

Iwona Szym-Borowska<sup>1</sup>✉, Joanna Ukalska<sup>2</sup>, Joanna Simińska<sup>3</sup>

## Markery RAPD sprzężone z genami cech ilościowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

Random amplified polymorphic DNA markers linked to quantitative traits loci in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)

**Abstract.** Quantitative variation is a feature of many economically important traits in forest trees, such as yield, quality or disease resistant, which are assumed to be influenced by many interacting loci, and are called quantitative traits loci (QTL). The method for finding and locating QTLs is called QTL mapping and requires multi-locus genotypes (molecular markers) and phenotypes (quantitative traits), which are measured on all individuals of segregating population. Next phenotypic values are statistically associated with genotypic values, usually using multiple regression or maximum likelihood methods to identify markers that have a strong association with the quantitative trait.

This article will describe a modification of QTL analysis, bulk segregant analysis (BSA), that has been shown to work well with genes having major effects and that obviates the need for constructing detailed genetic maps. This approach has been used successfully with composite population of maize to locate QTLs associated with yield under severe drought.

In order to find molecular markers linked to quantitative traits, economically important in Scots pines breeding program we decided to combine two different techniques RAPD and BSA. Half-sib progeny of plus tree have been grouped according to the expression of six economically important traits. To assess the diversity and the separation of progeny groups we used two multivariate statistical methods: hierarchical cluster analysis and principal component analysis (PCA). The largest positive values of correlation coefficients were found for the first principal component and the surface of the needle ( $r = 0.96$ ), its length ( $r = 0.85$ ) and width ( $r = 0.65$ ). The second principal component was strongly correlated with height ( $r = 0.77$ ) and DBH ( $r = 0.68$ ), while the third was positively correlated with the amount of needles ( $r = 0.64$ ). Features strongly correlated with each of the first three principal components identify common genetic factors. We can conclude that the most important genetic factor, which makes the largest part of the variability of phenotypic traits, is factor responsible for the characteristics of the leaf. The second main component can be regarded as a genetic factor responsible for the development of the main stem (trunk), and a third factor is responsible for the foliage.

We analyzed 10 primer combinations and identified locus OPA02-1500bp, probably linked to height and DBH. In the future this approach can be also extended to the study another quantitative traits.

**Key words :** RAPD, BSA , quantitative traits, *Pinus sylvestris*.

### 1. Wstęp

Hodowla roślin jest bardzo dynamicznie rozwijającą się dyscypliną nauk stosowanych. Ważnym celem ho-

dowców jest ulepszanie gatunków pod kątem cech odpowiadających potrzebom człowieka. U drzew leśnych większość pożądaných cech użytkowych i adaptacyjnych, takich jak: wysokość drzewa, właściwości

<sup>1</sup> Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, ul. Braci Leśnej 3, Sękocin Stary, 05-090 Raszyn; ✉ Fax +48 22 7150313, e-mail: I.Szyp@ibles.waw.pl

<sup>2</sup> Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Zakład Biometrii, Katedra Ekonometrii i Statystyki, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

<sup>3</sup> Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Biochemii, ul. Nowoursynowska 159, blok 37, 02-776 Warszawa

drewna czy odporność na działanie czynników biotycznych i abiotycznych, kontrolowana jest wielogenowo (Sewell et al. 2002). Ten typ cechy nazywany jest cechą ilościową, a obszary na chromosomie, w których zlokalizowane są geny kontrolujące tę cechę, to loci cechy ilościowej – QTL (ang. quantitative trait loci). Cecha uwarunkowana przez wiele genów może osiągać różne natężenie, od niedostrzegalnego w fenotypie do bardzo wyraźnego, dlatego wskazanym jest ustalenie wiarygodnej metody wyznaczania osobników o najbardziej cennych genotypach. Poznanie podstaw dziedziczenia ważnych gospodarczo cech drzew leśnych jest szczególnie ważne dla zapewnienia trwałości zasobów leśnych i ich wydajności. W tym kontekście, każde dodatkowe narzędzie kierujące procesem selekcji, które poprawi ocenę wartości genetycznej i zredukuje czas wykonania oceny jest szczególnie ważne.

