

**MONIKA KOCIUBA****STEFAN STOJAŁOWSKI**

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

## Efektywność markerów molekularnych SCAR z chromosomu 4RL w selekcji genotypów męskopłodnych oraz ich związek z wybranymi cechami morfologicznymi żyta (*Secale cereale* L.)

### **Efficiency of the SCAR markers from 4RL chromosome in selection of male fertile genotypes and their relation to some morphological traits in rye (*Secale cereale* L.)**

Celem prezentowanych badań było sprawdzenie efektywności znanych wcześniej z literatury oraz nowo opracowanych markerów SCAR z chromosomu 4RL przy selekcjonowaniu męskopłodnych genotypów posiadających cytoplazmę Pampa. Materiał badawczy stanowiła populacja F<sub>2</sub> mieszańca pomiędzy męskosterylną linią wsobną 541P, a pojedynczą, losowo wybraną rośliną z populacji prymitywnego żyta irańskiego — IRAN IX. W pracy oceniono też związek pomiędzy płodnością roślin, a kilkoma cechami morfologicznymi mieszańca: liczbą kłosek w kłosie, długością kłosa oraz wysokością roślin, ale nie wykryto pomiędzy nimi silnych zależności. Z czternastu testowanych markerów zmapowanych na długim ramieniu chromosomu 4R jedynie cztery ujawniły polimorfizm w badanym materiale i utworzyły grupę sprzężeń. Skonstruowana w oparciu o segregację tych markerów mapa genetyczna obejmuje obszar 24cM, a wszystkie markery należące do tej grupy wykazują statystycznie istotny związek z płodnością roślin badanego mieszańca. Najefektywniejszy przy ewentualnym selekcjonowaniu genotypów męskopłodnych okazał się marker SCP16M58. Średnio, w badanej populacji rośliny posiadające prązek markerowy zawiązywały czterokrotnie więcej ziaren pod izolatorami w porównaniu do osobników bez prązka. Marker ten wykazywał równocześnie istotny statystycznie związek z *locus* kontrolującym długość źdźbła, pomimo że współczynnik korelacji między płodnością roślin, a ich wysokością nie osiągał w badanej populacji wysokich wartości.

**Słowa kluczowe:** cytoplazmatyczna męska sterylność, cytoplazma Pampa, markery molekularne, żyto

The study aimed at a verification if previously published as well as newly developed SCAR markers located on the 4RL chromosome can be efficient in selecting male fertile genotypes with the Pampa cytoplasm. Research material constituted a F<sub>2</sub> population developed after crossing the male sterile inbred line 541 with a single randomly chosen plant from the IRAN IX population of primitive rye. Correlations between male fertility and some morphological traits of plants i.e.: number of spikelets per ear, length of ear and plant height were also examined but no strong dependences were detected.

Only 4 out of 14 tested markers mapped on the long arm of 4R chromosome revealed polymorphism between parental genotypes of the studied hybrid. These four SCAR markers formed one linkage group. The constructed genetic map covered the distance of 24cM and all markers belonging to this linkage group showed a statistically significant relation to male fertility of the studied individuals. The most effective tool for selection of male fertile genotypes proved to be the SCP16M58 marker. On average, in the analyzed population, seed set under bags was four times higher on plants with the marker band vs. individuals without the band. This marker showed as well a significant relation to the *locus* controlling plant height, although the correlation coefficient between male fertility of plants and their height was rather low.

**Key words:** cytoplasmic male sterility, Pampa cytoplasm, molecular markers, rye

#### WSTĘP

Znaczący postęp hodowlany, jaki został dokonany w europejskiej hodowli żyta na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza jest w dużym stopniu rezultatem wprowadzenia do uprawy odmian mieszańcowych (Geiger, 2007). Pierwsze odmiany mieszańcowe żyta zostały zarejestrowane w Niemczech w połowie lat 80. XX wieku, a główną zaletą decydującą o ich wciąż rosnącej popularności jest wysoki potencjał plonotwórczy wynikający z wykorzystania efektu heterozji w stopniu pełniejszym niż to było możliwe w tradycyjnych odmianach populacyjnych.

