

ZASTOSOWANIE MARKERÓW DNA W SELEKCJI MARCHWI Z CECHĄ CYTOPLAZMATYCZNEJ MĘSKIEJ STERYLNOŚCI TYPU PŁATKOWEGO

THE USE OF DNA MARKERS IN THE SELECTION OF CARROT LINES WITH CYTOPLASMIC MALE STERILITY TRAIT

**Wojciech Szczechura, Marzena Nowakowska, Katarzyna Nowak,
Piotr Kamiński, Renata Nowak, Elżbieta U. Kozik**

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
e-mail: wojciech.szczechura@inhort.pl

Abstract

Cytoplasmic male sterility (CMS) is a maternally inherited trait in which a plant is unable to produce functional pollen. It occurs in many plants, including carrots. The expression of this trait depends on environmental conditions, especially temperature – therefore, DNA markers become an excellent tool for selecting carrot genotypes with this feature. In this study, we used seventeen DNA markers available in the literature, linked with various mitochondrial DNA sequences that are associated with the CMS trait. Their amplification was tested on male sterile and male fertile plants. Only five markers – A321/392, I214/401/435, K751, N795, O790 – correctly identified the tested genotypes. They can be used as selection tools in carrot breeding programs.

Key words: CMS, carrot, DNA markers, marker-assisted selection (MAS)

WSTĘP

Marchew jest jednym z ważniejszych warzyw uprawianych na świecie ze względu na duże zawartości prowitaminy A, karotenu oraz błonnika (Simon 2000). Polska zajmuje pierwsze miejsce pod względem powierzchni uprawy (22 118 ha) oraz drugie pod względem produkcji (827 138 t) wśród krajów Unii Europejskiej (FAOSTAT 2017).

Cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS, ang. cytoplasmic male sterility) marchwi jest cechą pozwalającą na efektywne i powtarzalne uzyskiwanie mieszańców F₁ przy wykorzystaniu homozygotycznych linii wsobnych o pożądanym cechach agronomicznych. Wykorzystanie cechy CMS do otrzymywania mieszańców F₁ marchwi daje możliwość uzyskania większego plonu, lepszej jakości korzeni o wyższych wartościach odżywczych oraz eliminuje etap ręcznej kastracji pylników (Schnable i Wise 1998).

Występowanie cechy CMS zaobserwowano u ponad 150 gatunków roślin (Mackenzie i in. 1994; Schnable i Wise 1998). Cecha ta objawia się brakiem

produkcji pyłku lub wytwarzaniem niefunkcjonalnego pyłku, co wiąże się z zaburzeniami w procesie mikrosporogenezy (Laser i Lersten 1972).

U wielu gatunków fenotyp płci jest wynikiem interakcji genów jądrowych (geny restorerowe) i cytoplazmatycznych (Couvet i in. 1990; Ronfort i in. 1995). Rośliny sterylne charakteryzują się zmienioną organizacją genów mitochondrialnych kodujących podjednostki łańcucha oddechowego: *atp1*, *atp6*, *atp9*, *atp8*, *nad6*, *cob*. Może dochodzić do duplikacji tych genów, ich rearanzacji powyżej oraz poniżej sekwencji kodującej, skrócenia oraz tworzenia genów chimerycznych, co skutkuje powstawaniem nowych, zmienionych ramek odczytu (ORF, ang. open reading frame) (Ronfort i in. 1995; Bach i in. 2002). Takie modyfikacje zaobserwowano między innymi w genach *orf13* kukurydzy (Levings 1990), *orfH522* słonecznika (Köhler i in. 1991) i *orf256* pszenicy (Song i Hedgcoth 1994). Nieprawidłowości na poziomie komórkowym uwidaczniają się w tkance tapetum, gdzie dochodzi do nadmiernej wakuolizacji i tworzenia wielojądrowych syncytiów (Laser i Lersten 1972; Overman i Warmke 1972; Scoles i Evans 1979; Majewska-Sawka i Sadoch 2003), oraz w komórkach macierzystych pyłku, charakteryzujących się nieprawidłowym wykształceniem grzebieni mitochondrialnych (Lee i Warmke 1979; Bino 1985; Schnable i Wise 1998).

