparcie.

Serdeczne podziękowania dla Pani Prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak za pomoc podczas pisania pracy, wszelką życzliwość, poświęcony czas oraz wsparcie.

Serdeczne podziękowanie dla rodziny za wyrozumiałość oraz wsparcie.

Spis treści

1. Streszczenie i słowa kluczowe.....	7
2. Summary and keywords.....	8
3. Wstęp.....	9
4. Hipotezy badawcze, cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej	17
5. Materiał roślinny i metodyka badań.....	19
5.1. Materiał roślinny.....	19
5.2. Metodyka badań.....	19
5.2.1. Fenotypowanie.....	19
5.2.2. Izolacja DNA.....	20
5.2.3. Genotypowanie.....	20
5.2.4. Analizy statystyczne i mapowanie asocjacyjne.....	21
5.2.5. Mapowanie fizyczne.....	22
5.2.6. Analiza funkcjonalna sekwencji genów.....	23
5.2.7. Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych markerów SilicoDArT i SNP, sprzężonych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków, wigorem oraz cechami struktury plonu i plonem kukurydzy.....	23
5.2.8. Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami.....	23
5.2.9. Elektroforeza.....	24
6. Wyniki	25
6.1. Doświadczenie polowe i analizy fenotypowe.....	25
6.2. Genotypowanie i mapowanie asocjacyjne.....	27
6.3. Mapowanie fizyczne.....	28
6.4. Projektowanie starterów.....	34

6.5. Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami.....	35
6.6. Analiza polimorfizmu pomiędzy badanymi genotypami.....	36
7. Podsumowanie.....	40
8. Wnioski.....	49
9. Spis literatury	51
10. Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych.....	63
11. Artykuły naukowe wchodzące w skład zbioru.....	82
11.1. Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P., Bocianowska M., 2022. The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> https://doi.org/10.3390/ijms232314865	82
11.2. Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022. The use of DArTseq technology to identify new SNP and SilicoDArT markers related to the yield-related traits components in maize. <i>Genes</i> , vol. 13 (iss. 5), art. 848. https://doi.org/10.3390/genes13050848	99
11.3. Nowak B., 2023. Wykorzystanie metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy. <i>Fragm. Agron.</i> 40(1) 2023, 25–32; doi: 10.26374/fa.2023.40.3.....	117
11.4. Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P. Ł., Spychała J., Jamruszka T.. 2024. Identification and analysis of candidate genes associated with yield structure traits and maize yield using next-generation sequencing technology. <i>Genes</i> vol. 15 (iss. 1), art. no. 56 ; https://doi.org/10.3390/genes15010056	126

1. Streszczenie i słowa kluczowe

Odpowiedzią na potrzeby sektora rolniczego w XXI wieku jest wdrażanie do produkcji rolniczej postępu biologicznego, który pozwala na podnoszenie produkcji i jakości żywności przy jednoczesnej poprawie stopnia wykorzystania nakładów na chemiczne i techniczne środki produkcji. Postęp biologiczny w branży hodowlano-nasiennej kukurydzy jest wyjątkowy pod względem społecznego i ekologicznego aspektu innowacji. Ma wpływ na produktywność rolnictwa i dopasowanie uprawianych odmian kukurydzy do wymagań rynkowych oraz zmieniających się uwarunkowań klimatycznych, nie czyni tego jednak kosztem środowiska. Współczesna hodowla kukurydzy na całym świecie opiera się na szerokiej palecie technik badawczych z zakresu genetyki molekularnej. Dzięki tym technologiom możemy identyfikować regiony genomu powiązane z różnymi cechami fenotypowymi, w tym z plonem, co ma fundamentalne znaczenie dla poznania tych regionów i manipulowania nimi. Wobec powyższego celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja nowych markerów molekularnych sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon ziarna, zdolności kiełkowania ziarniaków oraz wczesny wigor kukurydzy, dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego.

W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 20 markerów molekularnych, które były związane ze zdolnością kiełkowania ziarniaków oraz wigorem siewek. Spośród nich 6 markerów znajdowało się wewnątrz genów. W 4 przypadkach zgodnie z doniesieniami literaturowymi geny te mogą mieć wpływ na kiełkowanie ziarniaków oraz wigor u kukurydzy. W kolejnym etapie badań zidentyfikowano łącznie 36 markerów molekularnych związanych z cechami struktury plonu oraz plonem. Spośród tych markerów 11 zlokalizowane jest wewnątrz genów. W 5 przypadkach zgodnie z najnowszymi doniesieniami literaturowymi geny te są odpowiedzialne za wysokość plonu. Wszystkie zidentyfikowane, istotne statystycznie markery molekularne mogą zostać wykorzystane w procesie hodowli kukurydzy do selekcji komponentów rodzicielskich do krzyżowań. Pozwoli to na skrócenie cyklu hodowlanego i jednocześnie pozwoli na oszczędność środków materialnych.

Słowa kluczowe: kukurydza, plon, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), mapowanie asocjacyjne, mapowanie fizyczne, markery molekularne.

2. Summary and keywords

The answer to the needs of the agricultural sector in the 21st century is the implementation of biological progress in agricultural production, which allows for the improvement of food production and quality while improving the degree of utilization of inputs on chemical and technical means of production. Biological progress in the corn breeding and seed industry is unique in terms of the social and ecological aspects of innovation. It influences agricultural productivity and adapts cultivated corn varieties to market requirements and changing climatic conditions, but does not do so at the expense of the environment. Modern corn breeding around the world is based on a wide range of research techniques in the field of molecular genetics. Thanks to these technologies, we can identify regions of the genome associated with various phenotypic traits, including yield, which is fundamental to understanding and manipulating these regions. Therefore, the aim of the doctoral dissertation was to identify new molecular markers coupled with candidate genes that determine grain yield, kernel germination and early vigor of corn, thanks to the use of next-generation sequencing, association and physical mapping.

As a result of the analyses, 20 molecular markers were identified that were related to the germination capacity of grains and the vigor of seedlings. Of these, 6 markers were located inside genes. In 4 cases, according to literature reports, these genes may affect grain germination and vigor in maize. In the next stage of research, a total of 36 molecular markers related to crop structure features and yield were identified. Of these markers, 11 are located inside genes. In 5 cases, according to the latest literature reports, these genes are responsible for height of the yield. All identified, statistically significant molecular markers can be used in the maize breeding process to select parental components for crossbreeding. This will shorten the breeding cycle and at the same time save material resources.

Keywords: corn, yield, next-generation sequencing (NGS), association mapping, physical mapping, molecular markers.

3. Wstęp

Kukurydza (*Zea mays* L.) zaliczana jest do jednego z najważniejszych i najstarszych gatunków roślin uprawnych. Przyjmuje się, że ośrodkami pochodzenia kukurydzy są Meksyk i Ameryka Środkowa, gdzie uprawiana jest od 4,5 tysięcy lat. Roślina ta należy do plemienia *Maydae*, z rodziny *Poaceae* (Wiechlinowce) (Kennett i in., 2020; Chavan i Smith, 2014; Awika, 2011). Jedną z teorii mówi, że najbardziej prawdopodobnym przodkiem kukurydzy jest teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). Genetyczne loci, takie jak *tbt1* (teosinte branched 1) oraz *tga1* (teosinte glume architecture 1) odegrały kluczową rolę w przekształceniu teosinte we współczesną kukurydzę (Mano i Omori, 2013; Ellstrand i in., 2007; Fukunaga i in., 2005). Z centrów pochodzenia kukurydza rozprzestrzeniła się później do różnych części świata, w tym do Ameryki, Afryki i Azji. Do Europy kukurydza została sprowadzona przez Kolumba, a w ciągu kolejnych 300 lat stała się bardzo popularna. Obecnie kukurydza wraz z pszenicą oraz ryżem należą do najważniejszych gospodarczo gatunków zbóż (Gupta i in., 2015). Zasięg uprawy kukurydzy jest bardzo szeroki ponieważ uprawiana jest pomiędzy 50°N a 40°S.

Obecnie kukurydza na ziarno jest uprawiana na około 197 mln ha gruntów na całym świecie, co czyni ją drugą po pszenicy najważniejszą gospodarczo rośliną. Dla porównania powierzchnia uprawy pszenicy wynosi 216 mln ha, a ryżu 165 mln ha (Erenstein i in., 2022). Roczna produkcja ziarna kukurydza na świecie wynosi obecnie 1137 mln ton i jest znacznie wyższa niż produkcja ryżu i pszenicy. W ciągu ostatniego ćwierćwiecza produkcja kukurydzy wzrosła ponad dwukrotnie, czemu sprzyja zarówno znaczny wzrost plonów jak i ekspansja na coraz szersze obszary (Erenstein i in., 2022). Spośród trzech wymienionych zbóż plony kukurydzy w ciągu 25 lat wzrosły o prawie 2 tony (z 3,9 do 5,8 ton/ha). Dynamika produkcji kukurydzy w ciągu ostatniego ćwierćwiecza opiera się na wcześniejszych tendencjach. Od 1961 r. globalna powierzchnia upraw kukurydzy wzrosła prawie dwukrotnie, ze 106 mln ha do obecnych 197 mln ha. Jeżeli tendencje się nie zmienią i nadal będziemy obserwować stagnację jeżeli chodzi o areał uprawy pszenicy, kukurydza wyprzedzi pozostałe gatunki zbóż jako najpowszechniej uprawiana roślina do 2030 r. (Erenstein i in., 2021).

Wspomniany wyżej intensywny wzrost plonów kukurydzy nie byłby możliwy, gdyby nie postęp biologiczny. Postęp ten można określić jako ekologiczny sposób intensyfikacji produkcji rolniczej, polegający na doskonaleniu genetycznym roślin, które

stają się wydajniejsze w korzystaniu z sił przyrody i przemysłowych środków produkcji (Zhang i in., 2021). Rośliny te są również lepsze jakościowo z punktu widzenia wymagań człowieka, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia kosztów ponoszonych na ich produkcję. Na rozwój postępu biologicznego różnych gatunków roślin uprawnych niewątpliwie wpływa wprowadzenie nowej zmienności genetycznej. Zmienność ta jest ważna dla procesów doboru naturalnego i ewolucji biologicznej. Zmiany genetyczne, które pojawiają się w populacji, są przypadkowe, ale proces doboru naturalnego już nie. Selekcja naturalna jest wynikiem interakcji między zmiennością genetyczną w populacji a środowiskiem (Guo i in., 2019). Dobór naturalny określa, które odmiany genetycznie są bardziej korzystne lub lepiej przystosowane do przetrwania. Organizmy z tymi wyselekcjonowanymi środowiskowo genami przeżywają i rozmnażają się, a bardziej korzystne cechy są przekazywane całej populacji (Zhang i in., 2021). Poszukiwanie nowych genów, ważnych z punktu widzenia gospodarczego to zadanie dla współczesnej hodowli roślin.

Obecnie przyjmuje się, że do priorytetów hodowlanych w tym również hodowli kukurydzy należy wprowadzenie do produkcji odmian o wyższej wartości użytkowej czyli większej plenności i poprawionej wartości żywieniowej, paszowej oraz technologicznej uzyskiwanego plonu. Ważne jest również zwiększenie odporności roślin zarówno na stesy biotyczne jak i abiotyczne (Zhu i in., 2021). Współczesna hodowla kukurydzy na całym świecie opiera się na szerokiej palecie technik badawczych z zakresu genetyki molekularnej stosowanych głównie w dwóch obszarach. Pierwszy obszar dotyczy podejmowania decyzji związanych z selekcją, opartą na analizie sekwencji nukleotydów DNA, a drugi obszar dotyczy poszerzania zmienności genetycznej w populacjach hodowlanych na drodze modyfikacji genetycznych. Modyfikacje te polegają przede wszystkim na kreowaniu organizmów roślinnych z obcymi gatunkowo genami (Xu i in. 2017; Zenke-Philippi i in. 2017). Tworzy to nie tylko atrakcyjne perspektywy uzyskiwania postępu biologicznego, ale również nowe możliwości w zakresie wykorzystania nie tylko kukurydzy ale i innych roślin uprawnych (Cooper i in 2016). Wprowadzenie do hodowli narzędzi molekularnych oraz szybki postęp w sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS) umożliwił sekwencjonowanie genomów wielu gatunków roślin uprawnych, w tym również kukurydzy. Do tej pory do najpowszechniejszych technik NGS należą pirosekwencjonowanie 454 (Roche, 2010), technika Solex (Illumina, San Diego USA), platforma SOLiD (Life Technologies

Corporation, Carlsbad, USA), Polonator (Harvard University, Cambridge, USA), oraz HeliScope Single Molecule Sequencer (Helicos BioSciences, Cambridge, USA). Technologie te zapewniają niedrogie odczyty sekwencji całego genomu za pomocą metod takich jak chromatynowa immunoprecypitacja, mapowanie mutacji, wykrywanie polimorfizmu i wykrywanie niekodujących sekwencji RNA (Mardis, 2008). Metody sekwencjonowania, takie jak RAD (ang. Restriction site Associated DNA) (Baird i in. 2008), MSG (ang. Multiplexed Shotgun Genotyping) (Adolfatto i in. 2011) i BSRSeq (RNA-Seq) (Liu i in. 2012) pozwalają na identyfikację dużej liczby markerów i pozwalają na dokładne badanie wielu loci w niewielkiej liczbie próbek. Metoda z wykorzystaniem Illuminy dała początek rozwojowi procedur GBS (Sansaloni i in. 2011) oraz DArTseq (Elshire i in. 2011). Technologię DArTseq wykorzystano w badaniach własnych prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, do identyfikacji markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi plon ziarna oraz zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor kukurydzy.

Platforma DArT oferuje analizy w oparciu o technologię NGS-DArTseq (Akbari i in., 2006). Metoda DArTseq zmniejsza złożoność genomu poprzez trawienie enzymami restrykcyjnymi, a następnie sekwencjonowanie krótkich odczytów. Wybór kombinacji enzymów restrykcyjnych pozwala na izolację wysoce informacyjnych fragmentów genomu o niskiej liczbie kopii. Nawet 90% uzyskanych markerów DArTseq jest komplementarnych do unikalnych sekwencji genomu (Courtois i in., 2013; Cruz i in., 2013). Analiza DArTseq generuje dwa zbiory danych. Pierwszy zawiera markery dominujące, drugi obejmuje markery kodominujące z zaznaczonymi polimorfizmami pojedynczych nukleotydów. Uzyskuje się co najmniej trzykrotnie więcej markerów dominujących w porównaniu z konwencjonalną metodą DArT (Sansaloni i in., 2011). Technologia DArT również sprawdza się jako wydajne narzędzie diagnostyczne do badania różnorodności genotypowej (Wenzl i in., 2004). Markery DArT z powodzeniem zostały wykorzystane do badania różnorodności genetycznej i struktury populacji nie tylko kukurydzy ale również chińskiej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Zbadano łącznie 111 odmian i linii hodowlanych z północnych Chin. Wyniki dostarczyły informacji do dalszej selekcji form rodzicielskich dla potrzeb chińskiego programu hodowli pszenicy (Zhang i in., 2012). Metoda DArT znalazła szerokie zastosowanie w analizie pokrewieństwa np. u owsa (*Avena* sp.), gdzie zbadano 134 odmiany i wyróżniono grupy odpowiadające formom ozimym i jarym (Tinker i in., 2009). Natomiast badania

232 form grochu bengalskiego (*Cajanus cajan*) wykazały niski stopień zróżnicowania materiałów. Spośród 696 markerów DArT tylko 64 okazało się polimorficznych, przy czym wykazano, że formy dzikie są najbardziej zróżnicowane (Yang i in., 2006). Na chwilę obecną niewiele jest doniesień naukowych na temat wykorzystania technologii DArTseq do analiz polskich materiałów hodowlanych kukurydzy.

