

Rys historyczny badań nad cytoplazmatyczno-genową męską sterylnością w kukurydzy (*Zea mays* L.)

Historical outline of research on cytoplasmic-genic male sterility in maize (*Zea mays* L.)

Monika Żurek  

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

 m.zurek@ihar.edu.pl

Badania nad zjawiskiem męskiej sterylności w kukurydzy rozpoczęły się w latach 30-tych ubiegłego wieku. Od tamtego czasu odnotowano w tej materii wiele osiągnięć, które umożliwiły wytworzenie funkcjonalnego systemu CGMS, z powodzeniem wykorzystywanego w produkcji nasiennej odmian mieszańcowych kukurydzy. W historii badań nad tym zjawiskiem spotykamy również przykłady spektakularnych błędów, wynikających z nadmiernej uniformizacji genetycznej źródeł męskiej sterylności, wykorzystywanych na szeroką skalę w produkcji nasiennej. Niniejsza praca stanowi przegląd historycznych oraz aktualnych doniesień literaturowych dotyczących badań nad cytoplazmatyczno-genową męską sterylnością w kukurydzy.

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczno-genowa męska sterylność, CGMS, *Helminthosporium maydis* race-T

Research on the phenomenon of male sterility in maize began in the 1930s. Since then, there have been many achievements in this matter, which have enabled the creation of a functional CGMS system, successfully used in the seed production of hybrid maize varieties. In the history of research on this phenomenon, we also encounter examples of spectacular errors resulting from excessive genetic uniformity of sources of male sterility, used on a large scale in seed production. This paper is a review of historical and current literature reports on studies on cytoplasmic-gene male sterility in maize.

Key words: cytoplasmic-genic male sterility, CGMS, *Helminthosporium maydis* race-T

Wstęp

Pierwszy przypadek rośliny kukurydzy niewytwarzającej pyłku został opisany przez Rhodes'a w 1933 r., który zidentyfikował rośliny męskosterylne w kukurydzy z Peru. Kolejny przypadek roślin męskosterylnych został zidentyfikowany w 1939 roku w Argentynie (Duvick, 1965). Zarówno linie męskosterylne odkryte przez Rhodes'a jak również te pochodzące z Argentyny, nie zachowały się do czasów teraźniejszych. Dlatego też nic nie wiadomo na temat ich cytotypu oraz genów przywracających płodność w tych liniach (Duvick, 1959). Pierwsze próby wykorzystania zjawiska męskiej sterylności w hodowli kukurydzy przeprowadzili, niezależnie od siebie, jednakże z takim samym rezultatem, dwaj hodowcy – D.F. Richey i H.A. Wallace. W swoich pracach, dążących do wyeliminowania ręcznego kastrowania roślin, bazowali oni na sterylnej cytoplazmie odkrytej przez Rhodes'a. Zakładali oni, że wszystkie linie hodowlane po skrzyżowaniu ze źródłem sterylności dadzą sterylne potomstwo, tak więc w końcowej odmianie F_1 , oprócz nasion z cytoplazmą sterylną będzie konieczna domieszka nasion z cytoplazmą normalną, dających płodne rośliny. W swoich badaniach nie uwzględniali oni genetycznego współdziałania linii hodowlanych ze

źródłem cytoplazmy. Z uwagi na różną stabilność męskiej sterylności, po początkowym entuzjazmie związanym z wykorzystaniem tego zjawiska w hodowli kukurydzy, prace hodowlane zostały zarzucone na parę lat, a źródło sterylnej cytoplazmy odkryte przez Rhodes'a bezpowrotnie utraciono. Wyniki tych prac nie zostały również nigdzie szczegółowo opublikowane (Duvick, 1959). Kolejne próby prac hodowlanych nad wykorzystaniem zjawiska CGMS w hodowli kukurydzy związane były z odkryciem nowego źródła sterylności przez Rogersa i Edwardsona w 1944 roku. Odkrycie źródeł męskiej sterylności w kukurydzy pozwoliło na usprawnienie oraz obniżenie kosztów związanych z produkcją nasiennej odmian mieszańcowych, a także umożliwiło efektywniejsze wykorzystanie potencjału zjawiska heterozji (Su i in., 2017). 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.

