



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii

Aleksandra Maria Sobiech

**Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów
związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium**
Multivariate exploration of molecular mechanisms related to maize (*Zea mays*)
fusarium resistance

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo
Doctoral dissertation in the field of agriculture
in the discipline of agriculture and horticulture

Promotorzy:

prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

prof. dr hab. Jan Bocianowski
Katedra Metod Matematycznych
i Statystycznych

Poznań, 2025 rok

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej:

P1: 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).** *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6105. <https://doi.org/10.3390/ijms23116105>

Impact factor: 4,9

Punktacja wg MNiSW: 140

P2: Sobiech, A., Tomkowiak, A., Bocianowski, J., Nowak, B., Weigt, D., Kurasiak-Popowska, D., Kwiatek, M., 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*, 12(9), 1412. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091412>

Impact factor: 3,6

Punktacja wg MNiSW: 100

P3: Sobiech, A. (2023). **Molekularne mechanizmy odporności na fuzariozę kolb kukurydzy.** *Fragmenta Agronomica* 40(1), 14–24. DOI: 10.26374/fa.2023.40.2

Punktacja wg MNiSW: 40

P4: 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.** *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16712. <https://doi.org/10.3390/ijms242316712>

Impact factor: 4,9

Punktacja wg MNiSW: 140

Sumaryczny Impact Factor: 13,4

Suma punktów MNiSW: 420

Chciałabym serdecznie podziękować Promotorom:

*prof. UPP dr hab. Agnieszce Tomkowiak
za przekazaną wiedzę, cierpliwość, wyrozumiałość, dobre słowa oraz pomoc w rozwoju
naukowym*

*prof. dr. hab. Janowi Bocianowskiemu za wsparcie w pisaniu publikacji, poświęcony czas
i życzliwość*

*Pracownikom Katedry Genetyki i Hodowli Roślin, w szczególności:
prof. UPP dr hab. Danucie Kurasiak-Popowskiej, za życzliwość i wspieranie moich pomysłów
oraz dr Sylwii Mikołajczyk za pomoc i pogłębianie mojej wiedzy w zakresie rolnictwa*

Mamie za pozwolenie mi podążania własną drogą

Przyjaciółom:

*dr inż. Julii Spychale i dr inż. Aleksandrze Noweiskiej za nieustanną pomoc naukową,
wsparcie w każdym momencie i pełne zrozumienie,
Katarzynie Szewczyk za umiejętność wysłuchania,
pozostałym za szanowanie moich wyborów życiowych...*

prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak

prof. dr hab. Jan Bocianowski

Oświadczenie promotorów rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium” została przygotowana pod naszym kierunkiem i stwierdzamy, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora rozprawy

.....

Podpis promotora rozprawy

.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.: „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium”

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

.....

podpis autora rozprawy

Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW	8
2. STRESZCZENIE	12
3. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	13
4. WPROWADZENIE	14
4.1 PRODUKCJA KUKURYDZY ZWYCZAJNEJ - ZAGROŻENIA I WYZWANIA	14
4.2 <i>FUSARIUM</i> SPP. JAKO SPRAWCA CHOROBY FUZARYJNEJ	16
4.3 RÓŻNE TYPY ODPORNOŚCI U ROŚLIN	17
4.3.1 <i>Wpływ fenotypu na genetycznie warunkowaną odporność</i>	19
4.4 METODY MOLEKULARNE WYKORZYSTYWANE W HODOWLI KUKURYDZY	20
4.4.1 <i>Rozwój Metod Sekwencjonowania DNA</i>	20
4.4.2 <i>Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS)</i>	21
4.4.2.1 Diversity Arrays Technology (DArT)	21
4.4.2.2 Markery DArT i ich charakterystyka	22
4.4.3 <i>Analizy GWAS i mapowanie QTL</i>	22
4.4.4 <i>Postęp w hodowli odpornościowej dzięki wykorzystaniu MAS</i>	23
5. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY DOKTORSKIEJ	25
6. MATERIAŁY I METODY	26
6.1 MATERIAŁ BADAWCZY	26
6.2 METODY BADAWCZE	28
6.2.1 <i>Doświadczenie polowe</i>	28
6.2.2 <i>Fenotypowanie</i>	30
6.2.3 <i>Ocena przynależności gatunkowej grzyba</i>	32
6.2.4 <i>Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z potencjalnymi genami odporności na <i>Fusarium spp.</i></i>	33
6.2.4.1 Izolacja genomowego DNA z liści kukurydzy	33
6.2.4.2 Genotypowanie oraz identyfikacja markerów SilicoDArT i SNP	33
6.2.4.3 Mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem analizy GWAS	35
6.2.4.4 Mapowanie fizyczne	35
6.2.5 <i>Wykorzystanie zidentyfikowanych polimorfizmów silicoDArT i SNP do różnicowania genotypów referencyjnych podatnych i odpornych na fuzarium</i>	36
6.2.5.1 Projektowanie starterów w celu zidentyfikowania istotnych polimorfizmów silicoDArT i SNP związanych z odpornością na fuzarium	36
6.2.5.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy	36
6.2.5.3 Elektroforeza	36
6.2.6 <i>Analiza ekspresji wybranych genów kandydujących sprzężonych z istotnymi markerami silicoDArT i SNP oraz genów referencyjnych</i>	37
6.2.6.1 Inokulacja wybranych genotypów odpornych i genotypu podatnego	37
6.2.6.2 Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji	38
6.2.6.3 Charakterystyka wybranych genów kandydujących i genów referencyjnych	38
6.2.6.4 Reakcja RT-qPCR	41
6.2.6.5 Opracowanie krzywych standardowych	41
6.2.6.6 Analizy transkryptomyczne wytypowanych genów kandydujących	42
6.2.7 <i>Analiza statystyczna</i>	42
7. WYNIKI	44
7.1 OBSERWACJE POŁOWE STOPNIA PORĄŻENIA KUKURYDZY PRZEZ FUZARIUM	44
7.1.2 <i>Ocena stopnia porażenia materiałów referencyjnych</i>	49
7.2 OCENA PRZYNALEŻNOŚCI GATUNKOWEJ PATOGENICZNEGO GRZYBA	50
7.3 IZOLACJA GENOMOWEGO DNA Z LIŚCI KUKURYDZY	51
7.4 IDENTYFIKACJA MARKERÓW SPRZĘŻONYCH Z POTENCJALNYMI GENAMI ODPORNOŚCI NA <i>FUSARIUM</i> SPP	51
7.4.1 <i>Genotypowanie oraz mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem GWAS</i>	51
7.4.2 <i>Oszacowanie podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi genotypami, na podstawie zidentyfikowanych markerów SNP i silicoDArT</i>	53

7.4.3 Mapowanie fizyczne, analiza funkcjonalna genów	56
7.4.4 Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych polimorfizmów <i>silicoDArT</i> i <i>SNP</i> związanych z odpornością roślin kukurydzy na <i>Fusarium spp.</i>	60
7.4.5 Testowanie markerów molekularnych z wykorzystaniem <i>PCR</i> na materiałach referencyjnych	61
7.4.5.1 Markery zaczerpnięte z doniesień literaturowych	61
7.4.5.2 Wybrane markery <i>silicoDArT</i> i <i>SNP</i>	68
7.5 EKSPRESJA GENÓW KANDYDUJĄCYCH ZWIĄZANYCH Z ODPORNOŚCIĄ NA <i>FUSARIUM SPP.</i> (WYNIKI NIEPUBLIKOWANE)	70
7.6 ANALIZA DANYCH TRANSKRYPTOMICZNYCH	77
8. DYSKUSJA	79
9. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	86
10. BIBLIOGRAFIA	89
11. SPIS TABEL I RYCIN	105
12. OPUBLIKOWANE PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD ZBIORU	107
P1: ASSOCIATIVE AND PHYSICAL MAPPING OF MARKERS RELATED TO <i>FUSARIUM</i> IN MAIZE RESISTANCE, OBTAINED BY NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS).	107
P2: APPLICATION MARKER-ASSISTED SELECTION (MAS) AND MULTIPLEX PCR REACTIONS IN RESISTANCE BREEDING OF MAIZE (<i>ZEAMAYS L.</i>).	123
P3: MOLEKULARNE MECHANIZMY ODPORNOŚCI NA FUZARIOZĘ KOLB KUKURYDZY.	139
P4: IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CANDIDATE GENES ASSOCIATED WITH MAIZE <i>FUSARIUM</i> COB RESISTANCE USING NEXT-GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY.	151
13. OŚWIADCZENIA AUTORÓW	167

1. Wykaz skrótów

%E – (ang. *efficiency*) – wydajność

ACT – (ang. *actin2*) – aktyna 2

ADF – (ang. *actin depolymerizing factor*) – czynnik depolimeryzujący aktywne

AMP – (ang. *antimicrobial peptides*) – peptydy przeciwdrobnoustrojowe

ANOVA – (ang. *analysis of variance*) – analiza wariancji

APE – (ang. *apurinic/apyrimidini endonuclease*) – endonukleaza apurynowa/apirymidynowa

BBCH – (niem. *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*) – skala pozwalająca na identyfikację fitofenologicznych faz roślin uprawnych

BLAST – (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) – narzędzie bioinformatyczne (algorytm) służące do lokalnego przyrównywania sekwencji aminokwasów białek lub nukleotydów DNA.

Bt – (łac. *Bacillus thuringiensis*) – gram-dodatnia bakteria żyjąca w glebie

CA – (ang. *California*) – Kalifornia

cDNA – (ang. *complementary DNA*) – komplementarne DNA

CDPK – (ang. *calcium ependent protein kinases*) – kinaza białkowa zależna od wapnia

cm – centymetr

COBORU – Centralny Ośrodek Badań Odmian Roślin Uprawnych

cT – (ang. *Threshold cycle*) – cykl progowy reakcji qPCR

CYT – (ang. *cyclophilin*) – cyklofilina

d.f. – (ang. *degrees of freedom*) – liczba stopni swobody

DAMP – (ang. *Damages Associated Molecular Patterns*) – wzorce molekularne związane uszkodzeniami

DarT – Diversity Arrays Technology

ddNTP – dideoksynukleotydy

DNA – (ang. *Deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – deoksynukleotydy

DON – deoksyniwalenol

E – (ang. *east*) – wschód

E. coli – (łac. *Escherichia coli*) – bakteria pałeczka okrężnicy

EC – (ang. *Commission Regulation*) – rozporządzenie komisji

ETI – (ang. *Effector Triggered Immunity*) – odporność indukowana efekтором

ETS – (ang. *Effector Triggered Susceptibility*) – wrażliwość wyzwalana przez efektor

F. – (łac. *Fusarium*) – grzyby patogeniczne

F1 – (łac. *filia* = córka, *filius* = syn) – pierwsze pokolenie potomne

F1 – gen esterazy/lipazy *GDSL At4g01130* niescharakteryzowane białko prekursorowe

F2 – hydroksycynamlotransferaza putrescyny, *LOC103649226*

F3 – nieskchrakteryzowane białko

F4 – gen prekursora peroksydazy 72 i białko zawierające powtórzenia pentatriopeptydowe *At5g57250*, mitochondrialne

FAO – (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

FASTA – (ang. *format of the nucleotide sequence*) – format zapisu sekwencji kwasów nukleinowych oraz białek używany w bioinformatyce

FER – (ang. *fusarium ear rot*) – *Fusarium* kolb kukurydzy

FPKM – (ang. *Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments*) – Fragmenty na kilobazę na milion zmapowanych fragmentów

FR – odmiana Farm Modena

FUM – fumiozyny

GBS – (ang. *genotyping by sequencing*) – genotypowanie przez sekwencjonowanie

GDSL – Glicyna, Dasparagina, Seryna, Leucyna

GWAS – (ang. *Genome-Wide Association Study*) – badanie asocjacyjne, obejmujące cały genom

h – (ang. *hour*) – godzina

hpi – (ang. *hours post inoculation*) – godziny po inokulacji

HR – hodowla roślin

ID – Iowa Dent

IHAR – Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

InDel – (ang. *insertion/deletion*) – mutacja/ delecja

ISR – (ang. *inducate systemic resistant*) – systemiczna odporność indukowana

ISR – (ang. *induced systemic resistance*) – systemiczna odporność indukowan

ISSR – (ang. *inter simple sequence repeat*) – polimorfizm sekwencji między mikrosatelitarnych

ITS – (ang. *Internal transcribed spacer*) – regiony charakteryzujące się dużą zmiennością międzygatunkową i niewielką wewnątrzgatunkową

L. – skrót umieszczany przy naukowej nazwie taksonu, którego autorem jest Karol Linneusz

MAF – (ang. *minor allele frequency*) – częstotliwość alleli minor

MAMP – (ang. *Molecular Patterns Associated with Microorganisms*) – wzorce molekularne związane z mikroorganizmami

MAPK – (ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*) – kinazy białkowe aktywowane mitogenem

MAS – (ang. *Marker Assisted Selection*) – selekcja wspomagana markerami molekularnymi
mix – mieszanina

MTZ – masa tysiąca ziaren

N – (ang. *north*) – kierunek geograficzny północ

NCBI – (ang. *National Center for Biotechnology Information*) – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej

ng – nano gram

NGS – (ang. *next-generation sequencing*) – sekwencjonowanie nowej generacji

Nsp I – endonukleaza restrykcyjna z *Neisseria denitrificans*, która tnije DNA w sekwencjach 5'-CATATG-3'.

NTC – (ang. *No Template Control*) – kontrola bez matrycy cDNA

PAMP – (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) – wzorce molekularne związane z patogenami

PAMP – (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) – wzorce molekularne związane z patogenami

PCA – (ang. *principal component analysis*) – analiza głównych składowych

PCR – (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PDA – (ang. *Potato Dextrose Agar*) – pożywka agarowo glukozowo - ziemniaczana

PRR – (ang. *Pattern Recognition Receptors*) – receptory rozpoznające wzorce molekularne

PstI – enzym restrykcyjny, który rozpoznaje sekwencję C_TGCAG

PTI – (ang. *Pattern Triggered Immunity*) - odporność indukowana przez wzorce molekularne

pz – par zasad

qRT-PCR – (ang. *quantitative Real-Time PCR*) – jakościowy PCR w czasie rzeczywistym

QTL – (ang. *quantitative trait loci*) – loci cech ilościowych

R – (ang. *resistant*) – gen/ białko odporności

R² – współczynnik determinacji

RNA – (ang. *ribonucleic acid*) – kwasy rybonukleinowe

ROS – (ang. *Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu

Sacc. – w nazwie naukowej "*Fusarium verticillioides* (*Sacc.*) Nirenberg" odnosi się do włoskiego botanika i mykologa Pier Andrea Saccardo

SAR – (ang. *Systemic Acquired Resistance*) – nabyta odporność systemiczna

SNA – (ang. *Sabouraud Dextrose Agar*) – pożywka z agarą dekstrozową

SNP – (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

sp. z.o.o. – Spółka z ograniczoną odpowiedzialnością

spp. – (łac. *subspecies*) – podgatunek

SSR – (ang. *simple sequence repeat*) – mikrosatelitarny polimorfizm krótkich tandemowych powtórzeń

starter F – starter (ang. *forward*) – starter prawy/do przodu

starter R – starter (ang. *revers*) – starter lewy/do tyłu

STS – (ang. *Sequence Tagged Site*) – miejsca znaczone sekwencyjnie

t/ha – tona na hektar

TaqI – enzym restrykcyjny wyizolowany z bakterii *Thermus aquaticus*. Ma sekwencję rozpoznawania 5'TCGA 3'AGCT i robi cięcie 5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'

TEF – (ang. *translation elongation factor*) – czynnik wydłużania translacji

T_m – (ang. *melting temperature*) – temperatura topnienia

U.S.A. – (ang. *United States of America*) – Zjednoczone Stany Ameryki

UE – Unia Europejska

UPGMA – (ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) – nieważona metoda grup par ze średnią arytmetyczną

URGI – (fr. *Unité de Recherche Génomique Info*) – jednostka badawcza genomiki informacyjnej

UTR – (ang. *untranslated region*) – rejon mRNA niepodlegający translacji

UV – promieniowanie ultrafioletowe

V r. – współczynnik zmienności, wartość procentowa, która wskazuje, ile odpowiedzi odbiega od trybu.

v/v – stężenie procentowe objętościowe

vs. – (łac. *versus*) – w stosunku do

V – Volt

WWW – ang. World Wide Web

z. mays – (łac. *zea mays*) – kukurydza zwyczajna

ZEA – zearalenon

α -EC1 – (ang. *elongation factor 1*) – czynnik wydłużeniowy

β -TUB – (ang. *β -tubulin*) – β -tubulina

2.Streszczenie

Zmiany klimatu stanowią poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywnościowego świata. Panujące obecnie warunki pogodowe są czynnikiem, który w znaczącym stopniu wpływa na porażenie ziarna kukurydzy przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. Wobec powyższego celem rozprawy doktorskiej była wielopłaszczyznowa analiza genetycznych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. powodujące fuzariozę kolb kukurydzy. W wyniku przeprowadzonych analiz dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji oraz mapowania asocjacyjnego zidentyfikowano nowe markery molekularne, sprzężone z genami kandydującymi, które były związane z odpornością na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. u kukurydzy. Spośród zidentyfikowanych markerów molekularnych, wybrano 26 (istotne na poziomie 0,001), które przekonwertowano na markery specyficzne. Optymalizacja warunków reakcji pozwoliła zidentyfikować markery silcoDArT (553, 13242, 11801, 24753) oraz SNP (58153), które różnicowały genotypy referencyjne podatne i odporne na porażenie *Fusarium* spp. Wobec powyższego mogą one zostać wykorzystane w programach hodowlanych do selekcji genotypów odpornych, dzięki czemu skróceniu ulegnie czas niezbędny na wyhodowanie nowych odmian. Na podstawie mapowania fizycznego ustalono, że osiem z 26 istotnych markerów molekularnych znajduje się wewnątrz genów. Położenie markerów wewnątrz genów oraz ich charakterystyka w doniesieniach literaturowych pozwoliła na wybór czterech markerów (553, 15097, 58771, 27775), które są sprzężone z potencjalnymi genami kandydującymi (*hydroksycynamlotransferaza putrescyny*, *prekursor peroksydazy 72*, *esteraza/lipaza GDSL* oraz *nieskchrakteryzowane białko*). Analiza ekspresji czterech genów kandydujących wykazała, że charakteryzowały się one podwyższonym poziomem ekspresji po inokulacji, co świadczy o ich udziale w reakcji odpornościowej na porażenie przez *Fusarium* spp. *Prekursor peroksydazy 72* charakteryzował się najwyższym poziomem ekspresji po inokulacji u wszystkich badanych genotypów, co może go predystynować, do genu potencjalnie niosącego odporność na *Fusarium* spp. Genotypy pochodzące w tej samej firmie hodowlanej charakteryzowały się podobnymi wzorcami ekspresji, co sugeruje, że mogą się różnić pod względem pochodzenia. W wyniku przeprowadzonych badań jako geny referencyjne do analiz RT-qPCR wytypowano *beta tubulinę* (β -TUB) oraz *cyklofilinę* (CYP). Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* spp., które występowały na porażonych ziarniakach kukurydzy pozwoliła ustalić, że najliczniej występowały grzyby *Fusarium poae*, a pojedyncze próbki były również zasiedlone przez *Fusarium ploriferatum* lub *Fusarium culmorum*.

Słowa kluczowe: kukurydza, *Fusarium*, MAS, NGS, silcoDArT

3.Streszczenie w języku angielskim

Climate change as a serious threat to world food security. The current weather conditions are a factor that has a significant impact on the infestation of maize grain by fungi of the genus *Fusarium* spp. In view of the above, the aim of the dissertation was a multifaceted analysis of the genetic mechanisms involved in maize resistance to fungi of the genus *Fusarium* spp. causing fusariosis of maize cobs. As a result of the analyses, through the use of next-generation sequencing and association mapping, new molecular markers, coupled to candidate genes, were identified that were associated with resistance to fungi from genus *Fusarium* spp. in maize. From identified molecular markers, 26 were selected (significant at the 0.001 level) and converted to specific markers. Optimization of reaction conditions allowed, to identify silcoDArT markers (553, 13242, 11801, 24753) and SNPs (58153), which differentiated between reference genotypes susceptible and resistant to *Fusarium* spp. infection. In view of the foregoing, they can be used in breeding programs to select resistant genotypes, due to reducing the time required to breed new varieties. Based on physical mapping, eight of 26 relevant molecular markers were found to be located inside the genes. The location of markers within genes and their characterization in literature reports allowed the selection of four markers (553, 15097, 58771, 27775) that are conjugated to potential candidate genes (*GDSL esterase/lipase gene At4g01130 precursor uncharacterized precursor of the protein, putrescine hydroxycinnamyltransferase gene, peroxidase precursor gene 72* and *pentatricopeptide repeat-containing protein At5g57250, mitochondrial*). Expression analysis of four candidate genes showed that they were characterized by elevated expression levels after inoculation, indicating their participation in the resistance response to infection by *Fusarium* spp. The peroxidase 72 precursor was characterized by the highest level of expression after inoculation in all genotypes tested, which may predispose it, to a gene potentially carrying resistance to *Fusarium* spp. Genotypes from the same breeding company showed similar expression patterns, suggesting that they may differ in origin. As a result, *beta tubulin* (β -TUB) and *cyclophilin* (CYP) were selected as reference genes for RT-qPCR analyses. Identification of fungi of the genus *Fusarium* spp. that were present on infested maize kernels made it possible to determine that the most abundant fungi occurred *Fusarium poae*, and single samples were also populated by *Fusarium ploriferatum* or *Fusarium culmorum*.

Key words: maize, *Fusarium*, MAS, NGS, silcoDArT

4.Wprowadzenie

4.1 Produkcja kukurydzy zwyczajnej - zagrożenia i wyzwania

Kukurydza (*Zea mays* L.) została udomowiona ponad 9000 lat temu w południowym Meksyku lub Ameryce Środkowej (Awika, 2011; Kennett i in., 2020). Jedną z teorii mówi, że najbardziej prawdopodobnym przodkiem kukurydzy jest Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). Genetyczne loci, takie jak *tb1* (*teosinte branched 1*) oraz *tg1* (*teosinte glume architecture 1*) odegrały kluczową rolę w przekształceniu teosinte we współczesną kukurydzę (Mano i Otori, 2013; Ellstrand i in., 2007; Fukunaga i in., 2005). Kukurydza wraz z pszenicą i ryżem są wiodącymi na świecie podstawowymi zbożami, z których każde uprawiane jest na około 200 milionach ha. W 2022 r. globalne zbiory kukurydzy wyniosły około 203,5 mln ton przy wydajności 5,82 t/ha (FAO, 2022). Oprócz dostarczania składników odżywczych dla ludzi i zwierząt, kukurydza jest wykorzystywana jako surowiec do produkcji różnych innych kluczowych produktów takich jak skrobia, olej, napoje alkoholowe, słodziki spożywcze i paliwo (Dragomir i in., 2022). Obecnie sektory rolnicze państw na całym świecie dążą do zwiększenia i zrównoważenia produkcji żywnościowej, jest to w dużej mierze spowodowane wzrostem liczby ludności (Hickey i in., 2019), zmianami warunków środowiskowych, transformacją systemów dotyczących przetwarzania i dystrybucji produktów rolnych oraz ewoluowaniem oczekiwań rynku. Niestety możliwości wzrostu produkcji żywnościowej, z wykorzystaniem metod agrotechnicznych ma swoje ograniczenia technologiczne i ekonomiczne wynikające z relacji cen środków produkcji do ceny ziarna (Maschietto i in., 2017). Intensyfikacja produkcji powinna być opłacalna a wielokrotnie bywa tak, że wzrost dodatkowych nakładów na nawozy i środki ochrony nie jest równoważony wzrostem plonów (Ray i in., 2013). Czynnikiem limitującym wzrost produkcji jest też presja na ograniczenie nawożenia mineralnego i ilości stosowanych pestycydów jak również eliminowaniem z rynku wielu środków chemicznej ochrony roślin (Netshifhefhe i in., 2018).

Od wielu lat kraje członkowskie Unii Europejskiej (UE) wdrażają oraz realizują strategie i programy zrównoważonego rozwoju, które mimo podjęcia słusznych inicjatyw nadal są niewystarczające w stosunku do aktualnych, i przyszłych potrzeb (Wrzaszcz, Prandecki, 2020). Dlatego też wdrażanie integrowanych metod produkcji wraz z integrowaną ochroną roślin (mające na celu zmniejszenie presji na środowisko przyrodnicze) stały się nieuniknione. Pogarszający się w UE stan środowiska naturalnego wynikający z działalności rolniczej, jak również negatywne skutki zmian klimatu spowodowały, że w grudniu 2019 roku Komisja Europejska przygotowała komunikat dotyczący Europejskiego Zielonego Ładu.

Kładzie on nacisk na ograniczenie stosowania środków chemicznych, w tym m.in. pestycydów i nawozów, podkreślając dbałość o utrzymanie bioróżnorodności oraz dążenie do podwyższenia żyzności gleby (Europejski Zielony Ład 2019, 2021). Dwie najważniejsze dla rolnictwa Strategie Europejskiego Zielonego Ładu to Strategia „Od pola do stołu” oraz Strategia na rzecz bioróżnorodności 2030, które zakładają redukcję stosowania pestycydów o 50% wyznaczając w ten sposób ogólny cel UE (Ginter i in., 2021). W czerwcu 2022 roku ustalony został obligatoryjny cel redukcyjny dla każdego państwa członkowskiego, w tym dla Polski, i nie może być on mniejszy niż 35% (Kapela, Majchrowska-Safaryan, 2024).

Zmiany klimatu dodatkowo stanowią poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywnościowego (Perry i in., 2020). Globalny klimat ociepla się w niespotykanym dotąd tempie, odkąd zaczęto rejestrować temperaturę (Ji i in., 2014). Jako najczęściej uprawiana roślina rolnicza, kukurydza odgrywa bardzo dużą rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego (Ranum i in., 2014). Wzrost globalnej temperatury o 1°C doprowadziłby do zmniejszenia plonów kukurydzy o 3,4% (Deng i in., 2023). Warunki pogodowe są czynnikiem, który w większym stopniu wpływa na porażenie ziarna zbóż przez *Fusarium* spp. niż zróżnicowane systemy uprawy roli. Teorię tą potwierdzają badania prowadzone przez Champeil i in. (2004). Dodatkowo epidemiom sprzyja pojawianie się nowych gatunków agrofagów oraz inwazyjne przemieszczanie się już występujących, na tereny sąsiednie. Na podstawie badań przeprowadzonych w ostatnich kilku latach szacuje się, że choroby kukurydzy co roku są przyczyną strat wysokości plonu, sięgających nawet 30% (Butrón i in., 2019). Znacznemu pogorszeniu ulega również jakość plonu ziarna ponieważ wczesne porażenie roślin przez grzyby i bakterie powoduje zdrobnienie ziarna, pogorszenie wartości pokarmowej oraz jakości uzyskiwanej paszy (Scauflaire i in., 2011).

Oprócz presji agrofagów i zmieniającego się klimatu na potencjał ekonomiczny obszarów produkcyjnych kukurydzy wpływa również Omacnica prosowianka [*Ostrinia nubilalis* (Hübner)], która jest szkodnikiem kukurydzy (Bode i Calvin, 1990; Szóke i in., 2002). Zwykle występują dwa pokolenia larw omacnicy w ciągu roku: pierwsze pokolenie atakuje rośliny w połowie lub pod koniec fazy wegetatywnej, a drugie pokolenie w fazie reprodukcji (od wczesnej fazy młecznej do dojrzałości) (Blandino i in., 2009). Ponadto larwy drugiego pokolenia odgrywają bardzo ważną rolę w promowaniu infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium* spp. i produkcji mykotoksyn w ziarnach kukurydzy (Sobek i Munkvold, 1999).

4.2 *Fusarium* spp. jako sprawca choroby fuzaryjnej

Choroby fuzaryjne kolb kukurydzy [ang. *Fusarium ear rot* (FER)], powodowane przez *Fusarium* spp. znane są od dawna. Jednym z pierwszych doniesień na ten temat była praca Bisby'ego i Bailey'a (1923) z Kanady. Grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. są powszechne w uprawach kukurydzy i mogą wywoływać różne choroby, takie jak zgnilizna korzeni, siewek, łodyg i kolb. Jest to choroba o złożonej etiologii, a wśród czynników sprawczych wymienia się między innymi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* i *Fusarium proliferatum*. Najczęściej sprawcą fuzariozy kolb są grzyby *Fusarium graminearum* (produkujące deoksyniwalenol – DON i zearalenon – ZEA) oraz *Fusarium verticillioides* (produkujące fumiozyny – FUM) (Garcia-Ceron i in., 2021). *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, jest najbardziej szkodliwym patogenem rozpowszechnionym na wszystkich kontynentach, z większą agresywnością w cieplejszych regionach klimatycznych (Ncube i in., 2020). W literaturze opisywana jest też *Gibberella fujikuroi*, która jest doskonałym (telemorfa) stadium *Fusarium graminearum*. Często objawy fuzariozy powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. nie są wyraźnie widoczne na kolbie, jednak wewnątrz porażenie postępuje, prowadząc do akumulacji mykotoksyn (Vigier i in., 2001; Mesterhazy i in., 2012). Po odkryciu toksyn wytwarzanych przez *Fusarium* zrozumiano w pełni szkody spowodowane występowaniem tego grzyba. Mykotoksyny mogą wywoływać wiele chorób u ludzi, między innymi różnego rodzaju alergie, zaburzenia hormonalne, nowotwory (toksyny te uaktywniają komórki onkogenne). Ich obecność w paszy stanowi duże zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt, szczególnie dla trzody chlewnej i drobiu, gdyż powodują one podwyższoną wrażliwość na czynniki zakaźne, które w standardowych warunkach, bez dodatkowego działania metabolitów grzybów produkujących toksyny nie byłyby w stanie wywołać choroby. Ponadto negatywnie wpływają na wyniki produkcyjne (Garcia-Ceron i in., 2021). Większość krajów wprowadziła nowe przepisy dotyczące dopuszczalnych poziomów mykotoksyn w żywności i paszach. W 2007 roku Unia Europejska wprowadziła normy określające maksymalne zawartości mykotoksyn w ziarnie kukurydzy (EC No 1126/2007). Jeżeli zawartość DON w ziarnie nieprzetworzonym przekracza 1700 µg/kg, ZEA 350 µg/kg, a FUM 4000 µg/kg, takie ziarno nie kwalifikuje się do wykorzystania na paszę. Ponadto, w przypadku kukurydzy stosowanie fungicydów jest trudne i często mało efektywne, ponieważ trudno jest oceniać nasilenie choroby (Uwe i in., 2020).

Wyróżniamy, trzy główne przyczyny infekcji *Fusarium* i biosyntezy mykotoksyn w kukurydzy: predyspozycje genetyczne odmian, praktyki produkcyjne i warunki

klimatyczne. Różne odmiany charakteryzują się różną odpornością na choroby grzybowe i zanieczyszczenia mykotoksynami. Hodowla odmian o mniejszej podatności na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* ssp. jest powszechnie uznana za najbardziej opłacalną i przyjazną środowisku metodę ochrony roślin przed porażeniem przez choroby (Meissler i in., 2010; Vasileiadis i in., 2011).

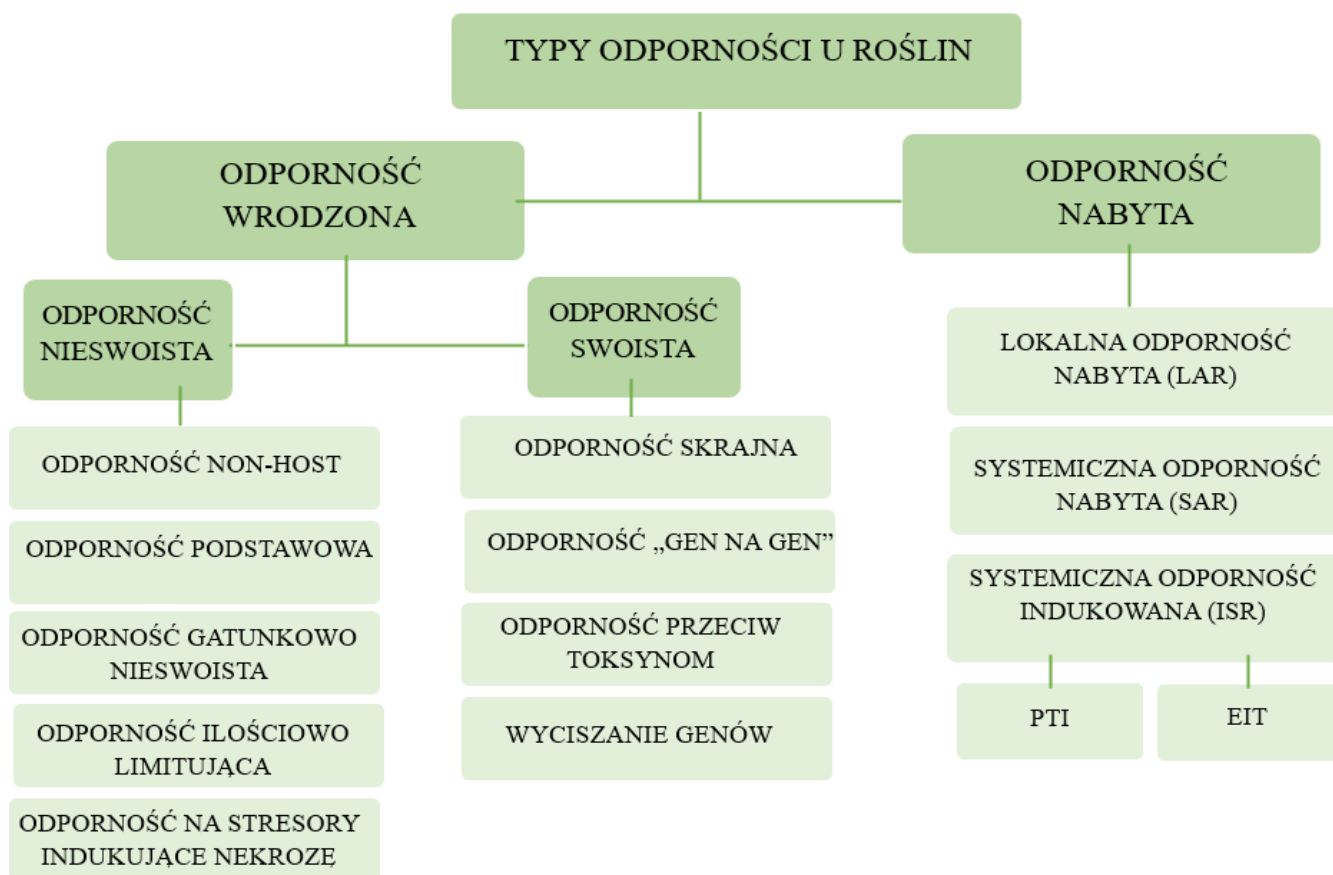
4.3 Różne typy odporności u roślin

Odporność roślin na infekcje powodowane przez patogeny dzieli się na: odporność wrodzoną, obejmującą mechanizmy, które są obecne w roślinie przez całe jej życie, nawet pomimo braku kontaktu z patogenami (bariery fizyczne i chemiczne) oraz odporność nabytą, która jest aktywowana w odpowiedzi na infekcje patogenne. Odporność wrodzoną możemy podzielić na: nieswoistą (ogólną) - zapewniającą roślinom efektywną obronę przeciwko różnym gatunkom i szczepom patogenów oraz odporność swoistą - warunkującą ochronę konkretnemu, jednemu rodzajowi roślin w stosunku do jednego lub kilku szczepów patogennych.

Odporność nieswoista jest najbardziej rozpowszechnionym typem odporności charakterystycznym dla większości roślin. Opisano różne formy tego typu odporności, a wśród nich: odporność „non-host”, czyli rasowo nieswoistą, odporność podstawową, odporność gatunkowo nieswoistą, ilościowo limitującą odporność oraz odporność na czynniki nekrotyczne. Przeciwno infekcjom grzybowym rośliny wykształciły dwa typy odporności wrodzonej nieswoistej: odporność rasowo niespecyficzną (gatunkowo nieswoistą) oraz odporność limitującą tempo i ograniczającą sporulację patogennych grzybów (Wojtasik, Kulma, 2016).

Odporność nabyta to system obrony roślin przed atakami patogenów, obejmujący zarówno mechanizmy indukowane, jak i konstytutywne. Rośliny aktywują mechanizmy obronne w odpowiedzi na atak patogenu, co opisuje model zygzakowy (Jones, Dangl, 2006). Systemiczna odporność indukowana (ISR) (ang. *Inducate Systemic Resistant*) inicjowana jest przez wzorce molekularne związane z mikroorganizmami lub patogenami (MAMP/PAMP) (ang. *Molecular Patterns Associated with Microorganisms/Pathogen Associated Molecular Patterns*) lub uszkodzeniami (DAMP) (ang. *Damages Associated Molecular Patterns*, rozpoznawane przez receptory PRR (receptory rozpoznające wzorce molekularne), (ang. *Pattern Recognition Receptors*) (Jones, Dangl, 2006; Couto, Zipfel, 2016; Yu i in., 2017; Zipfel, 2014). Rozpoznanie MAMP/PAMP/DAMP prowadzi do aktywacji niespecyficzej odporności PTI (ang. *Pattern Triggered Immunity*) (odporność indukowana przez wzorce

molekularne), obejmującej kaskady kinaz (CDPK, MAPK) (ang. *Calcium-dependent protein kinases*, ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*), indukcję genów obronnych, produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) (ang. *Reactive Oxygen Species*), wzmocnienie ściany komórkowej, syntezę fitoaleksyn i akumulację białek powiązanych z patogenezą (Jones, Dangl, 2006). Patogeny mogą prowadzić do supresji PTI za pomocą efektorów (czynniki wirulencji), wprowadzanych do komórek gospodarza przez systemy sekrecji (Rodriguez-Moreno i in., 2018; Chaudhari i in., 2014; Win i in., 2012; Kanyuka, Rudd, 2019). Efektory blokują aktywność PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*), defosforylują kinazy, hamują biosyntezę metabolitów wtórnych lub aktywują geny gospodarza, prowadząc do wyzwolanej przez efektor wrażliwości (ETS) (ang. *Effector Triggered Susceptibility*) (Hetmann, Kowalczyk, 2019; Uhse, Djamei, 2018; Arroyo-Velez i in., 2020). Efektory mogą stać się czynnikami awirulencji, rozpoznawanymi przez wewnątrzkomórkowe receptory R, czyli geny/białka odporności (Petit-Houdenot, Fudal, 2017). Rozpoznanie efektora przez białko R aktywuje specyficzną odporność ETI (ang. *Effector Triggered Immunity*), często z towarzyszącą reakcją nadwrażliwości, prowadzącą do śmierci komórek w miejscu infekcji (Nguyen i in., 2021; Hawkins, 2019; Balint-Kurti, 2019). ETI jest szybszą i silniejszą wersją PTI, efektywną wobec biotrofów (Jones, Dangl, 2006; Balint-Kurti, 2019). Rośliny posiadają zatem wielowarstwowy system obrony, od barier fizycznych i chemicznych, poprzez indukcję odporności przez rozpoznanie wzorców molekularnych, aż po specyficzne rozpoznanie efektorów patogenów, co prowadzi do silnej odpowiedzi obronnej (Albuquerque i in., 2021; Ayliffe i in., 2011; Bednarek, Osbourn, 2009; Jamiolkowska, 2020; Dangl, Jones, 2001) (rycina 1).



Rycina 1. Schemat przedstawiający organizację systemu odpornościowego roślin z uwzględnieniem różnych typów odpowiedzi obronnych (Sobiech)

4.3.1 Wpływ fenotypu na genetycznie warunkowaną odporność

Fenotyp rośliny ma wpływ na jej skłonności do porażenia przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Genotypy charakteryzujące się większą liczbą ziarniaków w rzędach wykazują zwiększoną odporność na FER – *Fusarium ear rot* (Warfield, Davies, 1996; Butron i in., 2006). Cechy fizjologiczne, n.p. wczesność kwitnienia, również wpływają na zmniejszenie podatności na infekcje powodowane przez patogeny, między innymi *F. verticillioides*. Hoenish i Davis (1994) wykazali, że na stopień porażenia kolby przez fuzarium wpływ miały właściwości okrywy nasiennej. Grubsza owocnia utrudniała penetrację patogenu, co zmniejszało nasilenie choroby (Battilani i in., 2008). Oprócz cech fenotypowych warunkujących zmniejszenie nasilenia występowania fuzariozy, ważna jest genetyczna odporność na tą chorobę. Fenotypowa współzależność pomiędzy nasileniem FER a ilością fumonizyn jest umiarkowana, do niskiej (Clements i in., 2003), prawdopodobnie z powodu bezobjawowych infekcji (Oren i in., 2003), natomiast korelacja genotypowa pomiędzy podatnością na porażenie roślin przez grzyby z rodzaju *Fusarium* i akumulacją myk toksyn była wyższa, niż korelacja fenotypowa (0,87–0,96 vs. 0,40–0,64) (Robertson i in., 2006).

W hodowli, selekcja genotypów bardziej odpornych na FER pozwala na jednoczesną selekcję genotypów w mniejszym stopniu akumulujących wysokie zawartości fumiozyn. Dlatego genetyczne predyspozycje w dużym stopniu determinują podatność rośliny na infekcje. Dobrym przykładem jest kukurydza *Bt* (genetycznie zmodyfikowana w celu ekspresji białek owadobójczych pochodzących z *Bacillus thuringiensis*), która dzięki modyfikacjom genetycznym jest mniej podatna na infekcje powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* niż tradycyjne odmiany (Chukwudi i in., 2021).

Efektywne wykorzystanie istniejących źródeł odporności w programach hodowlanych wymaga dogłębnej analizy architektury genetycznej cech warunkujących odporność na FER oraz identyfikacji i charakterystyki mechanizmów molekularnych leżących u ich podstaw. Odporność na fuzarium jest wielogenową cechą, dziedziczną ilościowo, a zatem jest kontrolowana przez liczne loci cech ilościowych (QTL). Należy jednak zaznaczyć, że odporność roślin na fuzarium może być również wynikiem oddziaływań epistatycznych lub efektem dominacji genów (Williams i in., 2009; Pérez-Brito i in., 2001; Hung i in., 2012; Butron i in., 2015; Netshifhefhe i in., 2018).

4.4 Metody molekularne wykorzystywane w hodowli kukurydzy

4.4.1 Rozwój Metod Sekwencjonowania DNA

Przełomowym momentem w historii sekwencjonowania DNA było opracowanie w 1977 roku metody Sangera (Sanger i in., 1977). Technika ta wykorzystuje analogi chemiczne deoksyrybonukleotydów (dNTP), czyli dideoksyrybonukleotydy (ddNTP), które charakteryzują się brakiem grupy 3' hydroksylowej, niezbędnej do elongacji łańcucha DNA, uniemożliwiając tym samym tworzenie wiązania fosfodiesterowego z kolejnym dNTP (Chidgeavadze, Beabealashvili, 1984). W kolejnych latach wprowadzono liczne udoskonalenia metody Sangera, w tym zastąpiono znakowanie radioaktywne znakowaniem fluorometrycznym (Smith i in., 1985) oraz zastosowano elektroforezę kapilarną (Swerdlow, Gesteland, 1990; Luckey, Drossman, 1990), co znacząco poprawiło rozdzielczość i czułość detekcji. Te ulepszenia przyczyniły się do rozwoju zautomatyzowanych sekwenatorów (Ansorge i in., 1986; Ansorge i in., 1987; Prober i in., 1987; Kambara i in., 1988) oraz komercyjnych maszyn do sekwencjonowania DNA (Hunkapiller i in., 1991; Heather, Chain, 2016).

4.4.2 Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS)

Równolegle z rozwojem sekwencjonowania Sangera na dużą skalę, pojawiła się technika pirosekwencjonowania, stanowiąca fundament dla sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Metoda ta różni się od wcześniejszych technik tym, że identyfikacja nukleotydów opiera się na detekcji luminescencyjnej pirofosforanu, a nie na znakowaniu radioaktywnym lub fluorescencyjnym dNTP i elektroforezie. Pirosekwencjonowanie, wykorzystuje naturalne nukleotydy i umożliwia obserwację w czasie rzeczywistym, eliminując potrzebę elektroforezy. Technika ta została skomercjalizowana przez 454 Life Sciences, stając się pierwszą komercyjnie udaną platformą NGS. Maszyny 454 (później zakupione przez Roche) umożliwiały sekwencjonowanie, znacząco zwiększając przepustowość (Margulies i in., 2005). Po sukcesie 454 pojawiło się wiele technik NGS, w tym sekwencjonowanie Solexa (Illumina) (Voelkerding i in., 2009). Rewolucja genomiki, napędzana przez NGS, radykalnie obniżyła koszty sekwencjonowania (Stein, 2010). Metoda z wykorzystaniem Illuminy dała początek rozwojowi procedur GBS (ang. *genotyping by sequencing*) (Sansaloni i in., 2011) oraz DArTseq (Elshire i in., 2011).

4.4.2.1 Diversity Arrays Technology (DArT)

Technologia Diversity Arrays Technology (DArT) została opracowana jako narzędzie wykorzystywane do mapowania genomowego o wysokiej przepustowości (Kilian i in., 2005). Proces ten rozpoczyna się od zebrania reprezentatywnej grupy próbek DNA, odzwierciedlającej pulę genową badanego gatunku (Jaccoud i in., 2001). Próbkę powinny charakteryzować się niską zawartością powtarzalnego DNA i odpowiednią złożonością sekwencji, definiowaną przez liczbę unikalnych fragmentów i ich średnią długość (Jaccoud i in., 2001; Wenzl i in., 2004; Xia i in., 2005; Kilian i in., 2005).

Następnie stosuje się metody redukcji złożoności genomu, które oparte są na trawieniu enzymami restrykcyjnymi, takimi jak *PstI*. Wykorzystuje się wrażliwość tych enzymów na metylację DNA w celu selekcji regionów o niskiej liczbie powtórzeń sekwencji (Rabinowicz i in., 1999). W celu dalszej redukcji złożoności, *PstI* jest stosowany w połączeniu z innymi, często tnącymi enzymami, takimi jak np. *TaqI* i *BstNI* (Wenzl i in., 2004; Xia i in., 2005). Wybór enzymów wpływa na zdolność wykrywania polimorfizmu DNA, a kombinacje enzymów wrażliwych na metylację mogą zwiększać wykrywalność polimorfizmu (Kilian i in., 2005).

4.4.2 Markery DArT i ich charakterystyka

Markery DArT są markerami, które mogą być dominujące (obecność/brak) lub kodominujące. Rodzaj redukcji złożoności determinuje typ polimorfizmu wykrywanego przez markery DArT, w tym polimorfizm sekwencji (SNP, InDel) i polimorfizm metylacji DNA. SNP w sekwencjach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne stosowane na etapie redukcji złożoności, natomiast InDel w tych sekwencjach obejmują część lub cały fragment restrykcyjny. Zatem silicoDArT reprezentują obecność/brak fragmentu restrykcyjnego w reprezentacjach genomowych (bibliotekach) wśród próbek objętych analizą. Większość markerów DArT charakteryzuje się stabilnością i dziedziczeniem mendlowskim (Wenzl i in., 2004; Wittenberg i in., 2005). W przypadku konieczności wysokiej stabilności markerów, można stosować kombinacje enzymów niewrażliwych na metylację lub dostosować reprezentacje do wykrywania wyłącznie polimorfizmu metylacji (Kilian i in., 2005; Rakyant i in., 2004).

4.4.3 Analizy GWAS i mapowanie QTL

Badania asocjacji całego genomu (GWAS) są użytecznym narzędziem do identyfikacji genów kandydujących, zwłaszcza w połączeniu z mapowaniem QTL w celu walidacji loci pod kątem cech ilościowych. Mapowanie genomu wykazało, że odporność na FER jest kontrolowana przez wiele genów o stosunkowo małych efektach, które różnią się w zależności od środowiska i populacji (Mesterházy i in., 2012; Lanubile i in., 2017). Chociaż różne linie wsobne i mieszańce kukurydzy wykazują różną zmienność genetyczną pod względem odporności na FER, nie ma dowodów na istnienie genotypów kukurydzy o pełnej odporności na FER lub na skażenie fumonizynami w kukurydzy (Clements i in., 2004; Clements, Kleinschmidt, 2003; Lanubile i in., 2011). Identyfikacja nowych genów odporności na *F. verticillioides* jest bardzo ważna, w celu znalezienia trwałego rozwiązania problemów związanych z FER w produkcji kukurydzy. W kilku badaniach zidentyfikowano QTL związane z odpornością na *F. verticillioides* czego skutkiem było zmniejszenie akumulacji fumonizyn, wykorzystując populacje krzyżówkowe (Zhang i in., 2007). Zila i in. (2013, 2014) przeprowadzili testy GWAS na kukurydzy w celu wykrycia SNP związanego ze zwiększoną odpornością na fuzarium. Zidentyfikowali dziesięć markerów SNP istotnie związanych z odpornością na ten patogen. Zila i in. (2013) zidentyfikowali markery SNP związane z odpowiedzią obronną w pięciu genach lub w ich sąsiedztwie, których wcześniej nie korelowano z odpornością na choroby, ale których przewidywane funkcje genów obejmowały szlak zaprogramowanej śmierci komórki. W analizach GWAS regiony QTL związane

z odpornością na FER zostały zidentyfikowane na chromosomach 1, 4, 5, 7, 8 i 10 (De Jong i in., 2017), chromosomach 4, 5 i 9 (Zila i in., 2014) oraz chromosomach 1, 5 i 9 (Zila i in., 2013). Chen i in. (2021) stwierdzili znaczący efekt odpornościowy QTL na chromosomie 4. W badaniach Li i in. (2011) wykryto cztery QTL związane z odpornością na grzyby z rodzaju *Fusarium*. Znajdowały się one na chromosomach 3, 4, 5 i 6. Allel odporności w każdym z tych czterech QTL został przekazany przez odpornego rodzica BT-1 i stanowił 2,5–10,2% zmienności fenotypowej. QTL o największym efekcie wykryty na chromosomie 4 może być traktowany jak locus odporności na fuzarium kolb kukurydzy. Ponadto w wyniku GWAS zidentyfikowano trzy geny kandydujące w tych regionach, które należały do rodziny białek Glutaredoxin, czynników depolimeryzujących aktynę (ADFs) i białek wiążących AMP (Wu i in., 2020). Obecnie wiele cech ilościowych zostało z powodzeniem zbadanych za pomocą GWAS w kukurydzy (Xiao i in., 2017). W 2016 roku Chen i jego współpracownicy przedstawili 45 SNP, które były istotnie związane z odpornością na FER, z których każdy miał stosunkowo mały efekt addytywny na odporność na FER i wyjaśniał 1–4% zmienności fenotypowej (Chen i in., 2016). Ponadto badania z zastosowaniem GWAS dla FER zostały przeprowadzone przez wiele zespołów badawczych, takich jak (Butron i in., 2019; Coan i in., 2018; Zila i in., 2013; Zila i in., 2014). W porównaniu z tradycyjną analizą sprzężeń, mapowanie asocjacyjne oferuje wyższą rozdzielczość oraz eliminuje czas i koszty opracowania syntetycznych populacji mapujących, co rekompensuje wadę fałszywie pozytywnych wyników (Flint-Garcia i in., 2005; Yu i in., 2006; Motte i in., 2014; Pedernana i in., 2014).

4.4.4. Postęp w hodowli odpornościowej dzięki wykorzystaniu MAS

Obecnie coraz więcej programów hodowli kukurydzy koncentruje się na opracowaniu odpornych mieszańców kukurydzy przeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierząt (Lanubile i in., 2017). W dobie szybkiego rozwoju narzędzi biologii molekularnej ważna jest identyfikacja markerów związanych z genami warunkującymi odporność na fuzarium, w celu ułatwienia selekcji odpornych genotypów. Maschietto i in. (2017) wykazali przydatność markerów SSR do selekcji genotypów odpornych na fuzarium.

Markery molekularne są użytecznymi narzędziami do identyfikacji genów kandydujących, zwłaszcza w połączeniu z mapowaniem QTL w celu walidacji loci dla cech ilościowych (Korte, Farlow, 2013). Połączenie tych metod pozwoliło przezwyciężyć ich ograniczenia (Brachi i in., 2010). Jako alternatywa dla klasycznych metod hodowli roślin, precyzyjna inżynieria genetyczna opierająca się na technologiach edycji genomu może

odegrać kluczową rolę w dostępie do zasobów genetycznych. Zasoby te mogą zostać wykorzystane do zwiększenia odporności roślin na choroby, poprzez ukierunkowanie na odpowiednie mechanizmy obronne roślin warunkowane genetycznie (Eller i in., 2008).

Hodowla prowadzona w kierunku zwiększenia odporności na fusariozę kolb (FER) w kukurydzy jest utrudniona ze względu na dużą zmienność genetyczną patogena. W przeszłości zidentyfikowano kilka linii wsobnych charakteryzujących się stabilną odpornością na tę chorobę, nie udało się jednak uzyskać odmian całkowicie odpornych (Ayesiga i in., 2024). Obecnie najskuteczniejszą metodą walki z tym patogenem jest uprawa odmian o genetycznie uwarunkowanej odporności na *Fusarium* (Champeil i in., 2004; Bocianowski, 2024).

Powyższe rozważania pozwoliły na sformułowanie hipotezy badawczej oraz celu prezentowanej rozprawy doktorskiej.

5. Hipoteza badawcza i cel pracy doktorskiej

Hipoteza badawcza zakłada, że wielowymiarowa analiza genetycznych uwarunkowań wybranych genów i powiązanych z nimi regionów pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmu odporności na *Fusarium* spp. w kukurydzy zwyczajnej. Ponadto analiza genów kandydujących pozwoli na wysekcjonowanie genów odpowiedzialnych za odporność na grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Głównym celem pracy jest wielopłaszczyznowa analiza genetycznych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. powodujące fuzariozę kolb kukurydzy.

Cele szczegółowe:

1. Identyfikacja nowych markerów silicoDArT i SNP sprzężonych z genami warunkującymi odporność roślin kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.
2. Zaprojektowanie starterów służących do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów silicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi odporność na *Fusarium* spp. u kukurydzy.
3. Optymalizacja procedur diagnostycznych, służących do identyfikacji nowych markerów molekularnych na materiałach referencyjnych podatnych i odpornych na *Fusarium* spp.
4. Określenie poziomu ekspresji wybranych genów kandydujących związanych z odpornością roślin kukurydzy na *Fusarium* spp.
5. Wybranie potencjalnych genów niosących odporność na *Fusarium* spp. u kukurydzy spośród wytypowanych genów kandydujących.

6. Materiały i metody

6.1 Materiał badawczy

Materiał roślinny przeznaczony do sekwencjonowania nowej generacji (NGS), przedstawiony w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej stanowiło 560 genotypów kukurydzy *Zea mays* L., w skład których wchodziło 252 linie wsobne (250 linii matecznych i dwie linie ojcowskie) oraz 308 mieszańców pokolenia F₁ (mieszańce powstały w wyniku krzyżowania linii matecznych i ojcowskich). Analizy tego materiału roślinnego były podzielone na etapy zgodnie z harmonogramem projektu MRiRW. W pierwszym etapie badań (publikacja 1) analizowano 186 linii matecznych kukurydzy, w drugim etapie badań analizowano pozostałe 64 linie mateczne, 2 linie ojcowskie oraz 122 mieszańce pokolenia F₁ (publikacja 4). W trzecim etapie badań analizowano kolejne 186 mieszańców F₁. Wyniki trzeciego etapu badań stanowią część niepublikowaną rozprawy.

Materiał roślinny wykorzystany do sekwencjonowania otrzymano od Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. Analizowane linie wsobne pochodziły z Europy oraz ze Stanów Zjednoczonych. Charakteryzowały się one typem ziarna dent i flint. Linie flint pochodziły m.in. z Francji (populacja Lacaune), z Hiszpani (populacja wywodząca się z Pirenejów) i Niemiec (German Flint). Linie dent pochodziły z różnych grup ze Stanów Zjednoczonych: Iowa Stiff Stalk Synthetic (BSSS), Iowa Dent (ID) i Lancaster.

Oprócz materiału roślinnego przeznaczonego do sekwencjonowania nowej generacji (NGS) analizowano genotypy referencyjne (podatne i odporne na fuzarium). Celem tych analiz było przetestowanie użyteczności nowo zidentyfikowanych markerów, a następnie wykorzystać je do selekcji genotypów odpornych w programach hodowlanych.

Materiał referencyjny stanowiły w sumie 52 genotypy (opisane szczegółowo w publikacjach 1, 2 i 4). Były to rośliny otrzymane od Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR (zaznaczone kolorem niebieskim), Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (zaznaczone kolorem zielonym) oraz cztery genotypy pochodzące z Katedry Agronomii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (zaznaczone kolorem fioletowym). Do analizy ekspresji wykorzystano cztery genotypy odporne i jeden genotyp podatny (zaznaczone w tabeli 1 pogrubioną czcionką). Zestawianie wszystkich genotypów zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie genotypów referencyjnych (odporne i podatne na porażenie Fusarium spp.)

