

BEATA MYŚKÓW**ANNA ŁAŃ****MONIKA HANEK**

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpływ sposobu zapylenia żyta na mapowanie QTL dla porastania przedźniwnego*

Analysis of the impact of pollination method on the results of mapping QTL for pre-harvest sprouting in rye

Mapa genetyczna populacji rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) wyprowadzonych z pokolenia F₂ mieszańca żyta S120×S76 posłużyła do identyfikacji *loci* cech ilościowych (QTL) związanych z porastaniem przedźniwnym (PHS). Mapa siedmiu chromosomów żyta o łącznej długości 962cM składała się z 1285 markerów DArT (markery molekularne wykorzystujące enzymy restrykcyjne i metodę hybrydizacji na mikropłytkach) oraz 62 *loci* uzyskanych z użyciem metody PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy). Materiałem badawczym były linie RIL pochodzące z doświadczeń polowych prowadzonych w Szczecinie, na terenie hali wegetacyjnej ZUT w latach 2007–2010. Część kłosów poszczególnych RIL izolowano, podczas gdy pozostałe pozostawiano do swobodnego przepylecia. PHS oceniano po kilkudniowym zraszaniu dojrzałych, ściętych kłosów wodą i oznaczano jako procent ziaren skielkowanych. Oceny fenotypowej dokonano na kłosach poddawanych samozapyleniu (I) w czterech latach, a w dwóch latach (2008, 2010) także na kłosach nieizolowanych (N). Celem pracy było porównanie lokalizacji QTL porastania wskazanej w wyniku oceny kłosów izolowanych i nieizolowanych. Na mapie wykryto łącznie 33 QTL przedźniwnego porastania, rozlokowane na wszystkich chromosomach. Na podstawie wyników z 2008 roku zmapowano po sześć różnych i jeden wspólny QTL dla wariantów oceny z kłosami samo- i obcozapylnymi. W 2010 roku stwierdzono obecność jednego QTL dla kłosów izolowanych, pokrywającego się z jednym z sześciu wykrytych w tym roku dla kłosów nieizolowanych. Nie stwierdzono żadnego pokrywającego się przedziału QTL w dwóch sezonach (2008 i 2010), niezależnie od typu zapłodnienia badanych roślin. Lokalizacja niektórych QTL z obu wariantów została potwierdzona na podstawie analiz z innych lat. Stwierdzono, że materiał roślinny do analizy QTL porastania przedźniwnego żyta mogą stanowić kłosy poddane obcozapyleniu, w uzupełnieniu lub zamiennie z kłosami samozapylnymi.

Słowa kluczowe: *loci* cech ilościowych (QTL), obcozapylenie, porastanie przedźniwne (PHS), samozapylenie, żyto

Rye mapping population of S120×S76 cross consisting of 143 genotypes of RIL-F₈ generation and it has been used to analyze pre-harvest sprouting. The map of seven rye chromosomes was together 962

* Praca finansowana z projektu MNiSW, NN 310 067639

cM long and contained 1285 DArT and 62 PCR markers. Plant material was grown in an experimental field of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Poland, in four years (2007–2010). PHS was measured as a percentage of germinating seeds *per* total number of seeds in the ear, after watering of mature, harvested spikes. Each RIL was represented by several self-pollinated spikes (6 for most genotypes) every season and by several open-pollinated spikes in two years (2008, 2010). The objective of the research was to determine the positions of QTL for pre-harvest sprouting on rye genetic map of RIL population using spikes of two types of pollinating and comparing them together. There were jointly 33 QTL for PHS detected, that were spread on all chromosomes. Data from 2008 based on isolated and non-isolated spikes allowed to map 12 different (six for each variant) and one coinciding QTL. There was one QTL detected with the use of isolated spikes in 2010 and it overlapped with one of six QTL revealed on the basis of non-isolated spikes in this year. Localization of some of these QTL was confirmed by QTL analysis from other seasons. There was no overlapping QTL between 2008 and 2010, regardless the method of plant pollinating. It was suggested that open-pollinated spikes could be used to study QTL for PHS equally well as the self-pollinated plants or as a complementary plant material.