Dzięki powyższym technologiom możemy identyfikować regiony genomu powiązane z różnymi cechami fenotypowymi, w tym z plonem, co ma fundamentalne znaczenie dla poznania tych regionów i manipulowania nimi. Pojawienie się nowych technologii sekwencjonowania genomu wraz z nowymi metodami obliczeniowymi doprowadziło również do zsekwencjonowania genomu referencyjnego kukurydzy. Otrzymane w wyniku NGS obszernie dane genotypowe mogą zostać wykorzystane do mapowania asocjacyjnego. Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS, ang. – genome wide association studies) stały się zatem potężną metodologią badania zmienności genetycznej i identyfikowania związku między cechą a podstawową zmiennością genetyczną poprzez wykorzystanie historycznych zdarzeń rekombinacji (Sakhare i in., 2022). Mapowanie asocjacyjne polega na poszukiwaniu korelacji genotyp–fenotyp u niespokrewnionych osobników przy użyciu dedykowanych metod statystycznych (Abdurakhmonov i in., 2008; Rafalski, 2010; Zhu i in., 2008). Podejście polegające na mapowaniu asocjacji zapewnia możliwości generowania dobrej jakości markerów do selekcji wspomaganej markerami (MAS, ang. – marker assisted selection). Markery funkcjonalne ściśle powiązane z cechą odzwierciedlają polimorfizmy genów, które bezpośrednio powodują zmienność fenotypową. Mapowanie asocjacji zapewnia możliwości znalezienia specyficznych markerów, w szerokim spektrum zasobów genetycznych. Potencjał mapowania asocjacyjnego wynika z prawdopodobieństwa uzyskania wyższej rozdzielczości, dzięki zastosowaniu większej liczby zdarzeń rekombinacyjnych w historii rozwoju plazmy zarodkowej (Rakoczy-Trojanowska i in., 2017). Zatem mapowanie asocjacji stało się obiecującym podejściem w porównaniu z tradycyjnym mapowaniem. Istnieją dwa główne typy mapowania asocjacji: mapowanie asocjacji całego genomu (GWAM, ang. – genome wide association mapping) i mapowanie asocjacji genów kandydujących (CGAM, ang. – candidate gene association mapping). Podejście GWAM bada zmienność genetyczną w całym genomie, w celu znalezienia sygnałów asocjacyjnych dla różnych złożonych cech, podczas gdy CGAM koreluje polimorfizmy DNA w wybranych genach kandydujących z interesującą cechą

(Rafalski, 2010; Zhu i in., 2008). Istnieje wiele przykładów udanego zastosowania analizy asocjacyjnej w zbożach, głównie w kukurydzy. Ostatnio GWAM stał się potężnym narzędziem do analizy architektury genetycznej złożonych cech różnych gatunków roślin uprawnych (Rakoczy-Trojanowska i in., 2017; Edwards i in., 2013). Początkowo mapowanie asocjacyjne wykonane u kukurydzy (Bar-Hen i in., 1995), nie uwzględniało struktury populacji. Błąd ten został naprawiony przez Pritcharda, który w 2001 roku w badaniach nad kukurydzą uwzględnił strukturę populacji (Pritchard, 2001).

Od kilku lat hodowla kukurydzy na całym świecie jest wspomagana przez przydatne markery molekularne co w znaczący sposób wpływa na wzrost plonów nie tylko w USA, ale także w innych krajach, oferując ogromny potencjał w zakresie zwiększania produktywności i wartości plazmy zarodkowej kukurydzy (Dhliwayo i in., 2009; Chander i in., 2008). Kukurydza, podobnie jak jęczmień i ryż, jest jednym z najlepiej poznanych pod względem genetycznym gatunków zbóż. Posiada ponad 32 000 genów na dziesięciu chromosomach, a wielkość genomu wynosi 2,3 Gpz. Cechą charakterystyczną genomu kukurydzy jest wysoki polimorfizm. W wielu loci występuje kilka aktywnych alleli, a częstość występowania duplikatów sekwencji DNA, których znaczącą część stanowią retrotranspozony i transpozony, wynosi około 58%. Regiony genowe stanowią jedynie 7,5% całego genomu kukurydzy (Messing i in., 2004). W ostatnim dwudziestoleciu wielu naukowców (Baird i in., 2008; Guo i in., 2013; Benke i in., 2015) w swoich badaniach wykorzystano metody biologii molekularnej do wykrywania i zlokalizowania loci determinujących plon ziarna i cechy struktury plonu u kukurydzy. W związku z tym, że selekcja z wykorzystaniem markerów molekularnych pozwala zaoszczędzić czas i pieniądze nieustannie poszukuje się nowych markerów, które byłyby sprzężone z plonem i jego komponentami. Badania prezentowane przez różnych autorów wskazują, że regiony QTL (ang. quantitative trait loci) związane z plonem ziarna i jego komponentami rozłożone są po całym genomie. Prasanna (2010) wraz ze swoim zespołem wykazali, że najwięcej QTL związanych z plonem ziarna kukurydzy znajduje się na chromosomach 1S, 1L, 2S, 5S, 6L oraz 8L. Podobne wyniki przedstawił Beavis i in. (1994), którzy analizowali również masę hektolitra, dla której zlokalizowali regiony QTL na chromosomach 1S, 2S, 3S oraz 5S. W swoich obszernych badaniach Ribaut i in. (1996) oraz Veldboom i in. (1994) wykazali, że regiony QTL związane z liczbą rzędów ziarniaków znajdują się na chromosomach 1L, 4L, 5L, 9S

natomiast QTL związane z liczbą kolb z rośliny znajdują się na chromosomach 1S, 1L, 3S, 3L, 6L, 8L. Ribaut i in. określili również położenie QTL dla długości kolby (chromosomy 1S, 1L, 3S, 3L, 5S, 6L, 8L) oraz średnicy kolby (chromosomy 1L, 2L, 4L, 7L, 8L). Badania związane z identyfikacją QTL dla cech struktury plonu prowadzili również Austin i in. (2001) oraz Melchinger i in. (1998).

Jak opisano w publikacji nr 3, współcześnie w hodowli kukurydzy oprócz selekcji z wykorzystaniem markerów molekularnych coraz częściej wykorzystuje się również selekcję genomową. Po raz pierwszy selekcję genomową (SG) opisał Meuwissen i in. (2001). Wykorzystał w niej modele statystyczne oraz szeroko pojętą bioinformatykę wraz z kompleksową wiedzą na temat genomów roślin. Jedną z podstaw SG jest bardzo precyzyjne fenotypowanie materiałów hodowlanych, np. linii kukurydzy. Skrót GEBV (ang. Genetic Estimated Breeding Value) określa genomową szacunkową wartość hodowlaną (Heffner i in., 2011). Im wyższa wartość tego współczynnika, tym materiał lub komponent jest bardziej pożądanym do krzyżowań (Jonas i Koning, 2013). Chcąc wprowadzić tą metodę do programów hodowlanych, należy wyznaczyć liczbę genotypów, tzw. populację treningową, w celu określenia GEBV. Populacja ta powinna zawierać minimum 500 linii (Jarska i in., 2015). Na wybranych formach niezbędne jest dobrze zrobione fenotypowanie oraz genotypowanie. Zbiór tych danych zawiera charakterystykę poszczególnych linii. Do najczęściej stosowanych metod statystycznych używa się najbliższą liniową nieobciążoną predykcję (BLUP, ang. Best Linear Unbiased Prediction), rozszerzenie BLUP czyli RR-BLUP (Ridge Regression BLUP), GBLUP (Genomic BLUP) lub metodę Bayesian (Meuwissen i in., 2001; Habier i in., 2013). Metoda Bayesian zakłada, że parametr taki jak wariancja określona przez dany locus pochodzi z wcześniejszego rozkładu. Wariancja może się różnić, w różnych loci. W przypadku modelu BayesA, dane są modelowane na dwóch poziomach: na poziomie danych oraz na poziomie sekwencji genów. Na poziomie danych model jest taki sam jak w przypadku metody BLUP. W metodzie BayesB rozkład wariancji genetycznych w loci pokazuje, że jest wiele loci bez wariancji genetycznej (niesegregujących) i kilka z wariancją genetyczną. Wartościowe linie do krzyżowań wybiera się na podstawie genotypowej wartości hodowlanej oraz współczynniki GEBV, dzięki temu populacja zawiera allele, które są pożądane przez hodowcę. Na tym etapie pomija się fenotypowanie. Aby tak uzyskana populacja była wyrównana i trwała, prowadzi się następnie chów wsobny lub wykorzystuje metody *in vitro* (Jarska i in., 2015). Do zalet

tej metody zalicza się zachowanie wyjściowej zmienności genetycznej, minimalizację fenotypowania oraz skrócenie cyklu hodowlanego (Jonas i Koning, 2013).

Prowadzone intensywnie analizy molekularne u kukurydzy skupiają się nie tylko na identyfikacji nowych markerów oraz regionów QTL, ale również w kręgu zainteresowań hodowców analizami DNA leży poszukiwanie metod umożliwiających dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań heterozyjnych (Tang i in., 2009). W tym przypadku chodzi o znalezienie związku pomiędzy plonem mieszańca F_1 a heterogennością loci – markerów dla jego form rodzicielskich. Powszechnie wiadomo, że o sukcesie hodowlanym decyduje dostęp do materiałów wyjściowych o dużej różnorodności genetycznej, ponieważ dobrze rozpoznany i podzielony na grupy heterotyczne materiał wyjściowy skutkuje obniżeniem kosztów całego procesu hodowli mieszańców (Barata i in., 2006). Materiały roślinne możemy podzielić na grupy heterotyczne według następujących kryteriów: pochodzenie genetyczne (rodowód), wyniki krzyżowania w układach diallelicznych, pochodzenie geograficzne. Niestety przedstawione kryteria podziału są obciążone pewnymi wadami. W wyniku krzyżowania w układzie diallelicznym otrzymujemy dużo informacji o posiadanym materiale, ale są to metody bardzo kosztowne. Wnioskowanie o zróżnicowaniu genetycznym na podstawie pochodzenia geograficznego jest również zawodne ze względu na wymianę międzynarodową materiałów hodowlanych. W przypadku pochodzenia genetycznego nie zawsze mamy dostęp do pełnej informacji rodowodowej. W związku z powyższym, w ostatnich latach próbuje się selekcjonować komponenty rodzicielskie do krzyżowań heterozyjnych w oparciu o podobieństwo genetyczne pomiędzy liniami rodzicielskimi, wyznaczone przy pomocy markerów molekularnych (Yang i in., 2006; Wenzl i in., 2004).

Aktualne osiągnięcia w dziedzinie biotechnologii roślin przekraczają dotychczasowe oczekiwania, a perspektywy ich wykorzystania są jeszcze bardziej obiecujące. Co więcej, lepsze zrozumienie biologii roślin możliwe dzięki zastosowaniu technologii „omicznych”, wykorzystanie zasobów biologii molekularnej i nowych platform analizy danych, zostało przełożone na praktykę rolniczą i umożliwiło ulepszenie wielu gatunków roślin uprawnych. W świetle powyższego intensyfikacja rozwoju rolnictwa wymaga wydajnych technologii wytwarzania opłacalnych ekonomicznie i konkurencyjnych produktów roślinnych. Nie da się tego osiągnąć bez zaawansowanych badań i rozwoju w dziedzinie biochemii, fizjologii, genomiki i agronomii. Dlatego biotechnologia roślin może w dalszym ciągu wpływać na ewolucję rolnictwa, aby

sprostać światowemu zapotrzebowaniu zarówno na dostawy żywności, jak i nowe biomateriały.

Powyższe rozważania pozwoliły na sformułowanie hipotezy badawczej oraz celu głównego i celów szczegółowych rozprawy doktorskiej.

4. Hipotezy badawcze, cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej

Hipotezy Badawcze

1. Zgodnie z główną hipotezą badawczą wykorzystanie technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS) połączonych z mapowaniem asocjacyjnym i fizycznym umożliwi identyfikowanie skutecznych markerów molekularnych lub regionów QTL sprzężonych z plonem, cechami struktury plonu, zdolnością kiełkowania ziarniaków i wigorem kukurydzy *Zea mays* L.
2. Wytypowanie, a następnie wykorzystanie nowych, specyficznych markerów molekularnych pozwoli na wstępną selekcję komponentów rodzicielskich do krzyżowań i dalszych prac hodowlanych.
3. Wykorzystanie zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP pozwoli ustalić stopień podobieństwa genetycznego między liniami wsobnymi w przypadku, kiedy nie posiadamy informacji o rodowodzie lub informacje te są niepełne, co ograniczy lub wyeliminuje kosztowne i pracochłonne krzyżowanie w układach diallelicznych.
4. Wykorzystanie najnowszych technik biologii molekularnej pozwoli na ograniczenie czasu i kosztów wyhodowania nowych odmian kukurydzy.

Cel główny

Celem badań była identyfikacja nowych markerów molekularnych sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon ziarna, zdolności kiełkowania ziarniaków oraz wczesny wigor kukurydzy, dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego.

Cele szczegółowe

1. Określenie stopnia spokrewnienia pomiędzy analizowanymi genotypami dzięki wykorzystaniu markerów molekularnych SilicoDArT i SNP otrzymanych w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS).
2. Identyfikacja markerów molekularnych SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami warunkującymi plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.
3. Mapowanie fizyczne polegające na przedstawieniu rzeczywistej pozycji zidentyfikowanych markerów i sprzężonych z nimi genów.
4. Charakterystyka wytypowanych genów kandydujących warunkujących plon ziarna, zdolności kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.
5. Projektowanie starterów służących do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi warunkujących plon ziarna, zdolności kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.
6. Wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do testowania wybranych markerów molekularnych na roślinnych materiałach referencyjnych.

5. Materiał roślinny i metodyka badań

Realizacja założonych celów rozprawy wymagała przeanalizowania materiału roślinnego za pomocą zróżnicowanych metod badawczych, obejmujących zarówno obserwacje polowe jak i analizy laboratoryjne. Opracowanie otrzymanych wyników było możliwe dzięki wykorzystaniu analiz statystycznych i bioinformatycznych. Przedstawione poniżej podrozdziały opisują poszczególne etapy badań polowych oraz analiz molekularnych.

5.1. Materiał roślinny

Materiałem roślinnym użytym do badań przedstawionych w publikacjach 1, 2 i 4 były łącznie 392 genotypy kukurydzy *Zea Mays* L (250 linii wsobnych, 122 mieszańce F₁ oraz 20 genotypów referencyjnych dobrze i słabo plonujących). W publikacji 1 analizowano 152 linie wsobne, w publikacji 2 analizowano te same 152 linie, które analizowano w publikacji 1 oraz dodatkowe 34 linie (razem 186), natomiast w publikacji 4 analizowano 64 linie wsobne, 122 mieszańce oraz 20 genotypów referencyjnych. Materiał roślinny pochodził z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR (51°41'023.1600 N 17°40'18,24100 E) oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o. (50°58'019,41100 N 16°55'047,32300 E). Część analizowanych linii charakteryzowała się ziarnem typu flint, natomiast druga grupa charakteryzowała się ziarnem typu dent. Linie o ziarnie typu flint pochodziły między innymi z Francji (populacja Lacaune), z Hiszpanii (populacja wywodząca się z Pirenejów) i Niemiec (German Flint). Linie o ziarnie typu dent pochodziły z różnych grup ze Stanów Zjednoczonych: Iowa Stiff Stalk Synthetic (BSSS), Iowa Dent (ID) i Lancaster.

5.2. Metodyka badań

5.2.1. Fenotypowanie

W publikacji 1 ocenie fenotypowej poddawano zdolności kiełkowania ziarniaków kukurydzy. Kiełkowanie ziarniaków oceniano zgodnie z zasadami Międzynarodowego Stowarzyszenia Badania Nasion (ISTA) w laboratorium, w optymalnych warunkach temperatury, wilgotności i jakości podłoża służącego do kiełkowania (bibuła). W takich warunkach, po 5 i 10 dniach sprawdzano energię kiełkowania licząc ilość skiełkowanych roślin. Po 14 dniach oceniano żywotność ziarniaków, gdyż wszystkie ziarniaki (także słabe) zdolne do kiełkowania powinny wykiełkować. Przeprowadzono również test

wigoru siewek, który polegał na umieszczeniu 25 ziarniaków w rolce średniej bibuły filtracyjnej, w czterech powtórzeniach. Arkusze bibuły zwilżono wodą i umieszczono w termostacie o temperaturze 20°C. Po zakończeniu kiełkowania mierzono długość normalnie kiełkujących siewek (cm) i określono średnią długość siewek z rolki. Wigor ziarniaków oceniano w laboratorium oraz bezpośrednio na polu, w stosunkowo niskiej temperaturze. Oceniono wielkość wschodów, ich szybkość i jednorodność. Doświadczenie polowe z 152 liniami wsobnymi założono na poletkach o powierzchni 10 m² w układzie bloków losowanych kompletnych, w trzech powtórzeniach.

W publikacji 2 i 4 ocenie fenotypowej poddano następujące cechy morfologiczne: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów ziarna, liczba ziaren w rzędzie, masa tysiąca ziaren (MTZ) oraz plon. Pomiary przeprowadzono po zbiorach, w pierwszej połowie listopada, na dziesięciu losowo wybranych kolbach z trzech powtórzeń. Doświadczenie polowe z liniami wsobnymi założono na poletkach o powierzchni 10m² w systemie bloków losowanych kompletnych, w trzech powtórzeniach, w dwóch lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice).

5.2.2. Izolacja DNA

Izolację DNA przeznaczonego do sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w publikacji 1 przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji materiału genetycznego z roślin Plant DNA MAXI z firmy Syngen. W publikacji 2 i 4 do izolacji DNA przeznaczonego do sekwencjonowania wykorzystano zestawu Wizard® Genomic DNA Purification Kit firmy Promega. W publikacji 4 do izolacji DNA z 20 genotypów referencyjnych, przeznaczonych do testowania wyselekcjonowanych markerów molekularnych użyto zestawu odczynników Genomic Mini AX Plant Spin zakupionego od A&A Biotechnology. Stężenie i czystość wyizolowanych próbek DNA oznaczono za pomocą spektrofotometru DS-11 firmy DeNovix. Wyizolowaną matrycę DNA doprowadzono do stężenia o równej wartości 100 ng μ L⁻¹ poprzez rozcieńczenie wodą podwójnie destylowaną (ddH₂O).