Genotypy odporne	Genotypy podatne	Publikacja
9	16	Publikacja 2
25	23	
28	24	
35	41	
45	57	
47	58	
52	67	
66	68	
71	78	
74	103	
80	253	
114	254	
255	256	
257	258	
260	259	
KF9	K612A	Publikacja 1 i 4
KF11	K605A	
KF12	K620A	
KF13	KF 02	
KF15	GSZ	
SF9	KWS ESPERANTO	
SF11	BRIGADO	
SF12	FARM MODENA	
SF13	BLASK żeński	
SF14	BLASK męski	

6.2 Metody badawcze

6.2.1 Doświadczenie polowe

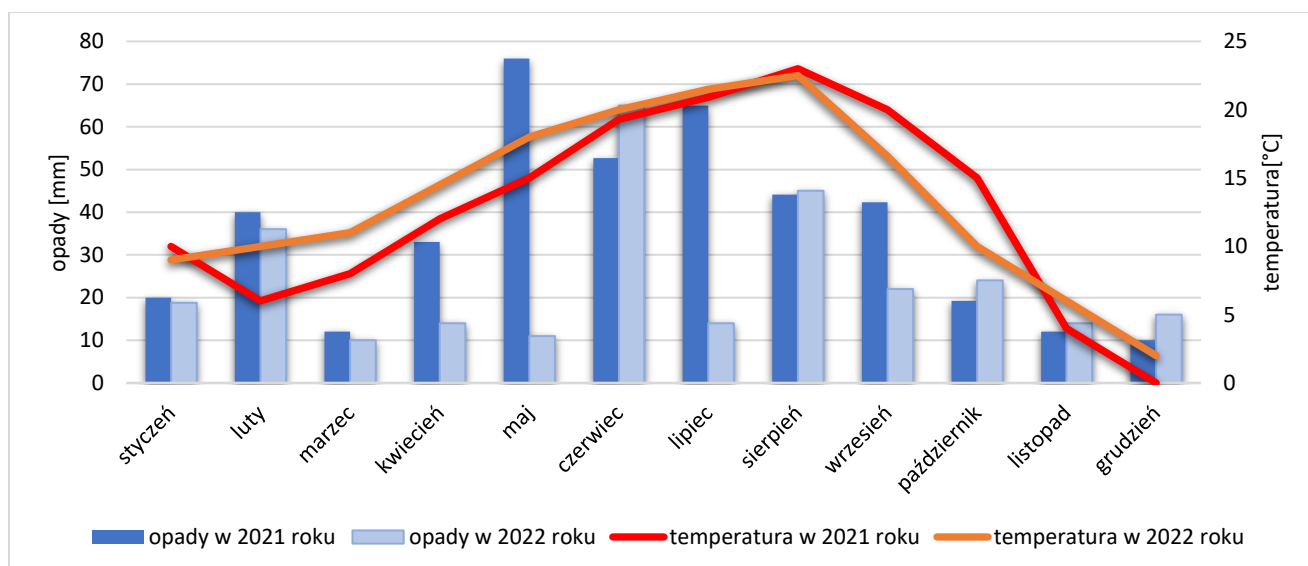
Doświadczenie z 560 genotypami kukurydzy zostało założone na poletkach 10 m² należących do Hodowli Roślin Smolice sp. z o.o. Grupa IHAR (51°41'23.16" N, 17°4'18.241" E) oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (50°58'17" N, 16°55'50" E) w układzie bloków losowanych kompletnych w trzech powtórzeniach w 2021 i 2022 roku.

Doświadczenie z genotypami referencyjnymi zostało założone w jednym powtórzeniu w każdym roku (2022, 2023) w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin.

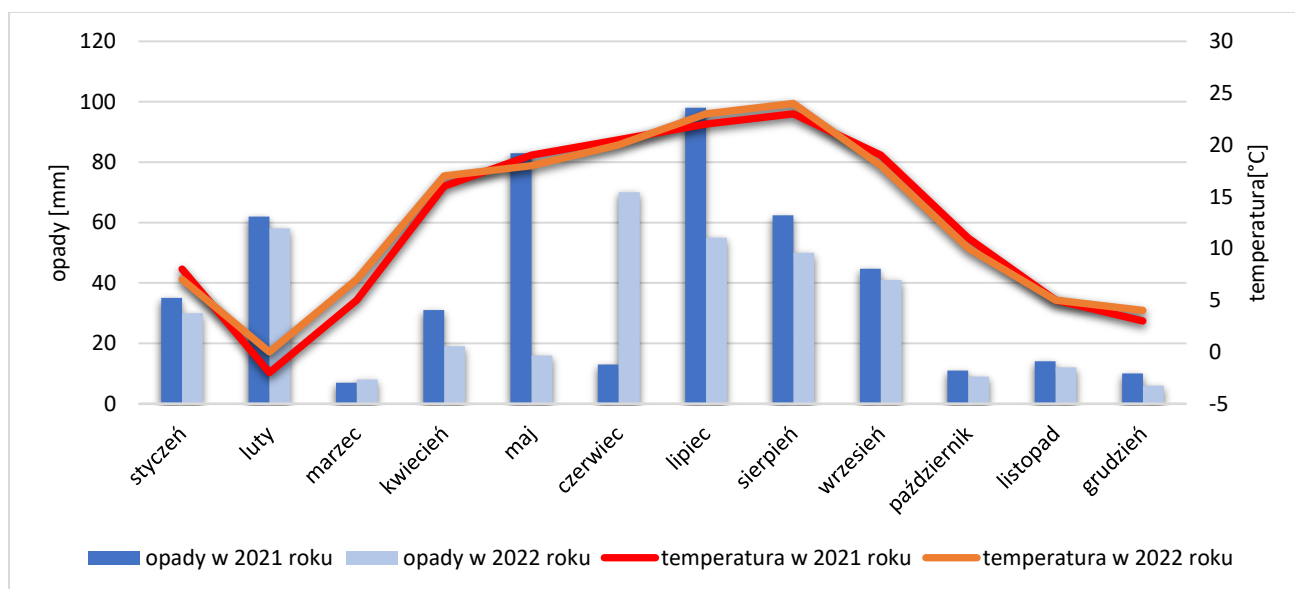
Warunki meteorologiczne w sezonie wegetacyjnym 2021 roku były sprzyjające dla wzrostu i rozwoju kukurydzy mimo, że przymrozki w kwietniu opóźniły się. Miesiąc maj, bardzo istotny dla wzrostu i rozwoju kukurydzy, należy zaliczyć do chłodnych (12°C) i wilgotnych, ponieważ ilość opadów wyniosła 76 mm. W przeciwieństwie do maja, czerwiec i lipiec 2021 roku okazały się miesiącami suchymi (czerwiec 52,7 mm; lipiec 65 mm) i ciepłymi (czerwiec 19,3°C; lipiec 20,9°C). Sucha i ciepła pogoda nie sprzyjała rozprzestrzenianiu się chorób grzybowych w tym okresie. Nie obserwowano również intensywnych nalotów motyli omacnicy prosowianki (*Ostrinia nubilalis*), która żeruje na kukurydzy zwiększając jej podatność na fuzarium poprzez składanie jaj od połowy czerwca do końca sierpnia. W sierpniu zaobserwowano zwiększone porażenie kukurydzy przez fuzarium, co było spowodowane bardzo dużą ilością opadów (140,1 mm) i dość wysoką temperaturą (17°C). Bardzo suche miesiące wrzesień (42,3 mm) oraz październik (19,2 mm) wpłynęły na zahamowanie rozwoju chorób grzybowych w tym fuzariozy kolb. Wobec powyższego wszystkie analizowane genotypy charakteryzowały się dużą odpornością.

Sezon wegetacyjny w 2022 roku pod względem warunków meteorologicznych również sprzyjał wzrostowi i rozwojowi kukurydzy. Maj był miesiącem bardzo ciepłym i suchym, średnia temperatura miesięczna wynosiła 15,2°C, a miesięczna suma opadów zaledwie 10,8 mm. Niska wilgotność powietrza i brak większych opadów przyczyniły się do pogłębiającej się suszy. Miesiące: czerwiec, lipiec i sierpień charakteryzowały się średnią temperaturą powyżej normy, odpowiednio 18,3°C, 21,7°C, i 22,1°C. W przeciwieństwie do maja, czerwiec był miesiącem o największej sumie opadów w tym okresie (63,4 mm), natomiast lipiec (13,3 mm) i sierpień (44,8 mm) były miesiącami bardzo suchymi. Wrzesień był miesiącem ciepłym (16,7°C) o małej ilości opadów (22,5 mm), podobnie jak październik (10,2°C, 24,6 mm). Sucha i ciepła pogoda nie sprzyjała rozwojowi chorób grzybowych w całym okresie wegetacji kukurydzy. W 2022 roku wszystkie analizowane genotypy

charakteryzowały się odpornością na poziomie 8° lub 9° w 9-stopniowej skali stosowanej przez COBORU (Centralny Ośrodek Badań Odmian Roślin Uprawnych). Warunki meteorologiczne panujące w Kobierzycach i Smolicach w latach 2021-2022 przedstawiono na rycinie 2 i 3.



Rycina 2. Średnia miesięczna temperatura i średnia miesięczna suma opadów w miejscowości Smolice w latach 2021 i 2022



Rycina 3. Średnia miesięczna temperatura i średnia miesięczna suma opadów w miejscowości Kobierzyce w latach 2021 i 2022



Fot 1. Poletko doświadczalne w Hodowli Roślin w Smolicach w czerwcu 2021 roku (fot. Sobiech)



Fot 2. Poletko doświadczalne w Hodowli Roślin w Smolicach w październiku 2021 roku (fot. archiwum HR Smolice)

6.2.2 Fenotypowanie

W trakcie prowadzenia doświadczeń prowadzone były obserwacje dotyczące stopnia porażenia kolb kukurydzy przez *Fusarium* spp. Obserwacje prowadzono w ośmiu terminach: termin 1 - rozwój pierwszych ziarniaków o konsystencji wodnistej, zawierają około 16% suchej masy (BBCH 71), termin 2 - początek dojrzałości mlecznej ziarniaków (BBCH 73), termin 3 - pełna dojrzałość mleczna ziarniaków, zawierają około 40% suchej masy (BBCH 75), termin 4 - ziarniaki osiągają typową wielkość (BBCH 79), termin 5 - początek dojrzałości woskowej ziarniaków, ziarniaki miękkie zawierają około 45% suchej masy (BBCH 83), termin 6 - pełna dojrzałość woskowa ziarniaków, ziarniaki o typowym zabarwieniu zawierają około 55% suchej masy (BBCH 85), termin 7 - dojrzałość fizjologiczna, widoczne czarne punkty u podstawy ziarniaka zawierają około 60% suchej

masy (BBCH 87), termin 8 - dojrzałość pełna, ziarniaki twarde i błyszczące zawierają około 65% suchej masy (BBCH 89).

Stopień porażenia kolb kukurydzy przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, oceniano w skali 9-stopniowej (Borowiecki, 1989) (tabela 2), gdzie 1 oznacza genotypy najbardziej podatne, a 9 – odporne na porażenie. Skala ta stosowana jest również przez COBORU. Wskaźnik porażenia kolb przez *Fusarium* spp. obliczono wg wzoru Townsenda-Heubergera (Puntener, 1981). Uzyskane wyniki przeliczano na stopnie kątowe Bliss'a i w tej postaci poddano analizie statystycznej. Ponadto w fazie dojrzałości woskowej (BBCH 85) określono procent roślin z widocznymi oznakami żerowania gąsienic omacnicy prosowianki (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) na kolbach kukurydzy. Dla genotypów referencyjnych oceniano stopień porażania w warunkach polowych. Obserwacje prowadzono trzykrotnie.

Tabela 2. Interpretacja skali służącej do oceny zasiedlenia kolb przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

stopień	Opis
1	czyste kłosy, bez grzybni
3	pojedyncze kolonie grzybów na kłosie
5	50% kłosa skolonizowanego przez grzybnię
7	75% kłosa skolonizowanego przez grzybnię
9	całe kłosy skolonizowane przez grzybnię



Fot. 3. Kolby kukurydzy zebrane z poletek doświadczalnych w Hodowli Roślin w Smolicach, o różnym stopniu porażenia przez *Fusarium* spp. Patrząc od lewej: kolba 1 – stopień porażenia 7, kolba 2 – stopień porażenia 5, kolba 3 – stopień porażenia 3 (fot. Sobiech, Tomkowiak)



Fot. 4. Kolba kukurydzy przed zbiorem na poletku doświadczalnym w Hodowli Roślin w Smolicach z widocznymi objawami fuzariozy (fot. z archiwum HR Smolice)

6.2.3 Ocena przynależności gatunkowej grzyba

W sezonie wegetacyjnym z roślin kukurydzy z objawami fuzariozy kolb były pobierane porażone ziarniaki, w celu dokonania izolacji patogenów powodujących objawy chorobowe. Zainfekowane ziarniaki były umieszczane na 1 minutę w 2% podchlorynie sodu, w celu dezynfekcji powierzchniowej tkanek. Następnie zostały wyłożone na pożywkę PDA (pożywka agarowo glukozowo-ziemniaczana). Po siedmiu dniach wyrosłe kultury zostały przeszczepiono na nowe podłoże. Po wstępnej selekcji uzyskanych kultur, pod względem przynależności do rodzaju *Fusarium* spp. prowadzono hodowlę na pożywce SNA (ang. *Sabouraud Dextrose Agar*), a następnie oceniano przynależności gatunkową metodą mikroskopową z wykorzystaniem powszechnie stosowanych kluczy (Booth, 1971; Nelson i in., 1983; Kwaśna i in., 1991). W kolejnym kroku przygotowano materiał do izolacji DNA. Po wyizolowaniu DNA metodą Doyle'a i Doyle'a (1987) prowadzono PCR w celu weryfikacji przynależności gatunkowej pozyskanych izolatów grzybów rodzaju *Fusarium* spp. Reakcję PCR prowadzono przy zachowaniu następujących parametrów: wstępna denaturacja, 95°C przez 5 min; denaturacja, 94°C przez 30 s; przyłączanie starterów, 55°C przez 70 s; wydłużanie nici, 72°C przez 35 s – powtarzano 35 razy; wydłużanie nici końcowe, 72°C przez 10 min. Amplifikacji poddano jądrowe regiony rybosomalne – ITS (ang. *Internal Transcribed Spacer*), które charakteryzują się dużą zmiennością międzygatunkową i niewielką wewnątrzgatunkową. Fragmenty te wykorzystywane są w ustalaniu taksonomii grzybów. Analiza dotyczyła fragmentów rDNA ograniczonych przez fragmenty DNA komplementarne do starterów ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') i ITS4 (5'

TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White i in., 1990) oraz fragmentów genu *tefl* (kodującej elongacyjny czynnik transkrypcyjny) (O'Donnell i in., 1998) i *β-tub* (kodującej *β-tubulinę*). Uzyskane fragmenty DNA zostały poddane sekwencjonowaniu. W celu identyfikacji sekwencji zastosowano program BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) oraz FUSARIUMID v. 1.0, publicznie dostępną bazę danych DNA czynnika elongacji częściowej translacji *1-alfa* (TEF). Po reakcji PCR, DNA oczyszczono przy pomocy zestawu Clean-up concentrator (A&A Biotechnology) i przesłano do firmy Macrogen Europe (Holandia) celem wykonania sekwencjonowania uzyskanego fragmentu DNA. Uzyskane izolaty wykorzystano do inokulacji.

6.2.4 Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z potencjalnymi genami odporności na *Fusarium* spp.

6.2.4.1 Izolacja genomowego DNA z liści kukurydzy

Izolacja DNA z 560 genotypów kukurydzy, które zostały przekazane do sekwencjonowania nowej generacji oraz genotypów referencyjnych była prowadzona przy użyciu zestawu odczynników z firmy Wizard® Genomic DNA Purification Kit z firmy Promega. Izolacja DNA z genotypów odpornych i podatnych na fuzarium (przedstawionych w publikacji 2) prowadzona była przy użyciu zestawu do izolacji z firmy A&A Biotechnology.

Materiał był izolowany z 10-dniowych siewek kukurydzy. Obie izolacje były prowadzone zgodnie z metodyką dołączoną do zestawów. Stężenie oraz czystość wyizolowanych prób DNA była określana przy użyciu spektrofotometru DS-11 firmy DeNovix. Wyizolowana matryca DNA została doprowadzona do jednakowego stężenia wynoszącego 50 ng/μL poprzez rozcieńczenie wodą destylowaną w przypadku genotypów referencyjnych. Natomiast genotypy wykorzystane do sekwencjonowania zostały rozcieńczone wodą wolną od RNaz do 100 ng/μL i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu sekwencjonowania.

6.2.4.2 Genotypowanie oraz identyfikacja markerów SilicoDArT i SNP

Genotypowanie wykonane zostało z wykorzystaniem technologii DArTseq, opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Wyizolowane DNA badanych roślin kukurydzy w ilości 25 μl o stężeniu 100 ng/μl z każdego genotypu, zostało wysłane na 96-dołkowych płytkach Eppendorf do analiz, których celem była identyfikacja polimorfizmów typu silicoDArT

i SNP. Analizy zostały wykonane w Diversity Arrays Technology, University of Canberra w Australii.

Kolejnym etapem, po wyizolowaniu DNA, było trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi *PstI*, *NspI* w celu redukcji złożoności genomu. Wykorzystanie enzymów restrykcyjnych do kontrolowanej redukcji złożoności genomu w połączeniu z NGS po raz pierwszy opisał Baird i in. (2008). W oryginalnej metodzie GBS stosowano jeden enzym APE KI (Elshire i in., 2011). Następnie metoda została rozszerzona o dwa enzymy: jeden rzadko tnący *PstI* w połączeniu z drugim często tnącym genomowy DNA *NspI* (Poland, Rife, 2012). Zastosowanie takiej wersji pozwala na tworzenie jednorodnej biblioteki genomowej oraz umożliwia wykrycie większości fragmentów powiązanych z enzymem rzadko tnącym. Stosowane enzymy restrykcyjne są wrażliwe na metylację, dzięki temu możliwe jest odfiltrowanie obszarów niekodujących oraz metylowanych sekwencji powtarzalnych.

Następnie fragmenty genomowego DNA „pocięte” przez enzymy restrykcyjne poddawane były ligacji z adaptorami, zgodnie z Kilian i in. (2012).

Fragmenty rozpoznawane przez enzymy *PstI* i *NspI* były amplifikowane w PCR przy użyciu następujących warunków reakcji: denaturacja 1 min w 94°C, a następnie 30 cykli 94°C przez 20 s, 58°C przez 30 s i 72°C przez 45 s oraz końcowe wydłużanie 72°C przez 7 min. Po reakcji PCR równomolowe ilości produktów amplifikacji z każdej próbki z 96-dołkowej płytki zostały zagęszczone i naniesione na mostek PCR c-Bot (Illumina), a następnie sekwencjonowane na urządzeniu Illumina Hiseq2500. Sekwencjonowanie (pojedynczy odczyt) prowadzono przez 77 cykli.

Sekwencje wygenerowane z każdego odczytu były przetwarzane przy użyciu własnych potoków analitycznych DArT. W podstawowym protokole pliki fastq były najpierw przetwarzane w celu odfiltrowania sekwencji o niskiej jakości, stosując bardziej rygorystyczne kryteria selekcji do rozpoznanego regionu w porównaniu z resztą sekwencji (Poland, Rife, 2012). Uzyskane produkty po PCR były analizowane pod względem rozmiaru i stanowiły bibliotekę genomową, która była następnie sekwencjonowana za pomocą platformy do NGS-Illuminy wg metodyki opisanej szczegółowo na stronie firmy Diversity Arrays Technology. Około 2500000 (+/-7%) sekwencji na pojedynczą próbkę wykorzystano do wyłonienia markera. Na koniec identyczne sekwencje zostały podzielone na „pliki fastqcall”. Pliki te zostały wykorzystane w protokole wtórnym dla autorskich algorytmów typowania SNP i SilicoDArT (obecność/nieobecność fragmentów restrykcyjnych w reprezentacji) (DArTsoft14).

Do analizy asocjacji wybrano tylko sekwencje DArT spełniające następujące kryteria: jeden SilicoDArT i/lub SNP w obrębie danej sekwencji (69 nt), częstotliwość występowania alleli (ang. *minor allele frequency*, MAF) > 0,25 i częstość obserwacji brakujących <10% (<https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/>).

6.2.4.3 Mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem analizy GWAS

Stosując analizy GWAS przeprowadzono mapowanie asocjacyjne mające na celu powiązanie obserwacji dotyczących stopnia porażenia kolb przez fuzarium 560 genotypów kukurydzy *Zea mays* L. (w skład których wchodziło 252 linii wsobnych i 308 mieszańców pokolenia F₁) z markerami molekularnymi SNP i silicoDArT otrzymanymi z analizy DArTseq.

Na podstawie wykonanej analizy GWAS do dalszych badań wybrano te markery silicoDArT i SNP, które charakteryzowały się największym poziomem istotności, czyli te, które były najsilniej związane z odpornością kukurydzy na fuzariozę kolb. Jako poziom istotności ustalono $\alpha=0,001$, z poprawką na wielokrotne testowanie metodą Benjamini-Hochberg.

Markery silicoDArT są dominujące, ponieważ reprezentują obecność lub brak fragmentu enzymu restrykcyjnego w reprezentacjach genomowych podzbioru linii w analizie. Markery te są wyodrębniane przez oprogramowanie DArTsoft14. Markerom, które były obecne w reprezentacji, przypisano wartość 1, a tym, które były nieobecne, przypisano odpowiednio wartość 0. Markery te wykorzystano również do oszacowania podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi genotypami kukurydzy.

6.2.4.4 Mapowanie fizyczne

W celu znalezienia sekwencji o wysokiej homologii względem wybranych sekwencji markerów silicoDArT i SNP przeszukano bazy danych. Do tego celu wykorzystano narzędzie bioinformatyczne BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST jest jednym z najczęściej używanych programów tego typu ze względu na zastosowanie mechanizmu heurystycznego, nie porównuje całych sekwencji tylko krótsze fragmenty obu sekwencji.

Do wykonania analiz wykorzystano URGI (fr. *Unité de Recherche Génomique Info*) z kompletnie zsekwencjonowanym genomem kukurydzy. Wskazano położenie wyszukanych sekwencji na chromosomach, i wyznaczono ich lokalizację fizyczną.

6.2.5 Wykorzystanie zidentyfikowanych polimorfizmów silicoDArT i SNP do różnicowania genotypów referencyjnych podatnych i odpornych na fuzarium

6.2.5.1 Projektowanie starterów w celu zidentyfikowania istotnych polimorfizmów silicoDArT i SNP związanych z odpornością na fuzarium

Do projektowania starterów został wykorzystany popularny program Primer3Plus. W programie tym, można w dowolnym formacie podać, sekwencje, dla której mają być zaprojektowane startery, wyznaczyć określone wartości dotyczące długości, temperatury topnienia, %GC (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

6.2.5.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy

Identyfikacja nowych markerów sprzężonych z genami związanymi z odpornością roślin kukurydzy na fuzarium została przeprowadzona z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). PCR został przeprowadzony w termocyklerze T1000 firmy BIO-RAD. Profil reakcji był następujący: denaturacja wstępna, 94°C przez 2 min; denaturacja, 95°C przez 1 min; przyłączanie startera, T_m (indywidualna dla każdej pary starterów) przez 50 s; wydłużanie nici DNA, 72°C przez 1 min – powtórzone 39 razy; wydłużanie końcowe nici DNA, 72°C przez 5 min; schłodzenie do 4°C. Temperatury dla poszczególnych markerów podano w tabeli 3.

W celu przygotowania mieszaniny wykorzystano odczynniki z firmy Promega. Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej pary starterów oraz multiplex PCR przedstawiono w tabeli 3.

6.2.5.3 Elektroforeza

Elektroforeza produktów reakcji PCR była prowadzona w 1,5% żelu agarozowym, z dodatkiem 1 µl roztworu Midori Green, przez 2 h pod napięciem 100-120 V. W celu określenia wielkości mas molekularnych otrzymanych produktów PCR użyty został wzorzec O'RangeRuler 100 pz firmy Fermentas. Wizualizację rozdzielonych fragmentów DNA przeprowadzono z wykorzystaniem promieni UV przy użyciu transiluminatora firmy Bio-Rad i zarchiwizowano na zdjęciach cyfrowych z zastosowaniem systemu do wizualizacji i dokumentacji żeli – Image Lab.

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla pojedynczej reakcji i reakcji multiplex

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Wartości na jedną reakcję	Ilość na jedną próbkę (20 j) [μ l]	Ilość na multiplex (20 j) [μ l]
Bufor (5x Green Go Taq, Flexi Buffer)	1X	4	4
25mM MgCl ₂	1,5 mM	1,6	1,6
Starter F	0,3 μ M	0,5	0,5
Starter F II			0,5
Starter R	0,3 μ M	0,5	0,5
Starter R II			0,5
10mM dNTPs Mix	Mix 0,1 mM	0,32	0,32
Polimeraza DNA (Go Taq G2 Flexi)	0,05 U/ μ L	0,17	0,17
Woda bez nukleaz	-	11,91	10,91
DNA	0,05 μ g to 1 μ g	1	1

6.2.6 Analiza ekspresji wybranych genów kandydujących sprzężonych z istotnymi markerami silicoDArT i SNP oraz genów referencyjnych

6.2.6.1 Inokulacja wybranych genotypów odpornych i genotypu podatnego

Doświadczenie przeprowadzono w komorze wegetacyjnej w kontrolowanych warunkach: temperatura została ustawiona na 22°C w ciągu dnia i 18°C w nocy z 16-godzinnym fotoperiodem, wilgotność względna wynosiła od 60 do 70%. Ponadto, widmo emisji źródła światła zostało ustalone ze strumieniem fotonów 572 μ E. Do doniczek o średnicy 16 cm z glebą, z pola uprawnego wysiano po cztery ziarniaki kukurydzy, w czterech powtórzeniach. Glebę przez okres wzrostu utrzymywano w wilgotności około 70% pojemności polowej. W fazie 4-5 liści kukurydzy dokonano sztucznej infekcji roślin kukurydzy zawiesiną zarodników oraz grzybni kilku izolatów grzybów rodzaju *Fusarium* (*Fusarium graminearum* izolaty Fg/D, *Fusarium boothii* izolat F0410/7, 20K, *Fusarium pseudograminearum* izolaty: F2811, 1428/12b, *Fusarium subglutinans* ZK4). Zarodniki do

przygotowania izolatów pozyskano z zainfekowanych ziarniaków roślin kukurydzy pochodzących z poletek należących do HR Smolice i Małopolskiej HR. Inokulację przeprowadzono poprzez rozpylanie zawiesiny konidiów w stężeniu około $5 \cdot 10^5$ zarodników/ml. Zawiesina inokulum była równomolową mieszaniną czterech szczepów grzybów zawieszonych w wodzie z 1% odczynnikiem v/v Tween 20, przygotowaną bezpośrednio przed inokulacją. Fragmenty tkanek liści pobierano w pięciu punktach czasowych: 0 (przed inokulacją), 6, 12, 24 i 72 godzin po inokulacji (hpi) (ang. *hours post inoculation*) w trzech powtórzeniach biologicznych. Pobrane liście umieszczono w probówkach typu eppendorf i natychmiast zamrożono w ciekłym azocie. Zebrane fragmenty liści były przechowywane w kriozamrażarce (-80°C), do momentu rozpoczęcia izolacji RNA.

6.2.6.2 Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji

Izolację całkowitego RNA z różnych próbek tkanek liści zebranych w trzech powtórzeniach biologicznych i punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 72 hpi) przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji Maxwell RSC Plant RNA Kit (Promega, Madison, U.S.A.). Stężenie i czystość wyizolowanego całkowitego RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop w zakresie absorbancji A260/A280. Syntezę cDNA przeprowadzono z wykorzystaniem 1 µg RNA, przy użyciu zestawu iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.), zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Profil temperaturowy reakcji syntezy cDNA był następujący: inkubacja wstępna w 25°C przez 5 minut, odwrotna transkrypcja w 46°C przez 60 minut, inaktywacja odwrotnej transkryptazy w 95°C przez 1 minutę, schłodzenie do 4°C i przechowywanie w 20°C.

6.2.6.3 Charakterystyka wybranych genów kandydujących i genów referencyjnych

W tabeli 4 przedstawiono charakterystykę wybranych genów kandydujących i genów referencyjnych. Wyniki ekspresji badanych genów należy odnieść do wartości ekspresji genów referencyjnych (ang. *housekeeping genes*). Geny referencyjne charakteryzują się stabilnym profilem ekspresji, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie znormalizowanych wartości ekspresji badanych genów. Na podstawie danych literaturowych wybrano cztery geny referencyjne dla stabilnej ekspresji: *Actin2*, *Elongation factor 1/α-EC1α*, *β-tubulina*, *cyklofina* (Lin i in., 2014, Srdić, J i in., 2011).

Geny te były testowane za pomocą reakcji PCR, z wykorzystaniem otrzymanego cDNA jako matrycy (wizolowanego z roślin po inokulacji patogenem). W celu

wyselekcjonowania genów referencyjnych wykonano reakcję PCR w gradiencie temperaturowym, z wykorzystaniem otrzymanego cDNA jako matrycy. Dla czterech testowanych genów referencyjnych wykorzystywano sekwencje starterów, uzyskane z doniesień literaturowych. Startery dla analizowanych genów zaprojektowano samodzielnie i również poddano testom w gradiencie temperaturowym, który ustawiono w zakresie od 52°C do 64°C. Następnie przeprowadzono elektroforezę w 2% żelu agarozowym, z dodatkiem 1 µl roztworu Midori Green. Elektroforeza prowadzona była przez 1 h pod napięciem 100-120 V. Wyniki elektroforezy zostały sfotografowane w świetle UV z wykorzystaniem systemu Molecular Imager GelDoc XR UV (Bio-Rad). Na podstawie uzyskanych zdjęć elektroforetycznych wybrano te geny referencyjne, w przypadku których zaobserwowano pożądaną długość produkt amplifikacji, zgodną z danymi literaturowymi. Na tym etapie uzyskano niespecyficzne produkty dla genu *Actin2*, w związku z tym zrezygnowano z wykorzystania go jako genu referencyjnego. Wykorzystując reakcję RT-qPCR dla pozostałych genów opracowano krzywe wzorcowe stosując takie samo podejście jak dla badanych genów. Po analizie krzywych wzorcowych, dwa geny: *β-tubulina* oraz *cyklofina* o najwyższych wartościach wydajności reakcji (%E) i współczynnika determinacji ($R^2 > 0,999$ dla *β-tubuliny* i $R^2 > 0,998$ dla *cyklofiny*), zostały wybrane jako geny referencyjne dla RT-qPCR.

Zastosowany gradient temperaturowy umożliwił ustalenie 60°C jako optymalnej temperatury przyłączania starterów podczas reakcji RT-qPCR dla wszystkich analizowanych genów.

Sekwencje starterów dla wybranych genów referencyjnych oraz ich wydajność (%E), R^2 i temperaturę przyłączania startera (T_m) przedstawiono w tabeli 4. Wyniki analizy genów referencyjnych porównywano z ekspresją genów kandydujących dzięki użyciu narzędzia Gene Study (CFXMaestro firmy Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, U.S.A.)

Tabela 4.Charakterystyka wybranych genów kandydujących i genów referencyjnych

Oznaczenie genu	Produkt/funkcja genu	Numer dostępu	Symbol genu	Sekwencje starterów (5'-3') forward revers		Wielkość produktu mRNA (pz)	Długość produktu z intronem	Wydajność (%E)	R ²	Tm (°C)
F1	<i>gen esterazy/li paży GDSL At4g01130 niescharakteryzowane białko prekursorowe</i>	NM_001148347.1	LOC100273960	AAAGCGT CAAGCGA AGCCTA	GAACACC ATGAAGC TGCGAG	98	224	123,9	0,998	60
F2	<i>hydroksycynamlotransferaza putrescyny</i>	XM_008673542.3	LOC103649226	GTGGAGG TGGTGCA GGTG	CGAGGAA GTCGCTG GTGG	109	-	120,8	0,998	60
F3	<i>nieskchraakteryzowane białko</i>	NM_001195961.1	LOC100501166	GTGCGCT TGTCGTA CTTCTTG	ACTACAT AGGTAGG AGGAGCT CTA	105	207	93,8	0,998	60
F4	<i>gen prekursora peroksydazy 72</i>	NM_001155037.2	LOC100282124	ATTGTGC AGTCCAT TGTGGC	GTTGTCC AACAGCA CCGAAG	123	755	103,8	0,999	60
CYT	<i>Cyclofilina</i>	M55021/ Zm00001e b312970 (umc2057)	LOC MZECYP	CTACCTC ACGGCAT CTGCTAT GT	AACACGA ATCAAGC AGAG	139	-	85,7	0,998	60
β-TUB	<i>β-tubulina</i>	NP_001112117	LOC1920235	CTGAGTG GTGGTCT TAGT	GTCACAC ACACTCG ACTTCAC G	100	-	111,5	0,999	60
ACT	<i>Aktyna2</i>			CTGAGGT TCTATTC CAGCCAT CC	CCACCAC TGAGGAC AACATTA GC	133	-	-	-	-
El	<i>Czynnik elongacyjny I/α - EC1α</i>			TGGGCCT ACTGGTC TTACTAC TGA	ACATACC CACGCTT CAGATCC T	135	-	73,4	0,887	60

6.2.6.4 Reakcja RT-qPCR

Analizy RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu odczynnika iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) i termocyklera CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.). Zgodnie z zaleceniami MIQE dotyczącymi prawidłowości analiz PCR w czasie rzeczywistym, zastosowano trzy powtórzenia biologiczne dla każdego genu, w każdym z punktów czasowych dla każdej badanej próby. Ponadto przygotowano trzy powtórzenia techniczne dla każdego z nich. Otrzymane wyniki zostały uśrednione. Dodatkowo, dla każdego badanego genu przeprowadzono również kontrolę negatywną bez matrycy cDNA – NTC (ang. *No Template Control*), każdorazowo w trzech powtórzeniach technicznych, podobnie jak dla genów badanych. Skład mieszaniny reakcyjnej RT-qPCR był następujący: iTaq supermix – 5 μ L, startery „forward” i „reverse” (10 μ M) – 0,5 μ L każdy, 3 μ L wody wolnej od nukleaz i matryca cDNA – 1 μ L. W reakcjach RT-qPCR zastosowano profil temperaturowy: denaturacja wstępna przez 3 minuty w temperaturze 95°C; następnie 40 cykli: denaturacja przez 10 sekund w temperaturze 95°C, przyłączanie starterów przez 30 sekund w temperaturze 60°C, etap topnienia (krzywa topnienia): zakres temperatur od 65°C do 90°C; co 5 sekund temperaturę zwiększano o 0,5°C.

6.2.6.5 Opracowanie krzywych standardowych

W kolejnym kroku opracowano krzywe standardowe dla wszystkich genów badanych i referencyjnych. Po ustaleniu warunków reakcji wykonano reakcję PCR pięciokrotnie, w objętości 20 μ L każda, aby uzyskać objętość 100 μ L dla każdego z docelowych amplikonów. Profil temperaturowy amplifikacji był tożsamy z profilem reakcji RT-qPCR. Następnie oczyszczono indywidualnie uzyskane amplikony za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Stężenie oczyszczonych produktów PCR zmierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). W celu wykonania krzywych wzorcowych przygotowano serię rozcieńczeń dla każdego analizowanego genu. Dla każdego genu przygotowano serię rozcieńczeń w stężeniach od 1 do 10^{-10} uzyskanych amplikonów. Wykonano sześć powtórzeń dla każdego stężenia przy użyciu iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Rozcieńczenia dla każdego z badanych genów nanoszono na płytkę 96-dołkową i przeprowadzano reakcje RT-qPCR. Podczas wykonywania krzywych standardowych zastosowano tożsamy skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowy, wykorzystany podczas analizy ekspresji genów metodą RT-qPCR. Uzyskaną wydajność reakcji (%E) oraz współczynnik determinacji (R^2) dla wszystkich krzywych standardowych zestawiono w tabeli 4.

6.2.6.6 Analizy transkryptomiczne wytypowanych genów kandydujących

Na podstawie numerów LOC badanych genów w bazie internetowej National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wyszukano numer akcesyjne dostępne w publikacji Walley i in. (2016) w celu określenia w jakich narządach i tkankach roślin badane geny ulegają największej ekspresji. Poziom ekspresji zidentyfikowanych genów, mierzony jako fragmenty na kilobazę transkryptu na milion zmapowanych odczytów (FPKM), w różnych narządach i tkankach *Z. mays* określono na podstawie danych transkryptomicznych.

6.2.7 Analiza statystyczna

Zgodność rozkładu empirycznego stopnia porażenia linii kukurydzy przez *F. verticillioides* z rozkładem normalnym sprawdzano za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka (publikacja 2). Jednorodność wariancji przetestowano za pomocą testu Bartletta. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) w celu określenia wpływu linii na zmienność stopnia porażenia przez *F. verticillioides* (publikacje 1, 2 i 4). Podobieństwo genetyczne dla wszystkich par badanych genotypów obliczono na podstawie współczynnika zaproponowanego przez Nei i Li (1979) (publikacje 1, 2 i 4). Uzyskane współczynniki podobieństwa genetycznego posłużyły do hierarchicznego grupowania linii metodą nieważonych grup par średnich arytmetycznych (UPGMA) (Starzycka-Korbas i in. 2021). Wyniki grupowania genotypów przedstawiono w postaci dendrogramów. Wyniki analizowano również przy użyciu metod wielowymiarowych. Analiza składowych głównych (ang. *principal component analysis*, PCA) została zastosowana w celu przedstawienia wielomarkerowej oceny podobieństwa badanych linii (publikacja 2). Związek między markerami molekularnymi, a stopniem porażenia przez *F. verticillioides* oszacowano za pomocą analizy regresji (Bocianowski i in. 2011).

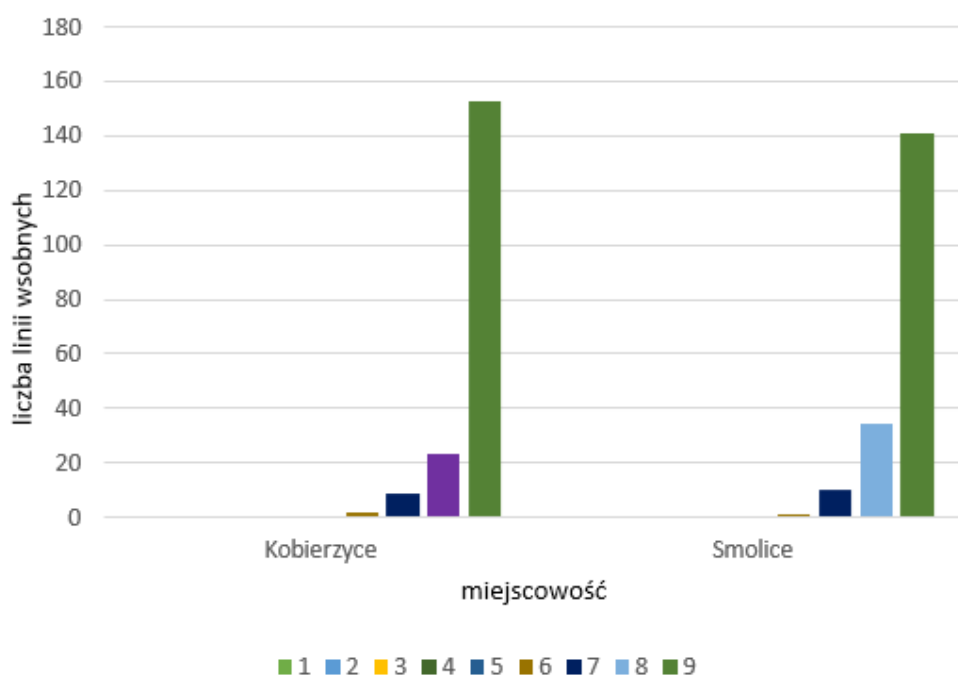
Test Kołmogorowa-Smirnowa został zastosowany do testowania hipotezy zerowej, zakładającej, że empiryczny rozkład znormalizowanych danych ekspresji dla określonego genu i linii był zgodny z rozkładem normalnym (wyniki niepublikowane). Test ten został zastosowany do wszystkich kombinacji gen $\times$ genotyp. Do oceny jednorodności wariancji zastosowano wariant Brown-Forsythe'a testu Levene'a (znany dla wszystkich badanych kombinacji punkt czasowy $\times$ gen $\times$ genotyp). Przeprowadzono dwuczynnikowe analizy wariancji (ANOVA) w celu określenia wpływu genu i punktu czasowego, jak również interakcji gen $\times$ punkt czasowy na zmienność poszczególnych profili ekspresji analizowanych genów kandydujących oraz dwóch genów referencyjnych: CYT i β -TUB. Współzależność

między ekspresją genów oceniono za pomocą współczynników korelacji liniowej Pearsona. Dla porównania średnich wykonano test *t*-Studenta dla dwóch prób. Ekspresję analizowanych genów kandydujących przedstawiono w postaci map ciepła. Do wizualizacji wyników ekspresji genów przeprowadzono analizę skupień (metoda UPGMA) z odległościami euklidesowymi. Dane analizowano również wielowymiarowo: przeprowadzono analizę zmiennych kanonicznych (Bocianowski i in., 2022) i obliczono odległości Mahalanobisa (Mahalanobis, 1936; Bocianowski, Majchrzak, 2019; Warzecha i in., 2023). Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone korzystając z pakietu GenStat 18.2 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, Anglia, Wielka Brytania).

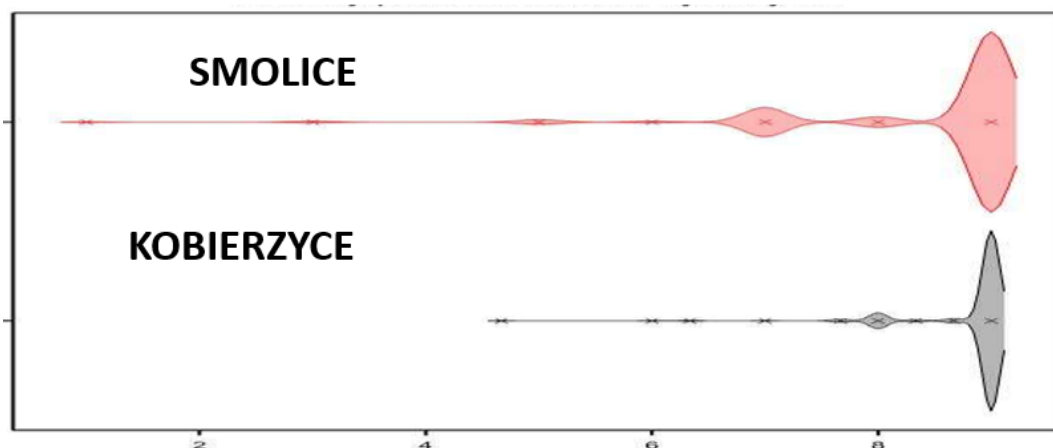
7. Wyniki

7.1 Obserwacje polowe stopnia porażenia kukurydzy przez fuzarium

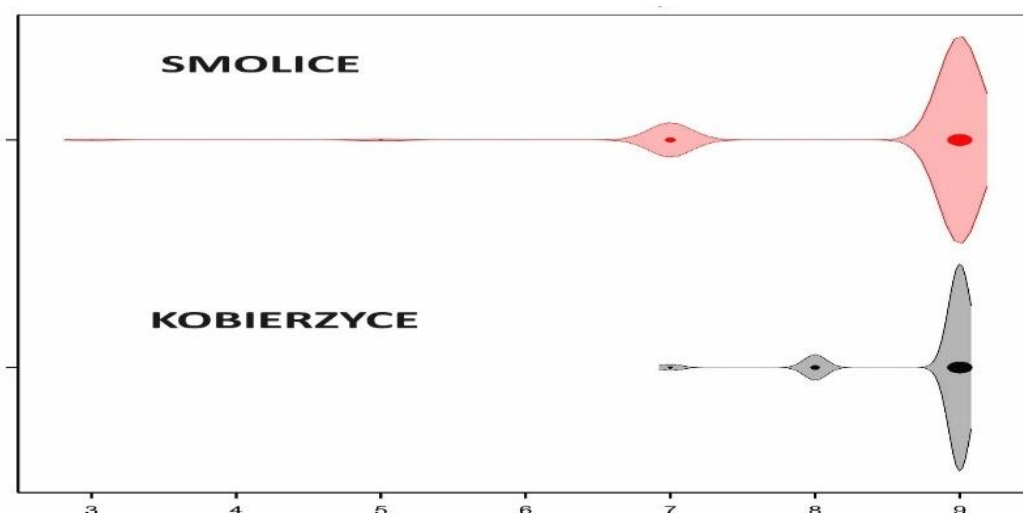
Stopień porażenia roślin przez *Fusarium* spp. różnił się pomiędzy miejscowościami Smolice i Kobierzycy. W obu miejscowościach nie zaobserwowano porażenia na poziomach 1-6. Stopień porażenia dla 186 linii wsobnych (matecznych) został przedstawiony w publikacji 1 (rycina 4). W tym doświadczeniu najwięcej linii wsobnych, w obu miejscowościach, charakteryzowało się odpornością na poziomie 9. Stopień porażenia pozostałych 64 linii matecznych, dwóch linii ojcowskich i 122 mieszańców F₁ przedstawiono w publikacji 4. W tym doświadczeniu, w Smolicach większość roślin była porażona przez fuzarium w zakresie od 6,5 do 9, natomiast w Kobierzycach od 8 do 9 (rycina 5). Dla pozostałych 186 mieszańców: w Smolicach najwięcej genotypów charakteryzowało się odpornością na poziomie 7 i 9, natomiast w Kobierzycach – na poziomie 8 i 9 (rycina 6).



Rycina 4. Wykres stopnia porażenia przez fuzarium dla 186 linii wsobnych dwóch lokalizacjach (kolory oznaczają stopień porażenia)



Rycina 5. Wykres gęstości stopnia porażenia przez fuzarium 64. linii wsobnych i 122. mieszańców F_1



Rycina 6. Wykres gęstości stopnia porażenia przez fuzarium 186. mieszańców F_1

Analiza wariancji 186 linii wsobnych nie wykazała istotnych różnic w średnim stopniu porażenia roślin przez fuzarium pomiędzy liniami w obrębie danej miejscowości (Kobierzyce, Smolice), jak również pomiędzy miejscowościami. Zaobserwowano istotne statystycznie skorelowanie pomiędzy stopniem porażenia roślin przez fuzarium w Smolicach a stopniem porażenia roślin przez fuzarium w Kobierzycach (współczynnik korelacji był równy $r=0,8898$) (publikacja 1).

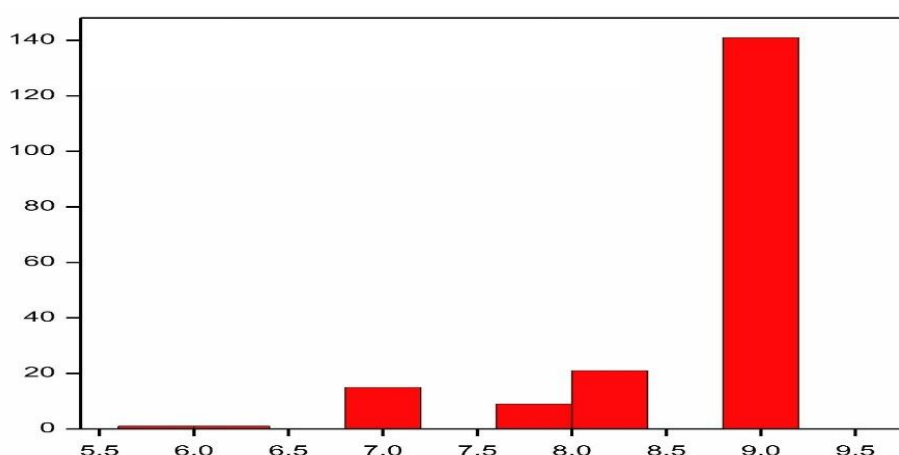
Wyniki analizy wariancji pomiędzy 64 liniami wsobnymi i 122 mieszańcami F_1 pod względem stopnia porażenia przez fuzarium wykazały istotne statystycznie zróżnicowanie stopnia porażenia kukurydzy przez fuzarium (publikacja 4). Wykazano również istotne statystycznie zróżnicowanie tej cechy pomiędzy miejscowościami.

W przypadku danych niepublikowanych dla 186 mieszańców F₁ analiza wariancji wykazała istotne statystycznie zróżnicowanie pomiędzy miejscowościami ze względu na średni stopień porażenia roślin kukurydzy (tabela 5).

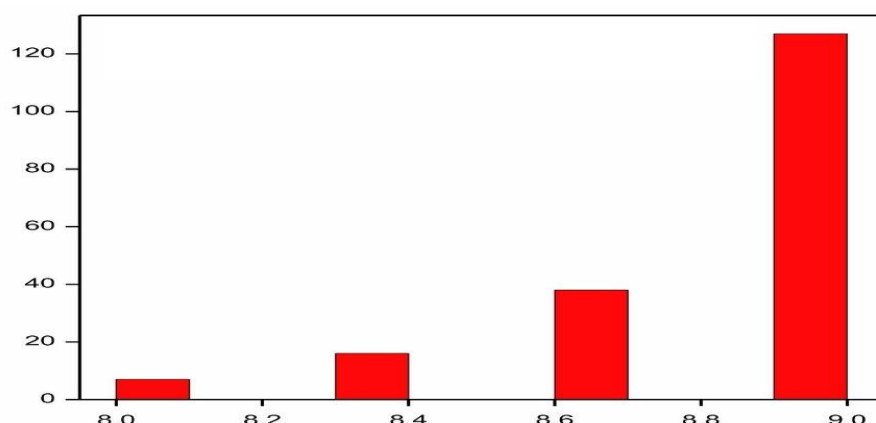
Tabela 5. Średnie kwadraty z analizy wariancji dla stopnia porażenia 186 mieszańców kukurydzy przez fuzarium

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Fusarium kolb
Genotyp	187	0,7423 ***
Lokalizacja	1	8,0009 ***
Genotyp×Lokalizacja	187	0,8066 ***
Reszta	752	0,2757
*** $p < 0,001$		

Na podstawie danych z doświadczeń polowych prowadzonych niezależnie w obu miejscowościach (Smolice i Kobierzyce) sprawdzono rozkład stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium w obrębie badanej populacji. Analizy statystyczne wykazały, że w przypadku tej cechy mamy do czynienia z rozkładem Poissona odwróconym (ryciny 7 i 8).

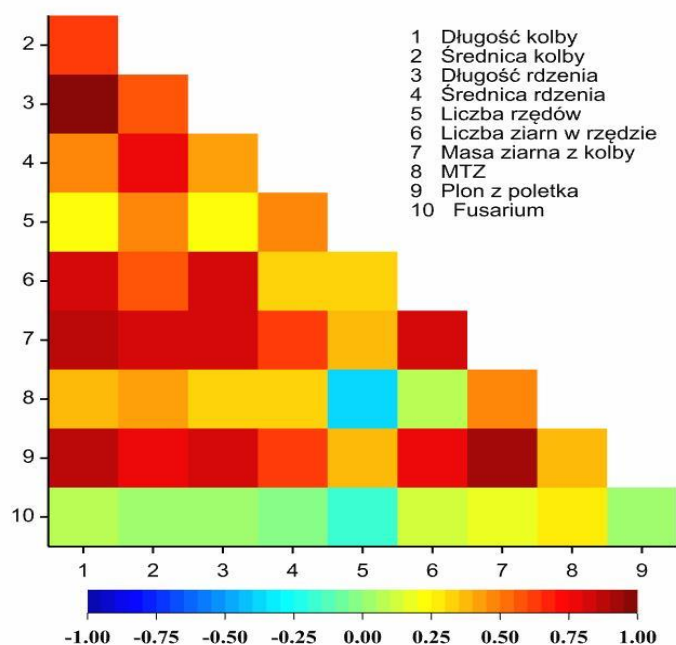


Rycina 7. Rozkład stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium w miejscowości Smolice



Rycina 8. Rozkład stopnia porażenia roślin kukurydzy przez fuzarium w miejscowości Kobierzyce

W przypadku wszystkich mieszańców w obu miejscowościach (Smolice, Kobierzyce) analizowano korelacje pomiędzy stopniem porażenia roślin przez fuzarium, a wartościami cech struktury plonu i plonem z poletka. Wykazano, że w Smolicach stopień porażenia roślin przez fuzarium najsilniej dodatnio skorelowany był z masą ziarna z kolby (rycina 9 i tabela 6). W przypadku Kobierzyc stopień porażenia roślin przez fuzarium najsilniej dodatnio skorelowany był z plonem z poletka a także z masą ziarna z kolby oraz MTZ (rycina 10 i tabela 7).

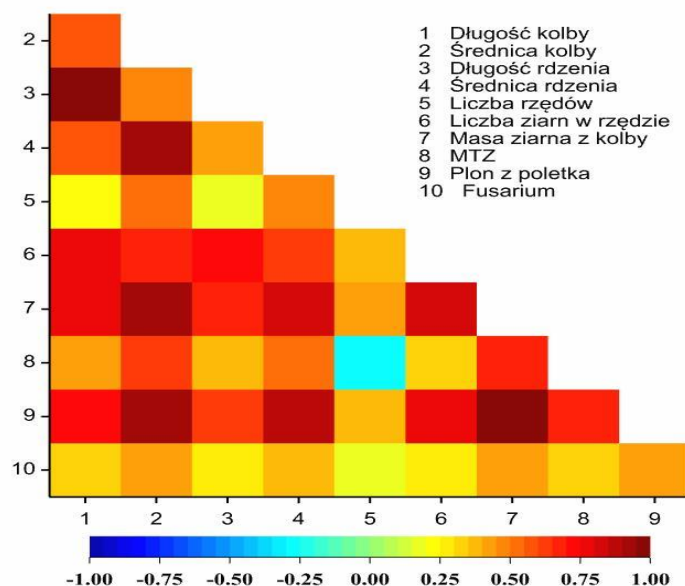


Rycina 9. Mapa ciepła przedstawiająca korelacje pomiędzy stopniem porażenia mieszańców kukurydzy pokolenia F1 przez fuzarium, a cechami struktury plonu w Smolicach

Tabela 6. Korelacje pomiędzy stopniem porażenia mieszańców kukurydzy pokolenia F1 przez fuzarium, a cechami struktury plonu w Smolicach

Cecha	Długość kolby	Średnica kolby	Długość rdzenia	Średnica rdzenia	Liczba rzędów	Liczba ziarn w rzedzie	Masa ziarna z kolby	MTZ	Plon z poletka
Średnica kolby	0,628***								
Długość rdzenia	0,966***	0,553***							
Średnica rdzenia	0,467***	0,770***	0,425***						
Liczba rzędów	0,228**	0,495***	0,221**	0,460***					
Liczba ziarn w rzedzie	0,844***	0,556***	0,817***	0,325***	0,340***				
Masa ziarna z kolby	0,888***	0,828***	0,833***	0,617***	0,381***	0,829***			
MTZ	0,395***	0,439***	0,330***	0,316***	0,356***	0,099	0,474***		
Plon z poletka	0,873***	0,783***	0,836***	0,617***	0,377***	0,757***	0,915***	0,385***	
Fusarium	0,085	0,025	0,028	-0,002	-0,174*	0,104	0,160*	0,251***	0,04

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Rycina 10. Mapa ciepła przedstawiająca korelacje pomiędzy stopniem porażenia mieszańców kukurydzy pokolenia F1 przez fuzarium, a cechami struktury plonu w Kobierzycach

Tabela 7. Korelacje pomiędzy stopniem porażenia mieszańców kukurydzy pokolenia F1 przez fusarium, a cechami struktury plonu w Smolicach

Cecha	Długość kolby	Średnica kolby	Długość rdzenia	Średnica rdzenia	Liczba rzędów	Liczba ziarn w rzędzie	Masa ziarna z kolby	MTZ	Plon z poletka
Średnica kolby	0,592***								
Długość rdzenia	0,977***	0,454***							
Średnica rdzenia	0,562***	0,941***	0,434***						
Liczba rzędów	0,224**	0,501***	0,16*	0,498***					
Liczba ziarn w rzędzie	0,792***	0,67***	0,711***	0,605***	0,387***				
Masa ziarna z kolby	0,774***	0,928***	0,658***	0,849***	0,426***	0,833***			
MTZ	0,443***	0,622***	0,36***	0,548***	0,276***	0,302***	0,654***		
Plon z poletka	0,734***	0,925***	0,606***	0,851***	0,368***	0,799***	0,968***	0,673***	
Fusarium	0,309***	0,426***	0,259***	0,368***	0,163*	0,289***	0,418***	0,337***	0,42***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

7.1.2 Ocena stopnia porażenia materiałów referencyjnych

Wyniki obserwacji przedstawiono w tabeli 8. Genotypy referencyjne, które użyto do analizy ekspresji zostały oznaczone poprzez podkreślenie.

Tabela 8. Stopień porażenia przez *Fusarium* spp. poszczególnych genotypów referencyjnych

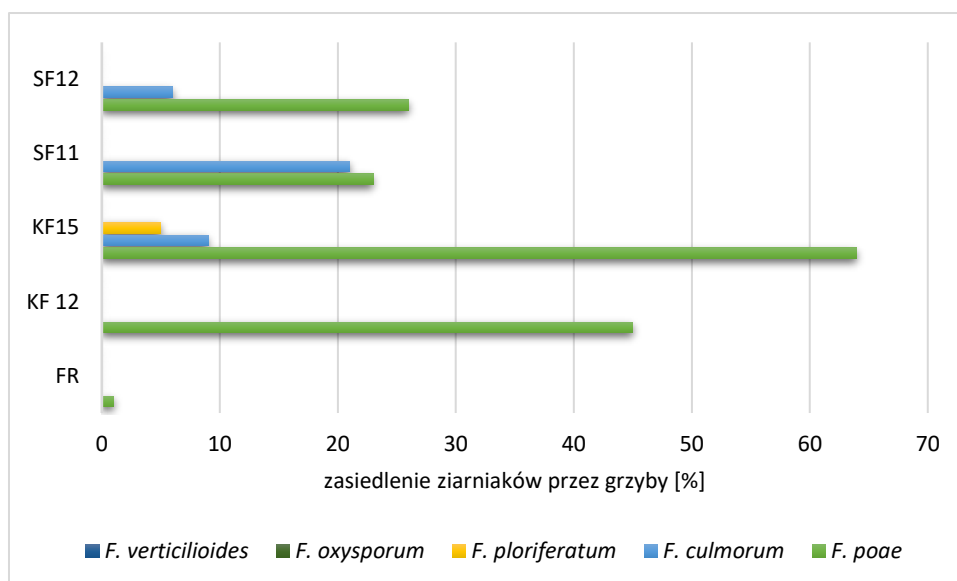
Nazwa genotypu	Obserwacja stopnia porażenia przez fusarium			Źródło
	I powtórzenie	II powtórzenie	III powtórzenie	
253	7	7	8	Publikacja 2
254	4	5	4	
255	9	9	9	
256	5	7	6	
257	5	5	6	
258	7	8	7	
259	7	7	7	
260	9	9	8	
9	9	9	8	
16	7	6	7	
23	6	6	7	
24	6	5	4	
25	9	8	9	
28	9	8	8	
35	8	8	7	
41	8	7	6	
45	7	7	8	
47	8	7	8	
52	9	8	8	
57	5	6	5	
58	6	6	5	
66	8	7	7	

67	4	5	6
68	5	7	4
71	8	8	9
74	8	6	5
78	6	8	6
80	6	6	7
103	8	6	6
114	9	8	9
KF9	9	9	9
KF11	9	9	9
KF12	9	9	9
KF13	9	8	9
KF15	9	9	9
SF9	8	9	9
SF11	9	9	9
SF12	9	9	9
SF13	9	8	9
SF14	9	9	9
K612A	5	5	5
K605A	5	5	5
K620A	5	5	5
KF 02	5	4	5
GSZ	6	4	5
KWS	4	5	4
ESPERANTO			
BRIGADO	4	5	4
FARM	5	5	5
MODENA			
BLASK żeński	6	5	6
BLASK męski	6	6	6

Publikacja 1 i 4

7.2 Ocena przynależności gatunkowej patogenicznego grzyba

Przebadane próbki ziarniaków różnych genotypów kukurydzy różniły się znacznie pod względem zasiedlenia przez grzyby rodzaju *Fusarium*. Najliczniej występowały grzyby *Fusarium poae*. Pojedyncze próbki (SF12, SF11, KF15) były bardzo słabo zasiedlone przez *Fusarium ploriferatum* lub *Fusarium culmorum*. Wyniki obserwacji przedstawiono na rycinie 11.