W hodowli marchwi wykorzystuje się dwa podstawowe typy CMS o różnej budowie morfologicznej: typ brązowych pylników, charakteryzujący się zasychaniem pylników przed otwarciem kwiatu (Banga i in. 1964; Ronfort i in. 1995), oraz typ petaloidalny, w którym pręciki przekształcają się w struktury płatkopodobne (Erickson i in. 1982; Kitagawa i in. 1994; Szklarczyk i in. 2000). W typie petaloidalnym kwiaty posiadają 10 płatków, drugi dodatkowy okółek powstaje z pręcików. Takie zmiany w morfologii kwiatu mogą mieć różny kształt i wielkość (Kozik i in. 2012). W hodowli mieszańcowej marchwi najczęściej wykorzystuje się typ petaloidalny ze względu na większą stabilność w zmiennych warunkach pogodowych, zwłaszcza w podwyższonej temperaturze i wilgotności powietrza. Cytoplazma typu petaloid wywodzi się z dwóch źródeł – Cornell zidentyfikowanego przez Thompsona (1961) oraz Wisconsin Wild opisanego przez Morelocka i in. (1996).

W ostatnich latach markery molekularne są bardzo wygodnym narzędziem diagnostycznym w hodowli roślin uprawnych, dającym możliwość szybkiej i dokładnej analizy puli genowej, oceny stabilności genetycznej oraz identyfikacji ważnych cech użytkowych (Sztuba-Solińska 2005). Zaletą stosowania markerów molekularnych jest również ich niezależność od warunków środowiska oraz możliwość zastosowania na każdym etapie rozwoju rośliny, jeszcze przed wykształceniem się oczekiwanego fenotypu. Systemy markerów DNA możemy zaklasyfikować do trzech grup: bazujące na hybrydyzacji – np. RFLP, na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction) – RAPD, AFLP, SCAR, CAPS, SSR oraz na sekwencji DNA –

np. SNP (Gupta i in. 1999). Zastosowanie markerów w hodowli nosi nazwę selekcji wspomaganą markerami (MAS, Marker Assisted Selection) i jest częścią nowej dyscypliny zwanej hodowlą molekularną (Collard i Mackill 2008).

Jest wiele prac dotyczących wykorzystania markerów DNA, zwłaszcza tych opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy, które znalazły zastosowanie w selekcji genotypów marchwi z ważnymi cechami użytkowymi, w tym z cechą CMS.

Celem badań było wykorzystanie dostępnych markerów DNA do selekcji genotypów marchwi z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterility.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem roślinnym użytym do badań były 123 rośliny marchwi z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterility typu płatkowego reprezentujące 34 linie hodowlane (G1064, G1063, G1068, G1079, G1082, G1109, G1111, G1125, G1158, G1273, G1276, G1297, G1290, G1383, G1398, G1385, G1382, G1392, G1426, G1296, G1394, G1437, G1263, G1461, G1418, G1406, G1464, G1463, G1409, G1381, G1466, G1402, G1470, G1462) oraz 17 roślin płodnych (4 linie dopełniające: M989, M1076, M1187, M1301) – stanowiących kontrolę. Liczba roślin reprezentujących daną linię wahała się od 1 do 8. Wszystkie genotypy pochodziły z Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa i zostały otrzymane w latach 2008–2019 w trakcie badań hodowlanych mających na celu uzyskanie nowej zmienności genetycznej do tworzenia mieszańców heterozygotycznych. Wszystkie rośliny wykorzystane do analizy molekularnej zostały wcześniej ocenione pod względem fenotypowym oraz cechy płodności/sterility typu płatkowego w warunkach polowych i szklarniowych. Analizę molekularną prowadzono indywidualnie dla każdej z męskopłodnych i męskosterylnych roślin należących do 34 linii hodowlanych wykorzystując 17 markerów DNA (tab. 1) typu SCAR: A/B, G427/469, A321/329, E1100, H1508, L422, P1229, B1632, C1608, D1346, F373, I214/401/435, K751, N795, M451, O790, Q672. Warunki amplifikacji oraz markery do oceny poziomu męskiej sterility użyte w badaniach opracowane zostały przez Szklarczyka i in. (2000) oraz Bach i in. (2002). DNA izolowano z młodych liści wykorzystując komercyjny zestaw NucleoSpin Plant II (Macherey–Nagel). Czystość oraz stężenie sprawdzono przy użyciu spektrofotometru BioPhotometr (Eppendorf) oraz na 1,4% żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny.