Od chwili zarejestrowania pierwszych odmian mieszańcowych żyta ich produkcja nasienna bazuje głównie na odkrytej przez Geigera i Schnella (1970) cytoplazmie sterylizującej typu Pampa (CMS-P). Utrzymanie męskiej sterility u roślin z tą cytoplazmą nie nastęca większych trudności, a genotypy dopełniające występują powszechnie we wszystkich europejskich populacjach hodowlanych (Geiger i Miedaner, 1996). Poważnym problemem w hodowli mieszańców żyta z cytoplazmą Pampa jest natomiast skuteczne przywracanie płodności. Allele płodności wprowadzane są do genotypu mieszańca przez komponenty ojcowskie. Trudności w znajdowaniu form ojcowskich, które gwarantowałyby potomstwu wysoki efekt heterozji i jednocześnie pełną zdolność do produkcji pyłku, spowodowały, iż większość zarejestrowanych aktualnie mieszańców pyli wyraźnie słabiej niż odmiany populacyjne. Według Geigera i Miedanera (1996) częściowa płodność odmian mieszańcowych żyta otrzymywanych przy wykorzystaniu cytoplazmy Pampa, przeważnie nie wpływa negatywnie na zawiązywanie ziaren w kłosie, ale niebezpiecznie zwiększa poziom porażenia przez sporysz (*Claviceps purpurea*). Rozwiązanie tego problemu wymagało znalezienia źródeł genów efektywnie przywracających płodność pyłku u roślin z CMS-Pampa. Źródła takie zidentyfikowano wśród prymitywnych populacji żyta uprawnego pochodzących z Ameryki Południowej i Iranu (Geiger i Miedaner, 1996). Przeniesienie pojedynczych genów pochodzących z populacji nieprzystosowanych do uprawy w warunkach intensywnej gospodarki rolnej do elitarnych materiałów hodowlanych jest procesem długotrwałym. Jego powodzenie zależy w dużym stopniu od skutecznego oddzielenia interesujących nas *loci* od sprzężonych z nimi genów determinujących niekorzystne z agronomicznego punktu widzenia cechy. Według Miedanera i wsp. (2000) efektywne allele płodności pochodzące z południowoamerykańskiej populacji Pico Gentario zlokalizowane są na długim ramieniu

chromosomu 4R w bliskim sąsiedztwie genu warunkującego wysokość roślin. W tym samym obszarze genomu żyta zmapowany został równie efektywny w przywracaniu płodności gen pochodzący z irańskiej populacji o nazwie IRAN IX (Miedaner i in., 2000). W celu usprawnienia procesu przenoszenia alleli płodności pochodzących z prymitywnych form żyta do linii wsobnych wykorzystywanych przy tworzeniu odmian mieszańcowych opracowane zostały markery molekularne SCAR sprzężone z tymi genami (Stracke i in., 2003; Hackauf i in., 2009). Zestaw znanych markerów molekularnych niezbędnych do prowadzenia precyzyjnej hodowli z ich wykorzystaniem (ang. Marker Assisted Breeding) można rozszerzyć sięgając po kolejne markery zlokalizowane na długim ramieniu chromosomu 4R, których związek z genami kontrolującymi płodność w systemie CMS-P nie był dotąd badany.

Celem niniejszej pracy była ocena męskiej płodności oraz kilku mających znaczenie agronomiczne cech morfologicznych w populacji  $F_2$  mieszańca między męskosterylną linią wsobną z cytoplazmą Pampa, a prymitywnym żytem IRAN IX będącym źródłem efektywnych genów przywracających płodność przecikowia w systemie CMS-P. W oparciu o dane fenotypowe oraz wyniki analiz PCR-SCAR podjęto próbę:

- zweryfikowania, które z opisanych wcześniej markerów sprzężonych z *locus* płodności/sterylności (Stracke i in., 2003) mogą być najbardziej przydatne w hodowli mieszańców z cytoplazmą Pampa,
- sprawdzenia czy zlokalizowane na długim ramieniu chromosomu 4R markery (Stojałowski, 2007), których wcześniej nie wykorzystywano do badań nad żytem z cytoplazmą P, mogą zostać użyte do selekcjonowania genotypów męskopłodnych.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiła populacja  $F_2$  mieszańca otrzymanego po ręcznym zapyleniu posiadającej cytoplazmę Pampa męskosterylnej linii wsobnej 541P ( $B_{17}$ ) pyłkiem zebrany z losowo wybranej rośliny (oznaczonej numerem 269-4) pochodzącej z populacji IRAN IX. Linia 541P jest męskosterylnym analogiem linii wsobnej 541, która została wytworzona w macierzystej jednostce autorów niniejszej pracy przez prof. M. Łapińskiego i posiada złożony rodowód (Łapiński i Stojałowski, 1996). Populacja prymitywnego żyta irańskiego IRAN IX, będąca źródłem genów efektywnie przywracających męską płodność u roślin z cytoplazmą Pampa (Geiger i Miedaner, 1996) została udostępniona do badań przez prof. H.H. Geigera z Uniwersytetu Hohenheim (Stuttgart, Niemcy). Składające się z 33 osobników pokolenie mieszańca  $F_1$  rozszczebiało się na rośliny męskopłodne i męskosterylne. Nasiona populacji  $F_2$  uzyskano z 16 losowo wybranych, zaizolowanych przed kwitnieniem kłosów zebranych z płodnych roślin  $F_1$ .