Typy cytoplazm męskosterylnych

CMS-T

W 1944 roku Rogers i Edwardson zidentyfikowali sterylność cytoplazmę w meksykańskiej populacyjnej odmianie kukurydzy o nazwie Golden June. Z uwagi na miejsce odkrycia, czyli Texas Agricultural Experiment Station, cytoplazma ta otrzymała nazwę Texas, w skrócie cms-T. Cytoplazma T w latach 1950-1970 była wykorzystywana do produkcji prawie 85% odmian mieszańcowych kukurydzy uprawianych w południowych regionach USA oraz w tzw. pasie uprawy kukurydzy (ang. *corn belt*) obejmującym stany Iowa, Illinois, Indianę, Ohio, Missouri, Kentucky, Minnesotę, oraz wschodnią Nebraskę. Grupa CMS-T składa się z wcześniej zidentyfikowanych cytoplazm HA, I, Q, RS i T, w których płodność przywracają geny *Rf1* i *Rf2*. Z uwagi na wysoką stabilność w różnych warunkach środowiska, cytoplazma T stała się w latach 60-tych ubiegłego wieku najpowszechniej wykorzystywaną cytoplazmą w hodowli odmian mieszańcowych. Główną wadą tej cytoplazmy była, znana od lat 50., podatność na dwa gatunki patogenów grzybowych: *Helminthosporium maydis race-T* (*Bipolaris maydis race-T*), wywołującego chorobę Southern Corn Leaf Blight, oraz *Mycosphaerella zea-maydis*, sprawcę żółtej plamistości liści kukurydzy. W latach 1969-1970 epidemia Southern Corn Leaf Blight w USA spowodowała miliardowe straty (na poziomie ok. 12% ogólnego plonu) w produkcji kukurydzy, co doprowadziło do zaprzestania wykorzystywania cytoplazmy T w produkcji nasiennej na korzyść innych cytoplazm – głównie cytoplazmy C (Tatum, 1971). W 1985 roku 13% produkcji nasiennej odmian mieszańcowych w USA opierało się na wykorzystaniu cytoplazm męskosterylnych cms-C i cms-S (Darrah i Zuber, 1986).

CMS-S

Kolejna z głównych sterylnych cytoplazm w kukurydzy została odkryta w 1957 r., przez Jenkins z USDA. Cytoplazma ta otrzymała nazwę cytoplazmy sterylnej z USDA, w skrócie cms-S. Jest to jedno z najczęściej występujących źródeł sterylności. Do tej samej grupy zalicza się wiele źródeł sterylności: Ca, F, G, H, I, IA, J, K, L, M, ME, ML, MY, PS, R, SD, TA, VG oraz W (Sofi i in. 2007). Wykazano, że za sterylność tego typu cytoplazmy odpowiedzialny jest transkrypt, kodowany przez *ofr355-orf77* w genomie mitochondrialnym, który wykazuje wysoką ekspresję w pyłku sterylnych roślin podczas mikrosporogenezy, co może zakłócać normalną funkcję kompleksu syntazy ATP, prowadząc do zakłócenia wy-

tworzania pyłku. Głównym genem przywracającym płodność pyłku w cytoplazmie S jest gen *Rf3*. Cytoplazma S jest odporna na *Bipolaris maydis race T*, jednakże stosowanie tego typu cytoplazmy w programach hodowlanych jest utrudnione ze względu na wysoką niestabilność sterylności. Za niestabilność sterylności w cms-S odpowiada złożona interakcja wielu czynników genetycznych oraz warunków środowiska (Small i in., 1988; Su i in., 2017). Niestabilność restoracji w cytoplazmie S może być również tłumaczona wrażliwością na temperaturę genu *Rf9*, drugiego z genów przywracających płodność w tej cytoplazmie (Gabay-Laughnan i in., 2009). W literaturze publikowanej w krajach byłego Związku Radzieckiego cytoplazma S nazywana jest często cytoplazmą Mołdawską (M) (Slischuk i in., 2011).

Po odkryciu cytoplazmy T oraz S rozpoczęto prace badawcze nad poznaniem natury zjawiska restoracji, czyli przywracania płodności. Niektóre z badanych linii nie przywracały płodności w żadnej z cytoplazm. Należały one do kolejnej z cytoplazm- zidentyfikowanej przez Becketta w 1971 roku w brazylijskiej kukurydzy, cytoplazmy Charua (cms-C).