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris*) jest najważniejszym gatunkiem lasotwórczym i użytkowym w Polsce. Ponad 72% pozyskania grubizny drewna przypada na gatunki iglaste, z czego około 70% stanowi sosna zwyczajna. Udział sosny wynosi 69% składu gatunkowego lasów w Polsce, dlatego właśnie ten gatunek wybrano do analizy genetycznej kontroli cech przyrostowych.

Większość badań genetyki klasycznej wymaga środków i procedur generalnie nieosiągalnych dla genetyków leśnych, takich jak linie wsobne, kolekcjonowanie charakterystycznych mutantów. Stąd zapewne powszechne stwierdzenie, że drzewa leśne są trudnym obiektem analiz genetycznych. W przypadku drzew iglastych dużą zaletą jest możliwość wykorzystania tkanki megagametofitu. Każdy megagametofit jest bowiem ekwiwalentem wkładu drzewa matecznego w powstanie zarodka, dlatego możliwa jest bezpośrednia analiza dziedziczenia loci genetycznych, bez konieczności używania krzyżówek kontrolowanych.

Zwykle używana metoda identyfikacji loci cech ilościowych (QTL) wymaga zastosowania populacji mapującej, którą stanowi pełne rodzeństwo lub półrodzeństwo i w której każdy osobnik jest genotypowany za pomocą markerów molekularnych. Innym podejściem, według którego osobniki populacji mapującej mogą zostać pogrupowane stosownie do natężenia danej cechy i analizowane pod względem różnic we frekwencji alleli wewnątrz każdej z grup, jest metoda analizy zbiorczych pul DNA (ang. BSA – bulk segregant analysis). Metodę zbiorczych pul DNA rozwinęli Michelmore i współpracownicy (1991), którzy wykorzystali to podejście do mapowania genów sałaty związanych z jej odpornością na patogeny. W badaniach drzew leśnych jako pierwszy metodę tę zastosował Devey i wsp. (1995) do mapowania genu odporności *Pinus lambertiana* na rdzę kory wejmutki (*Cronartium ribicola*). Kolejne przykłady

wykorzystania metody BSA zakończone sukcesem także dotyczyły mapowania genów odporności na patogeny: genów wiązu drobnolistnego na *Stegophora ulmea* (Benet et al. 1995), genów hybryd topoli na *Melampsora larici – populina* (Cervera et al. 1996, Villar 1996) oraz genów sosny taeda na *Cronartium quercuum* (Wilcox et al. 1996). Metodę BSA wykorzystano także do zmapowania genu świerka pospolitego kontrolującego ujawnienie fenotypu o wysmukłej koronie (Lehnera et al. 1995). Quarrie i współpracownicy (1999) zaproponowali wykorzystanie metody BSA w badaniach nad odpornością kukurydzy (*Zea mays* L.) na suszę, czyli cechą kontrolowaną przez wiele genów. Badania te pokazały, że analiza zbiorczych pul DNA może być wykorzystywana nie tylko do identyfikacji markerów cech kodowanych przez pojedyncze geny, ale także takich, które mają charakter ilościowy, lecz kontrolowane są przez geny o dużym efekcie fenotypowym. Markery molekularne, które wykazują polimorfizm pomiędzy rodzicami oraz są silnie sprzężone z locus cechy ilościowej o dużym efekcie fenotypowym, będą wówczas segregowały allele z danym locus w potomstwie (Quarrie et al. 1999), czyli inaczej markery sprzężone z locus cechy ilościowej będą wspólnie dziedziczone.

Wraz z rozwojem technologii markerów molekularnych pojawiły się nowe możliwości powiązania określonej cechy z wynikami kontroli genetycznej. Stosując markery RAPD, które mają charakter dominujący, do wykorzystania metody BSA wymagana jest niewielka próba osobników (około 10) w obu grupach segregantów. Prawdopodobieństwo, że niezwiązany locus jest polimorficzny w obu grupach 10 osobników wynosi  $2 \times 10^{-6}$  (Michelmore et al. 1991).

W artykule przedstawiono zmodyfikowaną procedurę analizy loci cech ilościowych, w której do określenia sprzężenia z markerami RAPD, wykorzystano zbiorcze pule DNA.