Badana populacja  $F_2$  licząca 276 osobników została wysiana punktowo w rozstawie 20×20cm na terenie Hali Wegetacyjnej Akademii Rolniczej w Szczecinie w sezonie 2005/06. Z młodych roślin pobrane zostały próbki liści do izolacji DNA. Przed kwitnieniem na trzy kłosa każdej spośród 251 dobrze rozwiniętych roślin zostały założone izolatory z tomofanu. W czasie żniw zbierano tylko zaizolowane kłosa, a osadzanie ziaren pod izolatorami było w doświadczeniu traktowane jako wskaźnik płodności roślin. Drugą

metodą oceny płodności były kilkukrotne obserwacje wzrokowe kwitnienia każdego z pojedynczych wykonanych przy zastosowaniu 9-stopniowej skali bonitacyjnej Geigera i Morgensterna (1975). Przed zbiorem dokonano pomiarów wysokości roślin, a po zbiorach oceniono długość kłosów, liczbę kłosków w kłosie i liczbę ziaren w kłosie. Osadzanie ziaren określano jako procentowy stosunek liczby zawiązanych ziarniaków do liczby kwiatków w kłosie. Rośliny nie zawiązujące w ogóle ziaren w izolowanych kłosach klasyfikowano jako męskosterylne, te które osadzały ziarno na poziomie do 50% określano jako częściowo płodne. Przy co najmniej 50% osadzeniu ziarna, rośliny zaliczono do kategorii męskopłodnych.

Ziarna uzyskane z częściowo i w pełni płodnych roślin pokolenia  $F_2$  wysiano na jednorzędkowych poletkach w sezonie 2007/08, a płodność każdego liczącego minimum 15 roślin potomstwa  $F_3$  oceniano wzrokowo w czasie kwitnienia i zaliczono do dwóch kategorii: męskopłodnych (gdy wszystkie oceniane rośliny wykazywały przynajmniej częściowe objawy płodności) oraz segregujących (gdy w pokoleniu  $F_3$  obok roślin w pełni lub częściowo płodnych pojawiały się również rośliny męskosterylne).

Ekstrakcję DNA z roślin badanej populacji wykonano przy zastosowaniu jednoetapowej metody wg Thomson i Henry'ego (1995). Warunki analiz PCR-SCAR zostały opisane w pracy Stojałowskiego i wsp. (2005), a jedyna modyfikacja dotyczyła składu mieszaniny reakcyjnej i wynikała z uproszczonej metody izolacji DNA: zastosowano zredukowaną do poziomu 2–4 ng ilość DNA i zmniejszoną 5-krotnie ilość buforu PCR. Przetestowano czternaście markerów SCAR zmapowanych na długim ramieniu chromosomu 4R (Stracke i in., 2003; Stojałowski, 2007), spośród których tylko cztery wykrywały polimorfizm między formami rodzicielskimi i segregowały w pokoleniu  $F_2$  badanej populacji. Dwa spośród nich: SCP16M58 i SCY09d znane były jako markery sprzężone z genami kontrolującymi płodność w CMS-Pampa (Stracke i in., 2003), dwa pozostałe (SCSz334L700 i SCSz1139L856) zostały opracowane w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie (Stojałowski, Milczarski, dane niepublikowane) i nie były dotąd używane do badań nad żytem z tym typem cytoplazmy sterylizującej.

Dla danych z oceny fenotypowej roślin  $F_2$  wyliczono średnie arytmetyczne, odchylenia standardowe oraz współczynniki korelacji pomiędzy badanymi cechami. Zgodność obserwowanych segregacji płodności/sterylności roślin oraz obecności/braku prążków markerowych z zakładanymi modelami dziedziczenia sprawdzano testem  $\chi^2$ . Mapę sprzężeń markerów molekularnych utworzono w programie JoinMap 3,0 (Van Ooijen i Voorrips, 2001) przy  $LOD = 4,0$ . Identyfikację *loci* kontrolujących oceniane cechy fenotypowe (QTL-e) przeprowadzono za pomocą programu MapQTL v.5,0 (Van Ooijen, 2004). Wartość krytyczną dla krzywej LOD przy mapowaniu interwałowym (interval mapping) dla każdej z cech określono przy pomocy testu permutacji przy 1000 permutacjach. Dodatkowo przy mapowaniu QTL-i zastosowano nieparametryczny test rangowy Kruskala-Wallisa pozwalający na określenie związku między markerem molekularnym i *locus* kontrolującym daną cechę ilościową.