CMS-C

Obecnie głównym źródłem sterylnej cytoplazmy, wykorzystywanym na dużą skalę w produkcji odmian mieszańcowych kukurydzy, jest cytoplazma C. Po raz pierwszy rośliny sterylne należące do cytotypu C zostały zidentyfikowane przez Becketta w 1971 roku, w brazylijskiej odmianie kukurydzy Charua. Do grupy cms-C zaliczamy następujące źródła sterylności: RB, E1, EL, ES, BB oraz Bb. W przypadku cytoplazmy C, częstym zjawiskiem jest występowanie częściowego przywracania płodności oraz zjawisko „późnego przełamania sterylności” (ang. *late brake of sterility*), gdzie roślina zaczyna produkować pyłek po przekwitnięciu znamion (Kheyr-Pour, 1981). Na początku kwitnienia, przez okres 5–10 dni wiecha wygląda całkowicie sterylne. Pylniki nie wydostają się z łusek. Po 5-10 dniach, szczególnie po deszczu, następuje spontaniczny wyrzut pylników z otwartymi porami. Liczba pylników i żywotność pyłku zależą w znacznym stopniu od warunków pogodowych. Przy upalnej i suchej pogodzie wyrzucanych jest mniej pylników, a pyłek może stracić żywotność lub być niekonkurencyjny w porównaniu z pyłkiem roślin męskopłodnych. W sprzyjających warunkach wyrzucanych jest więcej pylników z żywym pyłkiem. Sugeruje się, że zjawisko późnego przełamania sterylności jest charakterystyczne tylko dla sterylnych genotypów, posiadających ilościowo dziedziczne czynniki (QTL), które przywracają płodność przy braku głównego genu *Rf4* lub jako efekt działania genów komplementarnych (Sotchenko i in., 2007).

Pochodzenie cytoplazm męskosterylnych

Za powstanie cytoplazm męskosterylnych w kukurydzy odpowiada prawdopodobnie jeden z dwóch modeli zaproponowanych przez Doebley i Sisco (1989): mutacja mitochondrialnego genomu lub introgresja obcej cytoplazmy. Po przeanalizowaniu genomów chloroplastów trzech typów cytoplazm sterylnych udomowionej kukurydzy (C, T i S) oraz jej przodków (*Zea parviglumis*, *Z. perennis*, *Z. diploperennis*, *Z. luxurians*, *Z. mexicana*), znaleziono podobieństwo pomiędzy genomami cytoplazm C i T oraz *Z. parviglumis* (teosinte). Oznacza to, iż cytoplazmy C i T powstały w wyniku mutacji mitochondrialnego genomu. W przypadku cytoplazmy S odnaleziono podobieństwo do genomu cytoplazmatycznego *Z. mexicana*, co świadczy o tym, że ten typ cytoplazmy powstał na drodze introgresji obcej cytoplazmy do kukurydzy udomowionej (Sofi i in., 2007). Dowodem potwierdzającym tezę o powiązaniu cytoplazmy S z dzikimi przodkami kukurydzy, są badania przeprowadzone przez Gabay-Laughnan z zespołem (2004). W badaniach tych zidentyfikowano 46 alleli *Rf* dla cytoplazmy S, w 26 populacjach lokalnych kukurydzy z Meksyku oraz w 6 obiektach *teosinte*. Świadczy to o częstym występowaniu w tym rejonie alleli przywracających płodność cytoplazmie S.

Cms a podatność na choroby

Odkrycie, że linie wsobne posiadające cytoplazmę T są silnie podatne na specyficzne patogeny i produkowane przez nie toksyny (toksyny I, II i V) okazało się dobrodziejstwem dla badań nad mechanizmami męskiej sterylności w kukurydzy (Karr i in., 1975). Badania stymulowane przez epidemię Southern Corn Leaf Blight wykazały, że męska sterylność w cytoplazmie T jest kontrolowana przez ten sam mitochondrialny gen, który jest odpowiedzialny za wrażliwość na toksyny grzybów (Wise i in. 1999; Wu i in., 2012). *T-urf13*, gen mitochondrialny posiadający unikatowe sekwencje chimeryczne, obecny jest jedynie w mitochondriach cytoplazmy typu T. Wykazano, że mitochondrialny polipeptyd o masie 13 kDa (URF13) kodowany przez gen *T-urf13* warunkuje wrażliwość na toksynę T wytwarzaną przez *Bipolaris (Helminthosporium) maydis race T* (Dewey i in., 1987), patogen grzybowy, sprawcę Southern Corn Leaf Blight (SCLB) (Gregor i in., 1978). Groźna dla odmian z cytoplazmą T rasa *Bipolaris maydis race T* została po raz pierwszy zidentyfikowana w szkółce zimowej kukurydzy na Filipinach w 1961 roku, a w uprawach kukurydzy w USA pojawiła się po raz pierwszy w 1969 roku (Burns, 2017). Interakcje URF13 z mitochondriami i toksynami wytwarzanymi przez *Bipolaris maydis race T* zostały dokładnie przebadane (Siedow i in., 1995). Polipeptyd URF13 jest powiązany z wewnętrzną błoną mitochondrialną.

