



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Mgr inż. Monika Żurek

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Interakcja genów jądrowych linii wsobnych kukurydzy (*Zea mays* L.) z cytoplazmami  
indukującymi męską sterylność.**

*Interaction of maize (*Zea mays* L.) inbred lines nuclear genes with male sterility inducing cytoplasm*

Promotor: Prof. Dr hab. Józef Adamczyk  
Hodowla Roślin Smolice Sp. z o. o., Grupa IHAR

Promotor pomocniczy: Dr inż. Roman Warzecha  
Zakład Biologii Stosowanej  
(dawniej Zakład Genetyki i Hodowli Roślin)  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Recenzenci:

dr hab. inż. Renata Galek  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;  
Wydział Przyrodniczo-Technologiczny;  
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

prof. dr hab. Piotr Masojć  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie;  
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa;  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin;

Radzików, 2022

## WSTĘP I CEL PRACY

Cytoplazmatyczno-genowa męska sterylność (CGMS) jest zjawiskiem szeroko występującym w świecie roślin oraz powszechnie wykorzystywanym w hodowli wielu gatunków roślin uprawnych (Majewska-Sawka i Sadoch, 2003). Rośliny posiadające ten typ sterylności są niezdolne do produkcji pyłku, bądź produkowany pyłek jest niepłodny (Edwardson, 1962; Levings, 1993). Z punktu widzenia hodowli jest to bardzo pożądane zjawisko pozwalające na uniknięcie samozapylenia w liniach matecznych (Hassan, 2015). Z uwagi na wyeliminowanie czasochłonnego i kosztownego procesu kastrowania roślin linii matecznych, męskosterylne linie są obiektem zainteresowania w procesie produkcji nasiennej odmian mieszańcowych wielu gatunków roślin, w tym kukurydzy. Hodowla odmian mieszańcowych z wykorzystaniem linii męskosterylnych wymaga wytworzenia stabilnych w różnych środowiskach, sterylnych linii matecznych oraz odpowiednich linii ojcowskich posiadających geny przywracania płodności pyłku (restoracji). Transformacja ta jest możliwa jedynie w przypadku poznania reakcji konkretnych linii na poszczególne typy cytoplazm męskosterylnych. W kukurydzy wyróżniamy trzy główne typy cytoplazm męskosterylnych: cms-T (Texas), cms-S (USDA) oraz cms-C (Charrua).

W przypadku kukurydzy męska sterylność warunkowana jest mutacjami mitochondrialnego DNA, które powodują zaburzenia produkcji pyłku przez roślinę. W cytoplazmie T oraz C występuje męska sterylność typu sporofitycznego - w wyniku załamania się komórek tapetum, uniemożliwiona bądź zaburzona, jest produkcja pyłku (Warmke i Lee, 1977). Cytoplazma S charakteryzuje się gametofitycznym typem sterylności - produkowany pyłek jest nieżywotny (Hanson i Bentolia, 2004). Przywracanie płodności pyłku w roślinach posiadających sterylną cytoplazmę (tzw. restoracja) jest możliwe przy udziale genów jądrowych (genów *Rf* = *restorer of fertility*). Przywracanie płodności pyłku jest procesem złożonym, często uwarunkowanym obecnością kilku współdziałających genów *Rf*, a także w dużej mierze zależnym od warunków środowiska. Złożoność procesu restoracji związana jest z rzadkim występowaniem genów *Rf* w puli genowej, a także ze współdziałaniem wielu komplementarnych genów, które w przypadku braku głównego genu *Rf*, częściowo przywracają płodność (Kohls i in.; Slischnik i in., 2011). Doniesienia literaturowe sugerują, iż zarówno cecha męskiej sterylności, jak i przywracanie płodności pyłku, są uzależnione od wpływu czynników środowiskowych (Duvick, 1965; Weider i in., 2009). W ostatnich latach, z uwagi na problematykę koegzystencji upraw roślin genetycznie zmodyfikowanych i konwencjonalnych, badania nad systemem CGMS w kukurydzy zyskały również dodatkowy aspekt. Zastosowanie w materiale siewnym roślin płodnych (niezmodyfikowanych genetycznie) oraz roślin męskosterylnych (zmodyfikowanych genetycznie) pozwala na ograniczenie rozprzestrzeniania się pyłku kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie, bez konieczności rezygnacji z pozytywnych aspektów modyfikacji genetycznych (np. odporności na szkodniki) (Feil i in., 2003; Bückmann i in., 2017). Obecnie badania nad męską sterylnością w kukurydzy koncentrują się głównie na poznaniu czynników wpływających na stabilność tej cechy oraz ulepszeniu metod molekularnych pozwalających na identyfikację genów *Rf*.

Pierwsze polskie prace badawczo-hodowlane nad zjawiskiem męskiej sterylności oraz liniami przywracającymi płodność u kukurydzy podjęto w 1956 r. w Smolicach (Królikowski, 1963). Koncentrowały się one głównie na poszukiwaniu źródeł męskiej sterylności oraz źródeł

genów przywracających płodność w krajowych oraz zagranicznych materiałach hodowlanych. Epidemia Southern Corn Leaf Blight, która w latach 70. ubiegłego wieku, zdziesiątkowała plantacje nasienne odmian kukurydzy z cytoplazmą T w USA, spowodowała porzucenie prac nad wdrożeniem systemu CMS do krajowych programów hodowlanych. Poniższa praca stanowi próbę ponownego podjęcia tematyki związanej z możliwością wykorzystania cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterility w krajowych programach hodowli odmian mieszańcowych kukurydzy.

Celem pracy jest zbadanie interakcji genów jądrowych wybranych linii wsobnych kukurydzy z cytoplazmami cms-C i cms-T indukującymi męską sterility w kukurydzy. Ponadto zostanie określony wpływ cytoplazmy męskosterylnej na plonowanie oraz cechy agronomiczne mieszańców  $F_1$  kukurydzy.

Hipoteza badawcza I: Linie wsobne kukurydzy wykazują zróżnicowaną interakcję genów jądrowych z cytoplazmami sterylizującymi C i T. Zróżnicowanie to wynika z obecności różnych genów przywracających płodność (w stopniu całkowitym bądź częściowym) lub dopełniających sterility w puli genowej kukurydzy.

Hipoteza badawcza II: Typ cytoplazmy wpływa na plonowanie, cechy agronomiczne oraz skład chemiczny ziarna pokolenia  $F_1$ . Wpływ ten warunkowany jest dziedziczeniem cytoplazmy przez potomstwo.