Key words: open-pollination, pre-harvest sprouting (PHS), Quantitative Trait *Loci* (QTL), rye, self-pollination

WSTĘP

Według szacunkowej oceny straty plonu zbóż spowodowane porastaniem przedźniwnym (PHS) sięgają w Polsce średnio 5–10% ogólnej produkcji, jednak w niektórych latach, kiedy pogoda jest wyraźnie niekorzystna mogą przybrać rozmiary klęski (Czarnecki i in., 2007). Uzyskanie odmian odpornych na kiełkowanie ziaren w kłosach jest jednym z głównych kierunków w programach hodowli żyta. Podatność na porastanie zależy od wielu różnych cech, z których część warunkowana jest genotypem rośliny matecznej — morfologia kłosa, struktura i skład okrywy owocowo-nasiennej (King i Wettstein-Knowles, 2000), a część genotypem rośliny potomnej — procesy metaboliczne zachodzące w zarodku (Suzuki i in., 2000).

Dotychczasowe prace zmierzające do poznania genetycznego podłoża PHS u żyta dotyczyły głównie lokalizacji na mapach genetycznych *loci* cech ilościowych (QTL) kontrolujących tę cechę. Materiał do badań stanowiły trzy mieszańce międzyliniowe; wszystkie analizy wykonywano w oparciu o ocenę kłosów poddawanych samozapyleniu (Myśków i in., 2004; Masojć i Milczarski, 2005; Twardowska i in., 2005; Masojć i in., 2007; Masojć i in., 2009; Masojć i Milczarski, 2009; Myśków i in., 2010). Izolowanie kłosów przed kwitnieniem zapewnia znajomość genotypów wszystkich tkanek ziarniaka podnosząc precyzję badań genetycznych. Jednak w komercyjnej hodowli żyta ocena odporności na porastanie u rodów i odmian jest wykonywana na kłosach pochodzących ze swobodnego przepylecia i wyniki takiej oceny w sposób zadowalający charakteryzują materiały hodowlane. Niniejsza praca miała za zadanie sprawdzenie czy izolowanie kłosów objętych fenotypowaniem jest niezbędne w badaniach nad genetycznym podłożem PHS. W tym celu wykorzystano populację RIL żyta, mieszańca S120×S76, która posłużyła do identyfikacji QTL badanej cechy na mapie genetycznej tej populacji. Do oceny PHS używane były kłosy poddane samozapyleniu i równocześnie część kłosów nieizolowanych. Uzyskane w ten sposób dane zastosowano do lokalizacji QTL.

W badaniach z zastosowaniem materiałów roślinnych o zaawansowanym poziomie chowu wsobnego analizowane genotypy w obrębie pojedynczej linii są identyczne lub prawie identyczne. Dopuszczenie do obcozapylenia linii wsobnych sprawia, że genotyp rośliny potomnej różni się od matecznej. Ponieważ PHS w dużej mierze jest uzależnione od cech morfologicznych, to wpływ obcozapylenia na zmianę wyników oceny porostania w obrębie poszczególnych linii, dotyczy może tylko procesów warunkowanych przez geny zarodka, bo morfologia rośliny matecznej, poddawanej ocenie nie ulega zmianie. Spodziewanym wynikiem jest więc wykrycie przynajmniej części QTL (tych związanych z cechami morfologicznymi kłosa lub całej rośliny) wspólnych dla obu grup kłosów.