Otrzymane amplikony, specyficzne dla genotypów sterylnych i płodnych, rozdzielano elektroforetycznie w 1,4% żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny, następnie porównywano je z oceną fenotypową każdej z analizowanych roślin. Wielkość amplikonów została określona przez Szklarczyka i in. (2000) oraz Bach i in. (2002) na podstawie danych sekwencyjnych. Natomiast w prezentowanych badaniach własnych wielkość amplikonów podana jest z dokładnością do 10 par zasad.

Tabela 1. Markery DNA użyte do identyfikacji linii marchwi z cechą CMS
 Table 1. DNA markers used to identify carrot plants with the CMS trait

Markery Markers	Gen Gene	Sekwencja starterów Sequence of primers	Źródło Source
A321/392		cmt1: 5' GCAAGAAGGAAAGCTGTTAGAG cmt2: 3' GGTATCCCTCTTCTGTTTCGG	
B1632	<i>atp1</i>	atp1-d1: 5' CGCGTTGGGAGTACCTATTGA cmt-3: 3' GAGGAATACGACGTGAGACAACA	Bach i in. 2002
C1608		atp1-d1: 5' CGCGTTGGGAGTACCTATTGA cmt-4: 3' TCCCGCAGGTCGTCAACAG	
D1346		atp1-d1: 5' CGCGTTGGGAGTACCTATTGA cmt-5: 3' ATCCCCCTCCGCCCCAGTA	
E1100	<i>atp6</i>	cmt-6: 5' GGCAACAGCTGACCACGGTTC cmt-7: 3' ATTGCGGCCTTCGCTCCTCGC	Bach i in. 2002
F373		cmt-8: 5' CTACTIONAATTTGCACCTGAAC atp6-u1: 3' TTTGTGAATGAGAAATACAAG	
A/B	<i>atp9</i>	A: 5' TTCAGTTCTTTGATTCATTC, B: 3' ATTGACTTCTGATCGTGACT	Szklarczyk i in. 2000
G427/469		atp9-d1: 5' GAAGGTGCAAAATCAATAGG cmt-9: 3' TACATGGACTTTAAATTGACTTCT	Bach i in. 2002
H1508	<i>atp8</i>	cmt-10: 5' GGCCCAGTCAGCAAGCCAGGC atp8-u1: 3' GTGAATTTATCCAGTTGAGGC	Bach i in. 2002
I214/401/435		atp8-d2: 5' GTCCTCATATAGCACTTCTTCC cmt-12: 3' CTGTATTCGTGGGGGGTTCGC	
K751		cmt-15: 5' CAGCATCACTTTGAATTCATT atp8-u2: 3' CGCGTGGAACATGGATTAG	
L422		cmt-16: 5' CCGCGCTGGTCGTAATAGATA nad6-u1: 3' CTTTGGGTTGGTAGTAATGGAATG	
M451	<i>nad6</i>	nad6-d1: 5' GACTACTAAGGTGAAAAGACAGG cmt-17: 3' GCGAAATGCAATGCCCAACC	Bach i in. 2002
N795		nad6-u1: 5' CTTTGGGTTGGTAGTAATGGAATG cmt-18: 3' GTTTCTGCTTACTCCTCTATGA	
O790		nad6-d1: 5' GACTACTAAGGTGAAAAGACAGG cmt-19: 3' TGGAGCTTACCGGTTTATGG	
P1229	<i>cob</i>	cmt-20: 5' CTTACCGATGTTCTTTCAAGG cob-u2: 3' GCTTTGTCAGGTATACTACG	Bach i in. 2002
Q672		cmt-21: 5' GAATTCTCGTTTTATAGTTACAGT cob-u1: 3' CTGTCAACAATCATTAAATAGGAAGA	

Tabela 2. Ocena fenotypowa oraz genotypowanie marchwi przy użyciu markerów DNA
 Table 2. Phenotypic and genotyping evaluation of carrot plants using DNA markers