## MATERIAŁ I METODYKA BADAWCZA

### Określenie interakcji genów jądrowych linii wsobnych z cytoplazmami sterylnymi C i T

Materiał badawczy stanowiło łącznie 57 linii, w tym:

- 37 linii wsobnych pozyskanych z Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o,
- 18 linii wsobnych z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o, Grupa IHAR,
- 1 linia z zasobów Pracowni Kukurydzy i Pszenżyta IHAR-PIB,
- 1 historyczna linia pochodząca z HR Smolice, obecnie znajdująca się w zasobach Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie

Linie dobrano tak, aby reprezentowały zróżnicowane pochodzenie (grupy heterogeniczne). 39 linii charakteryzowało się ziarnem typu dent, 10 linii posiadało ziarno typu flint, 8 linii reprezentowało typy pośrednie (2 linie typu semiflint, 6 linii typu semident). Jako źródła cytoplazm sterylnych C i T wykorzystano linie Tc 208-cms C oraz Tc 208-cms-T, otrzymane z Agricultural Research and Development Station (ARDS) w Turdzie (Rumunia).

W 2012 roku w wyniku krzyżowania badanych linii wsobnych ze źródłami cytoplazm męskosterylnych Tc 208-cms C oraz Tc 208-cms-T wytworzone zostały potomstwa  $F_1$ . Krzyżowanie źródeł cytoplazm sterylnych z liniami wsobnymi prowadzono ręcznie, nanosząc pyłek na wcześniej zaizolowane znamiona. Kontrolowano również męską sterility źródeł cytoplazm C i T.

W wytworzonych potomstwach oraz w kolejnych pokoleniach uzyskanych w wyniku krzyżowań wstecznych ( $BC_1$ ,  $BC_2$  i  $BC_3$ ) określona została interakcja pomiędzy genami

jądroвыми a cytoplazmą, na podstawie wizualnej oceny jakości oraz ilości pylników według skali opracowanej przez Kohls i in., (2011).

W celu kwantyfikacji ilości wyrzucanych pylników zastosowano następującą skalę (Kohls i in., 2011):

- 1 - ponad 75% pylników na wierzchu,
- 2 - 50-75% pylników na wierzchu,
- 3 - 25-50% pylników na wierzchu,
- 4 - 5-25% pylników na wierzchu,
- 5 - 0-5% pylników na wierzchu,
- 6 - brak wyrzutu pylników.

W pracy zastosowano następującą skalę wizualnej oceny jakości pylników:

- 1 (a) - normalne, pełne pyłku, pękające pylniki,
- 2 (b) - pojedyncze pomarszczone pylniki, pełna produkcja pyłku,
- 3 (c) - dużo pomarszczonych pylników, zredukowana produkcja pyłku,
- 4 (d) - tylko pomarszczone pylniki, pyłek produkowany w minimalnej ilości,
- 5 (e) - puste pylniki, brak pyłku,
- 6 (f) - brak pylników.

Nasiona uzyskane w wyniku krzyżowań źródeł cytoplazm T i C z wybranymi liniami wsobnymi, wykorzystano do założenia szkółki polowej, na której prowadzono obserwacje. Szkołka polowa została założona na polu IHAR-PIB w Radzikowie (woj. mazowieckie). Obserwacje dotyczące jakości oraz ilości pylników oraz terminu kwitnienia prowadzono codziennie, w godzinach przedpołudniowych, przez okres dwóch tygodni. Początkiem obserwacji był dzień rozpoczęcia kwitnienia wiech w najwcześniejszym obiekcie, końcem obserwacji był dzień zakończenia pylenia przez najpóźniejszy obiekt. Obserwacje prowadzono na 25 roślinach/badany obiekt.

Ostateczna ocena odzwierciedlała średnie wyniki oceny jakości pylników oraz ostatnią ocenę ich ilości. W badanych pokoleniach określono również interwał (w dniach) pomiędzy pyleniem wiech a kwitnieniem kwiatostanów żeńskich (ASI = *anthesis-silking interval*). W przypadku gdy wiechy zaczynały kwitnąć przed znamionami ASI = 0. Na podstawie wyników wizualnej oceny ilości i jakości pylników oraz wartości bezwzględnej ASI, obliczono wartość indeksu restoracji, co pozwoliło sklasyfikować badane linie według stopnia przywracania płodności. Przyjmując zasadę, iż im wyższa wartość indeksu restoracji, tym niższy poziom przywracania płodności, wyróżniono trzy grupy linii:

- *linie przywracające męską płodność danej cytoplazmie sterylnej w stopniu całkowitym*: jakość pylników 1-2; ilość pylników 1-2; wiechy zaczynają pylenie przed kwitnieniem znamion, w tym samym czasie (ASI = 0) lub do 4 dni po (ASI = 4); Indeks restoracji = 2-8.

- *linie przywracające męską płodność w stopniu częściowym*: jakość pylników 3-4; ilość pylników 3-4; pylenie wiech i znamion rozmija się w czasie powyżej 4 dni; Indeks restoracji > 8.

- *linie dopełniające sterylność (nieprzywracające płodności)*: jakość pylników: 5/6, ilość pylników: 5/6; indeks restoracji: brak

#### Określenie wpływu cytoplazmy na cechy agronomiczne i skład ziarna mieszańców

W celu określenia wpływu cytoplazmy na cechy agronomiczne oraz skład ziarna pokolenia  $F_1$  wykorzystano pokolenie  $F_1$  uzyskane na drodze krzyżowania następujących komponentów:

- jako formy mateczne: 3 formy z cytoplazmą T oraz 3 analogiczne formy z cytoplazmą normalną (N). Wszystkie formy mateczne zostały pozyskane z Hodowli Roślin Smolice.
- jako formy ojcowskie: linii wsobnych SR10 oraz K154, których właściwości restorujące względem cytoplazmy T zostały zidentyfikowane w czasie realizacji badań, oraz 4 linii wsobnych będących restorerami dla cytoplazmy T (TC109A, TD288Tu, TD263, TE 229), pozyskanych z ARDS Turda.

W 2016 roku w oparciu o męskosterylne komponenty mateczne, ich płodne analogi, a także linie wsobne przywracające płodność pyłku cytoplazmie T zostało wytworzone pokolenie  $F_1$ . W latach 2017 - 2018 z wytworzonymi mieszańcami  $F_1$  zostały założone w Radzikowie (woj. mazowieckie) doświadczenia polowe, w których oceniony został wpływ cytoplazmy sterylizującej pyłek na plonowanie. W badanych mieszańcach wykonano obserwacje dotyczące jakości oraz ilości wyrzucanych pylników, a także określono interwał pomiędzy kwitnieniem wiech i znamion (ASI). Ponadto, w czasie sezonu wegetacyjnego określone zostały następujące cechy agronomiczne: termin kwitnienia wiech i znamion, porażenie przez głównię guzowatą i fuzariozę kolb, wysokość osadzenia kolby (cm), wysokość rośliny razem z wiechą (cm), wyleganie. Po zbiorze określone zostały następujące parametry: plon ziarna przy 15% H<sub>2</sub>O (t/ha), masa tysiąca ziarniaków (g), masa hektolitra (kg/Hl). Ponadto określony został skład chemiczny ziarna: zawartość białka, skrobi, tłuszczu.