Celem pracy było porównanie lokalizacji QTL porostania przedźniwnego wskazanej w wyniku oceny kłosów izolowanych i nieizolowanych oraz stwierdzenie czy wyniki uzyskane z użyciem do analizy QTL kłosów linii wsobnych ulegających swobodnemu przepyleciu są porównywalne z wynikami otrzymywanymi przy wykorzystaniu roślin samozapylanych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny stanowiły 143 RIL wyprowadzone z pokolenia F_2 mieszańca żyta S120×S76. Linie rodzicielskie różniły się istotnie pod względem wrażliwości na porostanie. Każdy RIL był potomstwem pojedynczej rośliny pokolenia F_2 . Ocnom fenotypowym poddawano rośliny pokoleń S_6 – S_9 , pochodzące z doświadczeń polowych prowadzonych w Szczecinie, na terenie hali wegetacyjnej ZUT w latach 2007–2010. PHS oceniano po kilkudniowym zraszaniu dojrzałych, ściętych kłosów wodą i oznaczano jako procent ziaren skiełkowanych. Dla każdego RIL pobierano kilka-kilkanaście kłosów i wyliczano średnią wartość PHS. Oceny fenotypowej dokonano na kłosach poddawanych samozapyleniu (I), a w dwóch latach także na kłosach pozostawionych do swobodnego przepylecia (N). Wartości średnie z obu wariantów (I i N) w danym sezonie oznaczano symbolem tego roku (2008, 2010). Liczebności przebadanych kłosów przedstawiono w tabeli 1. W roku 2009 doświadczenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach oceniając tylko kłosy izolowane (2009I-1, 2009I-2), a identyfikację QTL przeprowadzono w oparciu o wyniki średnie z obu powtórzeń (2009I).

Rozkład wartości cechy w poszczególnych powtórzeniach i korelacja między różnymi wariantami ocen fenotypowych oceniane były przy użyciu wersji 9,0 pakietu Statistica (<http://www.statsoft.com>). Do ustalenia zgodności z rozkładem normalnym wykorzystano test Kołmogorowa-Smirnowa. Analizie poddawano średnie wartości porostania poszczególnych RIL.

Do identyfikacji *loci* cech ilościowych (QTL) związanych z PHS posłużyła mapa genetyczna populacji RIL (Mysków, 2012) o łącznej długości 962cM. Mapa składała się z 1285 markerów DArT oraz 62 markerów uzyskanych z użyciem metody PCR a średnia odległość między *loci* wynosiła 0,714cM.

Tabela 1

Liczebności kłosów wykorzystanych do oceny porastania przedźniwnego w populacji mapującej typu RIL u żyta (mieszaniec S120×S76)
Number of spikes used to evaluate the pre-harvest sprouting in a RIL mapping population of rye (cross S120×S76)

Sposób zapylenia roślin Method of plant pollination	Rok Year	Liczba RIL poddanych ocenie Number of analyzed RILs	Liczba kłosów ocenionych w całej populacji mapującej Number of spikes examined in mapping population	Liczba kłosów ocenionych w poszczególnych RIL Number of spikes examined in every RIL
Samozapylenie Self-pollination (I)	2007	65	128	2
	2008	133	704	6
	2009	143	1486	12 (6+6)
	2010	134	725	6
Obcozapylenie Open-pollination (N)	2008	142	710	5
	2010	123	734	6

Analiza QTL przeprowadzona została przy użyciu wersji 2.51 programu Windows QTL Cartographer (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>, Wang i in., 2007), z zastosowaniem metody CIM (composite interval mapping) (Zeng, 1994) i testu permutacji (Doerge i Churchill, 1996). Do ustalenia poziomu LOD istotnego dla każdego wariantu danych wykonywano 1000 permutacji, przy $p = 0,05$. Wyznaczony poziom LOD mieścił się w zakresie 2,0-2,4; najczęściej przyjmował wartość 2,2.