Oligomery wiążą się z toksynami patogenów grzybowych, prowadząc do powstania hydrofilowych porów (Rhoads i in., 1995). URF13 ma trzy membrany obejmujące alfa helisy, a oligomery ulegają konformacji w obecności toksyn grzybów, co umożliwia szybkie zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej (Kempken i Pring, 1999). Dalsze badania wykazały również podatność roślin z cytoplazmą T na sprawcę szarej plamistości liści, *Mycosphaerella zeae-maydis*. Rośliny posiadające gen *T-urf13* są również wrażliwe na insektycyd, methomyl (Glab i in., 1994). W obecności genu *Rf1* przywracającego płodność cytoplazmie T, ilość polipeptydu URF13 znacząco spada (Dewey i in., 1987; Vinod, 2005). W przypadku obecności jedynie genu *Rf2*, ilość polipeptydu URF13 nie spada. Badania przeprowadzone przez Liu i in. (2001) wykazały, że gen *Rf2* koduje produkcję dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), białka potrzebnego do rozwoju pylników. Pomimo zagrożenia związanego z wykorzystaniem cytoplazmy T na szeroką skalę w produkcji nasiennej, nie zrezygnowano z badań nad tą grupą cytoplazm. W 2021 roku Yi z zespołem zaproponowali zwiększenie różnicowania genetycznego grupy cytoplazm T jako sposób na bezpieczny powrót do jej wykorzystania w produkcji nasiennej odmian mieszańcowych kukurydzy. W badaniach tych na drodze mutagenyzy w przestrzeni kosmicznej, z linii wsobnej kukurydzy RP125, uzyskano dwa mutanty *SauS4* oraz *SauS5*, które na podstawie analizy produktów reakcji PCR, zostały zaklasyfikowane jako należące do grupy CMS-T (Yi i in., 2021).

Metody molekularne związane z systemem CGMS w kukurydzy

Użyteczność zjawiska cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterylności w produkcji nasiennej odmian heterozyjnych kukurydzy, wpłynęła również na rozwój metod molekularnych związanych z tą tematyką. Badania molekularne prowadzone w tej tematyce można podzielić na trzy główne grupy: (I) prace badawcze koncentrujące się na opracowaniu szybkich metod pozwalających na określenie typu cytoplazmy, poprzez analizę polimorfizmu regionów mitochondrialnych związanych z cms; (II) identyfikacja markerów molekularnych blisko sprzężonych z genami *Rf* (Slischuk i in., 2011); (III) badania podstawowe dotyczące mechanizmów warunkujących działanie genów *Rf* (Arakawa i in., 2019). W przypadku cytoplazm C i S prowadzone są również badania nad poznaniem genetycznych uwarunkowań niestabilności sterylności. Wykorzystanie nowoczesnych metod molekularnych do zrozumienia istoty zjawisk cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterylności oraz przywracania płodności, jest kluczowe dla zwiększenia wykorzystania tych mechanizmów w produkcji nasiennej odmian mieszańcowych, a także pełnego wykorzystania potencjału

heterozji (Bohra i in., 2016). Określenie typu cytoplazmy można wykonać na różny sposób: metodą krzyżowań testowych z restorerami, metodami biochemicznymi oraz molekularnymi. Niestety, tradycyjne krzyżowanie testowe, które jest najbardziej znaną metodą charakteryzowania typu cytoplazmy kukurydzy, jest procesem czasochłonnym. W celu ułatwienia identyfikacji typu cytoplazmy zaproponowano specyficzne markery molekularne. Metody molekularne bazujące na markerach RFLP są czasochłonne i kosztowne, co czyni je trudnymi do zaaplikowania na szeroką skalę w programach hodowlanych. Liu z zespołem (2002) opracował metodę szybkiego określania typu sterylnej cytoplazmy w kukurydzy, opartą na reakcji PCR i wizualizacji produktów amplifikacji na żelu agarozowym. W tym celu zaprojektowano trzy pary starterów, odpowiadające sekwencjom chimerycznym regionów mitochondrialnego DNA, charakterystycznym dla trzech głównych typów sterylnych cytoplazm (T, C, S):