Doświadczenia prowadzono w układzie bloków losowanych. Poletka doświadczalne były 2-rzędowe, o powierzchni 7,5 m<sup>2</sup> (1,5 m x 5 m). Nasiona wysiano co 15,5 cm w rzędzie. Odstęp między rzędami wynosił 75 cm. Każdy obiekt wysiany został w 3 powtórzeniach. W czasie sezonu wegetacyjnego przeprowadzono obserwację terminu kwitnienia wiech oraz znamion, a także oceniono jakość i ilość pylników z wykorzystaniem 6-cio stopniowej skali zaproponowanej przez Kohls (Kohls i in., 2011). Obserwacje prowadzono codziennie, przez okres dwóch tygodni od rozpoczęcia kwitnienia. Przed zbiorem zmierzono wysokość roślin razem z wiechą (cm) oraz wysokość osadzenia kolby głównej (cm). Określono również porażenie roślin przez głównię guzowatą, żerowanie omacnicy prosowianki oraz porażenie kolb przez fuzariozę kolb. Po zbiorze określono plon ziarna z poletek (kg) oraz pobrano próby ziarna do analiz składu. Zawartość suchej masy (%) w ziarnie określono metodą suszarkową w temperaturze 105 °C. Po wysuszeniu prób ziarna określono masę tysiąca nasion (MTZ, (g)) oraz gęstość ziarna w stanie zsypanym (masę hektolitra nasion (kg/HL)). Skład ziarna (zawartość skrobi, białka, tłuszczu, (%)) określono przy wykorzystaniu spektrometru NIRS.

### Określenie występowania dominujących alleli genu *Rf4* w wybranych liniach wsobnych

W celu określenia występowania genu *Rf4* oraz/lub jego alleli: *Rf4Rf4*, lub *Rf4rf4*, w wybranych liniach zaklasyfikowanych jako przywracające całkowicie bądź częściowo płodność w cytoplazmie typu C, na podstawie przeprowadzonej fenotypowej oceny płodności, zostało wykorzystanych 6 markerów molekularnych blisko sprzężonych z genem *Rf4*: b0329-13.1, b0640-3.4, c0466-1.7, c0113-2.2, c0216-3.15, b0440-16.2 (Kohls i in., 2010).

Do wyodrębnienia linii z genem przywracającym płodność pyłku, zostały wykorzystane wzorce – matryce linii bez dominującego allelu genu *Rf4* (o profilu *rf4rf4*), jako kontrola negatywna, oraz matryce linii z genem *Rf4*, jako kontrola pozytywna (o profilu *Rf4Rf4* lub *Rf4rf4*), pozyskane z Maize Genetic Cooperation Centre.

Analizy molekularne wykonano dla 19 linii, wybranych z pośród 57 badanych linii wsobnych. Wyboru linii do analiz molekularnych dokonano na podstawie wyników oceny interakcji z cytoplazmą C. Wytypowane linie reprezentowały zróżnicowany poziom przywracania płodności lub dopełniały sterylność w tym typie cytoplazmy. W przypadku linii S80660A wykorzystano również pokolenie *BC*<sub>3</sub> na cytoplazmie C.

### Izolacja roślinnego DNA

Do badań molekularnych, z wybranych linii wsobnych oraz linii wzorcowych DNA zostało wyizolowane przy wykorzystaniu protokołu opartego na bromku heksadecylotrimetyloaminowego (CTAB) (Murray i Thompson, 1980; Wagner i in., 1987) z drobnymi modyfikacjami. Po zakończeniu etapu izolacji procedura była prowadzona zgodnie z metodyką opisaną przez Murray'a i Thompson'a (1980). Spektrofotometryczny pomiar ilości UV zaabsorbowanego przez zasady DNA został oznaczony zgodnie z instrukcją fluorymetru NanoDrop 3300 (ThermoScientific, Wilmington, USA). Za pomocą systemu typu NanoDrop, w kropli  $\leq 1,5 \mu\text{l}$  próbki, absorbcja została automatycznie przeliczona na stężenie.

Wyizolowane powyższą metodą genomowe DNA, wykorzystane zostało w reakcji amplifikacji dla markerów molekularnych, podczas selekcji alleli genu *Rf4*: *Rf4Rf4*, *Rf4rf4*, a także *rf4rf4*.

### Selekcja molekularna, reakcja amplifikacji PCR

Reakcje amplifikacji zostały przeprowadzone w układzie zawierającym w objętości 40  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej następujące składniki: 50 ng DNA, 1  $\times$  bufor (MBI Fermentas), 0,125 mM dNTPs, 0,2  $\mu\text{M}$  startera i 1 jednostka polimerazy Taq (MBI Fermentas), 5 vol % dimetylosulfotlenek (DMSO). Dla markerów powielanie fragmentów DNA zostało przeprowadzone według następującego profilu termicznego: 95°C/5 min. denaturacji wstępnej, 50 cykli składających się z: 95°C/15 sek., 60°C/30 sek., 72°C/15 sek., etap elongacji trwał 4 min. Temperatura pokrywy grzewczej w termocyklerze ustawiona została na 105°C we wszystkich zastosowanych programach (Kohls i in., 2011).

### Elektroforeza na żelach poliakrylamidowych

Rozdział produktów amplifikacji PCR został przeprowadzony na sekwenatorze DNA ABI 377 XL na 4,75% denaturującym żelu poliakrylamidowym (Long Ranger Gel Solution, USA) w obecności barwników: HEX (żółty), FAM (niebieski), TET (zielony). Katalizatorem reakcji

polimeryzacji był N,N,N,N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), a inicjatorem nadsiarczan amonu (APS). Rozdział elektroforetyczny prowadzony był w buforze  $1 \times$  TBE (0,1 M Tris, 90 mM kwas borowy, 9 mM EDTA). W zależności od wielkości oczekiwanych produktów czas rozdzielania na żelu wynosił od 2,5 do 4 godzin. Analiza uzyskanych obrazów elektroforetycznych wykonywana była wizualnie.

#### Analiza statystyczna

Analizy statystyczne zostały wykonane za pomocą pakietu STATISTICA® ver. 12 [StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (*data analysis software system*), version 12. www.statsoft.com].

Dla określenia wpływu roku realizacji doświadczenia na zróżnicowanie badanych cech wykonano analizę ANOVA (jednowymiarowy test istotności, bez wyrazu wolnego).

O istotności różnicy pomiędzy średnimi wnioskowano z prawdopodobieństwem co najmniej 95%.

Dla określenia efektów czynników doświadczenia (rodzaj cytoplazmy, forma mateczna oraz forma ojcowska) na zróżnicowanie badanych cech zastosowano analizę komponentów wariacyjnych w modelu mieszanym ANOVA/ANCOVA. Rodzaj cytoplazmy, oraz forma mateczna i ojcowska zostały przyjęte w tej analizie jako czynniki losowe. Dla określenia względnego udziału poszczególnych komponentów wariacyjnych została zastosowana metoda ANOVA, SS typu I.

Zależności pomiędzy cechami wyznaczono za pomocą korelacji prostej Pearsona i o ich istotnościach wnioskowano z prawdopodobieństwem co najmniej 95%.