## 2. Materiały i metody

### Materiał

Materiał roślinny stanowiło potomstwo drzewa doborowego sosny (ród 167), pochodzące z wolnego zapylenia, z plantacyjnej uprawy nasiennej, założonej w 1990 roku, zlokalizowanej w Nadleśnictwie Skiernewice, Leśnictwo Ryłsk. Jedynym kryterium wyboru była odpowiednio liczna reprezentacja potomstwa. W badanym zbiorze 124 osobników potomnych analizowano sześć cech: pierśnicę na wysokości 1,3 m – *DBH*, wysokość drzewa – *H*, liczbę igieł na pędzie I rzędu na długości 10 cm od pączka wierzchołkowego, szerokość

igły, długość igły oraz powierzchnię igły. Materiał badawczy stanowiły igły zebrane z drzewa matecznego i 124 drzew potomstwa oraz szyszki. Z 30 zebranych szyszek dla każdego drzewa wyłuszczone nasiona. Po odskrzydleniu i oddzieleniu nasion pustych, pozostałe wysiano na bibułowe krążki. Po 7 dniach od skiełkowanych siewek oddzielano megagametofit. Z uzyskanej tkanki megagametofitu i z igieł ekstrahowano DNA genomowy. Ekstrakcję DNA prowadzono z użyciem zestawu do izolacji Dneasy Plant Kits firmy QIAGEN według procedury producenta. Oceny jakościowej i ilościowej otrzymanego DNA dokonywano przez rozdział elektroforetyczny w 0,8% żelu agarozowym w buforze 0,5×TBE.

### Analiza zbiorczych pul DNA

#### Metody statystyczne

Do oceny zróżnicowania oraz wydzielenia grup potomstwa zastosowano dwie wielowymiarowe metody statystyczne, wzajemnie się uzupełniające, tj. hierarchiczną analizę skupień (ang. – hierarchical cluster analysis) (Mohammadi, Prasanna 2003; Crossa, Franco 2004) oraz analizę składowych głównych PCA (PCA – ang. principal component analysis).

Analiza składowych głównych została przeprowadzona w celu oceny zróżnicowania potomstwa pod względem badanych cech fenotypowych. Wyznaczono współczynniki korelacji między składowymi głównymi a wartościami średnich dla poszczególnych cech. Na podstawie bezwzględnej wartości współczynników korelacji można stwierdzić, które cechy charakteryzują się największą mocą dyskryminacyjną, czyli różnicującą badaną populację (Ukalska et al. 2007).

W celu wyznaczenia grup potomstwa podobnego pod względem badanych ilościowych cech fenotypowych zastosowano hierarchiczną analizę skupień metodą Warda (Ward 1963). Jako miarę podobieństwa wzięto kwadrat odległości euklidesowej między potomkami, którą obliczono na podstawie wartości średnich dla 6 rozważanych cech w skali standaryzowanej dla każdej z nich (Krzanowski 1988). Liczba homogenicznych grup potomstwa została wyznaczona na podstawie kryterium skupień sześciennych (Sarle 1983). Jest to jedno z kilku możliwych do zastosowania statystycznych kryteriów służących do obiektywnego podziału obiektów na grupy jednorodne pod względem wielowymiarowym (Crossa, Franco 2004).

Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą obu zastosowanych metod wielowymiarowych wykonano wykres wydzielonych grup genotypów w układzie dwóch pierwszych składowych głównych.

Obliczenia potrzebne do wykonania podanych analiz statystycznych oraz prezentowany w pracy wykres wykonano przy użyciu procedur FASTCLUST i PRINCOMP oraz procedur graficznych pakietu SAS (Khattree i Naik 2000, SAS/STAT User's Guide, 2004).

### Analiza RAPD

Najprostszą w wykonaniu techniką, która pozwala na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA na obszarze całego genomu, jest opracowana przez Williamsa i wsp. (1990) metoda RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA), wykorzystująca losowo amplifikowany polimorficzny DNA. Metoda ta wykorzystuje pojedynczy, 10-nukleotydowy starter o losowo wybranej sekwencji. W celu zidentyfikowania polimorficznych fragmentów DNA przetestowano 10 starterów: OPA02, OPA06 OPA11, OPE08, OPD12, OPE09, OPG04 OPG09, OPG10 i OPW09 (Opreon Technologies, Alameda, California, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 10 ng DNA, 0,2 μM starter, 5,5 μM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 1 × bufor do polimerazy DNA, 1 U Polimerazy Taq (QIAGEN).