Rycina 11. Stopień zasiedlenia ziarniaków badanych genotypów kukurydzy przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp., z uwzględnieniem procentowości udziału poszczególnych genotypów patogenu

7.3 Izolacja genomowego DNA z liści kukurydzy

Stężenie DNA pojedynczej próbki mieściło się w przedziale od 107 ng/μl do 950 ng/μl. Czystość poszczególnych próbek była bardzo dobra i mieściła się w zakresie od 1,7 do 2,1 dla absorbancji 260/280 i 260/230 odpowiednio.

7.4 Identyfikacja markerów sprzężonych z potencjalnymi genami odporności na *Fusarium* spp.

7.4.1 Genotypowanie oraz mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem GWAS

Na podstawie analiz sekwencjonowania 252 linii wsobnych i 308 mieszańców F₁ zidentyfikowano łącznie 175 829 markerów molekularnych (114 935 sliCoDArT i 60 894 SNP).

Aby określić przydatność zidentyfikowanych markerów zastosowano MAF>0.25 oraz liczbę obserwacji brakujących <10%. Szczegółowe wyniki analiz statystycznych zawarto w publikacjach 1 i 4 oraz w tabeli 9.

Tabela 9. Markery molekularne SilicoDArT i SNP istotnie związane z odpornością kukurydzy na fuzariozę kolb (istotne powiązania wybrane przy $p < 0,05$ z poprawką na wielokrotne testowanie metodą Benjamini-Hochberg, $LOD > 3,0$)

Lokalizacja		Kobierzyce	Smolice	Razem	
Publikacja 1	Liczba istotnych markerów	silicoDArT	136	185	321
		SNP	1067	1574	2641
		Razem (silico DArT i SNP)	1203	1759	2962
	Efekt mniinmalny	silicoDArT	−1,234	−0,279	
		SNP	−1,469	−0,305	
		Razem (silicoDArT i SNP)	−1,469	−0,305	
	Efekt maksymalny	silico DArT	1,381	0,269	
		SNP	1,574	0,311	
		Razem (silicoDArT i SNP)	1,574	0,311	
	Efekt średni	silcico DArT	0,092	0,039	
		SNP	−0,043	0,008	
		Razem (silicoDArT i SNP)	−0,028	0,011	
Publikacja 4	Liczba istotnych markerów	DArT	4885	390	5275
		SNP	1100	141	1541
		Razem			6516
		(silicoDArT i SNP)	5985	531	
	Efekt mniinmalny	DArT	−0.431	−0.68	
		SNP	−0.425	−0.64	
		Razem			
		(silicoDArT i SNP)	−0.431	−0.68	
	Efekt maxymalny	DArT	0.573	0.67	
		SNP	0.566	0.601	
		Razem			
		(silicoDArT i SNP)	0.573	0.67	
Efekt średni	DArT	0.371	0.009		
	SNP	0.362	−0.041		

Lokalizacja		Kobierzyce	Smolice	Razem
Wyniki niepublikowane	Razem (silicoDArT i SNP)	0.369	-0.005	
	Liczba istotnych markerów	145	1468	1613
	Efekt minimalny	-0,1714	-0,4213	
	Efekt maksymalny	0,174	0,5112	
	Efekt średni	-0,01579	0,190454	

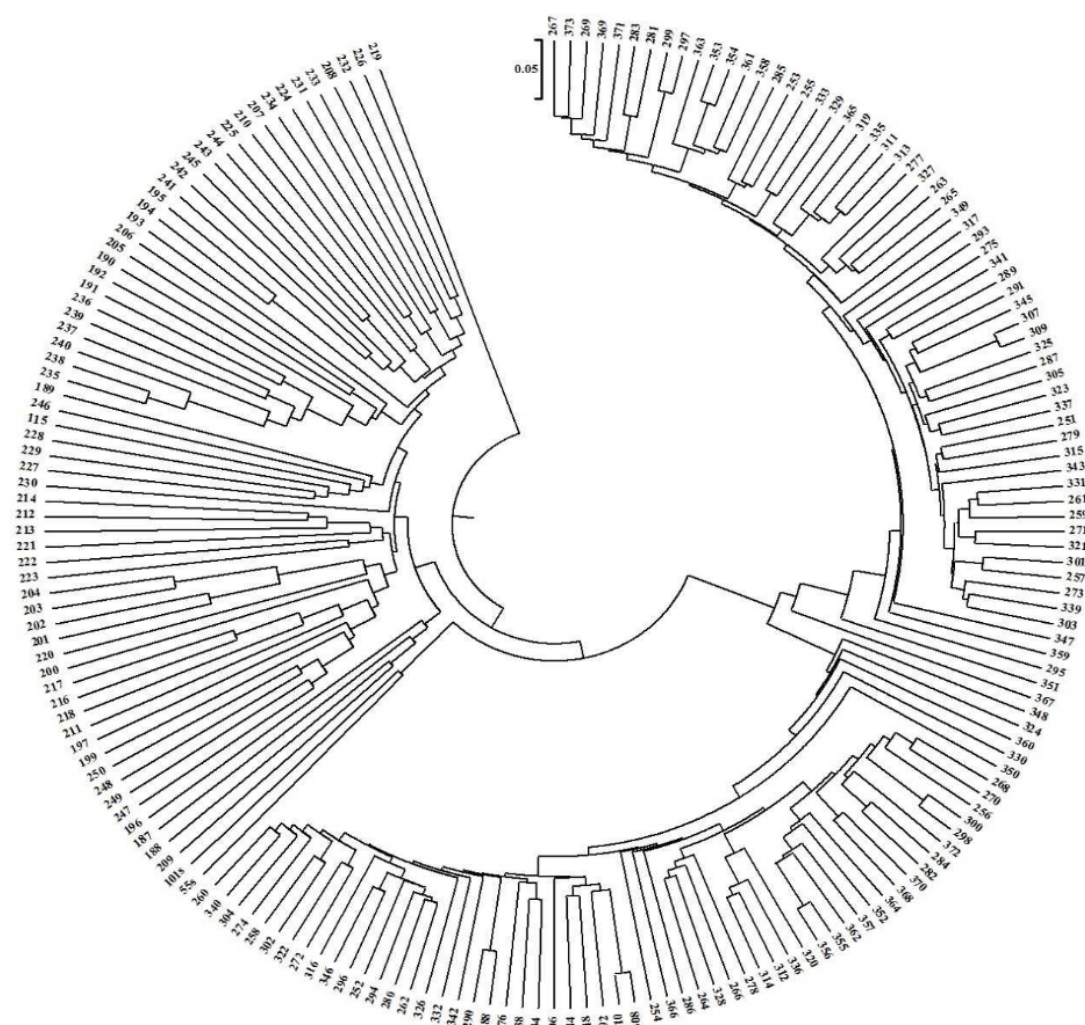
7.4.2 Oszacowanie podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi genotypami, na podstawie zidentyfikowanych markerów SNP i silicoDArT

Na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SNP i silicoDArT obliczono współczynniki podobieństwa genetycznego między 186 analizowanymi liniami wsobnymi i na ich podstawie skonstruowano dendrogram podobieństwa genetycznego (publikacja 1). Wyróżniono cztery grupy główne. W pierwszej grupie znajdują się dwie linie pochodzące z HR Kobierzyce (K037 i K038). Linie te są podobne w 63%. Drugą grupę tworzą również dwie linie (S145 i S132) podobne do siebie w 51% pochodzące z HR Smolice. W trzeciej licznej grupie możemy wyróżnić trzy podgrupy. W pierwszej podgrupie znajduje się 25 linii, w drugiej 23 linie, natomiast w trzeciej 25 linii. We wszystkich tych podgrupach linie pochodzące z HR Smolice stanowią 87,5%, pozostałe 12,5% to linie pochodzące z HR Kobierzyce. Czwartą grupę główną tworzą również trzy podgrupy (łącznie 109 linii). W pierwszej podgrupie dominują genotypy z HR Kobierzyce (65%), natomiast w drugiej i trzeciej z HR Smolice. Analizując dendrogram można zauważyć, że linie grupują się w zależności od przynależności do danej firmy hodowlanej ponadto linie pochodzące z HR Smolice wykazują większe podobieństwo pomiędzy sobą, niż z liniami pochodzącymi z Kobierzyc, i odwrotnie: linie z Kobierzyc są bardziej podobne do siebie niż do linii ze Smolic (rycina 12).



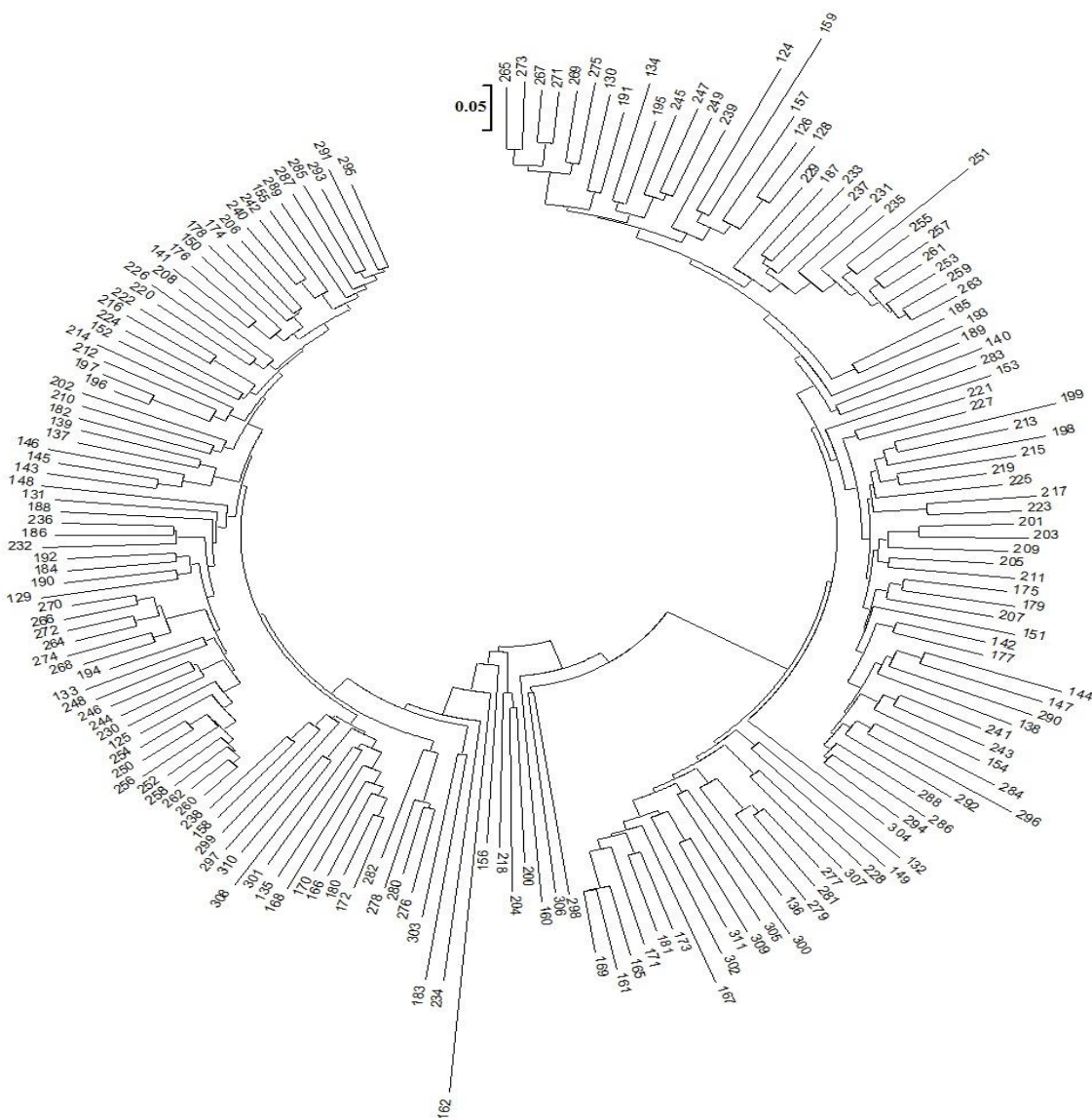
Rycina 12. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi 186 liniami wsobnymi skonstruowany na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP (publikacja 1)

Na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SNP i SilicoDArT sporządzono dendrogram podobieństwa genetycznego między 186 analizowanymi genotypami (64 linie wsobne i 122 mieszańce pokolenia F₁) (publikacja 4). Dendrogram bardzo wyraźnie pokazuje dwie odrębne grupy podobieństwa. Pierwsza grupa obejmuje 65 linii wsobnych z HR Kobierzyce, natomiast druga grupa obejmuje 122 analizowane mieszańce i jedną linię wsobną. Takie idealne pogrupowanie pokazuje przydatność markerów SNP i silicoDArT do grupowania genotypów pod względem podobieństwa genetycznego (rycina 13).



Rycina 13. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi 64 liniami wsobnymi i 122 mieszancami pokolenia F1, wyznaczony na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP (publikacja 4)

W wynikach niepublikowanych dla zidentyfikowanych markerów molekularnych SNP i SilicoDArT wykonano dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy 186 analizowanymi mieszancami. Wyodrębniono dwie grupy podobieństwa. Mieszance, które powstały w wyniku krzyżowania linii matecznych z tą samą formą ojcowską stworzyły jedną grupę podobieństwa; natomiast mieszance, które powstały z przekrzyżowania linii matecznych z drugą formą ojcowską utworzyły drugą grupę podobieństwa (rycina 14).



Rycina 14. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi 186 mieszańcami pokolenia F1, wyznaczony na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP

7.4.3 Mapowanie fizyczne, analiza funkcjonalna genów

W celu zawężenia liczby markerów do mapowania fizycznego, spośród wszystkich istotnych, wybrano 26 istotnych na poziomie 0,001. W wyniku analiz stwierdzono, że osiem z 26 wytypowanych markerów jest zlokalizowanych wewnątrz genów, które opisano w tabeli 10. W przypadku pozostałych markerów podano ich lokalizację i odległość od najbliższych położonych genów, które w części są scharakteryzowane.

Tabela 10. Charakterystyka i położenie markerów istotnie związanych z odpornością roślin na fuzarium

źródło	marker	typ markera	chromosom	położenie markera	lokalizacja w genomie
Publikacja 1	553	SilicoDArT	9	19345104	Marker zakotwiczony w genie (<i>niescharakteryzowany prekursor białka loc100273960</i>)
	10382	SilicoDArT	10	149495362	1182 pz po stronie 5': <i>niescharakteryzowane białko loc100191221 izoforma x1</i> 1718 pz po stronie 3': <i>niescharakteryzowane białko loc100501931</i>
	13242	SilicoDArT	1	Występuje w postaci 3 kopi 292840905 292841155 292841283	W obrębie tRNA Cys, 66700 pz po stronie 5': <i>niescharakteryzowany prekursor białka loc100191430</i> 90541 pz po stronie 3': <i>kinaza białkowa zależna od wapnia 11</i>
	15097	SilicoDArT	2	203171066	Marker zakotwiczony w genie <i>hydroksycynamlotransferaza putrescyny</i>
	15156	SilicoDArT	5	215026162	50422 pz po stronie 5': <i>niescharakteryzowane białko loc100276619 izoforma x1</i> 40871 pz po stronie 3': <i>prekursor alfa ekspansyny 2</i>
	58153	SNP	9	145274999	1499 pz po stronie 5': <i>histon h2a</i> 2328 pz po stronie 3': <i>histon h2b.1-podobny</i>
	58771	SNP	3	40548812	Marker zakotwiczony w genie <i>prekursor peroksydazy 72</i>
Publikacja 4	27364	SilicoDArT	4	2451800	95397 pz po stronie 5': <i>białko zlokalizowane jądrowo z motywem at-hook 23</i> 5235 pz po stronie 3': <i>niescharakteryzowane białko loc100286026</i>
	26864	SilicoDArT	2	2583292	765204 pz po stronie 5': <i>prekursor białka germinopodobnego podrodziny 1 członka 17</i>

				85363 pz po 3' stronie: <i>ukierunkowane dna polimerazy rna ii, iv i v podjednostka 9a</i>	
	17777	SilicoDArT	3	4769959	<i>niescharakteryzowane białko loc100275570 izoforma x1</i>
	27435	SilicoDArT	10	4770049	6549 pz po stronie 5': <i>prekursor syntazy skrobi iiib-1</i> 8366 pz po stronie 3': <i>niescharakteryzowane białko loc103642070</i>
	27775	SilicoDArT	3	25946459	Marker zakotwiczony w genie <i>esterazy/lipazy GDSL At4g01130</i> <i>niescharakteryzowane białko prekursorowe</i>
	11801	SilicoDArT	5	4764756	620 pz po stronie 5': <i>kinaza karboksylazy fosfoenolopirogronianowej 1</i> 11629 pz po 3' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc103628906 izoforma x1</i>
	24753	SilicoDArT	8	2440301	33881 pz po stronie 5': <i>niescharakteryzowane białko loc100281900</i> 14700 pz po stronie 3': <i>niescharakteryzowane białko loc103636139</i>
	20607	SilicoDArT	7	24015383	210 pz po stronie 5': <i>niescharakteryzowane białko loc100383808 izoforma x2</i> 7460 pz po 3' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100272692</i>
	73234	SNP	2	34766405	przypuszczalne <i>niescharakteryzowane białko ddb_g0274535</i>
	8596	SilicoDArT	7	4592527	116269 pz po 5' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc10019402712714 pb po 3' stronie: przypuszczalne białko nadrodziny cytochromu p450</i>
Wyniki niepublikowane	18414	SilicoDArT	1	6482017	<i>niescharakteryzowane białkoloc100275291</i>
	18499	SilicoDArT	1	3842257	<i>niescharakteryzowane białkoddb_g0271670</i>
	19066	SilicoDArT	5	61268380	75585 bp po 5' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100284270</i> 4904 bp po 3' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100285378</i>
	19254	SilicoDArT	9	28561377	1236 pz po 5' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100285600</i>

				28877 pz po 3' stronie: <i>białko podobne do kinezy 2</i>
20376	SilicoDArT	6	104559975	1553 pz po 5' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100274850</i> 83982 pz po 3' stronie: <i>białko trichom birefringence-podobny 5</i>
20701	SilicoDArT	7	36542358	20460 pz po 5' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100278673</i> 11867 pz po 3' stronie: <i>białko wiążące białko</i>
21044	SilicoDArT	6	176335045	8067 pz po stronie 5': <i>izoforma x2 kinazy białkowej 7 aktywowanej mitogenami</i> 3347 pz po 3' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100383775</i>
22200	SilicoDArT	9	101670695	514 pz po 5' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc109942573</i> 36875 pz po 3' stronie: <i>niescharakteryzowane białko loc100304070</i>
27770	SilicoDArT	1	302440939	<i>ligaza cysteina-trna cps1, chloroplastowa/mitochondrialna</i>

7.4.4 Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych polimorfizmów silicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin kukurydzy na *Fusarium spp.*

Po określeniu lokalizacji 26 wytypowanych markerów silcoDArT i SNP zaprojektowano startery, które zostały wykorzystane do ich identyfikacji na materiałach referencyjnych. Zaprojektowane startery zostały przedstawione w tabeli 11. Markery SSR, ISSR i STS zaczerpnięto z doniesień literaturowych.

Tabela 11. Sekwencje zaprojektowanych starterów służące do identyfikacji wytypowanych markerów związanych z odpornością roślin na fuzarium

Polimorfizm	Marker	Sekwencja starterów		Wielkość produktu (pz)	Temperatura topnienia (°C)	źródła
		Rewers	Forward			
SSR	bnlg1621	GGATCTTCGTTGCAGT TCTT	CATCAGTGATCCTCCA CCAT	135-160	54	[Abdel-Rahman i in. 2016]
	bnlg1063	GGAGACAACCCCGAC GAC	GGTACCAGAGCCACA GATCC	105-120	55	
	bnlg1740	TTTTCTCCTTGAGTTCG TTCG	ACAGGCAGAGCTCTC ACACA	125-160	56	
	umc2082	TAGCTGCCCCCTCTTCC GTCT	GTCGTGGCGTAGAGA CTAGGGT	100-130	54	
	umc2059	CTCTTCGATCTTTAAG AGAGAGAGAG	ACACGAGGCACTGGT ACTAACG	170-200	54	
	umc2013	GGAAAAGGAGGAACA GTGTAAGCA	AGCGTGATCAGACGT ACAATGCTA	110-130	54	[Salah i in., 2016]
	SSR85	GGGACGAGAGTCTGTT GTTGTTG	GTTGATGCATGTGACT CTGGAAAC	110-125	55	
	SSR93	CGCCGTACAGACTGCT ATGA	CACATGCTACGACTGC GATG	210	57	
	SSR105	GTTTCATCCTGATTCCC ATCC	CAGCCTTGCTTCTACA CCAC	200	58	
	SSR255	TCGACGAGATACGCG ACTAC	CAGTACAAAGCCGAT CCAAG	200	55	
ISSR	AD8	(AGC) ₆ GC		410	55	Publikacja 1
STS	STS03	CTTGTATCATCAGCTA GGGCATGT	GTGATCTGAACGCCAA CCTC	300	54	
SilicoDArT	553	TTGTCGACGTACACGA CCG	TTCGGGTGCGTGAAAA GCTA	116	60	
	10382	GCAGTGCCTCGTGCAG T	AAGCCGATCGAGTTTG TGTTT	91	58	
	13242	ACCTGCAGATCAATAG TCAC	GGACCCTTTGTATCGA AAA	122	52	
	15097	GGCTCACCTTCCCGTT CTAC	GTACGAAGGCACCAG GAACA	107	59	
	15156	CCGACATCAAATGTCA CAGCA	TGAGAAGACGACGAC GAAGC	151	59	
SNP	58153	ACTGCAGTATGGGACC ACAA	TGAAACATGCACCAA AATAAAATCC	100	57	
	58771	TGCTAGCACAAGTGCA TTTCAA	TGAAGGTGTTGCAAGC GAAT	103	58	

silicoDArT	27364	AAGACTGGGGGTAGC TGCAG	CTTGACCGGTAGCGAT TGGA	269	62	Publikacja 4
	26864	GCACGCTGGATGTTGC AG	GACGGGCATGTGATCT AACGA	138	65	
	17777	ACCAGAAGAACATTCT GCAG	GAACGAGCTCACTCA GAAGC	167	57,5	
	27435	AAGGCGTGCTCCATCT GCAG	CGGTCACCACTCACCA GGTA	333	63	
	27775	AGAATTGAGATCCTCT GCAG	TTGGTTTTCCATTTTCC CGC	273	62	
	11801	GCAACGTGGCGTCTCT GCAG	ATGCTGATACGGTTGG AGTCAGT	237	59	
	24753	AGCTAGCTTTGGTCCT GCAG	TCAAAGGCGAACGTA GCGAT	336	65	
	20607	TCACTTTTTCAGTTCTG CAG	AACGAACCAAACAAG CCTTA	137	60	
	SNP 73234	ACTATAAAGGAACTCC TGCAG	TCTACTGTAGCAGGAA TGGGA	486	59	
silicoDArT	8596	TTCTAGGGTGTACCT GCAG	GCCCTTAGTCTAAAGC GGCA	310	64	Wyniki niepublikowane
	18414	CTGCGACCACGTACAG CATG	AGGCAGTACAACAGG TCCAAG	260	64	
	18499	GTATCTCCTCTCCATA AAGAGTAC	AAAAAACAATGGAAG CCTCAC	305	68	
	19066	TGAAGAAGATACGCC GTTGC	ATGAGGAGGAATAAT TACATTAGGC	199	60	
	19254	CATCACCTTCTTGCTG CCGTT	AAGTAGTATGAAAGG AAGGTAGCGT	435	61	
	20376	CTTCCCAGTCCATCTC GATCTTA	TCAAATGATGGCAATA AACTGTCAA	657	60	
	20701	GCAGACCATTCGTCTT GCTC	ATCATGGGCGGTAGTT GGAA	141	60	
	21044	GTAGACTTTACCAGCC CATT	ACCAAGCTATGAAGG GCAATATTT	211	60	
	22200	ATAAAATTGGACTCCT GCAGT	AAAACATCACAGCTCC TCTCA	79	58	
	27770	ATACTCAAAGGCGTCG GCATT	CCTCACTTTTATAGCT CAAGGGAG	184	60	

7.4.5 Testowanie markerów molekularnych z wykorzystaniem PCR na materiałach referencyjnych

7.4.5.1 Markery zaczerpnięte z doniesień literaturowych

Markery, które zostały zaczerpnięte z doniesień literaturowych opisano w publikacji 2. Tabela 12 przedstawia rozkład markerów molekularnych związanych z genami odporności na *F. verticillioides* w badanych liniach. Analizy wykazały, że dziesięć z 12 testowanych markerów zostało zidentyfikowanych dla jednej linii o numerze 25. Linia ta ma odporność na fuzarium 8-9 w warunkach polowych (tabela 8). Dla linii o numerach 255, 260 i 9 zidentyfikowano dziewięć z dwunastu markerów. Linie te również wykazywały odporność na

poziomie 8-9 w warunkach polowych. Podobnie dla linii o numerze 35 zidentyfikowano dziewięć markerów; linia ta jednak wykazywała nieco niższą odporność – na poziomie 7-8. Najmniej odporna była linia 254, u której odporność była na poziomie 4-5, a liczba zidentyfikowanych markerów wynosiła pięć. Podobnie było w przypadku linii 257, 24 i 67, które charakteryzowały się odpornością na poziomie 4-6, a liczba zidentyfikowanych markerów wynosiła sześć (tabela 8 i tabela 12). Elektrofonogramy obrazujące wyniki analiz zostały zamieszczone w publikacji 2.

Tabela 12. Identyfikacja markerów molekularnych związanych z odpornością roślin na fuzarium obecnych w analizowanych liniach

Numer linii	Marker molekularny												Suma prążków
	SSR85	bngl1063	bngl1740	umc2082	bngl1621	umc2059	umc2013	SSR93	SSR105	SSR255	AD8	STS03	
253	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6
254	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	5
255	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	9
256	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	7
257	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6
258	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	7
259	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	8
260	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	9
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	9
16	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	7
23	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	8
24	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	10

Numer	Marker molekularny												
linii	SSR85	bngl1063	bngl1740	umc2082	bngl1621	umc2059	umc2013	SSR93	SSR105	SSR255	AD8	STS03	Suma prążków
28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	8
35	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	9
41	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	7
45	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	8
47	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	8
52	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	8
57	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	7
58	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	7
66	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	8
67	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6
68	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	7
71	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	8
74	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	8
78	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	7

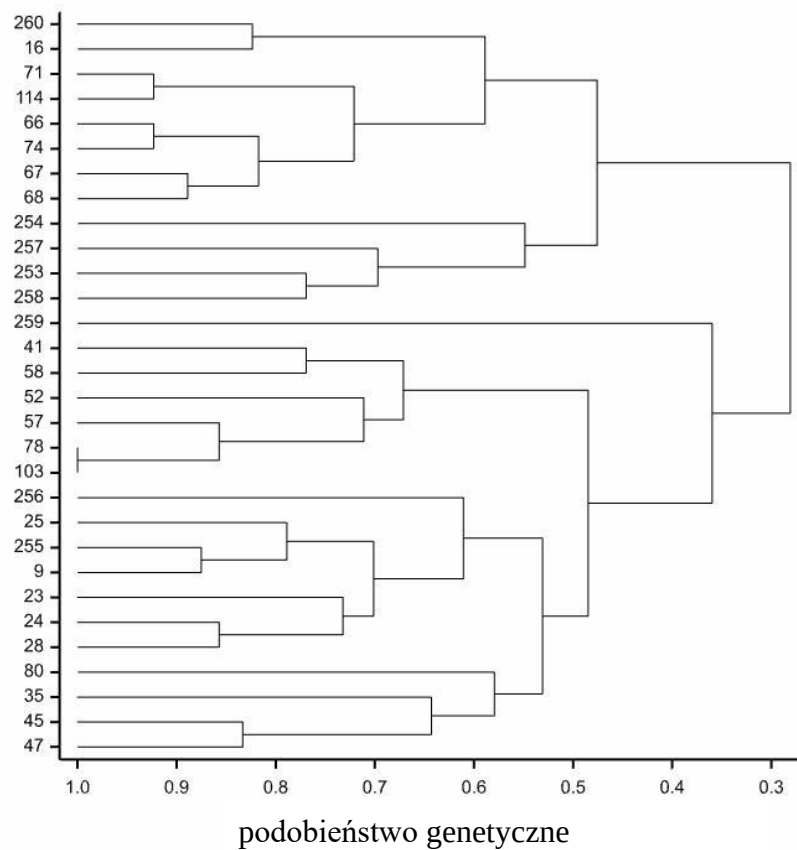
Numer	Marker molekularny												
linii	SSR85	bngl1063	bngl1740	umc2082	bngl1621	umc2059	umc2013	SSR93	SSR105	SSR255	AD8	STS03	Suma prążków
80	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	8
103	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	7
114	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	8

(„+” - widoczny produkt amplifikacji na elektroforogramie, „-” - brak produktu amplifikacji na elektroforogramie)

Obserwacje polowe są zgodne z analizami molekularnymi. Genotypy, u których wykazano obecność na żelach agarozowych większej liczby markerów charakteryzowały się wyższą odpornością, w 9-stopniowej skali stosowanej przez COBORU (1-podatne; 9-odporne). Empiryczny rozkład stopnia porażenia przez *F. verticillioides* był normalny. Wyniki analizy wariancji dla odporności na *Fusarium* ($F_{29;60}=8,55$) wykazały zróżnicowanie badanych linii na poziomie istotności $\alpha=0,001$. Linie o numerach 255, 260, 9, 25, 28, 52, 71 były najbardziej odporne – na poziomach 8 i 9 (tabela 8). Warto zauważyć, że podczas analiz molekularnych zidentyfikowano w tych liniach największą liczbę markerów molekularnych związanych z genami odporności na *F. verticillioides* (tabela 13). Najmniej odporne – na poziomie 4-6 – były linie o numerach: 254, 257, 24 i 67. W wyniku analiz statystycznych, stwierdzono, że marker AD8 nie był związany z odpornością linii kukurydzy na *F. verticillioides* (tabela 13). Procent całkowitej zmienności wyjaśniany przez poszczególne markery wynosił od 0,7% (*bngl1621*, *bngl1621*) do 19,9% (*STS03*). Największe podobieństwo genetyczne oszacowane z uwzględnieniem wszystkich markerów molekularnych, pomiędzy analizowanymi genotypami (równe 1) stwierdzono dla genotypów 78 i 103, podczas gdy największe zróżnicowanie (podobieństwo równe 0) dla genotypów 28 i 258 (rycina 15 i rycina 16).

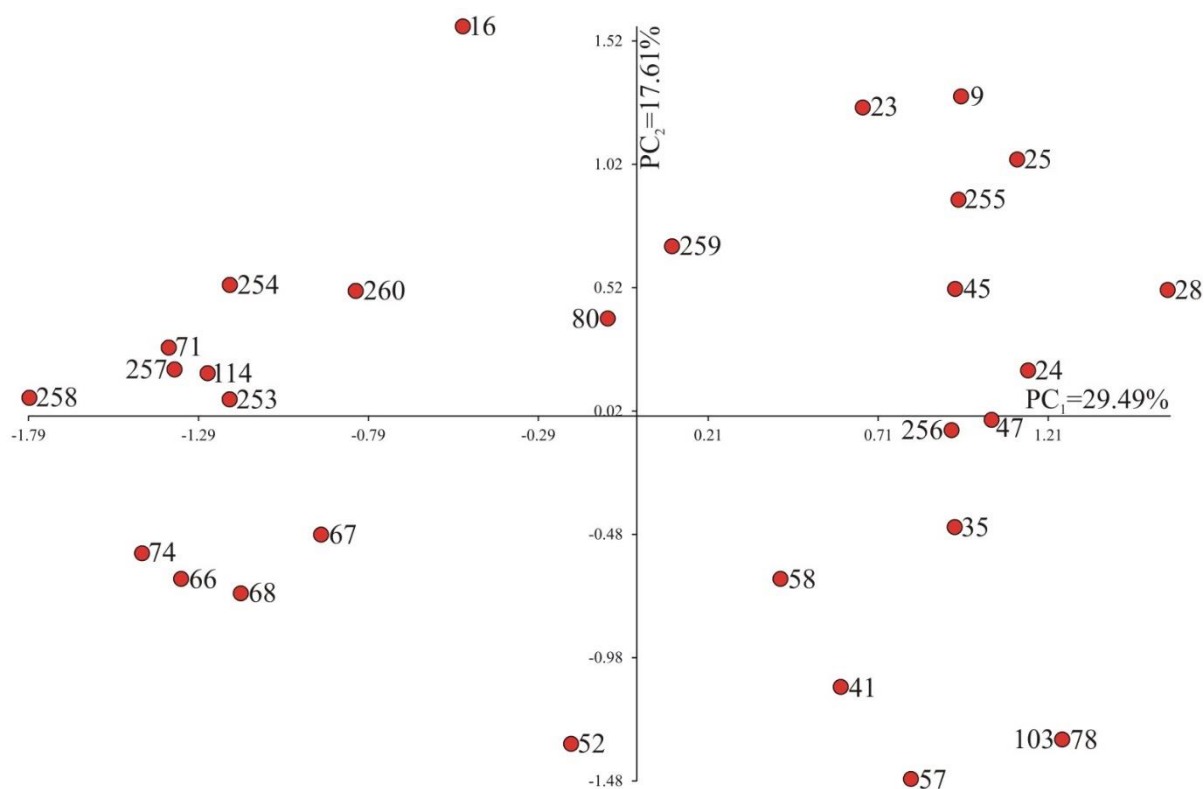
Tabela 13. Efekt markerów molekularnych związanych z odpornością na *Fusarium verticillioides*

Marker	Efekt	Procent uwzględnionej wariancji
SSR85	0,921 ***	9,9
bngl1063	0,565 ***	7,4
bngl1740 125 bp	-0,093 *	1,5
bngl1740 155 bp	-0,432 ***	6,7
bngl1740 160 bp	0,518 ***	2,8
umc2082 100 bp	0,503 ***	3,4
umc2082 115 bp	0,067 *	1,2
umc2082 120 bp	0,164 ***	4,7
bngl1621 170 bp	-0,521 ***	0,7
bngl1621 175 bp	0,521 ***	0,7
umc2059 110 bp	0,694 **	1,8
umc2059 120 bp	-2,7 **	11,2
umc2059 125 bp	0,417 *	7,5
umc2059 130 bp	-0,476 **	5,5
umc2013 120 bp	-0,224 *	2,8
umc2013 125 bp	-0,093 *	1,5
SSR93	0,486 **	3,6
SSR105	1,033 ***	11,3
SSR255	0,483 ***	5,7
AD8	0,06	x
STS03	1,25 ***	19,9
* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$		



Rycina 15. Dendrogram grupowania 30 genotypów kukurydzy na podstawie wszystkich markerów molekularnych

Rozmieszczenie 30 linii kukurydzy w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (obliczonych dla wszystkich markerów molekularnych) przedstawiono na rycinie 13. Na wykresie współrzędne punktu dla danej linii były wartościami, odpowiednio, pierwszej i drugiej składowej głównej. Pierwsze dwie składowe główne wyjaśniały 47,10% całkowitej zmienności między poszczególnymi liniami.



Rycina 16. Rozkład 30 linii kukurydzy w przestrzeni dwóch pierwszych składowych głównych

7.4.5.2 Wybrane markery silicoDArT i SNP

Nowe wyselekcjonowane markery testowano na 20. genotypach referencyjnych pochodzących z hodowli roślin w Smolicach i Kobierzycach. Tabela 14 przedstawia rozkład markerów molekularnych związanych z genami odporności na *Fusarium* spp. w badanych genotypach. Analizy wykazały, że pięć markerów (553, 13242, 58153, 11801 i 24753) z 26 testowanych różnicowały genotypy podatne i odporne. Dla pozostałych markerów zaobserwowano monomorficzne produkty amplifikacji na żelach agarozowych o rozmiarach zgodnych z oczekiwanymi wartościami. Elektroforogramy, wykonane na potrzeby analiz załączono w publikacji 4.

Tabela 14.Charakterystyka markerów molekularnych związanych z odpornością na *Fusarium* spp.

Genotypy	Markery																									Suma prążków w genotypie		
	553	10382	13242	15097	15156	58153	58771	27364	26864	17777	27435	27775	11801	24753	20607	73234	8596	18414	18499	19066	19254	20376	20701	21044	22200		27770	
Genotypy odporne na fuzarium w warunkach polowych																												
SF9	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	20	
SF11	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	20	
SF12	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	19	
SF13	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	21	
KF9	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	20	
KF11	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	16	
KF11	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	19	
KF12	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	22	
KF13	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	18	
KF15	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	18	
Genotypy podatne na fuzarium w warunkach polowych																												
GSZ	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	17	
K612A	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	17	
K605A	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	16	
K620A	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	17	
KF 02	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	18	
KWS	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	18	
ESPERANTO																												
BRIGADO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	17
FARM MODENA	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	17	
BLASK żeński	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	17	
BLASK męski	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	16	
Suma prążków w markerze	15	2	8	20	7	10	20	5	20	20	12	1	12	10	20	20	9	20	20	20	20	18	19	1	18	16	x	

„+” - widoczny produkt amplifikacji na elektroforogramie, „-” - brak produktu amplifikacji na elektroforogramie

7.5 Ekspresja genów kandydujących związanych z odpornością na *Fusarium* spp. (wyniki niepublikowane)

Badano ekspresję genów: F1 (*gen esterazy/lipazy GDSL At4g01130 niescharakteryzowane białko prekursorowe*), F2 (*hydroksycynamlotransferaza putrescyny, LOC103649226*), F3 (*nieskchrakteryzowane białko*), F4 (*gen prekursora peroksydazy 72 i białko zawierające powtórzenia pentatriopeptydowe At5g57250, mitochondrialne*). Zmiany poziomów ekspresji czterech genów po inokulacji (w stosunku do próbek przed inokulacją) przedstawiono w tabeli 16. Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i zidentyfikowano różnice w poszczególnych profilach ekspresji analizowanych genów dla odmian w określonych punktach czasowych. Odmiany wykazały zróżnicowane wzorce ekspresji genów w odpowiedzi na infekcję *Fusarium* spp. w odmianach i punktach czasowych.

Odmiana FR (Farm Modena) wykazywała szczególnie wysoki poziom ekspresji dla wszystkich genów, po 6 h od inokulacji. Może to wskazywać na aktywowanie procesów odpornościowych. W kolejnych godzinach (12 h i 24 h) po inokulacji zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji wszystkich genów badanych w tej odmianie. Na uwagę zasługuje fakt, że gen F4, 72 h po inokulacji charakteryzował się niższą ekspresją niż przed inokulacją. Świadczy to o przełamaniu odporności tego genu, co jest potwierdzeniem większej podatności tej odmiany na infekcję *Fusarium* spp., niż pozostałe genotypy, i może stanowić kontrolę negatywną (tabela 15, rycina 17).

Dla genotypu KF12 geny F1, F2 i F3 wykazywały zróżnicowany poziom ekspresji w różnych punktach czasowych, z wyjątkiem 72 h po inokulacji. Ostatecznie dla genów tych, wartość poziomu ekspresji była niższa niż przed inokulacją. Należy podkreślić, że spośród wszystkich analizowanych genów wyłącznie F4 charakteryzował się wyższym poziomem ekspresji 72 h po inokulacji niż przed nią (tabela 15, rycina 18).

W przypadku odmiany KF15 warto zaznaczyć, że geny F1 i F3 wykazywały wyższy poziom ekspresji w 72 h po inokulacji niż przed nią. We wcześniejszych punktach czasowych poziom ich ekspresji był zróżnicowany. Dla genów F2 i F4 poziom ekspresji w 72 h po inokulacji był niższy niż przed nią (dla genu F4 wynosił 0) (tabela 15, rycina 18).

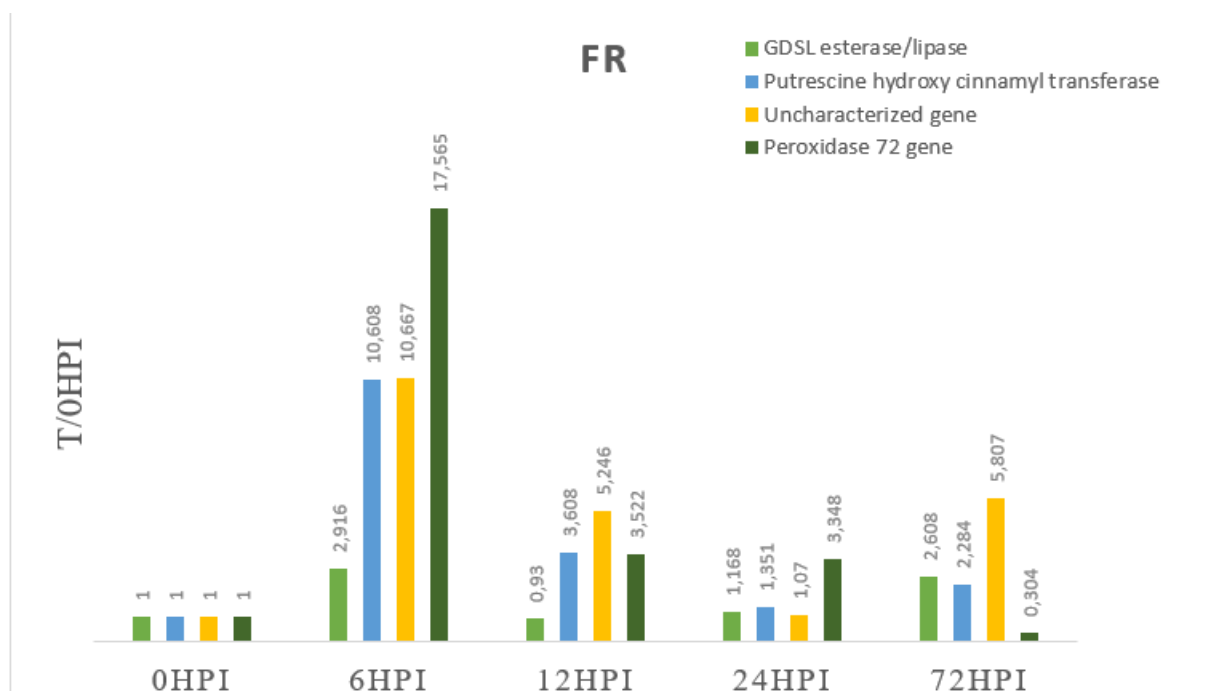
W przypadku odmiany SF11 najwyższą ekspresję zaobserwowano dla genu F3, gdzie w każdym punkcie czasowym jego ekspresja była wyższa niż przed inokulacją. Natomiast gen F2 osiągnął najwyższy poziom ekspresji po 6 h od inokulacji, podczas gdy dla genu F1 szczyt ten wystąpił po 12 h (tabela 15, rycina 18).

Genotyp SF12 charakteryzował się znaczącym wzrostem ekspresji dla genu F4 po 72 h od inokulacji. Ekspresja genu F1 była niższa po inokulacji we wszystkich badanych czasach niż przed nią. W przypadku genów F2 i F3 najwyższa ekspresja występowała w 6 h po inokulacji, następnie spadała poniżej poziomu wyjściowego (tabela 15, rycina 18).

Co ciekawe, w przypadku wszystkich genów, z wyjątkiem F1, genotypy KF12 i KF15 (pochodzące z Małopolskiej HR), charakteryzowały się największą odmiennością wzoru ekspresji w porównaniu z innymi genotypami. Były jednak najbardziej podobne do siebie. Z kolei genotypy SF12 i SF11 (pochodzące z HR Smolice), charakteryzowały się najbardziej podobnym wzorcem ekspresji między sobą dla genu F2 (*hydroksycynamonotransferazy putrescyny*) i genu F1 (*esterazy/lipazy GDSL At4g01130 niescharakteryzowany prekursor białka*). Obserwacja ta może wskazywać na podobne wzorce ekspresji genotypów pochodzących z tych samych stacji hodowli (rycina 18).

Tabela 15. Zmiany poziomów ekspresji po inokulacji (w stosunku do ekspresji przed inokulacją - 0h) dla czterech genów

Linia	czas	F1 (<i>gen esterazy/lipazy GDSL At4g01130 niescharakteryzowane białko prekursorowe</i>) [marker 553]				F2 (<i>hydroksycynamlotransferaza putrescyny, LOC103649226</i>) [marker 15097]				F3 (<i>nieskchrakteryzowane białko</i>) [marker 58771]				F4 (<i>gen prekursora peroksydazy 72 i białko zawierające powtórzenia pentatriopeptydowe At5g57250, mitochondrialne</i>)[marker 27775]			
		T/0h	K-S test	Levene's	t-Student	T/0h	K-S test	Levene's	t-Student	T/0h	K-S test	Levene's	t-Student	T/0h	K-S test	Levene's	t-Student
FR	00h	1	0.916			1.000	0.770			1.000	0.928			1.000	0.696		
FR	06h	2.916		0.026	0.963	10.608		0.024	0.249	10.667		0.053	0.252	17.565		0.039	0.756
FR	12h	0.930		0.292	0.914	3.608		0.289	0.872	5.246		0.034	0.986	3.522		0.227	0.774
FR	24h	1.168		0.236	0.226	1.351		0.287	0.001***	1.070		0.082	0.020*	3.348		0.110	0.063
FR	72h	2.608		0.192	0.303	2.284		0.105	0.561	5.807		0.059	0.199	0.304		0.037	0.932
KF12	00h	1.000	0.987			1.000	0.898			1.000	0.892			1.000	0.702		
KF12	06h	0.252		0.167	0.454	2.188		0.103	0.176	0.734		0.038	0.187	12.000		0.093	0.964
KF12	12h	0.682		0.252	0.215	1.625		0.714	0.513	2.625		0.232	0.807	0.000		0.016	1.000
KF12	24h	0.467		0.393	0.091	0.688		0.047	0.020*	0.719		0.029	0.814	1.000		0.148	0.460
KF12	72h	0.813		0.587	0.650	0.938		0.534	0.887	0.594		0.058	0.730	23.000		0.018	0.144
KF15	00h	1.000	0.968			1.000	0.853			1.000	0.860			1.000	0.891		
KF15	06h	1.583		0.046	0.673	4.961		0.065	0.094	6.142		0.095	0.450	17.000		0.057	0.650
KF15	12h	0.777		0.442	0.589	2.169		0.036	0.534	0.206		0.111	0.563	4.000		0.078	0.472
KF15	24h	0.709		0.066	0.290	0.590		0.090	<0.001***	0.394		0.397	<0.001***	6.000		0.022	0.053
KF15	72h	1.524		0.040	0.344	0.680		0.035	0.625	2.277		0.022	0.234	0.000		0.158	0.891
SF11	00h	1.000	0.949			1.000	0.954			1.000	0.939			1.000	0.933		
SF11	06h	1.211		0.082	0.590	2.400		0.187	0.389	5.733		0.030	0.657	0.825		0.974	0.992
SF11	12h	1.304		0.249	0.200	1.667		0.181	0.907	4.000		0.029	0.907	0.988		0.032	0.515
SF11	24h	0.249		0.350	0.709	1.133		0.267	0.088	1.333		0.332	0.162	0.450		0.158	0.810
SF11	72h	0.310		0.153	0.236	0.600		0.819	0.581	5.200		0.154	0.208	3.338		0.819	0.016*
SF12	00h	1.000	0.874			1.000	0.969			1.000	0.796			1.000	0.693		
SF12	06h	0.230		0.067	0.182	1.916		0.128	0.942	4.074		0.104	0.369	6.667		0.022	0.995
SF12	12h	0.409		0.501	0.196	1.050		0.105	0.758	0.360		0.225	0.745	0.667		0.636	0.997
SF12	24h	0.430		0.264	0.091	0.780		0.179	0.213	0.771		0.249	0.001***	1.000		0.795	0.863
SF12	72h	0.434		0.761	0.199	0.908		0.219	0.899	0.371		0.169	0.376	70.667		0.034	0.054



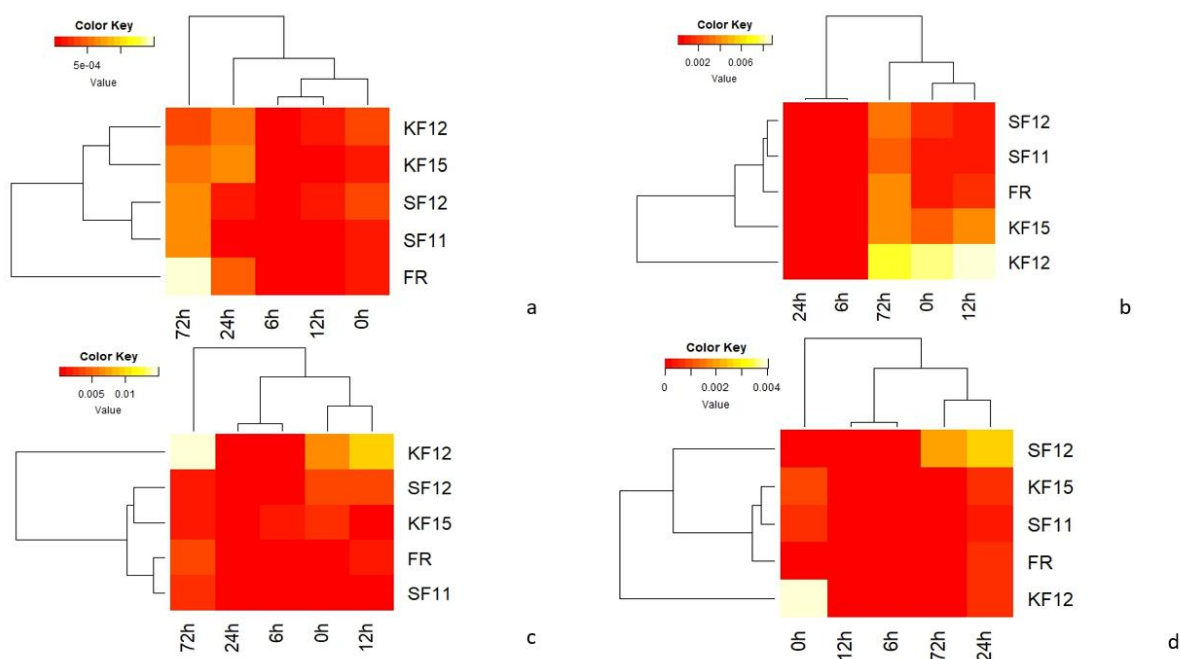
Rycina 17. Ekspresja badanych genów w odniesieniu do czasu 0 dla genotypu podatnego na porażenie *Fuarium* spp.



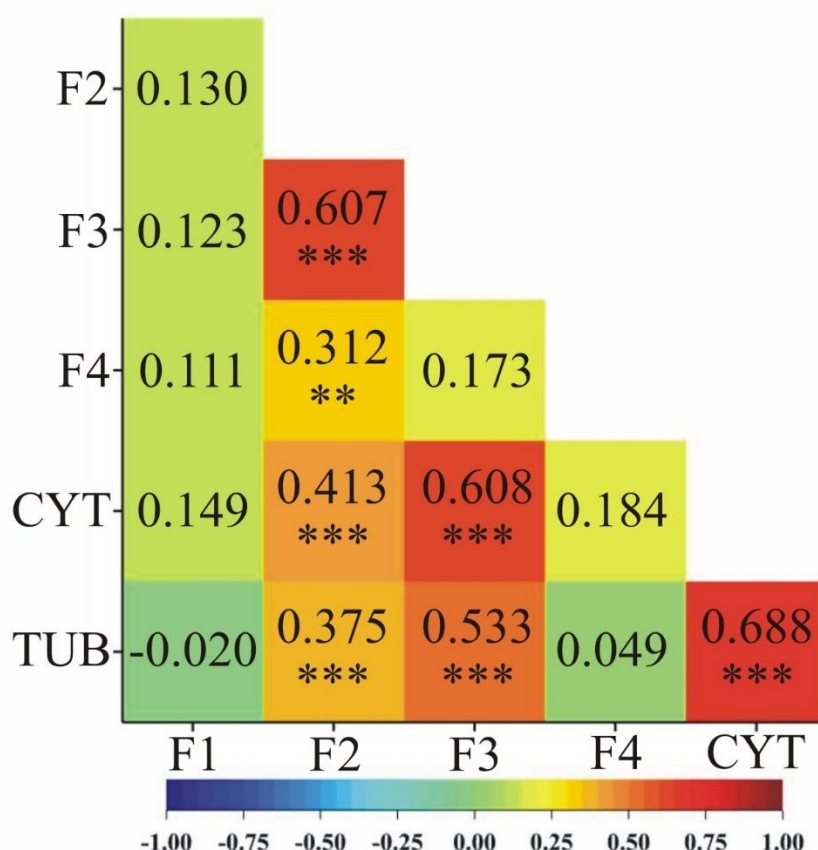
Rycina 18. Ekspresja badanych genów w stosunku do czasu 0 w genotypach odpornych na porażenie *Fuvarium* spp.

Średnie wartości z analizy RT-qPCR genów kandydujących we wszystkich badanych genotypach kukurydzy w różnych punktach czasowych podsumowano jako mapy cieplne (rycina 19). Dla każdej z badanych odmian najsilniejszą ekspresję zaobserwowano dla genu peroksydazy 72 (F4) i niescharakteryzowanego genu (F3).

U wszystkich odpornych genotypów (KF12, K15, SF11, SF12) aktywność genu F4 utrzymywała się na wysokim poziomie bezpośrednio po inokulacji. W genotypie SF12 sklasyfikowanym jako odporny, gen F4, wykazywał niską ekspresję w 72 h po inokulacji, co może wskazywać, że odporność ta, nie jest determinowana przez ten gen. W odmianie FR, która jest odmianą podatną, aktywność tego genu znacznie spadła w 72 h po inokulacji, co może wskazywać, że odporność rośliny została przełamana (rycina 19). Wykazano również, że ekspresja genu kandydującego F2 była dodatnio skorelowana z ekspresją genów kandydujących: F3 (0,607) i F4 (0,312) (rycina 20).

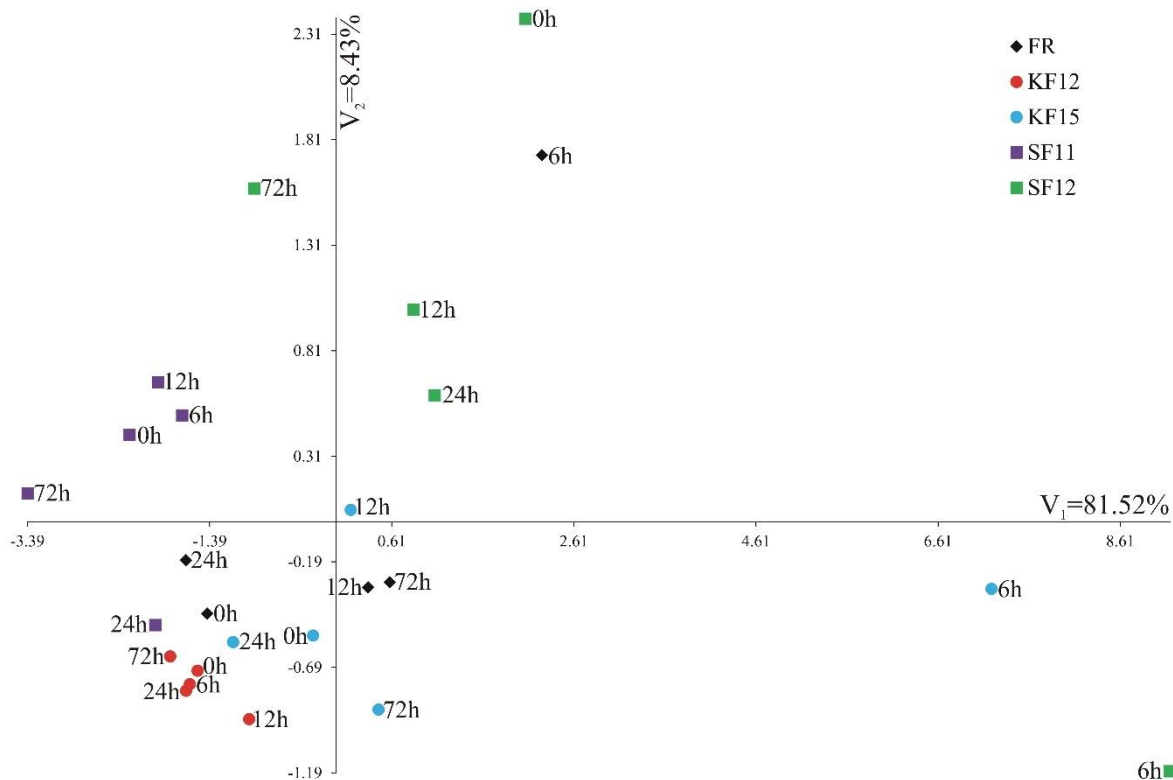


Rycina 19. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji uzyskane przy użyciu ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym; a- genu F1 (gen *GDSL* esterazy/lipazy *At4g01130* prekursor niescharakteryzowanego prekursora białka), b- genu F2 (*hydroksycynamlotransferaza putrescyny*, *LOC103649226*), c- genu F3 (niescharakteryzowane białko), d- genu F4 (gen prekursora peroksydazy 72 i białko zawierające powtórzenia pentatriopeptydowe *At5g57250*, mitochondrialny)



Rycina 20. Mapa ciepła współczynników korelacji liniowej Pearsona między analizowanymi genami na podstawie wartości ich indywidualnych profili ekspresji. Istotność korelacji parami jest zaznaczona: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Schemat kolorów mapy cieplnej (oznaczony na dole) informuje o bardziej pozytywnych (czerwony odcień) lub negatywnych (niebieski odcień) korelacjach

Porównanie ekspresji genów w kombinacji genotypów i punktów czasowych przy użyciu metod wielowymiarowych przedstawiono na rycinie 21. Analiza zmiennych kanonicznych została przeprowadzona w celu sprawdzenia, czy analizowane kombinacje genotypów i punktów czasowych zostały pogrupowane, w zależności od poziomu ekspresji poszczególnych genów. Pierwsza zmienna kanoniczna wyjaśniła 81,52% całkowitej zmienności kombinacji genotyp-punkt czasowy, podczas gdy druga zmienna kanoniczna określiła zmienność kombinacji genotyp-punkt czasowy w 8,43% (rycina 21). Największe wielowymiarowe podobieństwo pod względem ekspresji czterech genów, wyrażone najmniejszymi wartościami odległości Mahalanobisa, zaobserwowano dla KF12 po 6 godzinach i KF12 po 24 godzinach (0,15). Najbardziej zróżnicowanymi kombinacjami genotyp-punkt czasowy były SF11 po 72 godzinach i SF12 po 6 godzinach (12,703).