## WYNIKI

W obrębie badanej populacji F<sub>2</sub> obserwowano pełen zakres zmienności pod względem fenotypowych objawów męskiej płodności/sterylności. Liczebność roślin zaliczonych wzrokowo do kategorii męskosterylnych (oceny od 1 do 3 w skali Geigera i Morgensterna) i w pełni męskopłodnych (od 7 do 9 w skali) były bardzo zbliżone (tab. 1).

Tabela 1

**Wyniki oceny męskiej płodności/sterylności u pojedynczych roślin pokolenia F<sub>2</sub> oraz potomstw pokolenia F<sub>3</sub> mieszańca 541P × IRAN IX 269-4**  
**Results of male fertility/sterility assessment among individuals of the F<sub>2</sub> population and F<sub>3</sub> progenies of the cross 541P × IRAN IX 269-4**

Metoda oceny Assessment method	Pokolenie Generation	Fenotypy <sup>1)</sup> Phenotypes						Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Zgodność z dwugenowym modelem dziedziczenia <sup>2)</sup> Conformity with the two-gene inheritance model <sup>2)</sup>	
		MS		CP		MP				Chi <sup>2</sup>	P
Wzrokowa Visual	F <sub>2</sub>	98	53	100				5,14	2,70	2,26	0,20–0,10
	F <sub>3</sub>	segr. —	MP —	segr. 30	MP 3	segr. 79	MP 17			2,52	0,20–0,10
Osadzanie ziaren Seed set	F <sub>2</sub>	90	96	65				26,1	28,2	6,35	0,025–0,01

<sup>1)</sup> MS — męskosterylne, male sterile; CP — częściowo płodne; partially fertile; MP — męsko płodne; male fertile; segr. — rozszczepiające się; segregating

<sup>2)</sup> Objasnienia w tekście. Details in the text

Roślin ocenionych jako częściowo płodne było prawie o połowę mniej. Bimodalny rozkład cechy z maksymalnymi liczebnościami roślin reprezentujących skrajne kategorie fenotypowe wskazuje na oligogeniczny charakter dziedziczenia męskiej sterylności w badanej populacji. Przy próbie sformułowania hipotezy genetycznej tłumaczącej dziedziczną kontrolę płodności roślin w badanej populacji wyróżniano dwie główne klasy fenotypowe, zaliczając do form męskopłodnych rośliny w pełni męskopłodne i częściowo płodne. Obserwowane stosunki rozszczepień zarówno w pokoleniu F<sub>2</sub>, jak i w F<sub>3</sub> wskazują, że przywracanie płodności pręcikowia determinowane było przez geny z co najmniej dwóch niezależnych *loci*. Zadowalającą zgodność obserwowanych stosunków rozszczepień z teoretycznie oczekiwanymi uzyskano przyjmując hipotezę, że badana cecha kontrolowana jest przez dwie pary niezależnych, dominujących, komplementarnie współdziałających genów, a rośliny męskopłodne posiadają przynajmniej po jednym dominującym allelu w obu postulowanych *loci*. Przy takich założeniach rozszczepienie na formy męskopłodne i męskosterylne w pokoleniu F<sub>2</sub> powinno być zgodne ze stosunkiem 9:7, a rozszczepienie na potomstwa męskopłodne i segregujące w pokoleniu F<sub>3</sub> (otrzymanym wyłącznie z męskopłodnych pojedynczków F<sub>2</sub>) zgodne z proporcją 1:8. Dane z wzrokowej oceny pylenia roślin z obu pokoleń badanego mieszańca wykazują zgodność z tymi założeniami (tab. 1). Rozszczepienia pod względem płodności uzyskane przy ocenie osadzania ziaren pod izolatorami różnią się nieco od rezultatów oceny wzrokowej i wykazują statystycznie istotne odchylenia od oczekiwań dla hipotezy o dwugenowej kontroli przywracania płodności (tab. 1). Z drugiej strony korelacja pomiędzy obiema

metodami oceny jest bardzo wysoka (tab. 3), a zakwalifikowanie roślin zawiązujących śladowe ilości ziaren (poniżej 1%) do kategorii roślin męskosterylnych zamiast męskopłodnych powoduje, że obserwowane odchylenia od oczekiwanego stosunku rozszczepień 9:7 przestają być statystycznie istotne (szczegółowe dane nie zostały ukazane w pracy).