Linia Line	Fenotyp Phenotype	Liczba Number of plants	A/B	Markery/wielkość amplicjonu (kbp) Markers/size of amplicion (kbp)														
				G427/469	A321/392	E1100	H1508	L422	P1229	B1632	C1608	D1346	F373	I214/401/435	K751	N795	M451	O790
G1064	s	8	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	0,37	0,40	-	-	0,45	-
G1063	s	1	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	0,37	0,40	-	-	0,45	-
G1068	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-
G1079	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-
G1082	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-
G1109	s	3	0,38	0,47	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1111	s	6	0,38	0,47	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1125	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1158	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-
G1273	s	8	0,38	0,47	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1276	s	5	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1297	s	5	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1290	s	5	0,34	0,43	0,32	-	-	0,42	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-	-
G1383	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	0,37	0,40	-	-	0,45	-
G1398	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1385	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-
G1382	s	5	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	0,37	0,40	-	-	0,45	-
G1392	s	1	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	1,61	-	-	0,40	-	-	0,45	-
G1392	s	2	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	1,61	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-

G1426	s	1	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	1,61	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1296	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1394	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	1,61	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1437	s	2	0,38	0,47	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	1,61	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1263	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1461	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1418	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	-	-	1,35	-	0,40	-	-	-	-	-
G1406	s	5	0,38	0,47	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	-	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1464	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1463	s	2	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	-	-	1,35	-	0,40	-	-	-	-	-
G1409	s	3	0,38	0,47	0,32	1,10	-	0,42	1,23	-	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1381	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	-	-	-
G1466	s	1	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	1,35	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1402	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1470	s	3	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
G1462	s	4	0,34	0,43	0,32	1,10	1,51	0,42	1,23	1,63	-	-	-	0,40	-	-	0,45	-	-
M989	p	3	0,38	0,47	0,39	-	-	-	-	-	1,61	1,35	0,37	0,44	0,75	0,80	-	0,79	0,67
M1076	p	4	0,38	0,47	0,39	-	-	-	-	-	1,61	1,35	0,37	0,44	0,75	0,80	-	0,79	0,67
M1187	p	5	0,38	0,47	0,39	-	-	-	-	-	1,61	1,35	0,37	0,44	0,75	0,80	-	0,79	0,67
M1301	p	5	0,38	0,47	0,39	-	-	-	-	-	1,61	1,35	0,37	0,44	0,75	0,80	-	0,79	0,67

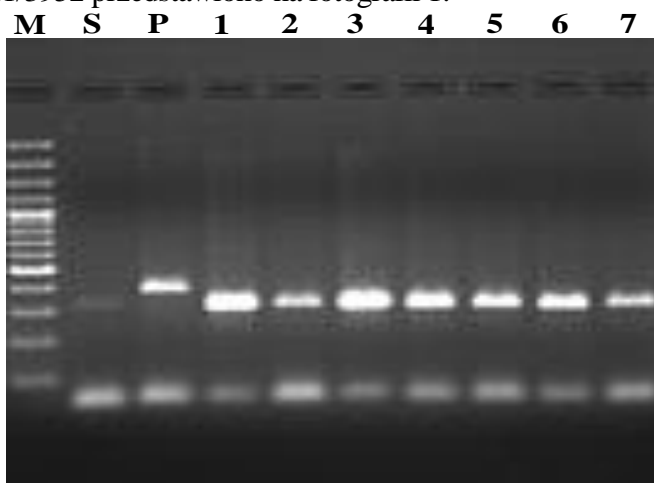
s – roślina z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterylności; plant with the cytoplasmic male sterility trait