WYNIKI

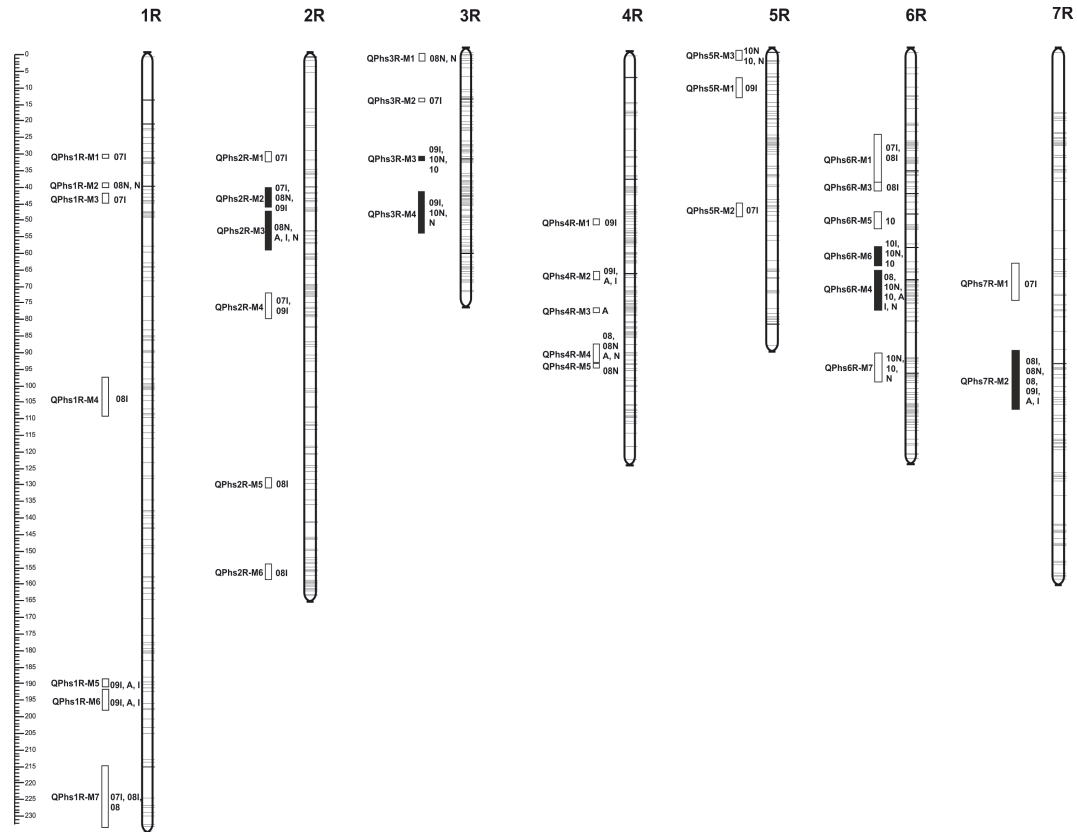
Linie rodzicielskie badanego mieszańca różnią się istotnie średnimi wartościami porastania: S120 – 68,1% ($\pm 1,3$), S76 – 25,6% ($\pm 1,3$). Zakres zmienności cechy w populacji mapującej RIL wahał się od 0% do 100%, a średnie wartości w różnych latach wynosiły 28%-49%. Większość wariantów oceny PHS (poza dwoma: 2008I, 2008), charakteryzowało się rozkładem wartości nie odbiegającym istotnie od rozkładu normalnego.

Na mapie zlokalizowanych jest łącznie 33 QTL (te same przedziały zidentyfikowane w kilku powtórzeniach traktowano jako jeden QTL). Analiza QTL z wykorzystaniem danych z roku 2008 wykazała obecność sześciu QTL charakterystycznych tylko dla wariantu z kłosami izolowanymi (I) i tyle samo dla wariantu z kłosami nieizolowanymi (N). Wykryto ponadto jeden region wspólny dla obu wariantów. Jeden z QTL dla N potwierdzony został w analizach z innych lat (2007, 2009), a kolejne dwa wykazane zostały również przy użyciu danych uśrednionych dla wszystkich sezonów i wariantów (rys. 1).