- CMSTF 5'-CATGAAATGGGTGAAGTCTCTTTC-3'
- CMSTR 5'-AAGAGAAAGGGAGACTTTGGTCCC-3'
- CMSCF 5'-ATGCTAATGGTGTTCGATTC-3'
- CMSCR 5'-AGCATCATCCACATTCGCTAG-3'
- CMSSF 5'-CAACTTATTACGAGGCTGATGC-3'
- CMSSR 5'-AGTTCGTCCCATATACCCGTA-3'

Ignjatović-Micić z zespołem (2006) wykorzystła procedurę identyfikacji typu cytoplazmy opracowaną przez Liu (Liu i in., 2002) do charakterystyki cytotypu 30 obiektów z Maize Gene Bank- Zemun Polje (Belgrad, Serbia). Przeprowadzone analizy wykazały, że wśród badanych obiektów dominującym typem cytoplazmy był typ S. Występował on w 26 z 30 badanych obiektów. Typy T i C zidentyfikowano odpowiednio w dwóch i jednym obiekcie. W przypadku jednego z badanych obiektów, na żelu agarozowym nie zaobserwowano produktów amplifikacji, co może sugerować odkrycie nowego typu cytoplazmy. W 2019 roku Alfalahi z zespołem zaproponowali wykorzystanie markerów RAMs (ang. *Random Amplified Microsatellite markers*) do identyfikacji typu cytoplazmy oraz zależności genetycznych pomiędzy liniami wsobnymi kukurydzy.

Wykorzystanie metod molekularnych pozwala również na mapowanie genów związanych z restoracją bądź wpływających na stabilność cechy męskiej sterility. Określenie markerów molekularnych powiązanych z genami przywracającymi płodność pyłku umożliwia zdefiniowanie właściwości restorujących lub dopełniających danego genotypu względem cytoplazmy sterylnej. Selekcja wspomagana markerami (MAS- z ang. *marker*

assisted selection) pozwala na ograniczenie testów polowych z wykorzystaniem krzyżowań testowych, do niezbędnego minimum (Kohls i in., 2010). Z uwagi na szerokie wykorzystanie cytoplazm C i S w międzynarodowych programach hodowlanych, w literaturze dostępnych jest wiele doniesień, dotyczących identyfikacji genów restorujących względem tych dwóch źródeł sterility. Tang z zespołem (2001) zidentyfikował 3 markery SSR (bnlg1346, bnlg1711, phi058) blisko sprzężone z genem *Rf5*, przywracającym płodność w cytoplazmie C. Dzięki wykorzystaniu techniki cDNA-AFLP, Zhang i Zheng (2008), zidentyfikowali gen *PPRE1*- potencjalny gen przywracający płodność w cytoplazmie S. Istotnym aspektem jest również identyfikacja genów inhibitorowych względem genów *Rf*. Gen *Rf-I*, inhibitor względem genu *Rf5* (restorera płodności w cms-C), został zmapowany na chromosomie 7, jako blisko sprzężony z markerami umc2326 i umc2327 (Hu i in., 2006).

Nowoczesne techniki molekularne mogą również służyć do uzyskiwania linii męskosterylnych. Dobrym tego przykładem jest wykorzystanie techniki edycji genomu, CRISPR/Cas9 (z ang. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*), do uzyskania linii kukurydzy męskosterylnych pozbawionych genu *ZmTMS*. W mutantach pozbawionych tego genu męska sterility zależna była od temperatury (rośliny były sterylne w temperaturze 32°C, a w temperaturze 24°C były płodne) (Li i in., 2017).

Dyskusja

Łatwość uzyskania męskosterylnych form maciecznych oraz wysoka stabilność męskiej sterility, warunkowały szerokie wykorzystanie cytoplazmy T w produkcji nasiennej w latach 50. i 70. ubiegłego wieku w USA. 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 sterility (Abidi i in., 2018). Wykorzystywanie zróżnicowanych genetycznie źródeł sterility 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 unifikacją genetyczną źródeł sterności. Zidentyfikowana w toku prowadzonych prac, duża grupa linii wsobnych kukurydzy, o zdolnościach dopełniających męską sterność 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 Rf_1 i Rf_2 , zapewniających przywrócenie płodności w pokoleniu F_1 , np. w obiektach zgromadzonych w Bankach Genów. 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 sterylnej formy matecznej 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 mechaniczny 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 sterności (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 sterności. 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).