5.2.3. Genotypowanie

Wyniki z genotypowania przedstawione w publikacjach 1, 2 i 4 otrzymano dzięki wykorzystaniu technologii DArTseq. Analizy przeprowadziła firma Diversity Arrays Technology Pty Ltd. z Australii. W pierwszym kroku, w celu redukcji złożoności genomu

matrycę DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi. Wykorzystano następujące enzymy: Ape KI, Pst I, Msp I. W oryginalnej metodzie GBS stosowano jeden enzym Ape KI. Potem metoda została rozszerzona o dwa enzymy: jeden rzadko tnący Pst I w połączeniu z drugim często tnącym genomowy DNA Msp I. Dzięki takiemu podejściu możliwe jest tworzenie jednorodnej biblioteki oraz wykrywanie większości fragmentów powiązanych z enzymem rzadko tnącym. Cechą charakterystyczną wykorzystywanych enzymów jest ich wrażliwość na metylację, dzięki czemu możliwe jest odfiltrowanie obszarów niekodujących oraz metylowanych sekwencji powtarzalnych, takich jak np. elementy mobilne. W kolejnym kroku fragmenty genomowego DNA pocięte przez enzymy restrykcyjne poddawane były ligacji z adaptorami. Ponieważ ostatnie zawierają w sobie identyfikatory tak zwane barcode, pochodzenie każdej próby było ściśle zdefiniowane, a identyfikatory spełniały odpowiednie kryteria. Uzyskane produkty po PCR były analizowane pod względem rozmiaru i stanowiły bibliotekę genomową, która była następnie sekwencjonowana za pomocą najważniejszej platformy do NGS, Illuminy HiSeq2500 wg metodyki opisanej szczegółowo na stronie firmy Diversity Arrays Technology:

(<https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/>).

5.2.4. Analizy statystyczne i mapowanie asocjacyjne

W publikacjach 1, 2 i 4 przeprowadzono dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA), w celu określenia wpływu interakcji linii oraz lokalizacji na zmienność badanych cech. Charakter rozkładu obserwowanych cech sprawdzono za pomocą testu Shapiro -Wilka (1965), sprawdzając, czy analiza wariancji (ANOVA) spełniła założenie, że reszty modelu ANOVA mają rozkład normalny. Jednorodność wariancji zbadano za pomocą testu Bartletta (1937). Podobieństwo genetyczne pomiędzy analizowanymi liniami i mieszanicami oszacowano na podstawie współczynnika zaproponowanego przez Nei i Li (1979). Linie pogrupowano hierarchicznie, stosując metodę średnich arytmetycznych grup nieważonych par (UPGMA) w oparciu o obliczone współczynniki. Zależności pomiędzy liniami przedstawiono w formie dendrogramu. Zależności pomiędzy obserwowanymi cechami oceniano w oparciu o współczynniki korelacji Pearsona (2007) i sprawdzano za pomocą testu t, niezależnie dla doświadczeń w Kobierzycach i Smolicach. Wyniki analizowano także metodami wieloczynnikowymi. Zastosowano analizę zmiennych kanonicznych (CVA), aby przedstawić wielocechową

ocenę podobieństwa badanych linii i mieszańców w mniejszej liczbie wymiarów, przy możliwie najmniejszej stracie informacji. Jako miarę podobieństwa fenotypowego linii zaproponowano odległość Mahalanobisa, której istotność weryfikowano za pomocą wartości krytycznej D_α , zwanej także „odległością najmniej znaczącą”. Ten parametr obliczono dla wszystkich linii.

Dzięki wykorzystaniu analizy GWAS wykonano mapowanie asocjacyjne. Mapowanie to przeprowadzono na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania i fenotypowania. Dane genotypowe uzyskano z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiły wyniki zdolności kiełkowania ziarniaków kukurydzy (Publikacja 1) oraz wyniki dotyczące wielkości analizowanych cech struktury plonu i plonu kukurydzy (Publikacje 2 i 4). Analizowanymi składnikami plonu były: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów ziaren, liczba ziaren w rzędzie, masa tysiąca ziaren oraz plon. Na podstawie analizy GWAS do dalszych badań wybrano markery silicoDArT i SNP o najwyższym poziomie istotności, czyli te, które najsilniej związane były ze zdolnością kiełkowania ziarniaków, wigorem siewek, cechami struktury plonu oraz plonem. Wszystkie analizy przeprowadzono w programie Genstat 18.2 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, Wielka Brytania).

5.2.5. Mapowanie fizyczne

Wyselekcjonowane w oparciu o GWAS sekwencje markerów silicoDArT i SNP poddano analizie BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), która polegała na przeszukiwaniu baz danych pod kątem sekwencji wysoce homologicznych do wybranych markerów SilicoDArT i SNP. Wykorzystano w tym celu następujące publicznie dostępne przeglądarki internetowe: Baza danych typu CEPH Geno <http://www.cephb.fr/en/cephdb/>, NCBI Map Viewer <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>, UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/>, Ensembl Map View [http://ensembl.fugu-sg.org/common/helpview? kw=mapview;ref](http://ensembl.fugu-sg.org/common/helpview?kw=mapview;ref). Zastosowane programy pomogły w identyfikacji lokalizacji uzyskanych sekwencji na poszczególnych chromosomach oraz w określeniu ich fizycznej lokalizacji, co zaprezentowano w publikacjach 1, 2 i 4. Następnie analizowano sekwencje wszystkich genów znajdujących się w wyznaczonym regionie chromosomów.

5.2.6. Analiza funkcjonalna sekwencji genów

Analizę funkcjonalną przeprowadzono przy użyciu programu Blast2GO (NCBI). Analizie poddano sekwencje wszystkich genów znajdujących się w regionie chromosomów, określone metodą analizy BLAST przeprowadzonej na stronie NCBI. Celem było uzyskanie informacji na temat funkcji biologicznej sekwencji genów zlokalizowanych w wyznaczonym regionie chromosomu.

5.2.7. Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych markerów SilicoDArT i SNP, sprzężonych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków, wigorem siewek oraz cechami struktury plonu i plonem kukurydzy.

Do projektowania starterów wykorzystano program Primer 3 Plus (Publikacje 1, 2 i 4). Dostęp do programu można uzyskać online i nie wymaga instalacji. W programie wykorzystano wiele funkcji, między innymi różne sposoby określenia sekwencji, dla której startery mają zostać zaprojektowane. Ustalano również właściwości starterów, między innymi ich długość, temperaturę topnienia, procentowy udział zasad GC, komplementarność, itp.).

5.2.8. Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami.

Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi warunkującymi plon wraz z jego komponentami (Publikacja 4) została przeprowadzona, z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wykonanej w termocyklerze C1000 firmy Biorad.

Mieszanina reakcyjna zawierała następujące składniki: 1 µl matrycy DNA (50 ng µL⁻¹), 4 µL buforu reakcyjnego (5×), 1,6 µL dNTP (10 mM), 1,6 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL startera forward (10 µM), 0,5 µL startera reverse (10 µM), 0,2 µL polimerazy GoTaq (5 U µL⁻¹) i 10,6 µL H₂O. Skład ten był modyfikowany, w zależności od zidentyfikowanego markera. Warunki PCR zostały indywidualnie określone dla każdego ze zidentyfikowanych markerów i różniły się pod względem temperatury przyłączania starterów, która była określona na podstawie temperatury ich topnienia.

Zastosowano następujący profil łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR): denaturacja początkowa przez 5 min w 95 °C, następnie 35 cykli (denaturacja przez 45 s w 95 °C), przyłączanie starterów przez 1 min (dla każdej pary starterów zastosowano inną temperaturę, zgodną z temperaturą ich topnienia), wydłużanie nici DNA przez 1 min w 72 °C oraz końcowe wydłużanie przez 5 min w 72 °C. Ostatni etap to chłodzenie do 4 °C.

5.2.9. Elektroforeza

Elektroforeza produktów amplifikacji PCR była prowadzona w 2,5 % żelu agarozowym, z dodatkiem 1 µl roztworu Midori Green, przez 2 h pod napięciem 100 V. W celu identyfikacji wielkości otrzymanych produktów amplifikacji użyty był wzorzec O'RangeRuler 50bp 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.

6. Wyniki

6.1. Doświadczenie polowe i analizy fenotypowe

Doświadczenie polowe opisane w publikacji 1 zostało założone na poletkach doświadczalnych należących do HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR (51°42'58.904" N, 17°13'29.13" E) natomiast doświadczenie polowe opisane w publikacjach 2 i 4 założono na poletkach doświadczalnych należących do HR Smolice i Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. z siedzibą w Kobierzycach (50°58'19.411" N, 16°55'47.323" E). Doświadczenia pozwoliły na wykonanie i analizę pomiarów biometrycznych 392 genotypów łącznie. W publikacji 1 analizowano zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor siewek kukurydzy natomiast w publikacjach 2 i 4 analizie poddano plon oraz jego komponenty: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów, liczba ziaren w rzędzie, masa ziarna z kolby, MTZ. Wyniki pomiarów zostały wykorzystane do mapowania asocjacyjnego.

W publikacji 1 obie obserwowane cechy (zdolność kiełkowanie ziarniaków i wigor) charakteryzowały się rozkładem normalnym. Analiza wariancji wykazała, że główny wpływ linii był istotny dla obu badanych cech. Średnie wartości kiełkowania ziarniaków wahały się od 3 (dla linii nr 137) do 9 (dla 60 linii) ze średnią 8,12. Średnie wartości wigoru siewek kukurydzy wahały się od 3 (dla linii: nr 50 i nr 85) do 9 (dla 57 linii) przy średniej 7,55. Zaobserwowano dodatnią ($r = 0,41$), statystycznie istotną ($p < 0,001$) korelację między kiełkowaniem nasion a wigorem siewek.

W publikacji 2 po zbiorze określono plon oraz jego komponenty (długość kolby, średnicę kolby, długość rdzenia, średnicę rdzenia, liczbę rzędów ziarna, liczbę ziaren w rzędzie, masę ziarna z kolby, masę tysiąca ziaren). Wszystkie obserwowane cechy, podobnie jak cechy analizowane w publikacji 1, charakteryzowały się rozkładem normalnym. Analiza wariancji wykazała, że główne efekty linii i lokalizacji, a także interakcji linia \times lokalizacja były istotne dla wszystkich badanych cech. Trzy cechy (średnica kolby, długość rdzenia i liczba rzędów ziarna) charakteryzowały się większą zmiennością w Kobierzycach niż w Smolicach. W warunkach polowych obserwowano zróżnicowanie w zakresie średniej wartości wybranych cech, np. średnia długość kolby dla wszystkich linii w Smolicach wynosiła 13,1 cm, a średnia długość kolby dla tych samych linii w Kobierzycach wynosiła 15,4 cm lub średnia masa ziarna dla linii w Smolicach wynosiła 91,2 g, a w Kobierzycach 111 g. Powyższe wyniki wskazują na

występowanie interakcji genotypowo-środowiskowych. W celu zbadania rozkładu wszystkich analizowanych zmiennych w obu lokalizacjach skonstruowano również wykresy gęstości. Szczyty na wykresach gęstości ilustrują zakresy, w których koncentrują się wartości analizowanych cech, np. dla większości analizowanych genotypów w obu lokalizacjach (Smolice, Kobierzyce) długość kolby mieściła się w zakresie 17-19 cm. Również w publikacji 2 na podstawie cech fenotypowych określono podobieństwo pomiędzy analizowanymi liniami. W tym celu zastosowano technikę wielowymiarową, czyli analizę zmiennych kanonicznych oraz odległości Mahalanobisa. Stwierdzono, że linie, które najbardziej różnią się od siebie pod względem analizowanych cech to linie z numerami 59 i 71 (odległość między nimi wynosiła 15,366). Największe podobieństwo stwierdzono między liniami 31 i 122, gdzie odległość pomiędzy nimi wynosiła 0,520. W publikacji tej nie zaobserwowano grupowania się linii pod względem analizowanych cech, jeżeli chodzi o pochodzenie z danej firmy hodowlanej. Dane z doświadczeń polowych pozwoliły również na analizę korelacji badanych cech. Dodatkowo, statystycznie istotne korelacje w obu lokalizacjach (Smolice, Kobierzyce) zaobserwowano między 25 parami cech (widoczne jest to na ryc. 2 i 3 w publikacji 2).

W publikacji 4 przeprowadzono analizę wariancji między genotypami dla analizowanych cech i podobnie jak w publikacjach 1 i 2 zaobserwowano istotne zróżnicowanie pomiędzy cechami. Analiza wariancji wykazała również statystycznie istotne zróżnicowanie dla wszystkich badanych cech między lokalizacjami, w których przeprowadzono doświadczenie polowe. Interakcja linie-lokalizacja nie była istotna, jedynie w przypadku liczby rzędów. W celu określenia zależności między grupami zmiennych w zbiorze danych, tj. obserwacjami cech struktury plonu i plonu w obu lokalizacjach, podobnie jak w publikacjach 1 i 2 zastosowano technikę wielowymiarową, a mianowicie analizę zmiennych kanonicznych. Wszystkie cechy charakteryzowały się rozkładem normalnym. W publikacji 4 można zaobserwować grupowanie genotypów na linie i mieszańce. W publikacji 4 analizowano również korelacje między obserwowanymi cechami w obu lokalizacjach, tj. w Smolicach i Kobierzycach. Wykazano, że w Smolicach najsilniej dodatnio skorelowanymi cechami były: długość kolby i długość rdzenia (97%), masa ziarna z kolby i plon (92%), długość kolby i masa ziarna z kolby (89%) oraz długość kolby i plon (87%). W przypadku Kobierzyc silnie dodatnio skorelowane były następujące cechy: długość kolby i długość rdzenia (98%), masa ziarna

z kolby i plon (97%), średnica kolby i średnica rdzenia (94%), średnica kolby i masa ziarna z kolby (93%) oraz średnica kolby i plon (93%).

6.2. Genotypowanie i mapowanie asocjacyjne

W publikacji 1 w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS) uzyskano łącznie 81 602 markery molekularne (53 031 SilicoDArT i 28 571 SNP). W wyniku mapowania asocjacyjnego z całej dostępnej puli markerów wybrano 15 409 (1 559 SilicoDArT i 13 850 SNP), które były związane z analizowanymi cechami czyli zdolnością kiełkowania ziarniaków kukurydzy i wigorem. Istotnie związane ze zdolnością kiełkowania ziarniaków kukurydzy były 1 323 markery molekularne (1 115 SilicoDArT i 208 SNP). Efekty poszczególnych markerów wahały się od -0,639 (dla markera SilicoDArT 2,382,757) do 0,637 (dla markera SNP 2,386,217). Z wigorem istotnie związanych było 890 markerów molekularnych (758 SilicoDArT i 132 SNP). Efekty poszczególnych markerów dla wigoru wahały się od -0,801 (dla markera SilicoDArT 25,947,631) do 0,714 (dla markera SNP 4,770,911). Aby zawęzić pulę markerów, które zostaną wykorzystane do mapowania fizycznego wybrano tylko te, które były istotne dla obu cech jednocześnie (zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor). W związku z tym dla obu cech istotnych było pięćdziesiąt sześć markerów (47 SilicoDArT i 9 SNP). Spośród tych 56 markerów na drodze analiz statystycznych wybrano 20 najbardziej istotnych (pięć z tych markerów było istotnych na poziomie 0,001 dla wigoru siewek i na poziomie 0,05 dla kiełkowania ziarniaków, kolejne pięć markerów było istotnych na poziomie 0,001 dla kiełkowania ziarniaków i na poziomie 0,05 dla wigoru nasion, następne pięć markerów było istotne na poziomie 0,001 tylko dla wigoru siewek i ostatnie pięć było istotne na poziomie 0,001 tylko dla kiełkowania ziarniaków). Markery te zostały wykorzystane do mapowania fizycznego w celu określenia ich lokalizacji na mapie genetycznej.

W publikacji 2 wykorzystano te same wyniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) co w publikacji 1, ale korelowano je z cechami struktury plonu i z plonem. Największa liczba markerów molekularnych była związana z długością kolby (1203), średnicą kolby (1759), długością rdzenia (1201) i średnicą rdzenia (2326). Najmniej markerów było związanych z liczbą rzędów ziarna (321) i liczbą ziaren w rzędzie (130). W celu zawężenia liczby markerów do mapowania fizycznego, spośród wszystkich

znaczących wybrano 16, które były związane z tymi samymi czterema cechami w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice).

W publikacji 4, w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS) uzyskano łącznie 92 614 markerów molekularnych, w tym 60 436 markerów SilicoDArT i 32 178 SNP. Jako kryteria określające przydatność zidentyfikowanych markerów zastosowano $MAF > 0,25$ i liczbę brakujących obserwacji $< 10\%$, co pozwoliło na zmniejszenie liczby markerów do 32 900 (26 234 SilicoDArT i 6666 SNP), które następnie wykorzystano do mapowania asocjacyjnego. Większość markerów SNP i SilicoDArT była związana z plonem (18 352-Kobierzyce i 18 751-Smolice), masą ziarna z kolby (17 685-Kobierzyce i 18 314-Smolice) oraz średnicą rdzenia (17 787-Kobierzyce i 16 018-Smolice). Niewiele markerów było powiązanych z liczbą rzędów ziarniaków (12 757-Kobierzyce i 11 714-Smolice) oraz liczbą ziaren w rzędzie (13 265-Kobierzyce i 13 981-Smolice). Aby zawęzić liczbę markerów do mapowania fizycznego, spośród wszystkich istotnych markerów wybrano 20 markerów, które były związane z tymi samymi cechami w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice).