W celu określenia wzajemnych zależności pomiędzy badanymi obiektami przeprowadzono również analizę czynnika głównego (PCA). Wykorzystano do tego macierz średnich wartości 12 cech uzyskanych z pomiarów i obserwacji 22 badanych mieszańców. Cechami tymi były: wysokość roślin, wysokość osadzenia kolb, ASI, ilość i jakość pylników, MTZ, zawartość suchej masy, plon netto z 1 ha, zawartość białka, tłuszczu oraz skrobi. Powyższe wartości średnie przed analizą poddano standaryzacji według wzoru:  $x_{st} = (x_i - x_{sr})/Sd$ , gdzie  $x_{st}$  to wartość po standaryzacji,  $x_i$  to wartość cechy przed standaryzacją,  $x_{sr}$  to średnia z próby,  $Sd$  – odchylenie standardowe z próby. Uzyskane wartości czynników poddano rotacji metodą varimax znormalizowaną.

#### Określenie występowania dominujący alleli genu Rf4 w wybranych liniach wsobnych

### WYNIKI I DYSKUSJA

#### Określenie interakcji genów jądrowych linii wsobnych z cytoplazmami sterylnymi C i T

Przy ocenie interakcji linii wsobnych ze źródłami cytoplazm męskosterylnych, kluczowe znaczenie ma wybór stabilnego w różnych warunkach klimatycznych źródła sterylności, które nie będzie zaburzało uzyskiwanych wyników poprzez obecność genów częściowo przywracających płodność. Konkluzja ta znajduje potwierdzenie w danych literaturowych uzyskanych przez VoichiPa (2002) oraz Kohls (2011). Źródła cytoplazm C i T (linie Tc 208-cms C i Tc 208-cms T) wykorzystane w badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy charakteryzowały się bardzo wysokim poziomem stabilności oraz całkowitą

męską sterylnością, dzięki czemu uzyskane wyniki nie zostały zaburzone poprzez ewentualną, częściowo przywróconą, płodność męską źródła cytoplazmy.

Istotne znaczenie dla precyzyjności uzyskiwanych wyników, dotyczących przywracania płodności bądź dopełniania sterylności, ma metoda wykonywania oceny płodności roślin. W literaturze dostępnych jest kilka skali oceny płodności (np. skala Duvicka z modyfikacją Becketta (Beckett, 1966)). W prezentowanych badaniach zastosowano kwantyfikację przywracania płodności według skali zaproponowanej przez Kohls (2011), będącą syntezą różnych skali. Skala zaproponowana przez Kohls wyróżnia się odrębnym systemem oceny ilości i jakości pylników, co pozwala na uchwycenie subtelnych różnic w tych dwóch parametrach, wymiennie wpływających na indeks restoracji.

Na podstawie przeprowadzonej wizualnej oceny jakości oraz ilości pylników, w pokoleniu  $F_1$  otrzymanym w wyniku krzyżowania cytoplazm sterylnych C i T z 57 liniami wsobnymi kukurydzy oraz w kolejnych pokoleniach ( $BC_1$ ,  $BC_2$ ,  $BC_3$ ) otrzymanych w wyniku krzyżowań wstecznych, wyodrębniono następujące grupy linii wsobnych:

- I grupa: linie przywracające całkowicie płodność pyłku w cytoplazmie C (35 linii),
- II grupa: linie przywracające częściowo płodność pyłku w cytoplazmie C (2 linie),
- III grupa: linie dopełniające sterylność w cytoplazmie C (20 linii),
- IV grupa: linie przywracające całkowicie płodność pyłku w cytoplazmie T (3 linie),
- V grupa: linie przywracające częściowo płodność pyłku w cytoplazmie T (1 linia),
- VI grupa: linie dopełniające sterylność w cytoplazmie T (53 linie),
- VII grupa: linie przywracające płodność pyłku w cytoplazmie C i T (1 linia),
- VI grupa: linie dopełniające sterylność w cytoplazmach C i T (17 linii).

Większość badanych linii wykazała stabilną interakcję z cytoplazmą sterylną w kolejnych pokoleniach wypierających, jednakże w przypadku 11 linii, zaobserwowano niestabilną interakcję z cytoplazmą C, skutkującą spadkiem poziomu płodności lub spontanicznym jej przywróceniem.

Zidentyfikowano również grupę, niezwykle istotną z punktu widzenia wykorzystania systemu CGMS w produkcji nasiennej odmian mieszańcowych kukurydzy, którą stanowiły linie dopełniające sterylność w obydwóch typach cytoplazm. W grupie tej znalazło się 10 linii wsobnych pochodzących z Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o (K381, K387, K397, K447, K466, K467, K469, K475, K478, K479) oraz 7 linii pochodzących z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o, Grupa IHAR (S03778A3, S266, S41324A-2, S61328, S79757, S80660A, S80835A). Uniwersalne właściwości przywracające męską płodność w obydwóch typach cytoplazm, zidentyfikowano jedynie w przypadku 1 linii (K434), pochodzącej z Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o. Linia ta przywracała płodność męską w cytoplazmie C w stopniu całkowitym a w cytoplazmie T, jedynie w stopniu częściowym. Przypuszczalnie, wskazuje to na obecność w tej linii genu *Rf8*, który odpowiada za częściowe przywracanie płodności cytoplazmie T, jednakże efekty jego działania mogą być znoszone w kolejnych pokoleniach wstecznych (Meyer, 2008). Historyczna linia SR10, znajdująca się w zasobach Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, oraz linie K154 i K468 przywracały męską płodność w cytoplazmie T.



Określenie interakcji linii wsobnych z cytoplazmami sterylnymi stanowi jeden z najistotniejszych elementów implikacji systemu CGMS do produkcji nasiennej. Jedynie linie o stabilnej interakcji, skutkującej całkowitym przywróceniem płodności bądź utrzymaniem sterylności, mogą być z powodzeniem stosowane jako komponenty ojcowskie lub mateczne. Badane linie wykazywały zróżnicowaną interakcję z cytoplazmą C i T. Spośród badanych 57 linii wsobnych, zdecydowana ich większość przywracała płodność w cytoplazmie C, natomiast jedynie niewielka ich liczba przywracała płodność w cytoplazmie T. Przeprowadzone obserwacje wskazują na wysoką frekwencję genów przywracających płodność pyłku cytoplazmie C w badanych liniach wsobnych, oraz niską frekwencję genów przywracających płodność męską cytoplazmy T, co koresponduje z wynikami uzyskanymi przez Królikowskiego (Królikowski, 1963).

Kolejnym istotnym aspektem wpływającym na implementację systemu CGMS do produkcji nasiennej jest stopień restoracji płodności pyłku. Linie ojcowskie w pełni przywracające płodność sterylnym liniom matecznym pozwalają na wytworzenie dużej ilości w pełni funkcjonalnych pylników w pokoleniu  $F_1$ . W przeprowadzonych badaniach, zaobserwowano wysoką korelację pomiędzy jakością i ilością pylników produkowanych przez rośliny pokoleń  $F_1$ ,  $BC_1$ ,  $BC_2$ ,  $BC_3$  co znalazło potwierdzenie w wynikach uzyskanych przez Kohls (2011).