Każda reakcja PCR była przeprowadzona według programu obejmującego 40 cykli: 1 min – 94°C, 1 min – 37°C i 2 min – 72°C. Program poprzedzony był 1,5-minutowym okresem denaturacji w temp. 94°C i kończył się 10-minutowym wydłużaniem produktów w temperaturze 72°C. Produkty reakcji PCR rozdzielano w barwionym bromkiem etydyny 2% żelu agarozowym w buforze TBE.

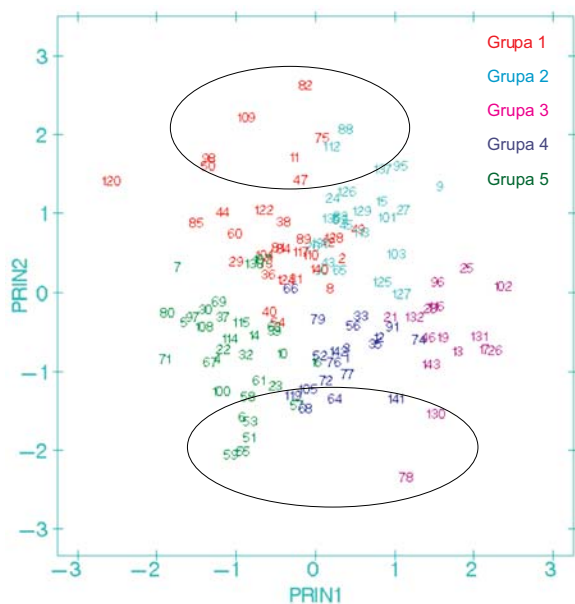
## 3. Wyniki

W przedstawionych badaniach zastosowano markery RAPD i metodę BSA do identyfikacji fragmentów DNA sprzężonych z loci cech ilościowych analizowanych dla potomstwa sosny zwyczajnej, pochodzącego z wolnego zapylenia. Drzewa pogrupowane zostały według ekspresji sześciu analizowanych cech. Wyniki analizy składowych głównych przedstawiono w tabeli 1. Trzy pierwsze składowe główne wyjaśniały łącznie 82% całkowitej zmienności średnich wszystkich badanych cech w populacji mapującej sosny. Największe wartości dodatnie współczynników korelacji pierwszej składowej głównej stwierdzono z powierzchnią igły ( $r=0,96$ ), jej długością ( $r=0,85$ ) oraz szerokością ( $r=0,65$ ). Druga składowa była silnie skorelowana z wysokością ( $r=0,77$ ) i pierśnicą ( $r=0,68$ ), natomiast trzecia składowa była dodatkowo skorelowana z liczbą igieł ( $r=0,64$ ). Cechy silnie skorelowane z każdą z trzech pierwszych głównych składowych są podstawą identyfikacji wspólnych czynników genetycznych. Można zatem stwierdzić, że

**Tabela 1. Korelacja między trzema pierwszymi składowymi głównymi PRIN1, PRIN2 i PRIN3 a 6 cechami fenotypowymi potomstwa oraz skumulowana wariancja wyjaśniana przez trzy pierwsze składowe główne**

Table 1 Correlation between the first three principal components (PRIN1, PRIN2 and PRIN3) and 6 phenotypic traits of offspring and the cumulative variance explained by first three principal components

Cecha Trait	Współczynniki korelacji Correlation coefficients		
	PRIN1	PRIN2	PRIN3
Pierśnica DBH	0,32	0,68	-0,47
Wysokość Height	0,33	0,77	-0,14
Liczba igieł Needle number	-0,42	0,47	0,64
Szerokość igły Needle width	0,65	-0,50	-0,18
Długość igły Needle length	0,85	0,15	0,40
Powierzchnia igły Needle surface	0,96	-0,08	0,25
Skumulowana wariancja całkowita, % Total cumulative variance, %	41,0%	66,8%	82,0%