Analiza z użyciem wyników oceny porastania z 2010 roku pozwoliła na wykrycie jednego QTL dla wariantu z kłosami izolowanymi, pokrywającego się z regionem dla wariantu z kłosami nieizolowanymi. Wyniki oceny PHS na kłosach z roślin obcozaplodzonych pozwoliły dodatkowo wykryć pięć QTL, z których dwa były potwierdzeniem analiz z 2009 roku dla wariantu kłosów izolowanych, a kolejny QTL został potwierdzony w wyniku analizy przeprowadzonej na podstawie wartości średnich (rys. 1).

Korelacja między wariantem I i N w roku 2008 wyniosła 0,66; w roku 2010 osiągnęła wartość 0,62, a między wariantami I i N wyliczonymi jako średnie wartości ze wszystkich

lat była równa 0,78. Wszystkie wymienione wartości były istotne statystycznie. Dla porównania, korelacja między dwoma powtórzeniami doświadczenia z roku 2009 wyliczona na podstawie oceny kłosów izolowanych była również istotna statystycznie, ale wyraźnie niższa od wyżej podanych - wynosiła 0,43.



Rys. 1. Mapa genetyczna populacji RIL mieszańca żyta S120×S76, z QTL kontrolującymi PHS, wykrytymi na podstawie ocen z lat 2007–2010 kłosów izolowanych (07I–10I), nieizolowanych (08N, 10N), oraz wartości średnich ogółem (A), średnich z obu wariantów dla lat (08, 10) lub średnich z lat dla każdego z wariantów (I, N). Liczby 07–10 oznaczają rok doświadczenia. Czarne prostokąty oznaczają QTL wykryte na podstawie oceny kłosów nieizolowanych oraz izolowanych
Fig. 1. Genetic map of rye (RIL population of hybrid S120×S76), with QTL controlling PHS, detected based on assessments of isolated spikes from the years 2007 to 2010 (07I–10I), non-isolated spikes (08N, 10N), and mean values of total (A), mean from both variants for years (08, 10) or the average of the years for each of the variants (I, N). Numbers 07–10 indicate the year of experiment. Black rectangles indicate QTL common for non-isolated- and isolated spikes

Wszystkie wartości korelacji dla doświadczeń z kłosami izolowanymi poddanymi ocenie w różnych latach były niższe od tych wyliczonych między wariantami I-N i wahały się w przedziale od 0,24 do 0,60. Niższy wynik (0,54) osiągnął też współczynnik korelacji dla wariantów z kłosami nieizolowanymi z lat 2008 i 2010 (tab. 2).

Tabela 2

Korelacje wartości porastania populacji RIL między różnymi wariantami doświadczenia (symbole liczbowe oznaczają rok doświadczenia, litera I oznacza kłosy samozapylane, N — kłosy obcozapylane, brak I lub N oznacza średnie z obu wariantów). Współczynniki korelacji są istotne przy $p < 0,05$
Correlations of pre-harvest sprouting value in RIL population between the different variants of the experiment (numbers mean the year, letter I—self-pollinated ears, N — open-pollinated ears, lack of the letter — average values). The correlation coefficients are significant with $P < 0.05$

08	08I	08N	09I	09I-1	09I-2	10	10I	10N	07-10	07-10I	07-10N	
0,44	0,39	0,43	0,50	0,47	0,37	0,30	0,24	0,34	0,52	0,54	0,42	07I
	0,89	0,92	0,72	0,54	0,66	0,54	0,48	0,52	0,87	0,84	0,80	08
		0,66	0,60	0,44	0,58	0,45	0,40	0,44	0,75	0,77	0,61	08I
			0,70	0,50	0,66	0,54	0,45	0,54	0,84	0,76	0,88	08N
				0,82	0,86	0,61	0,55	0,55	0,89	0,92	0,71	09I
					0,43	0,46	0,43	0,43	0,70	0,74	0,53	09I-1
						0,55	0,48	0,49	0,79	0,81	0,65	09I-2
							0,92	0,89	0,83	0,77	0,79	10
								0,62	0,74	0,75	0,59	10I
									0,78	0,65	0,90	10N
										0,97	0,90	07-10
											0,78	07-10I