6.3. Mapowanie fizyczne

W publikacji 1 do mapowania fizycznego wytypowano 20 istotnych markerów molekularnych (Tab. 1). Analiza ogólnodostępnych baz danych pozwoliła na wytypowanie sześciu markerów (pięć SilicoDArT - 2,435,784, 4,772,587, 4,776,334, 2,507,310, 25,981,291 i jeden SNP - 2,386,217), które zlokalizowane są wewnątrz genów. Analiza doniesień literaturowych wykazała, że istnieje duże prawdopodobieństwo, że geny te tzw. kandydujące mogą wpływać zarówno na zdolność kiełkowania ziarniaków, jak i na wigor siewek.

Tabela 1.

Dwadzieścia statystycznie istotnych markerów związanych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków kukurydzy oraz wigorem

Marker	Typ markera	Cechy	Chromosom	Lokalizacja markera	Gen kandydujący
4,589,607	DArT	Wigor (0.001), Zdolność kiełkowania (0.05)	Chr2	168,930,481	128 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 100272672 84,601 bp at 3' side: diacylglycerol lipase-beta
7,059,320	DArT	Wigor (0.001), Zdolność kiełkowania (0.05)	Chr2	168,930,481	128 bp at 5' side: uncharacterized

					protein loc 100272672 84,601 bp at 3' side: diacylglycerol lipase- beta
2,435,784	DArT	Wigor (0.001), Zdolność kiełkowania (0.05)	Chr1	56,888,568	sucrose synthase 4 isoform x 2 sucrose synthase isoform x 1
4,776,334	DArT	Wigor (0.001), Zdolność kiełkowania (0.05)	Chr2	129,929,222	phosphoinositide phosphatase sac7 isoform x 1 phosphoinositide phosphatase sac7 isoform x 2
25,000,251	DArT	Wigor (0.001), Zdolność kiełkowania (0.05)	Chr1	89,047,678	110,109 bp at 5; side: ndrl/hin1-like protein 10 552 bp at 3; side: translocase of chloroplast 120, chloroplastic
4,765,935	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001), Wigor (0.05)	Chr8	22,460,192	5781 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 100279368 1404 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100280975
4,772,587	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001), Wigor (0.05)	Chr4	141,172,070	Putative set-domain containing protein family isoform x 1 Putative set-domain containing protein family isoform x 2
2,500,039	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001), Wigor (0.05)	Chr2	190,086,478	12,544 bp at 5' side: atp-dependent dna helicase pif1-like 2947 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100217048
16,726,826	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001), Wigor (0.05)	Chr2	190,140,760	821 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 100283853 438 bp at 3; side: alpha carbonic anhydrase 4
25,943,049	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001), Wigor (0.05)	Chr2	62,908,172	86,280bp at 5' side: uncharacterized protein loc100273593 isoform x 1 1726 bp at 3' side: inhibitor of apoptosis-like protein
4,580,898	DArT	Wigor (0.001)	Chr1	159,125,630	30,617 bp at 5' side: uncharacterized protein loc103644989 isoform x 1 161,136 bp at 3' side:

					uncharacterized protein loc 100274710 isoform x 2
2,507,310	DArT	Wigor (0.001)	Chr2	69,438,881	grx_c8-glutaredoxin subgroup iii
9,699,056	DArT	Wigor (0.001)	Chr1	159,575,935	228,802 bp at 5' side: scarecrow-like protein 34 154,620 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 103640060
25,981,291	DArT	Wigor (0.001)	Chr1	86,637,007	a-agglutinin anchorage subunit-like
25,947,631	DArT	Wigor (0.001)	Chr8	143,760,900	5439 bp at 5' side: protein quirky 78,137 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100284991
2,382,757	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001)	Chr3	32,582,513	672 bp at 5' side: probable mitochondrial import receptor subunit tom20 21,113 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100276184
2,386,217	SNP	Zdolność kiełkowania (0.001)	Chr3	32,204,938	probable 3-beta-hydroxysteroid-delta(8), delta(7)-isomerase
4,770,719	SNP	Zdolność kiełkowania (0.001)	Chr3	32,126,239	uncharacterized protein loc 100272990 uncharacterized protein loc 100272990 isoform x 1
7,059,241	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001)	Chr3	32,125,561	uncharacterized protein loc 100272990 uncharacterized protein loc 100272990 isoform x 1
2,565,888	DArT	Zdolność kiełkowania (0.001)	Chr3	33,897,068	11,124 bp at 5' side: gds1 esterase/lipase at 1g338116976 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100273387

W publikacji 2, spośród 15 409 (1 559 SilicoDArT i 13 850 SNP) markerów istotnie związanych z analizowanymi cechami struktury plonu i plonem, wybrano 16, które były istotne dla tych samych czterech cech w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice) (Tab. 2). Analiza bioinformatycznych baz danych pozwoliła na ustalenie lokalizacji wybranych markerów molekularnych. W wyniku analiz stwierdzono, że 6 z 16 (1818; 14506; 2317; 3233; 11657; 12812) znajduje się wewnątrz genów, jak

przedstawiono w tabeli 2. Dla pozostałych 10 markerów określono ich lokalizację i pokazano odległość od najbliżej zlokalizowanych genów.

Tabela 2.

Szesnaście statystycznie istotnych markerów związanych z cechami struktury plonu i plonem kukurydzy

Marker	Typ markera	Cechy	Chromosom	Lokalizacja markera	Gen kandydujący
17,300	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr1	2.15×10^8	40,523 bp at 5' side: gdu1 68,570 bp at 3' side: receptor like protein kinase isoform
18,852	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr3	1.02×10^8	25,4293 bp at 5' side: low quality protein: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 18,563 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 103650335
1818	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr8	1.5×10^8	A marker that is anchored to the gene cinnamoyl-CoA reductase1
16,474	DArT	długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia	Chr3	19,789,904	1270 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 100382383 precursor 4772 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100279241 precursor
14,506	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr9	28,978,769	A marker that is anchored (WAT1-related protein At1g09380)
13,517	DArT	długość kolby, długość rdzenia, liczba rzędów ziarna, MTZ	Chr9	1.31×10^8	8016 bp at side: uncharacterized protein loc103639077 isoform 1 450 bp at 3' side: allene-oxidecyclase2.
2317	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr7	1.38×10^8	A marker that is anchored (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit c)
7950	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr2	43,524,954	233,907 bp at 5' side: actin binding protein precursor 5461 bp at 3' side: mads-box transcription factor 27 isoform 2

16,703	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr2	1.68 x 10 ⁸	A marker that is anchored (uncharacterized protein loc 100282883
17,490	DArT	długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, liczba rzędów	Chr10	1.39 x 10 ⁸	91,320 bp at 5' side: scarecrow-like protein 8 6776 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100383502
17,843	DArT	długość kolby, liczba ziarna w rzędzie, masa ziarna z kolby, plon	Chr3	2.25 x 10 ⁸	1290 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 100192921 isoform 1 6791 bp at 3' side: uncharacterized protein loc 100276743
18,664	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr5	2.11 x 10 ⁸	85,540 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 100278506 101,692 bp at 3' side: delta-12 fatty acid desaturasefad2 isoform 1
3233	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr3	2.1 x 10 ⁸	A marker that is anchored RNA polymerase II transcriptional coactivator KERP
4205	DArT	średnica kolby, liczba rzędów ziaren, masa ziarna z kolby, plon	Chr5	2.26 x 10 ⁸	42,608 bp at 5' side: uncharacterized protein loc 118472127 46,806 bp at 3' side: callose synthase
11,657	DArT	średnica kolby, średnica rdzenia, masa ziarna z kolby, plon	Chr5	2.22 x 10 ⁸	A marker that is anchored aspartate aminotransferase
12,812	DArT	długość kolby, długość rdzenia, liczba rzędów ziarna, MTZ	Chr1	15,198,950	A marker that is anchored sucrose transporter 1

W publikacji 4 spośród 32 900 markerów (26 234 DArT i 6666 SNP) istotnie powiązanych z analizowanymi cechami struktury plonu i plonem wybrano 20, które były istotne dla tych samych cech w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice) (Tab. 3). Podobnie jak w poprzednich publikacjach kreślono lokalizację wybranych markerów SNP. Niestety nie udało się ustalić położenia jednego markera. Kolejnym krokiem było zaprojektowanie starterów do identyfikacji 19 wyselekcjonowanych i zlokalizowanych markerów. Sześć spośród 19 markerów SNP znajduje się wewnątrz scharakteryzowanych genów.

Tabela 3.

Dziewiętnaście statystycznie istotnych markerów związanych z cechami struktury plonu i plonem kukurydzy

Marker	Typ markera	Chromosom	Gen kandydujący
28629	SNP	Chr. 8	probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
28630	SNP	Chr. 8	637 bp at 5' side: putative protein phosphatase 2c 4658414 bp at 3' side: metallothionein-like protein type 2
28631	SNP	Chr. 4	99861 bp at 5' side: uncharacterized protein loc1002769903113 bp at 3' side: disease resistance protein rpm1 isoform x1
28632	SNP	Chr. 7	uncharacterized atp-dependent helicase ypra
28633	SNP	Chr. 7	4486 bp at 5' side: lon protease homolog 2, peroxisomal54848 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100280671
28634	SNP	Chr. 7	132577 bp at 5' side: isoamylase-type starch debranching enzyme iso3 isoform x135136 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100272620
31977	SNP	Chr. 1	1394 bp at 5' side: 60 s ribosomal protein l32-like68287 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100193765 isoform x1
29503	SNP	Chr. 4	uncharacterized protein loc103655564
28625	SNP	Chr. 1	probable arabinosyltransferase arad1
28640	SNP	Chr. 9	probable sugar phosphate/phosphate translocator
28648	SNP	Chr. 1	uncharacterized protein loc100502264
28639	SNP	Chr. 8	3130 bp at 5' side: protein senescence-associated gene 21, mitochondrial91 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100382335
28649	SNP	Chr. 4	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15 isoform x2ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15 isoform x3
28654	SNP	Chr. 5	318 bp at 5' side: uncharacterized protein loc100383290 isoform x12155 bp at 3' side: uncharacterized protein loc111589274
30773	SNP	Chr.4	30080 bp at 5' side: uncharacterized protein loc103653173940 bp at 3'side: uncharacterized protein loc100193686 isoform x1
30772	SNP	Chr.3	1814 bp at 5' side: uncharacterized protein loc100192805 isoform x240087 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100278501
29294	SNP	Chr. 5	hydroxyproline o-galactosyltransferase galt6
28262	SNP	Chr. 9	uncharacterized protein loc100383550uncharacterized protein loc100383550 isoform x1
28263	SNP	Chr. 3	uncharacterized protein loc103650272

6.4. Projektowanie starterów

Kolejnym krokiem po mapowaniu fizycznym w publikacjach 1, 2 i 4 było zaprojektowanie starterów do identyfikacji wybranych i zlokalizowanych markerów związanych z analizowanymi cechami (zdolność kiełkowania ziarniaków, wigor, plon i jego komponenty). Startery prezentowane w publikacji 1 zamieszczono w tabeli 4, startery prezentowane w publikacji 2 przedstawiono w tabeli 5, natomiast startery wymienione w publikacji 4 przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 4.

Startery zaprojektowane do identyfikacji statystycznie istotnych markerów związanych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków i wigorem siewek kukurydzy

Marker	Sekwencje starterów		Tm (°C)	Wielkość produktu
	Forward	Reverse		
4,589,607	ACGGGAGAGGAACGCTGCAG	GCCTAAACACAAGCAAGTGGGC	63	70
7,059,320	ACGGGAGAGGAACGCTGCAG	TCTGAAGAGCCATGGCAAAGC	62	483
2,435,784	GGTATTTCTGAGTACTGCAG	no		
4,776,334	AACATTTACATCATCTGCAG	AATTGATCACAAATGTTATT	56	161
25,000251	GAGAGTGCAGAGTGCAG	TGGGCATGCTACTGAGTTTT	54	207
4,765,935	AACAGACAACACTACTGTAG	TCGAAACAAATTAGGATCAAACCTCT	57	199
4,772,587	TACCTTGTGAAACTGCAG	ACCTGCTCGGGTCATCAAAT	52	149
2,500,039	GCTCTGTTTTTCGTGCTGCAG	ACAAGATCTGTGGTGCCGAG	60	531
16,726826	AGCCAAGGGTAGCTGCAG	CGTAGCAGCTGCATTCAAGAC	59	151
25,943049	ATTAATAAGTGCTGCTGCAG	CGACCATTTTCGATAGCAGTA	54	74
4,580,898	ACGGTAGCAACGAACCTGCAG	TACAGGTTGCAGGCTTCCAG	60	86
2,507,310	TGATGATCGAAGGGCTGCAG	TAAAGCTACTTGCGCCACA	60	192
9,699,056	CCATCGCCATTTCCCTGCAG	TTACCCACCCCAGTACACCA	60	173
25,981291	CTCTGCGCCTCCGTCTGCAG	AGCGCAAGCAACGTGAGAGA	62	197
25,947631	TATCAATGTAACATCTGCAG	CCTGTTCTACTTCGTCACCGCG	60	185
2,382,757	TGCATTGCCTACATCTGCAG	GCGCAAGTAGCCCAAATACG	60	97
2,386,217	CGTACGGCCACATCCTGCAG	GGTACGCGGTGACGAAGTAG	60	78
4,770,719	CCGTACGGCCACATCCTGCAG	TTGCCGACGAAATACGCCCA	63	137
7,059,241	ATAGTAGGTGATTGCTGCAG	GGCCTGTTTGCGATTCAATT	57	153
2,565,888	TCCCACAGCACAGCTGCAC	CCGTTTCAGTTTTTCCGGCG	62	88

Tabela 5.

Startery zaprojektowane do identyfikacji statystycznie istotnych markerów związanych z cechami struktury plonu i plonem kukurydzy

Marker	Sekwencja		Tm [°C]	Długość produktu
	Forward	Reverse		
17,300	CGCCTTGACCTGATCTGCAG	AGCCTTCTCAACACACTCGG	56	329
18,852	TCCTCAAAAATCGTTTATGCAT	CTCTCCCTCTGCAACATGAG	53	230
1818	TTTGACAGGCTGAAACTGCAG	TGGAGGCACGGGAGAAGTAT	59	186
16,474	GTGAGGAGAAAAAAGTGCAG	TGCTTCTGATAACACCGCA	53	321
14,506	TCAGATGATACGATAATTACTGCAG	TGTCCTGCGTAGAAATCCACA	58	151
2317	AGGAACGAAGAAACCTGCAG	ACGAGGAATGCTACACACCA	58	216
7950	GTAAAGGTCTGTTTCTGCAG	CAGCTGTTTGCTGAGTGC	55	153
16,703	GTAGTGGTAGTGGCCTGCAG	TCACTCGAAGAACCAAGCCC	56	500
17,490	GCATTTTCTATTAATTATTTACTGCAG	AAGTGGCCGGTTACCATATC	55	282
17,843	CCTCAATTATATGTTACTGCAG	TCAGAAATTATGTCCGACGGT	55	159
18,664	GATCCTGTTAGCCTCTGCAG	AATCAGGAGCAGAAAAGGCTCT	58	385
3233	GTACATTTCAITCTCCTGCAG	ACGGTGGAAATGTGCTTTTG	56	388

4205	AGCATAGCGAGACCCTGCAG	GGTGAATCCAGACTGTGGCA	60	255
11,657	ATAGGACAGAAGAGCTGCAG	TTGCTTTGTAAACGCGGCT	58	291
12,812	GTAGAGCAATTGACTGCAGA	AGGGCCCAACTGGGTG	57	150

Tabela 6.