**Rycina 1. Rozmieszczenie populacji w przestrzeni pierwszej (PRIN1) i drugiej (PRIN2) składowej głównej. Na wykresie oddzielono dwie grupy osobników o skrajnych wartościach cechy, które posłużyły do utworzenia dwóch zbiorczych pul DNA**

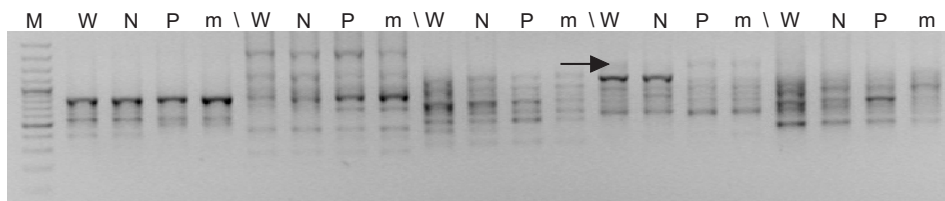
Figure 1. Distribution of the population in the area of the first (PRIN1) and second (PRIN2) main components. In the graph there are separated two groups of subjects with extreme values of the features that were used to create two pooled DNA pools

najważniejszym czynnikiem genetycznym spośród tych, które warunkują rozpatrywane zmienne, jest czynnik odpowiedzialny za cechy liścia. Czynnik ten powoduje największą część zmienności badanych cech fenotypowych. Drugą główną składową można traktować jako czynnik genetyczny odpowiedzialny za wykształcenie pędu głównego (pnia), a trzecią jako czynnik odpowiedzialny za ulistnienie.

Za pomocą hierarchicznej analizy skupień oraz na podstawie wartości statystyki kryterium skupień sześciennych podzielono badane potomstwo na 5 grup, homogenicznych pod względem rozważanych 6 cech fenotypowych. Wartości średnie i współczynniki zmienności cech fenotypowych dla tych grup przedstawiono w tabeli 2. Wyznaczone grupy potomstwa ukazano graficznie w przestrzeni dwóch pierwszych składowych głównych PRIN1 i PRIN2 (ryc. 1). Wykres taki pozwala na scharakteryzowanie populacji jednocześnie pod względem tych cech, które były silnie skorelowane ze składowymi głównymi. Na podstawie przedstawionego wykresu można scharakteryzować wydzielone grupy oraz pojedyncze osobniki. Przykładowo, osobnik 120, z grupy oznaczonej kolorem czerwonym, charakteryzuje się najmniejszymi wartościami cech silnie, dodatnio skorelowanymi z pierwszą składową główną PRIN1, czyli jest to osobnik o najkrótszych i najwęższych igłach. Jednocześnie, osobnik ten charakteryzuje się wyższymi niż średnia wartościami cech silnie skorelowanych z drugą składową główną PRIN2, tj. wyższą niż średnia wysokością i pierśnicą. Do tej samej grupy należy drzewo oznaczone numerem 82, które charakteryzuje się średnimi wartościami cech silnie dodatnio

**Tabela 2. Wartości średnie  $\bar{x}$  i współczynniki zmienności CV (%) dla 5 grup potomstwa wydzielonych metodą Warda**  
 Table 2. The mean values  $\bar{x}$  and coefficients of variation CV (%) for the 5 groups of offspring separated by Ward's method

Cecha Trait	1		2		3		4		5		Ogółem Total	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
Średnica DBH	162,72	11	231,17	10	203,03	11	196,50	11	184,94	13	194,69	16
Wysokość Height	829,38	11	1037,00	8	980,31	8	861,50	7	953,13	8	929,60	12
Liczba igiel Needle number	84,89	12	81,62	9	86,46	14	70,54	9	72,13	15	80,70	14
Szerokość igły Needle width	1,98	6	2,06	5	1,85	6	2,14	6	2,21	5	2,02	9
Długość igły Needle length	54,09	11	64,42	10	60,91	10	61,81	9	75,02	5	61,79	14
Powierzchnia igły Needle surface	231,34	11	290,78	10	247,57	14	286,77	9	366,13	7	273,37	19