p – roślina płodna; fertile plant

- brak amplikonu; amplicon absent

WYNIKI

Wszystkie zastosowane markery DNA generowały produkty specyficzne dla genotypów męskosterylnych/męskopłodnych. Linie dopełniające zostały sklasyfikowane przez wszystkie markery DNA jako męskopłodne (tab. 2). A/B, A321/392, G427/469, I401/435/214 były markerami kodominującymi, generującymi amplikony specyficzne zarówno dla genotypów płodnych (o wielkości odpowiednio: 0,38, 0,39, 0,47, 0,44 kpz), jak i sterylnych (0,34, 0,32, 0,43, 0,40 kpz). Pozostałe to markery dominujące: C1608, D1346, F373, K751, N795, O790, Q672, w wyniku amplifikacji których powstają produkty specyficzne dla roślin męskopłodnych (1,61, 1,35, 0,37, 0,75, 0,80, 0,79, 0,67 kpz) oraz markery dominujące, w wyniku amplifikacji których powstają produkty specyficzne dla roślin męskosterylnych: B1632, E1100, H1508, L422, M451, P1229 (1,63, 1,10, 1,51, 0,42, 0,45, 1,23 kpz). Spośród 17 przetestowanych markerów DNA tylko 5 poprawnie identyfikowało fenotyp analizowanych roślin (tab. 2). Obecność amplikonów 0,32, 0,40 kpz (specyficzne dla genotypów sterylnych) dla markerów A321/392 i I214/401/435 oraz brak produktów o wielkości 0,75, 0,80 i 0,79 kpz (produkty specyficzne dla genotypów płodnych) dla markerów K751, N795, O790 zaobserwowano we wszystkich analizowanych sterylnych liniach marchwi (tab. 2). W przypadku markerów: A/B, G427/469, E1100, H1508, L422, P1229, B1632, C1608, D 1346, F373, M451 oraz Q672 nie wykazano pełnej zgodności profili amplifikacyjnych z fenotypową oceną kwiatu w obrębie badanych linii. Procent zgodności fenotypu z genotypem wynosił odpowiednio: Q672 – 99%, E1100 i L422 – 98%, P1229 – 97%, H1508 – 96%, C1608 i M451 – 94%, B1632 – 93%, F373 – 86%, A/B i G427/469 – 78% oraz 55% dla markera D 1346. Przykładowy rozdział elektroforetyczny amplikonów markera A321/392 przedstawiono na fotografii 1.



Fot. 1. Amplifikacja markera DNA A321/392 w roślinach marchwi z cechą CMS
 Photo. 1. Amplification of A321/392 DNA marker in carrot plants with the CMS trait
 M – marker wielkości DNA, 100 pz; DNA size marker, 100 bp; S – kontrola, roślina z cechą CMS; control, plant with CMS trait; P – kontrola, roślina normalna; control, normal plant

DYSKUSJA

Metody identyfikacji cytoplazmatycznej męskiej sterylności w oparciu o analizę genomu mitochondrialnego opracowano dla wielu gatunków roślin, w tym dla rzepaku (Tinchant i in. 1997), buraka (Bervillé i in. 1990) i słonecznika (Moreau i Bervillé 1991). Natomiast w przypadku cebuli identyfikacja tej cechy opiera się na polimorfizmie chloroplastowego DNA dziedziczonego jak mtDNA – matecznie (Havey 1995). W literaturze dostępne są markery STS (miejsca znalezione sekwencyjnie, ang. sequence-tagged site) dla marchwi, przy pomocy których możliwa jest identyfikacja genotypów płodnych oraz z cechą CMS, a także identyfikacja cytoplazmy typu Cornell i Wisconsin Wild (Nakajima i in. 1999). W innych badaniach bazując na markerach RFLP opracowano kolejne 18 markerów typu SCAR dla 6 genów mitochondrialnych, będących narzędziem w selekcji marchwi z cechą CMS (Bach i in. 2002; Szklarczyk i in. 2000).

W niniejszej pracy sprawdzono przydatność 17 markerów DNA (amplifikujących fragmenty DNA mitochondrialnego) do identyfikacji cytoplazmatycznej męskiej sterylności marchwi typu płatkowego.

Według Bach i in. (2002) amplifikacja markerów D1346, N795, O790 i Q672, oprócz identyfikacji genotypów płodnych, pozwala na wychwycenie reorganizacji w cytoplazmie normalnej. Markery, które w niniejszej pracy poprawnie identyfikowały badaną cytoplazmę, były ściśle związane z cechą CMS (A321) lub z cytoplazmą normalną (A392, I214/435, K751, N795, O790). Markery A/B (Szklarczyk i in. 2000) oraz G427/469 (Bach i in. 2002) sprzężone z genem *atp9* wykazują tę samą segregację, co może świadczyć o ich homologii.