W trakcie prowadzonych badań zidentyfikowano 35 linii całkowicie oraz 2 linie częściowo przywracających płodność pyłku w cytoplazmie C, 3 linie całkowicie oraz 1 linię częściowo przywracające płodność pyłku w cytoplazmie T. Zidentyfikowane linie o właściwości przywracania męskiej płodności mogą posłużyć jako źródła genów *Rf*. Dopełnienie męskiej sterylności dla cytoplazmy C zostało zidentyfikowane w przypadku 20 linii, a dla cytoplazmy T w przypadku 53 linii. Zidentyfikowano również 17 linii dopełniających sterylność męską w obydwu typach cytoplazmy, oraz 1 linię o uniwersalnych właściwościach przywracania płodności (K434).

W wyniku przeprowadzonych analiz interakcji linii wsobnych z cytoplazmą C w pokoleniu  $F_1$  oraz kolejnych pokoleniach wypierających, zidentyfikowano niestabilną interakcję linii z cytoplazmą w przypadku 11 badanych linii (K378, K381, K398, K426, K429, K436, K450, S54555, S61328, S64417, S80660A). W przypadku linii K436, która w pokoleniu  $F_1$  dopełniała sterylność, w pokoleniu  $BC_1$  po 14 dniach od kwitnienia znamion zaobserwowano wyrzut około 50% pylników o niskiej jakości, co może sugerować wystąpienie zjawiska późnego przełamania sterylności. W kolejnych pokoleniach wypierających otrzymanych z linii K436, również obserwowano częściowe przywrócenie płodności oraz znaczące opóźnienie w kwitnieniu wiech w stosunku do kwitnienia znamion. Zjawisko częściowego przywracania męskiej płodności cytoplazmie C, zaobserwowano w przypadku 2 linii (K436, K464).

Przeprowadzone obserwacje potwierdziły hipotezę badawczą I zakładającą, że *linie wsobne kukurydzy wykazują zróżnicowaną interakcję genów jądrowych z cytoplazmami sterylizującymi C i T. Zróżnicowanie to wynika z obecności różnych genów przywracających płodność (w stopniu całkowitym bądź częściowym) lub dopełniających sterylność w puli genowej kukurydzy.*

### Określenie wpływu cytoplazmy na cechy agronomiczne i skład ziarna mieszańców

Rozwój badań nad wpływem typu cytoplazmy na plonowanie odmian mieszańcowych kukurydzy został przerwany w latach 70tych ubiegłego wieku, z powodu ujawnienia się podatności cytoplazmy T na Southern Corn Leaf Blight Race-T. Do tematyki tej powrócono dopiero w roku 2000, w kontekście cytoplazmy C i systemu Plus-Hybrid (Stamp i in., 2000). Poznanie oddziaływania typu cytoplazmy na plonowanie i cechy agronomiczne może potencjalnie wpływać na poprawę wydajności upraw, ponieważ cytoplazma jest dziedziczona przez potomstwo (Abidi i in., 2018 b). Z uwagi na brak wydatku energii oraz składników pokarmowych związanych z wyrzutem pylników, rośliny męskosterylne mają możliwość efektywniejszego gospodarowania zasobami, a co się z tym wiąże - lepszego plonowania.

Transport składników pokarmowych ukierunkowany jest w ich przypadku na rozwój kolby. Sytuacja ta powinna, przynajmniej teoretycznie, jednoznacznie wiązać wykorzystanie form męskosterylnych w produkcji nasiennej, z wyższym plonowaniem oraz efektywniejszym zawiązywaniem nasion. Jednakże wyniki literaturowe nie potwierdzają jednoznacznie pozytywnego wpływu typu cytoplazmy na plonowanie mieszańców (Duvick, 1958; Noble i Russel, 1963; Sanford i in., 1965).

W przeprowadzonych badaniach oceniano wpływ typu cytoplazmy (męskosterylna cytoplazma T *versus* normalna) na plonowanie oraz cechy agronomiczne pokolenia  $F_1$ . Wytworzone do badań pokolenie  $F_1$  reprezentowane były przez mieszańce typu trójliniowego (ang. *three way cross*).

Nie stwierdzono istotnego wpływu cytoplazmy na: średnią wysokość roślin oraz średnią wysokość osadzenia kolby, plonowanie oraz zawartość suchej masy w ziarnie badanych mieszańców. Uzyskane wyniki korespondowały z wynikami uzyskanymi przez Everetta (1960). Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że obiekty z cytoplazmą T, charakteryzowały się średnią, istotną statystycznie, wyższą masą tysiąca ziarniaków. Porównując gęstość ziarna w stanie zsypanym (masę hektolitra), w większości badanych obiektów nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy analizowanymi wariantami cytoplazmy (cytoplazma normalna *versus* cytoplazma T).

Analizując wpływ typu cytoplazmy na skład chemiczny ziarna, stwierdzono iż typ cytoplazmy nie wpływał w sposób istotny na zawartość tłuszczu w ziarnie. Niewielką, istotną statystycznie różnicę na korzyść obiektów z cytoplazmą T stwierdzono natomiast w przypadku zawartości białka.

Analizując wpływ typu cytoplazmy na porażenie roślin przez patogeny, stwierdzono iż typ cytoplazmy wpływał w sposób istotny statystycznie na uszkodzenie roślin przez omacnicę prosowiankę oraz na porażenie kolb grzybami z rodzaju *Fusarium*. Obiekty z obecną cytoplazmą N były średnio mniej podatne na porażenie omacnicą oraz fuzariozą kolb od obiektów z cytoplazmą T.

Analiza komponentów wariancyjnych wykazała bardzo mały (średnio 0,91% dla 12 cech) udział rodzaju zastosowanej cytoplazmy w zmienności badanych cech. Relatywnie największy udział zmienności zależny od rodzaju cytoplazmy (4,5%), stwierdzono w przypadku cechy MTZ. Nieco niższe wartości zanotowano dla zawartości białka (3,1%) oraz ilości pylników (2,5%).

Nie stwierdzono udziału interakcji pomiędzy rodzajem cytoplazmy a formą mateczną w zmienności badanych cech agronomicznych oraz związanych z plonowaniem i składem

chemicznym ziarna. Z kolei interakcja pomiędzy rodzajem cytoplazmy a formą ojcowską wahała się od 0 (sześć cech) do 12,3% (jakość pylników). W zmienności tej ostatniej cechy stwierdzono bardzo duży (78%) udział błędu doświadczenia. Żadna z opisanych powyżej interakcji nie wpływała na zmienność plonu netto czy zawartości białka.

Względnie największy udział w kształtowaniu zmienności badanych form kukurydzy miała zastosowana w krzyżowaniach forma ojcowska (średnio 34,41%). Z kolei w zmienności zawartości suchej masy największy udział stwierdzono dla rodzaju zastosowanej formy matecznej (58,2%), gdzie forma ojcowska odpowiadała za 3,8% zmienności, a ich wzajemna interakcja za 11,9% zmienności.

W celu określenia wzajemnych zależności pomiędzy badanymi obiektami przeprowadzono również analizę czynnika głównego (PCA). Stwierdzono, iż 79,7% zmienności badanych obiektów jest objaśniane przez 4 czynniki, których dwa pierwsze objaśniają ponad połowę zmienności. Czynniki 1, objaśniający 29,8% ogólnej zmienności, związany jest z cechami bezpośrednio wpływającymi na produktywność badanych form tzn. z wysokością osadzania kolb, wskaźnikiem ASI, % suchej masy oraz plonem netto. Drugi czynnik, objaśniający 22,1% zmienności, związany jest z wysokością roślin oraz masą hektolitra nasion. Projekcja wartości czynnikowych badanych obiektów w dwuwymiarowej przestrzeni czynników 1-go i 2-go (odpowiednio, osi OX i OY) nie pozwala na wyodrębnienie grup obiektów w zależności od zastosowanego rodzaju cytoplazmy. Jest to dodatkowym potwierdzeniem na brak istotnego wpływu rodzaju cytoplazmy na zmienność badanych obiektów kukurydzy.

Uzyskane wyniki pozwoliły na odrzucenie hipotezy badawczej II, w kontekście *wpływu typu cytoplazmy na plonowanie oraz cechy agronomiczne*, oraz na potwierdzenie jej w odniesieniu do *wpływu typu cytoplazmy na zdrowotność roślin, masę tysiąca ziarniaków oraz zawartość białka w ziarnie*.

#### Określenie występowania genu *Rf4* w wybranych liniach wsobnych

Fenotypowa analiza interakcji genów jądrowych z cytoplazmami sterylnymi to podstawowy sposób klasyfikowania genotypów/linii pod kątem ich zdolności do przywracania płodności pyłku bądź do dopełniania męskiej sterility. Jest to analiza obarczona kilkoma słabymi stronami: (I) jest długotrwała- wymaga wytworzenia pokolenia F<sub>1</sub> a następnie analizowania w nim stopnia przywracania płodności; (II) ocena oparta o system kwantyfikacji ilości i jakości pylników jest subiektywna, a jej wynik w dużej mierze uzależniony od doświadczenia i wprawy oceniającego; (III) nie daje informacji o obecności bądź braku konkretnego genu związanego z przywracaniem płodności pyłku. Analizy molekularne pozwalają na zidentyfikowanie konkretnych genów przywracających płodność oraz określenie częstotliwości ich występowania w populacji bez konieczności prowadzenia roślin w szkółce polowej. Markery molekularne pozwalające na identyfikację genów *Rf* są przedmiotem zainteresowania firm hodowlanych oraz podlegają patentowaniu dlatego też w dostępnej literaturze nie znajdziemy zbyt wielu doniesień na ten temat.

W badaniach wykorzystano 6 markerów związanych z przywracającym płodność pyłku cytoplazmie C, genem *Rf4* (b0329-13.1, b0640-3.4, c0466-1.7, c0113-2.2, c0216-3.15, b0440-

16.2) zaproponowanych przez Kohls (2010). Wyniki uzyskane na podstawie analizy produktów reakcji PCR, wykazały przydatność markera b0329-13.1 do określenia występowania dominujących alleli genu *Rf4* w liniach wsobnych. Porównując polimorfizm pomiędzy sterylnymi i płodnymi liniami wzorcowym, obecność dominujących alleli genu *Rf4* potwierdzono w 13 liniach wsobnych. W przypadku markera c0466-1.7 zidentyfikowano gen *Rf4* jedynie w płodnej linii wzorcowej K55. Pozostałe markery dawały produkty reakcji PCR, ale okazały się one niespecyficzne, co uniemożliwiło wykonanie na ich podstawie analizy obecności bądź braku dominującego allelu genu *Rf4*.

Obserwowana fenotypowo interakcja linii wsobnej z cytoplazmą C, znalazła potwierdzenie w występowania bądź braku dominujących alleli genu *Rf4*, w przypadku 16 badanych linii wsobnych. W przypadku 4 badanych linii obserwowana interakcja z cytoplazmą C, nie pokryła się z wynikiem analiz molekularnych. W przypadku linii K459 oraz K464, zaklasyfikowanych jako przywracające płodność w cytoplazmie C, wykonane analizy nie potwierdziły obecności dominujących alleli genu *Rf4*. Może to świadczyć o obecności w tych liniach innych genów przywracających płodność w cytoplazmie C, które odpowiedzialne są za m.in. za częściowe przywracanie płodności w kolejnych pokoleniach wypierających linii K464. Odwrotna sytuacja wystąpiła w przypadku linii K436, która podczas oceny pokolenia  $F_1$ , zaklasyfikowana została jako linia dopełniająca sterylność w cytoplazmie C. W kolejnych pokoleniach wypierających linia ta wykazywała częściowe przywracanie płodności. W tej linii przeprowadzone analizy molekularne, wykazały obecność dominującego allelu genu *Rf4*. Zaobserwowana w przypadku linii K436, obecność dominujących alleli genu *Rf4* przy jednoczesnym braku właściwości restorujących dla cytoplazmy C w pokoleniu  $F_1$  oraz słabym, częściowym przywracaniu płodności w pokoleniach  $BC_1$ - $BC_3$ , może wskazywać na obecność w tej linii genów inhibitorowych, znoszących działanie genu *Rf4*. W przypadku pokolenia  $BC_3$  linii S80660A stwierdzono brak dominujących alleli genu *Rf4*, co oznacza, że za przywracanie płodności w tej linii mogą być odpowiedzialne inne geny restorujące.

Jedynie marker b0329-13.1 dawał produkty reakcji PCR charakteryzujące się polimorfizmem pomiędzy liniami będącymi wzorcami sterylności i płodności. W przeprowadzonych badaniach, obserwowana fenotypowo interakcja linii wsobnej z cytoplazmą C, znalazła potwierdzenie w występowania bądź braku dominujących alleli genu *Rf4*, w przypadku 16 badanych linii wsobnych, natomiast w przypadku 4 badanych linii obserwowana interakcja z cytoplazmą C nie pokryła się z wynikiem analiz molekularnych. Odmienny od obserwacji fenotypowych wynik analiz molekularnych świadczyć może o obecności w tych liniach innych genów przywracających płodność pyłku cytoplazmie C lub o występowaniu w nich genów inhibitujących działanie genu *Rf4* (Hu i in., 2006).

#### PODSUMOWANIE: MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA CYTOPLAZMATYCZNO-GENOWEJ MĘSKIEJ STERYLNOŚCI W NASIENICTWIE POLSKICH ODMIAN MIESZAŃCOWYCH KUKURYDZY

Potwierdzona w toku przeprowadzonych prac badawczych, wysoka frekwencja linii wsobnych o właściwościach dopełniających sterylność męską cytoplazmy T oraz wysoka stabilność sterylności, pozwala na (ograniczone) wykorzystanie tej cytoplazmy w nasiennictwie polskich odmian mieszańcowych kukurydzy. Z uwagi na rzadkie występowanie w puli genowej genów przywracających płodność cytoplazmie T, łatwo w oparciu o nią uzyskać

mateczny komponent męskosterylny. Niska frekwencja genów przywracających płodność cytoplazmie T stwarza konieczność wprowadzenia tych genów do linii wsobnej w celu uzyskania jej płodnego analogu. Włączając cytoplazmę T do produkcji nasiennej należy mieć na uwadze postępujące zmiany klimatyczne, które niosą zagrożenie związane z możliwością wystąpienia epidemii Southern Corn Leaf Blight Race-T, choroby, atakującej kukurydzę z cytoplazmą T, która dotychczas nie występowała w klimacie umiarkowanym. Jednym ze sposobów ograniczania zagrożenia związanego z podatnością cytoplazmy T na choroby jest poszukiwanie różnych źródeł cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterylności (Abidi i in., 2018a). Wykorzystywanie zróżnicowanych genetycznie źródeł sterylności uznawane jest za kluczowy aspekt w zapobieganiu zagrożeniom związanym z podatnością wykorzystywanego na dużą skalę źródła na niekorzystne czynniki biotyczne i abiotyczne. Warto w tym miejscu przytoczyć ostrzeżenie A. J. Ullstrupa, (za: Burns, 2017; tłumaczenie własne) które jest dziś tak samo prawdziwe, jak w 1972 roku „Nigdy więcej żaden główny gatunek uprawny nie powinien być tak jednorodny, że staje się powszechnie podatnym na atak patogena, owada lub stres środowiskowy. Różnorodność musi być zachowana zarówno w budowie genetycznej, jak i cytoplazmatycznej, we wszystkich ważnych gatunkach roślin uprawnych”. Tak więc wykorzystanie cytoplazmy T w nasiennictwie odmian mieszańcowych kukurydzy jest możliwe pod warunkiem ograniczenia zagrożenia związanego z nadmierną uniformizacją genetyczną źródeł sterylności. Zidentyfikowana w toku prowadzonych prac, duża grupa linii wsobnych kukurydzy, o zdolnościach dopełniających męską sterylność cytoplazmy T oraz niska frekwencja linii o zdolnościach restorujących względem tej cytoplazmy, świadczą o potencjalnych możliwościach wytworzenia funkcjonalnego systemu CGMS dla produkcji nasiennej polskich odmian mieszańcowych kukurydzy. Ponadto, aby w pełni zaimplementować system CGMS w produkcji nasiennej, konieczne jest zidentyfikowanie źródeł genów *Rf1* i *Rf2*, zapewniających przywrócenie płodności w pokoleniu *F1*. Przykład historycznej smolickiej linii SR10, znajdującej się obecnie w zasobach Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, której zdolność do stabilnej restoracji płodności męskiej cytoplazmy T, została potwierdzona w przeprowadzonych badaniach, wskazuje na potrzebę dokładniejszego przebadania historycznych materiałów zgromadzonych w banku genów, pod kątem poszukiwania źródeł genów *Rf* oraz zróżnicowanych źródeł typów cytoplazmy. Badania przeprowadzone przez Ignjatović-Micić z zespołem (2006) nad obiektami kukurydzy zgromadzonymi w Maize Gene Bank- Zemun Polje (Belgrad, Serbia), wykazały przydatność metod molekularnych do szybkiej identyfikacji typów cytoplazm w zróżnicowanym materiale oraz możliwość poszukiwania nowych źródeł cytoplazm w materiałach zgromadzonych w bankach genów. W celu ograniczenia ewentualnych problemów związanych z wykorzystaniem cytoplazmy T w produkcji nasiennej (podatność na choroby, niska frekwencja genów *Rf*) wykorzystanie sterylnych form matecznych z cytoplazmą cms-T można ograniczyć do połowy wysiewanej formy matecznej (dwa rzędy sterylnej formy matecznej + dwa rzędy płodnej formy matecznej o normalnej cytoplazmie). Zabieg mechanicznej bądź ręcznej kastracji wykonuje się tylko na rzędach obsianych płodną formą mateczną, a w czasie zbioru, suszenia i przerobu następuje wymieszanie nasion (ang. *seed - blending*) (Adamczyk, 2005).

W przypadku wykorzystania cytoplazmy C w nasiennictwie odmian mieszańcowych kukurydzy, głównym problemem utrudniającym stworzenie funkcjonalnego systemu CGMS, jest wysoka frekwencja genów przywracających płodność pyłku w badanej puli genowej, co

utrudnia wytworzenie męskosterylnej formy matecznej. Kolejnymi, istotnymi aspektami utrudniającymi implementację tej cytoplazmy do produkcji nasiennej jest występowanie zjawiska częściowego przywracania płodności oraz późnego, spontanicznego przełamania sterylności (ang. *late-brake of sterility*) (Sotchenko i in., 2007). Obydwa, niekorzystne z punktu widzenia produkcji nasiennej, zjawiska można wyeliminować poprzez dobór do systemu CGMS linii wykazujących stabilność cechy męskiej sterylności. W tym celu, konieczne jest wykonanie screeningu linii wsobnych pod kątem stabilności interakcji ze źródłem cms-C, na szerokiej puli genowej (Mackenzie, 2012). Niemniej jednak, wyeliminowanie tych niekorzystnych zjawisk jest możliwe na drodze hodowlanej, o czym świadczy fakt, iż cytoplazma C jest obecnie stosowana w nasiennictwie ważnych komercyjnie odmian mieszańcowych kukurydzy w wielu europejskich krajach (Sotchenko i in., 2007; Kohls, 2010). Dalsze prace nad implementacją systemu CGMS do produkcji nasiennej polskich odmian heterozyjnych kukurydzy powinny koncentrować się na trzech głównych kierunkach: (I) poszukiwaniu efektywnych źródeł genów przywracających płodność cytoplazmie T oraz dopełniających płodność męską w cytoplazmie C, (II) pozyskaniu zróżnicowanych źródeł cytoplazm sterylnych, (III) opracowaniu markerów molekularnych pozwalających na identyfikację genów *Rf*.

#### WNIOSKI

Uzyskane wyniki i przeprowadzone analizy pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Frekwencja genów przywracających płodność cytoplazmom sterylnym C i T, występująca w krajowych liniach wsobnych kukurydzy, pozwala na zaimplementowanie systemu CGMS do produkcji nasiennej polskich odmian heterozyjnych kukurydzy.
2. Ocena interakcji genów jądrowych linii wsobnych z cytoplazmami sterylnymi powinna być prowadzona z uwzględnieniem osobnej kwantyfikacji ilości i jakości pylników.
3. W przypadku oceny interakcji genów jądrowych linii wsobnych z cytoplazmą C, szczególną uwagę należy zwrócić na zjawisko częściowego przywracania płodności oraz zjawisko późnego, spontanicznego przełamania sterylności.
4. Wykorzystanie cytoplazmy sterylnej T nie wpływa istotnie na cechy agronomiczne oraz plonowanie mieszańców, niemniej jednak w formach z tym typem cytoplazmy należy zwrócić szczególną uwagę na zdrowotność roślin.
5. Na podstawie obecności bądź braku dominujących alleli genu *Rf4*, nie można jednoznacznie (w pełni) określić zdolności linii wsobnej do przywracania płodności w cytoplazmie C. Informacja o obecności dominujących alleli tego genu może być przydatna dla hodowców, którzy mogą na tej podstawie wnioskować o frekwencji występowania tego genu w danej populacji.
6. Obiekty kukurydzy, zgromadzone w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, powinny zostać scharakteryzowane pod kątem obecności genów *Rf* oraz identyfikacji typu cytoplazmy, co przyczyni się do zwiększenia ich potencjalnej przydatności dla hodowli.

## LITERATURA

1. Abidi, I., Ali, G., Dar, Z., Wani, S. H., Dar, S. A., Gazal, A. (2018) (a). Genetic studies on CMS/FR system in maize (*Zea mays* L.) for hybrid production under temperate climate conditions. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(3):1029-1034
2. Abidi, I., Ali, G., Dar, Z., Wani, S. H., Iqbal, A. M., Gazal, A. (2018) (b). Staining techniques to ascertain CMS/FR system in maize (*Zea mays* L.) for hybrid development. *Journal of AgriSearch* 5(3): 169-174; <https://doi.org/10.21921/jas.5.3.5>
3. Adamczyk, J. (2005). Genetyczne podstawy hodowli kukurydzy. W: Górny A. G (red.) *Zarys Genetyki Zbóż. Tom 2. Pszenżyto, kukurydza i owies*. Wyd. IGR-PAN, Poznań, 279-310
4. Beckett, J. B. (1966). Inheritance of partial male fertility in maize in the presence of Texas sterile cytoplasm. *Crop Science*, 6 (2): 183-184; <https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183X000600020022x>
5. Bückmann, H., Capellades, G., Hamouzová, H., Holec, J., Soukup, J., Messeguer, J., Melé, E., Nadal, A., Guillen, H. P., Pla, M., Serra, J., Thiele, K., Schiemann, J. (2017). Cytoplasmic male sterility as a biological confinement tool for maize coexistence: optimization of pollinator spatial arrangement. *Plant Soil Environment*, 63(4) 145-151
6. Burns, H. A. (2017). Southern Corn Leaf Blight: A story worth retelling. *Agronomy Journal*, 109(4): 1-7
7. Duvick, D. N. (1958). Yields and other agronomic characteristics of cytoplasmically pollen sterile corn hybrids, compared to their normal counterparts. *Agronomy Journal* 50: 121-125
8. Duvick, D.N. (1965). Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Advances in Genetics* 13: 1-56
9. Edwardson, J. R. (1962). Cytoplasmic male sterility. *The Botanical Review* 341-420
10. Feil, B., Weingartner, U., Stamp, P. (2003). Controlling the release of pollen from genetically modified maize and increasing its grain yield by growing mixtures of male-sterile and male-fertile plants. *Euphytica* 130: 163-165
11. Hanson, M. R., Bentolia, S. (2004). Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16: 154-160
12. Hassan, A. (2015). Male sterility in plants. *Journal of Environmental Science, Computer Science, and Engineering & Technology*; Sec. A; 4(3), 796-801.
13. Hu, Y. M., Tang, J. H., Yang, H., Xie, H. L., Lu, X. M., Niu, J. H., Chen, W. C. (2006). Identification and mapping of Rf-I an inhibitor of the Rf5 restorer gene for Cms-C in maize (*Zea mays* L.) *Theoretical Applied Genetics* 113: 357-360
14. Ignjatović-Micić, D., Nikolić, A., Mladenović-Drinić, S., Vančetović, J., Lazić-Jančić, V. (2006). Identification of sterile cytoplasm (CMS) in maize by using specific mtDNA primers. *Genetika*, 38 (3): 227-233
15. Kohls, S., Stamp, P., Knaak, C., Messmer, R. (2011). QTL involved in the partial restoration of male fertility of C-type cytoplasmic male sterility in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 123: 327-338
16. Kohls, S., Stamp, P., Messmer, R. (2010). Fine-mapping of RF4 a major restorer-of-fertility gene for c-type cytoplasmic male sterility in maize. *Bulletin SGPW/SSA*, No. 23: 18
17. Królikowski, Z. (1963). Badania nad zjawiskiem męskiej niepłodności i liniami przywracającymi płodność u kukurydzy. *Biuletyn IHAR* 5-6: 125-130
18. Levings, C.S. 3rd (1993). Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *The Plant Cell* 5: 1285-1290
19. Mackenzie, S. (2012). Male sterility and hybrid seed production. W: Altman A., Hasegawa P. M. (red) *Plant Biotechnology and Agriculture; Academic Press*, str.185-194, ISBN 9780123814661, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00012-2>.
20. Majewska-Sawka, A., Sadoch, Z. (2003). Cytoplazmatyczna męska sterylność roślin- mechanizmy biologiczne i molekularne. *Problemy Nauk Biologicznych*, Tom 52, Nr 4 (261): 413-423
21. Meyer, J. M. (2010). Genetic characterization of the partial restorer of fertility gene, Rf8, in T cytoplasm. *Graduate Theses and Dissertations- Iowa State University*, paper 11882.
22. Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19): 4321-4326

23. Noble, S. W., Russell, W. A. (1963). Effects of male-sterile cytoplasm and pollen fertility restorer genes on performance of hybrid corn. *Crop Science*, 3: 92-96
24. Sanford, J. O., Grogan, H. V., Jordan, H. V., Sarvella, P. A. (1965). Influence of male-sterility on nitrogen utilization in corn, *Zea mays* L. *Agronomy Journal* 57: 580-583
25. Slischuk, G. I., Kozhukhova, N. E., Sivolap, Y. M. (2011). Molecular genetic analysis of maize mitochondrial regions associated with CMS. *Tsitologiya I Genetika*, 45(3): 15-19
26. Sotchenko, V. S., Gorbacheva, A. G., Kosogorova, N. I. (2007). C-type cytoplasmic male sterility in corn. *Russian Agricultural Sciences*, 33(2): 83-86, DOI: 10.3103/S1068367407020048
27. Stamp, P., Chowchong, S., Menzi, M., Weingartner, U., Kaeser, O. (2000). Increase in the yield of cytoplasmic male sterile maize revisited. *Crop Science*, vol. 40(6): 1586-1587, <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4061586x>
28. Voichița, H. A. (2002). Evaluation of some inbred lines on fertility restoration patterns of male-sterile cytoplasm. *Romanian Agricultural Research*, 17-18: 1-9
29. Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Maroo, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 84: 2097-2100
30. Warmke, H. E., Lee, S-L J. (1977). Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *The Journal of Heredity* 68:213-222
31. Weider, C., Stamp, P., Christov, N., Husken, A., Foueillassar, X., Camp, K.-H., Munsch, M. (2009). Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions *Crop Science*, 49: 77-84, doi: 10.2135/cropsci2007.12.0694