**Rycina 2. Produkty reakcji PCR ze starterami: OPW09 - pierwsze cztery ścieżki, kolejne: OPA11, OPE09, OPA02 i OPA06 dla obu pul zbiorczych 'W' i 'N' oraz dla drzewa matecznego 'P' oraz megagametofitu 'm'. M – 100 bp Ladder DNA (MBI Fermentas)**

Figure 2. Products of PCR-reaction with primers: OPW09 – the first four tracks, further: OPA11, OPE09, OPA02 and OPA06 for both bulk pools 'W' and 'N' and the female trees 'P' and megagametophyte m. M – 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

skorelowanych z pierwszą składową główną i jednocześnie najwyższymi wartościami cech silnie skorelowanych z drugą składową główną, tj. wysokością i pierśnicą.

Spośród sześciu badanych cech do analizy sprzężenia z markerami RAPD wybrano cechy skorelowane z drugą składową tj.: wysokość i pierśnicę. Cechy te stanowiły przedmiot wielu wcześniejszych badań (Bradshaw et al. 1995; Byrne et al. 1997; Emebiri et al. 1997; Kaya et al. 1999; Kubisiak et al. 1997; Plemion et al. 1996; Wu 1998; Yoshimura et al. 1998). Dla sosny zwyczajnej zidentyfikowano 0–3 QTL-i sprzężonych z wysokością i pierśnicą, charakteryzujących się dużym efektem fenotypowym – 11,5–12,5% dla wysokości, i – 9,3–15% dla pierśnicy (Larceteau et al. 2000).

Analizy statystyczne pozwoliły na wyznaczenie dwóch pul zbiorczych DNA. Pierwsza składała się z 10 połączonych ilościowo próbek DNA wyizolowanych z roślin o najwyższych wartościach analizowanej cechy, wyznaczonych na podstawie wykresu przestrzennego dwóch pierwszych głównych składowych, druga mieszanina zawierała DNA o skrajnie najniższych war-

tościach cechy. I tak drzewa najwyższe o największej pierśnicy oznaczono literą „W” i włączono do tej grupy osobniki 82, 109, 75, 88, 112, 11, 98, 50, 47, 137, natomiast grupę drzew najniższych o najmniejszej pierśnicy, którą stanowiły osobniki 78, 51, 53, 6, 65, 59, 68, 64, 130, 141, nazwano „N”. Obie grupy roślin zawierają, z założenia, bardzo zbliżone ilości DNA, a co się z tym wiąże, produkty amplifikacji są bardzo podobne, z tą różnicą, że markery RAPD związane z badaną cechą są bardziej intensywne w jednej grupie i mniej intensywne lub nieobecne w grupie drugiej.

Dla utworzonych w ten sposób grup zbiorczych pul DNA prowadzono analizę zmienności markerów RAPD przy użyciu 10 starterów. Starter OPA02 wykazywał polimorfizm pomiędzy grupami „W” i „N” (ryc. 2). Obecność fragmentu wielkości 1500 pz w grupie osobników wysokich i u drzewa matecznego oraz brak tego fragmentu w drugiej skrajnej grupie zbiorczej mogą wskazywać na sprzężenie tego markera z analizowaną cechą – wysokością drzewa.

#### 4. Dyskusja

Możemy wyróżnić dwa zasadnicze sposoby identyfikacji markerów sprzężonych z cechami fenotypowymi. Pierwszy, analiza QTL, opiera się na genotypowaniu całego potomstwa i osobników rodzicielskich za pomocą markerów gęsto pokrywających cały genom, a następnie badaniu związków między fenotypowymi różnicami a genotypami. Jest to postępowanie czasochłonne i kosztowne. Drugie podejście, analiza zbiorczych grup segregantów, opiera się na genotypowaniu tylko tej części potomstwa, której fenotyp skrajnie odbiega od średniej pod względem analizowanej cechy. O istnieniu sprzężenia wnioskuje się na podstawie różnic częstości alleli między grupami roślin o skrajnych fenotypach (Lebowitz et al. 1987). Jest to najprostsze i najtańsze podejście bo wymaga analizy DNA tylko dwóch połączonych grup osobników, reprezentujących dwie fenotypowe skrajności (Giovannoni et al. 1991; Michelmore et al. 1991). Podczas gdy analiza QTL oferuje bardziej precyzyjne narzędzie dla lokalizacji genów regulujących ekspresję genów, BSA jest alternatywą, która pozwala uniknąć genotypowania wszystkich osobników w populacji i znacznie skrócić czas analizy oraz zredukować koszty.