Szeroki zakres zmienności zaobserwowano w obrębie cech morfologicznych ocenianych w pokoleniu F<sub>2</sub> mieszańca między linią 541P, a rośliną z populacji IRAN IX (tab. 2). Uzyskane rozkłady wykazywały zasadniczo zgodność z rozkładem normalnym wskazując na poligeniczny charakter dziedziczenia tych cech. Najsilniej skorelowanymi ze sobą cechami, poza płodnością ocenianą wzrokowo i osadzaniem ziarna, była długość kłosa i liczba kłosek w kłosie (tab. 3). Obie cechy morfologiczne kłosa były nieco słabiej, ale wciąż istotnie, skorelowane z wysokością roślin. Nie stwierdzono natomiast znaczących zależności między cechami morfologicznymi, a płodnością roślin.

Tabela 2

**Cechy morfologiczne oceniane w populacji F<sub>2</sub> mieszańca 541P × IRAN IX 269-4**  
**Morphological characters evaluated among F<sub>2</sub> population of the cross 541P × IRAN IX 269-4**

Cecha Trait	Zakres zmienności Variation range		Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation
	min.	max.		
Liczba kłosek w kłosie Spikelets number per ear	20,0	49,0	33,82	5,39
Długość kłosa (cm) Ear length (cm)	4,7	15,6	10,14	1,82
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	97,0	198,0	143,3	18,81

Tabela 3

**Współczynniki korelacji pomiędzy cechami badanymi w populacji F<sub>2</sub> mieszańca 541P × IRAN IX 269-4**  
**Correlation coefficients between characters evaluated among F<sub>2</sub> population of the cross 541P × IRAN IX 269-4**

Cecha Trait	Ocena wzrokowa płodności Visual scoring of fertility	Osadzanie ziaren Seed set	Wysokość roślin Plant height	Długość kłosa Ear length
Liczba kłosek w kłosie Spikelets number per ear	0,15	0,13	0,50	0,73
Długość kłosa Ear length	0,04	0,01	0,52	
Wysokość roślin Plant height	0,38	0,37		
Osadzanie ziaren Seed set	0,85			

Wszystkie cztery segregujące w badanej populacji F<sub>2</sub> markery SCAR wykazywały dominujący charakter dziedziczenia, ale rozszczepienia tylko jednego spośród nich były zgodne z oczekiwaną proporcją 3:1 (tab. 4). Marker ten oznaczony jako SCP16M58 był produktem amplifikacji fragmentu DNA wprowadzonego do mieszańca przez genotyp

rośliny ojcowskiej. Pozostałe trzy markery będące produktami charakterystycznymi dla genotypu linii matecznej 541P segregowały w badanej populacji w proporcjach niezgodnych z oczekiwanymi dla cech dziedziczonych monogenicznie.

Tabela 4

**Segregacje markerów SCAR oraz ich lokalizacja na mapie sprzężeń populacji F<sub>2</sub> mieszańca 541P × IRAN IX 269-4**  
**Segregation data of SCAR markers and their localization on the linkage map of the F<sub>2</sub> population 541P × IRAN IX 269-4**

Marker Marker	Pochodzenie produktu amplifikacji Origin of amplified products	Stosunek rozszczepeń Segregation ratio	$\chi^2$ (oczekiwane rozszczepecie 3:1) (3:1 expected ratio)	Prawdo- podobieństwo Probability	Pozycja na mapie sprzężeń Position on the linkage map
SCP16M58	IRAN IX 269-4	179:74	2,4	0,1–0,3	0 cM
SCSz334L700	541P	184:90	9,0	<0,01	13 cM
SCY09d	541P	187:89	7,7	<0,01	18 cM
SCSz1139L856	541P	180:95	13,4	<0,01	24 cM

Mapa sprzężeń utworzona przez cztery użyte w pracy markery SCAR posiada całkowitą długość 24 cM i stanowi fragment długiego ramienia chromosomu 4R (tab. 4). W bezpośrednim sąsiedztwie markera SCP16M58 zidentyfikowano na skonstruowanej mapie genetycznej *locus* kontrolujący przywracanie płodności u roślin badanej populacji. Niezależnie od zastosowanej metody oceniania płodności/sterylności roślin (ocena wzrokowa i osadzanie ziaren pod izolatorami) krzywa LOD otrzymana w trakcie mapowania interwałowego wyraźnie przekraczała w pobliżu SCP16M58 poziom statystycznej istotności (tab. 5).