Rycina 21. Rozkład kombinacji genotypów i wyrażeń układu dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych: V_1 - pierwsza zmienna kanoniczna i V_2 - druga zmienna kanoniczna

7.6 Analiza danych transkryptomicznych

Poziom ekspresji analizowanych czterech genów w różnych organach i tkankach *Z. mays* oceniono z wykorzystaniem danych transkryptomicznych z pracy Walley i wsp. (2016). Dwa z tych genów, wewnątrz których zlokalizowane są markery 553 i 27775, ulegały najsilniejszej ekspresji w ziarniakach, odpowiednio, w owocni i bielmie. Najwyższą liczbę transkryptów genów związanych z markerami 15097 i 58771 stwierdzono w korzeniu (tabela 16).

Tabela 16. Mapa ciepła zmian poziomów ekspresji czterech genów, w wybranych narządach i tkankach *Z. mays*. Przedstawiono numer locus i numer akcesyjny, które umożliwiły analizę danych transkryptomowych. Mapa ciepła przedstawia wartości fragmentów na kilobazę na milion zmapowanych fragmentów (FPKM) w danych transkryptomowych uzyskanych od Walley i in. (2016). Dla każdego genu (kolumn) intensywność czerwieni wskazuje na wyższą ekspresję genu, intensywność zieleni wskazuje na niższą ekspresję genu, podczas gdy umiarkowane wartości ekspresji genu są oznaczone na żółto-pomarańczowo

Marker	553	15097	58771	27775		
Locus genu	LOC100273960	LOC103649226	LOC100282124	LOC100501166		
Numer akcesyjny	GRMZM2G07124	GRMZM2G09532	GRMZM2G08998	GRMZM5G80538		
Organ/tkanka	Znamiona	10,397	0,000	1,785	0,317	
	Siewka-6 mm liść	9,239	0,000	6,277	2,202	
	ziarniak	Bielmo	5,278	0,000	1,076	124,242
		Owocnia	81,798	0,000	0,522	35,447
		zarodek	26,429	0,000	2,720	0,623
		Kielkujący ziarniak	8,964	0,021	167,036	2,687
		7-8 międzywęzle	12,516	0,000	157,940	0,473
	liść	Liść w 1 fazie wzrostu	6,009	0,000	6,713	1,214
		Liść w 2 fazie wzrostu	5,583	0,000	4,589	4,677
		Liść w 3 fazie wzrostu	4,430	0,000	4,968	1,007
	korzeń	Korzenie po 4-5 dniach	9,133	0,095	989,494	11,764
		Korzenie po 7-8 dniach	8,725	0,077	1375,330	6,702

8. Dyskusja

W kontekście aktualnie obowiązującego od kilku lat paradygmatu integrowanej ochrony roślin i sukcesywnego ograniczania ilości dostępnych substancji czynnych pestycydów, uprawa odmian odpornych na choroby staje się coraz ważniejsza. Polityka Europejskiego Zielonego Ładu, opracowana przez Komisję Europejską, ma na celu osiągnięcie neutralności klimatycznej, czyli redukcji emisji gazów cieplarnianych do poziomu netto równego zeru, do 2050 roku. Ponadto zakłada zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin o połowę, do 2030 roku. Zmiany klimatyczne i degradacja środowiska to główne wyzwania współczesnego świata. Zrównoważone rolnictwo ma kluczowe znaczenie dla ograniczenia wpływu rolnictwa na środowisko, a jego możliwości zależą między innymi od postępu biologicznego. Zestawienie klasycznych metod hodowli z narzędziami biologii molekularnej, pozwala, nie tylko na skrócenie czasu niezbędnego na wyhodowanie nowych odmian, ale również przyczynia się do ograniczenia chemicznej ochrony dzięki uprawie roślin, o podwyższonej genetycznie odporności na choroby. Jedną z najpoważniejszych chorób kukurydzy, powodującą znaczne straty w plonach, jest fuzarioza powodowana przez patogeniczne grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

Kukurydza porażana jest przez różne gatunki fuzarium, m.in.: *Fusarium graminearum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium culmorum*. Objawy można zaobserwować na różnych częściach roślin: korzeniach, łodygach, liściach, kolbach, ziarniakach. Problem stanowi nie tylko występowanie choroby, związane ze spadkiem plonów ale również występowanie mykotoksyn, które są szkodliwe dla ludzi i zwierząt (Escrivá i in., 2015; Nelson i in., 1981). Porażenie kolb i ziarniaków przyczynia się do strat w uprawie kukurydzy. Ocieplenie klimatu w ostatnich latach (cieplejsze sezony wegetacyjne) powoduje zwiększone zanieczyszczenie fumonizynami i aflatoksynami (Yuan i in., 2024). W kontekście zmian klimatycznych, które sprzyjają rozwojowi grzybów i produkcji mykotoksyn, kluczowe staje się poszukiwanie nowych strategii ochrony kukurydzy. Brak skutecznych fungicydów sprawia, że coraz większe znaczenie ma hodowla odmian odpornych kukurydzy na *Fusarium* (Mesterhazy i in., 2024). Zwiększony poziom odporności warunkowany genetycznie można, więc uznać za bardzo ważny (Zijstra i in., 2011).

Wielu naukowców kładzie nacisk, na zrozumienie struktury genetycznej różnych gatunków roślin uprawnych, w tym kukurydzy. Odporność kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* jest cechą wielogenową, o złożonym dziedziczeniu (Presello i in., 2005; Martin i in., 2012; Butrón i in., 2015). Zrozumienie mechanizmów genetycznych, kontrolujących odporność na choroby grzybowe, ułatwia prowadzenie hodowli. Już w 1994 roku Hoenisch

i Davis (1994) wykazali, że odporność na fuzariozę jest warunkowana przez wiele genów, między innymi te, które wpływają na grubość owocu i warstwy aleuronowej. Bily i in. (2003) oraz Sampietro i in. (2009) sugerowali, że w procesy odpornościowe zaangażowane są również geny odpowiedzialne za produkcję wosku oraz związków fenolowych. Wielu autorów uważa, że odporność roślin na fuzarium jest wynikiem różnych oddziaływań między genami (Williams i in. 2009, Pérez-Brito i in. 2001, Hung i in. 2012, Butrón i in. 2015, Netshifhehe i in. 2018).

W badaniach własnych wykazano, że stopień porażenia roślin kukurydzy przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, był skorelowany z masą ziarna z kolby, plonem z poletka oraz plonem z ha.

Genotypowanie całego genomu staje się coraz ważniejsze dla zrozumienia architektury genetycznej cech warunkowanych wielogenowo. Technologia sekwencjonowania nowej generacji (NGS) dzięki wysokiej wydajności i coraz niższym kosztom zmieniała współczesną biologię (Fritsch i in., 2015). Technologia ta umożliwia identyfikację różnego typu markerów molekularnych i sprzężonych z nimi genów warunkujących ważne użytkowo cechy, w tym odporność na choroby grzybowe. Zhou i in. (2021) na podstawie mapy powiązań genetycznych skonstruowanej przy użyciu 1868 markerów, zidentyfikowali 11 QTL, w tym pięć stabilnych, związanych z odpornością na fuzarium. Sugeruje to, że opisywany *locus* może być potencjalnie wykorzystany w hodowli odmian kukurydzy, celem poprawy odporności na choroby powodujące fuzariozę kolb. Analiza transkryptomu pozwoliła Zhang i in. (2024) zidentyfikować 153 geny, związane z odpornością na choroby fuzaryjne. Szlaki sygnałowe kinazy białkowej aktywowanej mitogenami i peroksysomów regulowały główne mechanizmy odporności linii wsobnych kukurydzy na infekcję powodowaną przez *F. graminearum*. Zhang i in. (2024) przypuszczają, że dwa szlaki mogą odgrywać ważną rolę w mechanizmie odporności na fuzarium, a funkcja genów tych dwóch szlaków musi być dalej badana.

W niniejszej rozprawie, dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego zidentyfikowano łącznie 175 829 markerów molekularnych (114 935 sliCoDArT i 60 894 SNP), z których wyselekcjonowano 4 574 istotnie związanych z odpornością na fuzarium. Wśród nich były zarówno markery SNP jak i sliCoDArT.

Badania asocjacji całego genomu (GWAS) są użytecznym narzędziem do identyfikacji genów kandydujących, sprzężonych z cechami ilościowymi. Zila i in. (2013, 2014) wykorzystując GWAS zidentyfikowali markery, związane z odpornością kukurydzy na

fuzarium. Autorzy zidentyfikowali dziesięć markerów SNP istotnie związanych z odpornością na ten patogen. Regiony te nie były wcześniej korelowane z odpornością na choroby, przypisywano im natomiast funkcję związaną ze szlakiem zaprogramowanej śmierci komórki. Dzięki analizom GWAS wielu autorów identyfikowało regiony QTL związane z odpornością roślin na stresy biotyczne. De Jong i in. (2017) zidentyfikowali te regiony na chromosomach 1, 4, 5, 7, 8 i 10, natomiast Zila i in. (2014) na chromosomach 1, 4, 5, i 9. Chen i in. (2012) stwierdzili, że za odporność na fuzarium odpowiadają geny znajdujące się na chromosomie 4. W badaniach Li i in. (2011) wykryto cztery QTL na chromosomach 3, 4, 5 i 6. Zdaniem autorów QTL wykryty na chromosomie 4 może być traktowany jak *locus* odporności na fuzarium kolb kukurydzy.

W badaniach własnych wybrano 26 istotnych (na poziomie 0,001) markerów molekularnych (SNP i silicoDArT) sprzężonych z odpornością na fuzarium, które, podobnie jak w pracy De Jong i in. (2017), zlokalizowane były na chromosomach 2, 3, 4, 5, 7, 8 i 10. Ostatecznie z 26 markerów wybrano osiem zlokalizowanych wewnątrz genów. Położenie markerów wewnątrz genów oraz ich charakterystyka w doniesieniach literaturowych pozwoliła na wybór czterech markerów (553, 15097, 58771, 27775), które są sprzężone z potencjalnymi genami kandydującymi (*hydroksycynamlotransferaza putrescyny*, *prekursor peroksydazy 72*, *esteraza/lipaza GDSL* oraz *nieskchakteryzowane białko*).

Aby potwierdzić udział tych czterech genów w reakcji odpornościowej przeanalizowano profile ich ekspresji, po przeprowadzeniu sztucznej inokulacji roślin kukurydzy zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*. Geny stanowiące referencje, były wybrane na podstawie pracy Lin i in. (2014) oraz Srdić i in. (2011). W wyniku selekcji do analiz RT-qPCR wybrano dwa geny referencyjne: *beta tubulinę* (β -TUB) oraz *cyklofilinę* (CYP) (Lin i in., 2014).

Wytypowany gen kandydujący *esterazy/lipazy (GDSL)* należy do enzymów lipolitycznych, które zostały zidentyfikowane u drobnoustrojów i wielu roślin, ale tylko kilka z nich zostało scharakteryzowane pod kątem ich roli we wzroście, rozwoju i odpowiedzi na stres (Ling, 2008). Charakterystyka i cechy genów *GDSL* zostały przeanalizowane u roślin na poziomie genomowym w *Arabidopsis*, *Sorghum bicolor*, *Populus tricholarpa*, *Oryza sativa*, kukurydzy i innych (Ling 2008; Volokita i in., 2011; Chepyshko i in., 2012). Pełnią one istotną rolę w odpowiedzi na stres abiotyczny, morfogenezę, obronę przed patogenami oraz syntezę metabolitów wtórnych (Hong i in., 2008; Ji i in., 2023). Aby lepiej zrozumieć dokładną rolę *GDSL* w rozwoju roślin i reakcji na stres potrzebne są dodatkowe badania (Shen, i in., 2022).

W niepublikowanych badaniach własnych zaobserwowano, że ekspresja genu *esteraza/lipaza (GDSL)* wzrastała po inokulacji, u prawie wszystkich badanych odmian – najbardziej u odmiany, która charakteryzowała się największą odpornością polową na grzyby z rodzaju *Fusarium*. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że gen ten jest powiązany z mechanizmem odpowiedzi odpornościowej na porażenie *Fusarium* spp. u kukurydzy.

Drugi wytypowany gen kandydujący to *hydroksycynamlotransferaza putrescyny*. Białko to jest zaliczane do poliamin, które są związkami organicznymi o małej masie molowej, mającymi w swojej strukturze co najmniej dwie grupy aminowe. Występują w komórkach ludzi, zwierząt, roślin i bakterii i zaliczane są do amin biogennych np., putrescyna. Walters i in. (2003) wykazali, że poliaminy mogą odgrywać kluczową rolę w odpowiedzi roślin na porażenie przez patogeny. W komórkach roślinnych poliaminy mogą występować w postaci wolnej lub związanej z kwasami fenolowymi, białkami oraz składnikami ściany komórkowej (Walters i in., 2003). Jimenez-Bremont i in. (2014) w swoich badaniach wskazali na występowanie związku między poliaminami i hormonami biorącymi udział w reakcji obronnej roślin podczas stresu biotycznego (Jimenez-Bremont i in., 2014). Geny transferazy putrescynohydroksycynamoilowej pozytywnie regulują śmierć komórek ryżu i odporność na *Magnaporthe oryzae* (Fang i in., 2022). Wojtasik i in. (2015) donoszą o zwiększonym poziomie ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę poliamin po zainfekowaniu lnu przez *F. graminearum* (Jimenez-Bremont i in., 2014). Jedną z najczęściej przyjmowanych hipotez głosi, że poliaminy mają zdolność do wiązania się ze składnikami ściany komórkowej, co skutkuje wzmocnieniem fizycznej bariery, która zapobiega lub ogranicza wnikanie strzępek grzyba. Coraz więcej dowodów sugeruje również, że poprzez utlenianie i generowanie nadtlenu wodoru, poliaminy, mogą działać jako mediatory aktywacji obrony roślinnej (Gauthier i in., 2015).

W niepublikowanych badaniach własnych analizowano również poziom ekspresji genu kandydującego *hydroksycynamlotransferazy putrescyny*. W przypadku wszystkich badanych odmian obserwowano intensywny wzrost poziomu ekspresji tego genu w 6 h po inokulacji. W kolejnych godzinach poziom ekspresji *hydroksycynamlotransferazy putrescyny* stopniowo obniżał się, ostatecznie (72 h po inokulacji) przyjmując wartości sprzed inokulacji. Może to dowodzić, że gen ten zaangażowany jest w reakcję odpornościową u kukurydzy po kontakcie z grzybami z rodzaju *Fusarium*.

Kolejnym, wytypowanym genem, związanym z odpornością kukurydzy na fuzarium jest *peroksydaza 72*. Roślinne peroksydazy klasy III są zaangażowane w szeroki zakres procesów fizjologicznych, w całym cyklu życia roślin (Passardi i in., 2005) między innymi

w metabolizm ściany komórkowej (Barcelo i Pomar, 2003; Passardi i in., 2004), gojenie ran (Allison i Schultz, 2004) i katabolizm auksyn (Gazaryan i in., 1996). Uważa się również, że są zaangażowane w usuwanie nadtlenu wodoru, obronę przed atakiem patogenów lub owadów, a także normalny wzrost komórek. Ponadto peroksydazy klasy III mogą generować wysoce reaktywne formy tlenu (Liszka i in., 2003; Passardi i in., 2004), które mogą być aktywne podczas różnych reakcji środowiskowych i procesów rozwojowych, w tym reakcji stresu oksydacyjnego oraz reakcji nadwrażliwości (HR) lub wydłużania komórek (Bolwell i in., 2002; Schopfer i in., 2002; Delannoy i in., 2003; Liszka i in., 2004; Bindschedler i in., 2006). Fernández-Pérez i in. (2015) stwierdzili, że w genomie *Arabidopsis* zakodowane są 73 peroksydazy, wśród których wykazano, że *AtPrx72* bierze udział w lignifikacji. Powszechnie wiadomo, że lignina jest polimerem zbudowanym z pochodnych alkoholi fenolowych. Jest to substancja zwiększająca sztywność ściany komórkowej, dzięki czemu jest ona odporna na działanie czynników mechanicznych, oraz stanowi barierę dla patogenów również grzybów z rodzaju *Fusarium* spp. (Liu i in. 2016).

W niniejszej rozprawie dla genu *prekursora peroksydazy 72*, u wszystkich odmian najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano 6 h po inokulacji. U odmian SF12 i KF15 w kolejnych punktach czasowych poziom ekspresji tego genu obniżał się, aż do 72 h, natomiast u odmian SF11 i KF12 po 72 h od inokulacji poziom ekspresji tego genu był wyższy niż przed inokulacją.

Tran i in. (2024) zidentyfikowali geny związane z odpornością kukurydzy *Fusarium verticillioides*. Przeprowadzona przez nich analiza transkryptomiczna linii kukurydzy, badająca reakcję na inokulację grzybem w różnych punktach czasowych wykazała, że kluczowa reakcja odpornościowa rośliny na patogen występuje 72 h po inokulacji. Autorzy zidentyfikowali dwa geny kodujące regulatory reakcji nadwrażliwości (*Zm00001d016584* i *Zm00001d016585*), które byłyby interesującymi kandydatami do dalszych badań, dotyczących odpowiedzi roślin na infekcję *F. verticillioides* i inne patogeny.

Badanie Wanga i in. (2016) wykazało, że poziom transkryptu genów związanych z kluczowymi szlakami, dotyczącymi odporności, znacząco zmienia się w ziarnach kukurydzy po inokulacji *F. verticillioides*. Różnicowa ekspresja genów w ziarnach kukurydzy odpornych i podatnych została potwierdzona za pomocą analizy mikromacierzy RNA i RT-qPCR. Badanie sugeruje, że mała rodzina białek szoku cieplnego, niektóre metabolity wtórne oraz szlaki sygnałowe kwasu abscysynowego, kwasu jasmonowego i kwasów salicylowych mogą być zaangażowane w odporność wywołaną *F. verticillioides* (Wang i in., 2016).

W niniejszej dysertacji, przeprowadzono również identyfikacje grzybów z rodzaju *Fusarium* ssp., które występowały na porażonych ziarniakach kukurydzy. Przebadane próbki ziarniaków różnych genotypów kukurydzy różniły się znacznie pod względem zasiedlenia przez grzyby rodzaju *Fusarium*. Najliczniej występowały grzyby *Fusarium poae*. Pojedyncze próbki były również zasiedlone przez *Fusarium ploriferatum* lub *Fusarium culmorum*.

Selekcja wspomagana markerami (MAS) pozwala na zmniejszenie nakładów finansowych i wzrost produktywności. Dzięki zwiększeniu efektywności selekcji odmian do krzyżowań, hodowcy mogą w krótszym czasie udoskonalić programy hodowlane (Arabzai i Gul, 2021). Zastosowanie markerów SNP sprzężonych z cechami struktury plonu u kukurydzy i jęczmienia, wykazywało większą precyzję niż metody oparte na badaniu szlaków metabolicznych (Michel i in., 2021).

Prowadzone w rozprawie doktorskiej analizy molekularne na genotypach kukurydzy skupiały się, nie tylko na identyfikacji nowych markerów oraz regionów QTL, związanych z odpornością na grzyby z rodzaju *Fusarium*, ale również istotne było poszukiwanie metod umożliwiających dobór komponentów rodzicielskich, do krzyżowań celem zwiększenia plonowania odmian odpornych. Aspekt ten choć pobocznie omawiany w rozprawie doktorskiej jest również bardzo istotny z hodowlanego punktu widzenia (Tang i in., 2010). Ma to na celu, 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 obarczone 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 w oparciu o podobieństwo genetyczne pomiędzy liniami rodzicielskimi, wyznaczone przy pomocy markerów molekularnych.

W prezenowanej rozprawie doktorskiej, w podrozdziale 7.3.2 opisano podział analizowanych genotypów na grupy, w oparciu o dystans genetyczny oszacowany na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych SNP i silicoDArT. Wskazane jest aby do krzyżowań wybierać genotypy odporne pomiędzy, którymi występuje duży dystans genetyczny.

Prowadzone w rozprawie doktorskiej badania wpisują się w kierunki rozwoju współczesnego rolnictwa na świecie. Rozwój ten powinien dotyczyć zapewnienia odpowiedniej ilości żywności dla wciąż rosnącej liczby ludności, poprawy jakości życia osób pracujących w sektorze rolniczym oraz promowania zrównoważonego rozwoju, który uwzględnia ochronę środowiska i racjonalne wykorzystanie zasobów naturalnych. Biotechnologia to dziedzina o wybitnie praktycznym charakterze, a zakres jej wykorzystania w nowoczesnym, inteligentnym rolnictwie zależy przede wszystkim od poziomu społecznej akceptacji dla proponowanych innowacji oraz od ram prawnych i organizacyjnych. W kontekście strategii Unii Europejskiej „od pola do stołu”, której celem jest osiągnięcie neutralności klimatycznej do 2050 roku i przekształcenie europejskiego systemu żywnościowego w bardziej zrównoważony model, biotechnologia może odegrać kluczową rolę. Może ona m.in. przyczynić się do: 1) zwiększenia dostępności taniej, zdrowej i pełnowartościowej żywności, 2) zmniejszenia stosowania pestycydów i nawozów, 3) ograniczenia strat i marnowania żywności poprzez efektywne wykorzystanie odpadów, 4) rozwijania metod wykrywania fałszerstw w łańcuchu dostaw żywności, 5) podnoszenia standardów dobrostanu zwierząt.

Wraz z nowymi regulacjami dotyczącymi dopuszczalnych limitów mykotoksyn w wielu krajach, są inicjowane programy hodowlane mające na celu rozwój odporności na fuzariozę kolb. W konsekwencji przyszłe mieszańce mogą wykazywać większą odporność. Do tego czasu nadal najważniejsze jest, aby rolnicy mieli dostęp do danych dotyczących oceny fusariozy kolb na mieszańcach, które mogą uprawiać. Pozwoli to rolnikom wybierać mieszańce o większej odporności, jeśli choroba ta, stanowi znaczące zagrożenie w ich gospodarstwie. Należy opracować skuteczniejsze metody selekcji, a istniejącą metodologię należy ulepszyć i ustandaryzować (Mesterházy i in., 2012). Dlatego tak ważne jest wspomaganie klasycznych metod hodowli technikami takimi jak MAS.

9. Podsumowanie i wnioski

Obecnie coraz więcej programów hodowli kukurydzy, zarówno w instytucjach publicznych, jak i prywatnych, inicjuje i rozszerza programy hodowlane w celu opracowania odpornych odmian, które będą przeznaczone do spożycia przez ludzi i zwierzęta. Prowadzone badania miały na celu: dostarczenie informacji o mechanizmach genetycznych związanych z odpornością roślin na grzyby z rodzaju *Fusarium*, wytypowanie genów kandydujących odpowiedzialnych za reakcje odpornościowe, opracowanie metod identyfikacji markerów sprzężonych z genami kandydującymi, dostarczenie narzędzi do selekcji odmian odpornych, scharakteryzowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* obecnych na poletkach, gdzie było założone doświadczenie polowe oraz podział analizowanych genotypów na grupy w oparciu o dystans genetyczny oszacowany na podstawie zidentyfikowanych markerów SNP i SilicoDArT.

W skład materiału roślinnego wchodziło: 252 linie wsobne i 308 mieszańców pokolenia F₁ (250 linii matczyńskich, dwie linie ojcowskie, oraz mieszańce powstałe w wyniku ich przekrzyżowania). Pochodziły one, z polskich spółek hodowlanych (HR Smolice sp. z o.o. Małopolska HR sp. z o.o.). Stosując analizy GWAS, przeprowadzono mapowanie asocjacyjne mające na celu powiązanie obserwacji stopnia porażenia kolb przez fuzarium 560 genotypów kukurydzy *Zea mays* L. z markerami molekularnymi SNP i silicoDArT otrzymanymi z analizy DArTseq. Na podstawie analiz sekwencjonowania nowej generacji zidentyfikowano łącznie 175 829 markerów molekularnych (114 935 silicoDArT i 60 894 SNP), z których w wyniku mapowania asocjacyjnego wyselekcjonowano 4 574 istotnie związane z odpornością roślin na grzyby z rodzaju *Fusarium*. W celu zawężenia liczby markerów do mapowania fizycznego spośród 4 574 wybrano 26, które były istotne na poziomie 0,001, a osiem z nich było zlokalizowane wewnątrz genów. Położenie markerów wewnątrz genów oraz charakterystyka tych genów w doniesieniach literaturowych pozwoliło na wybór czterech markerów (553, 15097, 58771, 27775), które są sprzężone z potencjalnymi genami kandydującymi (*hydroksycynamlotransferazy putrescyny*, *prekursor peroksydazy 72*, *esteraza/lipaza GDSL* oraz *nieskchrakteryzowane białko*). Aby potwierdzić udział, tych czterech genów w reakcji odpornościowej przeanalizowano profile ich ekspresji, po przeprowadzeniu sztucznej inokulacji roślin kukurydzy zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*. Próby do analiz RT-qPCR pobierano przed inokulacją oraz 6 h, 12 h, 24 h i 72 h po inokulacji. W wyniku doświadczenia wykazano istotny wpływ odmiany i czasu na ekspresję badanych genów u kukurydzy. Geny stanowiące referencje, były wybrane na podstawie pracy Lin i in. (2014) oraz Srdić i in. (2011). W wyniku selekcji do analiz RT-qPCR wybrano dwa geny referencyjne: *beta tubulinę* (β -TUB) oraz *cyklofilinę* (CYP) (Lin i in., 2014). W ramach

rozprawy doktorskiej przeprowadzono również identyfikacje grzybów z rodzaju *Fusarium* spp., które występowały na porażonych ziarniakach kukurydzy. Ponadto poszukiwano metod umożliwiających dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań, celem zwiększenia plonowania odmian odpornych. W prezenowanej rozprawie doktorskiej, analizowane genotypy podzielone zostały na grupy, w oparciu o dystans genetyczny oszacowany na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych.

Przedstawione powyżej badania pozwoliły na sformułowanie poniższych wniosków:

1. Dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji oraz mapowania asocjacyjnego zidentyfikowano nowe markery molekularne, sprzężone z genami kandydującymi, które były związane z odpornością na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. u kukurydzy.
2. Spośród zidentyfikowanych markerów molekularnych, wybrano 26 (istotne na poziomie 0,001), które konwertowano na markery specyficzne. Optymalizacja warunków reakcji pozwoliła zidentyfikować markery silicoDArT (553, 13242, 11801, 24753) oraz SNP (58153), które różnicowały genotypy referencyjne podatne i odporne na porażenie *Fusarium* spp. Wobec powyższego mogą one zostać wykorzystane w programach hodowlanych do selekcji genotypów odpornych, dzięki czemu skróceniu ulegnie czas niezbędny na wyhodowanie nowych odmian.
3. Na podstawie mapowania fizycznego ustalono, że osiem z 26 istotnych markerów molekularnych znajduje się wewnątrz genów. Należą do nich: marker silicoDArT 553 zlokalizowany na chromosomie 9, wewnątrz genu *niescharakteryzowany prekursor białka loc100273960*; marker silicoDArT 15097 zlokalizowany na chromosomie 2, wewnątrz genu *hydroksycynamlotransferaza putrescyny*; marker SNP 58771 zlokalizowany na chromosomie 3, wewnątrz genu *prekursor peroksydazy 72*; marker silicoDArT 27775 zlokalizowany na chromosomie 3, wewnątrz genu *esterazy/lipazy GDSL At4g01130 niescharakteryzowane białko prekursorowe*; marker SNP 73234 zlokalizowany na chromosomie 2, wewnątrz genu *niescharakteryzowane białko ddb_g0274535*; marker silicoDArT 18414 zlokalizowany na chromosomie 1, wewnątrz genu *niescharakteryzowane białko loc100275291*; marker silicoDArT 18499 zlokalizowany na chromosomie 1, wewnątrz genu *niescharakteryzowane białko ddb_g0271670*; marker silicoDArT 27770 zlokalizowany na chromosomie 1, wewnątrz genu *ligaza cysteina-trna cps1, chloroplastowa/mitochondrialna*.

4. Położenie markerów wewnątrz genów oraz ich charakterystyka w doniesieniach literaturowych pozwoliła na wybór czterech markerów (553, 15097, 58771, 27775), które są sprzężone z potencjalnymi genami kandydującymi (*hydroksycynamlotransferaza putrescyny*, *prekursor peroksydazy 72*, *esteraza/lipaza GDSL* oraz *nieskchrakteryzowane białko*).
5. Analiza ekspresji genów kandydujących (*esteraza/lipaza GDSL*, *hydroksycynamlotransferaza putrescyny*, *prekursor peroksydazy 72* oraz *nieskchrakteryzowane białko*) wykazała, że charakteryzowały się one podwyższonym poziomem ekspresji po inokulacji, co świadczy o ich udziale w reakcji odpornościowej na porażenie przez *Fusarium* spp.
6. *Prekursor peroksydazy 72* charakteryzował się najwyższym poziomem ekspresji po inokulacji u wszystkich badanych genotypów, co może go predystynować, do genu potencjalnie niosącego odporność na *Fusarium* spp.
7. Genotypy pochodzące w tej samej firmy hodowlanej charakteryzowały się podobnymi wzorcami ekspresji, co sugeruje, że mogą być podobne do siebie pod względem pochodzenia.
8. Jako geny referencyjne do analiz RT-qPCR wytypowano *beta tubulinę* (β -TUB) oraz *cyklofilinę* (CYP).
9. Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* spp., które występowały na porażonych ziarniakach kukurydzy pozwoliła ustalić, że najliczniej występowały grzyby *Fusarium poae*, a pojedyncze próbki były również zasiedlone przez *Fusarium ploriferatum* lub *Fusarium culmorum*.
10. Podzielenie analizowanych genotypów na grupy umożliwi dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań celem zwiększenia plonowania odmian odpornych.

10.Bibliografia

1. Abdel-Rahman, M.M., Bayoumi, S.R., Barakat, M.N. (2016). Identification of molecular markers linked to *Fusarium* ear rot genes in maize plants *Zea mays* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(4), 692–699. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1181987>
2. Albuquerque, G.M.R., Fonseca, F.C.A., Boiteux, L.S., Borges, R.C.F., Miller, R.N.G., Lopes, C.A., Souza, E.B., Fonseca, M.E.N. (2021). Stability analysis of reference genes for RT-qPCR assays involving compatible and incompatible *Ralstonia solanacearum*-tomato ‘Hawaii 7996’ interactions. *Scientific Reports*, 11(1), 18719. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98271-z>
3. Allison, S.D., Schultz, J.C. (2004). Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 30(7), 1363–1379. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000037745.66972.3e>
4. An, X., Dong, Z., Tian, Y., Xie, K., Wu, S., Zhu, T., Wan, X. (2019). ZmMs30 Encoding a Novel GDSL Lipase is Essential for Male Fertility and Valuable for Hybrid Breeding in Maize. *Molecular Plant*, 12(3), 343–359. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.011>
5. Ansorge, W., Sproat, B.S., Stegemann, J., Schwager, C. (1986). A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 13(6), 315–323. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(86\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0165-022X(86)90038-2)
6. Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., Zenke, M. (1987). Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15(11), 4593–4602. <https://doi.org/10.1093/nar/15.11.4593>
7. Arabzai, M., Gul, H. (2021). Application Techniques of Molecular Marker and Achievement of Marker Assisted Selection (MAS) in Three Major Crops Rice, Wheat and Maize. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.31033/ijrasb.8.1.10>
8. Arroyo-Velez, N., Gonzalez-Fuente, M., Peeters, N., Lauber, E., Noel, L. D. (2020). From effectors to effectomes: Are functional studies of individual effectors enough to decipher plant pathogen infectious strategies? *PLoS Pathogens*, 16(10), e1009059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009059>
9. Awika, J. (2011). Major cereal grains production and use around the world. In J. M. Awika, V. Piironen, S. Bean (Eds.), *Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion* (pp. 1–13). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1089.ch001>
10. Ayesiga, S.B., Rubaihayo, P., Oloka, B.M., Dramadri, I.O., Sserumaga, J.P. (2024). Genome-wide association study and pathway analysis to decipher loci associated with *Fusarium* ear rot resistance in tropical maize germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 71(6), 2435–2448. <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01793-4>

11. Ayliffe, M., Devilla, R., Mago, R., White, R., Talbot, M., Pryor, A., Leung, H. (2011). Nonhost resistance of rice to rust pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(9), 1143–1155. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0100>
12. Baird, D. (2004). *Thing knowledge: A philosophy of scientific instruments*. University of California Press.
13. Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 20(8), 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
14. 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. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9155-y>
15. Barceló, A.R., Pomar, F., López-Serrano, M., Pedreno, M.A. (2003). Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology*, 30(6), 577–591. <https://doi.org/10.1071/FP02096>
16. Battilani, P., Pietri, A., Barbano, C., Scandolara, A., Bertuzzi, T., Marocco, A. (2008). Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10433–10438. <https://doi.org/10.1021/jf801809d>
17. Bednarek, P., Osbourn, A. (2009). Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science*, 324(5928), 746–748. [10.1126/science.1171661](https://doi.org/10.1126/science.1171661)
18. Bily, A.C., Reid, L.M., Taylor, J.H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A.J., Bakan, B., Regnault-Roger, C., Pauls, K.P., Arnason, J.T., Hamilton, R.I. (2003). Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93(6), 712–719. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.712>
19. Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., Ausubel, F.M., Bolwell, G.P. (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47(6), 851–863. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02837.x>
20. Bisby, G.R., Bailey, D.L. (1923). Ear and root rots. *Fourth Annual Report of the Survey of the Prevalence of Plant Diseases in the Dominion of Canada*, 33.
21. Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., Tamiatti, G., Pietri, A. (2009). Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection, fumonisin and deoxynivalenol contamination of maize kernels. *World Mycotoxin Journal*, 2(4), 409–418.
22. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (dostęp: 2022, 2023, 2024)
23. Bocianowski, J. (2024). Using NGS Technology and Association Mapping to Identify Candidate Genes Associated with *Fusarium* Stalk Rot Resistance. *Genes*, 15(1), 106. <https://doi.org/10.3390/genes15010106>
24. Bocianowski, J., Majchrzak, L. (2019). Analysis of effects of cover crop and tillage method combinations on the phenotypic traits of spring wheat (*Triticum aestivum* L.)

- using multivariate methods. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(6), 15267–15276. http://dx.doi.org/10.15666/aecer/1706_1526715276
25. Bocianowski, J., Jakubowska, M., Zawada, D., Dobosz, R. (2022). The Effect of Acaricide Control of the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch on the Cultivation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) and on the Size and Quality of the Yield. *Applied Sciences*, 12(23), 12139. <https://doi.org/10.3390/app122312139>
 26. Bocianowski, J., Kozak, M., Liersch, A., Bartkowiak-Broda, I. (2011). A heuristic method of searching for interesting markers in terms of quantitative traits. *Euphytica*, 181(1), 89–100.
 27. Bode, W.M., Calvin, D.D. (1990). Yield-loss relationships and economic injury levels for European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) populations infesting Pennsylvania field corn. *Journal of Economic Entomology*, 83(4), 1595–1603.
 28. Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1367–1376. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1367>
 29. Booth, C. (1971). *Methods in microbiology*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(09\)70007-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(09)70007-8)
 30. Bouwer, G.A. (2020). Framework for effective *Bt* maize IRM Programs: Incorporation of lessons learned from *Busseola fusca* resistance development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 717. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00717>
 31. Brachi, B., Faure, N., Horton, M., Flahauw, E., Vazquez, A., Nordborg, M., Bergelson, J., Cuguen, J., Roux, F. (2010). Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. *PLoS Genetics*, 6(5), e1000940.¹ <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000940>
 32. Butrón, A., Reid, L.M., Santiago, R., Cao, A., Malvar, R.A. (2015). Inheritance of maize resistance to gibberella and *fusarium* ear rots and kernel contamination with deoxynivalenol and fumonisins. *Plant Pathology*, 64(5), 1053–1060. <https://doi.org/10.1111/ppa.12351>
 33. Butrón, A., Reid, L. M., Santiago, R., Cao, A., Malvar, R. A. (2015). Inheritance of maize resistance to gibberella and *fusarium* ear rots and kernel contamination with deoxynivalenol and fumonisins. *Plant Pathology*, 64(5), 1053–1060. <https://doi.org/10.1111/ppa.12351>
 34. Butrón, A., Santiago, R., Cao, A., Samayoa, L.F., Malvar, R.A. (2019). QTLs for resistance to *fusarium* ear rot in a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) maize population. *Plant Disease*, 103(5), 897–904.
 35. Butrón, A., Stantiago, R., Mansilla, P., Pintos-Varela, C., Ordas, A., Malvar, R.A. (2006). Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6113–6117. <https://doi.org/10.1021/jf0611163>
 36. Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F. (2004). *Fusarium* head blight: Epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of

- mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166(6), 1389–1415. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.004>
37. Chaudhari, P., Ahmed, B., Joly, D.L., Germain, H. (2014). Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. *Virulence*, 5(5), 703–709.
 38. Chen, J., Ding, J., Li, H., Li, Z., Sun, X., Li, J., Dai, X., Dong, H., Song, W., Chen, W. (2012). Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Molecular Breeding*, 30(4), 1649–1656. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9748-1>
 39. Chen, J., Shrestha, R., Ding, J., Zheng, H., Mu, C., Wu, J., Mahuku, G. (2016). Genome-wide association study and QTL mapping reveal genomic loci associated with *Fusarium* ear rot resistance in tropical maize germplasm. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(11), 3803–3815. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034561>
 40. Chepyshko, H., Lai, C.P., Huang, L.M., Liu, J.H., Shaw, J.F. (2012). Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics*, 13(1), 309. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-309>
 41. Chidgeavadze, Z.G., Beabealashvili, R.S., Atrazhev, A.M., Kukhanova, M.K., Azhayev, A.V., Krayevsky, A.A. (1984). 2',3'-Dideoxy-3' aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 12(3), 1671–1686. <https://doi.org/10.1093/nar/12.3.1671>
 42. Chukwudi, U.P., Kutu, F.R., Mavengahama, S. (2021). Mycotoxins in maize and implications on food security: A Review. *Agricultural Reviews*, 140(1), 42–49. <https://doi.org/10.18805/ag.R-140>
 43. Clements, M.J., Kleinschmidt, C.E., Maragos, C.M., Pataky, J.K., White, D.G. (2003). Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Disease*, 87(2), 147–153. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.147>
 44. Coan, M.M.D., Senhorinho, H.J.C., Pinto, R.J.B., Scapim, C.A., Tessmann, D.J., Williams, W.P., Warburton, M.L. (2018). Genome-wide association study of resistance to ear rot by *Fusarium verticillioides* in a tropical field maize and popcorn core collection. *Crop Science*, 58(2), 564–578. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.05.0322>
 45. Couto, D., Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537–552.
 46. Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826–833.
 47. De Jong, G., Pamplona, A.K.A., Von Pinho, R.G., Balestre, M. (2018). Genome-wide association analysis of ear rot resistance caused by *Fusarium verticillioides* in maize. *Genomics*, 110(5), 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.12.001>
 48. Delannoy, E., Jalloul, A., Assigbetsé, K., Marmey, P., Geiger, J. P., Lherminier, J., Nicole, M. (2003). Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(11), 1030–1038. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.11.1030>

49. Deng, B., Carter, R.A., Cheng, Y., Liu, Y., Eddy, L., Wyss, K.M., Ucak-Astarlioglu, M.G., et al. (2023). High-temperature electrothermal remediation of multi-pollutants in soil. *Nature Communications*, 14(1), 6371. <https://doi.org/10.1038/35081161>
50. Diversity Arrays Technology | Genotyping & data analysis experts. <https://www.diversityarrays.com/>, (dostęp: 2022, 2023, 2024)
51. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
52. Dragomir, V., Ioan Sebastian, B., Alina, B., Victor, P., Tanasă, L., Horhocea, D. (2022). An overview of global maize market compared to Romanian production. *Romanian Agriculture Research*, 39, 535–544.
53. Eller, M., Robertson-Hoyt, L.A., Payne, G.A., Holland, J.B. (2008). Grain yield and *Fusarium* ear rot of maize hybrids developed from lines with varying levels of resistance. *Maydica*, 53(3), 231–237.
54. Ellstrand, N.C., Garner, L.C., Hegde, S., Guadagnuolo, R., Blancas, L. (2007). Spontaneous hybridization between maize and teosinte. *Journal of Heredity*, 98(2), 183–187. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm002>
55. 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(5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
56. 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(5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
57. Escrivá, L., Font, G., Manyes, L. (2015). In vivo toxicity studies of *fusarium* mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 185–206. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.005>
58. Europejski Zielony Ład (European Green Deal, COM(2019) 640). (2019). Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady Europejskiej, Rady, Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów. Pobrane z <https://eur-lex.europa.eu/resource>.
59. Europejski Zielony Ład. (2021). Pobrane z: <https://www.consilium.europa.eu/pl/policies/green-deal/> (dostęp: 06.06.2024).
60. Fang, H., Shen, S., Wang, D., Zhang, F., Zhang, C., Wang, Z., Zhou, Q., Wang, R., Tao, H., He, F., Yang, C., Peng, M., Jing, X., Hao, Z., Liu, X., Luo, J., Wang, G.L., Ning, Y. (2022). Function of hydroxycinnamoyl transferases for the biosynthesis of phenolamides in rice resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(8), 776–786. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.06.014>
61. FAOSTAT. (2022). *Statistical Database of the Food and Agriculture of the United Nations*. FAO. Pobrane z <http://www.fao.org>.
62. Fernández-Pérez, F., Pomar, F., Pedreño, M.A., Novo-Uzal, E. (2015). Suppression of *Arabidopsis* peroxidase 72 alters cell wall and phenylpropanoid metabolism.¹ *Plant Science*, 239, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.001>

63. Flint-Garcia, S.A., Thuillet, A.C., Yu, J., Pressoir, G., Romero, S.M., Mitchell, S.E., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M., Buckler, E.S. (2005). Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal*, 44(6), 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02591.x>
64. Fritsch, L., Fischer, R., Wambach, C., Dudek, M., Schillberg, S., Schröper, F. (2015). Next-generation sequencing is a robust strategy for the high-throughput detection of zygosity in transgenic maize. *Transgenic Research*, 24(4), 615–623. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9864-x>
65. 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(4), 2241–2254. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.031393>
66. Garcia-Ceron, D., Lowe, R.G.T., McKenna, J.A., Brain, L.M., Dawson, C.S., Clark, B., Berkowitz, O.P., Whelan, J., Bleackley, M.R., Anderson, M.A. (2021). Extracellular Vesicles from *Fusarium graminearum* Contain Protein Effectors Expressed during Infection of Corn. *Journal of Fungi*, 7(11), 977. <https://doi.org/10.3390/jof7110977>
67. Gauthier, L., Atanasova-Penichon, V., Chéreau, S., Richard-Forget, F. (2015). Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24839–24872. <https://doi.org/10.3390/ijms161024839>
68. Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., Ashby, G.A., Thorneley, R.N.F. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal*, 313(3), 841–847. <https://doi.org/10.1042/bj3130841>
69. Ginter, A. (2021). *Małe gospodarstwa rolne wobec wyzwań zrównoważonego rozwoju i Zielonego Ładu*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. ISBN 978-83-66541-76-4.
70. Hawkins, N.J. (2019). Digest: Plant-pathogen coevolution extends to shifts in plant breeding systems. *Evolution*, 73(3), 628–629. <https://doi.org/10.1111/evo.13687>
71. Heather, J.M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
72. Hickey, L.T., Hafeez, A.N., Robinson, H., Jackson, S.A., Leal-Bertioli, S.C., Tester, M., Gao, C., Godwin, I.D., Hayes, B.J., Wulff, B.B.H. (2019). Breeding crops to feed 10 billion. *Nature Biotechnology*, 37(7), 744–754. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0152-9>
73. Hoenisch, R.W., Davis, R.M. (1994). Relationship between grain pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot. *Plant Disease*, 78(5), 517–519. doi:10.1094/PD-78-0517, 0191-2917
74. Hoenisch, R.W., Davis, R.M. (1994). Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. *Plant Disease*, 78(6), 578–580. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0517>
75. Hong, J.K., Choi, H.W., Hwang, I.S., Kim, D.S., Kim, N.H., Choi, D.S., et al. (2008). Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, *CaGLIP1*, in disease susceptibility

- and abiotic stress tolerance. *Planta*, 227(3), 539–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0637-5>
76. Hung, H.-Y., Holland, J.B. (2012). Diallel analysis of resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Science*, 52(5), 2173–2181. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0154>
 77. Hunkapiller, T., Kaiser, R.J., Koop, B.F., Hood, L. (1991). Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*, 254(5028), 59–67. <https://doi.org/10.1126/science.1925562>
 78. Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29(5), e25. <https://doi.org/10.1093/nar/29.4.e25>
 79. Jamiolkowska, A. (2020). Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, 10(2), 173. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020173>
 80. Ji, D., Li, L., Wang, Y., Zhang, J., Cheng, M., Sun, Y., Liu, Z., et al. (2014). The heaviest particulate air-pollution episodes occurred in northern China in January, 2013: Insights gained from observation. *Atmospheric Environment*, 92, 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.04.048>
 81. Ji, Z., Wang, M., Zhang, S., Du, Y., Cong, J., Yan, H., Guo, H., Xu, B., Zhou, Z. (2023). GDSE Esterase/Lipase GELP1 Involved in the Defense of Apple Leaves against *Colletotrichum gloeosporioides* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10343. <https://doi.org/10.3390/ijms241210343>
 82. Jimenez-Bremont, J.F., Marina, M., Guerrero-Gonzalez, M.D., Rossi, F.R., Sanchez-Rangel, D., Rodriguez-Kessler, M., Ruiz, O., Garriz, A. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 95. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00095>
 83. Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
 84. Kambara, H., Nishikawa, T., Katayama, Y., et al. (1988). Optimization of Parameters in a DNA Sequenator Using Fluorescence Detection. *Nature Biotechnology*, 6(7), 816–821. <https://doi.org/10.1038/nbt0788-816>
 85. Kanyuka, K., Rudd, J.J. (2019). Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.005>
 86. Kapela, K., Majchrowska-Safaryan, A. (2024). Mechaniczne i biologiczne metody ochrony roślin przed agrofagami w kontekście strategii Europejskiego Zielonego Ładu. *Progress in Plant Protection*, 64(3). <https://doi.org/10.14199/ppp-2024-013>
 87. 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(39), eaba3245. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3245>

88. Kilian, A., Huttner, E., Wenzl, P.E., Jaccoud, D.A., Carling, J.A., Caig, V.A., Evers, M. A., Heller-Uszynska, K.A., Cayla, C., Patarapuwadol, S., Xia, L. (2003). The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement. In *Proceedings of the international congress in the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution* (pp. 443-461). Avenue Media: Bologna, Italy.
89. Kilian, B., Graner, A. (2012). NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. *Briefings in Functional Genomics*, 11(1), 38–50. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elr046>
90. Korte, A., Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>
91. Kwaśna, H., Chełkowski, J. (1991). Ecology and taxonomy of *Fusarium* species in Poland. *Mycotoxin Research*, 7(Suppl 1), 58–63. <https://doi.org/10.1007/BF03192186>
92. Lanubile, A., Maschietto, V., Borrelli, V.M., Stagnat, L., Logrieco, A., Marocco, F.A. (2017). Molecular Basis of Resistance to *Fusarium* Ear Rot in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1774. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01774>
93. Lanubile, A., Pasini, L., Lo Pinto, M., Battilani, P., Prandini, A., Marocco, A. (2011). Evaluation of broad spectrum sources of resistance to *Fusarium verticillioides* and advanced maize breeding lines. *World Mycotoxin Journal*, 4(1), 43–51. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1206>
94. Li, Z.M., Ding, J.Q., Wang, R.X., Chen, J., Sun, X., Chen, W., Song, W., Dong, H., Dai, X., Xia, Z., Wu, J. (2011). A new QTL for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), 403–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0054-0>
95. Lin, Y., Zhang, C., Lan, H., Gao, S., Liu, H., Liu, J., Cao, M., Pan, G., Rong, T., Zhang, S. (2014). Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PLoS One*, 9(5), e95445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095445>
96. Ling, H. (2008). Sequence analysis of GDSL lipase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(5), 763–767. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.763.767>
97. Liskay, A., Kenk, B., Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217(5), 658–667. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1028-1>
98. Liskay, A., van der Zalm, E., Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 136(2), 3114–3123. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044784>
99. Liu, Y., Guo, Y., Ma, C., et al. (2016). Transcriptome analysis of maize resistance to *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 17(1), 477. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2780-5>
100. Luckey, J. A., Drossman, H., Kostichka, A.J., Mead, D.A., D'Cunha, J., Norris, T.B., Smith, L.M. (1990). High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 18(15), 4417–4421. ¹<https://doi.org/10.1093/nar/18.15.4417>

101. Mahalanobis, P.C. (1936). On the generalized distance in statistics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,² 12(1), 49–55. <http://hdl.handle.net/10263/6765>
102. Mano, Y., Omori, F. (2013). Flooding tolerance in interspecific introgression lines containing chromosome segments from teosinte (*Zea nicaraguensis*) in maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Annals of Botany*, 112(6), 1125–1139. <https://doi.org/10.1093/aob/mct160>
103. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
104. Martin, M., Dhillon, B.S., Miedaner, T., Melchinger, A.E. (2012). Inheritance of resistance to gibberella ear rot and deoxynivalenol contamination in five flint maize crosses. *Plant Breeding*, 131(1), 28–32. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01908.x>
105. Maschietto, V., Cinzia, C., Pirona, R., Pea, G., Strozzi, F., Marocco, A., Rossini, L., Lanubile, A. (2017). QTL Mapping and Candidate Genes for Resistance to *Fusarium* Ear Rot and Fumonisin Contamination in Maize. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–21. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-017-0970-1>
106. Meissler, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X., Vasileiadis, V.P., Otto, S., Antichi, D., Kiss, J., Pálkás, Z., Dorner, Z., van der Weide, R., Groten, J., Czembor, E., Adamczyk, J., Thibord, J.-B., Melander, B., Cordsen Nielsen, G., Poulsen, R.T., Zimmermann, O., Verschwele, A., Oldenburg, E. (2010). Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. *Journal of Applied Entomology*, 134(5), 357–375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01491.x>
107. Mesterhazy, A. (2024). Food Safety Aspects of Breeding Maize to Multi-Resistance against the Major (*Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus*) and Minor Toxigenic Fungi (*Fusarium* spp.) as Well as to Toxin Accumulation, Trends, and Solutions—A Review. *Journal of Fungi*, 10(1), 40. <https://doi.org/10.3390/jof10010040>
108. Mesterházy, Á., Lemmens, M., Reid, L.M. (2012). Breeding for resistance to ear rot caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. *Plant Breeding*, 131(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01936.x>
109. Michel, S., Wagner, C., Nosenko, T., Steiner, B., Samad-Zamini, M., Buerstmayr, M., Mayer, K., & Buerstmayr, H. (2021). Merging Genomics and Transcriptomics for Predicting *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat. *Genes*, 12(1), 114. <https://doi.org/10.3390/genes12010114>
110. Motte, H., Vercauteren, A., Depuydt, S., Landschoot, S., Geelen, D., Werbrouck, S., Goormachtig, S., Vuylsteke, M., Vereecke, D. (2014). Combining linkage and association mapping identifies RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1 as an essential *Arabidopsis* shoot regeneration gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8305–8310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404978111>

111. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (dostęp: 2022, 2023, 2024)
112. Ncube, E., Truter, M., Flett, B.C., Van Den Berg, J., Erasmus, A., Viljoen, A. (2020). Fungal mycoflora associated with *Busseola fusca* frass in maize plants. *African Entomology*, 28(2), 394–405. <https://doi.org/10.4001/003.028.0394>
113. Nei, M., Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States⁴ of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
114. Nelson, M.T. (1986). Interactions of divalent cations with single calcium channels from rat brain synaptosomes. *The Journal of General Physiology*, 87(2), 201–222. <https://doi.org/10.1085/jgp.87.2.201>
115. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J. (Eds.). (1981). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania State University Press. <https://doi.org/10.1085/jgp.87.2.201>
116. Netshifhefhe, N.E.I., Flett, B.C., Viljoen, A., Rose, L.J. (2018). Inheritance and genotype by environment analyses of resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in maize F1 hybrids. *Euphytica*, 214(2), 20. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2310-5>
117. Nguyen, Q.M., Iswanto, A.B.B., Son, G.H., Kim, S.H. (2021). Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4709. <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>
118. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
119. Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., Sharon, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*–maize interaction characterized by using a green fluorescent protein expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1695–1701. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1695-1701.2003>
120. Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
121. Passardi, F., Longet, D., Penel, C., Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879–1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.023>
122. Pedergnana, V., Syx, L., Cobat, A., Guernon, J., Brice, P., Fermé, C., Carde, P., et al. (2014). Combined linkage and association studies show that HLA class II variants control levels of antibodies against Epstein-Barr virus antigens. *PLoS One*, 9(7), e102501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102501>

123. Pérez-Brito, D., Jeffers, D., González-de-León, D., Khairallah, M., Cortés-Cruz, M., Velázquez-Cardelas, G., Azpíroz-Rivero, S., Srinivasan, G. (2001). QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in highland maize. *Agrociencia*, 35(2), 181–196.
124. Perry, E.D., Moschini, G. (2020). Neonicotinoids in US maize: insecticide substitution effects and environmental risk. *Journal of Environmental Economics and Management*, 102, 102320. <https://doi.org/10.1016/j.jeem.2020.102320>
125. Petit-Houdénot, Y., Fudal, I. (2017). Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1072. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>
126. Poland, J.A., Rife, T.W. (2012). Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*, 5(3). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.05.0005>
127. Presello, D.A., Reid, L.M., Butler, G., Mather, D.E. (2005). Pedigree selection for *Gibberella* ear rot resistance in maize populations. *Euphytica*, 143(1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-6149-0>
128. Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238(4825), 336–341. <https://doi.org/10.1126/science.2443975>
129. Rabinowicz, P.D., Schutz, K., Dedhia, N., Yordan, C., Parnell, L.D., Stein, L., McCombie, W.R., Martienssen, R.A. (1999). Differential methylation of genes and retrotransposons facilitates shotgun sequencing of the maize genome. *Nature Genetics*, 23(3), 305–308. <https://doi.org/10.1038/15479>
130. Rakyan, V.K., Hildmann, T., Novik, K.L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A.V., Andrews, T.D., Howe, K.L., Otto, T., Olek, A., Fischer, J., Gut, I.G., Berlin, K., Beck, S. (2004). DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biology*, 2(12), e405. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020405>
131. Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
132. Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., Foley, J.A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS One*, 8(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
133. Robertson, L.A., Kleinschmidt, C.E., White, D.G., Payne, G.A., Maragos, C.M., Holland, J.B. (2006). Heritability and correlations of *Fusarium* ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Science*, 46(1), 353–361. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0139>
134. Rodríguez-Moreno, L., Ebert, M.K., Bolton, M.D., Thomma, B.P. (2018). Tools of the crook-infection strategies of fungal plant pathogens. *The Plant Journal*, 93(4), 664–674. <https://doi.org/10.1111/tpj.13810>

135. ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 1126/2007 z dnia 28 września 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i produktach z kukurydzy.
136. Salah, N., Milad, S.I., El-Rouby, M., Barakat, M.N. (2016). Identification of New Molecular Markers Linked to Maize Stalk Rot Disease Resistance (*Fusarium moniliforme*) in Maize. *Plant Omics Journal*, 9(1), 12–18. doi/10.3316/informit.887250322351779
137. Sampietro, D.A., Vattuone, M.A., Presello, D.A., Fauguel, C.M., Catalán, C.A.N. (2009). The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection*, 28(2), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.09.010>
138. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
139. 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*. In *BMC Proceedings* (Vol. 5, Suppl 7, p. P54). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S7-P54>
140. Scauflaire, J., Mahieu, O., Louvieux, J., Foucart, G., Renard, F., Munaut, F. (2011). Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9787-1>
141. Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G., Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214(6), 821–828. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0699-8>
142. Shen, G., Sun, W., Chen, Z., Shi, L., Hong, J., Shi, J. (2022). Plant GDSEsterases/Lipases: Evolutionary, Physiological and Molecular Functions in Plant Development. *Plants*, 11(4), 468. <https://doi.org/10.3390/plants11040468>
143. Shendure, J., Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
144. Smith, L.M., Fung, S., Hunkapiller, M.W., Hunkapiller, T.J., Hood, L.E. (1985). The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 13(7), 2399–2412. <https://doi.org/10.1093/nar/13.7.2399>
145. Sobek, E.A., Munkvold, G.P. (1999). European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *Journal of Economic Entomology*, 92(3), 503–509. <https://doi.org/10.1093/jee/92.3.503>
146. Srdić, J., Nikolić, A., Pajić, Z., Mladenović Drinić, S., Filipović, M. (2011). Genetic similarity of sweet corn inbred lines in correlation with heterosis. *Maydica*, 56(3), 251–256. <https://doi.org/2279-8013.0025-6153>

147. Starzycka-Korbas, E., Weber, Z., Matuszczak, M., Bocianowski, J., Budzianowski, G., Stefanowicz, M., Starzycki, M. (2021). The diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates from western Poland. *Journal of Plant Pathology*, 103(1), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00705-0>
148. Stein, L.D. (2010). The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biology*, 11(5), 1–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-207>
149. Swerdlow, H., Gesteland, R. (1990). Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 18(6), 1415–1419. <https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1415>
150. Szőke, C., Zsubori, Z., Pók, I., Rácz, F., Illés, O., Szegedi, I. (2002). Significance of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübn.) in maize production. *Acta Agronomica Hungarica*, 50(4), 447–461. <https://doi.org/10.1556/AAgr.50.2002.4.8>
151. Tang, J., Yan, J., Ma, X., Teng, W., Wu, W., Dai, J., Dhillon, B., Melchinger, D., Li, J. (2010). Dissection of the genetic basis of heterosis in an elite maize hybrid by QTL mapping in an immortalized F₂ population. *Theoretical and applied genetics*, 120, 333–340.
152. Tran, T.N., Lanubile, A., Marocco, A., Pè, M.E., Dell’Acqua, M., Miculan, M. (2024). Transcriptome profiling of eight *Zea mays* lines identifies genes responsible for the resistance to *Fusarium verticillioides*. *BMC Plant Biology*, 24(1), 1107. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05697-y>
153. Uhse, S., Djamei, A. (2018). Effectors of plant-colonizing fungi and beyond. *PLoS Pathogens*, 14(4), e1006992. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006992>
154. Uwe, L., Miedaner, T., Bürstmayr, H., Vögele, R.T. (2020). *Breeding for Resistance to Fusarium Ear Diseases in Maize and Small-Grain Cereals Using Genomic Tools*. Faculty of Agricultural Sciences University of Hohenheim.
155. Vasileiadis, V.P., Otto, S., Sattin, M., Palinkás, Z., Veres, A., Bán, R., Kiss, J., Pons, X., Kudsk, P., Weide, R., Czembor, E., Moonen, C., Kiss, J. (2011). Crop protection in European maize-based cropping systems: Current practices and recommendations for innovative Integrated Pest Management. *Agricultural Systems*, 104(7), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2011.04.002>
156. Vigier, B., Reid, L.M., Dwyer, L.M., Stewart, D.W., Sinha, R.C., Arnason, J.T., Butler, G. (2001). Maize resistance to *Gibberella* ear rot: symptoms, deoxynivalenol, and yield. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(2), 99–105. <https://doi.org/10.1080/07060660109506915>
157. Voelkerding, K.V., Dames, S.A., Durtschi, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
158. Volokita, M., Rosilio-Brami, T., Rivkin, N., Zik, M. (2011). Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDSL-lipase family in land-plants. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 551–565. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq226>