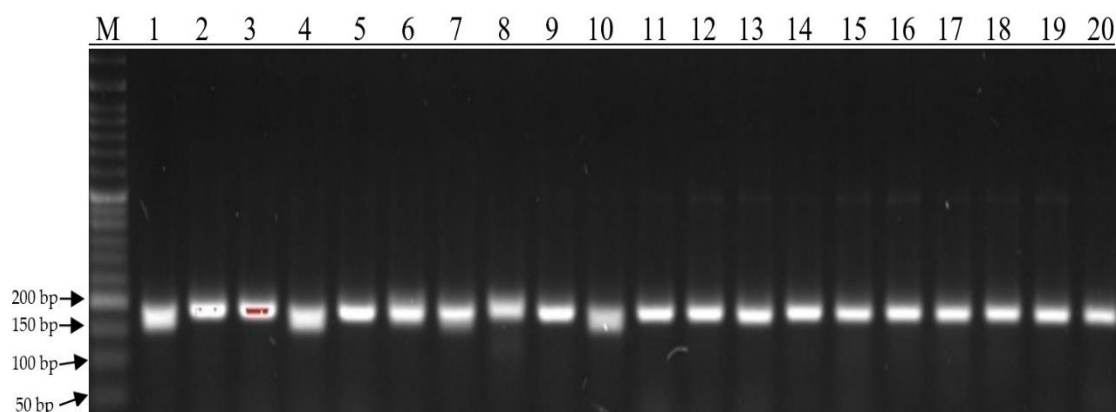
Startery zaprojektowane do identyfikacji statystycznie istotnych markerów związanych z cechami struktury plonu i plonem kukurydzy

Marker	Sekwencje starterów		Tm [C]	Wielkość produktu
	Forward	Reverse		
28629	CACCTGGAGAGGCCCTGCAG	TGAAGACTGGACTCGGTCCG	61	437
28630	AGGGACAACATACTGCAG	ACGGTAAAGAGACACAATCCCT	58	189
28631	AAATCTGCGATCAACTGCAG	GACTGGAGAGCCAGAACCTG	55	291
28632	AGAGAAGTATTGTCTTTCTGCAG	GCTGTCCTTGATGCCAAGTC	57	437
28633	GATTATCCTTCGAGCTGCAG	ACATGAATGTTGCAGGCAGG	61	423
28634	TTTATTCCTCACTGCTGCAG	AGAAAGAAGGAATGTAACAACACG	56	342
31977	CCACTTGCTCTCTGCTGCAG	CTCTCTATGGCTCGTCGCTG	59	207
29503	ACTCAGTAGCAGCACTGCAG	GTAGCTGCTGCCTCTCCAA	59	455
28625	GCGCGTTGTGAAGCTGCAG	TTTCAGGGCGGAAGGTTTCG	56	488
28640	TACTCTGTAAACACCTGCAG	ATGCGCAGTTGCCTACTTAT	62	158
28648	AATAAGAGCTTTTGCTGCAG	AGCGACGAGTAATCAATCCC	54	453
28639	GGCTTCCAGCTTGGCTGCAG	ATACGTGACGCACGAGACAAAC	58	189
28649	TGGAGCAAAAGTATCTGCAG	TTTTTCACCTCTTGACGGGC	61	471
28654	GGAATCCATCAGTTCTGCAG	CTTCCCGAGTGCATATCCT	59	169
30773	AAACCAAACCGCCGCTGCAG	CAGGCAGAGCTCAGTCCGAA	61	411
30772	GCATTTTACGGGGTCTGCAG	AGAGCTTGCTCCCTGAACG	57	500
29294	GTTTGTGGGACAACTGCAG	AGGGCTTAATTTATTTCCAGCCA	57	184
28262	TAAGAATGAGAAGCCTGCAG	GAATGCACTGTTGTTCTGCC	59	454
28263	GCCGGGAATAACTTCTGCAG	GTTCTTACTTCCGCCAGGCT	59	358

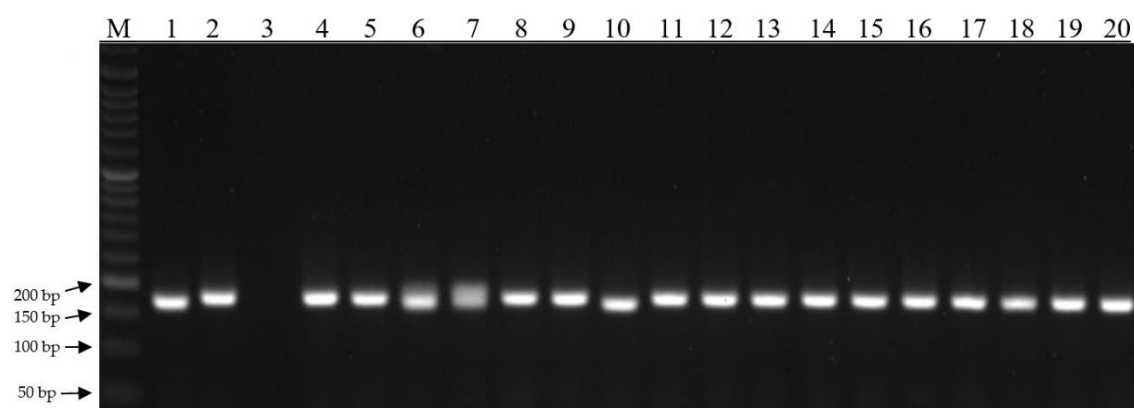
6.5. Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami

W publikacji 4, spośród 19 wybranych markerów dwa (28629 i 29294), dawały polimorficzne produkty amplifikacji na żelach agarozowych. Na podstawie obserwacji fenotypowych 20 genotypów referencyjnych pogrupowano na dobrze i słabo plonujące. Pierwsze 10 genotypów sklasyfikowano jako najwyżej plonujące, natomiast genotypy z numerami od 11 do 20 jako dające najniższy plon. W przypadku markera 28629 zaobserwowano specyficzny produkt o długości 189 bp dla genotypów 1, 4 i 10. Dla pozostałych genotypów otrzymano niespecyficzne produkty o długości 200 bp (Figura 1). Marker ten znajduje się na chromosomie 8, oddalony jest o 3130 bp od genu związanego ze starzeniem się białka mitochondrialnego i oddalony o 91 bp od niescharakteryzowanego białka loc100382335. W przypadku markera 29294 zaobserwowano specyficzny produkt o długości 189 bp dla genotypów 1 i 10. Dla pozostałych genotypów otrzymano niespecyficzne produkty o długości 200 bp (Figura

2). Marker ten znajduje się na chromosomie 5 wewnątrz genu hydroksyproliny 0-galaktozylotransferazy (galt6). Oba markery zostaną poddane dalszym testom na większej liczbie skrajnych genotypów, które zostaną wykorzystane do wstępnej selekcji genotypów wysoko plonujących.



Rycina 1. Elektroferogram przedstawiający produkty amplifikacji o długości 189 bp, charakterystyczne dla markera SNP 28639

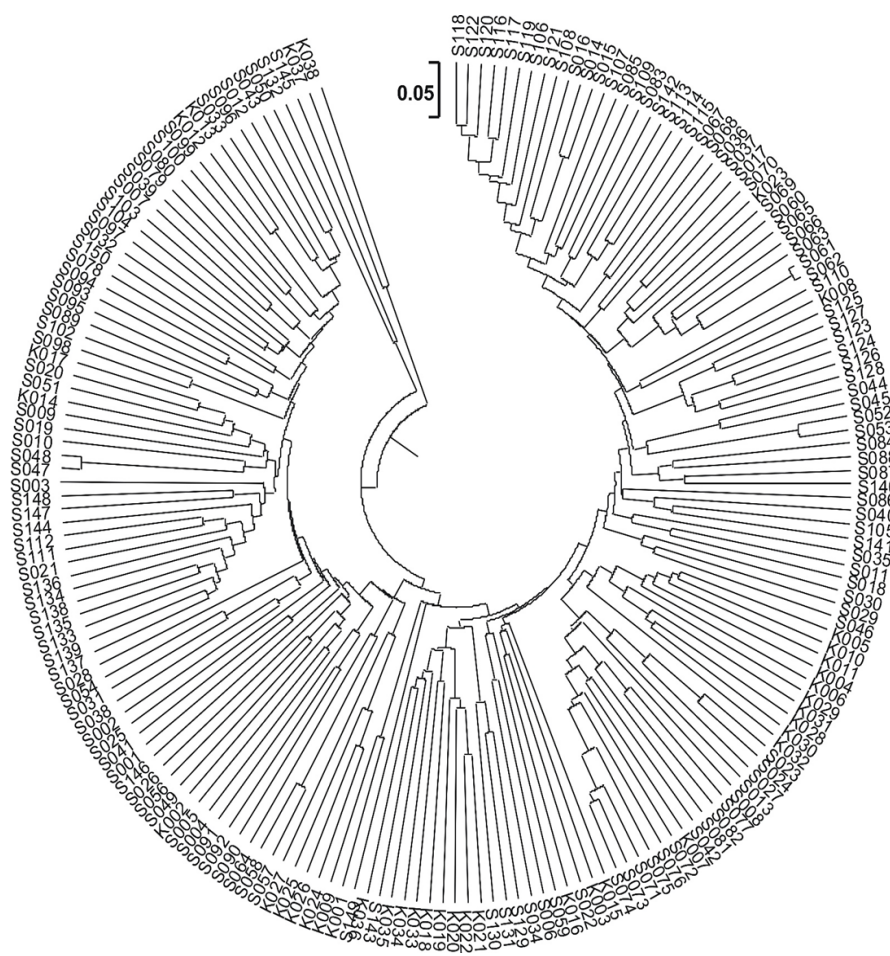


Rycina 2. Elektroferogram przedstawiający produkty amplifikacji o długości 184 bp, charakterystyczne dla markera SNP 29294

6.6. Analiza polimorfizmu pomiędzy badanymi genotypami

W publikacji 2 do sekwencjonowania nowej generacji wysłano łącznie 186 linii wsobnych, które analizowano również w warunkach polowych. W wyniku sekwencjonowania zidentyfikowano markery molekularne SilicoDArT (53 031) i SNP (28 571), na podstawie których oszacowano podobieństwo genetyczne pomiędzy analizowanymi liniami (Ryc. 3). Analizowane linie utworzyły cztery główne grupy

podobieństwa genetycznego. W grupie I znalazły się dwie linie (K037 i K038) z Małopolskiej Hodowli Roślin w Kobierzycach, które były do siebie podobne w 63%. Linie te były w 41% podobne do pozostałych 184 genotypów. Do drugiej grupy przynależą dwie linie (S145 i S132) należące do Hodowli Roślin Smolice. Linie te były do siebie podobne w 51% i w 45% do pozostałych linii. Trzecia grupa złożona była z 73 linii. W ramach trzeciej grupy można było wyróżnić trzy zasadnicze podgrupy. Pierwsza podgrupa złożona była z 25 linii (2 należące do Małopolskiej Hodowli Roślin i 23 do Hodowli Roślin Smolice). Drugą podgrupę tworzyły 23 linie (2 należą do Małopolskiej Hodowli Roślin i 21 do Hodowli Roślin Smolice). Pierwsza i druga podgrupa były podobne w 58%. Trzecia podgrupa była w 49% podobna do pierwszej i drugiej i obejmowała 25 linii (5 należących do Małopolskiej Hodowli Roślin i 20 należących do Hodowli Roślin Smolice). Czwarta grupa również składa się z trzech podgrup (łącznie 109 linii). Pierwsza podgrupa składa się z 23 linii (14 należących do Małopolskiej Hodowli Roślin i 9 należących do Hodowli Roślin Smolice). Linie z Małopolskiej HR były do siebie podobne w 59% i w 49% do linii z HR Smolice. Drugą podgrupę tworzyło 26 linii (11 z małopolskiej Hodowli Roślin i 15 z Hodowli Roślin Smolic). Linie z Hodowli Roślin Smolice były do siebie podobne w 60%, natomiast do linii z Małopolskiej Hodowli Roślin były podobne w 51% (ryc. 3). Do trzeciej, najliczniejszej podgrupy zaliczono 59 linii z Hodowli Roślin Smolice i 1 z Małopolskiej Hodowli Roślin (K008). Linie z Hodowli Roślin Smolice były do siebie podobne od 59% do 95%. Analizując dendrogram można zauważyć, że linie ze Smolic wykazują do siebie większe podobieństwo niż do linii z Małopolskiej HR i odwrotnie, linie z Małopolskiej HR były do siebie bardziej podobne niż do linii ze Smolic (Ryc. 3).



Rycina 3. Dendrogram podobieństwa genetycznego analizowanych linii, określony na podstawie wszystkich zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP

W publikacji 4, podobnie jak w publikacji 2 na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SNP i SilicoDArT skonstruowano dendrogram podobieństwa genetycznego dla 188 analizowanych genotypów (Ryc. 4). Dendrogram bardzo wyraźnie pokazał dwie odrębne grupy podobieństwa. Pierwszą grupę stanowiło 65 linii wsobnych z Małopolskiej HR w Kobierzycach, natomiast drugą grupę stanowiły 122 analizowane mieszańce i 1 linia wsobna. Takie idealne grupowanie pokazuje przydatność markerów SNP i SilocoDArT do grupowania genotypów według podobieństwa genetycznego (Ryc. 4).



Rycina 4. Dendrogram podobieństwa genetycznego analizowanych linii mieszańców, określony na podstawie wszystkich zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP

7. Podsumowanie

Od połowy lat 90. XX w. w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie, wykorzystując nowoczesne metody biotechnologii i biologii molekularnej prowadzone są intensywne badania nad strukturą i funkcją genomu kukurydzy. W wyniku kompleksowych eksperymentów hodowlanych, obserwacji fenotypowych i analiz genetycznych zidentyfikowano do tej pory wiele QTL związanych z określonymi cechami ilościowymi takimi jak plon, cechy struktury plonu, zdolność kiełkowania ziarniaków oraz wigor. Ponadto jak opisano w publikacji 3 hodowla heterozyjna kukurydzy konsekwentnie zmierza do wykorzystania potencjału wigoru mieszańców, skrócenia procesu hodowlanego (np. poprzez wykorzystanie linii podwojonych haploidów) oraz poprawy jakości i zmniejszenia kosztów związanych z produkcją nasion. Priorytetem dla wszystkich hodowców jest uzyskanie wysokowydajnych i odpornych na choroby odmian kukurydzy (Wan i in., 2021). W niniejszej rozprawie doktorskiej analizowano linie i mieszańce kukurydzy zarówno pod względem fenotypowym jak i genotypowym, w celu zidentyfikowania markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi plon jak i jego komponenty oraz zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor siewek. W oparciu o obserwacje fenotypowe (związane z plonem, cechami struktury plonu, zdolnością kiełkowania i wigorem) przeprowadzono analizę wariancji. W publikacjach 1, 2 i 4 dla wszystkich cech zaobserwowano istotne różnice pomiędzy genotypami. Analiza wariancji wykazała również statystycznie istotne zróżnicowanie, dla wszystkich badanych cech pomiędzy lokalizacjami w których przeprowadzono doświadczenie polowe. W celu określenia zależności pomiędzy grupami zmiennych w zbiorze danych, czyli obserwacjami cech struktury plonu, wysokości plonu, zdolności kiełkowania ziarniaków oraz wigoru zastosowano analizę zmiennych kanonicznych. Wszystkie cechy charakteryzowały się rozkładem normalnym. Można było zaobserwować grupowanie genotypów, np. na linie i mieszańce (publikacja 4). Analiza fenotypowa nie pozwala jednak na selekcję komponentów rodzicielskich do krzyżowań heterozyjnych, gdyż w dobie postępu technologicznego tradycyjne metody stosowane w hodowli są niewystarczające. W świetle tego wyzwania, w nowoczesnych programach hodowlanych wykorzystywane są wysokowydajne techniki analizy genomów roślin uprawnych, w celu ulepszenia nowych odmian, w tym kukurydzy (Liu i in., 2015). Takie podejście zorientowane na genomikę pozwala uzyskać informacje o regionach kodujących, które dostarczają informacji o strukturze białka (genu), a także o regionach

między genowych (Andorf i in., 2016). Jak podano w publikacji 3, wraz z postępowaniem w rozwoju wysokowydajnych metod sekwencjonowania DNA, umożliwiających poznanie sekwencji całych genomów i transkryptomów, pojawiła się nowa jakość badań wielu gatunków roślin, w tym kukurydzy (Aurus i Cairns, 2014; Godfray, 2014). Wprowadzenie metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS) umożliwiło odkrycie sekwencji nukleotydowej roślin innych niż organizmy modelowe o małym genomie, takie jak *Arabidopsis thaliana*. Głównymi obszarami zainteresowania są gatunki uprawne, takie jak zboża, kawa, kukurydza i trzcina cukrowa (Dell'Acqua i in., 2015). Od czasu sekwencjonowania genomu pierwszej rośliny modelowej w 2000 roku zarejestrowano sekwencje ponad 100 innych gatunków roślin (Shendure i Ji, 2008; Michael i VanBuren, 2015). Jak podano w publikacji 4 dzięki tym badaniom możliwa jest detekcja polimorfizmów SNP i ich korelacji z określonymi cechami, a także tzw. selekcja genomowa, która umożliwia monitorowanie całych segmentów genomu w programach hodowli rekombinacyjnej. Ważne jest, aby cele praktyczne zakładały podjęcie kompleksowych badań podstawowych, wnoszących istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu genetyki, fizjologii i biochemii roślin.

W ostatnich latach wielu autorów próbowało zidentyfikować markery molekularne powiązane funkcjonalnie z ważnymi cechami kukurydzy. Bocianowski i in. (2023) wykorzystali technologię NGS i mapowanie asocjacyjne do identyfikacji markerów związanych z efektem heterozji u kukurydzy. Stosując te same metody, Sobiech i in. (2023) zidentyfikowali markery powiązane z odpornością roślin kukurydzy na fuzarium. Technologię NGS wykorzystuje się do sekwencjonowania genomów i transkryptomów, badania interakcji białko–DNA/RNA, oceny poziomu metylacji, odkrywania nowych polimorfizmów DNA i prowadzenia badań metagenomicznych (Soto i in., 2016). Technologia ta pozwala na analizę różnych fragmentów DNA reprezentowanych przez wiele kopii podczas pojedynczej reakcji, przygotowanie biblioteki, a następnie zebranie gigabajtów danych genomowych z jednego przebiegu sekwencjonowania (Addo-Quaye i in., 2017; Anandhakumar i in., 2019). Zwiększa to nie tylko liczbę badanych próbek ale także zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników sekwencjonowania. Jest to szczególnie cenne, gdy różnice między określonymi genotypami są niewielkie (Liu i in., 2015). Koszty i czas potrzebny na sekwencjonowanie, w przeliczeniu na jednostkę uzyskanej informacji są znacznie niższe w porównaniu z kosztami analiz prowadzonych przy użyciu tradycyjnych sekwenatorów

kapilarnych (Michael, 2009). Inną strategią sekwencjonowania, stosowaną głównie do badania interakcji między roślinami a środowiskiem, jest zastosowanie metod NGS do charakteryzowania transkryptomu roślinnego w różnych stanach fizjologicznych. Analiza sekwencji cDNA dostarcza informacji o sekwencjach, które ulegają transkrypcji w określonych tkankach lub narządach, i pomimo pewnych ograniczeń dane te są bardzo przydatne dla hodowców (Liu i in., 2015; Perez-de-Castro i in., 2012; Huang i in., 2011). Techniki sekwencjonowania nowej generacji umożliwiają także jakościowe i ilościowe analizy genów ulegających ekspresji w różnych warunkach, a wyniki tych analiz wykorzystywane są do mapowania asocjacji (Ding i in., 2015; Thompson i Milos, 2011; Jiao i in., 2017; Egan i in., 2012). W artykułach 1, 2, 3 i 4, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zaprezentowano użyteczność analiz polowych, molekularnych, bioinformatycznych i statystycznych w identyfikacji genów kandydujących sprzężonych z genami związanymi z plonem, cechami struktury plonu, zdolnością kiełkowania ziarniaków oraz wigorem. Ponadto zaproponowano metody służące do identyfikacji genów kandydujących, które będą mogły zostać wykorzystane do selekcji genotypów o pożądanym cechach. Pozwoli to na zaoszczędzenie środków finansowych, które były niezbędne na wyhodowanie odmian kukurydzy metodami tradycyjnymi. Poniżej przedstawiono posumowanie wyników badań indywidualnie dla każdej publikacji.