Niepełna zgodność oceny molekularnej z fenotypową może wynikać z dynamicznej natury genomu mitochondrialnego oraz tła genów jądrowych w materiałach wyjściowych użytych do opracowania markerów DNA. Do selekcji marchwi najlepsze są markery A321/392 i I214/401/435, ze względu na ich kodominujący charakter. Pozostałe (K751, N795, O790) są markerami dominującymi, amplifikującymi produkty specyficzne dla cytoplazmy płodnej. Ze względu na różne typy cytoplazmy sterylnej, częste rearanżacje zachodzące w genomie mitochondrialnym oraz transfer genów mitochondrialnych do jądra komórkowego do selekcji materiałów marchwi z cechą CMS należy stosować równoległe kilka markerów dla różnych genów (Martin i Herrmann 1998; Bach i in. 2002).

Ważnym czynnikiem dla kształtowania się kwiatu są warunki środowiska (temperatura i wilgotność powietrza), których oddziaływanie może wpływać na ocenę fenotypową. Wzrost temperatury powyżej 30 °C ma znaczącą rolę w powstawaniu zmian typu petaloid w trzecim okółku kwiatu marchwi (Kitagawa i in. 1994). Podobny wpływ temperatury stwierdzono u mutantów pomidora – układ temperatur 18 °C dzień/15 °C noc sprzyja powstawaniu żywotnego pyłku, a układ 28 °C dzień/23 °C noc sprzyja powstawaniu struktur płatkopodobnych w miejscu pręcików (Sawhney 1983). Dlatego w przypadku omawianej cechy zastosowanie markerów DNA: A321/392, I214/401/435, K751, N795, O790,

których ekspresja nie zależy od warunków środowiskowych, może być dodatkowym źródłem informacji na temat genotypu w pracach hodowlanych ukierunkowanych na otrzymanie nowych mieszańców marchwi w oparciu o cechę CMS.

WNIOSKI

1. Markery A321/392, I214/401/435, K751, N795, O790 są najlepsze do selekcji marchwi z cechą CMS ze względu na 100% zgodność oceny fenotypowej z genotypową badanych linii marchwi.
2. Rozbieżność oceny genotypowej przy użyciu markerów DNA z oceną fenotypową może wynikać z modyfikujących fenotyp warunków środowiska, a mianowicie podwyższonej temperatury i wilgotności powietrza.

Literatura

- Bach I.C., Olesen A., Simon P.W. 2002. PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.). *Euphytica* 127: 353–365. DOI: 10.1023/a:1020314802236.
- Banga O., Petiet J., Van Bennekom J.L. 1964. Genetical analysis of male-sterility in carrots, *Daucus carota* L. *Euphytica* 13: 75–93. DOI: 10.1007/bf00037521.
- Bervillé A., Faivre-Rampant P., Santoni S., Moreau E. 1990. Control of cytoplasmic male-sterile seed stocks by molecular hybridization with a mitochondrial plasmid. *Agronomie* 10: 727–734. DOI: 10.1051/agro:19900904.
- Bino R.J. 1985. Ultrastructural aspects of cytoplasmic male sterility in *Petunia hybrida*. *Protoplasma* 127: 230–240. DOI: 10.1007/bf01276267.
- Collard B.C.Y., Mackill D. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1491): 557–572. DOI: 10.1098/rstb.2007.2170.
- Couvet D., Atlan A., Belhassen E., Gliddon C.J., Gouyon P., Kjellberg F. 1990. Coevolution between two symbionts: the case of cytoplasmic male sterility in higher plants. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7: 225–249.
- Erickson E.H., Garment M.B., Peterson C.E. 1982. Structure of cytoplasmic male-sterile and fertile carrot flowers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 698–706.
- Gupta P.K., Varshney R.K., Sharma P.C., Ramesh B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118(5): 369–390. DOI: 10.1046/j.1439-0523.1999.00401.x.
- Havey M. 1995. Identification of cytoplasmic male sterility using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 263–268. DOI: 10.1007/bf00222212.
- Kitagawa J., Posluszny U., Gerrath J.M., Wolyn D.J. 1994. Developmental and morphological analyses of homeotic cytoplasmic male sterile and fertile carrot flowers. *Sexual Plant Reproduction* 7: 41–50. DOI: 10.1007/bf00241886.
- Kozik E.U., Nowak R., Nowakowska M., Dyki B. 2012. Level of sterility and morphological flowers differentiation of petaloid male-sterile plants of carrot. *Journal of Agricultural Science* 4(2): 187–194. DOI: 10.5539/jas.v4n2p187.
- Köhler R.H., Horn R., Lössl A., Zetsche K. 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Molecular and General Genetics* 227(3): 369–376. DOI: 10.1007/bf00273925.