159. Walley, J.W., Sartor, R.C., Shen, Z., Schmitz, R.J., Wu, K.J., Urich, M.A., Briggs, S.P. (2016). Integration of omic networks in a developmental atlas of maize. *Science*, 353(6301), 814–818. <https://doi.org/10.1126/science.aag1125>
160. Walters, D. (2003). Resistance to plant pathogens: Possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*, 159(1), 109–115. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00802.x>
161. Wang, Y., Zhou, Z., Gao, J., Wu, Y., Xia, Z., Zhang, H., Wu, J. (2016). The mechanisms of maize resistance to *Fusarium verticillioides* by comprehensive analysis of RNA-seq data. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1654. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01654>
162. Warfield, C.Y., Davis, R.M. (1996). Importance of husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. *Plant Disease*, 80(2), 208–210. , doi:10.1094/PD-80-0208, 0191-2917,
163. Warzecha, T., Bathelt, R., Skrzypek, E., Warchoń, M., Bocianowski, J., Sutkowska, A. (2023). Studies of Oat-Maize Hybrids Tolerance to Soil Drought Stress. *Agriculture*, 13(2), 243. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020243>
164. Wen, J., Shen, Y.Q., Xing, Y.X., Wang, Z.Y., Han, S.P., Li, S.J., Yang, C., Hao, D., Zhang, Y. (2020). QTL mapping of resistance to *Gibberella* ear rot in maize. *Molecular Breeding*, 40(10), 10. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01173-1>
165. Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, 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*,¹ 101(26), 9915–9920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401076101>
166. White, T.J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press,² Inc. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128184>
167. Williams, W.P., Windham, G.L. (2009). Diallel analysis of fumonisin accumulation in maize. *Field Crops Research*, 114(3), 324–326. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.08.005>
168. Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., Kamoun, S. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 235–247. doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933
169. Wittenberg, A.H.J., van der Lee, T., Cayla, C., Kilian, A., Visser, R.G.F., Schouten, H.J. (2005). Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(6), 624–632. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-1145-6>
170. Wojtasik, W., Kulma, A., Namysl, K., Preisner, M., Szopa, J. (2015). Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science*, 6, 291. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00291>

171. Wrzaszcz, W., Prandecki, K. (2020). Agriculture and the European Green Deal. *Zagadnienia Ekonomiki Rolnej/Problems of Agricultural Economics*, 365(4), 156–179. <https://doi.org/10.30858/zer/131>
172. Wu, Y., Zhou, Z., Dong, C., Chen, J., Ding, J., Zhang, X., Mu, C., Chen, Y., Li, X., Li, H., Han, Y., Wang, R., Sun, X., Li, J., Dai, X., Song, W., Chen, W., Wu, J. (2020). Linkage mapping and genome-wide association study reveals conservative QTL and candidate genes for *Fusarium* rot resistance in maize. *BMC Genomics*, 21(1), 357. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6733-7>
173. Xia, L., Peng, K., Yang, S., Wenzl, P., de Vicente, C., Fregene, M., Kilian, A. (2005). DArT for high-throughput genotyping of cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(6), 1092–1098. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-1937-4>
174. Xiao, Y., Liu, H., Wu, L., Warburton, M., Yan, J. (2017). Genome-wide association studies in maize: praise and stargaze. *Molecular Plant*, 10(3), 359–374. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.008>
175. Yu, J., Buckler, E.S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.003>
176. Yu, X., Feng, B.M., He, P., Shan, L.B. (2017). From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
177. Yuan, G., Shi, J., Zeng, C., Shi, H., Yang, Y., Zhang, C., Shen, Y. (2024). Integrated analysis of transcriptomics and defense-related phytohormones to discover hub genes conferring maize *Gibberella* ear rot caused by *Fusarium Graminearum*. *BMC Genomics*, 25(1), 733. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10656-w>
178. Zhang, F., Zhang, F., Wan, X.Q., Pan, G.T. (2007). Molecular mapping of QTL for resistance to maize ear rot caused by *Fusarium moniliforme*. *Agricultural Sciences in China*, 6(5), 491–496.
179. Zhang, X., Zheng, S., Yu, M., Xu, C., Li, Y., Sun, L., Qiu, X. (2024). Evaluation of Resistance Resources and Analysis of Resistance Mechanisms of Maize to Stalk Rot Caused by *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*, 108(2), 348–358. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0825-RE>
180. Zhou, G., Li, S., Ma, L., Wang, F., Jiang, F., Sun, Y., Ruan, X., Cao, Y., Wang, Q., Zhang, Y., Fan, X., Gao, X. (2021). Mapping and validation of a stable quantitative trait locus conferring maize resistance to gibberella ear rot. *Plant Disease*, 105(7), 1984–1991. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2487-RE>
181. Zijlstra, C., Lund, I., Justesen, A. F., Nicolaisen, M., Jensen, P.K., Bianciotto, V., Posta, K., Balestrini, R., Przetakiewicz, A., Czembor, E., de Zande, J. V. (2011). Combining novel monitoring tools and precision application technologies for integrated high-tech crop protection in the future (a discussion document). *Pest Management Science*, 67(6), 616–625. <https://doi.org/10.1002/ps.2134>
182. Zila, C.T., Ogut, F., Romay, M.C., Gardner, C.A., Buckler, E.S. (2014). Genome wide association study of *Fusarium* ear rot disease in the U.S.A. maize

- inbred line collection. *BMC Plant Biology*, 14(1), 372. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0372-6>
183. Zila, C.T., Samayoa, L.F., Santiago, R., Butrón, A., Holland, J.B. (2013). A genome-wide association study reveals genes associated with *fusarium* ear rot resistance in a maize core diversity panel. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(12), 2095–2104. <https://doi.org/10.1534/g3.113.007328>
184. Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.*, 35, 345-351 <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>

11. Spis tabel i rycin

TABELA 1. ZESTAWIENIE GENOTYPÓW REFERENCYJNYCH (ODPORNE I PODATNE NA PORAZENIE FUSARIUM SPP.).....	27
TABELA 2. INTERPRETACJA SKALI SŁUŻĄCEJ DO OCENY ZASIEDLENIA KOLB PRZEZ GRZYBY Z RODZAJU FUSARIUM SPP.	31
TABELA 3. SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ PCR DLA POJEDYNCZEJ REAKCJI I REAKCJI MULTIPLEX	37
TABELA 4. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH GENÓW KANDYDUJĄCYCH I GENÓW REFERENCYJNYCH	39
TABELA 5. ŚREDNIE KWADRATY DLA STOPNIA PORAZENIA 186 MIESZAŃCÓW KUKURYDZY PRZEZ FUZARIUM.....	46
TABELA 6. KORELACJE POMIĘDZY STOPNIEM PORAZENIA MIESZAŃCÓW KUKURYDZY POKOLENIA F1 PRZEZ FUZARIUM, A CECHAMI STRUKTURY PŁONU W SMOLICACH	48
TABELA 7. KORELACJE POMIĘDZY STOPNIEM PORAZENIA MIESZAŃCÓW KUKURYDZY POKOLENIA F1 PRZEZ FUZARIUM, A CECHAMI STRUKTURY PŁONU W SMOLICACH	49
TABELA 8. STOPIEŃ PORAZENIA PRZEZ FUSARIUM SPP. POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW REFERENCYJNYCH	49
TABELA 9. MARKERY MOLEKULARNE SILICOdART I SNP ISTOTNIE ZWIĄZANE Z ODPORNOŚCIĄ KUKURYDZY NA FUZARIOZĘ KOLB (ISTOTNE POWIĄZANIA WYBRANE PRZY $p < 0,05$ Z POPRAWKĄ NA WIELOKROTNE TESTOWANIE METODĄ BENJAMINI-HOCHBERG, $LOD > 3.0$).....	52
TABELA 10. CHARAKTERYSTYKA I POŁOŻENIE MARKERÓW ISTOTNIE ZWIĄZANYCH Z ODPORNOŚCIĄ ROŚLIN NA FUZARIUM	57
TABELA 11. SEKWENCJE ZAPROJEKTOWANYCH STARTERÓW SŁUŻĄCE DO IDENTYFIKACJI WYTYPOWANYCH MARKERÓW ZWIĄZANYCH Z ODPORNOŚCIĄ ROŚLIN NA FUZARIUM	60
TABELA 12. IDENTYFIKACJA MARKERÓW MOLEKULARNYCH ZWIĄZANYCH Z ODPORNOŚCIĄ ROŚLIN NA FUZARIUM OBECNYCH W ANALIZOWANYCH LINIACH.....	63
TABELA 13. EFEKT MARKERÓW MOLEKULARNYCH ZWIĄZANYCH Z ODPORNOŚCIĄ NA FUZARIUM VERTICILLIOIDES	66
TABELA 14. CHARAKTERYSTYKA MARKERÓW MOLEKULARNYCH ZWIĄZANYCH Z ODPORNOŚCIĄ NA FUZARIUM SPP.	69
TABELA 15. ZMIANY POZIOMÓW EKSPRESJI PO INOKULACJI (W STOSUNKU DO EKSPRESJI PRZED INOKULACJĄ - 0h) DLA CZTERECH GENÓW	72
TABELA 16. MAPA CIEPŁA ZMIAN POZIOMÓW EKSPRESJI 4 GENÓW, W WYBRANYCH NARZĄDACH I TKANKACH Z. MAYS. PRZEDSTAWIONO NUMERY LOCUS I NUMER AKCESYJNY, KTÓRE UMOŻLIWIŁY ANALIZĘ DANYCH TRANSKRYPTOMOWYCH. MAPA CIEPŁA PRZEDSTAWIA WARTOŚCI FRAGMENTÓW NA KILOBAZĘ NA MILION ZMAPOWANYCH FRAGMENTÓW (FPKM) W DANYCH TRANSKRYPTOMOWYCH UZYSKANYCH OD WALLEY I IN. (2016). DLA KAŻDEGO GENU (KOLUMN) INTENSYWNOŚĆ CZERWIENI WSKAZUJE NA WYŻSZĄ EKSPRESJĘ GENU, INTENSYWNOŚĆ ZIELENI WSKAZUJE NA NIŻSZĄ EKSPRESJĘ GENU, PODCZAS GDY UMIARKOWANE WARTOŚCI EKSPRESJI GENU SĄ OZNACZONE NA ŻÓŁTO-POMARAŃCZOWO.	78
FOT 1. POLETKO DOŚWIADCZALNE W HODOWLI ROŚLIN W SMOLICACH W CZERWCU 2021 ROKU (FOT. SOBIECH).....	30
FOT 2. POLETKO DOŚWIADCZALNE W HODOWLI ROŚLIN W SMOLICACH W PAŹDZIERNIKU 2021 ROKU (FOT. ARCHIWUM HR SMOLICE).....	30
FOT 3. KOLBY KUKURYDZY ZEBRANE Z POLETEK DOŚWIADCZALNYCH W HODOWLI ROŚLIN W SMOLICACH, O RÓŻNYM STOPNIU PORAZENIA PRZEZ FUSARIUM SPP. PATRZĄC OD LEWEJ: KOLBA 1 – STOPIEŃ PORAZENIA 7, KOLBA 2 – STOPIEŃ PORAZENIA 5, KOLBA 3 – STOPIEŃ PORAZENIA 3 (FOT. SOBIECH, TOMKOWIAK).....	31
FOT 4. KOLBA KUKURYDZY PRZED ZBIOREM NA POLETKU DOŚWIADCZALNYM W HODOWLI ROŚLIN W SMOLICACH Z WIDOCZNYMI OBJAWAMI FUZARIOZY (FOT. Z ARCHIWUM HR SMOLICE).....	32

RYCINA 1. SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY ORGANIZACJĘ SYSTEMU ODPORNOŚCIOWEGO ROŚLIN Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH TYPÓW ODPOWIEDZI OBRONNYCH (SOBIECH)	19
RYCINA 2. ŚREDNIA MIESIĘCZNA TEMPERATURA I ŚREDNIA MIESIĘCZNA SUMA OPADÓW W MIEJSCOWOŚCI SMOLICE W LATACH 2021 I 2022.....	29
RYCINA 3. ŚREDNIA MIESIĘCZNA TEMPERATURA I ŚREDNIA MIESIĘCZNA SUMA OPADÓW W MIEJSCOWOŚCI KOBIERZYCE W LATACH 2021 I 2022	29
RYCINA 4. WYKRES STOPNIA PORAŻENIA PRZEZ FUZARIUM DLA 186 LINII WSOBNYCH DWÓCH LOKALIZACJACH (KOLORY OZNACZAJĄ STOPIEŃ PORAŻENIA)	44
RYCINA 5. WYKRES GĘSTOŚCI STOPNIA PORAŻENIA PRZEZ FUZARIUM 64. LINII WSOBNYCH I 122. MIESZAŃCÓW F ₁	45
RYCINA 6. WYKRES GĘSTOŚCI STOPNIA PORAŻENIA PRZEZ FUZARIUM 186. MIESZAŃCÓW F ₁	45
RYCINA 7. ROZKŁAD STOPNIA PORAŻENIA ROŚLIN KUKURYDZY PRZEZ FUZARIUM W MIEJSCOWOŚCI SMOLICE	46
RYCINA 8. ROZKŁAD STOPNIA PORAŻENIA ROŚLIN KUKURYDZY PRZEZ FUZARIUM W MIEJSCOWOŚCI KOBIERZYCE	47
RYCINA 9. MAPA CIEPŁA PRZEDSTAWIAJĄCA KORELACJE POMIĘDZY STOPNIEM PORAŻENIA MIESZAŃCÓW KUKURYDZY POKOLENIA F ₁ PRZEZ FUZARIUM, A CECHAMI STRUKTURY PŁONU W SMOLICACH.....	47
RYCINA 10. MAPA CIEPŁA PRZEDSTAWIAJĄCA KORELACJE POMIĘDZY STOPNIEM PORAŻENIA MIESZAŃCÓW KUKURYDZY POKOLENIA F ₁ PRZEZ FUZARIUM, A CECHAMI STRUKTURY PŁONU W KOBIERZYCACH.....	48
RYCINA 11. STOPIEŃ ZASIEDLENIA ZIARNIAKÓW BADANYCH GENOTYPÓW KUKURYDZY PRZEZ GRZYBY Z RODZAJU FUSARIUM SPP., Z UWZGLĘDNIENIEM PROCENTOWOŚCI UDZIAŁU POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW PATOGENU.....	51
RYCINA 12. DENDROGRAM PODOBIENSTWA GENETYCZNEGO POMIĘDZY ANALIZOWANYMI 186 LINIAMI WSOBNYMI SKONSTRUOWANY NA PODSTAWIE ZIDENTYFIKOWANYCH MARKERÓW MOLEKULARNYCH SILICO DART I SNP (PUBLIKACJA 1).....	54
RYCINA 13. DENDROGRAM PODOBIENSTWA GENETYCZNEGO POMIĘDZY ANALIZOWANYMI 64 LINIAMI WSOBNYMI I 122 MIESZAŃCAMI POKOLENIA F ₁ , WYZNACZONY NA PODSTAWIE ZIDENTYFIKOWANYCH MARKERÓW MOLEKULARNYCH SILICO DART I SNP (PUBLIKACJA 4)	55
RYCINA 14. DENDROGRAM PODOBIENSTWA GENETYCZNEGO POMIĘDZY ANALIZOWANYMI 186 MIESZAŃCAMI POKOLENIA F ₁ , WYZNACZONY NA PODSTAWIE ZIDENTYFIKOWANYCH MARKERÓW MOLEKULARNYCH SILICO DART I SNP	56
RYCINA 15. DENDROGRAM GRUPOWANIA 30 GENOTYPÓW KUKURYDZY NA PODSTAWIE WSZYSTKICH MARKERÓW MOLEKULARNYCH.....	67
RYCINA 16. ROZKŁAD 30 LINII KUKURYDZY W PRZESTRZENI DWÓCH PIERWSZYCH SKŁADOWYCH GŁÓWNYCH.....	68
RYCINA 17. EKSPRESJA BADANYCH GENÓW W ODNIESIENIU DO CZASU 0 DLA GENOTYPU PODATNEGO NA PORAŻENIE FUARIUM SPP.	73
RYCINA 18. EKSPRESJA BADANYCH GENÓW W STOSUNKU DO CZASU 0 W GENOTYPACH ODPORNÝCH NA PORAŻENIE FUARIUM SPP.	74
RYCINA 19. MAPY CIEPŁA PRZEDSTAWIAJĄCE PROFILE EKSPRESJI UZYSKANE PRZY UŻYCIU ILOŚCIOWEJ ANALIZY PCR W CZASIE RZECZYWISTYM; A- GENU F1 (GEN GDSL ESTERAZY/LIPAZY AT4G01130 PREKURSÓR NIESCHARAKTERYZOWANEGO PREKURSÓRA BIAŁKA), B- GENU F2 (HYDROKSYCYNAMLOTANSFERAZA PUTRESCYNY, LOC103649226), C- GENU F3 (NIESCHARAKTERYZOWANE BIAŁKO), D- GENU F4 (GEN PREKURSÓRA PEROKSYDAZY 72 I BIAŁKO ZAWIERAJĄCE POWTÓRZENIA PENTATRIOPEPTYDOWE AT5G57250, MITOCHONDRIALNY)	75
RYCINA 20. MAPA CIEPŁA WSPÓŁCZYNNIKÓW KORELACJI LINIOWEJ PEARSONA MIĘDZY ANALIZOWANYMI GENAMI NA PODSTAWIE WARTOŚCI ICH INDYWIDUALNYCH PROFILI EKSPRESJI. ISTOTNOŚĆ KORELACJI PARAMI JEST ZAZNACZONA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. SCHEMAT KOLORÓW MAPY CIEPLNEJ (OZNACZONY NA DOLE) INFORMUJE O BARDZIEJ POZYTYWNYCH (CZERWONY ODCIEŃ) LUB NEGATYWNYCH (NIEBIESKI ODCIEŃ) KORELACJACH.....	76
RYCINA 21. ROZKŁAD KOMBINACJI GENOTYPÓW I WYRAŻEŃ UKŁADU DWÓCH PIERWSZYCH ZMIENNYCH KANONICZNYCH: V ₁ - PIERWSZA ZMIENNA KANONICZNA I V ₂ - DRUGA ZMIENNA KANONICZNA.....	77

12.Opublikowane prace wchodzące w skład zbioru

**P1:Associative and Physical Mapping of Markers Related to
Fusarium in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation
Sequencing (NGS).**

**Sobiech, A., Tomkowiak, A., Nowak, B., Bocianowski, J., Wolko, Ł.,
Spychała, J.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(11), 6105. (2022).

<https://doi.org/10.3390/ijms23116105>



Article

Associative and Physical Mapping of Markers Related to *Fusarium* in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation Sequencing (NGS)

Aleksandra Sobiech ^{1,*} , Agnieszka Tomkowiak ¹ , Bartosz Nowak ², Jan Bocianowski ³ , Łukasz Wolko ⁴ and Julia Spychała ¹

- ¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl (A.T.); julia.spychala@up.poznan.pl (J.S.)
² Smolice Plant Breeding Ltd., Co., National Research Institute Group, Smolice 146, 63-740 Kobylin, Poland; nowak@hrsmolice.pl
³ Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań, Poland; jan.bocianowski@up.poznan.pl
⁴ Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; lukasz.wolko@up.poznan.pl
* Correspondence: aleksandra.sobiech@up.poznan.pl



Citation: Sobiech, A.; Tomkowiak, A.; Nowak, B.; Bocianowski, J.; Wolko, Ł.; Spychała, J. Associative and Physical Mapping of Markers Related to *Fusarium* in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation Sequencing (NGS). *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6105. <https://doi.org/10.3390/ijms23116105>

Academic Editor: Wenxue Li

Received: 13 April 2022

Accepted: 27 May 2022

Published: 29 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: On the basis of studies carried out in the last few years, it is estimated that maize diseases cause yield losses of up to 30% each year. The most dangerous diseases are currently considered to be caused by fungi of the genus *Fusarium*, which are the main culprits of root rot, ear rots, and stalk rot. Early plant infection causes grain diminution, as well as a significant deterioration in nutritional value and fodder quality due to the presence of harmful mycotoxins. Therefore, the aim of the research was to identify new markers of the SilicoDArT and SNP type, which could be used for the mass selection of varieties resistant to fusarium. The plant material consisted of 186 inbred maize lines. The lines came from experimental plots belonging to two Polish breeding companies: Plant Breeding Smolice Ltd., (Co., Kobylin, Poland). Plant Breeding and Acclimatization Institute—National Research Institute Group (51°41'23.16" N, 17°4'18.241" E), and Małopolska Plant Breeding Kobierzyce, Poland Ltd., (Co., Kobierzyce, Poland) (50°58'19.411" N, 16°55'47.323" E). As a result of next-generation sequencing, a total of 81,602 molecular markers were obtained, of which, as a result of the associative mapping, 2962 (321 SilicoDArT and 2641 SNP) significantly related to plant resistance to fusarium were selected. Out of 2962 markers significantly related to plant resistance in the fusarium, seven markers (SilicoDArT, SNP) were selected, which were significant at the level of 0.001. They were used for physical mapping. As a result of the analysis, it was found that two out of seven selected markers (15,097—SilicoDArT and 58,771—SNP) are located inside genes, on chromosomes 2 and 3, respectively. Marker 15,097 is anchored to the gene encoding putrescine N-hydroxycinnamoyltransferase while marker 58,771 is anchored to the gene encoding the peroxidase precursor 72. Based on the literature data, both of these genes may be associated with plant resistance to fusarium. Therefore, the markers 15,097 (SilicoDArT) and 58,771 (SNP) can be used in breeding programs to select lines resistant to fusarium.

Keywords: maize; fusarium; molecular markers; NGS; association mapping

1. Introduction

Maize (*Zea mays* L.), along with rice, is the most commonly cultivated crop for, inter alia, human and animal consumption [1]. In the last decade, many factors such as the increase in air temperatures, expansion of the acreage and intensification of cultivation, the introduction of agrotechnical simplifications, and the emergence of new species pathogens have significantly increased the threat to the height and quality of maize crops. It is

estimated that maize diseases cause yield losses of up to 30% each year. The quality of the yield also deteriorates [2].

At present, the most dangerous diseases caused by fungi of the genus *Fusarium* spp., which are the main culprits of root rot, ear rots stalk rot., Ear rot, except in cases of severe occurrence, causes slight losses in yield, but greatly deteriorates the quality of grain and fodder as a product for further processing [3].

Often, the symptoms of fusariosis caused by fungi of the genus *Fusarium* spp. are not clearly visible on the cob, but inside, the infestation progresses, leading to the accumulation of mycotoxins [4]. Secondary metabolites of these pathogens contained in food and feed obtained from contaminated grain are very harmful to humans and animals [5,6]. The most common culprit of ear rot is the fungi *Fusarium graminearum* (producing deoxynivalenol—DON and zearalenone—ZON) and *Fusarium verticillioides* (producing fumonisins—FUM).

In addition to the above-mentioned, they can also be accumulated in caryopsis and other parts: trichothecenes, among others T-2 toxin and diacetoxyscirpenol-DAS, ochratoxin A, HT-2 toxin, aflatoxins, etc. These substances can cause many diseases in humans, including various types of allergies, hormonal disorders, and cancer (they activate oncogenic cells). Their presence in the feed is also a great threat to the health and life of animals, especially pigs and poultry, because they cause increased sensitivity to infectious agents that under standard conditions, without the additional action of toxin-producing fungal metabolites, would not be able to cause disease. In addition, they negatively affect production results [7].

In 2007, the European Union introduced standards defining the maximum content of mycotoxins in maize grain (EC No. 1126/2007). If the content of DON in unprocessed grain exceeds 1700 µg/kg, ZEA 350 µg/kg, and FUM 4000 µg/kg, such grain is not eligible for feed use. Breeding and using in the cultivation of varieties less susceptible to infection by fungi of the genus *Fusarium* ssp. Are widely recognized as the most cost-effective and environmentally friendly method of protecting plants against disease infestation [3,8]. In the case of maize, the use of fungicides is difficult and often ineffective, because it is difficult to assess the severity of the disease [9]. *Fusarium* infestation of plants can also be minimized by reducing the occurrence of pests that damage the corn cobs during feeding [10,11].

Fusarium resistance is a polygenic trait and is strongly influenced by environmental factors. This type of resistance is very complex, making it difficult to breed, and with the result that most commercial maize hybrids have a lower level of resistance than desired [12].

In the era of rapid development of molecular biology tools, it is important to identify markers related to genes influencing resistance to fusarium—in order to facilitate the selection of resistant genotypes. Maschietto et al. [13] demonstrated the usefulness of SSR, GBS markers, transcriptomics, and QLT mapping to improve the selection of lines resistant to fusarium.

In breeding programs, it is recommended to use genomic selection to use molecular markers importantly related to immunity as permanent effects in genotypic value prediction models [14].

Rapid advances in Next Generation Sequencing (NGS) have made it possible to sequence the genome of many crops. High-throughput genotyping methods such as GBS and SNP enable rapid genome profiling to provide growers with detailed information on traits relevant to cultivation. High-resolution genotyping may therefore be the key to revitalizing phenotypic diversity in response to climate change [15].

Next-generation sequencing (NGS) and microarray methods have been used to identify the molecular mechanisms involved in *F. verticillioides* infection in resistant and susceptible maize genotypes [16,17]. All of these studies compared the response of resistant and susceptible lines to infection taking into account the early (12–48 h post-inoculation) and late (72–120 h post-inoculation) stages of infection. RNAseq made it possible to identify several thousand genes with different expressions and led to the possibility of discovering new genes expressed [18].

Diversity Arrays Technology (DArT) is a technology that does not require sequence information [19]. It uses a number of clones resulting from the amplification of restriction fragments. This method allows the screening of hundreds of molecular markers simultaneously throughout the genome. It can therefore be used to create genomic maps in plant breeding programs, especially in the context of studying traits with complex inheritance, and to analyze genetic diversity and expand information on the structure of the population of crops [20,21].

Genome wide association studies (GWAS) are a useful tool for the identification of candidate genes, especially when combined with QTL mapping to validate loci for quantitative traits. Zila et al. [22,23] conducted GWAS tests on maize to detect SNPs associated with increased resistance to fusarium. They identified ten SNP markers significantly associated with resistance to this pathogen [22,23]. Zila et al. [22] identified defense response SNPs in or around five genes that had not previously been correlated with disease resistance, but whose predicted gene functions involved a programmed cell death pathway.

Genomic selection (GS) by incorporating associations of SNPs detected with GWAS is a promising tool to improve fusarium resistance in maize [24].

Therefore, the aim of the research is to identify new markers of the SilicoDART and SNP type, which can be used for the mass selection of varieties resistant to fusarium.

2. Results

2.1. Phenotyping

The establishment of a field experiment with 186 corn inbred lines in two localities, Kobierzyce and Smolice, allowed for the necessary observations of the degree of cobs infestation by the fusarium. Inbred lines derived from hybrid varieties available on the Polish market were used for this study. They are characterized mainly by Dent grain types. Hybrids, from which inbred lines were derived, belonged to BSSS and non-BSSS origin groups, mainly Iodent and Lancaster. The method used to assess cob fusariosis infection was: the “visually moldy kernels” method. Table 1 shows the mean values of the eight observations according to the BBCH scale in two localities. The degree of infection of maize plants (cobs) by fusarium was presented on a 9-point scale. According to the COBORU scale (Central Research Centre for Cultivar Testing): 9—resistant, 1—susceptible. Due to favorable weather conditions during the entire growing season, most of the analyzed lines were highly resistant to fusarium (9). The most susceptible to infection were the lines from Smolice: S124, whose resistance was 6.0 in the field in Smolice and 5.7 in the field in Kobierzyce, and S140, whose resistance was 7.0 in the field in Smolice and 6.7 in the field in Kobierzyce (Table 1).

Table 1. The degree of infection of the maize line by the fusarium in Kobierzyce and Smolice (average of all observations made).

Line Number	Line Name	The Degree of Infection (9-Point Scale)		Line Number	Line Name	The Degree of Infection (9-Point Scale)		Line Number	Line Name	The Degree of Infection (9-Point Scale)	
		Smolice	Kobierzyce			Smolice	Kobierzyce			Smolice	Kobierzyce
1	S001	7	7.7	63	S063	9	9	125	S125	9	8.7
2	S002	8	8.3	64	S064	9	9	126	S126	9	8.7
3	S003	9	9	65	S065	7	8.7	127	S127	9	9
4	S004	9	9	66	S066	9	9	128	S128	7	7.3
5	S005	9	9	67	S067	9	9	129	S129	8	8.3
6	S006	9	9	68	S068	9	9	130	S130	9	8.7
7	S007	9	8.7	69	S069	9	9	131	S131	8	8.7
8	S008	8	8	70	S070	9	9	132	S132	7	7
9	S009	9	9	71	S071	9	9	133	S133	8	8.3
10	S010	9	9	72	S072	9	9	134	S134	8	7.5
11	S011	9	9	73	S073	9	8.7	135	S135	9	8.7
12	S012	9	9	74	S074	9	8.7	136	S136	8	9
13	S013	7	7.7	75	S075	9	9	137	S137	8	8.3
14	S014	9	9	76	S076	9	8.7	138	S138	9	9
15	S015	9	9	77	S077	9	8.7	139	S139	9	8.7

Table 1. Cont.

Line Number	Line Name	The Degree of Infection (9-Point Scale)		Line Number	Line Name	The Degree of Infection (9-Point Scale)		Line Number	Line Name	The Degree of Infection (9-Point Scale)	
		Smolice	Kobierzyce			Smolice	Kobierzyce			Smolice	Kobierzyce
16	S016	8	8.3	78	S078	9	9	140	S140	7	6.7
17	S017	9	9	79	S079	9	9	141	S141	9	9
17	S018	8	9	80	S080	9	9	142	S142	9	9
18	S019	9	9	81	S081	9	9	143	S143	9	9
20	S020	9	8.7	82	S082	9	9	144	S144	9	8.7
21	S021	9	9	83	S083	9	9	145	S145	9	9
22	S022	8	8.3	84	S084	9	9	146	S146	9	9
23	S023	9	9	85	S085	9	8.7	147	S147	9	9
24	S024	8	9	86	S086	8	9	148	S148	9	8.7
25	S025	9	9	87	S087	8	9	149	S149	8	8
26	S026	9	9	88	S088	9	9	150	S150	9	9
27	S027	9	9	89	S089	9	9	151	K001	9	9
28	S028	9	9	90	S090	9	9	152	K002	9	8.7
29	S029	9	9	91	S091	8	8.3	153	K003	9	8.7
30	S030	9	9	92	S092	9	9	154	K004	9	9
31	S031	9	8.7	93	S093	8	8.7	155	K005	8	8.3
32	S032	9	9	94	S094	9	8.7	156	K006	8	8
33	S033	9	9	95	S095	9	8.7	157	K007	9	8.7
34	S034	9	8.7	96	S096	9	9	158	K008	9	9
35	S035	7	8.3	97	S097	9	9	159	K009	8	8.3
36	S036	9	9	98	S098	9	9	160	K010	8	8.7
37	S037	9	8.7	99	S099	9	9	161	K011	9	9
38	S038	9	9	100	S100	9	8.7	162	K012	9	9
39	S039	8	9	101	S101	9	9	163	K013	9	9
40	S040	9	9	102	S102	9	9	164	K014	9	9
41	S041	9	9	103	S103	9	9	165	K015	9	9
42	S042	9	9	104	S104	9	9	166	K016	8	8.3
43	S043	9	9	105	S105	9	8.7	167	K017	9	8.7
44	S044	9	9	106	S106	8	8.3	168	K018	9	9
45	S045	9	8.7	107	S107	8	7.7	169	K019	9	9
46	S046	9	9	108	S108	9	8.7	170	K020	8	8
47	S047	9	9	109	S109	9	9	171	K021	9	9
48	S048	8	9	110	S110	9	8.7	172	K022	8	8.3
49	S049	7	7	111	S111	8	8	173	K023	9	9
50	S050	9	9	112	S112	9	8.7	174	K024	9	9
51	S051	7	7.3	113	S113	9	8.7	175	K025	9	9
52	S052	9	9	114	S114	9	8.7	176	K026	9	9
53	S053	8	8.3	115	S115	9	9	177	K027	9	9
54	S054	9	9	116	S116	9	9	178	K028	7	7.7
55	S055	9	9	117	S117	9	9	179	K029	9	9
56	S056	9	9	118	S118	9	9	180	K030	8	8.3
57	S057	9	9	119	S119	9	9	181	K031	9	9
58	S058	9	8.7	120	S120	8	8	182	K032	8	8.3
59	S059	9	9	121	S121	9	9	183	K033	9	9
60	S060	9	9	122	S122	9	8.7	184	K034	9	9
61	S061	9	8.7	123	S123	8	8.3	185	K035	9	9
62	S062	9	9	124	S124	6	5.7	186	K036	9	9

In the first stage, the analysis of variance was made. Analysis was carried out in terms of observations concerning the degree of plant infestation by the fusarium. The analysis of variance indicated that the main effect of lines, as well as line $\times$ location interaction, were statistically significant in the degree of plant infestation by the fusarium. The differences in the degree of plant infestation by the fusarium between locations were not significant (Table 2). Significant correlations were also found between the degree of plant infection by the fusarium in Smolice and Kobierzyce ($r = 0.8898$, $p < 0.001$).

Table 2. Values of F -statistics from two-way analysis of variance for the degree of plant infestation by the fusarium.

Source of Variation	The Number of Degrees of Freedom	F Statistic
Location	1	0.18
Lines	251	16.22 ***
Location $\times$ line interaction	251	25.73 ***

*** $p < 0.001$.

2.2. DNA Isolation

The efficiency of a single isolation using the Wizard® (Madison, WI, USA) Genomic DNA Purification Kit was very good and ranged from 107 ng/μL for line 16 to 690 ng/μL for line 159. The purity of individual DNA samples allowed for their direct medium use for next-generation sequencing. The purity ranged from 1.7 to 2.0 for both 260/280 and 260/230 absorbance. Immediately before sending the sample, the concentration was adjusted to the same 100 μg/μL.

2.3. Genotyping

Next-generation sequencing was made on 186 lines. The same lines were also observed eight times, under field conditions, for the infestation of corn cobs by fungi of the *Fusarium* genus. By performing sequencing analyzes, molecular markers SilicoDArT in the amount of 53,031 and SNP in the amount of 28,571 were identified. These markers were used to estimate the genetic similarity between the analyzed corn inbred lines (Figure 1). We can generally distinguish four main groups. The first group includes two lines from Plant Breeding (PB) in Kobierzyce (K037 and K038). These lines are 63% similar. The second group is also made up of two lines (S145 and S132), 51% similar to each other, coming from PB in Smolice (Figure 1). In the third large group, we can distinguish three subgroups. There are 25 lines in the first sub-group, 23 lines in the second, and 25 lines in the third. In all these subgroups lines derived from PB in Smolice constitute 87.5%, and the remaining 12.5% are lines derived from PB in Kobierzyce (Figure 1). The fourth main group is also made up of three subgroups (109 lines in total). Genotypes with PB in Kobierzyce (65%) dominate in the first subgroup, while in the second and third subgroups with PB in Smolice. When analyzing the dendrogram, it can be noticed that the lines are grouped depending on belonging to a given breeding company, moreover, the lines from PB in Smolice show greater similarity with each other than with the lines from Kobierzyce and vice versa, the lines from Kobierzyce are more similar. To each other than to the line from Smolice.

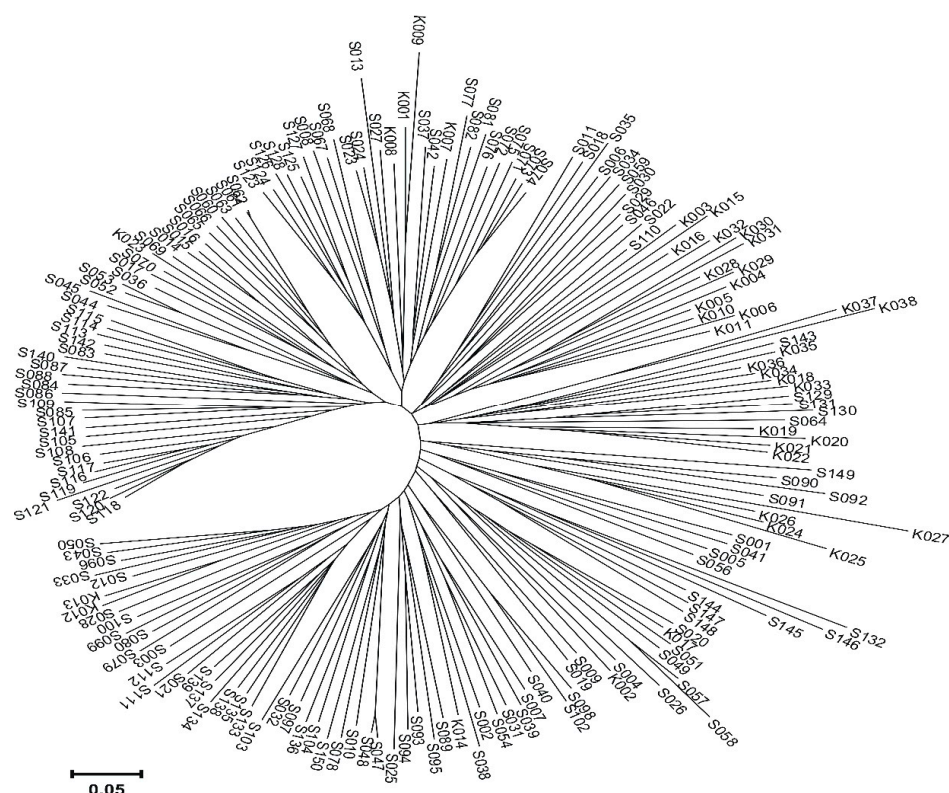


Figure 1. Dendrogram of genetic similarity between the analyzed lines, determined based on the identified molecular markers SilicoDArT and SNP.

2.4. Associative Mapping Using GWAS Analysis

Of the 81,602 molecular markers (53,031 SilicoDArT and 28,571 SNPs) obtained by next-generation sequencing, 2962 (321 SilicoDArT and 2641 SNPs) are significantly related to the resistance of maize plants to ear rot were selected (Table 3). In order to narrow down the number of markers for physical mapping, seven were selected from all significant ones, which were significant at the level of 0.001. Analysis of variance indicated that the main effects of line, as well as location-by-line interaction, were significant for the degree of plant infestation by the fusarium.

Table 3. Molecular markers of SilicoDArT and SNP significantly related to the resistance of maize to ear rot (significant associations selected at $p < 0.05$ corrected for multiple testing by the Benjamini-Hochberg method).

Location		Kobierzyce	Smolice	Total
The number of significant markers	SilicoDArT	136	185	321
	SNP	1067	1574	2641
	Total (Silico DArT and SNP)	1203	1759	2962
Minimal effect	SilicoDArT	−1.234	−0.279	
	SNP	−1.469	−0.305	
	Total (Silico DArT and SNP)	−1.469	−0.305	
Maximal effect	Silico DArT	1.381	0.269	
	SNP	1.574	0.311	
	Total (Silico DArT and SNP)	1.574	0.311	
Average effect	Silico DArT	0.092	0.039	
	SNP	−0.043	0.008	
	Total (Silico DArT and SNP)	−0.028	0.011	
Total effect	Silico DArT	12.483	7.146	
	SNP	−46.064	12.99	
	Total (Silico DArT and SNP)	−33.581	20.136	

2.5. Physical Mapping and Functional Analysis of Gene Sequences

From 2963 (321 SilicoDArT and 2641 SNP) markers significantly related to plant resistance in the fusarium, seven (five Silico DArT and two SNP) significant at the level of 0.001 were selected (Table 4). An attempt was also made to determine the location of the selected markers SilicoDArT and SNP. As a result of the analysis, it was found that two out of seven (15,097—DArT and 58,771—SNP) of the selected markers are located inside the genes, which are described in Table 4. In the case of the remaining markers, their location and distance from the closest genes were given. Marker 15,097 is anchored to the gene encoding the putrescine hydroxycinnamyltransferase protein, while marker 58,771 is anchored to the gene encoding the peroxidase precursor 72 (Table 4) (Figure S1).

2.6. Design of Primers for Identified SilicoDArT and SNP Polymorphisms Associated with Fusarium Resistance of Maize Plants

After determining the location of the seven selected DArT and SNP markers, an attempt was made to design primers that will be used for their identification. The designed primers are presented in Table 5. In the next year of research, the polymerase chain reaction (PCR) conditions will be refined in order to develop a methodology that will be used to identify the selected markers. In the following years, these markers can be used in breeding programs to select varieties resistant to fusarium.

Table 4. Characteristics and location of markers significantly related to plant resistance to fusarium.

Marker	Marker Type	Chromosome	Marker Location	Candidate Genes
553	DArT	Chr9	19345104	A marker that is anchored in the gene <i>GDSL esterase/lipase At4g01130</i> precursor uncharacterized precursor of the protein) (LOC100273960)
10382	DArT	Chr10	149495362	1182 bp at 5' side: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3 (LOC100191221) 1718 bp at 3' side: Heavy metal transport/detoxification superfamily protein (LOC100501931)
13242	DArT	Chr1	292840905 292841155 292841283	Within the tRNA Cys, 66,700 bp at 5' side: fasciclin-like arabinogalactan protein 16 precursor (LOC100191430) 90,541 bp at 3' side: calcium dependent protein kinase 11 (LOC103644148)
15097	DArT	Chr2	203171066	A marker that is anchored in <i>putrescine hydroxycinnamyltransferase</i> gene (LOC103649226)
15156	DArT	Chr5	215026162	50,422 bp at 5' side: photosynthetic NDH subunit of subcomplex B 4 chloroplastic (Loc100276619) 408 bp at 3' side: pseudogene (LOC103627720) and 40,871 bp: expansin alpha precursor 2 (LOC542648)
58153	SNP	Chr9	145274999	1499 bp at 5' side: histon h2a (LOC103639303) 2328 bp at 3' side: histon h2b.1-similar (LOC103639303)
58771	SNP	Chr3	40548812	A marker that is anchored the peroxidase precursor gene 72 (LOC100282124) and pentatricopeptide repeat-containing protein At5g57250, mitochondrial (LOC103649988)

Table 5. Sequences of the designed primers for the identification of newly selected markers significantly related to the analyzed features.

Marker	Primer Sequences		Annual Temperature (°C)	Product Size (bp)
	Forward	Reverse		
553	TTGTCGACGTACACGACCG	TTCGGGTGCGTGAAAAGCTA	60	116
10,382	GCAGTGCGTCGTGCAGT	AAGCCGATCGAGTTGTGTTT	58	91
13,242	ACCTGCAGATCAATAGTCAC	GGACCCCTTGTATCGAAAA	52	122
15,097	GGCTCACCTTCCCGTTCTAC	GTACGAAGGCACCAGGAACA	59	107
15,156	CCGACATCAAATGTCACAGCA	TGAGAAGACGACGACGAAGC	59	151
58,153	ACTGCAGTATGGGACCACAA	TGAAACATGCACCAAAATAAATCC	57	100
58,771	TGCTAGCACAAGTGCAATTTCAA	TGAAGGTGTTGCAAGCGAAT	58	103

3. Discussion

Ear rot is a fungal disease that occurs in many parts of the world and is considered to be one of the main factors affecting the size and quality of the obtained grain yield. It is caused by fungi belonging to the genus *Fusarium*, mostly *F. culmorum*, *F. graminearum*, and *F. verticillioides* [25]. *Fusarium* spp. infects maize grain, the aboveground parts of the entire plant become infected, leading to significant yield losses and deterioration in maize quality [26].

Fusarium graminearum invokes ear rot in maize, and was the main cause of maize cob fusariosis, among others, in Canada [27], China [28], and also in Europe in Italy [5,25].

Weather conditions are a factor that affects the infestation of cereal grains by fusarium to a greater extent than the differentiated farming systems. This theory is supported by studies by Champeil et al. [29]. Fusariosis risk assessment and models to predict its occurrence are based on weather conditions from flowering to early milk [30]. The weather conditions in the observation area in 2021 were not conducive to the spread of fungal diseases. June and July 2021 turned out to be dry (June 52.7 mm; July 65 mm) and warm (June 19.3 °C; July 20.9 °C). There were also no intense infestations of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), which feed on maize, increasing its susceptibility to fusarium. Light traps and charts showing butterfly flight dynamics from previous years were used to

estimate intense infestations of European corn borer. The increased infestation of maize by the fusarium was observed only in August, which was caused by a large amount of rainfall (140.1 mm) and a quite high temperature (17 °C). The very dry months of September (42.3 mm) and October (19.2 mm) inhibited the development of fungal diseases, including ear rot. Therefore, all analyzed lines were characterized by high resistance.

In this study, due to favorable weather conditions during the entire growing season, most of the analyzed lines were characterized by high resistance to fusarium (9), on a scale from 1-susceptible to 9-resistant. The most susceptible to infection were the lines from Smolice: line S124, the resistance of which was 6.0 in the experimental plots in Smolice and 5.7 in the experimental plots in Kobierzyce, and the line S140, the resistance of which was 7.0 in the plots in Smolice and 6.7 in the plots in Smolice in Kobierzyce.

Secondary metabolites of fungi of the genus *Fusarium* are highly harmful to humans and animals (especially pigs), causing disease and even death. *F. graminearum* produces deoxynivalenol—DON and zearalenone—ZEA, while *F. verticillioides* produces fumonisins—FUM.

Exposure of farm animals to the action of zearalenone leads to disorders of the genitourinary system, while acute or chronic poisoning can cause permanent damage to the organs of the reproductive system. Contamination of food of animal origin (mainly milk and meat) with mycotoxins from fusarium is currently low due to the constant monitoring of these products in terms of their safety [31]. Pigs and poultry are the most sensitive to mycotoxin contamination of feed [32]. Poultry is less sensitive to the fumonisin content of the feed than pigs and horses. This is related to the difference in the degree of absorption of this mycotoxin in the gastrointestinal tract [33]. Moreover, it has been noted that there is also a varied sensitivity to the fumonisin content among poultry. Turkeys and ducks are much more susceptible to poisoning than chickens [34]. Horses fed with fodder containing maize contaminated with aflatoxin died, and after the performed necrosis, extensive liver necrosis was found [33].

Therefore, one of the most recommended methods of plant protection against diseases, including fusarium, is resistance breeding [2]. There is a strong need to search for sources of resistance that could be used in further breeding works. It is also important to identify new resistance genes and their associated molecular markers.

New genes and molecular markers can be identified using Next Generation Sequencing (NGS). The most common NGS techniques include pyrosequencing 454 [35], the Solex technique (Illumina), the SOLiD platform (Applied Biosystems), Polonator (Dover/Harvard), and the HeliScope Single Molecule Sequencer (Helicos). These technologies provide inexpensive whole genome sequence readings through the use of methods such as chromatin immunoprecipitation, mutation mapping, polymorphism detection, and detection of non-coding RNA sequences [36]. Sequencing methods such as RAD (Restriction site Associated DNA) [37], MSG (Multiplexed Shotgun Genotyping) [38], and BSRSeq (Bulked segregant RNA-Seq) [39] allow the identification of a large number of markers and allow for a more accurate study of many loci in a small number of samples. The method using the Illumina approach gave rise to the development of GBS procedures [40] as well as DarTseq [41].

As a result of next-generation sequencing, the study authors identified 81,602 molecular markers (53,031 SilicoDArT and 28,571 SNP). From among them, they selected 2962 (321 SilicoDArT and 2641 SNP) significantly related to the resistance to ear rot. In order to narrow down the number of markers for physical mapping from the pool of all significant ones, they chose seven that were significant at the level of 0.001.

Marker Assisted Selection (MAS) allows for a reduction in financial outlays and an increase in productivity. By increasing the efficiency of selecting varieties for crossbreeding, breeders can improve breeding programs in a shorter time [42]. Salah et al. [43] identified the resistance/QTL genes on maize fusarium linked to the markers RAPD (OPA02), ISSR (AD8), SSR (SSR93, SSR105, SSR225, and SSR337), and STS (STS03) using MAS. The SSR and STS markers were shown to be on chromosome 10 [43]. The use of SNP markers linked to the features of the yield structure in maize and barley showed greater precision than

methods based on the study of metabolic pathways [44]. A useful tool for identifying candidate genes and their associated molecular markers is genome wide association studies (GWAS). Zila et al. [23] conducted GWAS tests on maize to detect SNPs associated with increased resistance to fusarium. Zila et al. [23] identified 10 SNP markers significantly associated with resistance to this pathogen.

In this study, out of 2963 (321 SilicoDArT and 2641 SNP) markers significantly related to plant resistance in fusarium, seven (five Silico DArT and two SNP) significant at the level of 0.001 were selected. In order to identify the selected markers, primers were designed. As a result of the analysis, it was found that two out of seven selected markers (15,097—DArT and 58,771—SNP) are located inside genes. Three markers are situated inside the genes. Marker 553 is situated inside the fourth exon of the GDSL esterase/lipase At4g01130 precursor. The detailed analysis shows that the marker is located in the alanine codon (77A). This amino acid position has been not linked with any active sites of the enzyme. However, the detection of DArT markers does not inform about the type of mutation causing restriction site loss. Marker 15,097 is anchored in the *putrescine hydroxycinnamoyltransferase* gene (LOC103649226). The polymorphism is situated in upstream UTR and may have a potential influence on the promotor and the regulation of the expression of this gene. Marker 58,771 is anchored in the intron of two genes: *peroxidase precursor* gene 72 (LOC100282124) and pentatricopeptide repeat-containing protein At5g57250, mitochondrial (LOC103649988). In the case of *gene At5g57250*, the polymorphism may disrupt the AG motif at the end of the intron and may result in the blocking of the splicing process of this intron.

Polyamines, such as putrescine, spermidine, and spermine, are small basic molecules with two or more primary amino groups. Ubiquitous in nature, they are believed to be important growth regulators in both eukaryotic and prokaryotic cells [45]. In plants, in addition to free polyamines, polyamines are conjugated with hydroxycinnamic acids to produce acylated polyamines (polyamine conjugates), which are also referred to as hydroxycinnamic acid amides (HCAAs) [46]. So far, a number of acyltransferases responsible for amide formation with hydroxycinnamic acids have been detected in different plants, belonging to them as well as putrescine N-hydroxycinnamoyltransferase. This enzyme belongs to the family of transferases, specifically those acyltransferases transferring groups other than aminoacyl groups. Tanabe et al. [47] found in their research on rice that the enzyme putrescine N-hydroxycinnamoyltransferase is highly expressed in rice roots and flowers in response to the stress of pest attack. As early as 2006, Chen and others [48] wrote about the role of putrescine N-hydroxycinnamoyltransferase in tomato immune processes. Wang et al. [49], based on quantitative trait loci mapping and genome-wide association study, identified a single-nucleotide polymorphism locus highly associated with variation in the severity of Rp1-D21-induced HR-hypersensitivity response. From a previous two maize genes encoding hydroxycinnamoyltransferase (HCT; a key enzyme involved in lignin biosynthesis) homologs, termed HCT1806 and HCT4918, were adjacent to this single-nucleotide polymorphism.

The most important peroxidases are the cationic peroxidase from *Zinnia elegans* (ZePrx). This enzyme is responsible for the final stage of the plant's lignification. Bibliographic evidence suggests that *Arabidopsis* 72 peroxidase (AtPrx72), which is a ZePrx homolog, may also play an important role in lignification [50]. Less than two years later, Fernández-Pérez et al. [51] stated that the *Arabidopsis* genome encodes for 73 peroxidases, among which AtPrx72 has been shown to participate in lignification. It is well known that lignin is a polymer composed of derivatives of phenolic alcohols. It is a substance that increases the density of wood cells and thus increases the stiffness of the cell wall, thanks to which it is resistant to mechanical factors and is a barrier to pathogens, including fungi of the *Fusarium* genus. Lanubile et al. [52] showed that in resistant maize seedlings, before infection, the expression of ascorbate peroxidase was higher than in susceptible seedlings, and the enzyme was activated after pathogen infection.

As indicated by the above results, markers (15,097—DArT and 58,771—SNP) of both genes can be used in breeding programs to select lines resistant to fusarium. The remaining

five of the seven selected markers will be tested on susceptible and fusarium resistant maize lines to also determine their suitability for the selection of resistant genotypes.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The plant material consisted of 186 inbred maize lines. The lines came from experimental plots belonging to two Polish breeding companies: Plant Breeding Smolice, Smolice, Ltd., Co., Poland Plant Breeding and Acclimatization Institute—National Research Institute Group (51°41'23.16" N, 17°4'18.241" E) and Małopolska Plant Breeding Kobierzyce, Kobierzyce, Ltd., Co., Poland (50°58'19.411" N, 16°55'47.323" E).

4.2. Methods

4.2.1. Phenotyping

A field experiment with 186 corn inbred lines was established in two localities of Kobierzyce and Smolice. The plant material was sown on 10 m² of experimental plots, in the system of complete randomly selected blocks, in three replications. In the course of the experiments, observations were made concerning the degree of infection of maize cobs by the fusarium. The observations were carried out on eight dates: term 1—development of the first blister stage kernels, which contain about 16% of dry matter (BBCH 71), date 2—the beginning of early milk (BBCH 73), term 3—milk stage; middle kernels milky, contain about 40% of dry matter (BBCH 75), term 4—nearly all kernels have reaches final volume (BBCH 79), date 5—the beginning of the kernel's denting maturity, kernels soft; 45% of dry matter (BBCH 83), date 6—full denting maturity of the kernels, kernels with a typical color, they contain about 55% of dry matter (BBCH 85), term 7—physiological maturity, visible black layering at the base of the kernel contain about 60% of dry matter (BBCH 87), date 8—full maturity, hard and shiny kernels contain about 65% dry weight (BBCH 89).

The meteorological conditions in the growing season of 2021 were favorable for the growth and development of maize, although the frosts in April delayed sowing. May, which is very important for the growth and development of maize, should be classified as cool (12 °C) and humid because the amount of rainfall was 76 mm. Contrary to May, June, and July 2021. turned out to be dry (June 52.7 mm; July 65 mm) and warm (June 19.3 °C; July 20.9 °C). Dry and warm weather was not conducive to the spread of fungal diseases during this period. Intensive infestation of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), was also not observed. European corn borer feeds on maize and increases its susceptibility to fusarium by laying eggs from mid-June to the end of August. In August, an increased infestation of maize by fusarium was observed, which was caused by a large amount of rainfall (140.1 mm) and a quite high temperature (17 °C). The very dry months of September (42.3 mm) and October (19.2 mm) inhibited the development of fungal diseases, including ear rot. Therefore, all analyzed lines were characterized by high resistance.

4.2.2. DNA Isolation

Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit from Promega was used to isolate DNA from 186 inbred lines. Tissue from 7-day-old seed leaves was used for DNA extraction. Immediately after isolation, the concentration and purity of the isolated DNA samples were determined using the DeNovix DS-11 spectrophotometer. In the next step, the template DNA was diluted with distilled water to 100 ng/μL and stored at −80 °C until sequencing.

4.2.3. Genotyping

The methodology used for next-generation sequencing was described in detail in the publication presenting the research by Tomkowiak et al. [53]. The DArTseq analysis was performed at Diversity Arrays Technology Pty Ltd. (Canberra, Australia). DNA sample digestion/ligation reactions were processed according to Kilian et al. [54] but replacing a single PstI-compatible adaptor with two adaptors corresponding to PstI- and NspI-compatible sequences and moving the assay on the sequencing platform as described

by Sansaloni et al. [40]. The PstI-compatible adapter was designed to include Illumina flow cell attachment sequence, sequencing primer sequence, and “staggered” varying length barcode region, similar to the sequence reported by Elshire et al. [41]. The reverse adapter contained a flowcell attachment region and NspI-compatible overhang sequence. Only “mixed fragments” (PstI–NspI) were amplified in PCR using the following reaction conditions: Denaturation 1 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 94 °C for 20 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, and the final elongation 72 °C for 7 min. After PCR equimolar amounts of amplification products from each sample of the 96-well microtiter plate are bulked and applied to c-Bot (Illumina, San Diego, California, United States) bridge PCR followed by sequencing on Illumina HiSeq2500. The sequencing (single read) was run for 78 cycles. Sequences generated from each lane were processed using proprietary DArT analytical pipelines. In the primary pipeline, the fastq files were first processed to filter away poor quality sequences, applying more stringent selection criteria to the barcode region compared to the rest of the sequence. In that way, the assignments of the sequences to specific samples carried in the “barcode split” step were very reliable. Approximately 2,500,000 ($\pm 7\%$) sequences per barcode/sample were used in marker calling. Finally, identical sequences were collapsed into “fastqcall files”. These files were used in the secondary pipeline for DArT PL’s proprietary SNP and SilicoDArT (presence/absence of restriction fragments in representation) calling algorithms (DarTsoft14). For the association analysis, only DarT sequences meeting the following criteria were selected: One SilicoDArT and SNP within a given sequence (69 nt), minor allele frequency (MAF) >0.25, and the missing observation fractions <10%.

4.2.4. Statistical Analysis

The normality of the distribution of the degree of infection of the maize line by the fusarium was tested using Shapiro–Wilk’s normality test to check whether the analysis of variance (ANOVA) met the assumption that the ANOVA model residuals followed a normal distribution. The homogeneity of variance was tested using Bartlett’s test. A two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the main effects of line, location, and line $\times$ location interaction on the variability of the degree of infection of the maize line by the fusarium. The genetic similarity for each pair of the investigated lines was estimated based on the coefficient proposed by Nei and Li [55]. The lines were grouped hierarchically using the unweighted pair group method of arithmetic means (UPGMA) based on the calculated coefficients [56]. The relationships between the lines were presented in the form of a dendrogram [57,58]. The relationship between the degree of infection of the maize line by the fusarium in both locations was assessed based on Pearson’s correlation coefficients and tested with the *t*-test [59]. All analyses were conducted in Genstat 18.2 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK).