DYSKUSJA

Analiza QTL porastania na mapie mieszańca S120×S76 pozwoliła na wykrycie 33 QTL (Myśków i in., 2011; Myśków, 2012). Analiza z wykorzystaniem danych dla wariantów z kłosami izolowanymi nie wykazała pełnej zgodności z wynikami oceny wariantów z kłosami nieizolowanymi.

W przypadku analizy QTL możliwe są dwa podstawowe rodzaje błędów. Błąd I typu, kiedy QTL nie istnieje, ale mimo to jego (rzekoma) obecność zostaje wykazana i błąd II typu, kiedy QTL jest obecny w genomie, ale nie zostaje wykryty (Doerge i Churchill, 1996). Wykluczając zmienność wynikającą z wpływu środowiska, różnice między lokalizacją QTL wykrywanych w tym samym materiale sugerują obecność któregoś z wymienionych rodzajów błędów. Pozostaje do ustalenia, z którym błędem mamy do czynienia i jaka jest jego przyczyna.

W badaniach PHS powszechnie przyjęto stosowanie oceny kłosów poddanych samozapyleniu (Myśków i in., 2004; Masojć i Milczarski, 2005; Twardowska i in., 2005; Masojć i in., 2007; Masojć i in., 2009; Masojć i Milczarski, 2009; Myśków i in., 2010). Zaobserwowane w prezentowanych badaniach rozbieżności wyników uzyskanych po ocenie kłosów izolowanych i nieizolowanych mogłyby więc sugerować, że ocena roślin pozostawionych do swobodnego zapylenia może być głównym źródłem wyżej wspomnianych dwóch rodzajów błędów. Jednak poza obszarami wspólnymi dla N i I w poszczególnych sezonach, na podstawie N identyfikowane były takie QTL, które potwierdzały wyniki analiz z innych lat oraz wyniki uzyskane przy użyciu danych uśrednionych ze wszystkich sezonów i wariantów. To wskazuje na niewykrywanie pewnych QTL na podstawie badania kłosów izolowanych (błąd II typu) i świadczy o tym, że ocena kłosów nieizolowanych może stanowić uzupełnienie lub nawet może w

niektórych przypadkach zastąpić ogólnie przyjętą metodę przygotowania materiału roślinnego do oceny PHS, przez doprowadzanie do samozapłodnienia roślin.

Trudno wskazać jakąkolwiek regułę, określającą przyczyny powtarzalności QTL lub jej braku. Uzyskane wyniki nie pozwalają stwierdzić, czy odrębne regiony QTL wykryte z użyciem I lub N są rezultatem identyfikowania grup genów kontrolujących cechy wpływające na PHS w odmienny sposób (np. cechy morfologiczne lub biochemiczne). Pojawianie się pojedynczych QTL charakterystycznych tylko dla jednego ze sposobów zapłodnienia roślin może być wynikiem błędów I typu i dotyczyć może zarówno QTL identyfikowanych przy użyciu N jak też I.

Prawdopodobnie na różnice w lokalizacji QTL, poza warunkami środowiska i zmiennością genotypową istotny wpływ może mieć liczebność prób wykorzystanych do badań. O wpływie liczebności prób na wyniki świadczą wartości współczynników korelacji — najniższe stwierdzano dla porównań z danymi z roku 2007 (najmniejsze liczebności prób), najwyższe zaś dla zestawień z średnimi z 2009 roku (najliczniejsze próby). W pracy Mysków (2012) wykazano, że wielkość minimalna próby niezbędna do przeprowadzenia precyzyjnej oceny porostania przedźniwnego ustalona z uwzględnieniem wariancji wyliczonej dla czterech linii wsobnych żyta, przy dopuszczalnym błędzie równym 10% wynosiła 5–13 kłosów, w zależności od badanej linii.