W publikacji 1 wykazano, że rozwój nowoczesnych technologii molekularnych, zwiększenie zdolności kiełkowania nasion i wigoru siewek oraz maksymalizacja zysków są obecnie podstawą zrównoważonego rolnictwa. Wigor siewek i zdolność kiełkowania nasion kukurydzy to bardzo złożone właściwości odmian, zdeterminowane genetycznie i fizjologicznie. Cechy te nie są łatwe do zdefiniowania, jednak dobrym wigorem charakteryzują się odmiany o intensywnym wzroście początkowym, mniej wrażliwe na przymrozki, a także posiadające większą zdolność do pobierania składników w niskich temperaturach. Wyraża się to bardziej zieloną barwą i mniejszym żółknięciem lub zasychaniem liści (Rodrigues i in., 2017). Dzięki technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS) możemy wygenerować ogromne ilości danych dotyczących sekwencji DNA, które staną się narzędziem do identyfikacji markerów molekularnych sprzężonych z cechami, takimi jak wigor i zdolność kiełkowania ziarniaków (Zing i in., 2015; Tang i in., 2015; Nannas i Dawe, 2015). W badaniach dotyczących rozprawy doktorskiej, w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS) 152 linii wsobnych kukurydzy uzyskano łącznie 81 602 markery molekularne (53 031 SilicoDArT i 28 571 SNP). W

kolejnym etapie badań markery te oraz obserwacje cech fenotypowych w zakresie wigoru i zdolności kiełkowania ziarniaków wykorzystano do mapowania asocjacyjnego. W wyniku analizy asocjacji wyselekcjonowano 15 409 (1559 SilicoDarT i 13 850 SNP) markerów molekularnych istotnie powiązanych z dwiema analizowanymi cechami. Ostatecznie wybrano 20 najbardziej istotnych (pięć z nich było istotnych na poziomie 0,001 dla wigoru ziarniaków i na poziomie 0,05 dla kiełkowania ziarniaków, kolejnych pięć markerów było istotnych na poziomie 0,001 dla kiełkowania ziarniaków i na poziomie 0,05 dla wigoru siewek, pięć markerów było istotnych na poziomie 0,001 tylko dla wigoru siewek, a pięć było istotnych na poziomie 0,001 tylko dla kiełkowania ziarniaków). Markery te wykorzystano do mapowania fizycznego w celu określenia ich lokalizacji na mapie genetycznej. Stwierdzono, że sześć z tych markerów (pięć SilicoDarT — 2 435 784, 4 772 587, 4 776 334, 2 507 310, 25 981 291 i jeden SNP — 2 386 217) zlokalizowanych jest wewnątrz genów, których działanie może wpływać zarówno na kiełkowanie ziarniaków, jak i wigor siewek. Marker SilicoDarT 2,435,784 jest zlokalizowany na chromosomie 1 wewnątrz genu syntazy sacharozy 4. Gen ten prawdopodobnie będzie miał wpływ na wigor, ponieważ Stein i Granot. (2019) wykazali, że rośliny o obniżonej aktywności syntazy sacharozy (SUS) mają zmniejszony wzrost, zmniejszoną syntezę skrobi, celulozy lub kalozy, zmniejszoną tolerancję na warunki stresu niedoboru tlenu oraz zmienioną funkcję merystemu wierzchołkowego pędu i morfologię liści. Rośliny wykazujące nadekspresję SUS wykazały zwiększony wzrost, zwiększoną powierzchnię ksylemu i szerokość ścian komórkowych ksylemu oraz zwiększoną zawartość celulozy i skrobi, co czyni SUS genami kandydującymi o wysokim potencjale jeżeli chodzi o poprawę istotnych cech rolniczych roślin uprawnych. Według Zhu i in. (2017) syntaza sacharozy jest powszechnie uważana za kluczowy enzym biorący udział w metabolizmie cukrów roślinnych, który ma kluczowe znaczenie dla wzrostu i rozwoju roślin, zwłaszcza ich jakości. Kolejny istotny marker molekularny SilicoDarT 4,776,334 znajduje się na chromosomie 2 wewnątrz genu fosfatazy fosfoinozytydowej *sac7* i może również wpływać zarówno na wigor, jak i kiełkowanie ziarniaków kukurydzy. Badania Mao i Tan. (2021) potwierdziły, że ostatnio pojawiła się rodzina fosfataz fosfoinozytydowych jako ważne regulatory wielu procesów wzrostu i rozwoju roślin. Trzeci istotny marker molekularny SilicoDarT 4,772,587 jest zlokalizowany na chromosomie 4 wewnątrz białka z konserwatywną domeną SET. Według Thorstensen i in. (2011) większość metylotransferaz lizyny histonowej (HKMTazy) to białka z konserwatywną domeną SET odpowiedzialną za aktywność enzymatyczną. Białka

domeny SET w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* można przypisać do klas ewolucyjnie konserwatywnych o różnej specyficy. Według Ng i in. (2007) białka domeny SET biorą udział w procesach rozwojowych. Doniesienia literaturowe wykazały, że białka SET u *Arabidopsis* i kukurydzy dzielą się na pięć klas w zależności od ich sekwencji i architektury domen. Czwarty istotny marker molekularny SilicoDArT 2,507,310 znajduje się na chromosomie 2 wewnątrz genu *grx_c8* – glutaredoksyny podgrupy iii. Glutaredoksyny (GRX) to małe, wszechobecne oksydoreduktazy zależne od glutationu (GSH), które katalizują odwracalną redukcję mostków dwusiarczkowych białek. Coraz więcej dowodów wskazuje, że roślinne GRX biorą udział w wielu szlakach komórkowych, w tym w kontroli czasu kwitnienia oraz rozwoju korzeni i pędów (Li i in., 2017). Piąty istotny marker molekularny SilicoDArT 25,981,291 jest zlokalizowany na chromosomie 1 wewnątrz genu *a-aglutyniny*. Ostatni istotny marker molekularny SNP 2,386,217 jest zlokalizowany na chromosomie 3 wewnątrz genu *3-beta-hydroksysteroidu-delta(8),delta(7)-izomerazy*. Według Coppoli i in. (2015) gen ten może pośrednio uczestniczyć w odpowiedzi immunologicznej pomidorów na owady. Z analizy doniesień literaturowych wynika, że pierwsze cztery opisane markery SilicoDArT 2,435,784, 4,776,334, 4,772,587 i 2,507,310 są powiązane z genami, które mogą znacząco wpływać zarówno na wigor siewek, jak i na kiełkowanie nasion. Autorzy wykorzystując te same techniki molekularne, identyfikowali markery molekularne sprzężone z innymi genami kandydującymi. Sobiech i in. (2022) zidentyfikowali dwa istotne markery SilicoDArT i SNP, które można wykorzystać do selekcji odmian odpornych na fuzarium. W wyniku analizy autorzy stwierdzili, że dwa z siedmiu wyselekcjonowanych markerów (15 097 – SilicoDArT i 58 771 – SNP) znajdują się wewnątrz genów. Markery te identyfikowali odpowiednio na chromosomach 2 i 3. Marker 097 jest zakotwiczony w genie kodującym N-hydroksycynamylotransferazę putrescyny, natomiast marker 58771 jest zakotwiczony w genie kodującym prekursor peroksydazy 72. Poszukiwanie markerów molekularnych związanych z poprawą wigoru i zdolności kiełkowania ziarniaków w niekorzystnych warunkach jest obecnie ważnym zagadnieniem w hodowli kukurydzy. Cechy te są bardzo istotne dla rozwoju produkcji roślinnej ale również dla lepszej odporności roślin na stresy biotyczne i abiotyczne. Zhang i in. (2012) zidentyfikowali 25 regionów QTL związanych z tolerancją kukurydzy na głęboki siew. Autorzy opisali 179 markerów molekularnych SSR. Długość mezokotyłu jest również ważną cechą wpływającą na wschody siewek kukurydzy. Zhao i in. (2022) wykorzystując sekwencjonowanie RNA wybrali 15 genów kandydujących

w regionie cQMES4, które można wykorzystać do badania kontroli genetycznej kiełkowania ziarniaków kukurydzy i wzrostu siewek w warunkach głębokiego siewu. Według Li (2014), oligosacharydy z rodziny rafinoz (RFO), które kumulują się w nasionach podczas dojrzewania wielu gatunków roślin, mogą być odpowiedzialne za wigor siewek kukurydzy.

W publikacji 2 w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS) otrzymano 81 602 markery molekularne (53 031 SilicoDArT i 28 571 SNP). W wyniku mapowania asocjacyjnego wybrano 15 409 markerów (1 559 SilicoDArT i 13 850 SNP) istotnie związanych z plonem i cechami struktury plonu. Najwięcej markerów molekularnych związanych było z długością kolby (1 203), średnicą kolby (1 759), długością rdzenia (1 201) i średnicą rdzenia (2 326). Spośród 15 409 markerów wybrano 16 markerów SilicoDArT, które były istotne dla tych samych czterech cech w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice). Markery te wykorzystano do mapowania fizycznego. W wyniku analiz stwierdzono, że 6 z 16 (1 818; 14 506; 2 317; 3 233; 11 657; 12 812) wybranych markerów zlokalizowanych jest wewnątrz genów. Markery te znajdują się odpowiednio na chromosomach 8, 9, 7, 3, 5 i 1. Dla pozostałych markerów podano ich lokalizację i odległość od najbliższych genów. Pierwszy istotny marker 1818 znajduje się wewnątrz genu reduktazy cynamoilo-CoA. Reduktaza cynamoilo-CoA (CCR) jest uważana za kluczowy enzym kontrolujący ilość i jakość ligniny. Pierwsze rośliny transgeniczne o obniżonej aktywności CCR uzyskano dla tytoniu. Zawartość ligniny została zmniejszona o 50% w porównaniu do ilości ligniny u typu dzikiego. Jednak spadek zawartości ligniny miał szkodliwy wpływ na rozwój roślin tytoniu. Biosyntezę CCR szczegółowo scharakteryzowano u roślin dwuliściennych, niestety niewiele jest doniesień na temat roślin jednoliściennych (Tamasloukht i in., 2011). Drugi istotny marker ma numer 14,506 i znajduje się wewnątrz genu WAT1. Na podstawie danych transkryptomicznych, metabolomicznych i fizjologicznych stwierdzono, że WAT1 bierze udział w tworzeniu wtórnej ściany komórkowej u *Arabidopsis* (Philippe i in., 2013). Wewnątrz genu znajduje się także inny istotny marker 2317 sprzężony z genem warunkującym inicjację translacji u eukariota (eIF3). W ciągu ostatnich 20 lat przeanalizowano kilka roślinnych podjednostek eIF3, głównie wykorzystując *Arabidopsis* jako organizm modelowy (Raabe i in., 2019). Czwarty istotny marker 3233 znajduje się wewnątrz genu koaktywatora transkrypcji polimerazy RNA II (KELP). U *Arabidopsis thaliana* KELP ma zdolność wiązania się z wirusem mozaiki pomidora (ToMV) i może zakłócać przemieszczanie się

wirusa do komórki, bierze zatem udział w reakcji odpornościowej (Matsushita i in., 2001). Piąty istotny marker 11,657 jest zakotwiczony wewnątrz genu aminotransferazy asparaginianowej. Prowadząc badania nad ryżem, pszenicą i jęczmieniem stwierdzono, że działanie aminotransferazy asparaginianowej zwiększa plon (Oddy i in., 2022). Ostatni z wytypowanych istotnych markerów 12,812 jest zakotwiczony wewnątrz genu transportera sacharozy 1. Na podstawie danych dotyczących analizy genomu zidentyfikowano dziewięć białek transportujących sacharozę u *Arabidopsis*, siedem u kukurydzy, pięć w topoli i pięć w ryżu. Geny kodujące transportery sacharozy są zwykle nazywane SUT lub SUC (Jin i in., 2022). Wymienione powyżej markery, zwłaszcza 11,657, związane z aminotransferazą asparaginianową, która może zwiększać plon, mogą zostać wykorzystane do selekcji dobrze plonujących genotypów kukurydzy. Nowoczesne narzędzia biotechnologiczne mogą przyspieszyć hodowlę nowych odmian, przyczyniając się w ten sposób do światowego bezpieczeństwa żywnościowego.

W publikacji 4 dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS) uzyskano łącznie 92 614 markerów molekularnych, w tym 60 436 markerów SilicoDArT i 32 178 SNP. Aby zawęzić pulę markerów do najistotniejszych przyjęto $MAF > 0,25$ i liczbę brakujących obserwacji $< 10\%$. W ten sposób otrzymano 32 900 markerów (26 234 DArT i 6666 SNP), które wykorzystano do mapowania asocjacyjnego. W publikacji 4 stwierdzono, że największa liczba markerów SNP i SilicoDArT była związana z plonem z poletka (18 352 – Kobierzyce i 18 751 – Smolice), masą ziarna z kolby (17 685 – Kobierzyce i 18 314 – Smolice) oraz średnicą rdzenia (17 787 – Kobierzyce i 16 018 – Smolice). Najmniej markerów związanych było z liczbą rzędów (12 757 – Kobierzyce i 11 714 – Smolice) i liczbą ziaren w rzędzie (13265 – Kobierzyce i 13981 – Smolice). Aby zawęzić liczbę markerów do mapowania fizycznego, spośród wszystkich istotnych, wybrano 19, które były związane z tymi samymi cechami w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice). Pięć z tych markerów (28629, 28625, 28640, 28649 i 29294) jest zlokalizowanych w genach, które można uznać za geny kandydujące związane z plonem i cechami struktury plonu. Istotny marker 28629 znajduje się na chromosomie 8 wewnątrz genu receptoropodobnej kinazy białkowej. Kinazy receptoropodobne (RLK) to zróżnicowana grupa białek transbłonowych charakteryzująca się domeną wiążącą ligand do odbierania sygnałów (Walker, 1994). Według doniesień literaturowych po raz pierwszy RLK wyizolowano z kukurydzy, a następnie zidentyfikowano liczne RLK u ponad 20 gatunków roślin (Walker i Zhang, 1990). RLK mogą pośrednio wpływać na

plon kukurydzy, ponieważ pośredniczą w wielu reakcjach sygnalizacyjnych na powierzchni komórki i działają jako kluczowe regulatory podczas procesów rozwojowych (Afzal i in., 2008; Gish i Clark, 2011; Johnson i Ingram, 2005). Badania genetyczne i biochemiczne prowadzone przez innych naukowców wykazały również, że roślinne LRR-RLK odgrywają ważną rolę w różnych procesach wzrostu i rozwoju (Dievart i Clark, 2004; Butenko i Aalen, 2012). Stwierdzono również, że CLV i RPK2 są kinazami receptoropodobnymi niezbędnymi do tworzenia i utrzymywania merystemu wierzchołkowego pędu (Matsushima i Miyashita, 2012; Dey i in., 2023). Drugim istotnym markerem był SNP 28625, zlokalizowany na chromosomie 1 wewnątrz genu arabinozylotransferazy (arad1). Jak podano w publikacji Belanger i in. (1996), gen kodujący arabinozylotransferazę arad1 katalizuje polimeryzację arabinozy do arabinanu arabinogalaktanu podczas tworzenia wtórnej ściany u sosny. Badania wskazują na związek pomiędzy arabinogalaktanem a biosyntezą białek i ligniny w procesie tworzenia ściany komórkowej. Powszechnie wiadomo, że lignina występuje w ścianie komórkowej i jest niezbędna do transportu wody i składników odżywczych w łądygach roślin. Polisacharydowe składniki ścian komórkowych roślin są hydrofilowe i dlatego przepuszczalne dla wody, natomiast lignina jest hydrofobowa. Usieciowanie polisacharydów przez ligninę zapobiega wchłanianiu wody przez ścianę komórkową. Dzięki temu lignina umożliwia tkance przewodzącej rośliny sprawne przewodzenie wody, co jest bardzo istotne dla prawidłowego funkcjonowania a także wzrostu i rozwoju rośliny oraz wpływa pośrednio na jej plon (Zhang i in., 2003). Istnieje zatem duże prawdopodobieństwo, że gen arabinozylotransferazy arad1 może wpływać na plon kukurydzy (Wojtaszek, 2000; Lucas i Lee, 2004; Fleming, 2005). Trzeci istotny marker SNP (28640) znajduje się na chromosomie 9 wewnątrz genu syntazy sacharozy i fosforanu (SPS). Gen ten jest kluczowym enzymem w szlakach metabolicznych cukru u roślin. SPS katalizuje konwersję fruktozo-6-fosforanu i urydynodifosforanu-glukozy (UDP-glukozy) do sacharozo-6-fosforanu, który jest substratem w syntezie sacharozy (Winter i in., 1997; Chen i in., 2005). SPS występuje w wielu izoformach, które mogą pełnić różne funkcje i są specyficzne dla różnych tkanek i etapów rozwoju. Szczególnie pożądana jest wiedza na temat związku lokalizacji poszczególnych form tych enzymów z ich rolą w odpowiedzi roślin na różne stresy (Lutfiyya i in., 2007). Czwarty istotny SNP (28649) znajduje się na chromosomie 4 wewnątrz genu izohydrolazy ubikwityny (UCH). W literaturze nie opisano funkcji tego genu u kukurydzy. Ostatni istotny SNP (29294) znajduje się na chromosomie 5 wewnątrz genu galt6 o-galaktozylotransferazy

hydroksyproliny. Z naszych badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej i danych literaturowych wynika, że gen ten może mieć związek z plonem kukurydzy, gdyż według Kaura i in. (2023) odgrywa on ważną rolę w różnych stadiach wzrostu i rozwoju roślin. Obecność wyżej wymienionych markerów testowano na genotypach referencyjnych wysoko i nisko plonujących. W wyniku badań wyselekcjonowano dwa markery (28629 i 29294) różnicujące badane genotypy. Dla markera 28629 zaobserwowano specyficzny produkt o długości 189 bp dla genotypów 1, 4 i 10. W przypadku markera 29294 zaobserwowano specyficzny produkt o długości 189 bp dla genotypów 1 i 10. Markery te mogą być wykorzystane do selekcji genotypów dobrze plonujących.