4.2.5. Associative Mapping Using GWAS Analysis

Associative mapping was performed using GWAS analyzes. An attempt was made to link the observations of the degree of ear rot infestation by the fusarium, 186 inbred maize lines with the molecular markers SNP and SilicoDArT obtained from the DArTseq analysis. On the basis of the GWAS analysis, the silicoDArT and SNP markers were selected for further studies that showed the highest level of significance, i.e., those that were most strongly associated with the resistance of maize to ear rot. The lower limit of the selected significance level results from the Manhattan plot charts, which graphically present the results of the association studies.

4.2.6. Physical Mapping

The databases were searched to find sequences with high homology to the selected sequences of the silicoDArT and SNP markers. The bioinformatics tool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) was used for this purpose. BLAST is one of the most frequently used programs of this type due to the use of a heuristic mechanism, it does not compare the

entire sequence, but the shorter fragments of both sequences. The analyzes were performed using URGI (Unité de Recherche Génomique Info) with a completely sequenced maize genome. The genome was sequenced from inbred lines from hybrid varieties available on the Polish market. The location on the chromosome of the searched sequences, which were similar to the analyzed sequences, was indicated, and their physical location was determined. To identify a region containing sequences similar to the analyzed sequences, an overall probability was calculated from the e-value (e-value) of each chromosome. The sequences of all genes in the designated area on the chromosome were further analyzed.

4.2.7. Functional Analysis of Gene Sequences

In order to obtain information about the biological function of genes located in the designated area of chromosomes, a functional analysis was performed using the Blast2GO program. The sequences of all genes located in the area of chromosomes determined on the basis of the BLAST analysis performed on the URGI website were analyzed.

4.2.8. Designing Primers for Identified SilicoDArT and SNP Polymorphisms Related to Fusarium Resistance

The Primer 3 Plus program was used to design the starters.

5. Conclusions

The introduction of next-generation sequencing (NGS) methods was a great breakthrough that revolutionized the world of molecular biology techniques. It is difficult to say how quickly NGS will become a standard in breeding programs, but it is known for certain that it has a wide range of applications. Currently, this technique is used for genomes and transcriptomes sequencing, studying protein-DNA/RNA interactions, checking the degree of methylation, as well as for metagenomic studies. In this study, the next-generation sequencing resulted in obtaining the molecular markers SilicoDArT (53,031) and SNP (28,571), on the basis of which the genetic distance between the analyzed lines was estimated. When analyzing the dendrogram, it can be noticed that the lines from PB Smolice show greater similarity with each other than with the lines from PB Kobierzyce, and conversely, the lines from Kobierzyce are more similar to each other than with the lines from Smolice. In total, 81,602 molecular markers were obtained, of which, as a result of the associative mapping, 2962 (321 SilicoDArT and 2641 SNP) significantly related to plant resistance to fusarium were selected. Out of 2962 markers significantly related to plant resistance in the fusarium, seven markers (SilicoDArT, SNP) were selected, which were significant at the level of 0.001. These markers were used for physical mapping. As a result of the analysis, it was found that two out of seven selected markers (15,097—SilicoDArT and 58,771—SNP) are located inside genes. These markers are located on chromosomes 2 and 3, respectively. Marker 15,097 is anchored in the gene encoding putrescine N-hydroxycinnamoyltransferase, while marker 58,771 is anchored in the gene encoding peroxidase 72 precursor. These genes may be related to plant resistance to fusarium. Therefore, the markers 15,097 (SilicoDArT) and 58,771 (SNP) can be used in breeding programs to select lines resistant to fusarium.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23116105/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.T.; Data curation, A.S. and A.T.; Formal analysis, J.B.; Investigation, A.S., A.T., B.N., J.B., Ł.W. and J.S.; Methodology, A.S., A.T. and J.B.; Supervision, A.T.; Visualization, J.B.; Writing—original draft, A.T., J.B. and A.S.; Writing—review and editing, A.T., A.S., J.B., Ł.W., J.S. and B.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research presented in this publication was financed as part of the research project “Analysis of genetic determinants of heterosis effect and fusarium resistance in maize (*Zea mays* L.)”. PL: “Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.)”. The project is implemented under the grant from the Ministry of Agriculture and Rural Development “Biological progress in plant production (recruitment 2020)”. Duration of the project 2021–2026. Open acces was financed form Projekt nr 005/RID/2018/19 pn. “Wielkopolska Regionalna Inicjatywa Doskonałości w obszarze nauk o życiu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu” Projekt finansowany w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa w latach 2019–2022.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Yadav, M.K.; Lipsa, D.; Sandeep, R. Evaluation of Host Plant Resistance Traits in Certain Genotypes of Maize (*Zea mays* L.) against Maize Spotted Stem Borer (*Chilo Partellus* Swinhoe, Crambidae). *Int. J. Entomol. Res.* **2021**, *6*, 64–69. Available online: www.entomologyjournals.com (accessed on 1 April 2022).
2. Zijlstra, C.; Lund, I.; Justesen, A.; Nicolaisen, M.; Bianciotto, V.; Posta, K.; Balestrini, R.; Przetakiewicz, A.; Czembor, E.; van de Zande, J. Combining novel monitoring tools and precision application technologies for integrated high-tech crop protection in the future (a discussion document). *Pest Manag. Sci.* **2011**, *67*, 616–625. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Vasileiadis, V.P.; Otto, S.; Sattin, M.; Palinkás, Z.; Veres, A.; Bán, R.; Kiss, J.; Pons, X.; Kudsk, P.; Weide, R.; et al. Crop protection in European maize-based cropping systems: Current practices and recommendations for innovative Integrated Pest Management. *Agric. Syst.* **2011**, *104*, 533–540. [\[CrossRef\]](#)
4. Mesterházy, Á.; Lemmens, M.; Reid, L.M. Breeding for resistance to ear rot caused by *Fusarium* spp. in maize—A review. *Plant Breed.* **2012**, *131*, 1–19. [\[CrossRef\]](#)
5. Logrieco, A.; Mule, G.; Moretti, A.; Bottalico, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 597–609. [\[CrossRef\]](#)
6. Garcia, D.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marin, S. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 757–769. [\[CrossRef\]](#)
7. Garcia-Ceron, D.; Lowe, R.G.T.; McKenna, J.A.; Brain, L.M.; Dawson, C.S.; Clark, B.; Berkowitz, O.P.; Whelan, J.; Bleackley, M.R.; Anderson, M.A. Extracellular Vesicles from *Fusarium graminearum* Contain Protein Effectors Expressed during Infection of Corn. *J. Fungi* **2021**, *7*, 977. [\[CrossRef\]](#)
8. Meissler, M.; Mouron, P.; Musa, T.; Bigler, F.; Pons, X.; Vasileiadis, V.P.; Otto, S.; Antichi, D.; Kiss, J.; Pálkás, Z.; et al. Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: Current status and future prospects. *J. Appl. Entomol.* **2010**, *34*, 357–375.
9. Uwe, L.; Miedaner, T.; Bürstmayr, H.; Vögele, R.T. Breeding for Resistance to *Fusarium* Ear Diseases in Maize and Small-Grain Cereals Using Genomic Tools. Ph.D. Thesis, Faculty of Agricultural Sciences University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 2020.
10. Munkvold, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. In *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*; Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 705–713. [\[CrossRef\]](#)
11. Munkvold, G.P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2003**, *41*, 99–116. [\[CrossRef\]](#)
12. Bush, B.J.; Carson, M.L.; Cubeta, M.A.; Hagler, W.M.; Payne, G.A. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium Verticillioide*s in Developing Maize Kernels. *Genet. Resist. Infect. Am. Phytopathol. Soc.* **2003**, *94*, 88–93. [\[CrossRef\]](#)
13. Maschietto, V.; Cinzia, C.; Pirona, R.; Pea, G.; Strozzi, F.; Marocco, A.; Rossini, L.; Lanubile, A. QTL Mapping and Candidate Genes for Resistance to *Fusarium* Ear Rot and Fumonisin Contamination in Maize. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Santiago, R.; Cao, A.; Malvar, R.A.; Butrón, A. Genomics of Maize Resistance to *Fusarium* Ear Rot and Fumonisin Contamination. *Toxins* **2020**, *12*, 431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Voss-Fels, K.; Snowden, R.J. Understanding and Utilizing Crop Genome Diversity via High-Resolution Genotyping. *Plant Biotechnol. J.* **2016**, *14*, 1086–1094. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Lanubile, A.; Maschietto, V.; Borrelli, V.M.; Stagnat, L.; Logrieco, A.; Marocco, F.A. Physiological and Molecular Plant Pathology Resistant and Susceptible Maize Genotypes Activate Different Transcriptional Responses against *Fusarium Verticillioide*s. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2012**, *77*, 52–59. [\[CrossRef\]](#)

17. Campos-Bermudez, V.A.; Fauguel, C.M.; Tronconi, M.A.; Casati, P.; Presello, D.A.; Andreo, C.S. Transcriptional and Metabolic Changes Associated to the Infection by *Fusarium verticillioides* in Maize Inbreds with Contrasting Ear Rot Resistance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61580. [CrossRef] [PubMed]
18. Lanubile, A.; Maschietto, V.; Borrelli, V.M.; Stagnat, L.; Logrieco, A.; Marocco, F.A. Molecular Basis of Resistance to Fusarium Ear Rot in Maize. *Front. Plant Sci. Mol.* **2017**, *8*, 1774. [CrossRef]
19. Cruz Von, M.V.; Kilian, A.; Dierig, D.A. 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* **2013**, *8*, e64062. [CrossRef]
20. Wittenberg, A.H.J.; Lee, T.; Cayla, C.; Kilian, A.; Visser, R.G.F.; Schouten, H. Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genom.* **2005**, *274*, 30–39. [CrossRef]
21. Wenzl, P.; Carling, J.; Kudrna, D.; Jaccoud, D.; Huttner, E.; Kleinhofs, A.; Kilian, A. Diversity Arrays Technology (DArT) for Whole-Genome Profiling of Barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9915–9920. [CrossRef]
22. Zila, C.T.; Samayoa, L.F.; Santiago, R.; Butrón, A.; Holland, J.B. A genome-wide association study reveals genes associated with fusarium ear rot resistance in a maize core diversity panel. *G3-Genes Genom. Genet.* **2013**, *3*, 2095–2104. [CrossRef]
23. Zila, C.T.; Ogut, F.; Roday, M.C.; Gardner, C.A.; Buckler, E.S. Genome wide association study of Fusarium ear rot disease in the U.S.A. maize inbred line collection. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 372. [CrossRef] [PubMed]
24. Yubo, L.; Zhang, G.; Loladze, A.; Hu, A.; Wang, Y.; Zhang, H.Q.J.; Olsen, X.; San Vicente, M.; Crossa, F.; Lin, J.; et al. Genome-Wide Association Study and Genomic Prediction of Fusarium Ear Rot Resistance in Tropical Maize Germplasm. *Crop J.* **2021**, *9*, 325–341. [CrossRef]
25. Bottalico, A.; Perrone, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 611–624. [CrossRef]
26. Oldenburg, E.; Höppner, F.; Ellner, F.; Weinert, J. Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Res.* **2017**, *33*, 167–182. [CrossRef] [PubMed]
27. Eli, K.; Schaafsma, A.W.; Limay-Rios, V.; Hooker, D.C. Effect of pydiflumetofen on *Gibberella* ear rot and *Fusarium* mycotoxin accumulation in maize grain. *World Mycotoxin J.* **2021**, *14*, 495–512. [CrossRef]
28. Gxasheka, M.; Wang, J.; Gunya, B.; Mbanjwa, V.; Louis, T.; Dlamini, T.; Gao, J. In vitro effect of some commercial fungicides on mycelial growth of *Fusarium* species causing maize ear rot disease in China. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2021**, *54*, 557–569. [CrossRef]
29. Champeil, A.; Doré, T.; Fourbet, J.F. Fusarium head blight: Epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci.* **2004**, *166*, 1389–1415. [CrossRef]
30. Doohan, F.M.; Brennan, J.; Cooke, B.M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* **2003**, *109*, 755–768. [CrossRef]
31. Samardžija, M.; Jeličić, A.; Mitak, M.; Pleadin, J. Oestrogen effects of zearalenone in farm animals and risks for human and animal health. *Vet. Stanica* **2017**, *48*, 109–118. Available online: <https://hrcak.srce.hr/222017> (accessed on 1 April 2022).
32. Ghareeb, K.; Awad, W.A.; Boehm, J.; Zebeli, Q. Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: Poultry and swine. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35*, 327–337. [CrossRef]
33. Guerre, P. Fusariotoxins in avian species: Toxicokinetics, metabolism and persistence in tissues. *Toxins* **2015**, *7*, 2289–2305. [CrossRef] [PubMed]
34. Tran, S.T.; Auvergne, A.; Bernard, G.; Bailly, J.D.; Tardieu, D.; Babile, R.; Guerre, P. Chronic effects of fumonisin B1 on ducks. *Poultry Sci.* **2005**, *84*, 22–28. [CrossRef]
35. Roche 454 Sequencing. Multiplex Identifier (MID) Adaptors for Rapid Library Preparations 454. *Life Sci.* **2010**, *006-2009*, 1–7.
36. Mardis, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* **2008**, *24*, 133–141. [CrossRef]
37. 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. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3376. [CrossRef] [PubMed]
38. Adolatto, P.; Davison, D.; Erezylmaz, D.; Hu, T.T.; Mast, J.; Sunayama-Morita, T.; Stern, D.L. Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res.* **2011**, *21*, 610–617. [CrossRef]
39. Liu, S.; Yeh, C.-T.; Tang, H.M.; Nettleton, D.; Schnable, P.S. Gene mapping via bulked segregant RNASeq (BSR-Seq). *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36406. [CrossRef]
40. Sansaloni, C.; Petrol, C.; Jaccoud, D.; Carling, J.; Detering, F.; Grattapaglia, D.; Kilian, A. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: Genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of *Eucalyptus*. *BMC Proc.* **2011**, *5*, P54. [CrossRef]
41. Elshire, R.J.; Glaubitz, J.C.; Sun, Q.; Poland, J.A.; Kawamoto, K.; Buckler, E.S.; Mitchell, S.E. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19379. [CrossRef]
42. Gul Arabzai, M.; Gul, H. Application Techniques of Molecular Marker and Achievement of Marker Assisted Selection (MAS) in Three Major Crops Rice, Wheat and Maize. *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* **2021**, *8*, 82–93. [CrossRef]
43. Salah, N.; Milad, S.I.; El-Rouby, M.M.; Barakat, M.N. Identification of New Molecular Markers Linked to Maize Stalk Rot Disease Resistance (*Fusarium Moniliforme*) in Maize. *Plant Omics J.* **2016**, *9*, 12–18.
44. Michel, S.; Wagner, C.; Nosenko, T.; Steiner, B.; Samad-Zamini, M.; Buerstmayr, M.; Mayer, K.; Buerstmayr, H. Merging, Genomics and Transcriptomics for Predicting Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Genes* **2021**, *12*, 114. [CrossRef] [PubMed]

45. Wang, W.; Snooks, H.D.; Sang, S. The Chemistry and Health Benefits of Dietary Phenolamides. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 6248–6267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Xiang, J.; Zhang, M.; Apea-Bah, F.B.; Beta, T. Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. *Food Chem.* **2019**, *295*, 214–223. [[CrossRef](#)]
47. Tanabe, K.; Hojo, Y.; Shinya, T.; Galis, I. Molecular evidence for biochemical diversification of phenolamide biosynthesis in rice plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2016**, *58*, 903–913. [[CrossRef](#)]
48. Chen, H.; Jones, A.D.; Howe, G.A. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2540–2546. [[CrossRef](#)]
49. Wang, G.F.; He, Y.; Strauch, R.; Olukolu, B.A.; Nielsen, D.; Li, X.; Balint-Kurti, P.J. Maize Homologs of Hydroxycinnamoyltransferase, a Key Enzyme in Lignin Biosynthesis, Bind the Nucleotide Binding Leucine-Rich Repeat Rp1 Proteins to Modulate the Defense Response. *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 2230–2243. [[CrossRef](#)]
50. Herrero, J.; Fernández-Pérez, F.; Yebra, T.; Novo-Uzal, E.; Pomar, F.; Pedreño, M.; Cuello, J.; Guéra, A.; Esteban-Carrasco, A.; Zapata, J.M. Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta* **2013**, *237*, 1599–1612. [[CrossRef](#)]
51. Fernández-Pérez, F.; Pomar, F.; Pedreño, M.A.; Novo-Uzal, E. Suppression of *Arabidopsis* peroxidase 72 alters cell wall and phenylpropanoid metabolism. *Plant Sci.* **2015**, *239*, 192–199. [[CrossRef](#)]
52. Lanubile, A.; Bernardi, J.; Marocco, A.; Logrieco, A.; Paciolla, C. Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides*. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *78*, 39–46. [[CrossRef](#)]
53. Tomkowiak, A.; Bocianowski, J.; Wolko, Ł.; Adamczyk, J.; Mikołajczyk, S.; Kowalczewski, P.L. Identification of Markers Associated with Yield Traits and Morphological Features in Maize (*Zea mays* L.). *Plants* **2019**, *8*, 330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kilian, B.; Graner, A. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. *Brief. Funct. Genom.* **2012**, *11*, 38–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Nei, M.; Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5269–5273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Starzycka-Korbas, E.; Weber, Z.; Matuszczak, M.; Bocianowski, J.; Budzianowski, G.; Stefanowicz, M.; Starzycki, M. The diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates from western Poland. *J. Plant Pathol.* **2021**, *103*, 185–195. [[CrossRef](#)]
57. Wrońska-Pilarek, D.; Dering, M.; Bocianowski, J.; Lechowicz, K.; Kowalkowski, W.; Barzdajn, W.; Hauke-Kowalska, M. Pollen Morphology and Variability of *Abies alba* Mill. Genotypes from South-Western Poland. *Forests* **2020**, *11*, 1125. [[CrossRef](#)]
58. Wrońska-Pilarek, D.; Jagodziński, A.M.; Bocianowski, J.; Marecik, M.; Janyszek-Sottysiak, M. Pollen morphology and variability of *Sambucus nigra* L.—Adoxaceae. *Biologia* **2020**, *75*, 481–493. [[CrossRef](#)]
59. Bocianowski, J.; Kozak, M.; Liersch, A.; Bartkowiak-Broda, I. A heuristic method of searching for interesting markers in terms of quantitative traits. *Euphytica* **2011**, *181*, 89–100. [[CrossRef](#)]

P2: Application Marker-Assisted Selection (MAS) and Multiplex PCR Reactions in Resistance Breeding of Maize (*Zea mays* L.).

Sobiech, A., Tomkowiak, A., Bocianowski, J., Nowak, B., Weigt, D., Kurasiak-Popowska, D., Kwiatek, M., Mikołajczyk, S., Niemann, J., Szewczyk, K.

Agriculture, 12(9), 1412. (2022).

<https://doi.org/10.3390/agriculture12091412>

Article

Application Marker-Assisted Selection (MAS) and Multiplex PCR Reactions in Resistance Breeding of Maize (*Zea mays* L.)

Aleksandra Sobiech ^{1,*} , Agnieszka Tomkowiak ¹ , Jan Bocianowski ² , Bartosz Nowak ³, Dorota Weigt ¹ , Danuta Kurasiak-Popowska ¹ , Michał Kwiatek ¹ , Sylwia Mikołajczyk ¹ , Janetta Niemann ¹  and Katarzyna Szewczyk ¹

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznan University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznan, Poland

² Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznan, Poland

³ Smolice Plant Breeding Sp. Z O. O. IHAR Group, Smolice 146, 63-740 Kobylin, Poland

* Correspondence: aleksandra.sobiech@up.poznan.pl



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

Academic Editors:

Edyta Paczós-Grzeda, Volker Mohler, Sylwia Sowa and Davinder Singh

Received: 7 July 2022

Accepted: 6 September 2022

Published: 7 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cultivated maize (*Zea mays* L.) is the oldest and one of the most important crop species in the world. Changing climatic conditions in recent years, warm weather, expansion of acreage and intensification of maize cultivation have resulted in an increase in the threat posed by diseases caused by, among others, *Fusarium* fungi. Breeding success in all plant species is determined by access to starting materials with possible high genetic diversity also in terms of disease resistance. Identification of parental combinations that produce offspring that are high-yielding and resistant to *Fusarium*, among other diseases, is one of the costliest steps in breeding programs. We used maize lines which, as a result of five-year field observations, were divided into resistant and susceptible to *F. verticillioides*. It is known that resistance to fusarium is a trait strongly dependent on environmental conditions. Due to the fact that the years of observation of the degree of infestation were hot and dry, the resistance of some lines could result from favorable environmental conditions. In view of the above, the aim of this study was to analyze the genetic basis of the resistance of these lines and to correlate molecular analyses with field observations. Comprehensive field and molecular analyses will allow the selection of reference lines that will be resistant to fusarium in the field and, at the same time, will have pyramided resistance genes. Such lines can be used for crossbreeding to obtain fusarium-resistant varieties. In addition, an attempt was made to develop Multiplex PCR conditions for faster identification of the analyzed markers. As a result of the analyses, it was found that the resistance of the studied maize lines was correlated with the number of molecular markers identified in them. Both field and laboratory analyses have shown that the best line that can be used for crossbreeding as a source of fusarium resistance genes is the line number 25. It has a resistance level of 8–9 on the nine-point COBORU scale. In this line, as a result of molecular analyses, 10 out of 12 markers were identified (SSR 85, Bngl 1063, Bngl 1740, Umc 2082, Bngl 1621, Umc 2059, Umc 2013, SSR 93, SSR 105, STS 03) related to fusarium resistance genes, which may be the reason for such a high resistance to this pathogen. Similarly, 9 markers were identified for line number 35 (SSR 85, Bngl 1063, Bngl 1740, Umc 2082, Bngl 1621, Umc 2059, Umc 2013, SSR 93, STS 03). This line, however, was characterized by a slightly lower resistance at the level of 7–8. Line 254 turned out to be the least resistant, as the resistance was at the level of 4–5, and the number of identified molecular markers was 5. Lines numbered 25 and 35 can be successfully used as a source of fusarium resistance genes.

Keywords: maize; molecular markers; multiplex PCR; *Fusarium*

1. Introduction

The maize (*Zea mays* L.), along with rice, is the most commonly cultivated crop for human and animal consumption. It is also a species grown for grain and feed. In 2022, the

largest producers of maize for grain were the United States of America (367.3 million tons), Mexico (337.8 million tons) and China (266.2 million tons). Maize ranks first place in terms of production volume among grain crops in the world (about 1 billion tons). In comparison, in 2000, the leading positions in the production of this species were occupied by the same countries; however, the amount of grain they produced was 251 million tons, 106 million tons and 32 million tons, respectively. These data confirm that over the past 20 years, the global maize production for grain has increased significantly [1].

The prevailing warm weather in the last decade of the 20th century, the expansion of acreage and intensification of corn cultivation, as well as the introduced agrotechnical simplifications, resulted in an increase in the threat caused by diseases to the amount and quality of yields. In addition, epidemics are facilitated by the emergence of new agrophage species, and the invasive movement of those already present, into neighboring areas. Based on studies conducted over the past few years, it is estimated that corn diseases cause yield losses of up to 30% each year [2]. The quality of the grain yield is also significantly affected because early plant infection by fungi and bacteria causes the grain to become diminished, deteriorating the feed value and quality of the forage obtained [3].

Diseases caused by fungi of the genus *Fusarium*, which are the main culprits of seedling rot, root rot and stem base rot, but also the most dangerous cob fusariosis, are now considered the most dangerous. Maize cob fusariosis, except in cases of severe occurrence, causes little yield loss, but greatly impairs the quality of grain and feed as a product for further processing [2,4]. Fungal species responsible for the infestation, in addition to secreting substances necessary for life, have the ability to produce secondary metabolites, so-called mycotoxins, accumulated in grains and other parts of the plant (trichothecenes, among others: T-2 toxin and diacetoxyscirpenol-DAS, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenone-DON, HT-2 toxin, alphanolins and others). These substances can cause many diseases in humans, including various types of allergies, hormonal disorders, cancer (they activate oncogenic cells) [5]. Their presence in feed also poses a major threat to animal health and life, especially for pigs and poultry, as they cause increased susceptibility to infectious agents that under standard conditions, without the additional action of toxigenic fungal metabolites, would not be able to cause disease. In addition, they negatively affect production and reproductive performance and, most importantly, the health and quality of the final product going to the consumer [6].

Fusarium resistance is a polygenic and is strongly influenced by environmental factors. This type of resistance is very complex which makes breeding difficult and results in most commercial maize hybrids having a lower level of resistance than is desirable [7].

Integrated pest management involves the development of non-chemical methods as an alternative to the most commonly used fungicides. Breeding for plant resistance to pathogens is a sustainable way to produce more crops without using inputs that are harmful to the environment and humans [8]. Stagnati et al. [9] mapped quantitative trait loci (QTLs) for *F. verticillioides* resistance in two maize populations. As a result of the study, they found that they were not consistent between populations. Analyzing the transcriptome and identifying areas associated with *F. verticillioides* resistance may help to better understand the processes that occur when plants are infected by these fungi.

Salah et al. [10] using marker-assisted selection (MAS) identified molecular markers linked to *F. verticillioides* resistance (QTL) genes: RAPD (OPA02), ISSR (AD8), SSR (SSR93, SSR105, SSR225 and SSR337) and STS (STS03). It was shown that the SSR and STS markers were located on chromosome 10. The use of SNP markers coupled to yield structure traits in maize and barley, showed greater precision than methods based on the study of metabolic pathways [11]. Maschietto et al. [12] demonstrated, the utility of SSR, GBS, and transcriptomics markers and QTL mapping to improve the selection of *F. verticillioides* resistant lines. Abdel-Rahman et al. [13] showed that regression analysis for the relationship between SSR markers and phenotypes of maize F₂ populations evaluated for *F. verticillioides* head blight severity was highly significant. This indicates that SSR markers were associated with resistance to the disease. SSR markers have been the most widely used markers

for many years due to their ease of use and relatively low price. Nowadays, more and more research is being conducted using SNP markers, as they occur at a much higher frequency in the genome than SRRs. Authors Jones et al. [14], Hamblin et al. [15] and Van Inghelandt et al. [16] point to the advantage of SNP markers over SRRs in studying the genetic diversity of inbred lines in maize.

Today, in public databases, more than one million SNPs can be found for maize. With the development of association mapping using SNPs, it will be possible to accelerate the identification and use of new agronomically useful alleles [17].

Marker-assisted selection (MAS) reduces financial expenses and increases productivity. By increasing the efficiency of selecting varieties for crossbreeding, breeders can improve breeding programs in less time [18].

The process, referred to as multiplex polymerase chain reaction (PCR), saves considerable time and money by simultaneously amplifying multiple sequences in a single reaction. Optimization of the method consisted of selecting the appropriate primer volume for all markers in each variant and adjusting the appropriate primer annealing temperature in order to obtain uniformly intense bands on the gel. Developing an effective multiplex PCR usually requires strategic planning and multiple attempts to optimize reaction conditions. The testing of a number of molecular markers related to maize plant resistance to *F. verticillioides* and the development of multiplex PCR conditions will provide breeders with tools ready to guide selection.

In view of the above, the aim of this study was to analyze the genetic basis of resistance to the fusarium of the studied lines and to correlate molecular analyses with field observations. Comprehensive field and molecular analyses will allow the selection of reference lines that will be resistant to fusarium in the field, and at the same time, they will be characterized by pyramided resistance genes. Such lines can be used for crossing to obtain fusarium-resistant varieties. Additionally, an attempt was made to develop Multiplex PCR conditions for faster identification of the analyzed markers

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Plant material consisted of 30 genotypes (15 resistant and 15 susceptible) to *F. verticillioides* donated to the Department of Plant Genetics and Breeding by Plant Breeding Smolice Ltd. IHAR Group. Lines used for the research were derived from hybrid varieties available on the Polish market. They are mainly characterized by grain types of Dent. Hybrids from which the inbred lines were derived belong to the BSSS and non-BSSS origin groups, mainly Iodent and Lancaster. The plant material is shown in Table 1. These lines were monitored for 5 years for resistance to fusarium. Throughout the years of observation, the resistance of each line remained constant (on a COBORU scale of 1–9; 1, susceptible; 9, resistant). In order to establish the genetic basis of resistance to the fusarium of these lines, the above experiment was set up.

Table 1. Plant material used in the experiment.

Resistant Genotypes		Susceptible Genotypes	
No.	Genotype Number	No.	Genotype Number
1	9	16	16
2	25	17	23
3	28	18	24
4	35	19	41
5	45	20	57
6	47	21	58
7	52	22	67
8	66	23	68
9	71	24	78
10	74	25	103
11	80	26	253
12	114	27	254
13	255	28	256
14	257	29	258
15	260	30	259

2.2. Methodology

2.2.1. Field Experiment

The experiment with 30 *F. verticillioides*-resistant and -susceptible maize genotypes was established in 10 m² fields belonging to Plant Breeding Smolice, Smolice, Ltd., Co., Poland Plant Breeding and Acclimatization Institute—National Research Institute Group (51°41′23.16″ N, 17°4′18.241″ E)—in a randomized complete block design in three replicates, in 2021. During the conduct of the experiments, observations were made on the degree of maize cob infection by *F. verticillioides*. The observations were carried out on eight dates: term 1—development of the first blister stage kernels, which contain about 16% of dry matter (BBCH 71); date 2—the beginning of early milk (BBCH 73); term 3—milk stage, middle kernels are milky, containing about 40% of dry matter (BBCH 75); term 4—nearly all kernels have reaches final volume (BBCH 79); date 5—the beginning of the kernel's denting maturity, kernels are soft, containing 45% of dry matter (BBCH 83); date 6—full denting maturity of the kernels, kernels with a typical color, containing about 55% of dry matter (BBCH 85); term 7—physiological maturity, visible black layering at the base of the kernel, with kernels containing about 60% of dry matter (BBCH 87); date 8—full maturity, hard and shiny kernels containing about 65% dry weight (BBCH 89).

Meteorological conditions during the 2021 growing season were favorable for the growth and development of maize, although frosts in April delayed sowing. The month of May, which is very important for the growth and development of maize, should be counted as cool (12 °C) and wet as the amount of precipitation was 76 mm. In contrast to May, June and July 2021 turned out to be dry (June 52.7 mm; July 65 mm) and warm (June 19.3 °C; July 20.9 °C) months. The dry and warm weather did not favor the spread of fungal diseases during this period. Intensive infestation of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) was also not observed. European corn borer feeds on maize and increases its susceptibility to fusarium by laying eggs from mid-June to the end of August. In August, an increased infestation of maize by *Fusarium* spp. was observed, which was due to very high rainfall (140.1 mm) and fairly high temperature (17 °C). The very dry months of September (42.3 mm) and October (19.2 mm) affected the inhibition of the development of fungal diseases including cob fusariosis.

2.2.2. DNA Isolation

Isolation of genomic DNA from 30 susceptible and resistant genotypes to *F. verticillioides* was performed using the reagent kit (Genomic Mini AX Plant) from A&A Biotechnology (Gdańsk, Poland).

The concentration and purity of the isolated DNA samples were measured by a DS-11 spectrophotometer from DeNovix. The isolated DNA matrix was brought to a uniform concentration of 50 ng µL^{−1} by dilution with distilled water.

DNA concentration ranged from 155 ng/µL for line 28 to 950 ng/µL for line 24. Purity of individual samples was also very good and ranged from 1.7 to 2.1 for absorbance 260/280 and 260/230.

2.2.3. Molecular Marker Analysis and PCR Amplification

Identification of markers (Table 2) coupled to *F. verticillioides* resistance genes was carried out using polymerase chain reaction (PCR) and primers proposed by Abdel-Rahman et al. [13] and Salah et al. [10] (Table 2).

The polymerase chain reaction (PCR) was conducted in a BIO-RAD T1000 thermocycler. Reagents from Promega were used to prepare the mixture. The composition of the reaction mixture volume (µL) of reaction components per 20 µL sample: Buffer (5× Green Go Taq, Flexi Buffer), 4 µL; 25 mM MgCl₂, 1.6 µL; 10 mM Ultrapure dNTPs Mix, 0.32 µL; DNA polymerase (Go Taq G2 Flexi), 0.17 µL; Nuclease-free water, 11.91 µL (reaction mixture for a single primer pair), 10.91 µL (reaction mixture for multiplex PCR); Starter F, 0.5 µL; Starter F, marker 2–0.5 µL (reaction mixture for multiplex PCR); Starter R, 0.5 µL; Starter 1,

marker 2–0.5 µL (reaction mixture for multiplex PCR); DNA, 1 µL. Reaction profile for PCR is shown below:

Table 2. Molecular markers associated with *F. verticillioides* resistance genes for maize.

Polymorphism	Marker	Primer Sequences		Product Size (bp)	Melting Temperature (°C)	Reference
		Rewers	Forward			
SSR	bnlg1621	GGATCTTCGTTGCAGTTCTT	CATCAGTGATCCTCCACCAT	135–160	54	[13]
	bnlg1063	GGAGACAACCCGACGAC	GGTACCAGAGCCACAGATCC	105–120	55	[13]
	bnlg1740	TTTTCTCCTTGAGTTCGTTCTG	ACAGGCAGAGCTCTCACACA	125–160	56	[13]
	umc2082	TAGCTGCCCTCTTCCGTCT	GTCGTGGCGTAGAGACTAGGGT	100–130	54	[13]
	umc2059	CTCTTCGATCTTTAAGAGAGAGAGAG	ACACGAGGCACTGGTACTAACG	170–200	54	[13]
	umc2013	GGAAAAGGAGGAACAGTGTAAGCA	AGCGTGATCAGACGTACAATGCTA	110–130	54	[13]
	SSR85	GGGACGAGAGTCTGTTGTGTTG	GTTGATGCATGTGACTCTGGAAAC	110–125	55	[13]
	SSR93	CGCCGTACAGACTGCTATGA	CACATGCTACGACTGCGATG	210	57	[10]
	SSR105	GTTTCATCTGATTCCCATCC	CAGCCTTGCTTCTACACCAC	200	58	[10]
	SSR255	TCGACGAGATACGCGACTAC	CAGTACAAAGCCGATCCAAG	200	55	[10]
ISSR	AD8	(AGC) ₆ GC		410	55	[10]
STS	STS03	CTTGATATCATCAGCTAGGGCATGT	GTGATCTGAACGCCAACCTC	300	54	[10]

PCR conditions:

94 °C/2 min.	} 39×
95 °C/1 min.	
54 °C */0.50 min.	
72 °C/1 min.	
72 °C/5 min.	
4 °C/∞.	

* The primer binding temperature was different for each marker and depended on the melting temperature of the primer. The temperatures for each marker are given in Table 2. Melting point for multiplex PCR is 54 °C.

2.2.4. Electrophoretic Separation

Electrophoresis was conducted in a 2% agarose gel in 1× TBE buffer out at 120 V for 1.5 h.

Composition of the 2% agarose gel: 1× TBE buffer, 150 µL; Agarose, 3 g; Midori Green DNA Stain, 7.5 µL.

2.3. Statistical Analysis

The normality of the distribution of the degree of *F. verticillioides* infection of the maize lines was tested using Shapiro–Wilk’s normality test. The homogeneity of variance was tested using Bartlett’s test. A one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the main line effect on the variability of the degree of *F. verticillioides* infection. The genetic similarity for each pair of the investigated lines was estimated based on the coefficient proposed by Nei and Li [19]. The lines were grouped hierarchically using the unweighted pair group method of arithmetic means (UPGMA) based on the calculated coefficients [20]. The relationships between the lines were presented in the form of a dendrogram. Results were also analyzed using multivariate methods. The principal component analysis (PCA) was applied to present a multi-markers assessment of similarity for the tested lines. The association between molecular markers and the degree of *F. verticillioides* infection was estimated using regression analysis [21]. All analyses were conducted in GenStat 18.2 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, England, UK).

3. Results

3.1. Field Experiment

As a result of field observations, it was confirmed that genotypes identified as resistant were characterized by higher resistance on a 9-level COBORU scale (1, susceptible; 9, resistant) than susceptible genotypes. The empirical distribution of the degree of *F. verticillioides* infection was normal. The results of the analysis of variance for *Fusarium* resistance

($F_{29,60} = 8.55$) showed variability of the tested lines at the significant level $\alpha = 0.001$. The lines with numbers 255, 260, 9, 25, 28, 52, 71 were the most resistant at levels 8 and 9 (Table 3). It is worth noting that during molecular analyses, the highest number of molecular markers linked to *F. verticillioides* resistance genes were identified in these lines (Table 3). The least resistant at level 4–6 were lines with numbers: 254, 257, 24, and 67.

Table 3. Degree of *Fusarium verticillioides* infection of individual genotypes and number of identified markers.

Line No.	Observation of the Degree of Resistance			Number of Molecular Markers Identified
	I Repetition	II Repetition	III Repetition	
253	7	7	8	6
254	4	5	4	5
255	<u>9</u>	<u>9</u>	<u>9</u>	9
256	5	7	6	7
257	5	5	6	6
258	7	8	7	7
259	7	7	7	8
260	<u>9</u>	<u>9</u>	<u>8</u>	9
9	<u>9</u>	<u>9</u>	<u>8</u>	9
16	7	6	7	7
23	6	6	7	8
24	6	5	4	6
25	<u>9</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	10
28	<u>9</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	8
35	8	8	7	9
41	8	7	6	7
45	7	7	8	8
47	8	7	8	8
52	<u>9</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	8
57	5	6	5	7
58	6	6	5	7
66	8	7	7	8
67	4	5	6	6
68	5	7	4	7
71	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	8
74	8	6	5	8
78	6	8	6	7
80	6	6	7	8
103	8	6	6	7
114	9	8	9	8

3.2. Identification of Molecular Markers Linked to *Fusarium verticillioides* Resistance Genes

The analyzed markers were taken from literature reports. Table 4 shows the distribution of molecular markers associated with *F. verticillioides* resistance genes in the tested lines. (“+” -visible stripe, “-” -no stripe). As can be seen from the analyses, ten of the 12 markers tested were identified for one line number 25 (Table 4). This line has a fusarium resistance of 8–9 under field conditions Table 3). For lines numbered 255, 260, and 9, nine of twelve markers were identified. These lines also exhibited resistance at the 8–9 level under field conditions. Similarly, for the line with number 35, nine markers were identified; this line, however, exhibited slightly lower resistance at the 7–8 level. The least resistant was line 254, in which resistance was at the level of 4–5, and the number of identified markers was five. The same was true for lines 257, 24 and 67, which were characterized by resistance at the level of 4–6 and the number of identified markers was six (Tables 3 and 4).

Table 4. Molecular markers linked to plant resistance to fusarium present in the analyzed lines.

Line No.	Molecular Marker											
	SSR85	bngl1063	bngl1740	umc2082	bngl1621	umc2059	umc2013	SSR93	SSR105	SSR255	AD8	STS03
253	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
254	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
255	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
256	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
257	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
258	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
259	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
260	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
16	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
23	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
24	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
41	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
45	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
47	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
52	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
57	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
58	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
66	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
67	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
68	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
71	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
74	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
78	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
80	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
103	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
114	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

Below, photos 1 and 2, and 3 and 4 show sample electrophoretic images showing the identification of bngl1621 and umc2059 markers for the 30 maize genotypes tested (Figures 1–4). For the bngl1521 marker, the following products were obtained by polymerase chain reaction: for lines 253, 254, 257, 258, 260, 16, 23, 66, 67, 68, 71, 74, 80 and 114, a specific product of 170 bp was obtained. For lines: 255, 256, 259, 9, 24, 25, 28, 35, 41, 45, 47, 52, 57, 58, 78 and 103 a specific product of 175 bp was obtained (Figures 1 and 2). For the umc 2059 marker, specific products of four different sizes were obtained: 110 bp (for lines: 260, 9, 16, 23, 24, 25, 28), 120 bp (for line: 254), 125 bp (for lines: 253 and 258) and 130 bp (for lines: 257 and 35) (Figure 3). In Figure 4, a product of 110 bp was observed in all analyzed lines.

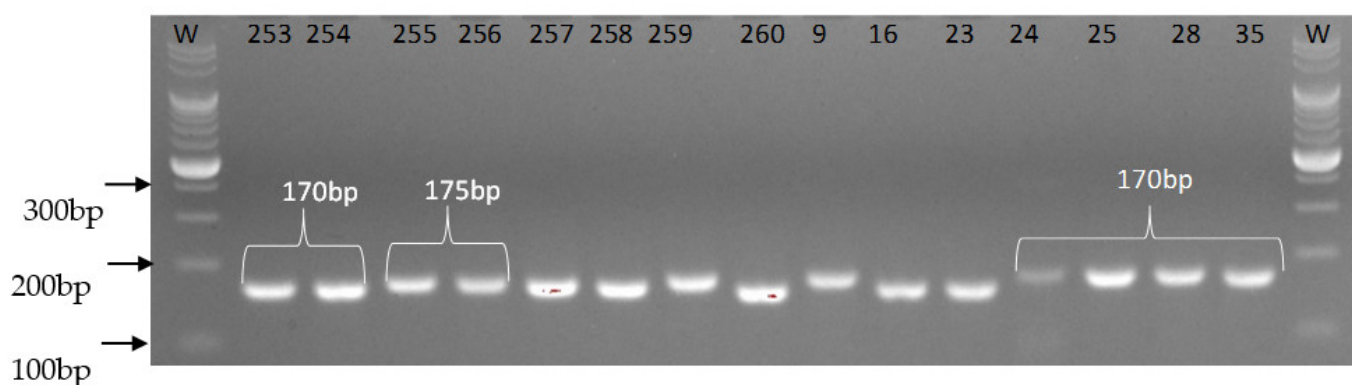


Figure 1. Electrophoretic image of PCR products in 2% agarose gel using bnlgl621 primer pair.

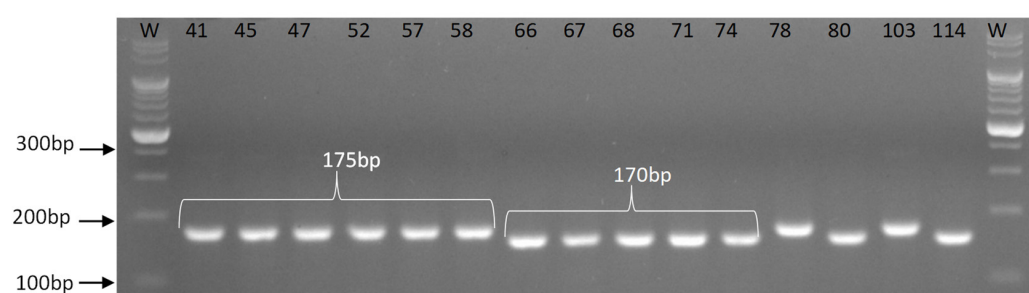


Figure 2. Electrophoretic image of PCR products in 2% agarose gel using bnlgl621 primer pair.

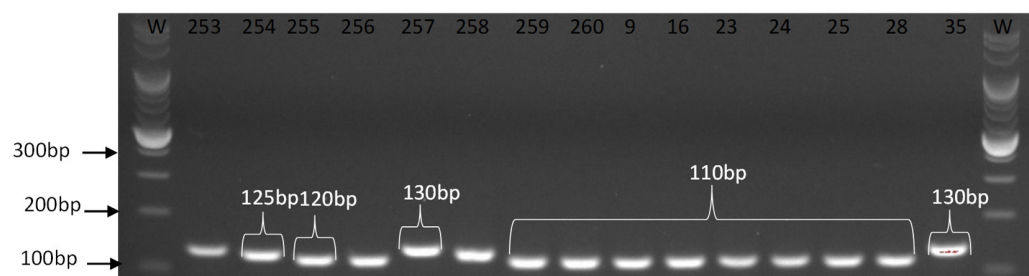


Figure 3. Electrophoretic image of PCR products in 2% agarose gel using umc2059 primer pair.

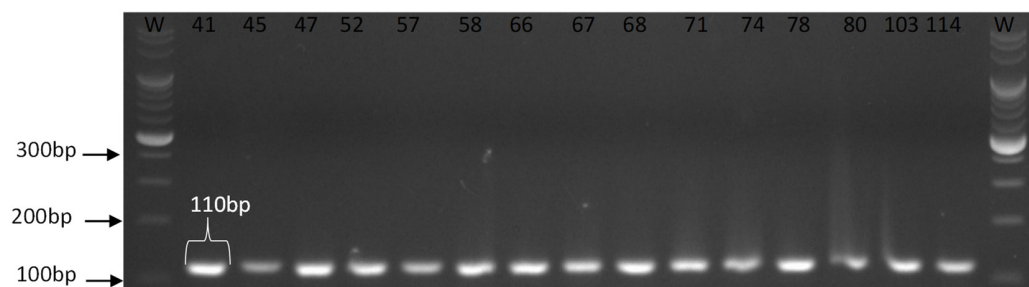


Figure 4. Electrophoretic image of PCR products in 2% agarose gel using umc2059 primer pair.

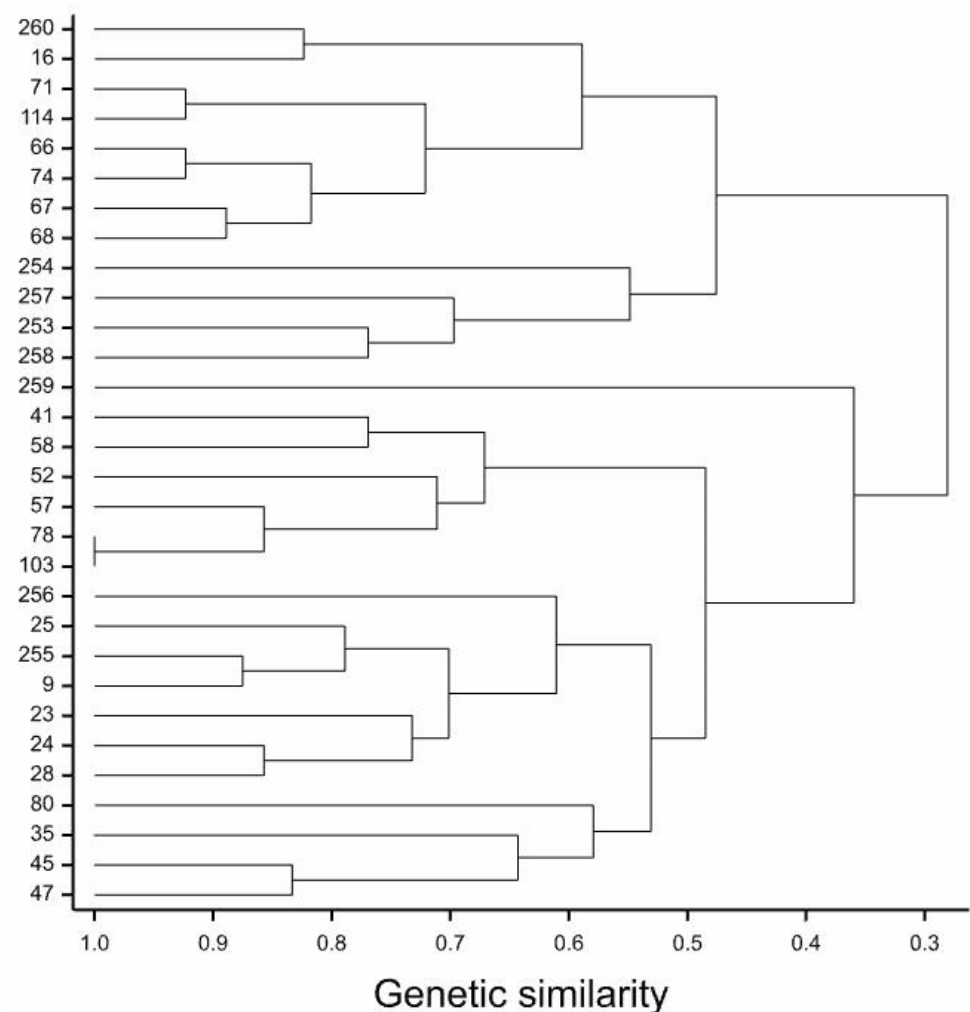
All markers, except AD8, were associated with *F. verticillioides* resistance of the maize lines (Table 5). Percentage variance accounted for particular markers ranged from 0.7% (for bnlgl621 170 bp and bnlgl621 175 bp) to 19.9% (for STS03 (Table 5).

The greatest genetic similarity (equal to 1) was found for lines 78 and 103, while the most diversity (equal to 0) for lines 28 and 258 (Figures 5 and 6).

Table 5. Characteristics of molecular markers associated with *Fusarium verticillioides* resistance.

Marker	Effect	Percentage Variance Accounted
SSR85	0.921 ***	9.9
bngl1063	0.565 ***	7.4
bngl1740 125 bp	−0.093 *	1.5
bngl1740 155 bp	−0.432 ***	6.7
bngl1740 160 bp	0.518 ***	2.8
umc2082 100 bp	0.503 ***	3.4
umc2082 115 bp	0.067 *	1.2
umc2082 120 bp	0.164 ***	4.7
bngl1621 170 bp	−0.521 ***	0.7
bngl1621 175 bp	0.521 ***	0.7
umc2059 110 bp	0.694 **	1.8
umc2059 120 bp	−2.7 **	11.2
umc2059 125 bp	0.417 *	7.5
umc2059 130 bp	−0.476 **	5.5
umc2013 120 bp	−0.224 *	2.8
umc2013 125 bp	−0.093 *	1.5
SSR93	0.486 **	3.6
SSR105	1.033 ***	11.3
SSR255	0.483 ***	5.7
AD8	0.06	
STS03	1.25 ***	19.9

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

**Figure 5.** Dendrogram of cluster groupings of 30 maize lines based on all molecular markers.

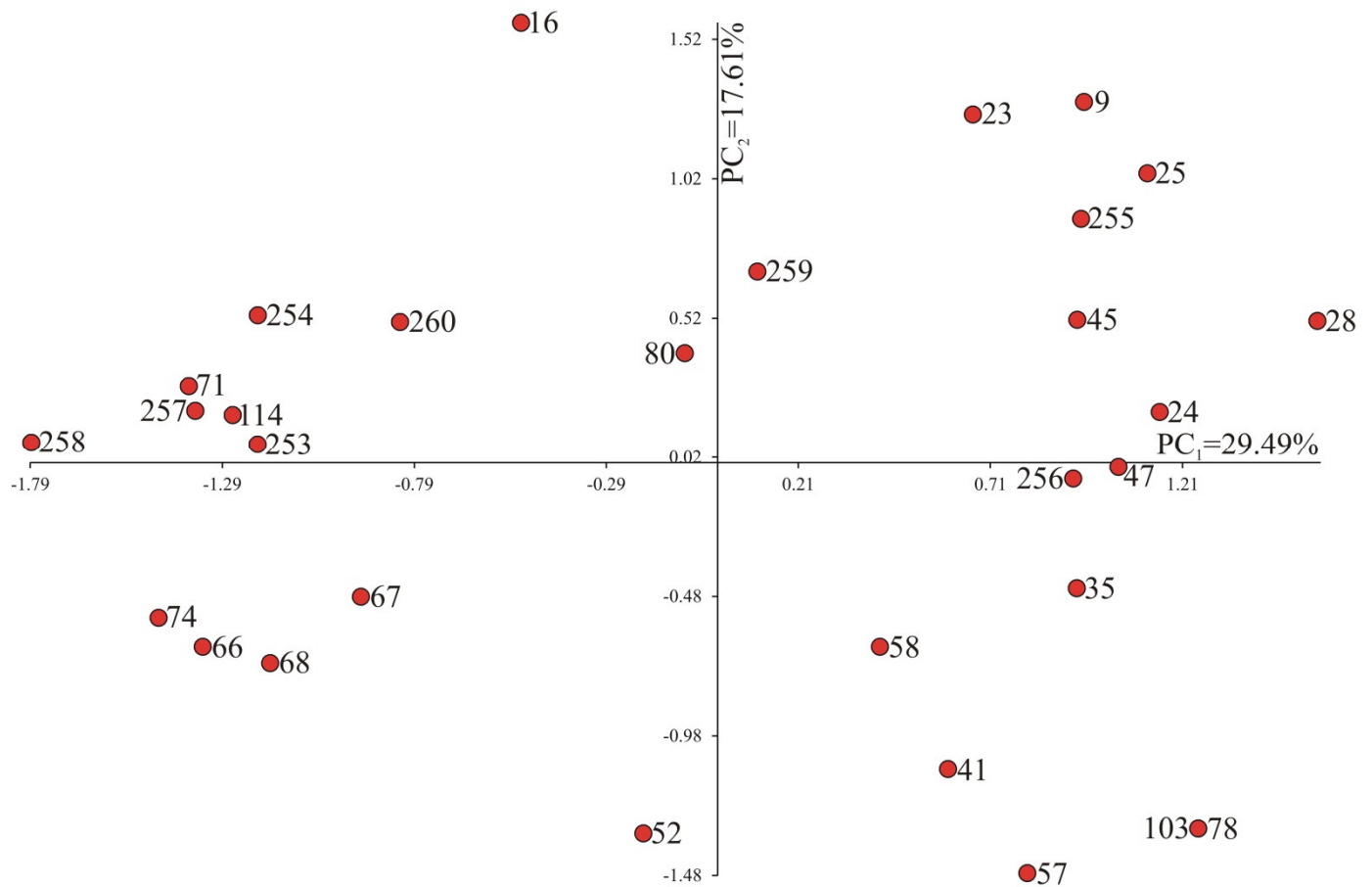


Figure 6. Distribution of 30 maize lines in the space of the first two principal components.

Analysis of the first two principal components for 30 maize lines regarding the all molecular markers is shown in Figure 6. In the graph, the coordinates of the point for a particular line were the values for the first and second principal component, respectively. The first two principal components accounted for 47.10% of the total variability between the individual lines.

3.3. Multiplex PCR Analyses

In order to simultaneously identify two markers associated with cob fusarium resistance genes, conditions were developed for multiplex PCR reactions. Figures 5 and 6 show the multiplex PCR results developed for the markers bnlg1621 and umc2059 (Figures 7 and 8). The multiplex PCR results corresponded to those from single marker analyses. Multiplex PCR was also developed for markers bnlg1621 and SSR85, bnlg1621 and bnlg1740, bnlg1740 and SSR85, STS03 and umc2013, and STS03 and SRR255 according to the methodology presented in Materials and Methods.

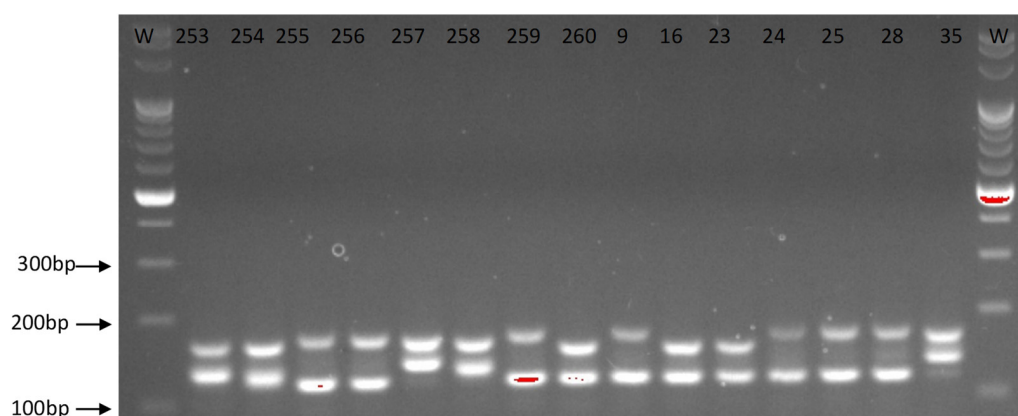


Figure 7. Electrophoretic image of PCR products after including bnlg1621 and umc2059 primer pairs in the reaction.

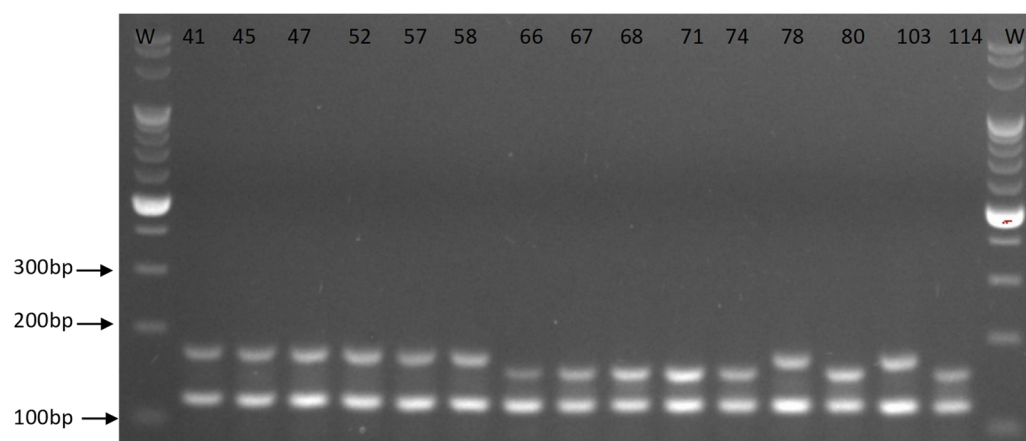


Figure 8. Electrophoretic image of PCR products after including bnlg1621 and umc2059 primer pairs in the reaction.

4. Discussion

Fungi of the genus *Fusarium* spp. are common pathogens among grain crops. They cause diseases associated with rot of ears, stems and roots, among others. Their negative effects cause large losses in yield. In addition, some races of these fungi have the ability to produce mycotoxins that are harmful to humans and animals [22]. Mycotoxins can be divided into three classes: fumonisins, compounds with a simple structure, cause complex and diverse harmful reactions; trichothecenes, a group of compounds with the most harmful effects on humans and animals, can cause fatal and chronic poisoning; zearalenones, the least harmful group of compounds, are toxic but cause death [23].

Mycotoxin toxicity is divided into four types: chronic, acute, teratogenic and mutagenic. The effect of acute poisoning is most often a decrease in kidney and liver function. In severe cases, it leads to the death of the individual [24].

As part of prevention, great emphasis is placed on the development of resistance breeding. Classical selection of resistant varieties based on phenotype analysis is time-consuming and costly. In view of the above, molecular biology tools are increasingly being used for selection. Sets of molecular markers are available that significantly augment traditional resistance breeding methods [25].

Maize resistance to *Fusarium* spp. is a quantitative trait determined by low-influence polygenes [12,26–28]. Over the past decade, many studies have been conducted on the genetic basis associated with resistance to the disease [29]. Genome-wide association and transcriptomic studies (transcriptomic and genome-wide association studies GWAS)

combined with QTL mapping have helped identify markers associated with increased resistance to *Fusarium* spp.