Tabela 5

**Wyniki mapowania *loci* kontrolujących badane cechy fenotypowe**  
**Interval mapping of analyzed phenotypic traits**

Cecha Trait	Poziom istotności <sup>1)</sup> Significance threshold <sup>1)</sup>	LOD <sub>max</sub>	VE <sup>2)</sup> (%)	Pozycja na mapie sprzężeń <sup>3)</sup> Position on the linkage map <sup>3)</sup>
Ocena wzrokowa płodności Visual scoring of fertility	3,7	30,88	83,6	2 cM
Osadzanie ziaren Seed set	6,5	10,10	20,4	0 cM
Liczba kłosek w kłosie Spikelets number per ear	2,9	0,26	0,6	24cM
Długość kłosa (cm) Ear length (cm)	2,5	0,71	2,8	24 cM
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	3,3	2,55	6,4	0 cM

<sup>1)</sup> Poziom istotności dla krzywej LOD określony na podstawie testu permutacji; Significance threshold of LOD value determined by permutation test

<sup>2)</sup> Wariancja tłumaczona efektem QTL; Variance explained by the QTL

<sup>3)</sup> Pozycja, w której krzywa LOD osiąga wartość maksymalną (LOD<sub>max</sub>); Position for the maximum level of the LOD curve (LOD<sub>max</sub>)

Stosunkowo wysoką wartość parametru LOD zaobserwowano w tym samym regionie chromosomu 4RL przy analizowaniu danych dla wysokości roślin, ale poziom

statystycznej istotności wyznaczony na podstawie testu permutacji nie został tu przekroczony. W objętym mapowaniem interwałowym obszarze genomu żyta nie stwierdzono obecności genów kontrolujących pozostałe dwie badane w doświadczeniu cechy morfologiczne (tab. 5). Wyniki testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa zasadniczo potwierdzają rezultaty uzyskane w trakcie mapowania interwałowego. Marker SCP16M58 wykazuje najsilniejszy związek z płodnością/sterylnością i spośród użytych w pracy markerów wydaje się być najbardziej przydatny do ewentualnych prac selekcyjnych. Pozostałe trzy markery są słabiej związane z cechą, ale nadal jest to związek statystycznie istotny, niezależnie od zastosowanej metody oceny płodności roślin (tab. 6).

Tabela 6

**Ocena sprzężeń markerów molekularnych z *loci* badanych cech ilościowych przy zastosowaniu nieparametrycznego testu rangowego Kruskala-Wallisa**  
**Assessment of linkage between the molecular markers and the analyzed quantitative trait *loci* using the nonparametric rank sum test of Kruskal-Wallis**

Cecha Trait	Marker <sup>1)</sup>											
	SCP16M58			SCSz334L700			SCY09d			SCSz1139L856		
	M (-)	F (+)	P	M (+)	F (-)	P	M (+)	F (-)	P	M (+)	F (-)	P
Ocena wzrokowa płodności Visual scoring of fertility	3,03	5,99	0,0001	4,96	5,63	0,05	4,95	5,65	0,05	4,91	5,67	0,05
Osadzanie ziaren (%) Seed set (%)	8,12	33,73	0,0001	24,32	31,56	0,05	24,27	31,26	0,05	23,66	32,01	0,05
Liczba kłosek w kłosie Spikelets number per ear	33,78	33,75	ns <sup>2)</sup>	34,00	33,35	ns <sup>2)</sup>	33,92	33,42	ns <sup>2)</sup>	34,01	33,30	ns <sup>2)</sup>
Długość kłosa (cm) Ear length (cm)	10,40	10,28	ns <sup>2)</sup>	10,55	9,91	ns <sup>2)</sup>	10,51	9,96	ns <sup>2)</sup>	10,54	9,94	ns <sup>2)</sup>
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	136,6	145,2	0,005	143,1	142,6	ns <sup>2)</sup>	143,0	142,6	ns <sup>2)</sup>	143,0	142,6	ns <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> M — Średnia wartość cechy u osobników posiadających allel markera pochodzący od linii matecznej (541P); Value of the trait average across individuals representing allele of a given marker originating from the maternal line (541P)  
 F — Średnia wartość cechy u osobników posiadających allel markera pochodzący od rośliny ojcowskiej (IRAN IX 269-4); Value of the trait average across individuals representing allele of a given marker originating from the paternal plant (IRAN IX 269-4)

(+) — Prążek markerowy obecny; Marker band present

(-) — Brak prążka markerowego; Marker band absent

P — Istotność różnic (prawdopodobieństwo); Significance of differences (probability)

<sup>2)</sup> ns — Różnice nieistotne statystycznie; Differences not significant

Wyniki testu Kruskala-Wallisa wskazują również na statystycznie istotne sprzężenie pomiędzy markerem SCP16M58 i *locus* warunkującym wysokość roślin. Gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4R pochodzący z prymitywnego żyta irańskiego zwiększał wysokość roślin badanej populacji średnio o około 9cm (tab. 6).