8. Wnioski

1. Zgodnie z głównym celem pracy, dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego zidentyfikowano nowe markery molekularne sprzężone z genami kandydującymi, warunkującymi plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków oraz wigor siewek kukurydzy.

2. W publikacji 1 wytypowano 20 istotnych markerów molekularnych, związanych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków i wigorem siewek. Spośród tych markerów 6 zlokalizowanych jest wewnątrz genów (pięć SilicoDArT – 2,435,784; 4,772,587; 4,776,334; 2,507,310; 25,981,291 i jeden SNP – 2,386,217). Markery te znajdują się odpowiednio na chromosomach 1, 2, 4, 2, 1, 3.

3. Spośród 6 markerów związanych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków i wigorem siewek znajdujących się wewnątrz genów, 4 z nich zgodnie z doniesieniami literaturowymi mogą mieć wpływ na kiełkowanie ziarniaków oraz wigor u kukurydzy. Należą do nich: marker SilicoDArT 2,435,278 zlokalizowany na chromosomie 1, wewnątrz genu syntazy sacharozy; marker SilicoDArT 4,776,334 zlokalizowany na chromosomie 2, wewnątrz genu fosfatazy fosfoinozytydynamowej (SAC 7); marker SilicoDArT 4,772,587 zlokalizowany na chromosomie 4, wewnątrz genu kodującego białko z konserwatywną domeną SET oraz marker SilicoDArT 2,507,310 zlokalizowany na chromosomie 2, wewnątrz genu grx_c8 glutaredoksyny podgrupy iii (GRX).

4. W publikacji 2 wytypowano 16 istotnych markerów molekularnych, związanych z cechami struktury plonu oraz z plonem kukurydzy. Spośród tych markerów 6 (SilicoDArT - 1818; 14,506; 2317; 3233; 11,657; 12,812) zlokalizowanych jest wewnątrz genów. Markery te znajdują się odpowiednio na chromosomach 8, 9, 7, 3, 5 i 1.

5. Jeden spośród 6 markerów opisanych w publikacji 2 związanych z cechami struktury plonu i plonem kukurydzy znajdujących się wewnątrz genów, zgodnie z doniesieniami literaturowymi może mieć wpływ na plonowanie kukurydzy. Markerem sprzężonym z tym genem kandydującym jest marker SilicoDArT o numerze 11,657 znajdujący się na chromosomie 5, wewnątrz genu aminotransferazy asparaginianowej.

6. W publikacji 4 wytypowano 20 istotnych markerów molekularnych, związanych z cechami struktury plonu oraz z plonem kukurydzy. Spośród tych markerów 5 (SNP -

28629, 28625, 28640, 28649 i 29294) zlokalizowanych jest wewnątrz genów. Markery te znajdują się odpowiednio na chromosomach 8, 7, 1, 9, 4, 5.

7. Cztery spośród 5 markerów opisanych w publikacji 4, związanych z cechami struktury plonu i plonem kukurydzy znajdujących się wewnątrz genów, zgodnie z doniesieniami literaturowymi mogą mieć wpływ na plonowanie kukurydzy. Należą do nich marker SNP 28629 znajdujący się na chromosomie 8, wewnątrz genu receptoropodobnej kinazy białkowej (RLK), marker SNP 28625 znajdujący się na chromosomie 1, wewnątrz genu arabinozylotransferazy (arad1), marker SNP 28640 znajdujący się na chromosomie 9, wewnątrz genu syntazy sacharozy i fosforanu (SPS) oraz marker SNP 29294 zlokalizowany na chromosomie 5, wewnątrz genu chydroxyproliny o-galaktozylotransferazy (galat6).

8. Markery molekularne wymienione we wniosku 3, 5 i 7 mogą zostać wykorzystane w programach hodowlanych do selekcji genotypów charakteryzujących się dobrymi wschodami i wysoko plonujących.

9. Wyselekcjonowane w publikacjach 1, 2, i 4 markery molekularne SilicoDArT i SNP mogą zostać wykorzystane do podziału materiałów hodowlanych na grupy heterotyczne i tym samym do selekcji komponentów rodzicielskich do krzyżowań heterozyjnych.

10. W publikacji 4 wyselekcjonowano dwa markery SNP (28629, 29294), które różnicują genotypy słabo i dobrze plonujące na żelach agarozowych. Marker 28629 znajduje się na chromosomie 8, oddalony jest o 3130 bp od genu związanego ze starzeniem się białka mitochondrialnego i o 91 bp od niescharakteryzowanego białka loc100382335, natomiast marker 29294 znajduje się na chromosomie 5 wewnątrz genu hydroksyproliny 0-galaktozylotransferazy (galt6). Markery te mogą zostać wykorzystane do selekcji genotypów dobrze plonujących.

9. Spis literatury

1. Abdurakhmonov I.Y., Abdukarimov A. 2008. Application of Association Mapping to Understanding the Genetic Diversity of Plant Germplasm Resources. *Int. J. Plant Genom.*, 2008, 1–18.
2. Addo-Quaye C., Buescher E., Best N., Chaikam V., Baxter I., Dilkes B.P. 2017. Forward Genetics by Sequencing EMS Variation-Induced Inbred Lines. *G3 Genes Genomes Genet.* 7, 413–425.
3. Adolfatto P., Davison D., Erezyilmaz D., Hu T.T., Mast J., Sunayama-Morita T., Stern D.L. 2011. Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res.*, 21, 610–617.
4. Afzal A.J., Wood A.J., Lightfoot D.A. 2008. Plant receptor-like serine threonine kinases: Roles in signaling and plant defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 507–517.
5. Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmensiek A., Kuchel H. 2006. Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor. Appl. Genet.*, 113, 1409–1420.
6. Anandhakumar C., Kizaki S., Bando T., Pandian G.N., Sugiyama H. 2015. Advancing Small-Molecule-Based Chemical Biology with Next-Generation Sequencing Technologies. *ChemBioChem* 16, 20–38.
7. Andorf C.M., Cannon E.K., Portwood J.L., Gardiner J.M., Harper L.C., Schaeffer M.L., Braun B.L., Campbell D.A., Vinnakota A.G., Sribalasu V.V. 2016. Maize GDB Update: New Tools, Data and Interface for the Maize Model Organism Database. *Nucleic Acids Res.* 44, D1195–D1201.
8. Araus J.L., Cairns J.E. 2014. Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends Plant Sci.*, 19, 52–61.
9. Austin D.F., Lee M., Veldboom L.R. 2001. Genetic mapping in maize with hybrid progeny across testers and generations: grain yield and grain moisture. *Crop Sci.* 40, 30–39.

10. Awika, J. 2011. Major cereal grains production and use around the world. *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion* Chapter 1pp 1-13.
11. Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., Selker E.U., Cresko W.A., Johnson E.A. 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE*, 3, e3376.
12. Bar-Hen A., Charcosset A., Bourgoin M., Guiard J. 1995. Relationship between genetic markers and morphological traits in a maize inbred lines collection. *Euphytica*, 84, 145–154.
13. Barata C., Carena M.J. 2006. Classification of North Dakota maize inbred lines into heterotic groups based on molecular and testcross data. *Euphytica* 151: 339–349.
14. Bartlett M. S. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Statistical Society, Series A* 160, 268–282.
15. Beavis W.D., Smith O.S., Grant D., Fincher R.R. 1994. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F4 progeny from maize. *Crop Sci.* 34, 882-896.
16. Belanger A.E., Besra G.S., Ford M.E., Mikusová K., Belisle J.T., Brennan P.J., Inamine J.M. 1996. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11919–11924.
17. Benke A., Urbany C., Stich B. 2015. Genome-wide association mapping of iron homeostasis in the maize association population. *BMC Genet.* 16: 1.
18. Bocianowski J., Tomkowiak A., Bocianowska M., Sobiech A. 2023. The use of DArTseq technology to identify markers related to the heterosis effects in selected traits in maize. *Curr. Issues Mol. Biol.* 45, 2644–2660.
19. Butenko M.A., Aalen R.B. 2012. Receptor ligands in development. In *Receptor-like Kinases in Plants: From Development to Defense*; Tax F., Kemmerling B., Eds. Springer: Berlin, Germany, pp. 195–226.

20. Chander S., Guo Y.Q., Yang X.H., Zhang Z., Lu X.Q., Yan J.B., Song T.M., Rocheford T.R., Li J.S. 2008. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theor. Appl. Genet.* 2008, 116, 223–233.
21. Chavan S., Smith S.M. 2014. A rapid and efficient method for assessing pathogenicity of *Ustilago maydis* on maize and teosinte lines. *J Vis Exp* 83, e50712.
22. Chen S., Hajirezaei M., Börnke F. 2005. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiol.*, 139, 1163–1174.
23. Cooper M., Technow F., Messina C., Gho C., Totir, L. R. 2016. Use of crop growth models with whole-genome prediction: Application to a maize multienvironment trial. *Crop Science*, 56, 2141–2156.
24. Coppola M., Corrado G., Coppola V., Cascone P., Martinelli R., Digilio M.C., Pennacchio F., Rao R. 2015. Prosystemin Overexpression in Tomato Enhances Resistance to Different Biotic Stresses by Activating Genes of Multiple Signaling Pathways. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 33, 1270–1285.
25. Courtois B., Audebert A., Dardou A., Roques S., Ghneim-Herrera T., Droc G., Frouin J., Rouan L., Gozé E., Kilian A. 2013. Genome-Wide Association Mapping of Root Traits in a Japonica Rice Panel. *PLoS ONE*, 8, e78037.
26. Cruz V.M.V., Kilian A., Dierig D.A. 2013. Development of DArT Marker Platforms and Genetic Diversity Assessment of the U.S. Collection of the New Oilseed Crop *Lesquerella* and Related Species. *PLoS ONE*, 8, e64062.
27. Dey D., Biswas P., Paul P., Mahmud S., Ema T.I., Khan A.A., Ahmed S.Z., Hasa M.M., Saikat A.S.M. Fatema B. 2023. Natural flavonoids effectively block the CD81 receptor of hepatocytes and inhibit HCV infection: A computational drug development approach. *Mol. Divers.*, 27, 1309–1322.
30. Dievart A., Clark S.E. 2004. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131, 251–261.
31. Ding J., Ali F., Chen G., Li H., Mahuku G., Yang N., Narro L., Magorokosho C., Makumbi D., Yan J. 2015. Genome-Wide Association Mapping Reveals Novel Sources of Resistance to Northern Corn Leaf Blight in Maize. *BMC Plant Biol.* 15, 206.

32. Dell'Acqua M., Gatti D.M., Pea G., Cattonaro F., Coppens F., Magris G., Hlaing A.L., Aung H.H., Nelissen H., Baute J. 2015. Genetic properties of the MAGIC maize population: A new platform for high definition QTL mapping in *Zea mays*. *Genome Biol.*, 16, 167.
33. Dhliwayo T., Pixley K., Menkir A., Warburton M. 2009. Combining Ability, Genetic Distances, and Heterosis among Elite CIMMYT and IITA Tropical Maize Inbred Lines. *Crop. Sci.*, 49, 1201–1210.
34. Edwards D., Batley J., Snowdon R.J. 2013. Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. *Theor. Appl. Genet.*, 126, 1–11.
35. Egan A.N., Schlueter J., Spooner D.M. 2012. Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *Am. J. Bot.* 99, 175–185.
36. Ellstrand N.C., Garner L.C., Hegde S., Guadagnuolo R., Blancas L. 2007. Spontaneous hybridization between maize and teosinte. *J Hered* 98:183–187.
37. Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*, 6, e19379.
38. Erenstein O., Chamberlin J., Sonder K. 2021. Estimating the global number and distribution of maize and wheat farms. *Global Food Security*, 30, 100558.
39. Erenstein O., Jaleta M., Sonder K., Mottaleb K., Prasanna B.M. 2022. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Security (2022)* 14:1295–1319.
40. Fleming A.J. 2005. *Intercellular Communication in Plants*; Blackwell Publishing: Oxford, UK; pp. 85–108.
41. Fukunaga K., Hill J., Vigouroux Y., Matsuoka Y., Sanchez G.J., Liu K., Buckler E.S., Doebley J. 2005. Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics* 169:2241–2254.
42. Gish L.A., Clark S.E. 2011. The RLK/Pelle family of kinases. *Plant J.* 66, 117–127.

43. Godfray H.C.J. 2014. How can 9-10 billion people be fed sustainably and equitably by 2050 In *Is the Planet Full* Goldin. I., Ed.; Oxford University Press: Oxford, UK; pp. 104–120.
44. Guo W., Lian T., Wang B., Guan J., Yuan D., Wang H., Azam F.M.S., Wan X., Wang W., Liang Q., Wang H., Tu J., Zhang C., Jiang L. 2019. Genetic mapping of folate QTLs using a segregating population in maize (*Zea mays*L.). *J Integr Plant Biol*61: 675-690.
45. Guo Z., Tucker D.M., Wang D., Basten C.J., Ersoz E., Briggs W.H., Lu J., Li M., Gay G. 2013. Accuracy of Across-Environment Genome-Wide Prediction in Maize Nested Association Mapping Populations. *G3 Genes Genomes Genet.*3: 263–272.
46. Gupta H.S., Hossain F., Muthusamy V. 2015. Development of biofortified maize through molecular breeding. *ISB News Report*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, pp 1–5.
47. Habier D., Fernando R. L., Garrick D. J. 2013. Genomic BLUP Decoded: A look into the black box of genomic prediction. *Genetics* 194(3): 5.
48. Heffner E.L., Jannink J., Sorrells M.E. 2011. Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. *Plant Genome* 4:65 – 75.
49. Huang X., Zhao Y., Wei X., Li C., Wang A., Zhao Q., Li W., Guo Y., Deng L., Zhu C. 2011. Genome-Wide Association Study of Flowering Time and Grain Yield Traits in a Worldwide Collection of Rice Germplasm. *Nat. Genet.* 44, 32–39.
50. Jarska W., Niedziela A., Orłowska R., Bednarek P.T. 2015. Strategie molekularne w nowoczesnej hodowli roślin. *Biuletyn IHAR* 275: 17–28.
51. Jiao Y., Peluso P., Shi J., Liang T., Stitzer M.C., Wang B., Campbell M.S., Stein J.C., Wei X., Chin C. 2017. Improved Maize Reference Genome with Single-Molecule Technologies. *Nature*, 546, 524–527.
52. Jin P., Wu D., Dai H., Sun R., Liu A. 2022. Characterization and functional divergence of genes encoding sucrose in oilseeds castor bean. *Oil Crop Sci.*, 7, 31–39.
53. Johnson K.L., Ingram G.C. 2005 Sending the right signals: Regulating receptor kinase activity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 648–656.