We know from literature reports that phytohormones, e.g., salicylic acid, jasmonic acid and abscisic acid, play a key role in maize's defense response to *Fusarium* spp. The induction of genes related to the benzoxazinoid biosynthetic pathway (i.e., an antimicrobial and insecticidal secondary compound in maize) has also been shown to be linked to plant defense mechanisms against pathogens. The involvement of genes encoding pathogenesis-related (PR) proteins, particularly β -1,3-glucanase, chitinase and pathogenesis-related protein 10 (PR10 protein), has also been observed in maize plant defense responses against *F. verticillioides* [30,31]. It is important to identify markers associated with genes affecting fusarium resistance to facilitate the selection of resistant genotypes. As a result of many studies to date, several SSR-type markers (SSR85, bnlgl1063, bnlgl1740, umc2082, bnlgl1621, umc2059 or umc2013) have been selected for molecular-level selection of resistant varieties and lines.

As can be concluded from the analyses, the resistance of the maize plants tested was correlated with the number of molecular markers identified. An example is line number 25, in which ten (SSR 85, Bngl 1063, Bngl 1740, Umc 2082, Bngl 1621, Umc 2059, Umc 2013, SSR 93, SSR 105, STS 03) of the twelve markers tested were identified. This line is characterized by a *F. verticillioides* resistance of 8–9 under field conditions. For other lines with numbers 255, 260, and 9, nine (SSR 85, Bngl 1063, Bngl 1740, Umc 2082, Bngl 1621, Umc 2059, Umc 2013, SSR 105, STS 03) of twelve markers were identified. As in the case of the line with number 25, these lines also exhibited resistance at the 8–9 level under field conditions. The same pattern was observed for the line with number 35, for which nine markers were identified. However, this line was characterized by a slightly lower resistance at the level of 7–8. The least resistant was line 254, in which resistance was at the level of 4–5 and the number of identified markers was five. The same was true for lines 257, 24 and 67, which were characterized by resistance at the level of 4–6, and the number of identified markers was six.

The molecular markers used for analysis in this work were taken from the literature of Abdel-Rahman et al. [13]. In their work, the authors studied *Fusarium* spp.—resistant and susceptible genotypes and two parental genotypes. This allowed them to select PCR reaction products responsible for increased resistance. In their study, the problematic markers were umc2082 and bnlgl1063. As many as four different products were obtained for the umc2082 marker. The resulting bands had similar lengths, making further analysis difficult. Park et al. [32] also studied this molecular marker to analyze the genetic diversity of maize in Korea. The course of the PCR reaction looked similar to the course in this work. However, Park et al. [32] in their work used a polyacrylamide gel for electrophoretic separation thus obtaining better separation of PCR reaction products. Hence, it can be inferred that by using this type of gel, a clearer electrophoretic image could be obtained. Abdel-Rahman et al. [13] obtained products of about 100 and 120 bp for this markers.

Sa et al. [33] evaluating the genetic diversity and structure of selected maize inbred lines studied the bnlgl1621 marker, which is also analyzed in this work. According to the study, a total of as many as 15 different alleles were shown for this particular molecular marker, which occurred in the inbred lines studied. Their research work also analyzed other SSR-type markers, 50 in number, and a total of 381 alleles were distinguished in just 32 maize inbred lines.

As a result of the methods used, clear and readable electrophoretic images were obtained for all the molecular markers analyzed. The exceptions were the aforementioned markers umc2082 and bnlgl1063. Ignjatović-Micić et al. [34] studying the diversity as well as genetic structure of local maize populations also took into account the bnlgl1063 marker due to its high polymorphism. In their research work, they obtained a very clear electrophoretic image. However, they used different primer attachment temperatures (63.5 °C or 56 °C). The authors did not specify which exact temperature was used for this marker. However, the difference between those used in this paper is at least one degree. Therefore, it can

be concluded that using a slightly higher temperature for primer attachment would have yielded a better, clearer electrophoretic image.

Ashkani et al. [35] investigating multiplex PCR conditions using SSR markers concluded that such reactions often require extensive optimization to obtain relatively good results, and the reaction conditions themselves can differ significantly from single marker analyses. Very often, primers of both markers can hybridize with each other.

In order to improve the breeding cycle, multiplex PCR conditions were developed to identify two markers simultaneously. The multiplex PCR results corresponded to those from single marker analyses. Multiplex PCR was developed for markers bnlg1621 and umc2059 bnlg1621 and SSR85, bnlg1621 and bnlg1740, bnlg1740 and SRR85, STS03 and umc2013, STS03 and SRR255 according to the methodology presented in Materials and Methods.

Butrón et al. [2] investigated quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance to corn cob fusariosis using a maize population called Multiparent Advanced Generation Intercross (MAGIC). The authors confirmed that maize cob fusariosis resistance is determined by quantitative trait genes, meaning that many loci manifest small additive effects [36–38].

In conclusion, it was found that the tested molecular markers may be useful for the selection of fusarium-resistant maize lines. In addition, multiplex PCR conditions were developed for the simultaneous identification of two markers. On the basis of the analysis of field experiments and molecular studies, maize lines with numbers 9, 25, 35, 255 and 260 were selected, which are characterized by very high resistance to fusarium and have accumulated markers linked with the genes of resistance to fusarium. These lines can be taken as reference lines and used in the breeding process as a source of fusarium resistance genes.

5. Conclusions

It is well known that advances in plant breeding depend on technologies to identify markers of quantitative traits. Statistical methods used in association mapping and genomic selection are playing an increasingly important role. Attempts are being made to identify and map new markers significantly associated with many traits, including *F. verticillioides* resistance. In recent years, there has been a change in the approach to selection. Instead of using single feature markers, multiple markers for these features are searched for, or the entire available pool of markers describing the population is used for selection. The research described in this paper shows that the presented markers can be successfully used for the selection of varieties resistant to *F. verticillioides*. In the course of molecular analyses and field observations, five lines were selected: 9, 25, 35, 255 and 260, which can be used to crossbreed in order to obtain varieties resistant to fusarium. In addition, conditions for multiplex PCR reactions were developed to shorten the breeding cycle. This tool can be used for the selection of resistant lines and varieties.

Author Contributions: Conceptualization, A.S. and A.T.; methodology, A.S. and J.B.; software, A.T., J.B. and A.S.; validation, A.T., J.B. and A.S.; formal analysis, A.S., J.B., A.T., B.N., K.S., D.W., D.K.-P., M.K., S.M. and J.N.; investigation, A.S., J.B., K.S. and A.T.; resources, A.S.; data curation, A.S., A.T. and J.B.; writing—original draft preparation, A.S., A.T. and J.B.; writing—review and editing, A.S., A.T. and J.B.; visualization, A.S., A.T. and J.B.; supervision, A.T. and J.B.; project administration, A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research presented in this publication was financed as part of the research project “Analysis of genetic determinants of heterosis effect and fusarium resistance in maize (*Zea mays* L.)”. PL: “Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.)”. The project is implemented under the grant from the Ministry of Agriculture and Rural Development “Biological progress in plant production (recruitment 2020)”. Duration of the project 2021–2026.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Yadav, M.K.; Lipsa, D.; Sandeep, R. Evaluation of Host Plant Resistance Traits in Certain Genotypes of Maize (*Zea Mays* L.) against Maize Spotted Stem Borer (*Chilo Partellus* Swinhoe, Crambidae). *Int. J. Entomol. Res.* **2021**, *6*, 64–69. Available online: www.entomologyjournals.com (accessed on 1 May 2022).
2. Butrón, A.; Santiago, R.; Cao, A.; Samayoa, L.F.; Malvar, R.A. QTLs for resistance to fusarium ear rot in a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) maize population. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 897–904. [\[CrossRef\]](#)
3. Scauflaire, J.; Mahieu, O.; Louvieux, J.; Foucart, G.; Renard, F.; Munaut, F. Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *131*, 59–66. [\[CrossRef\]](#)
4. Logrieco, A.; Mule, G.; Moretti, A.; Bottalico, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. In *Mycotoxins in Plant Disease*; Logrieco, A., Bailey, J.A., Corazza, L., Cooke, B.M., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2002; pp. 597–609. ISBN 978-94-010-3939-0. [\[CrossRef\]](#)
5. Eckard, S.; Wettstein, F.E.; Forrer, H.-R.; Vogelgsang, S. Incidence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Silage Maize. *Toxins* **2011**, *3*, 949–967. [\[CrossRef\]](#)
6. Garcia-Ceron, D.; Lowe, R.G.T.; McKenna, J.A.; Brain, L.M.; Dawson, C.S.; Clark, B.; Berkowitz, O.; Faou, P.; Whelan, J.; Bleackley, M.R.; et al. Extracellular Vesicles from *Fusarium graminearum* Contain Protein Effectors Expressed during Infection of Corn. *J. Fungi* **2021**, *7*, 977. [\[CrossRef\]](#)
7. Bush, B.J.; Carson, M.L.; Cubeta, M.A.; Hagler, W.M.; Payne, G.A. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing Maize Kernels. *Genet. Resist. Infect. Am. Phytopathol. Soc.* **2003**, *94*, 88–93. [\[CrossRef\]](#)
8. Uwe, L.; Miedaner, T.; Buerstmayr, H.; Vögele, R.T. *Breeding for Resistance to Fusarium Ear Diseases in Maize and Small-Grain Cereals Using Genomic Tools*; Faculty of Agricultural Sciences University of Hohenheim: Stuttgart, Germany, 2020; p. 144. Available online: http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2021/1865/pdf/Gaikpa_Dissertation_phdKIM_print.pdf (accessed on 1 May 2022).
9. Stagnati, L.; Lanubile, A.; Samayoa, L.F.; Bragalanti, M.; Giorni, P.; Busconi, M.; Holland, J.; Mrocco, B.A. A Genome Wide Association Study Reveals Markers and Genes Associated with Resistance to *Fusarium Verticillioides* Infection of Seedlings in a Maize Diversity Panel. *G3 Genes Genomes Genet.* **2019**, *9*, 571–579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Salah, N.; Milad, S.I.; El-Rouby, M.M.; Barakat, M.N. Identification of New Molecular Markers Linked to Maize Stalk Rot Disease Resistance (*Fusarium Moniliforme*) in Maize. *Plant Omics J.* **2016**, *9*, 12–18. [\[CrossRef\]](#)
11. Michel, S.; Wagner, C.; Nosenko, T.; Steiner, B.; Samad-Zamini, M.; Buerstmayr, M.; Mayer, K.; Buerstmayr, H. Merging Genomics and Transcriptomics for Predicting Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Genes* **2021**, *12*, 114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Maschietto, V.; Colombi, C.; Pirona, R.; Pea, G.; Strozzi, F.; Marocco, A.; Rossini, L.; Lanubile, A. QTL mapping and candidate genes for resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Abdel-Rahman, M.M.; Bayoumi, S.R.; Barakat, M.N. Identification of molecular markers linked to *Fusarium* ear rot genes in maize plants *Zea mays* L. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2016**, *30*, 692–699. [\[CrossRef\]](#)
14. Jones, E.S.; Sullivan, H.; Bhatramakki, D.; Smith, J.S.C. A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2007**, *115*, 361–371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Hamblin, M.T.; Fernandez, M.G.S.; Tuinstra, M.R.; Rooney, W.L.; Kresovich, S. Sequence Variation at Candidate Loci in the Starch Metabolism Pathway in Sorghum: Prospects for Linkage Disequilibrium Mapping. *Crop Sci.* **2007**, *47*, 125–134. [\[CrossRef\]](#)
16. Van Inghelandt, D.; Melchinger, A.E.; Lebreton, C.; Stich, B. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theor. Appl. Genet.* **2010**, *120*, 1289–1299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Li, M.; Zhong, W.; Yang, F.; Zhang, Z. Genetic and Molecular Mechanisms of Quantitative Trait Loci Controlling Maize Inflorescence Architecture. *Plant Cell Physiol.* **2018**, *59*, 448–457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Arabzai, M.; Gul, H. Application Techniques of Molecular Marker and Achievement of Marker Assisted Selection (MAS) in Three Major Crops Rice, Wheat and Maize. *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* **2021**, *8*, 82–93. [\[CrossRef\]](#)
19. Nei, M.; Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5269–5273. [\[CrossRef\]](#)
20. Starzycka-Korbas, E.; Weber, Z.; Matuszczak, M.; Bocianowski, J.; Budzianowski, G.; Stefanowicz, M.; Starzycki, M. The diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates from western Poland. *J. Plant Pathol.* **2021**, *103*, 185–195. [\[CrossRef\]](#)
21. Bocianowski, J.; Kozak, M.; Liersch, A.; Bartkowiak-Broda, I. A heuristic method of searching for interesting markers in terms of quantitative traits. *Euphytica* **2011**, *181*, 89–100. [\[CrossRef\]](#)
22. Bottalico, A.; Perrone, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 611–624. [\[CrossRef\]](#)
23. Desjardins, A.E.; Proctor, R.H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 47–50. [\[CrossRef\]](#)
24. Pitt, J.I. Toxigenic fungi: Which are important? *Med. Mycol.* **2000**, *38*, 17–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Santiago, R.; Cao, A.; Malvar, R.A.; Butrón, A. Genomics of Maize Resistance to Fusarium Ear Rot and Fumonisin Contamination. *Toxins* **2020**, *12*, 431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Robertson, L.A.; Kleinschmidt, C.E.; White, D.G.; Payne, G.A.; Maragos, C.M.; Holland, J.B. Heritability and correlations of Fusarium ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Sci.* **2006**, *46*, 353–361. [\[CrossRef\]](#)
27. Ding, J.Q.; Wang, X.M.; Chander, S.; Yan, J.E.; Li, J.S. QTL mapping of resistance to Fusarium ear rot using a RIL population in maize. *Mol. Breed.* **2008**, *22*, 395–403. [\[CrossRef\]](#)
28. Chen, J.; Ding, J.; Li, H.; Li, Z.; Sun, X.; Li, J.; Wang, R.; Dai, X.; Dong, H.; Song, W.; et al. Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to Fusarium ear rot in maize. *Mol. Breed.* **2012**, *30*, 1649–1656. [\[CrossRef\]](#)
29. Gaikpa, D.S.; Miedaner, T. Genomics-assisted breeding for ear rot resistances and reduced mycotoxin contamination in maize: Methods, advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.* **2019**, *132*, 2721–2739. [\[CrossRef\]](#)
30. Baldwin, T.; Baldwin, S.; Klos, K.; Bregitzer, P.; Marshall, J. Deletion of the benzoxazinoid detoxification gene *NAT1* in *Fusarium graminearum* reduces deoxynivalenol in spring wheat. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214230. [\[CrossRef\]](#)
31. Cotton, T.E.A.; Pétriacq, P.; Cameron, D.D.; Al Meselmani, M.; Schwarzenbacher, R.; Rolfe, S.A.; Ton, J. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME J.* **2019**, *13*, 1647–1658. [\[CrossRef\]](#)
32. Park, J.S.; Park, J.Y.; Park, K.J.; Lee, J.K. Genetic diversity among waxy corn accessions in Korea revealed by microsatellite markers. *Korean J. Breed. Sci.* **2008**, *40*, 250–257.
33. Sa, K.J.; Hong, T.K.; Lee, J.K. Genetic diversity and association analyses of canadian maize inbred lines with agronomic traits and simple sequence repeat markers. *Plant Breed. Biotechnol.* **2018**, *6*, 159–169. [\[CrossRef\]](#)
34. Ignjatović-Mićić, D.; Drinić, S.M.; Nikolić, A.; Lazić-Jančić, V. SSR analysis for genetic structure and diversity determination of maize local populations from former Yugoslavia territories. *Russ. J. Genet.* **2008**, *44*, 1317–1324. [\[CrossRef\]](#)
35. Ashkani, S.; Rafii, M.Y.; Shabanimofrad, M.; Foroughi, M.; Azizia, P.; Akhtar, M.S.; Sahebi, M.; Harun, A.R.; Nasehi, A. Multiplex SSR-PCR approaches for semi-automated genotyping and characterization of loci linked to blast disease resistance genes in rice. *Comptes Rendus Biol.* **2015**, *388*, 709–722. [\[CrossRef\]](#)
36. Bocianowski, J.; Nowosad, K.; Wróbel, B.; Szulc, P. Identification of Associations between SSR Markers and Quantitative Traits of Maize (*Zea mays* L.). *Agronomy* **2021**, *11*, 182. [\[CrossRef\]](#)
37. Cyplik, A.; Sobiech, A.; Tomkowiak, A.; Bocianowski, J. Genetic Parameters for Selected Traits of Inbred Lines of Maize (*Zea mays* L.). *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 6961. [\[CrossRef\]](#)
38. Sobiech, A.; Tomkowiak, A.; Nowak, B.; Bocianowski, J.; Wolko, Ł.; Spychała, J. Associative and Physical Mapping of Markers Related to *Fusarium* in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation Sequencing (NGS). *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

P3: Molekularne mechanizmy odporności na fuzariozę kolb kukurydzy.

Sobiech, A.

Fragmenta Agronomica 40(1), 14–24.(2023).

doi:10.26374/fa.2023.40.2

MOLEKULARNE MECHANIZMY ODPORNOŚCI NA FUZARIOZĘ KOLB KUKURYDZY

ALEKSANDRA SOBIECH¹

¹ Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Synopsis. Choroby fusaryjne kukurydzy są poważnym zagrożeniem dla jej upraw. Wobec dynamicznie rozwijającego się arealu tego zboża, koniecznym jest prowadzenie badań w kierunku genetycznej odporności na *Fusarium* spp. Ze względu na złożoność interakcji patogen-gospodarz najskuteczniejszym i najszybszym sposobem wspomagającym selekcję są genomowe badania asocjacyjne. Jest to użyteczne narzędzie do identyfikacji genów kandydujących, zwłaszcza w połączeniu z mapowaniem QTL, które z powodzeniem stosuje się w badaniach nad lokalizacją genów odporności na fuzarium. Ze względu na to, że odporność na *Fusarium* jest cechą ilościową i opartą na rozproszonej architekturze wielu drobnych genów, najlepszym podejściem dla przyszłej hodowli molekularnej jest MAS. Selekcja wspomagana markerami, która będzie wymagała profili markerów cało genomowych dla całego zestawu linii hodowlanych oraz modeli predykcyjnych i metodologii selekcji, znajdzie zastosowanie w analizie odporności na *Fusarium* – jak to ma miejsce dla klasycznych cech złożonych.

Słowa kluczowe: *Fusarium*, *Zea mays* L., QTL, odporność

WSTĘP

Kukurydza (*Zea mays* L.) jest ważnym gatunkiem roślin uprawianym na świecie. Dynamicznie zmieniający się klimat oraz wzrost zapotrzebowania na kukurydze, warunkowany przyrostem naturalnym, jest katalizatorem do prowadzenia badań na temat genów i regionów genomowych, istotnych z punktu widzenia agronomii [Unterseer i in. 2014, Shah i in. 2016].

Od początku XXI w. ciepła pogoda, poszerzanie arealu i intensyfikacja upraw, a także wprowadzenie uproszczeń agrotechnicznych oraz pojawianie się nowych gatunków agrofagów spowodowało znaczący wzrost zagrożenia dla wysokości i jakości plonów kukurydzy [Zijlstra i in. 2011]. Uprawy tego zboża są często porażane przez grzyby patogeniczne między innymi *Fusarium graminearum* i *Setosphaeria turcica*, co powoduje poważne straty w plonach [Galiano-Carneiro i Miedaner 2017, Sun i in. 2021].

Choroby fusaryjne kolb kukurydzy [ang. *Fusarium* ear rot (FER)], powodowane przez *Fusarium* spp. znane są od dawna. Jednym z pierwszych doniesień na ten temat była praca Bisby'ego i Bailey'a [1923] z Kanady. W odróżnieniu od powodowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium* zgorzeli łodyg, która często prowadzi do bezpośrednich strat w plonie, fuzariozę kolb uważano, za zjawisko rzadkie, mimo to odnotowywano sporadyczne, wysokie straty w plonach [Vigier i in. 2001]. W związku z tym podejmowano niewielkie wysiłki hodowlane mające na celu zwięks-

¹ Adres do korespondencji – *Corresponding address*: aleksandra.sobiech@up.poznan.pl

szenie odporności na fuzariozę kolb. Dopiero po odkryciu toksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* poznano w pełni wpływ pośrednich strat ekonomicznych spowodowanych występowaniem tego grzyba. W większości krajów wprowadzono nowe przepisy dotyczące dopuszczalnych limitów mikotoksyn w żywności i paszach. Obecnie coraz więcej programów hodowli kukurydzy, zarówno w instytucjach publicznych, jak i prywatnych, inicjuje i rozszerza programy hodowlane w celu opracowania odpornych mieszańców przeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierzęta [Lanubile i in. 2017]. Jest to choroba o złożonej etiologii, a wśród czynników sprawczych wymienia się między innymi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* i *Fusarium proliferatum*. Najczęściej sprawcą fuzariozy kolb są grzyby *Fusarium graminearum* (produkujący deoksyniwalenol – DON i zearalenon – ZEA) oraz *Fusarium verticillioides* (produkujący fumiozyny – FUM) [Garcia-Ceron i in. 2021]. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, jest najbardziej szkodliwym patogenem rozpowszechnionym na wszystkich kontynentach, z większą agresywnością w cieplejszych regionach klimatycznych [Ncube i in. 2020]. W literaturze opisywana jest też *Gibberella fujikuroi*, która jest doskonałym (telemorfa) stadium *Fusarium graminearum*.

Do najważniejszych mikotoksyn należą aflatoksyny, fumiozyny, ochratoksyna A, deoksyniwalenol, zearalenon oraz alkaloidy sporyszu, które są wytwarzane głównie przez rodzaje *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Claviceps* [Raghdia i in. 2022].

Selekcja genotypów odpornych na podstawie ich fenotypu może być skuteczna, ale jest pracochłonna i czasochłonna, a także napotyka na inne problemy. Fenotypowanie kukurydzy pod kątem odporności na fuzarium wymaga badań polowych prowadzonych w kilku środowiskach ze względu na dużą interakcję genotypu i środowiska. Ponadto wymagane jest odpowiednie zarządzanie terminem inokulacji, ze względu na zróżnicowanie genotypów pod kątem kwitnienia [Maschietto i in. 2017].

Najskuteczniejszym i najszybszym sposobem wspomagającym selekcję są badania transkryptomowe i genomowe badania asocjacyjne [ang. Genome-Wide Association Studies (GWAS)]. Są one użytecznymi narzędziami do identyfikacji genów kandydujących, zwłaszcza w połączeniu z mapowaniem QTL w celu mapowania i walidacji loci dla cech ilościowych [Korte i Farlow 2013]. Połączenie tych metod pozwoliło przezwyciężyć ich ograniczenia [Brachi i in. 2010]. Jako alternatywa dla klasycznych metod hodowli roślin, precyzyjna inżynieria genetyczna opierająca się na technologiach edycji genomu może odegrać kluczową rolę w dostępie do zasobów genetycznych. Zasoby te mogą zostać wykorzystane do zwiększenia odporności roślin na choroby, poprzez ukierunkowanie na odpowiednie mechanizmy obronne roślin warunkowane genetycznie [Eller i in. 2008].

W tym przeglądzie przedstawiono osiągnięcia naukowe i hodowlane ostatnich lat mające na celu poprawę odporności kukurydzy na choroby powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

INTERAKCJA PATOGEN-GOSPODARZ

Interakcja między grzybami z rodzaju *Fusarium* spp. a kukurydzą jest bardzo specyficzna. Od typowego układu, gdzie stopień nasilania choroby jest wynikiem interakcji pomiędzy gospodarzem, patogenem i środowiskiem, różni się tym, że system ten wymaga uzupełnienia o ilość i rodzaj wytwarzanych toksyn [Czembor i in. 2013].

Oprócz badań prowadzonych w celu wyjaśnienia występowania i skutków toksykologicznych, równie ważne jest określenie warunków, które mogą prowadzić do większego zanieczysz-

czenia mikotoksynami, w celu zrozumienia najlepszych praktyk zarządzania, które mogą być stosowane w celu ograniczenia zakażenia.

Warunki pogodowe są czynnikiem, który w większym stopniu wpływa na porażenie ziarna zbóż przez *Fusarium* niż zróżnicowane systemy uprawy roli. Teorię tą potwierdzają badania prowadzone przez Champeil i in. [2004]. Ocena ryzyka wystąpienia fuzariozy oraz modele, które mają na celu prognozowanie wystąpienia tej choroby są oparte na warunkach pogodowych w okresie od kwitnienia do fazy wczesnej dojrzałości młecznej [Doohan i in. 2003].

Na ilość mikotoksyn produkowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* mają wpływ czynniki, związane z rozwojem innych grzybów pojawiających się w warunkach polowych (tych, które ingerują w rośliny przed zbiorem), albo grzybów magazynowych (które ingerują w jakość ziarna po zbiorze). Czynniki te obejmują podłoże, na którym rośnie grzyb oraz warunki środowiskowe [Guerre 2016]. Praktyki rolnicze wyraźnie rozwinęły się w aspekcie kontroli jakości ziarna ze względu na zawartość mikotoksyn. Obejmują one kontrolę obecności i liczebności grzybów na polu oraz porażenie ziarna kukurydzy i kontrolę warunków przechowywania (temperatura, wilgotność, wentylacja, higiena, obecność owadów, czas przechowywania) [Tola i in. 2016, Carbas i in. 2021]

Grzyby patogeniczne są naturalnie obecne w glebie i nie można ich wyeliminować, ważna jest zatem kontrola w celu ograniczenia produkcji mikotoksyn, które są produkowane przez grzyby [Deepthi i in. 2022]. Należy więc skupić uwagę na potrzebach żywieniowych i strukturalnych zarówno rośliny, jak i jej mikrobiomu. W kilku badaniach wykazano, że nawożenie gleby miało pozytywny wpływ na tolerancję roślin na grzyby patogeniczne, jak np. stosowanie nawozów zawierających cynk albo fosforany potasu [Alsamir i in. 2020, Nowembabaz i in. 2021, Gilardi i in. 2022]. Z innych zabiegów agrotechniki, wykazano iż, stosowanie niewłaściwego płodozmianu, przyczynia się do nasilenia występowania fuzariozy kolb [Czembor i in. 2013]. Na stopień porażania kolb przez *Fusarium* pośredni wpływ ma omacnica prosowianka, która nadżera ziarniaki kukurydzy.

Omacnica prosowianka [*Ostrinia nubilalis* (Hübner)], jest szkodnikiem kukurydzy, który ma wpływ na potencjał ekonomiczny obszarów produkcyjnych kukurydzy [Bode i Calvin 1990, Szóke i in. 2002]. Zwykle występują dwa pokolenia larw omacnicy w ciągu roku: pierwsze pokolenie atakuje rośliny w połowie lub pod koniec fazy wegetatywnej, a drugie pokolenie w fazie reprodukcji (od wczesnej fazy młecznej do dojrzałości) [Blandino i in. 2009]. Ponadto larwy drugiego pokolenia odgrywają bardzo ważną rolę w promowaniu infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium* i produkcji mikotoksyn w ziarnach kukurydzy [Sobek i Munkvold 1999].

Na obszarach o klimacie umiarkowanym *F. verticillioides* jest ogólnie bardziej preferowany przez żerujące larwy omacnicy prosowianki niż inne gatunki *Fusarium* a bezpośrednie i pośrednie zwalczanie tego szkodnika jest jedną z głównych strategii przyjętych w celu zminimalizowania infekcji fuzariozami [Scarpino i in. 2015].

Badania epidemiologiczne sugerują prawdopodobny związek między spożyciem kukurydzy skażonej fumiozynami a zapadalnością na raka przełyku oraz występowaniem wad cewy nerwowej u ludzkich zarodków. Fumiozyny zostały sklasyfikowane jako prawdopodobnie rakotwórcze dla ludzi przez Międzynarodową Agencję ds. Badań nad Rakiem [Sun i in. 2007, Alizadeh i in. 2012].

W 2007 roku Unia Europejska wprowadziła normy określające maksymalne zawartości mikotoksyn w ziarnie kukurydzy (EC No 1126/2007). Jeżeli zawartość DON w ziarnie nieprzetworzonym przekracza 1700 µg/kg, ZEA 350 µg/kg, a FUM 4000 µg/kg, takie ziarno nie kwalifikuje się do wykorzystania na paszę. Hodowla i wykorzystanie w uprawie odmian o mniejszej podatności na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* ssp. są powszechnie uznane za najbardziej opłacalną i przyjazną środowisku metodę ochrony roślin przed porażeniem przez patogeny [Meissler i in. 2010, Vasileiadis i in. 2011].

Oprócz czynników środowiskowych, predyspozycji genetycznych również fenotyp rośliny ma wpływ na jej skłonności do porażenia przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Linie z ciasno przylegającymi ziarniakami ułożonymi w rzędach były bardziej odporne na FER [Warfield i Davies 1996, Butron i in. 2006]. Cechy fizjologiczne, takie jak wczesność kwitnienia również wpływają na zmniejszenie podatności na infekcje powodowane przez patogeny między innymi *F. verticillioides*. Hoenish i Davis [1994] wykazali, że na stopień porażenia kolby przez fuzarium wpływ miały właściwości okrywy nasiennej. Grubsza owocnia utrudniała penetrację patogenu, co zmniejszało nasilenie choroby [Battilani i in. 2008]. Oprócz korelacji cech fenotypowych warunkujących nasilenie występowania fuzariozy, ważna jest genetyczna odporność na tę chorobę. Fenotypowa korelacja pomiędzy nasileniem FER a ilością fumiozyn jest umiarkowana, do niskiej [Clements i in. 2003], prawdopodobnie z powodu bezobjawowych infekcji [Oren i in. 2003]. Ponadto korelacja genotypowa pomiędzy podatnością na porażenie roślin przez grzyby z rodzaju *Fusarium* i akumulacją miktosyn była wyższa, niż korelacja fenotypowa (0,87–0,96 vs. 0,40–0,64) [Robertson i in. 2006]. W hodowli, selekcja genotypów bardziej odpornych na FER pozwala na jednoczesną selekcję genotypów w mniejszym stopniu akumulujących wysokie zawartości fumiozyn. Mechanizmy genetyczne kontrolujące obie cechy są takie same lub ściśle powiązane [Lanubile i in. 2017].

GENETYCZNE PODSTAWY ODPORNOŚCI NA INFEKCJE POWODOWANĄ PRZEZ GRZYBY z RODZAJU *FUSARIUM*

Dziedziczenie odporności kukurydzy na *F. verticillioides* jest złożone [De Leon i Pandey 1989, Presello i in. 2005]. Identyfikacja czynników związanych z odpornością ziarniaków na porażenie przez fuzarium i akumulację fumiozyn pomaga w zrozumieniu mechanizmów genetycznych kontrolujących odporność na choroby, a także ułatwia hodowlę kukurydzy. Wcześniejsze badania wskazywały, że czynniki fizyczne, takie jak grubość owocni [Hoenish i Davis 1994] mogą być zaangażowane w odporność na zgniliznę kolb. Bily i in. [2003] oraz Sampietro i in. [2009] w swoich badaniach sugerowali, że czynniki chemiczne, takie jak związki fenolowe w owocni mogą być również zaangażowane w procesy odpornościowe.

Programy hodowlane wdrażane w celu zwiększenia odporności na FER uwzględniały efekty adytywne działania genów, ponieważ efekty te zostały uznane za najważniejsze dla dziedziczenia odporności na FER i akumulacji fumiozyn. Należy jednak zaznaczyć, że odporność roślin na fuzarium może być również wynikiem oddziaływań epistatycznych lub efektem dominacji genów [Williams i in. 2009, Pérez-Brito i in. 2001, Hung i in. 2012, Butron i in. 2015, Netshifhefhe i in. 2018].

Wykorzystanie istniejących źródeł odporności w programach hodowlanych wymaga dokładnego zrozumienia architektury genetycznej cech związanych z FER oraz leżących u ich podstaw mechanizmów molekularnych. Odporności na fuzarium jest złożoną cechą, o której donoszono, że jest dziedziczona ilościowo, a zatem jest kontrolowana przez liczne loci cech ilościowych (QTL) [Martin i in. 2012c, Butron i in. 2015].

W różnych populacjach mapujących stwierdzono ponad 300 QTL dla odporności na FER i GER [ang. *Gibberella* ear rot] oraz cech pokrewnych, stosując zarówno techniki o niskiej przepustowości takie jak: krótkie sekwencje powtarzalne (SSR), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) i losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD) [Ali i in. 2005, Li i in. 2011, Martin i in. 2012a, 2012b] oraz techniki o wysokiej wydajności, takie jak polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) i markery DartSeq [Giomi i in. 2016, Han i in. 2016, Kebede i in. 2016, Han i in. 2018, Wen i in. 2020, Yuan i in. 2020, Gaikpa i in. 2021, Galiano-Carneiro

i in. 2021, Zhou i in. 2021, Sobiech i in. 2022]. Zhou i in. [2021] na podstawie mapy powiązań genetycznych skonstruowanej przy użyciu 1868 markerów, zidentyfikowali 11 QTL, w tym pięć stabilnych QTL, poprzez indywidualną analizę środowiskową. Wspólna analiza wielu środowisk i interakcji epistatycznych ujawniły odpowiednio sześć addytywnych i sześć epistatycznych (addytywnych $\times$ addytywnych) QTL. Wykazali, że wiele QTL o niewielkim efekcie przyczyniło się do genetycznego komponentu odporności na GER, a zarówno efekty addytywne, jak i epistatyczne przyczyniły się do genetycznej architektury odporności na GER. QTL- qGER4.09, o największym efekcie zidentyfikowany i zwalidowany przy użyciu 588 osobników F₂, był korelowany z regionami genomowymi dla fuzaryjnej zgnilizny kolb i aspergillusowej zgnilizny kolb, co wskazuje, że ten locus genetyczny prawdopodobnie nadaje odporność na wiele patogenów i może być potencjalnie wykorzystany w hodowli odmian kukurydzy w celu poprawy odporności na choroby powodujące zgniliznę kolb. Giomi i in. [2016] w celu wyznaczenia QTL dla odporności na *Fusarium verticillioides* i *F. graminearum* zbadali populację mapującą F₅, która składająca się z 298 rekombinowanych mieszańców uzyskanych w wyniku losowego samosiewu krzyżówki LP4637 (umiarkowanie odporna) i L4674 (podatna). Populacja ta została poddana genotypowaniu przez 2 lata pod kątem nasilenia choroby po inokulacji zawiesinami konidialnymi *F. verticillioides* i *F. graminearum*. Cztery QTL zostały zmapowane w chromosomach 2, 3 i 5. Addytywne efekty każdego QTL wahały się od 5,0 do 11,9% powierzchni liścia pokrytej pleśnią i nie zaobserwowano interakcji epistatycznych. Cztery QTL były efektywne dla obu gatunków *Fusarium* niezależnie od środowiska, wskazując, że gen LP4637 jest źródłem szerokiej odporności na *Fusarium* stabilnym w różnych środowiskach. Analizując ekspresje genów Kebede i in. [2016], określili QTL na chromosomach 1, 2 i 9. Transporter MFS, cytochrom P450, dehydrogenaza aldehydowa i gen domeny lektyny zostały określone jako mogące brać udział w odporności na gibberelozę kłosów u kukurydzy. Ali i in. [2005] zidentyfikowali markery odporności na *Fusarium* kukurydzy na chromosomach 1, 3, 4, 5 i 10, odpowiednio w 2, 1, 3 i 2 loci. Na chromosomach 1, 3, 4 i 5 wykazywano markery odporności na fuzariozę kolb.

Li i in. [2011] określili, że selekcja fenotypowa odporności na FER jest skuteczna w hodowli konwencjonalnej. Jednakże, ze względu na trudności w przeprowadzeniu sztucznej inokulacji na polach kukurydzy, selekcja wspomagana markerami (MAS) dla tego rodzaju odporności mogłaby być skuteczna. W swoich badaniach, wykazał nowy QTL na chromosomie 4 (bin 4.06), tym samym poszerzając bazę genetyczną dla odporności na zgorzel podstaw łodygi wywoływanej przez *Fusarium* spp. Odkryty locus może być potencjalnym regionem, ułatwiającym MAS w programach hodowlanych kukurydzy.

W Kanadzie linie wsobne o wysokiej odporności na FER i GER zostały zgłoszone przez Reid i in. [2001a, 2001b, 2003]. Podobnie, potencjalne źródła odporności na FER zostały zidentyfikowane w Chinach [Guo i in. 2020] oraz w regionach tropikalnych, w tym w południowej, zachodniej i środkowej Afryce [Tembo i in. 2022]. W kilku badaniach odnotowano na świecie plazmy zarodkowe o różnych poziomach odporności na FER i GER [Reid i in. 2001a, 2001b, 2003, Gaikpa i in. 2021, Galiano-Carneiro i in. 2021].

Badania asocjacji całego genomu (GWAS) są użytecznym narzędziem do identyfikacji genów kandydujących, zwłaszcza w połączeniu z mapowaniem QTL w celu walidacji loci pod kątem cech ilościowych. Zila i in. [2013, 2014] przeprowadzili testy GWAS na kukurydzy w celu wykrycia SNP związanego ze zwiększoną odpornością na fuzarium. Zidentyfikowali 10 markerów SNP istotnie związanych z odpornością na ten patogen.

Zila i in. [2013] zidentyfikowali markery SNP związane z odpowiedzią obronną w pięciu genach lub w ich sąsiedztwie, których wcześniej nie korelowano z odpornością na choroby, ale których przewidywane funkcje genów obejmowały szlak zaprogramowanej śmierci komórki.

W analizach GWAS regiony QTL zostały znalezione na chromosomach 1, 4, 5, 7, 8 i 10 [De Jong i in. 2017], chromosomach 4, 5 i 9 [Zila i in. 2014] oraz chromosomach 1, 5 i 9 [Zila i in. 2013] dla odporności na FER. Chen i in. [2021] stwierdzili znaczący efekt odpornościowy QTL na chromosomie 4. Stanowi to podstawę do dalszych analiz i selekcji wspomaganej markerami. W badaniach Li i in. [2011] wykryto cztery QTL na chromosomach 3, 4, 5 i 6. Allel odporności w każdym z tych czterech QTL został wniesiony przez odpornego rodzica BT-1 i stanowił 2,5–10,2% zmienności fenotypowej. QTL o największym efekcie wykryty na chromosomie 4 może być traktowany jak locus odporności na fuzarium kolb kukurydzy. W wyniku mapowania asocjacyjnego ustalono, że na 3, 4 i 5 chromosomie występują regiony związane z odpornością na FER. Ponadto w wyniku GWAS zidentyfikowano trzy geny kandydujące w tych zgodnych i regionach, które należały do rodziny białek Glutaredoxin, czynników depolimeryzujących aktynę (ADFs) i białek wiążących AMP [Wu i in. 2020].

Sobiech i in. [2022] w wyniku sekwencjonowania nowej generacji w analizach SilcoDART wytypowali 7 markerów (SilcoDART, SNP) istotnie związanych z odpornością roślin na fuzarium. Dwa z wymienionych markerów zlokalizowane są na chromosomach 2 i 3 oraz zakodowane wewnątrz genów. W genie kodującym hydroksycynamoylotransferazę putrescyny oraz w genie kodującym prekursor peroksydazy 72. Jak wynika z doniesień literaturowych oba geny (hydroksycynamoylotransferaza putrescyny oraz prekursor peroksydazy 72) mogą być związane z odpornością roślin na fuzarium.

PODSUMOWANIE

W uprawie kukurydzy kluczowe jest zmniejszenie nasilenia choroby poprzez eliminację uszkodzeń spowodowanych przez owady lub zmniejszenie skuteczności patogenu, poprzez detoksykację lub blokowanie syntezy mikotoksyn w nasionach. W przypadku infekcji powodowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium* im większa roślina tym możliwość ochrony związanej z zaprawą maleje do zera już w fazie 3-4 liścia. Brak fungicydów, które zapewniłyby ochronę przed chorobami fuzaryjnymi. Zrozumienie podstaw genetycznych i mechanizmów molekularnych kontrolujących odporność na fuzarium jest kluczowym wymogiem dla rozwoju odmian kukurydzy o podwyższonej odporności. Ze względu na to, że odporność na *F. verticillioides* jest cechą ilościową i opartą na rozproszonej architekturze wielu drobnych genów, najlepszym podejściem dla przyszłej hodowli molekularnej jest MAS czyli selekcja wspomagana markerami, która będzie wymagała profili markerów całego genomu dla całego zestawu linii hodowlanych, modeli predykcyjnych i metodologii selekcji, jak to ma miejsce dla klasycznych cech złożonych [Poland i Rutkoski 2017].

PIŚMIENNICTWO

- Ali M.L., Taylor J.H., Jie L., Sun G., William M., Kasha K.J., Reid L.M., Pauls K.P. 2005. Molecular mapping of QTLs for resistance to gibberella ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. *Genome* 48 (3): 521–533. doi: 10.1139/G05-014.
- Alizadeh A.M., Rohandel G., Roudbarmohammadi S., Roudbary M., Sohanaki H., Ghiasian S.A., Taherkhani A., Semnani S., Aghasi M. 2012. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13: 2625–2628.

- Alsamir M., Al-Samir E., Kareem T.A., Abass M., Trethowan R. 2020. The application of zinc fertilizer reduces *Fusarium* infection and development in wheat. *Aust. J. Crop Sci.* 14: 1088–1094. doi: 10.21475/ajcs.20.14.07.p2235.
- Battilani P., Pietri A., Barbano C., Scandolaro A., Bertuzzi T., Marocco, A. 2008. Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10433–10438. doi: 10.1021/jf801809d.
- Bily A.C., Reid L.M., Taylor J.H., Johnston D., Malouin C., Burt A.J., Bakan B., Regnault-Roger C., Pauls K.P., Arnason J.T., Philogene J.R. 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93: 712–719.
- Bisby G. R., Bailey D. L. 1923. Ear and root rots. Fourth Annual Report of the Survey of the Prevalence of Plant Diseases in the Dominion of Canada, 33.
- Blandino M., Reyneri A., Vanara F., Pascale M., Haidukowski M., Campagna C. 2009. Management of fumonisin contamination in maize kernels through the timing of insecticide application against European corn borer. *Food Addit. Contam. A* 26(11): 1501–1514. doi: 10.1080/02652030903207243.
- Bode W.M., Calvin D.D. 1990. Yield-loss relationships and economic injury levels for European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) populations infesting Pennsylvania field corn. *J. Econ. Entomol.* 83(4): 1595–1603.
- Brachi B., Faure N., Horton M., Flahauw E., Vazquez A., Nordborg M., Bergelson J., Cuguen J., Roux F. 2010. Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. *PLoS Genet.* May 6;6(5):e1000940. doi: 10.1371/journal.pgen.1000940.
- Butrón A., Reid L. M., Santiago R., Cao A., Malvar R. A. 2015. Inheritance of maize resistance to gibberella and fusarium ear rots and kernel contamination with deoxynivalenol and fumonisins. *Plant Pathol.* 64(5): 1053–1060. doi: 10.1111/ppa.12351.
- Butron A., Santiago R., Mansilla P., Pintos-Varela C., Ordas A., Malvar, R.A. 2006. Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6113–6117. doi: 10.1021/jf0611163.
- Carbas B., Simões D., Soares A., Freitas A., Carvalho A., Silva A.S., Pinto T., Varela M., Semedo J., Covão S., Andrade E., Brites C. 2021. Estratégias de Mitigação da Incidência de Micotoxinas durante o Armazenamento do Milho. *Vida Rural* 1869: 56–63.
- Champeil A., Doré T., Fourbet J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci.* 166: 1389–1415. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.02.004.
- Chen J., Ding J., Li H., Li Z., Sun X., Li J., Dai X., Dong H., Song W., Chen W. 2012. Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Mol Breeding* 30: 1649–1656. doi: 10.1007/s11032-012-9748-1.
- Clements M. J., Kleinschmidt C. E., Maragos C. M., Pataky J. K., White D. G. 2003. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Dis.* 87: 147–153. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.2.147.
- Czembor E., Matusiak M., Ochodзки P. 2013. Odporność mieszańców kukurydzy na fuzariozę kolb powodowaną przez *Fusarium graminearum* i *F. verticillioides* w Polsce w latach 2008–2009. *Biul. IHAR* 270: 55–73.
- De Jong G., Pamplona A.K.A., Von Pinho R.G., Balestre M. 2017. Genome-wide association analysis of ear rot resistance caused by *Fusarium verticillioides* in maize. *Genomics* 10: 291–303. doi: 10.1016/j.ygeno.2017.12.001.
- De Leon C., Pandey S. 1989. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. *Crop Sci.* 29: 12–17.
- Deepthi B.V., Deepa N., Vanitha P.R., Sreenivasa M.Y. 2022. Stress responses on the growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium proliferatum* associated with stored poultry feeds. *Appl. Food Res.* 2, 100091. doi: 10.1016/j.afres.2022.100091
- Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Europ. J. Plant Pathol.* 109: 755–768.
- Eller M., Robertson-Hoyt L.A., Payne G.A., Holland, J.B. 2008. Grain yield and *Fusarium* ear rot of maize hybrids developed from lines with varying levels of resistance. *Maydica* 53: 231–237.

- Gaikpa D.S., Kessel B., Presterl T., Ouzunova M., Galiano-Carneiro A.L., Mayer M., Melchinger A., Schon C., Melchinger T. 2021. Exploiting genetic diversity in two European maize landraces for improving gibberella ear rot resistance using genomic tools. *Theor. Appl. Genet.* 134 (3): 793–805. doi: 10.1007/s00122-020-03731-9
- Galiano-Carneiro A.L., Kessel B., Presterl T., Gaikpa D.S., Kistner M.B., Miedaner T. 2021. Multi-parent QTL mapping reveals stable QTL conferring resistance to gibberella ear rot in maize. *Euphytica* 217, (1). doi: 10.1007/s10681-020-02748-x.
- Galiano-Carneiro A., Miedaner T. 2017. Genetics of resistance and pathogenicity in the maize/*Setosphaeria turcica* pathosystem and implications for breeding. *Front. Plant Sci.* 8: 1490. Doi: 10.3389/fpls.2017.01490
- Garcia-Ceron D., Lowe R.G.T., McKenna J.A., Brain L.M., Dawson C.S., Clark B., Berkowitz O.P., Whelan J., Bleackley M.R., Anderson M.A. 2021. Extracellular vesicles from *Fusarium graminearum* contain protein effectors expressed during infection of corn. *J. Fungi* 7(11), 977. doi: 10.3390/jof7110977.
- Gilardi G., Vasileiadou A., Garibaldi A., Gullino M.L. 2022. The effects of biological control agents, potassium phosphite and calcium oxide on race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce in closed soilless cultivation systems. *J. Phytopathol.* 170: 626–634. doi: 10.1111/jph.13127
- Giomi G. M., Kreff E. D., Iglesias J., Fauguel C. M., Fernandez M., Oviedo M. S., Presello D. 2016. Quantitative trait loci for *Fusarium* and *Gibberella* ear rot resistance in Argentinian maize germplasm. *Euphytica* 211(3): 287–294. doi: 10.1007/s10681-016-1725-z.
- Guerre P. 2016. Worldwide mycotoxins exposure in pig and poultry feed formulations. *Toxins* 8, 350. doi: 10.3390/toxins8120350
- Guo Z., Zou C., Liu X., Wang S., Li W. X., Jeffers D., Fan X., Xu M., Xu Y. 2020. Complex genetic system involved in *Fusarium* ear rot resistance in maize as revealed by GWAS, bulked sample analysis, and genomic prediction. *Plant Dis.* 104(6): 1725–1735. doi: 10.1094/PDIS-07-19-1552-RE.
- Han S., Miedaner T., Utz H. F., Schipprack W., Schrag T. A., Melchinger A. E. 2018. Genomic prediction and GWAS of gibberella ear rot resistance traits in dent and flint lines of a public maize breeding program. *Euphytica* 214, (1). doi: 10.1007/s10681-017-2090-2,
- Han S., Utz H.F., Liu W., Schrag T. A., Stange M., Würschum T., Miedaner T., Bauer E., Schön C.C., Melchinger A.E. 2016. Choice of models for QTL mapping with multiple families and design of the training set for prediction of *Fusarium* resistance traits in maize. *Theor. Appl. Genet.* 129(2): 431–444. doi: 10.1007/s00122-015-2637-3.
- Hoenisch R.W., Davis R.M. 1994. Relationship between grain pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot. *Plant Dis.* 78: 517–519.
- Hung H.-Y., Holland J.B. 2012. Diallel analysis of resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Sci.* 52: 2173–2181. doi: 10.2135/cropsci2012.03.0154
- Kebede A.Z., Johnston A., Schneiderman D., Bosnich W., Harris L.J. 2018. Transcriptome profiling of two maize inbreds with distinct responses to *Gibberella* ear rot disease to identify candidate resistance genes. *BMC Genet.* 19, (1). doi: 10.1186/s12864-018-4513-4.
- Korte A., Farlow A. 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* 9, 29. doi: 10.1186/1746-4811-9-29.
- Lanubile A., Maschietto V., Borrelli V.M., Stagnati L., Logrieco A.F., Marocco A. 2017. Molecular Basis of Resistance to *Fusarium* Ear Rot in Maize. *Front. Plant Sci.* 8: 1774. doi: 10.3389/fpls.2017.01774.
- Li Z.M., Ding J.Q., Wang R.X., Chen J., Sun X., Chen W., Song W., Dong H., Dai X., Xia Z., Wu J. 2011. A new QTL for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *J. Appl. Genetics* 52: 403–406. doi: 10.1007/s13353-011-0054-0.
- Martin M., Dhillon B. S., Miedaner T., Melchinger A. E. 2012a. Inheritance of resistance to gibberella ear rot and deoxynivalenol contamination in five flint maize crosses. *Plant Breed.* 131(1): 28–32. doi: 10.1111/j.1439-0523.2011.01908.x.
- Martin M., Miedaner T., Schwegler D. D., Kessel B., Ouzunova M., Dhillon B.S., Schipprack W., Utz H., Melchinger A. 2012b. Comparative quantitative trait loci mapping for gibberella ear rot resistance and reduced deoxynivalenol contamination across connected maize populations. *Crop Sci.* 52(1): 32–43. doi: 10.2135/cropsci2011.04.0214.

- Martin M., Schipprack W., Miedaner T., Dhillon B. S., Kessel B., Ouzunova M., Melchinger A. 2012c. Variation and covariation for gibberella ear rot resistance and agronomic traits in testcrosses of doubled haploid maize lines. *Euphytica* 185(3): 441–451. doi: 10.1007/s10681-012-0623-2.
- Maschietto V., Cinzia C., Pirona R., Pea G., Strozzi F., Marocco Adriano-Rossini L., Lanubile A. 2017. QTL Mapping and candidate genes for resistance to *Fusarium* Ear Rot and fumonisin contamination in Maize. *BMC Plant Biology* 17(1): 1–21. doi: 10.1186/s12870-017-0970-1.
- Ncube E., Truter M., Flett B.C., Van Den Berg J., Erasmus A., Viljoen A. 2020. Fungal mycoflora associated with *Busseola fusca* frass in maize plants. *Afr. Entomol.* 28(2): 394–405. doi: 10.4001/003.028.0394.
- Netshifhephe N.E.I., Flett B.C., Viljoen A., Rose L.J. 2018. Inheritance and genotype by environment analyses of resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in maize F1 hybrids. *Euphytica* 214, 20. doi: 10.1007/s10681-018-2310-4
- Nowembabaz A., Taulya G., Tinzaara W., Karamura E. 2021. Effect of integrated potassium nutrition on *Fusarium* wilt tolerance in apple bananas. *Afr. J. Plant Sci.* 15: 257–265. doi: 10.5897/AJPS2021.2140.
- Oren L., Ezrati S., Cohen D., Sharon A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*–maize interaction characterized by using a green fluorescent protein expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1695–1701. doi: 10.1128/AEM.69.3.1695-1701.2003.
- Pérez-Brito D., Jeffers D., González-de-León D., Khairallah M., Cortés-Cruz M., Velázquez-Cardelas G., Azpíroz-Rivero S., Srinivasan G. 2001. QTL mapping of *Fusarium* moniliforme ear rot resistance in highland maize, Mexico. *Agrociencia* 35: 181–196.
- Poland J., Rutkoski, J. 2016. Advances and challenges in genomic selection for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 54(1): 79–98. doi:10.1146/annurev-phyto-080615-100056.
- Presello D.A., Reid L.M., Butler G., Mather D.E. 2005. Pedigree selection for Gibberella ear rot resistance in maize populations. *Euphytica* 143: 1–8.
- Raghda A. El-Sayed, Jebur A., Kang W., El-Demerdash F. 2022. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *J. Future Foods* 2(2): 91–102. doi: 10.1016/j.jfutfo.2022.03.002.
- Reid L.M., McDiarmid G., Parker A.J., Woldemariam T. 2003. CO441 corn inbred line. *Can. J. Plant Sci.* 83(1): 79–80. doi: 10.4141/P02-058.
- Reid L.M., McDiarmid G., Parker A.J., Woldemariam T., Hamilton R.I. 2001a. CO388 and CO389 corn inbred lines. *Can. J. Plant Sci.* 81(3): 457–459. doi: 10.4141/P00-053.
- Reid L. M., McDiarmid G., Parker A.J., Woldemariam T., Hamilton R.I. 2001b. CO430, CO431 and CO432 corn inbred lines. *Can. J. Plant Sci.* 81(2): 283–284. doi: 10.4141/P00-118.
- Robertson L.A., Kleinschmidt C.E., White D.G., Payne G.A., Maragos C.M., Holland J.B. 2006. Heritability and correlations of *Fusarium* ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Sci.* 46: 353–361. doi: 10.2135/cropsci2005.0139.
- Sampietro D.A., Vattuone M.A., Presello D.A., Fauguel C.M., Catalán C.A. N. 2009. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Prot.* 28(2): 196–200. doi:10.1016/j.cropro.2008.09.010.
- Scarpino V., Reyneri, A., Vanara F., Scopel C., Causin R., Blandino M. 2015. Relationship between European Corn Borer injury, *Fusarium proliferatum* and *F. subglutinans* infection and moniliformin contamination in maize. *Field Crops Res.* 183: 69–78. doi: 10.1016/j.fcr.2015.07.014.
- Shah T.R., Prasad K., Kumar P. 2016. Maize – A potential source of human nutrition and health. *Cogent Food Agriculture* 2: 1. doi: 10.1080/23311932.2016.1166995.
- Sobek E.A., Munkvold G.P. 1999. European Corn Borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae as lectors of *Fusarium* moniliforme, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J. Econ. Entomol.* 92: 503–509.
- Sobiech A., Tomkowiak A., Nowak B., Bocianowski J., Wolko Ł., Szychala 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. doi: 10.3390/ijms23116105.
- Sun G., Wang S., Hu X., Su J., Huang T., Yu J., Tang L., Gao W., Wang J.-S. 2007. Fumonisin B1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. *Food Addit. Contam.* 2: 181–185.

- Sun Y., Ruan X., Wang Q., Zhou Y., Wang F., Ma L., Wang Z., Gao X. 2021. Integrated gene co-expression analysis and metabolites profiling highlight the important role of ZmHIR3 in maize resistance to *Gibberella* stalk rot. *Front. Plant Sci.* 12: 664–733. doi: 10.3389/fpls.2021.664733.
- Szóke C., Zsubori Z., Pók I., Rácz F., Illés O., Szegedi I. 2002. Significance of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hóbn.) in maize production. *Acta Agron. Hungarica* 50: 447–461.
- Tola M., Kebede B. 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food Agric.* 2, 1191103. doi: 10.1080/23311932.2016.1191103.
- Unterseer S., Bauer E., Haberer G., Seidel M., Knaak C., Ouzunova M., Meitinger T., Strom T.M., Fries R., Pausch H., Bertani C., Davassi A., Mayer K.F., Schön C.C. 2014. A powerful tool for genome analysis in maize: development and evaluation of the high density 600 k SNP genotyping array. *BMC Genomics* 15(1), 823. doi: 10.1186/1471-2164-15-823.
- Vasileiadis V.P., Otto S., Sattin M., Palinkás Z., Veres A., Bán R., Kiss J., Pons X., Kudsk P., Weide R., Czembor E., Moonen C., Kiss J. 2011. Crop protection in European maize-based cropping systems: Current practices and recommendations for innovative Integrated Pest Management. *Agric. Systems* 104(7): 533–540. doi: 10.1016/j.agry.2011.04.002.
- Vigier B., Reid L. M., Dwyer L. M., Stewart D. W., Sinha R. C., Arnason J. T., Butler G. 2001. Maize resistance to *Gibberella* ear rot: symptoms, deoxynivalenol, and yield. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 99–105.
- Warfield C.Y., Davis R.M. 1996. Importance of husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. *Plant Dis.* 80: 208–210.
- Wen J., Shen Y.Q., Xing Y.X., Wang Z.Y., Han S. P., Li S.J., Yang Ch., Hao D., Zhang Y. 2020. QTL mapping of resistance to *Gibberella* ear rot in maize. *Mol. Breeding* 40(10), 94. doi: 10.1007/s11032-020-01173-1.
- Williams W.P., Windham G.L. 2009. Diallel analysis of fumonisin accumulation in maize. *Field Crop. Res.* 114: 324–326. doi: 10.1016/j.fcr.2009.08.005.
- Wu Y., Zhou Z., Dong C., Chen J., Ding J., Zhang X., Mu C., Chen Y., Li X., Li H., Han Y., Wang R., Sun X., Li J., Dai X., Song W., Chen W., Wu J. 2020. Linkage mapping and genome-wide association study reveals conservative QTL and candidate genes for *Fusarium* rot resistance in maize. *BMC Genomics* 21(1), 357. doi: 10.1186/s12864-020-6733-7.
- Yuan G., Chen B., Peng H., Zheng Q., Li Y., Xiang K., Liu Li., Zou Ch., Lin H., Ding H., Pan G., Zhang Z. 2020. QTL mapping for resistance to ear rot caused by *Fusarium graminearum* using an IBM Syn10 DH population in maize. *Mol. Breeding* 40(9), 91. doi: 10.1007/s11032-020-01158-0.
- Zhou G., Li S., Ma L., Wang F., Jiang F., Sun Y., Ruan X., Cao Y., Wang Q., Zhang Y., Fan X., Gao X. 2021. Mapping and validation of a stable quantitative trait locus conferring maize resistance to *Gibberella* ear rot. *Plant Disease* 105(7): 1984–1991. doi: 10.1094/PDIS-11-20-2487-RE.
- Zijlstra C., Lund I., Justesen A., Nicolaisen M., Bianciotto V., Posta K., Balestrini R., Przetakiewicz A., Czembor E., van de Zande J. 2011. Combining novel monitoring tools and precision application technologies for integrated high-tech crop protection in the future (a discussion document). *Pest Manag. Sci.* 67(6): 616–625. doi: 10.1002/ps.2134.
- Zila C.T., Ogut F., Romay M.C., Gardner C.A., Buckler E.S. 2014. Genome wide association study of *Fusarium* ear rot disease in the U.S.A. maize inbred line collection. *BMC Plant Biol.* 14, 372. doi: 10.1186/s12870-014-0372-6.
- Zila C.T., Samayoa L.F., Santiago R., Butrón A., Holland J.B. 2013. A genome-wide association study reveals genes associated with *Fusarium* ear rot resistance in a maize core diversity panel. *G3-Genes Genom. Genetic* 3: 2095–2104. doi: 10.1534/g3.113.007328.