## DYSKUSJA

Na temat dziedzicznego podłoża przywracania płodności u żyta z cytoplazmą Pampa, które ma niewątpliwie złożony charakter, formułowano hipotezy zakładające działanie dwóch (Madej, 1976), trzech (Scoles i Evans, 1979) lub nawet czterech (Ruebenbauer i in., 1984) niezależnych par genów. Rozszczepienia na formy męskosterylne i płodne



obserwowane w pokoleniach  $F_2$  i  $F_3$  mieszańca między linią 541P, a rośliną IRAN IX 269-4 są zasadniczo zgodne z założeniem o działaniu genów z dwóch niezależnych *loci*, ale nie można wykluczyć, że dziedziczne uwarunkowanie przywracania męskiej płodności w analizowanym materiale jest bardziej skomplikowane. Dotychczas przeprowadzone badania z wykorzystaniem map genetycznych doprowadziły do zlokalizowania genów przywracających męską płodność w systemie CMS-P na pięciu chromosomach żyta, wśród których największe znaczenie miały *loci* z chromosomów 1RS i 4RL (Geiger i Miedaner, 1996; Miedaner i in., 2000). Ta ostatnia lokalizacja znalazła potwierdzenie w rezultatach badań użytego w niniejszej pracy mieszańca, dla którego źródłem alleli płodności była ojcowska forma IRAN IX 269-4. Mapowanie interwałowe, które wykonano w celu określenia przypuszczalnej lokalizacji genu kontrolującego płodność w badanym materiale dało zgodne rezultaty zarówno przy analizie danych z oceny wzrokowej jak i osadzania ziaren pod izolatorami. Obie metody oceny dały zresztą wyniki wysoce istotnie skorelowane ze sobą, a zaobserwowane niewielkie odstępstwa pomiędzy nimi wynikały prawdopodobnie z mniejszej dokładności obserwacji wzrokowych oraz przypuszczalnej aktywności alleli samoniezgodności pochodzących z populacji IRAN IX, które mogły uniemożliwiać zawiązywanie ziaren na drodze samozapylenia u niektórych roślin wizualnie określonych jako pyłące.

Zgodnie z założeniami sformułowanymi przez Geigera (1985) nowo tworzone komponenty ojcowskie dla odmian mieszańcowych żyta powinny posiadać cytoplazmę sterylizującą. Dzięki temu już na wczesnych etapach hodowli możliwe jest wstępne określenie, jaką przyszłe linie ojcowskie posiadają zdolność do przywracania płodności. Niestety obfite pylenie homozygotycznych komponentów ojcowskich posiadających sterylizującą cytoplazmę typu Pampa nie zawsze stanowi gwarancję skutecznego przywracania płodności u otrzymywanych z ich udziałem heterozygotycznych mieszańców. Stopień przywrócenia płodności w bardzo dużej mierze zależy bowiem od alleli sterility wprowadzanych przez komponent mateczny użyty w czasie krzyżowania (Geiger i Miedaner, 1996; Kolasińska, 2001). Trudności w znalezieniu wśród europejskich materiałów hodowlanych żyta genotypów o zadowalającej efektywności w przywracaniu płodności u roślin z cytoplazmą Pampa stały się impulsem do poszukiwań tego rodzaju form w obrębie populacji egzotycznych, pochodzących z Ameryki Południowej i Bliskiego Wschodu (Geiger i Miedaner, 1996). Zidentyfikowane w tych populacjach geny przywracające płodność charakteryzują się dużą efektywnością, wyraźnie lepszą od genów pochodzących ze źródeł o europejskich rodowodach, dotychczas stosowanych w hodowli żyta. Płodność mieszańców otrzymywanych przy wykorzystaniu restorerów o egzotycznym pochodzeniu w mniejszym stopniu zależy od genotypu linii matecznej i podlega mniejszym modyfikacjom pod wpływem działania czynników środowiskowych (Geiger i Miedaner, 1996). Niestety jednak, przynajmniej w przypadku genów pochodzących z południowoamerykańskiej populacji Pico Gentario, zaobserwowano niekorzystne sprzężenie między efektywnymi genami przywracającymi płodność pyłku, a genami wpływającymi na zwiększenie wysokości roślin (Miedaner i in., 2000). Podobny związek między genami warunkującymi wydłużenie źdźbła, a *loci* kontrolującymi płodność pręcikowia wydaje się występować w obrębie badanej w niniejszej pracy

populacji IRAN IX. Bliskie sąsiedztwo genów pożądaných w hodowli oraz *loci* warunkujących cechy niekorzystne z gospodarczego punktu widzenia stanowi dodatkowy argument za poszukiwaniem markerów molekularnych pozwalających na jak najprecyzyjniejszą selekcję pożądaných rekombinantów (Hackauf i in., 2009). Z drugiej strony za korzystne zjawisko należy uznać fakt, iż w obszarze długiego ramienia chromosomu 4R, poza genami wpływającymi na krzewienie (Börner i in., 2000) i pochodzącymi z prymitywnych form żyta genami warunkującymi wysokość roślin (Miedaner i in., 2000), zasadniczo nie wykrywano dotąd innych *loci* dla ważnych gospodarczo cech (Börner i in., 2000; Milczarski i Masojć, 2003). Wydaje się jednak, że ewentualna obecność w tym obszarze genomu żyta QTL-i o istotnym znaczeniu użytkowym zależy od genotypów wybranych do krzyżowania i powinna być każdorazowo przedmiotem oceny, szczególnie przy wykorzystywaniu w hodowli materiałów słabo zaadaptowanych do warunków współczesnego rolnictwa.