54. Jonas E., Koning D.J. 2013. Does genomic selection have a future in plant breeding? *Trends in Biotechnology* 31(9): 497–509.
55. Kaur S., Pennington T., Conley E.J., Green A., Kolmer J., Anderson J., Gupta R., Gill U. 2023. High-Resolution Melting-Based Marker Development for Wheat Leaf Rust Resistance Gene Lr34. *Phytopathology*, 113, 508–515.
56. Kennett, D. J., Prufer, K. M., Culleton, B. J., George, R. J., Robinson, M., Trask, W. R., Buckley, G. M., Moes, E., Kate, E. J., Harper, T. K., O'Donnell, L., Ray, E. E., Hill, E. C., Alsgaard, A., Merriman, C., Meredith, C., Edgar, H. J. H., Awe, J. J., Gutierrez, S. M. 2020. Early isotopic evidence for maize as a staple grain in the Americas. *Science Advances*, 6, eaba3245.
57. Li S. 2014. Redox Modulation Matters: Emerging Functions for Glutaredoxins in Plant Development and Stress Responses. *Plants*, 3, 559–582.
58. Li T., Zhang Y., Wang D., Liu Y., Dirk L.M.A., Goodman J., Downie B., Wang J., Wang G., Zhao T. 2017. Regulation of seed vigor by manipulation of raffinose family oligosaccharides in maize and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2017, 10, 1540–1555.
59. Liu H., Niu Y., Gonzalez-Portilla P.J., Zhou H., Wang L., Zuo T., Qin C., Tai S., Jansen C., Shen Y. 2015. An Ultra-HighDensity Map as a Community Resource for Discerning the Genetic Basis of Quantitative Traits in Maize. *BMC Genom.* 16, 1078.
60. Liu S., Yeh C.-T., Tang H.M., Nettleton D., Schnable P.S. 2012. Gene mapping via bulked segregant RNASeq (BSR-Seq). *PLoS ONE*, 7, e36406.
61. Lucas W.J., Lee J.Y. 2004. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 712–726.
62. Lutfiyya L.L., Xu N., D'Ordine R.L., Morrell J.A., Miller P.W., Duff S.M.G. 2007. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *J. Plant Physiol.*, 164, 923–933.
63. Mao Y., Tan S. 2021. Functions and Mechanisms of SAC Phosphoinositide Phosphatases in Plants. *Front Plant Sci.*, 12, 803635.
64. Mano Y., Omori F. 2013. Flooding tolerance in interspecific introgression lines containing chromosome segments from teosinte (*Zea nicaraguensis*) in maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Ann Bot* 112:1125–1139.

65. Matsushita Y., Deguchi M., Youda M., Nishiguchi M., Nyunoya H. 2001. Molecules and The Tomato Mosaic Tobamovirus Movement Protein Interacts with a Putative Transcriptional Coactivator KELP. *Mol. Cells*, 12, 57–66.
66. Melchinger A.E., Utz H., Schön C.C. 1998. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149 (1), 383-403.
67. Meuwissen T.H.E., Hayes B.J., Goddard M.E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.
68. Mardis E.R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.*, 24, 133–141.
69. Matsushima N., Miyashita H. 2012. Leucine-Rich Repeat (LRR) Domains Containing Intervening Motifs in Plants. *Biomolecules*, 2, 288–311.
70. Michael C.R. 2009. Alavanja Introduction: Pesticides Use and Exposure, Extensive Worldwide. *Rev. Environ. Health* 2009 24, 303–310.
71. Michael T.P., VanBuren R. 2015. Progress, challenges and the future of crop genomes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 24, 71–81.
72. Messing J., Bharti A.K., Karlowski W.M., Gundlach H., Kim H.R., Yu Y., Wei F., Fuks G., Soderlund C.A., Mayer K.F.X. 2004. Sequence composition and genome organization of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 14349–14354.
73. Nannas N.J., Dawe R.K. 2015. Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. *Genetics* 199, 655–669.
74. Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 5269–5273.
75. Ng D.W., Wang T., Chandrasekharan M.B., Aramayo R., Kertbundit S., Hall T.C. 2007. Plant SET domain-containing proteins: Structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1769, 316–329.
76. Oddy J., Raffan S., Wilkinson M.D., Elmore J.S., Halford N.G. 2022. Understanding the Relationships between Free Asparagine in Grain and Other Traits to Breed Low-Asparagine Wheat. *Plants*, 11, 669.

77. Pearson K. 2007. Sesquicentenary conference. A joint meeting of the Royal Statistical Society, the British Society for the History of Mathematics, and the British Society for the History of Science [on-line - dostęp 2013-06-04].
78. Perez-de-Castro A.M., Vilanova S., Canizares J., Pascual L., Blanca J.M., Diez M.J., Prohens J., Pico B. 2012. Application of Genomic Tools in Plant Breeding. *Curr. Genom.* 13, 179–195.
79. Philippe R., Oana D., Reka N., Felten J., Corratge-Faillie C., Novak O., Morree K., Lacombe B., Martinez Y., Pfrunder S. 2013. Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nat. Commun.*, 4, 2625.
80. Prasanna B.M., Pixley K., Warburton M., Xiao Xie Ch. 2010. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Molecular Breeding Volume 26*, pages 339–356.
81. Pritchard J.K. 2001. Deconstructing Maize Population Structure. *Nat. Genet.* 28, 203–204.
82. Raabe K., Honys D., Michailidis C. 2019. Plant Physiology and Biochemistry The role of eukaryotic initiation factor 3 in plant translation regulation. *Plant Physiol. Biochem.*, 145, 75–
83. Rafalski J.A., 2010. Association genetics in crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010, 13, 174–180.
84. Rakoczy-Trojanowska M., Krajewski P., Bocianowski J., Schollenberger M., Wakuliński W., Milczarski P., Masojć P., Targońska-Karasek M., Banaszak Z., Banaszak K., 2017. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Brown Rust Resistance, α -Amylase Activity and Pre-harvest Sprouting in Rye (*Secale cereale* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 35, 366–378.
85. Ribaut J., Hoisington D.A., Deutsch J.A., Jiang C., Gonzalez-de-Leon D. 1996. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.* 92(7) 905-914.
86. Roche 454 Sequencing. 2010. Multiplex Identifier (MID) Adaptors for Rapid Library Preparations 454. *Life Sci.* 2010, 1–7.

87. Rodrigues L.A., Alves C.Z., Queiroz Rego C.H., Benetoli Da Silva T.R., Bispo Da Silva J. 2017. Humic acid on germination and vigor of corn seeds. *Agronomia Rev. Caatinga*, 30, 149–154.
88. Sakhare A.S., Kota S., Rathod S., Parmar B., Chinnusamy V. 2022. Genome-Wide Association Study. in genotyping by sequencing for crop improvement. First published: 01 April 2022 <https://doi.org/10.1002/9781119745686.ch5>.
89. Sansaloni C., Petrolí C., Jaccoud D., Carling J., Detering F., Grattapaglia D., Kilian A. 2011. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: Genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. *BMC Proc.*, 5, P54.
90. Shapiro S.S., Wilk M.B. 1965. An Analysis of Variance Test for Normality, *Biometrika*, Vol. 52, No. 3/4, s. 591–611.
91. Shendure J., Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 26, 1135–1145.
92. Sobiech A., Tomkowiak A., Bocianowski J., Szymańska G., Nowak B., Lenort M. 2023. Identification and analysis of candidate genes associated with maize fusarium cob resistance using next-generation sequencing technology. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 16712.
93. Sobiech A., Tomkowiak A., Nowak B., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J. 2022. Associative and Physical Mapping of Markers Related to Fusarium in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation Sequencing (NGS). *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 6105.
94. Soto J., Rodriguez-Antolin C., Vallespín E., de Castro Carpeño J., Ibanez de Caceres I. 2016. The Impact of Next-Generation Sequencing on the DNA Methylation-Based Translational Cancer Research. *Transl. Res.* 169, 1–18.e1.
95. Stein O., Granot D. 2019. An Overview of Sucrose Synthases in Plants. *Front. Plant Sci.*, 10, 95.
96. Tamasloukht B., Wong Quai Lam M.S.-J., Martinez Y., Tozo K., Barbier O., Jourda C., Jauneau A., Borderies G., Balzergue S., Renou J.P. 2011. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: Effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *J. Exp. Bot.*, 62, 3837–3848.

97. Tang J.D., Perkins A., Williams W.P., Warburton M.L. 2015. Using genome-wide associations to identify metabolic pathways involved in maize aflatoxin accumulation resistance. *BMC Genom.*, 16, 673.
98. Tang J., Yan Y., Ma X., Teng W., Wu W., Dai J., Dhillon B.S., Melchinger A.E., Li J. 2009. Dissection of the genetic basis of heterosis in an elite maize hybrid by QTL mapping in an immortalized F2 population. *Theoretical Applied Genetic* 120: 333–340.
99. Tinker N.A., Kilian A., Wight C.P., Heller-Uszynska K., Wenzl P., Rines H.W., Bjørnstad Å., Howarth C.J., Jannink J.L., Anderson J.M. 2009. New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. *BMC Genom.* 10, 39.
100. Thompson J.F., Milos P.M. 2011. The Properties and Applications of Single-Molecule DNA Sequencing. *Genome Biol.* 12, 217.
101. Thorstensen T., Grini P.E., Aalen R.B. 2011. SET domain proteins in plant development. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, 1809, 407–420.
102. Veldboom L., Lee M. 1994. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. Determination of QTLs for grain yield components. *Theor. Appl. Genet.* 89,451-458.
103. Walker J.C. 1994. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1599–1609.
104. Walker J.C., Zhang R. 1990. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of Brassica. *Nature*, 345, 743–746.
105. Wan W., Kim S., Castel B., Charoennit N., Chae E. 2021. Genetics of Autoimmunity in Plants: An Evolutionary Genetics Perspective. *New Phytol.* 229, 1215–1233.
106. Wenzl P., Carling J., Kudrn D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. 2004. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101(26), 9915–9920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401076101>
107. Winter H., Huber J.L., Huber S.C. 1997. Membrane association of sucrose synthase: Changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Lett.*, 420, 151–155.

108. Wojtaszek P. 2000. Genes and plant cell walls: A difficult relationship. *Biol. Rev.*, 75, 437–475.
109. Xu Y., Li P., Yang Z., Xu C. 2017. Genetic mapping of quantitative trait loci in crops. *Crop J*, 5, 175–184.
110. Yang S., Pang W., Ash G., Harper J., Carling J., Wenzl P., Huttner E., Zong X., Kilian A. 2006. Low level of genetic diversity in cultivated Pigeonpea compared to its wild relatives is revealed by diversity arrays technology. *Theor. Appl. Genet.* 113, 585–595.
111. Zenke-Philippi C., Frisch M., Thiemann A., Seifert F., Schrag T., Melchinger A. E., Herzog E. 2017. Transcriptome-based prediction of hybrid performance with unbalanced data from a maize breeding programme. *Plant Breed*, 136, 331–337.
112. Zing J., Ali F., Chen G., Li H., Mahuku G., Yang N., Narro L., Magorokosho C., Makumbi D., Yan J. 2015. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. *BMC Plant Biol.*, 15, 206.
113. Zhao X., Niu Y. 2022. The Combination of Conventional QTL Analysis, Bulk-Segregant Analysis, and RNA-Sequencing Provide New Genetic Insights into Maize Mesocotyl Elongation under Multiple Deep-Seeding Environments. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 4223.
114. Zhang H., Lu Y., Ma Y., Fu J., Wang J. 2021. Genetic and molecular control of grain yield in maize. *Mol Breeding* 41:18.
115. Zhang H.W., Ma P., Zhao Z.N., Zhao G.W., Tian B.H., Wang J.H., Wang G.Y. 2012. Mapping QTL controlling maize deep-sowing tolerance-related traits and confirmation of a major QTL for mesocotyl length. *Theor. Appl. Genet.*, 124, 223–232.
116. Zhang Y., Brown G., Whetten R., Loopstra C.A., Neale D., Kieliszewski M.J., Sederoff R.R. 2003. An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Mol. Biol.*, 52, 91–102.
117. Zhu C., Gore M., Buckler E.S., Yu J. 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *Plant Genome J.*, 1, 5.
118. Zhu M., Tong L., Xu M., Zhong T. 2021. Genetic dissection of maize disease resistance and its applications in molecular breeding. *Mol Breeding* 41:32.

119. Zhu X., Wang M., Li X., Jiu S., Wang C., Fang J. 2017. Genome-Wide Analysis of the Sucrose Synthase Gene Family in Grape (*Vitis vinifera*): Structure, Evolution, and Expression Profiles. *Genes* 2017, 8, 111.

10. Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych

BARTOSZ NOWAK

imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.:

Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej Zea Mays

napisałem samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data 18.03.2024

Podpis autora rozprawy

.....

AGNIESZKA TOMKOWIAK

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji:

Nr telefonu

agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P.Ł., Spychała J., Jamruszka T., 2024, Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Yield Structure Traits and Maize Yield Using Next-Generation Sequencing Technology, Genes 2024, 15, 56, <https://doi.org/10.3390/genes15010056>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współtworzeniu koncepcji badawczej oraz nadzorze merytorycznym.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

ALEKSANDRA SOBIECH

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

aleksandra.sobiech@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P.Ł., Spychała J., Jamruszka T., 2024, Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Yield Structure Traits and Maize Yield Using Next-Generation Sequencing Technology, Genes 2024, 15, 56, <https://doi.org/10.3390/genes15010056>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale w izolacji DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

JAN BOCIANOWSKI

Pesel

Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w
Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

jan.bocianowski@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P.Ł., Spychała J., Jamruszka T., 2024, Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Yield Structure Traits and Maize Yield Using Next-Generation Sequencing Technology, Genes 2024, 15, 56, <https://doi.org/10.3390/genes15010056>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej związanej z mapowaniem asocjacyjnym.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

PRZEMYSŁAW ŁUKASZ KOWALCZEWSKI

Pesel

Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

przemyslaw.kowalczewski@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P.Ł., Spychała J., Jamruszka T., 2024, Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Yield Structure Traits and Maize Yield Using Next-Generation Sequencing Technology, Genes 2024, 15, 56, <https://doi.org/10.3390/genes15010056>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współdziałaniu w izolacji DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

JULIA SPYCHAŁA

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

julia.spychala@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P.Ł., Spychała J., Jamruszka T., 2024, Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Yield Structure Traits and Maize Yield Using Next-Generation Sequencing Technology, Genes 2024, 15, 56, <https://doi.org/10.3390/genes15010056>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu publikacji zgodnie z wymogami redakcyjnymi.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

TOMASZ JAMRUSZKA

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

tomasz.jamruszka@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P.Ł., Spychała J., Jamruszka T., 2024, Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Yield Structure Traits and Maize Yield Using Next-Generation Sequencing Technology, Genes 2024, 15, 56, <https://doi.org/10.3390/genes15010056>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał współudziale w przygotowaniu rozcięć DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

AGNIESZKA TOMKOWIAK

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P.Ł., Bocianowska M., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(23), 14865, <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współtworzeniu koncepcji badawczej, nadzorze merytorycznym.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

ALEKSANDRA SOBIECH

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

aleksandra.sobiech@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P.Ł., Bocianowska M., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(23), 14865, <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale w izolacji DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

JAN BOCIANOWSKI

Pesel

Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w
Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

jan.bocianowski@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P.Ł., Bocianowska M., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(23), 14865, <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej związanej z mapowaniem asocjacyjnym.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

ROKSANA BOBROWSKA

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

roksana.bobrowska@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P.Ł., Bocianowska M., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(23), 14865, <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale w przygotowaniu rozcięć DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

PRZEMYSŁAW ŁUKASZ KOWALCZEWSKI

Pesel

Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

przemyslaw.kowalczewski@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P.Ł., Bocianowska M., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(23), 14865, <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale w izolacji DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

MARIANNA BOCIANOWSKA

Pesel

Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Piotrowo 3A, 60-965
Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

E-mail

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P.Ł., Bocianowska M., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(23), 14865, <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współdziałaniu w analizach statystycznych dotyczących doświadczenia polowego.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

AGNIESZKA TOMKOWIAK

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify New SNP and SilicoDArT Markers Related to the Yield-Related Traits Components in Maize, Genes 2022, 13, 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współtworzeniu koncepcji badawczej, nadzorze merytorycznym.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

ALEKSANDRA SOBIECH

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

aleksandra.sobiech@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify New SNP and SilicoDArT Markers Related to the Yield-Related Traits Components in Maize, Genes 2022, 13, 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale w izolacji DNA.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

JAN BOCIANOWSKI

Pesel

Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w
Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

jan.bocianowski@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify New SNP and SilicoDArT Markers Related to the Yield-Related Traits Components in Maize, Genes 2022, 13, 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej związanej z mapowaniem asocjacyjnym.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

ŁUKASZ WOLKO

Pesel

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd
11,60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

lukwolko@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify New SNP and SilicoDArT Markers Related to the Yield-Related Traits Components in Maize, Genes 2022, 13, 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym dotyczącym zagadnień związanych z mapowaniem fizycznym

Data

Podpis

.....

wpisać właściwie: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

JULIA SPYCHAŁA

Pesel

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Dojazd 11,
60-632 Poznań

Adres do korespondencji

Nr telefonu

julia.spychala@up.poznan.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała J., 2022, The Use of DArTseq Technology to Identify New SNP and SilicoDArT Markers Related to the Yield-Related Traits Components in Maize, Genes 2022, 13, 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>] mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu publikacji zgodnie z wymogami redakcyjnymi.

Data

Podpis

.....

wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

11. Artykuły naukowe wchodzące w skład zbioru

11.1 The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize