



# Markery DNA w selekcji form restorerowych z CMS Pampa u żyta

Kamil Koc<sup>1</sup>, Barbara Kozber<sup>2</sup>, Waldemar Brukwiński<sup>2</sup>, Michał Materka<sup>3</sup>,  
Piotr T. Bednarek<sup>1</sup>

1 Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików  
2 DANKO Hodowla Roślin  
3 Poznańska Hodowla Roślin

## WSTĘP

Zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterylności bazujące na cytoplazmie sterylizującej Pampa (Geiger, Schnell, 1970) jest najczęściej stosowane w hodowli heterozyjnej żyta ozimego. Sterylizujące działanie tej cytoplazmy wynika z niezgodności genomu jądrowego i cytoplazmatycznego. Przy jej wykorzystaniu istotny problem stanowi przywracanie płodności pyłku. Do przywrócenia płodności niezbędne są geny jądrowe o nieidentycznej sile działania, zlokalizowane w różnych obszarach genomu. Geny o najsilniejszym efekcie posiadają loci na chromosomach 4R oraz 1R (Miedaner i in., 2000). Identyfikacja markerów molekularnych związanych z cechą przywracania płodności pyłku żyta z CMS Pampa stanowi problem, gdyż markery te muszą być silnie sprzężone z genami warunkującymi badaną cechę, by uniknąć równoczesnej selekcji cech niekorzystnych, i powinny skutecznie różnicować szeroką pulę materiałów. W ciągu ostatnich lat zidentyfikowaliśmy markery DArT silnie sprzężone z genami przywracania płodności (dane niepublikowane). Na podstawie sekwencji DNA tych markerów zostały opracowane startery do reakcji specyficznego PCR, które umożliwiają selekcję wspartą markerami molekularnymi linii – między innymi z genami na chromosomie 4R i 1R – w obrębie ograniczonej puli genowej.

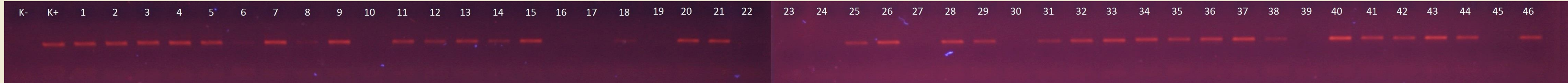
## MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny stanowiło 7 zróżnicowanych genotypów reprezentowanych przez linie restorerowe żyta (SO 23R/09, SR 13, WM 11R, WM 19R, WM 30R, WM 34R, WM 35R) prowadzone na cytoplazmie Pampa. Rośliny należące do wyżej wymienionych linii nie wykazywały obecności genu na chromosomie 4R (na podstawie badań molekularnych). Linie te krzyżowano z formą donorową, która zawierała gen przywracania płodności na chromosomie 4R (obecność genu stwierdzono na podstawie mapowania genetycznego), a następnie prowadzono krzyżowania wypierające genom formy donorowej. Uzyskano rośliny BC3F1. Krzyżowania wypierające kontrolowano za pomocą markerów DNA (specyficzne markery ukierunkowane na sekwencje markerów DArT sprzężonych z genami na chromosomach 1R i 4R). Stosowano pięć par selektywnych starterów powielających markery D-7, D-10 i D-11 ukierunkowane na 4R oraz D-4 i D-23 na 1R. Reakcje PCR prowadzono w 10µl mieszaniny reakcyjnej, zawierającej jednokrotny bufor do reakcji PCR, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM dNTPs, 0.15pM startera F i R, 5 ng genomowego DNA oraz 0.0125U polimerazy HotStarTaq DNA, stosując następujący profil termiczny powielania: [95°C – 15min] [94°C – 30s; 65°C Ramp -0.7°C – 30s; 72°C – 60s]x12 [94°C – 30s; 56°C – 30s; 72°C – 60s]x29 [72°C – 10 min] [5°C ∞]. Obecność markerów weryfikowano elektroforetycznie na żelach agarozowych. Uzyskane wyniki konwertowano do postaci matrycy binarnej.

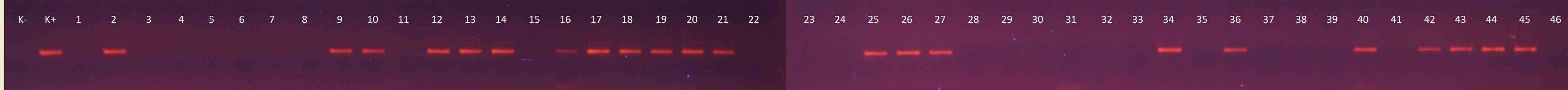
## WYNIKI

Analiza molekularna wykonana z wykorzystaniem markerów D-7, D-10 oraz D-11 wykazała wprowadzenie genu 4R do genotypów SO 23R/09, SR 13, WM 11R, WM 19R, WM 30R, WM 34R, WM 35R odpowiednio u 39, 15, 1, 11, 7, 107 i 18 linii. Markery genu przywracania płodności pyłku lokalizujące się na chromosomie 1R dla linii BC3F1 odpowiadających genotypom SO 23R/09, SR 13, WM 19R, WM 30R, WM 34R, WM 35R wystąpiły odpowiednio u 7, 3, 2, 9, 27 oraz 2 przypadkach. Nie stwierdzono obecności markerów genu 1R u jednej linii BC3F1 dla genotypu WM 11R. W przypadku linii BC3F1 odpowiadającym genotypom SO 23R/09, SR 13, WM 11R, WM 19R, WM 34R oraz WM 35R gen na chromosomie 1R występował zawsze łącznie z genem na 4R. Linie BC3F1 dla genotypu WM 30R stanowiły wyjątek, w trzech przypadkach stwierdzono występowanie genu na chromosomie 1R bez obecności genu na 4R. Zestawienie występowania poszczególnych genów podano w Tabeli 1.

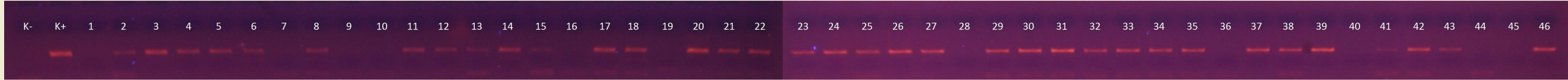
**Rysunek 1.** Fragment żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym z widocznymi markerami. Pierwsza (pusta) ścieżka – linia kontrolna (mateczna będąca biorcą genu 4R). Druga ścieżka – linia kontrolna (donorowa – dawca genu 4R). DNA badanych linii analizowano za pomocą markera D-7 sprzężonego z genem przywracania płodności pyłku na chromosomie 4R. Dalsze ścieżki reprezentują kolejne linie populacji BC3F1. Ścieżki 1-9 odpowiadają genotypowi SO 23R/09; ścieżka 10 – genotyp WM 11R; ścieżki 11-13 – genotyp SR 13; ścieżki 14-16 – genotyp WM 19R; ścieżki 17-18 – genotyp WM 30R; ścieżki 19-42 – genotyp WM 34R; ścieżki 43-46 – genotyp WM 35R.



**Rysunek 2.** Fragment żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym z widocznymi markerami. Pierwsza (pusta) ścieżka – linia kontrolna (mateczna będąca biorcą genu 4R). Druga ścieżka – linia kontrolna (donorowa – dawca genu 4R). DNA badanych linii analizowano za pomocą markera D-11 sprzężonego z genem przywracania płodności pyłku na chromosomie 4R. Dalsze ścieżki reprezentują kolejne linie populacji BC3F1. Ścieżki 1-9 odpowiadają genotypowi SO 23R/09; ścieżka 10 – genotyp WM 11R; ścieżki 11-13 – genotyp SR 13; ścieżki 14-16 – genotyp WM 19R; ścieżki 17-18 – genotyp WM 30R; ścieżki 19-42 – genotyp WM 34R; ścieżki 43-46 – genotyp WM 35R.



**Rysunek 3.** Fragment żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym z widocznymi markerami. Pierwsza (pusta) ścieżka – linia kontrolna (mateczna będąca biorcą genu 4R). Druga ścieżka – linia kontrolna (donorowa – dawca genu 4R). DNA badanych linii analizowano za pomocą markera D-23 sprzężonego z genem przywracania płodności pyłku na chromosomie 1R. Dalsze ścieżki reprezentują kolejne linie populacji BC3F1. Ścieżki 1-9 odpowiadają genotypowi SO 23R/09; ścieżka 10 – genotyp WM 11R; ścieżki 11-13 – genotyp SR 13; ścieżki 14-16 – genotyp WM 19R; ścieżki 17-18 – genotyp WM 30R; ścieżki 19-42 – genotyp WM 34R; ścieżki 43-46 – genotyp WM 35R.



**Tabela 1.** Zestawienie występowania markerów genów przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa dla poszczególnych genotypów restorerowych pokolenia BC3F1.

		Liczba linii z markerami genu na chromosomie:		
Genotyp linii BC3F1	Liczba linii w danym genotypie	1R	4R	1R/4R
SO 23R/09	42	7	39	7
SR 13	15	3	15	3
WM 11R	1	0	1	0
WM 19R	14	2	11	2
WM 30R	10	9	7	6
WM 34R	112	27	107	27
WM 35R	18	2	18	2
SUMA	212	50	198	47

## PODSUMOWANIE

- Specyficzne markery DNA, ukierunkowane na geny odpowiedzialne za przywracanie płodności pyłku zlokalizowane na chromosomach 4R i 1R, umożliwiają kontrolowanie przenoszenia (selekcje wspartą markerami molekularnymi) i/lub wstępne stwierdzenie obecności tych genów w wybranych genotypach linii restorerowych.
- W obrębie linii BC3F1 odpowiadających siedmiu genotypom linii restorerowych występuje marker genu przywracania płodności na chromosomie 4R.
- Stwierdzono, że w obrębie badanych materiałów tylko niektóre BC3F1 wykazywały obecność markera genu przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa na chromosomie 1R.
- Wyodrębniono linie BC3F1 odpowiadające genotypom SO 23R/09, SR 13, WM 19R, WM 34R, WM 35R oraz WM 11R, które najprawdopodobniej zawierają gen przywracania płodności pyłku lokalizujący się na chromosomie 4R i nie posiadają genu na 1R.
- Trzy linie odpowiadające genotypowi WM 30R wykazywały obecność markera genu na chromosomie 1R bez obecności genu na 4R.
- Wyodrębniono szereg linii reprezentujących sześć z siedmiu genotypów prawdopodobnie zawierających jednocześnie oba geny restoracji.
- Opracowane markery mogą być wykorzystane do wyprowadzenia linii restorerowych o zróżnicowanym składzie genów restoracji.
- Koniecznym jest potwierdzenie uzyskanych danych poprzez wykonanie analizy molekularnej populacji mapujących pokolenia F2 opartych o badane materiały roślinne.