Pracochłonny sposób analizy PHS w całej populacji mapującej sprawia, że trudno jest spełnić kryterium wymaganej liczebności próby, o czym świadczą metodyki badań wielu różnych zespołów, zakładające użycie do analiz porostania stosunkowo niewielkiej liczby kłosów. Zespół z Chin (Ren i in., 2008) analizując populacje F_2 i RIL pszenicy poddawał ocenie 3 kłosy, Liu i współautorzy (2008) badali po 5 kłosów każdej rekombinacyjnej linii wsobnej pszenicy, a w badaniach Masojca i współautorów (2007) oceniano po 3 kłosy poszczególnych linii RIL żyta. W prezentowanych badaniach dla większości wariantów doświadczenia oceny PHS dokonywano na 6 kłosach. Mimo liczniejszej reprezentacji prób w porównaniu z innymi badaniami, nadal nie uzyskiwano gwarancji miarodajnej oceny każdej z RIL, wobec wymaganej minimalnej liczebności wynoszącej w niektórych przypadkach nawet 13 kłosów (Mysków, 2012). Mniejsza dokładność oceny cechy mogła stanowić źródło mniejszej precyzji w lokalizacji QTL i prowadzić do pojawienia się przypadkowych różnic między wynikami uzyskanymi dla I oraz N.

Interesujące wydają się wyniki porównania ocen fenotypowych porostania z różnych lat i wariantów doświadczeń wykonane dla populacji mapującej $S120 \times S76$. Korelacja między wariantami I-N w obu latach badań była wyższa od korelacji dla wariantów I-I lub N-N z różnych lat. Wartości te były wyższe nawet od zależności między dwoma powtórzeniami doświadczenia prowadzonymi w tym samym roku dla kłosów wyłącznie izolowanych. To wskazywałoby, że sposób zapylenia roślin w stopniu nie większym niż inne czynniki środowiska wpływa na ocenę porostania.

Porównanie regionów zawierających *loci* kontrolujące PHS, mimo widocznych różnic, nie pozwala na stwierdzenie, że obcozapłodnienie wpływa istotnie na zmianę wyników analizy QTL. Stwierdzono bowiem jednakową liczbę regionów zawierających *loci* kontrolujące PHS (I) wspólnych dla różnych lat badań oraz wspólnych dla 2 wariantów (N i I). QTL o lokalizacji wykazanej tylko w jednym sezonie, niezależnie od typu zapylenia

roślin poddawanych ocenie fenotypowej, mogą być wynikiem współdziałania genotypów z warunkami środowiska chociaż nie można też wykluczyć, że niektóre z nich są rezultatem trudnych do uniknięcia błędów w analizie QTL.

Mimo, że wyniki analiz QTL z użyciem do badań materiałów przygotowanych według dwóch wariantów zapłodnienia nie pokrywają się w pełni, nie można potraktować oceny N jako dającej nieprawidłowe wyniki. Prawdopodobnie zwiększenie powtarzalności QTL kontrolujących porastanie przedzienne żyta w różnych latach można byłoby uzyskać przez zwiększenie liczby prób badanych, co niestety wiązałoby się z wydłużeniem czasochłonnego procesu oceny fenotypowej. Prezentowane wyniki sugerują jednak, że w zamian za to można byłoby uprościć jeden z etapów prac polowych przygotowania materiału do oceny PHS, unikając zakładania izolatorów i wykorzystując do badań kłosa ulegające swobodnemu zapyleniu. Jako wiarygodne QTL należałoby wówczas traktować te, które wykrywane są w różnych środowiskach i sezonach wegetacyjnych, ale to podejście jest właściwe także w przypadku badania roślin poddawanych chowowi wsobnemu.