Podsumowanie

Od czasów pierwszych prac z lat 30-tych ubiegłego wieku, zjawisko cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterności w kukurydzy zostało dokładnie przebadane i opisane przez wielu autorów. Zidentyfikowano zarówno korzyści wynikające z wykorzystania tego zjawiska w produkcji nasiennej odmian mieszańcowych kukurydzy, jak również dostrzeżono zagrożenia z nim związane. Dzięki wykorzystaniu metod molekularnych, określenie typu cytoplazmy oraz obecności genów Rf , stało się mniej czasochłonne. Decydując się na wykorzystanie cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterności w produkcji nasiennej odmian mieszańcowych kukurydzy, warto korzystać z tych osiągnięć. Z uwagi na coraz większe znaczenie gospodarcze kukurydzy w Polsce oraz wiodącą pozycję krajowej hodowli, istnieje uzasadniona potrzeba ponownego podjęcia tej tematyki w nasiennictwie polskich odmian mieszańcowych.

Literatura

- Abidi, I., Ali, G., Dar, Z., Wani, S. H., Dar, S. A., Gazal, A. (2018). 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
- Adamczyk, J. (2005). Genetyczne podstawy hodowli kukurydzy. W: Górny A. G (red.) *Zarys Genetyki Zboż*. Tom 2. Pszenżyto, kukurydza i owies. Wyd. IGR-PAN, Poznań, 279-310
- Alfalahi, A. O., There, R. M., Mohammed, M. A., Abdullah, M. H., Dhannoon, O. M., Hussein, Z. T., Drej, M. M. (2019). Molecular discrimination of maize CMS type and genetic relationship using RAMs markers. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 388 (2019) 012043, DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/388/1/012043>
- Arakawa, T., Sugaya, H., Katsuyama, T., Honma, Y., Matsui, K., Matsuhira, H., Kuroda, Y., Kitazaki, K., Kubo, T. (2019). How did a duplicated gene copy evolve into a restorer-of-fertility gene in a plant? The case of *Oma1*. *R. Soc. open sci.* 6: 190853. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.190853>
- Bohra, A., Jhra, U. C., Adhimoalam, P., Bisht, D., Singh, N. P. (2016). Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding of field crops. *Plant Cell Rep.* 35: 967-993, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1949-3>
- Burns, H. A. (2017). Southern Corn Leaf Blight: A story worth retelling. *Agronomy Journal*, 109(4): 1-7
- Darrah, L. L., Zuber, M. S. (1986). 1985 United States farm maize germplasm base and commercial breeding strategies. *Crop. Sci.* 26: 1109-1113