A. SOBIECH

**THE MOLECULAR MECHANISMS IN RESISTANCE REACTION
ON MAIZE COB FUSARIOSIS****Summary**

Fusarium diseases of maize are a serious threat to its crops. In view of the more dynamically expanding acreage of this cereal, it is necessary to conduct research for genetic resistance to *Fusarium* spp. Due to the complexity of pathogen-host interactions, the most effective and quickest way to support selection is genomic association studies (GWAS). This is a useful tool for identifying candidate genes, especially when combined with QTL mapping, which has been successfully used in studies to localize *Fusarium* resistance genes. Due to the fact that *Fusarium* resistance is a quantitative trait and based on a distributed architecture of many small genes, the best approach for future molecular breeding is MAS or marker-assisted selection, which will require genome-wide marker profiles for the entire set of breeding lines, predictive models and selection methodologies, as is used for classical complex traits.

Key words: *Fusarium*, *Zea mays* L., QTL, resistant

Zaakceptowano do druku – *Accepted for print* – 6.06.2023

Do cytowania – *For citation*:

Sobiech A. 2023. Molekularne mechanizmy odporności na fuzariozę kolb kukurydzy. *Fragm. Agron.* 40(1): 14–24.

P4: Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Maize *Fusarium* Cob Resistance Using Next-Generation Sequencing Technology.

Sobiech, A., Tomkowiak, A., Bocianowski, J., Szymańska, G.,
Nowak, B., Lenort, M.

International Journal of Molecular Sciences, 24(23), 16712. (2023).

<https://doi.org/10.3390/ijms242316712>



Article

Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Maize Fusarium Cob Resistance Using Next-Generation Sequencing Technology

Aleksandra Sobiech ¹ , Agnieszka Tomkowiak ^{1,*} , Jan Bocianowski ² , Grażyna Szymańska ³ ,
Bartosz Nowak ⁴ and Maciej Lenort ¹

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; aleksandra.sobiech@up.poznan.pl (A.S.); macieklenort@gmail.com (M.L.)

² Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań, Poland; jan.bocianowski@up.poznan.pl

³ Department of Agronomy, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; grazyna.szymanska@up.poznan.pl

⁴ Smolice Plant Breeding Sp. Z o.o. IHAR Group, Smolice 146, 63-740 Kobylin, Poland; nowak@hrsmolice.pl

* Correspondence: agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl

Abstract: The pressure to reduce mineral fertilization and the amount of pesticides used has become a factor limiting production growth, as has the elimination of many crop protection chemicals from the market. A key condition for this to be an effective form of protection is the use of varieties with higher levels of resistance. The most effective and fastest way to assist in the selection and control of pathogens is the conducting of genome-wide association studies. These are useful tools for identifying candidate genes, especially when combined with QTL mapping to map and validate loci for quantitative traits. The aim of this study was to identify new markers coupled to genes that determine maize plant resistance to fusarium head blight through the use of next-generation sequencing, association and physical mapping, and to optimize diagnostic procedures to identify selected molecular markers coupled to plant resistance to this fungal disease. As a result of field experiments and molecular analyses, molecular markers coupled to potential genes for resistance to maize ear fusariosis were selected. The newly selected markers were tested against reference genotypes. As a result of the analyses, it was found that two markers (11801 and 20607) out of the ten that were tested differentiated between susceptible and resistant genotypes. Marker number 11801 proved to be the most effective, with a specious product of 237 bp appearing for genotypes 1, 3, 5, 9 and 10. These genotypes were characterized by a field resistance of 4–6 on the 9° scale (1 being susceptible, 9 being resistant) and for all genotypes except 16 and 20, which were characterized by a field resistance of 9. In the next step, this marker will be tested on a wider population of extreme genotypes in order to use it for the preliminary selection of fusarium-resistant genotypes, and the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1 gene coupled to it will be subjected to expression analysis.

Keywords: maize; NGS; association mapping; fusarium; SNP markers; SilicoDArT markers



Citation: Sobiech, A.; Tomkowiak, A.; Bocianowski, J.; Szymańska, G.; Nowak, B.; Lenort, M. 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>

Academic Editor: Hai Du

Received: 23 October 2023

Revised: 19 November 2023

Accepted: 21 November 2023

Published: 24 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The use of biotechnological tools in plant resistance breeding is currently a priority because the enormous pressure of pathogens causes a significant decline in crop yields. Due to such serious losses, the breeding company and agricultural sectors of the world's countries are striving to increase and sustainably produce food [1]. Unfortunately, the breeding of new, fusarium-resistant varieties has its limitations, both technological and economic, due to the ratio of the prices of production inputs to the price of cereals [2]. Intensification of the breeding of resistant varieties should be profitable; however, many times it is unfortunately the case that the increase in additional expenditures on fertilizers and protection products is not offset by an increase in yields [3].

The principle by which integrated plant protection is applied by all agricultural producers in the European Union has been in effect since 1 January 2014 and was put in place to protect the environment and to ensure the safety of human health. One of the general principles of integrated plant protection is to prevent the occurrence of harmful organisms or limit their negative impact, which should be achieved with, among other strategies, the use of resistant or tolerant varieties [4,5].

A key factor allowing for this to become an effective form of protection is the use of varieties with higher levels of resistance. The burden of responsibility for further production growth is thus increasingly shifting from agrotechnology to breeding, which, as we have seen, is able to cope effectively [6]. Consequently, newer tools are being developed with which to guarantee greater efficiency in selection [7].

The selection methods presently in use have been enriched by advances in molecular biology and statistical models that allow the identification of markers for individual traits that are the result of single genes and for markers that are determined by multiple quantitative trait loci (QTLs) that explain the phenotypic variation of a trait to varying degrees [2,8]. Progress in crop production depends on the development of cultivation and plant breeding methods based on information about plant properties and their behavior under different growing and environmental conditions. Scientists have been conducting research projects dedicated to learning about these properties through observations at the genome, transcriptome, proteome, metabolome and phenome levels [9]. It is important that the information obtained in the research be collected in a coordinated manner and in public databases accessible to breeders and other interested parties [10].

As a result of climate change and the intensification of international trade, pathogen pressure is also increasing. Maize plants are most often infected by pathogenic fungi, including *Fusarium graminearum* and *Setosphaeria turcica*, causing severe yield losses [11,12]. Pathogenic fungi are naturally present in the soil and cannot be eliminated, so it is important to control them in order to reduce the production of mycotoxins that are produced by fungi [13]. Attention should therefore be focused on the nutritional and structural needs of both the plant and its microbiome. Several studies have shown that soil fertilization has had a positive effect on plant tolerance to pathogenic fungi, such as in instances where fertilizers containing either zinc or potassium phosphite have been used [14–16].

However, the most effective and fastest way to aid in pathogen selection and control are transcriptomic and genome-wide association studies (GWAS). These are useful tools for identifying candidate genes, especially when combined with QTL mapping to map and validate loci for quantitative traits [17]. Combining these methods allows for the overcoming of their respective limitations [18]. As an alternative to classical plant breeding methods, precision genetic engineering based on genome editing technologies can play a key role in accessing genetic resources. These resources can be used to increase plant resistance to disease by targeting appropriate genetically conditioned plant defense mechanisms [19].

The aim of the study was to identify new markers coupled to genes determining resistance of maize plants to fusarium through the use of next-generation sequencing, association and physical mapping, and to optimize diagnostic procedures with which to identify the selected molecular markers coupled to plant resistance to this fungal disease.

2. Results

2.1. Field Experiment

In order to examine the distribution of the analyzed variable in both localities (Smolice and Kobierzyce), a density plot was made (Figure 1). As can be seen in the attached graph, the distribution of the analyzed variable differed between Smolice and Kobierzyce. In Smolice, the majority of plants were infected by fusarium in the range of 6.5 to 9 on a 9 degree scale (9 being resistant and 1 being susceptible), while in Kobierzyce it ranged from 8 to 9 (Figure 1).

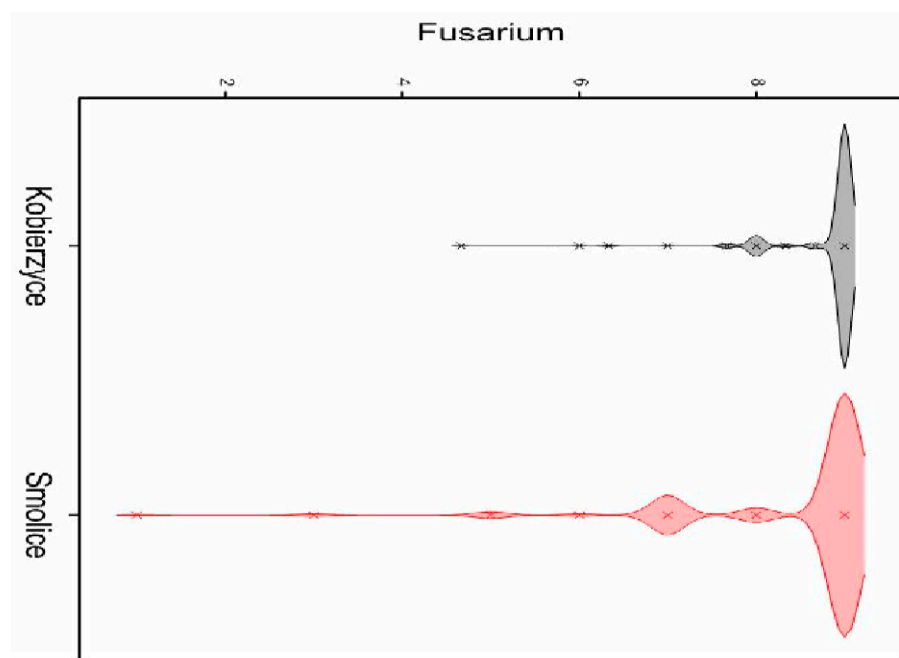


Figure 1. Density plot of the distribution of *Fusarium* infestation of surveyed lines in both localities.

2.2. Phenotyping

Analysis of variance indicated that the main effects of genotype, location, and genotype $\times$ location interaction were significant for the observed degree of fusarium infection of maize plants (Table 1).

Table 1. Analysis of variance for maize plant infection by *Fusarium* fungi.

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Statistics
Genotype (G)	187	252.2163	1.3416	3.90 ***
Location (L)	1	22.9549	22.9549	66.66 ***
G $\times$ L interaction	187	156.934	0.8348	2.42 ***
Residual	484	166.6667	0.3444	

*** $p < 0.001$.

For both localities (Smolice and Kobierzyce), correlations were analyzed between the degree of plant *Fusarium* infestation and the size of yield structure traits and yield per plot. It was shown that, in Smolice, the degree of plant *Fusarium* infestation was most positively correlated with the weight of grain per cob ($r = 0.16$)—the lower the infestation, the higher the weight of grain per cob—and the number of grains per row ($r = 0.10$) (Figure 2a). In Kobierzyce, the degree of plant *Fusarium* infestation was most positively correlated with yield per plot ($r = 0.42$)—the lower the infestation the higher the yield—as well as with grain weight per cob ($r = 0.41$) and weight of one thousand grains ($r = 0.33$) (Figure 2b).

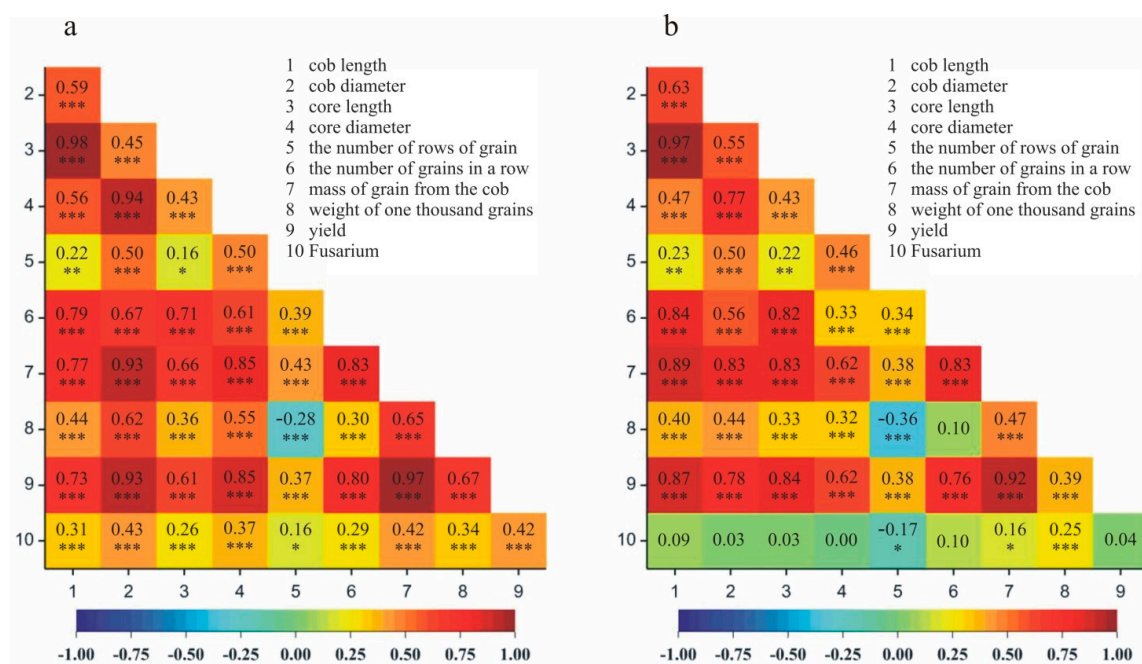


Figure 2. Heatmap showing Pearson correlation coefficients between the degree of *Fusarium* infestation of plants and yield and yield structure traits in s in (a) Kobierzyce and (b) Smolice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.3. Genotyping

Next-generation sequencing obtained a total of 92,614 molecular markers (60,436 SilicoDART and 32,178 SNPs). To determine the significance of the identified markers, $MAF > 0.25$ and the number of missing observations $< 10\%$ were used. This way, 32,900 (26,234 DARTs and 6666 SNPs) markers were obtained and used for association mapping (Figure 3). Significantly associated (selected at $p < 0.001$ with correction for Benjamini–Hochberg multiple testing) with fusarium resistance were 6816 SNP and silico DART molecular markers (5985—Kobierzyce, 531—Smolice) (Table 2). In order to narrow down the number of markers for physical mapping, 10 markers that were significant in both localities (Kobierzyce and Smolice) were selected from among all of them. These markers have the highest LOD values, making them the best tools for the breeding process.

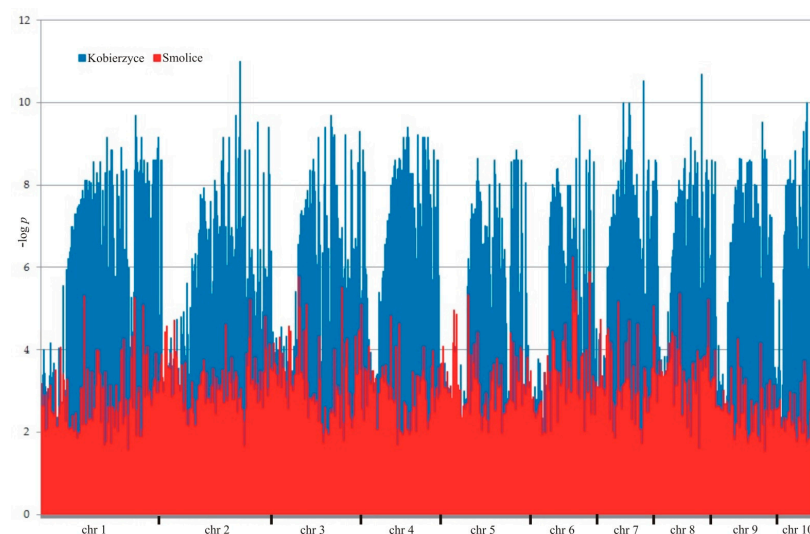


Figure 3. Manhattan plot for maize plant resistance to fusarium in Kobierzyce (blue) and Smolice (red).

Table 2. SilicoDArT and SNP molecular markers significantly associated with maize plant resistance to fusarium in Kobierzyce and Smolice (significant associations selected at $p < 0.001$ with correction for Benjamini–Hochberg multiple testing).

		Number of Identified SilicoDArT and SNPs Markers Associated with Fusarium Resistance in Maize	
		Kobierzyce	Smolice
Number of significant markers	DArT	4885	390
	SNP	1100	141
	Total	5985	531
Minimal effect	DArT	−0.431	−0.68
	SNP	−0.425	−0.64
	Total	−0.431	−0.68
Maximal effect	DArT	0.573	0.67
	SNP	0.566	0.601
	Total	0.573	0.67
Medium effect	DArT	0.371	0.009
	SNP	0.362	−0.041
	Total	0.369	−0.005
Total effect	DArT	1810	3.395
	SNP	398	−5.84
	Total	2208	−2.44
Percentage of variation explained			
Min	DArT	5.2	5.2
	SNP	5.2	5.2
	Total	5.2	5.2
Max	DArT	20.8	12.2
	SNP	21.2	11.4
	Total	21.2	12.2
Medium	DArT	10.73	6.48
	SNP	10.15	6.57
	Total	10.62	6.50

Based on the identified SNP and SilicoDArT molecular markers, a dendrogram of genetic similarity between the 188 analyzed genotypes was made (Figure 4). The dendrogram very clearly shows two distinct groups of similarity. The first group includes 65 inbred lines from plant breeding in Kobierzyce, while the second group includes 122 analyzed hybrids and 1 inbred line. Such an ideal grouping demonstrates the usefulness of SNP and silico DArT markers for grouping genotypes in terms of genetic similarity.

Of the 32,900 (26,234 DArTs and 6666 SNPs) markers selected for association mapping, 10 were selected that were significantly associated with plant resistance to fusarium in both locations—Kobierzyce and Smolice (Table 3). An attempt was also made to determine the location of the selected DArT (9) and SNP (1) markers. The next step was to design primers that served to identify the 10 selected markers. The sequences of the primers are shown in Table 4.

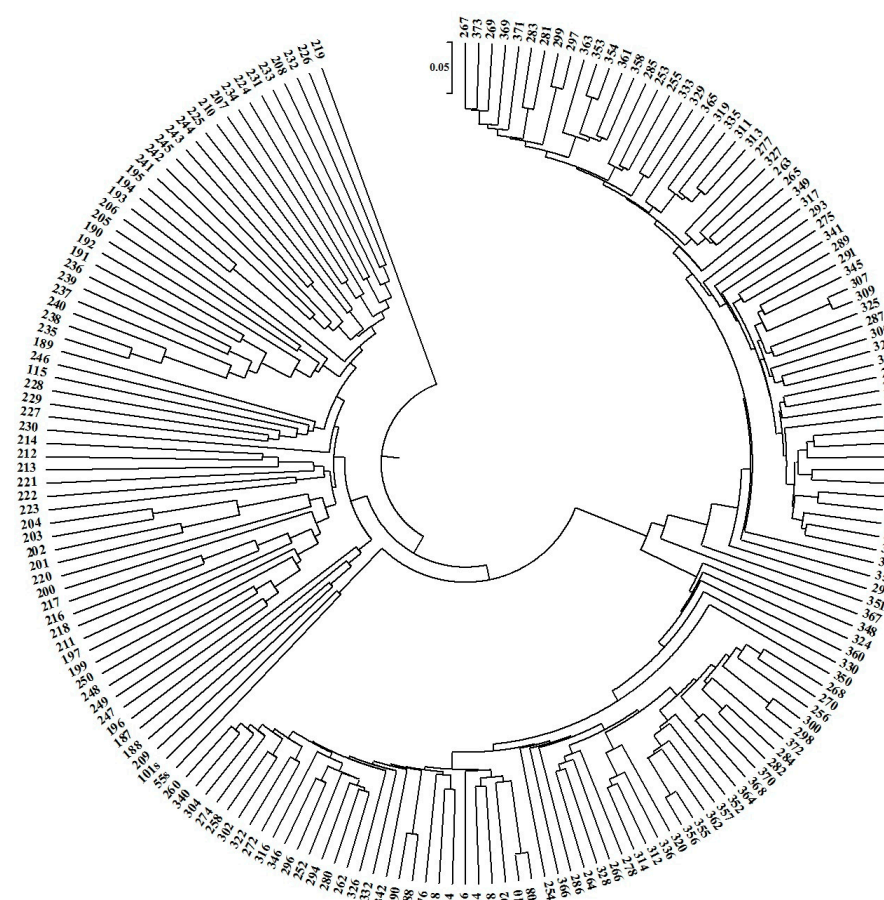


Figure 4. Dendrogram showing the genetic similarity between the analyzed genotypes. The numbers on the dendrogram indicate the individual genotypes.

Table 3. Characteristics and location of markers significantly related to plant resistance to fusarium (significant associations selected at $p < 0.001$ with correction for Benjamini–Hochberg multiple testing).

Marker	Marker Type	Chromosome	Marker Location	Candidate Genes
27364	SilicoDArT	Chr 4	2451800	95,397 bp at 5' side: at-hook motif nuclear-localized protein 23 5235 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100286026
26864	SilicoDArT	Chr 2	2583292	765,204 bp at 5' side: germin-like protein subfamily 1 member 17 precursor, 85,363 bp at 3' side: dna-directed rna polymerases ii, iv and v subunit 9a
17777	SilicoDArT	Chr 3	4769959	uncharacterized protein loc100275570 isoform X1, uncharacterized protein loc100275570 isoform X1
27435	SilicoDArT	Chr 10	4770049	6549 bp at 5' side: starch synthase iiib-1 precurs or 8366 bp at 3' side: uncharacterized protein loc103642070
27775	SilicoDArT	Chr 3	25946459	uncharacterized protein loc100501166
11801	SilicoDArT	Chr 5	4764756	620 bp at 5' side: phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1, 11,629 bp at 3' side: uncharacterized protein loc103628906 isoform X1
24753	SilicoDArT	Chr 8	2440301	33,881 bp at 5' side: uncharacterized protein loc100281900, 14,700 bp at 3' side: uncharacterized protein loc103636139
20607	SilicoDArT	Chr 7	24015383	210 bp at 5' side: uncharacterized protein loc100383808 isoform X2, 7460 bp at 3' side: uncharacterized protein loc100272692
73234	SNP	Chr 2	34766405	putative uncharacterized protein ddb_g0274535
8596	SilicoDArT	Chr 7	4592527	116,269 bp at 5' side: uncharacterized protein loc10019402712714 bp at 3' side: putative cytochrome p450 superfamily protein

Table 4. Sequences of designed primers used to identify newly selected markers significantly associated with plant fusarium resistance.

Marker	Primer Sequences		Melting Temperature (°C)	Product Size (bp)
	Forward	Reverse		
27364	AAGACTGGGGGTAGCTGCAG	CTTGACCGGTAGCGATTGGA	62	269
26864	GCACGCTGGATGTTGCAG	GACGGGCATGTGATCTAACGA	65	138
17777	ACCAGAAGAACATTCTGCAG	GAACGAGCTCACTCAGAAGC	57.5	167
27435	AAGGCGTGCTCCATCTGCAG	CGGTCACCACTCACCAGGTA	63	333
27775	AGAATTGAGATCCTCTGCAG	TTGGTTTTCCATTTCCCGC	62	273
11801	GCAACGTGGCGTCTCTGCAG	ATGCTGATACGGTTGGAGTCAGT	59	237
24753	AGCTAGCTTTGGTCTCTGCAG	TCAAAGGCGAACGTAGCGAT	65	336
20607	TCACTTTTTTCAGTTCTGCAG	AACGAACCAACAAGCCTTA	60	137
73234	ACTATAAAGGAACCTCTGCAG	TCTACTGTAGCAGGAATGGGA	59	486
8596	TTCTAGGGTGTACCTGCAG	GCCCTTAGTCTAAAGCGGCA	64	310

2.4. Identification of New Molecular Markers Associated with Fusarium Resistance in Maize Plants Using Polymerase Chain Reaction (PCR)

The new selected markers were tested on 20 reference genotypes from plant breeding in Smolice and Kobierzyce. On agarose gels, the genotypes were arranged in the following order: from 1 to 10 are genotypes susceptible to fusarium in field conditions, while from 11 to 20 are genotypes resistant to fusarium in field conditions. The analyses found that 2 markers (11801 and 20607) of the 10 tested differentiated between susceptible and resistant genotypes. For the remaining eight markers, monomorphic amplification products were observed on agarose gels with sizes consistent with the expected values in Table 4.

2.4.1. Marker 11801 (237 bp Product)

Analysis of marker number 11801 showed that a specific product of 237 bp appeared for genotypes: S1, S3, S5, S9 and S10. These genotypes were characterized by a field resistance level of 4–6 on the 9° scale (1 being susceptible and 9 being resistant) and for all genotypes except R6 and R10, which were characterized by a field resistance level of 9. This marker and the gene linked to it require further analysis to be used for the initial selection of fusarium-resistant genotypes (Figure 5a,b).

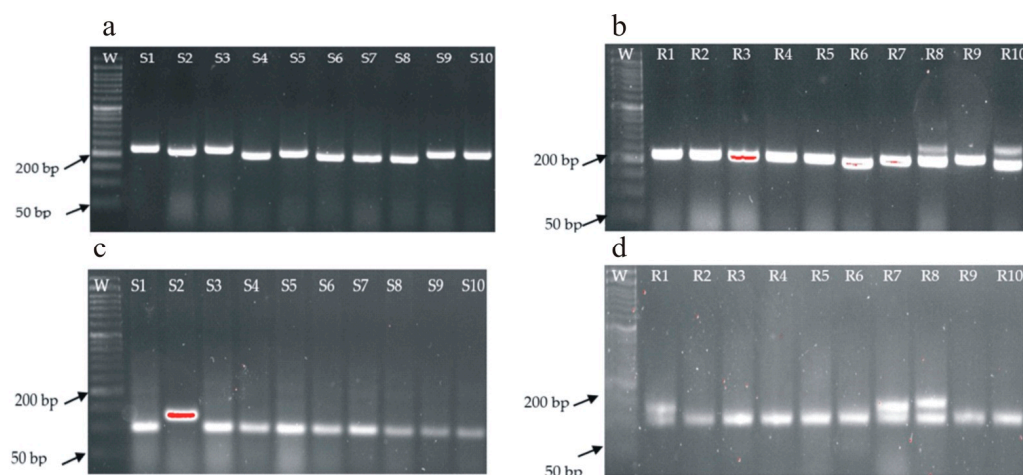


Figure 5. Electrophorogram illustrating: (a) 237 bp amplification products specific to the SilicoDart 11801 marker—susceptible genotypes, (b) 237 bp amplification products specific to the SilicoDart 11801 marker—resistant genotypes, (c) 137 bp amplification products specific to the SilicoDart 20607 marker—susceptible genotypes, and (d) 137 bp amplification products specific to the SilicoDart 20607 marker—resistant genotypes.

2.4.2. Marker 20607 (137 bp Product)

Analysis of marker number 20607 showed that a specific product of 137 bp appeared for genotype number S2, which had a field resistance level of 6 on the 9° scale (1 being susceptible and 9 being resistant), and for genotypes R1, R7 and R8, which had a field resistance level of 9. This marker, like marker 11801, needs to be tested on a larger population of extreme genotypes so that a decision can be made on its use for the initial selection of fusarium-resistant genotypes (Figure 5c,d).

3. Discussion

In the era of integrated pest management, which has been in force for several years, as well as the successive reduction in the amount of pesticide active substances available, it is particularly important to select for cultivation varieties that are less susceptible to disease. In the case of maize, the pathogens that have been causing huge yield losses for years are *Fusarium* fungi.

Fusarium is a disease that occurs in many parts of the world and is considered a major factor affecting the size and quality of the grain yield obtained. The disease is caused by fungi belonging to the genus *Fusarium*, mainly *F. culmorum*, *F. graminearum*, and *F. verticillioides* [20]. *Fusarium* spp. infect maize grain and other above-ground parts, leading to significant yield losses and a deterioration of maize grain quality [21]. *Fusarium graminearum* causes maize cob rot and is a major cause of yield losses in Canada [22], China [23], and, in Europe, Italy [20,24]. Weather conditions are more of a factor influencing *Fusarium* infestation of cereal grains than varying agricultural systems, a theory that is supported by the research of Champeil et al. [25]. Assessment of fusarium risk is based on weather conditions and is undertaken from flowering to milk maturity of the grain [26]. The emergence of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), which feeds on maize, also increases the susceptibility of maize to fusarium infection.

In the present experiment, in addition to in-depth molecular analyses, observations were made on the degree of infestation of maize plants by *Fusarium* fungi. Analysis of variance showed significant variation in fusarium resistance between genotypes and statistically significant variation in this trait between localities where the field experiment was established. For both localities (Smolice, Kobierzyce), correlations were analyzed between the degree of plant *Fusarium* infestation and the size of yield structure traits and yield per plot. It was shown that, in Smolice, the degree of plant *Fusarium* infestation was most positively correlated with the weight of grain per cob (0.16)—the lower the infestation the higher the weight of grain per cob, and the number of grains per row (0.10). In Kobierzyce, the degree of plant *Fusarium* infestation was most positively correlated with yield per plot (0.42)—the lower the infestation the higher the yield—as well as with grain weight per cob (0.41) and weight of one thousand grains (0.33). Maize resistance to *Fusarium* spp. is conditioned by multiple genes and the heredity of this trait is very complex [27–29]. Understanding the genetic mechanisms controlling resistance to fungal diseases facilitates maize breeding. As early as 1994, Hoenisch and Davis [30] showed that physical factors such as pericarp thickness are involved in resistance to cob rot. Bily et al. [31] and Sampietro et al. [32] have suggested that chemical factors such as phenolic compounds are involved in resistance processes. Many authors believe that plant resistance to fusarium is the result of interactions between genes. Opinions on this topic are divided because some researchers believe that these interactions are additive and others epistatic or have a large role in the dominance effect [4,29,33–35]. Zhou et al. [36], based on a genetic linkage map constructed using 1868 markers, identified 11 QTLs, including 5 stable QTLs. Collaborative analysis of multiple environments and epistatic interactions revealed six additive and six epistatic QTLs, respectively. The authors showed that many QTL with small effects had an impact on fusarium resistance. These were both additive and epistatic effects. The QTL qGER4.09, with the largest effect identified and validated using 588 F2 individuals, was linked to genomic regions associated with fusarium ear rot and aspergillus ear rot. This suggests that the described locus likely confers resistance to multiple pathogens and could potentially

be used in maize variety breeding to improve resistance to cob rot diseases. Exploiting existing sources of resistance in breeding programs requires a thorough understanding of the genetic basis of maize resistance to fusarium.

In view of the above, the aim of the present study was to identify new markers coupled to genes determining maize plant resistance to fusarium through the use of next-generation sequencing, association and physical mapping, and to optimize diagnostic procedures to identify the selected molecular markers coupled to plant resistance to this fungal disease.

In our own research, DArTseq technology developed at Diversity Arrays Technology in Australia was used for sequencing. As of now, the most common NGS techniques include pyrosequencing 454 [37], the Solex technique (Illumina, San Diego, CA, USA), the SOLiD platform (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), Polonator (Harvard University, Cambridge, MA, USA), and the HeliScope Single Molecule Sequencer (Helicos BioSciences, Cambridge, MA, USA). These technologies provide inexpensive whole-genome sequence reads using methods such as chromatin immunoprecipitation, mutation mapping, polymorphism detection, and detection of non-coding RNA sequences [38]. Sequencing methods, such as restriction site associated DNA (RAD) [39], multiplexed shotgun genotyping (MSG) [40] and BSRSeq (RNA-Seq) [41], allow for the identification of a large number of markers and for the accurate testing of multiple loci in a small number of samples. The Illumina method has given rise to the development of GBS [42] and DArTseq procedures [43].

In the present study, a total of 92,614 molecular markers (60,436 SilicoDArT and 32,178 SNPs) were obtained using the DArTseq technique. To determine the usefulness of the identified markers, MAF > 0.25 and the number of missing observations <10% were used. This resulted in 32,900 (26,234 DArTs and 6666 SNPs) markers, which were used for association mapping.

Genome-wide association studies (GWAS) are a useful tool for identifying candidate genes coupled to quantitative traits. Zila et al. [8,44], using GWAS, identified SNP markers associated with maize fusarium resistance. The authors identified 10 SNP markers significantly associated with resistance to this pathogen. Zila et al. [44] identified SNP markers associated with defense response in and adjacent to the sequences of five genes. These areas had not previously been correlated with disease resistance but were attributed to a function related to the programmed cell death pathway. Through GWAS analyses, many authors have identified QTL regions associated with plant resistance to biotic stresses. De Jong et al. [45] identified these regions on chromosomes 1, 4, 5, 7, 8, and 10 while Zila identified them on chromosomes 1, 4, 5, and 9 [8,44]. Chen et al. [46] found that genes located on chromosome 4 were responsible for fusarium resistance. In a study by Li et al. [47] four QTLs were detected on chromosomes 3, 4, 5 and 6. The resistance allele in each of these four QTLs was attributed to the resistant parent BT-1 and accounted for 2.5–10.2% of phenotypic variation. According to the authors, the QTL with the largest effect detected on chromosome 4 can be treated as a locus of resistance to maize cob fusarium.

In the present study, and as a result of association mapping, 6816 markers significantly associated with fusarium resistance were selected. Among these were both SNP and SilicoDArT markers. In order to narrow down the number of markers for physical mapping, 10 markers that were significant in both localities (Kobierzyce and Smolice) were selected from among all of them. These markers, as in the work of De Jong et al. [45], were located on chromosomes 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 10. Physical mapping determined the location of each marker and designed primers for their identification. Markers linked to candidate genes coupled to fusarium resistance can serve to select fusarium-resistant varieties.

Marker-assisted selection (MAS) reduces financial expenses and increases productivity. By increasing the efficiency of selecting varieties for crosses, breeders can improve breeding programs in less time [48]. Salah et al. [49], using MAS, identified genes for resistance (QTL) to *Fusarium* fungi in maize coupled to RAPD (OPA02), ISSR (AD8), SSR (SSR93, SSR105, SSR225 and SSR337) and STS (STS03) markers. The SSR and STS markers were shown to be located on chromosome 10 [49]. The use of SNP markers associated with yield structure

traits in maize and barley, showed greater precision than methods based on the study of metabolic pathways [9].

In the present study the analyses revealed that only two markers (11801 and 20607) of the ten tested differentiated between susceptible and resistant genotypes. Two selected markers occur at a higher frequency in resistant genotypes compared with susceptible genotypes. For example, marker 11801 occurs in 8 out of 10 resistant genotypes and 5 out of 10 susceptible genotypes. Importantly, susceptible genotypes S1, S3, S5 and S9 have a field resistance of 6, i.e., they are allowed to contain the 11801 marker that is linked to the candidate gene. Fusarium resistance is a multi-gene trait and therefore single resistance genes can appear in susceptible genotypes with field resistance, such as 6. For the remaining eight markers, monomorphic amplification products with sizes consistent with expected values were observed on agarose gels. Further analysis showed that marker 11801 is within 620 bp of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1 gene, which may be involved in resistance processes and can be used to select fusarium-resistant varieties. Additionally, phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is a key enzyme involved in several important physiological functions in plants, such as C4 and crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis as well as the anaplerotic pathway [50].

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The plant material includes 66 inbred lines, 122 F1 hybrids and 20 reference genotypes (susceptible and resistant to fusarium). The plant material comes from Plant Breeding Smolice Ltd. IHAR Group in Smolice, Poland (51°42'12" N 17°10'10" E) and Malopolska Plant Breeding Sp. z o.o. in Kobierzyce, Poland (50°58'17" N 16°55'50" E).

4.2. Methods

4.2.1. Field Experiment

During the implementation period of the field experiment, observations were made on the infestation of maize plants by fungi of the genus *Fusarium*. At the stage of the full maturity of maize (BBCH 89), the number of plants with symptoms of fusariosis on the cobs was determined on two dates, every two weeks. The degree of infestation of maize cobs by fungi of the genus *Fusarium*, was evaluated on a 9 point scale [51] (Table 5). The index of cob infestation by *Fusarium* spp. was calculated according to the Towsend–Heuberger formula [52]. The results were converted to Bliss angular degrees and subjected to analysis of variance in this form. In addition, at the wax maturity stage (BBCH 85), the percentage of plants with visible signs of maize caterpillar European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) feeding on maize cobs was determined.

Table 5. Interpretation of the scale for assessing the colonization of cobs by fungi of the genus *Fusarium*.

Degree	Description
1	pure ear, without mycelium
3	single fungal colonies on the ear
5	50% of ear colonized by mycelium
7	75% of ear colonized by mycelium
9	the whole ear colonized by mycelium

4.2.2. DNA Isolation

DNA isolation from 66 inbred lines and 122 F1 hybrids that were submitted for next-generation sequencing and 20 reference genotypes was conducted using a reagent kit from Promega. Both isolations were carried out according to the methodology provided with the kits. The concentration and purity of the isolated DNA samples were determined using a DS-11 spectrophotometer from DeNovix. The isolated DNA matrix was brought to a

uniform concentration of 100 ng/ μ L by dilution with distilled water. The efficiency of a single isolation was high and ranged from 106 ng/ μ L for line 15 to 935.24 ng/ μ L for line 34. The purity of individual samples was also very good and ranged from 1.7 to 2.0 for absorbance 260/280 and 260/230, respectively.

4.2.3. Genotyping

Genotyping was performed using DArTseq technology, based on next-generation sequencing. The isolated DNA of the tested maize plants, 25 μ L at 100 ng from each genotype, was sent in two 96-well Eppendorf plates for analyses aimed at identifying silicoDArT and SNP polymorphisms. The analyses were performed at Diversity Arrays Technology, University of Canberra, Australia. After DNA isolation, the next step was digestion of genomic DNA with restriction enzymes, e.g., Ape KI, Pst I, Msp I, to reduce genome complexity. The use of restriction enzymes for the controlled reduction of genome complexity in combination with NGS was first described by Baird et al. [39]. The original GBS method used a single Ape KI enzyme [43]. Later, the method was expanded to include two enzymes: one rare-cutting Pst I in combination with a second frequent-cutting genomic DNA Msp I [53]. The use of such a version allows the creation of a homogeneous library and enables the detection of most fragments associated with a rare-cutting enzyme. The restriction enzymes used are sensitive to methylation, so it is possible to filter out non-coding regions and methylated repetitive sequences, such as mobile elements. Fragments of genomic DNA cut by restriction enzymes were subjected to ligation with adaptors. Because the latter contain identifiers (barcodes), the origin of each sample was strictly defined, and the identifiers met the relevant criteria [54]. The resulting post-PCR products were analyzed for size and constituted a genomic library, which was then sequenced using the most important platform for NGS, Illumina, according to the methodology described in detail on Diversity Arrays Technology's website: <https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/> (accessed on 26 July 2023).

4.2.4. Statistical Analysis

The normality of the distribution of the maize plant infection by *Fusarium* fungi was tested using Shapiro–Wilk's normality test to check whether the analysis of variance (ANOVA) met the assumption that the ANOVA model residuals followed a normal distribution. The homogeneity of variance was tested using Bartlett's test. A two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the main effects of genotype, location, and genotype $\times$ location interaction on the variability of the degree of maize plant infection by *Fusarium* fungi. The genetic similarity for each pair of the investigated genotypes was estimated based on the coefficient proposed by Nei and Li [55]. The genotypes were grouped hierarchically using the unweighted pair group method of arithmetic means (UP-GMA) based on the calculated coefficients [56]. The relationships between the genotypes were presented in the form of a dendrogram [57–59]. All analyses were conducted in Genstat 23 [60].

4.2.5. Association Mapping Using GWAS Analysis

Association mapping of 188 maize genotypes (66 lines and 122 hybrids) was performed using GWAS analysis. This mapping was performed based on the results obtained from genotyping and phenotyping. The genotypic data were obtained from DArTseq analysis, while the phenotypic data represent field results on the degree of fusarium head blight. Based on the GWAS analysis performed, silicoDArT and SNP markers with the highest level of significance, i.e., those that were most strongly associated with plant resistance to fusarium, were selected for further study.

4.2.6. Physical Mapping

The silicoDArT and SNP marker sequences selected based on the GWAS analysis were subjected to Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis, which involves

searching databases to find sequences with high homology to the selected silicoDART and SNP marker sequences. These analyses were performed in the Unité de Recherche Génomique Info (URGI) service with the completely sequenced maize genome. The URGI program was used to indicate the chromosomal locations of retrieved sequences similar to those analyzed and to determine their physical locations. The sequences of all genes located in the designated area on the chromosome were subjected to further analysis.

4.2.7. Functional Analysis of Gene Sequences

Functional analysis was performed using the Blast2GO program. The sequences of all genes located in the chromosome region designated based on the BLAST analysis performed in the URGI service were analyzed. The goal was to obtain information on the biological function of gene sequences located in the designated chromosome region.

4.2.8. Designing Primers for Identified SilicoDART and SNP Polymorphisms Related to Fusarium Resistance

The Primer 3 Plus program was used to design the starters.

4.2.9. The Polymerase Chain Reaction (PCR)

Identification of new markers coupled to genes associated with plant resistance to fusarium was carried out using polymerase chain reaction (PCR). The location of the markers and the genes coupled to them are described in the results section.

The polymerase chain reaction (PCR) was conducted in a BIO-RAD T1000 thermocycler. Reagents from Promega were used to prepare the mixture. The basic composition of the reaction mixture is shown in Table 6. This composition was modified depending on the marker being identified.

Table 6. PCR reaction mixture composition.

Stock Solution and Components	Per Reaction	Per 1 Sample (20 µL)
Buffer (5× Green Go Taq, Flexi Buffer)	1X	4
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.6
10 mM Ultrapure dNTPs Mix	0.1 mM	0.32
DNA polymerase (Go Taq G2 Flexi)	0.05 U/µL	0.17
Primer I FW	0.3 µM	0.25
Primer II RW	0.3 µM	0.25
Nuclease-free water	-	11.91
DNA	0.05 µg to 1 µg	1

The conditions for carrying out the PCR reaction were determined individually for each of the identified markers and differed, among other things, in the temperature of attachment of the primers, determined by their melting point. The overall profile of the PCR reaction is shown below:

Pre-denaturation: 5 min at 94 °C

Primer binding: 40 cycles

Denaturation: 45 s at 94 °C

Attachment of primers: 1 min at X °C

Synthesis: 1 min at 72 °C

Final synthesis: 5 min at 72 °C

Storage max: 24 h at 4 °C

4.2.10. Electrophoresis

Electrophoresis of PCR reaction products was carried out in a 1.5% agarose gel, with the addition of 1 µL of Midori Green solution, for 2 h at 100 V. The O'RangeRuler 100 bp bar size marker from Fermentas was used to identify molecular masses. Visualization of the

separated DNA fragments was performed using UV light and recorded on digital images using the BIORAD gel visualization and documentation system.

5. Conclusions

Excessive use of chemical plant protection products negatively affects the natural environment. Pesticides also pose a direct threat to human health and sometimes even life. To prevent public exposure to widespread environmental contamination, integrated pest management methods should be introduced. The general principles of integrated pest management are to prevent the occurrence of pest organisms or to reduce their occurrence and negative impact, which can be achieved, among other things, by using resistant or tolerant varieties. As a result of field experiments and in-depth molecular analyses, molecular markers conjugated with potential genes for resistance to maize ear fusariosis were selected. The newly selected markers were tested against reference genotypes. As a result of the analyses, it was found that 2 markers (11801 and 20607) out of 10 tested differentiated between susceptible and resistant genotypes. Marker number 11,801 proved to be the most effective, with a specious product of 237 bp appearing for genotypes 1, 3, 5, 9 and 10. These genotypes were characterized by a field resistance of 4–6 on the 9° scale (1 being susceptible and 9 being resistant) and for all genotypes except 16 and 20, which were characterized by a field resistance of 9. Plant resistance to fusarium is a multigenic trait and the selected markers can be used to select genotypes together with markers of other genes involved in the immune reaction.

Author Contributions: Conceptualization, A.T. and A.S.; data curation, A.S., A.T. and J.B.; formal analysis, J.B. and A.S.; investigation, A.S., A.T., J.B. and B.N.; methodology, A.S., A.T., G.S., J.B. and M.L.; supervision, A.T. and J.B.; visualization, J.B.; writing—original draft, A.T., J.B. and A.S.; writing—review and editing, A.T., A.S. and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research presented in this publication was financed as part of the research project “Analysis of genetic determinants of heterosis effect and fusarium resistance in maize (*Zea mays* L.)”. The project is implemented with a grant from the Ministry of Agriculture and Rural Development, “Biological progress in plant production (recruitment 2020)”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: Bartosz Nowak is a PhD student at the Poznań University of Life Sciences and at the same time was employed by the company Smolice Plant Breeding Sp. z o.o. IHAR Group. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Hickey, L.T.; Hafeez, A.N.; Robinson, H.; Jackson, S.A.; Leal-Bertioli, S.C.; Tester, M.; Gao, C.; Godwin, I.D.; Hayes, B.J.; Wulff, B.B.H. Breeding crops to feed 10 billion. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 744–754. [\[CrossRef\]](#)
2. Maschietto, V.; Cinzia, C.; Pirona, R.; Pea, G.; Strozzi, F.; Marocco, A.; Rossini, L.; Lanubile, A. QTL Mapping and Candidate Genes for Resistance to Fusarium Ear Rot and Fumonisin Contamination in Maize. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Ray, D.K.; Mueller, N.D.; West, P.C.; Foley, J.A. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Netshifhefhe, N.E.I.; Flett, B.C.; Viljoen, A.; Rose, L.J. Inheritance and genotype by environment analyses of resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in maize F1 hybrids. *Euphytica* **2018**, *214*, 235. [\[CrossRef\]](#)
5. Watson, A.; Ghosh, S.; Williams, M.J.; Cuddy, W.S.; Simmonds, J.; Rey, M.D.; Hatta, M.A.M.; Hinchliffe, A.; Steed, A.; Reynolds, D.; et al. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nat. Plants* **2018**, *4*, 23–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Bassi, F.M.; Bentley, A.R.; Charmet, G.; Ortiz, R.; Crossa, J. Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.). *Plant Sci.* **2016**, *242*, 23–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

7. Tester, M.; Langridge, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* **2010**, *327*, 818–822. [\[CrossRef\]](#)
8. Zila, C.T.; Ogut, F.; Romay, M.C.; Gardner, C.A.; Buckler, E.S. Genome wide association study of Fusarium ear rot disease in the U.S.A. maize inbred line collection. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 372. [\[CrossRef\]](#)
9. Michel, S.; Wagner, C.; Nosenko, T.; Steiner, B.; Samad-Zamini, M.; Buerstmayr, M.; Mayer, K.; Buerstmayr, H. Merging Genomics and Transcriptomics for Predicting Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Genes* **2021**, *12*, 114. [\[CrossRef\]](#)
10. Araus, J.L.; Cairns, J.E. Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19*, 52–61. [\[CrossRef\]](#)
11. Galiano-Carneiro, A.L.; Kessel, B.; Presterl, T.; Gaikpa, D.S.; Kistner, M.B.; Miedaner, T. Multi-parent QTL mapping reveals stable QTL conferring resistance to Gibberella ear rot in maize. *Euphytica* **2021**, *217*, 2. [\[CrossRef\]](#)
12. Sun, Y.; Ruan, X.; Wang, Q.; Zhou, Y.; Wang, F.; Ma, L.; Wang, Z.; Gao, X. Integrated gene co-expression analysis and metabolites profiling highlight the important role of ZmHIR3 in maize resistance to Gibberella stalk rot. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 664–733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Deepthi, B.V.; Deepa, N.; Vanitha, P.R.; Sreenivasa, M.Y. Stress responses on the growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium proliferatum* associated with stored poultry feeds. *Appl. Food Res.* **2022**, *2*, 100091. [\[CrossRef\]](#)
14. Alsamir, M.; Al-Samir, E.; Kareem, T.A.; Abass, M.; Trethowan, R. The application of zinc fertilizer reduces Fusarium infection and development in wheat. *Aust. J. Crop Sci.* **2020**, *14*, 1088–1094. [\[CrossRef\]](#)
15. Nowembabaz, A.; Taulya, G.; Tinzaara, W.; Karamura, E. Effect of integrated potassium nutrition on Fusarium wilt tolerance in apple bananas. *Afr. J. Plant Sci.* **2021**, *15*, 257–265. [\[CrossRef\]](#)
16. Gilardi, G.; Vasileiadou, A.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. The effects of biological control agents, potassium phosphite and calcium oxide on race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce in closed soilless cultivation systems. *J. Phytopathol.* **2022**, *170*, 626–634. [\[CrossRef\]](#)
17. Korte, A.; Farlow, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: A review. *Plant Methods* **2013**, *9*, 29. [\[CrossRef\]](#)
18. Brachi, B.; Faure, N.; Horton, M.; Flahauw, E.; Vazquez, A.; Nordborg, M.; Bergelson, J.; Cuguen, J.; Roux, F. Linkage and association mapping of Arabidopsis thaliana flowering time in nature. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000940. [\[CrossRef\]](#)
19. Eller, M.; Robertson-Hoyt, L.A.; Payne, G.A.; Holland, J.B. Grain yield and Fusarium ear rot of maize hybrids developed from lines with varying levels of resistance. *Maydica* **2008**, *53*, 231–237.
20. Bottalico, A.; Perrone, G. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 611–624. [\[CrossRef\]](#)
21. Oldenburg, E.; Höppner, F.; Ellner, F.; Weinert, J. Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Res.* **2017**, *33*, 167–182. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Eli, K.; Schaafsma, A.W.; Limay-Rios, V.; Hooker, D.C. Effect of pydiflumetofen on *Gibberella* ear rot and *Fusarium* mycotoxin accumulation in maize grain. *World Mycotoxin J.* **2021**, *14*, 495–512. [\[CrossRef\]](#)
23. Gxasheka, M.; Wang, J.; Gunya, B.; Mbanjwa, V.; Louis, T.; Dlamini, T.; Gao, J. In vitro effect of some commercial fungicides on mycelial growth of *Fusarium* species causing maize ear rot disease in China. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2021**, *54*, 557–569. [\[CrossRef\]](#)
24. Logrieco, A.; Mule, G.; Moretti, A.; Bottalico, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 597–609. [\[CrossRef\]](#)
25. Champeil, A.; Doré, T.; Fourbet, J.F. *Fusarium* head blight: Epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci.* **2004**, *166*, 1389–1415. [\[CrossRef\]](#)
26. Doohan, F.M.; Brennan, J.; Cooke, B.M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* **2003**, *109*, 755–768. [\[CrossRef\]](#)
27. Presello, D.A.; Reid, L.M.; Butler, G.; Mather, D.E. Pedigree selection for *Gibberella* ear rot resistance in maize populations. *Euphytica* **2005**, *143*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
28. Martin, M.; Dhillon, B.S.; Miedaner, T.; Melchinger, A.E. Inheritance of resistance to gibberella ear rot and deoxynivalenol contamination in five flint maize crosses. *Plant Breed.* **2012**, *131*, 28–32. [\[CrossRef\]](#)
29. Butrón, A.; Reid, L.M.; Santiago, R.; Cao, A.; Malvar, R.A. Inheritance of maize resistance to gibberella and fusarium ear rots and kernel contamination with deoxynivalenol and fumonisins. *Plant Pathol.* **2015**, *64*, 1053–1060. [\[CrossRef\]](#)
30. Hoenisch, R.W.; Davis, R.M. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to fusarium ear rot in-field corn. *Plant Dis.* **1994**, *78*, 517–519. [\[CrossRef\]](#)
31. Bily, A.C.; Reid, L.M.; Taylor, J.H.; Johnston, D.; Malouin, C.; Burt, A.J.; Bakan, B.; Regnault-Roger, C.; Pauls, K.P.; Arnason, J.T.; et al. Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* **2003**, *93*, 712–719. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Sampietro, D.A.; Vattuone, M.A.; Presello, D.A.; Fauguel, C.M.; Catalán, C.A.N. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Prot.* **2009**, *28*, 196–200. [\[CrossRef\]](#)
33. Williams, W.P.; Windham, G.L. Diallel analysis of fumonisin accumulation in maize. *Field Crops Res.* **2009**, *114*, 324–326. [\[CrossRef\]](#)
34. Pérez-Brito, D.; Jeffers, D.; González-de-León, D.; Khairallah, M.; Cortés-Cruz, M.; Velázquez-Cardelas, G.; Azpíroz-Rivero, S.; Srinivasan, G. QTL mapping of Fusarium moniliforme ear rot resistance in highland maize. *Agrociencia* **2001**, *35*, 181–196.

35. Hung, H.-Y.; Holland, J.B. Diallel analysis of resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Sci.* **2012**, *52*, 2173–2181. [[CrossRef](#)]
36. Zhou, G.; Li, S.; Ma, L.; Wang, F.; Jiang, F.; Sun, Y.; Ruan, X.; Cao, Y.; Wang, Q.; Zhang, Y.; et al. Mapping and validation of a stable quantitative trait locus conferring maize resistance to gibberella ear rot. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 1984–1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Roche 454 Sequencing. Multiplex Identifier (MID) Adaptors for Rapid Library Preparations 454. *Life Sci.* **2010**, 1–7.
38. Mardis, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* **2008**, *24*, 133–141. [[CrossRef](#)]
39. 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. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3376. [[CrossRef](#)]
40. Adolatto, P.; Davison, D.; Erezylmaz, D.; Hu, T.T.; Mast, J.; Sunayama-Morita, T.; Stern, D.L. Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res.* **2011**, *21*, 610–617. [[CrossRef](#)]
41. Liu, S.; Yeh, C.-T.; Tang, H.M.; Nettleton, D.; Schnable, P.S. Gene mapping via bulked segregant RNASeq (BSR-Seq). *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36406. [[CrossRef](#)]
42. Sansaloni, C.; Petrol, C.; Jaccoud, D.; Carling, J.; Detering, F.; Grattapaglia, D.; Kilian, A. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: Genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. *BMC Proc.* **2011**, *5*, P54. [[CrossRef](#)]
43. Elshire, R.J.; Glaubitz, J.C.; Sun, Q.; Poland, J.A.; Kawamoto, K.; Buckler, E.S.; Mitchell, S.E. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zila, C.T.; Samayoa, L.F.; Santiago, R.; Butrón, A.; Holland, J.B. A genome-wide association study reveals genes associated with fusarium ear rot resistance in a maize core diversity panel. *G3 Genes Genom. Genet.* **2013**, *3*, 2095–2104. [[CrossRef](#)]
45. De Jong, G.; Pamplona, A.K.A.; Von Pinho, R.G.; Balestre, M. Genome-wide association analysis of ear rot resistance caused by *Fusarium verticillioides* in maize. *Genomics* **2017**, *10*, 291–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chen, J.F.; Ding, J.Q.; Li, H.M.; Li, Z.M.; Sun, X.D.; Li, J.J.; Wang, R.X.; Dai, X.D.; Dong, H.F.; Song, W.B.; et al. Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to Fusarium ear rot in maize. *Mol. Breed.* **2012**, *30*, 1649–1656. [[CrossRef](#)]
47. Li, Z.M.; Ding, J.Q.; Wang, R.X.; Chen, J.; Sun, X.; Chen, W.; Song, W.; Dong, H.; Dai, X.; Xia, Z.; et al. A new QTL for resistance to Fusarium ear rot in maize. *J. Appl. Genet.* **2011**, *52*, 403–406. [[CrossRef](#)]
48. Arabzai, M.; Gul, H. Application Techniques of Molecular Marker and Achievement of Marker Assisted Selection (MAS) in Three Major Crops Rice, Wheat and Maize. *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* **2021**, *8*, 82–93. [[CrossRef](#)]
49. Salah, N.; Milad, S.I.; El-Rouby, M.; Barakat, M.N. Identification of New Molecular Markers Linked to Maize Stalk Rot Disease Resistance (*Fusarium moniliforme*) in Maize. *Plant Omics J.* **2016**, *9*, 12–18.
50. Echevarria, C.; Vidal, J. The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 541–547. [[CrossRef](#)]
51. Borowiecki, M.; Michalak, D. On Hallian digraphs and their binding number. *Banach Cent. Publ.* **1989**, *25*, 33–37. [[CrossRef](#)]
52. Puntener, W. *Manual for Field Trials in Plant Protection*; Agricultural Division of Ciba-Geigy Limited: Basel, Switzerland, 1981; p. 205.
53. Poland, J.A.; Rife, T.W. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *Plant Genome* **2012**, *5*, 92–102. [[CrossRef](#)]
54. Poland, J.; Endelman, J.; Dawson, J.; Rutkoski, J.; Wu, S.; Manes, Y.; Dreisigacker, S.; Crossa, J.; Sánchez-Villeda, H.; Sorrells, M.; et al. Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *Plant Genome* **2012**, *5*, 103. [[CrossRef](#)]
55. Nei, M.; Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5269–5273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Starzycka-Korbas, E.; Weber, Z.; Matuszczak, M.; Bocianowski, J.; Budzianowski, G.; Stefanowicz, M.; Starzycki, M. The diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates from western Poland. *J. Plant Pathol.* **2021**, *103*, 185–195. [[CrossRef](#)]
57. Wrońska-Pilarek, D.; Dering, M.; Bocianowski, J.; Lechowicz, K.; Kowalkowski, W.; Barzdajn, W.; Hauke-Kowalska, M. Pollen Morphology and Variability of *Abies alba* Mill. Genotypes from South-Western Poland. *Forests* **2020**, *11*, 1125. [[CrossRef](#)]
58. Wrońska-Pilarek, D.; Jagodziński, A.M.; Bocianowski, J.; Marecik, M.; Janyszek-Sołtysiak, M. Pollen morphology and variability of *Sambucus nigra* L.—*Adoxaceae*. *Biologia* **2020**, *75*, 481–493. [[CrossRef](#)]
59. Wolko, Ł.; Antkowiak, W.; Lenartowicz, E.; Bocianowski, J. Genetic diversity of European pear cultivars (*Pyrus communis* L.) and wild pear (*Pyrus pyrastra* (L.) Burgsd.) inferred from microsatellite markers analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2010**, *57*, 801–806. [[CrossRef](#)]
60. VSN International. *Genstat for Windows*, 23rd ed.; VSN International: Hemel Hempstead, UK, 2023.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

13.Oświadczenia autorów