- Laser K.D., Lersten N.R. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Botanical Review* 38(3): 425–454. DOI: 10.1007/bf02860010.
- Lee S.J., Warmke H.E. 1979. Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *American Journal of Botany* 66: 141–148. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1979.tb06206.x.
- Levings C.S. 1990. The Texas cytoplasm of maize: Cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. *Science* 250(4983): 942–947. DOI: 10.1126/science.250.4983.942.
- Mackenzie S., He S., Lyznik A. 1994. The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiology* 105: 775–780. DOI: 10.1104/pp.105.3.775.
- Majewska-Sawka A., Sadoch Z. 2003. Cytoplazmatyczna męska sterylność roślin – mechanizmy biologiczne i molekularne. *Kosmos* 52(4): 413–423.
- Martin W., Herrmann R.G. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology* 118: 9–17. DOI: 10.1104/pp.118.1.9.
- Morelock T.E., Simon P.W., Peterson C.E. 1996. Wisconsin Wild: Another petaloid male-sterile cytoplasm for carrot. *HortScience* 31: 887–888. DOI: 10.21273/hortsci.31.5.887.
- Moreau E., Bervillé A. 1991. A dot blot assay for the routine determination of maintainer contaminants in cytoplasmic male sterile seed stocks of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Varieties and Seeds* 4: 31–36.
- Nakajima Y., Yamamoto T., Muranaka T., Oeda K. 1999. Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 99(5): 837–843. DOI: 10.1007/s001220051303.
- Overman M.A., Warmke H.E. 1972. Cytoplasmic male sterility in sorghum: II. Tapetal behavior in fertile and sterile anthers. *Journal of Heredity* 63: 227–234. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a108284.
- Ronfort J., Saumitou-Laprade P., Cuguen J., Couvet D. 1995. Mitochondrial DNA diversity and male sterility in natural populations of *Daucus carota* ssp *carota*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 150–159. DOI: 10.1007/bf00220872.
- Sawhney V.K. 1983. Temperature control of male sterility in a tomato mutant. *Journal of Heredity* 74(1): 51–54. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a109718.
- Schnable P.S., Wise R.P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science* 3(5): 175–180. DOI: 10.1016/s1360-1385(98)01235-7.
- Scoles G.J., Evans L.E. 1979. Pollen development in male-fertile and cytoplasmic male-sterile rye. *Canadian Journal of Botany* 57: 2782–2790. DOI: 10.1139/b79-330.
- Simon P.W. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breeding Reviews* 19: 157–190. DOI: 10.1002/9780470650172.ch5.
- Song J., Hedgcoth C. 1994. Influence of nuclear background on transcription of a chimeric gene (*orf256*) and *coxI* in fertile and cytoplasmic male sterile wheats. *Genome* 37(2): 203–209. DOI: 10.1139/g94-028.
- Szklarczyk M., Oczkowski M., Augustyniak H., Börner T., Linke B., Michalik B. 2000. Organisation and expression of mitochondrial *atp9* genes from CMS and fertile carrots. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 263–270. DOI: 10.1007/s001220050035.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos* 54(2–3): 227–239.
- Thompson D.J. 1961. Studies on the inheritance of male-sterility in the carrot, *Daucus carota* L. var. *sativa*. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 78: 332–338.
- Tinchant C., Defrance M.-C., Budar F. 1997. PCR primers for the estimation of contamination by seeds with normal cytoplasm in rapeseed lots bearing male-sterility-inducing Ogu-INRA cytoplasm. *Plant Breeding* 116: 390–392. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb01018.x.