#### WNIOSKI

1. Na długim ramieniu chromosomu 4R zmapowano pochodzący z rośliny IRAN IX 269-4 *locus* silnego genu przywracającego płodność u roślin z cytoplazmą Pampa.
2. Wykazano znaczącą efektywność markera SCP16M58 przy selekcjonowaniu genotypów męskopłodnych (czterokrotnie wyższe zawiązywanie ziaren pod izolatorami), ale marker ten wykazywał jednocześnie niekorzystne sprzężenie z *locus* zwiększającym wysokość roślin u badanego mieszańca.

#### LITERATURA

- Börner A., Korzun V., Voylokov A. V., Worland A. J., Weber W. E. 2000. Genetic mapping of quantitative trait *loci* in rye (*Secale cereale* L.). Euphytica 116: 203 — 209.
- Geiger H. H. 1985. Hybrid breeding in rye. Proceedings of the EUCARPIA Meeting of the Cereal Section on Rye. Svalöv, Sweden, 11–13 June 1985: 237 — 265.
- Geiger H. H. 2007. Strategies of hybrid rye breeding. Vortr. Pflanzenzüchtg. 71: 1 — 5.
- Geiger H. H., Miedaner T. 1996. Genetic basis and phenotypic stability of male fertility restoration in rye. Vortr. Pflanzenzüchtg. 35: 27 — 38.
- Geiger H. H., Morgenstern K. 1975. Angewandt-genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. Theor. Appl. Genet. 46: 269 — 276.
- Geiger H. H., Schnell F. W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Sci. 10: 590 — 593.
- Hackauf B., Stojalowski S., Wortmann H., Wilde P., Fromme F. J., Menzel J., Korzun V., Wehling P. 2009. Minimierung des Mutterkornbefalls im Hybridroggen durch Ansätze der Präzisionszüchtung. Journal für Kulturpflanzen 61 (1): 15 — 20.
- Kolasińska I. 2001. Przywracanie płodności pyłku u mieszańców żyta CMS-Pampa × restorer. Biul. IHAR 218/219: 341 — 349.
- Łapiński M., Stojalowski S., 1996. The C-source of sterility-inducing cytoplasm in rye: Origin, identity and occurrence. International Symposium on Rye Breeding and Genetics, Stuttgart, Germany 27-29 June 1996. Vort. Pflanzenzüchtg 35: 51 — 60.
- Madej L. 1976. Charakterystyka genetyczna trzech źródeł męskiej jałowości żyta (*Secale cereale* L.). Plant Breed. Seed Sci. 20: 157 — 174.

- Miedaner T., C. Glass F., Dreyer P., Wilde H., Wortmann H., Geiger H. H. 2000. Mapping of genes for male-fertility restoration in 'Pampa' CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1226 — 1233.
- Milczarski P., Masojć P. 2003. Interval mapping of genes controlling growth of rye plants. *Plant Breed. Seed Sci.* 48: 135 — 142.
- Ruebenbauer T., Kubara-Szpunar Ł., Pająk K. 1984. Testing of a hypothesis concerning interaction of genes with mutated cytoplasm controlling male sterility of the Pampa type in rye (*Secale cereale* L.). *Genet. Pol.* 25: 1 — 16.
- Scoles G. J., Evans L. E. 1979. The genetics of fertility restoration in cytoplasmic male sterile rye. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 417 — 422.
- Stracke S., Schilling A. G., Förster J., Weiss C., Glass C., Miedaner T., Geiger H. H. 2003. Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 1184 — 1190.
- Stojałowski S. 2007. Molecular marker linkage map for localising male-fertility restorer genes in rye with CMS-C cytoplasm. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 71: 250 — 252.
- Stojałowski S., Jaciubek M., Masojć P. 2005. Rye SCAR markers for male fertility restoration in the P cytoplasm are also applicable to marker-assisted selection in the C cytoplasm. *J. Appl. Genet.* 46 (4): 371 — 373.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394 — 400.
- Van Ooijen J. W., 2004. MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- Van Ooijen, J. W., Voorrips, R. E. 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant. Res. Intern.* Wageningen, the Netherlands.