- Dewey, R.E., Timothy, D.H., Levings, III C.S. (1987). A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 48, 5374-5378
- Doebley, J., Sisco, P. (1989). On the origin of maize male sterile cytoplasm. It is completely unimportant, that is why it is so interesting. *Maize Genet. Coop. Newslt.* 6: 147-148
- Duvick, D.N (1959). The use of cytoplasmic male sterility in hybrid seed production. *Economic Botany* 13(3): 167-195
- Duvick, D.N. (1965). Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Adv. Genet.* 13: 1-56
- Gabay-Laughnan, S., Chase, C.D., Ortega, V.M., Zhao, L. (2004). Molecular-genetic characterization of cms-S restorer-of-fertility alleles identified in Mexican maize and teosinte. *Genetics* 166: 959-970
- Gabay-Laughnan, S., Kuzmin, E. V., Monroe, J., Roark, L., Newton, K. J. (2009). Characterization of a novel thermosensitive restorer of fertility for cytoplasmic male sterility in maize. *Genetics* 182(1): 91-103
- Glab, N., Teste, M.-A., Slonimski, P. P. (1994). MRG1-1, a dominant allele that confers methomyl resistance in yeast expressing the cytoplasmic male sterility T-urf13 gene from maize. *Curr Genet* 26: 477-485
- Gregor, P., Matthews, D.E., York, D.W., Earle, E.D., Gracen, V.E. (1978). Southern corn leaf blight disease: studies on mitochondrial biochemistry and ultrastructure. *Mycopathologia*, 66, DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00429601>
- 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-1* an inhibitor of the *Rf5* restorer gene for Cms-C in maize (*Zea mays* L.) *Theor Appl Genet* 113: 357-360
- 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
- Karr, D. B., Karr, A. L., Strobel, G. A. (1975). The toxins of *Helminthosporium maydis* (Race T): A colorimetric determination of the toxins, their appearance in culture and in infected plants. *Plant Physiol* 55: 727-730
- Kempken, F., Pring, D. (1999). Plant breeding: male sterility in higher plants- fundamentals and applications. W: Esser K., Kadereit J. W., Lüttge U., Runge M. (red), *Progress in Botany*, vol. 60. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s.: 139-166
- Kheyr-Pour, A., Gracen, V.E., Everett, H. L. (1981). Genetics of fertility restoration in the c-group of cytoplasmic male sterility in maize. *Genetics* 98: 379-388
- 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
- Królikowski, Z. (1963). Badania nad zjawiskiem męskiej niepłodności i liniami przywracającymi płodność u kukurydzy. *Biul. IHAR* 5-6: 125-130
- Li, J., Zhang, H., Si, X., Tian, Y., Chen, K., Liu, J., Chen, K., Gao, C. (2017). Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene. *J. Genet. Genomics*, 44: 465-468, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.02.002>
- Liu, F., Cui, X., Horner, H. T., Weiner, H., Schnable, P. S. (2001). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *The Plant Cell*, 13: 1063-1078, DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.1063>
- Liu, Z., Peter, S. O., Long, M., Weingartner, U., Stamp, P., Kaeser, O. (2002). A PCR assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. *Crop Sci.* 42: 566-569
- 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, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00012-2>.
- Rhoads, D. M., Levings, C.S 3rd., Siedow, N. (1995). UR-F13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 27(4):437-45
- Siedow, N., Rhoads, D. M., Ward, G. C., Levings, C. S. 3rd. (1995). The relationship between the mitochondrial gene T-urf13 and fungal pathotoxin sensitivity in maize. *Biochim Biophys, 1271*(1): 235-40
- Slisuchuk, 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
- Small, I. D., Earle, E. D., Escote-Carlson, L. J., Gabay-Laughnan, S., Laughnan, J. R., Leavey, C. J. (1988). A comparison of cytoplasmic revertants to fertility from different CMS-S maize sources. *Theor Appl Genet*, 76: 609-618
- Sofi, P.A., Rather, A.G., Wani, S. A. (2007). Genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility in maize. *Commun. Biometry Crop Sci*, 2(1): 49-60
- 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: <https://doi.org/10.3103/S1068367407020048>
- Su, A., Song, W., Shi, Z., Zhao, Y., Xing, J., Zhang, R., Li, C., Luo, M., Wang, J., Zhao, J. (2017). Exploring differentially expressed genes associated with fertility instability of S-type cytoplasmic male-sterility in maize by RNA-seq. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8): 1689-1699
- Tang, J. H., Liu, Z. H., Chen, W. C., Hu, Y. M., Ji, Q. H., Ji, L. Y. (2001). The SSR markers of the main restorer genes for CMS-C cytoplasmic male sterility in maize. *Scientia Agricultura Sinica*, 34: 592-596
- Tatum, L. A. (1971). Southern corn leaf blight. *Science* 171: 1113-1116
- Vinod, K. K. (2005). Cytoplasmic genetic male sterility in plants- a molecular perspective. Proceedings of the training programme on "Advances and Accomplishments in Heterosis Breeding", Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India
- Wise, R. P., Bronson, C. R., Schnable, P. S., Horner, H. T. (1999). The Genetics, pathology, and molecular biology of T-cytoplasm male sterility in maize. *Botany Publication and Papers*, 60.
- Wu, D. Oide, S., Zhang, N., Choi, M. Y., Turgeon, G. (2012). ChLae1 and ChVell1 regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathogens* 8(2): e1002542. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002542>
- Yi, H., Zhang, C., Li, Ch., Wang, J., Yu, T., Liu, Y., Cao, M. (2021). Identification and genetic analysis of two maize CMS-T mutants obtained from out-space-flighted seeds. *Genet Resour Crop Evol*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01107-6>
- Zhang, Z., Zheng, Y. (2008). Identification of candidate genes associated with fertility restoration in maize S cytoplasmic male sterility. *Plant Mol Biol Rep*, 26: 60-71 DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0023-x>