Metoda BSA była bardzo skuteczna w konstruowaniu map genetycznych roślin przy użyciu markerów RFLP i SSR dla cech kontrolowanych przez pojedyncze geny (np. Barua et al. 1993; Hormaza et al. 1994; Villar et al. 1996; van Treuren 2001; Zhang al. 2002), a również w przypadku cech ilościowych (QTL), dla których zidentyfikowano 2–3 geny główne (Quarrie et al. 1999). Otrzymane w prezentowanej pracy wyniki wskazują na to, że metoda RAPD/BSA może być także pomocna w hodowli sosny zwyczajnej poprzez selekcję osobników o pożądanym cechach, bez potrzeby konstruowania szczegółowych map genetycznych. Procedura RAPD/BSA może mieć zatem praktyczne zastosowanie w przypadku wielu gatunków drzew leśnych, dla których nie ma jeszcze map genetycznych, służąc do szybkiej identyfikacji cennych genotypów. Ciekawym wydaje się być fakt, że dla badanej populacji sosny, dla której została także wyznaczona mapa genetyczna w oparciu o markery AFLP, zidentyfikowano QTL, które wykazało sprzężenie z wysokością drzewa (dane niepublikowane).

Następnym krokiem w analizie sprzężenia markerów DNA z cechami ilościowymi, powinno być zwiększenie liczby zastosowanych markerów oraz zastosowanie markerów o większym polimorfizmie. Rozwój technologii i metodologii genotypowania mutacji punktowych (SNP – ang. single nucleotide polymorphism), użytecznych w badaniach z zakresu genomiki człowieka, oferuje możliwość wykorzystania tych narzędzi także w

hodowli roślin, co wpłynie znacząco na zwiększenie efektywności metody BSA (Xu i Crouch 2007).

#### Podziękowania

Artykuł przygotowano w ramach projektu badawczego 2P06L\02829

#### Literatura

- Barua U.M., Chalmers K.J., Hackett C.A., Thomas W.T., Powell W., Waugh R. 1993. Identyfikacja markerów RAPD powiązanych z locus odporności na *Rhynchosporium secalis* w jęczmień używając linii bliskoizogenicznych i bulki segregantów. *Heredity*, 71: 177–184.
- Benet H., Guries R.P., Boury S., Smalley E.B. 1995. Identyfikacja markerów RAPD powiązanych z genem odporności na czarna plama liści w drzewie chińskim. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 1063–1073.
- Bradshaw H.D., Stettler R. 1995. Genetyka molekularna wzrostu i rozwoju w *Populus*. IV. Mapowanie QTLs z dużymi efektami na wzrost, formę i cechy fenologiczne w drzewie lasu. *Genetics*, 139: 963–973.
- Byrne M.J., Murrell J.C., Owen J.V., Kriedeman P., Williams E.R., Moran G. 1997. Identyfikacja i działanie ilościowego cechu wpływającego na wysokość siewki i powierzchnię liści w *Eucalyptus nitens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 674–681.
- Cervera M.T., Gusmão J., Steenackers M., Peleman J., Storme V., Vanden Broeck A. et al. 1996. Identyfikacja markerów AFLP molekularnych dla odporności na *Melampsora larici-populina* w *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 733–737.
- Crossa J., Franco J., 2004. Metody statystyczne dla klasyfikacji genotypów. *Euphytica*, 137: 19–37.
- Devey M.E., Delfino-Mix A., Kinloch B.B., Neale D.B. 1995. Markery DNA wielokrotnie powielone powiązane z genem odporności na białą plamę sosny cukrowej. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 2066–2070.
- Emebiri L.C., Devey M.E., Mathesen A.C., Slee M.V. 1997. Powiązanie markerów RAPD z NESTUR, cechy wzrostu siewki sosny. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 119–124.
- Giovannoni J.J., Wing R.A., Ganai M.W., Tanksley S.D. 1991. Izolacja markerów molekularnych z konkretnego odcinka chromosomu istniejącej populacji. *Nucleic Acids Research*, 19: 6553–6558.
- Hormaza I.J., Dollo L., Polito V.S. 1994. Identyfikacja markerów RAPD powiązanych z determinacją płci w *Pistacia vera* używając bulki segregantów. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 9–13.
- Kaya Z., Sewell M., Neal D. 1999. Identyfikacja QTLs wpływających na roczny przyrost wysokości i średnicy w sosny. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 586–592.