LITERATURA

- Czarnocki S., Starczewski J., Garwacka A. 2007. Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na skłonność do porastania ziarna pszenicy jarej. *Acta Agrophysica* 10 (3): 533 — 541.
- Doerge R.W., Churchill G. A. 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142: 285 — 294.
- King R. W., von Wettstein-Knowles P. 2000. Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat. *Euphytica* 112: 157 — 166.
- Liu S., Cai S., Graybosch R. A., Chen C. , Bai G. 2008. Quantitative trait *loci* for resistance to pre-harvest sprouting in US hard white winter wheat Rio Blanco. *Theor. Appl. Genet.* 117 (5): 691 — 699.
- Masojć P., Milczarski P. 2005. Mapping QTLs for alpha-amylase activity in rye grain. *J. Appl. Genet.* 46: 115 — 123.
- Masojć P., Milczarski P. 2009. Relationship between QTLs for preharvest sprouting and alpha-amylase activity in rye grain. *Mol Breeding* 23: 75 — 84.
- Masojć P., Banek-Tabor A., Milczarski P., Twardowska M (2007) QTLs for resistance to preharvest sprouting in rye (*Secale cereale* L.). *J. Appl. Genet.* 48: 211 — 217.
- Masojć P., Lebiecka K., Milczarski P., Wiśniewska M., Łań A., Owsianicki R. 2009. Three classes of *loci* controlling preharvest sprouting of rye (*Secale cereale* L.) discerned by means of bidirectional selective genotyping (BSG). *Euphytica* 170: 123 — 129.
- Myśków B., Stojałowski S., Milczarski P., Masojć P. 2004. Wykorzystanie mapy sprzężeń markerów RAPD do identyfikacji genów odporności na porastanie u żyta (*Secale cereale* L.). *Annales UMCS Sec. E.* 59 (3): 1289 — 1296.
- Myśków B., Stojałowski S., Milczarski P., Masojć P. 2010. Mapping of sequence specific markers and loci controlling pre-harvest sprouting and alpha-amylase activity on the genetic map of F₂ (S120×S76) rye (*Secale cereale* L.) population. *J. Appl. Genet.* 51 (3): 283 — 287.
- Myśków B. 2012. Identyfikacja *loci* cech ilościowych (QTL) kontrolujących wczesność i podatność na porastanie u żyta (*Secale cereale* L.) z wykorzystaniem zagęszczonych map genetycznych populacji rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL). Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, ISBN 978-83-7663-103-5.
- Myśków B., Stojałowski S., Łań A., Bolibok-Braęoszewska H., Rakoczy-Trojanowska M., Kilian A. 2011. Detection of the QTL for α -amylase activity on high-density genetic map of rye and comparing their localization to loci controlling preharvest sprouting and earliness. *Molecular Breeding*, DOI: 10.1007/s11032-011-9627-1.

- Ren X.-B., Lan X. J., Liu D.-C., Wang J.-L., Zheng Y.-L. 2008. Mapping QTLs for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 2D in a synthetic hexaploid wheat×common wheat cross. *J. Appl. Genet.* 49 (4): 333 — 341.
- Suzuki T., Matsuura T., Kawakami N., Noda K. 2000. Accumulation and leakage of abscisic acid during embryo development and seed dormancy in wheat. *Plant Growth Regul.* 30: 253 — 260.
- Twardowska M., Masojć P., Milczarski P. 2005. Pyramiding genes affecting sprouting resistance in rye by means of marker assisted selection. *Euphytica* 143: 257 — 260.
- Wang S., Basten C. J., Zeng Z.-B. 2007. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Zeng Z.-B. 1994. Precision mapping of quantitative trait *loci*. *Genetics* 136: 1457 — 1468.