- Khattree R., Naik D.N. 2000. Multivariate data reduction and discrimination with SAS software. Cary, NC, SAS Institute Inc., ISBN 1-58025-696-1.
- Krzanowski W.J. 1988. Principles of multivariate analysis: a users's perspective. Oxford, Oxford University Press, 563 ss. ISBN 0198522118.
- Kubisiak T.L., Nelson C.D., Stine M., 1997.. RAPD mapping of genomic regions influencing early height growth in longleaf pine × slush pine F1 hybrids. *Proceedings of the Southern Forest Tree Improvement Committee*, 24: 198–206.
- Lerceteau EC, Plomion C, Andersson B (2000) AFLP mapping and detection of quantitative trait loci (QTLs) for economically important traits in *Pinus sylvestris*: a preliminary study. *Molecular Breeding*, 6: 451–458
- Lebowitz R.L., Soller M., Beckmann J.S. 1987. Trait-based analysis for the detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in cross between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 73: 556–562.
- Lehner A., Campbell M.A., Wheeler N.C., Pöykkö T., Glössel J., Kreike J., Neale D.B. 1995. Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. *pendula*). *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1092–1094.
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. 1991. Identification of markers linked to disease- resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 9828–9832.
- Mohammadi S.A., Prasanna M. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants – Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Science*, 43: 1235–1248.
- Neale D.B. 2007. Genomics to tree breeding and forest health. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17: 539–44.
- Plomion C., Durel C.E. 1996. Genetic dissection of height in maritime pine seedlings raised under accelerated growth conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 849–858.
- Quarrie S.A., Lazić-Jančić V., Kovačević D., Steel A., Pekić S. 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1299–1306.
- Sarle W.S.1983. Cubic Clustering Criterion. SAS Technical Report A-108. Cary, NC, SAS Institute Inc.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Publishing ISBN: 978-1-59047-243-9.
- Sewell M.M., Neale D.B., Brown G.R. 2002. Molecular dissection of the quantitative inheritance of wood property traits in loblolly pine. *Annals of Forest Science*, 59: 595–605.
- Ukalska J., Mądry W., Ukalski K., Masny A. 2007. Wielowymiarowa ocena różnorodności fenotypowej w kolekcji zasobów genowych truskawki (*Fragaria × ananassa* Duch.). I. Analiza zmienności. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 517: 749–758
- van Treuren R. 2001. Efficiency of reduced primer selectivity and bulked DNA analysis for the rapid detection of AFLP polymorphisms in a range of crop species. *Euphytica*, 117: 27–37.
- Villar M. 1996. Molecular Genetics of Rust Resistance in Poplars (*Melampsora larici populina* Kleb / *Populus* sp.) by Bulk Segregant Analysis in a 2 X 2 Factorial Mating Design. *Genetics*, 143: 531–536.
- Ward J.H., Jr. 1963. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of American Statistic Association*, 58: 236–244.
- Wilcox P.L., Amerson H.V., Kuhlman E.G., Liu B.H., O'Malley D.M., Sederoff R.R. 1996. Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 3859–3864.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
- Wu R.L., Bradshaw H.D, Stettler R.F. 1998. Developmental quantitative genetics of growth in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 1110–1119.
- Xu Y., Crouch J.H., 2007. Marker – assisted selection in plant breeding : From publication to practice. *Crop Science*, 48: 391–407.
- Yoshimaru H., Ohba K., Tsurumi K., Tomaru N., Murai M., Mukai Y. et al. 1998. Detection of quantitative trait loci for juvenile growth, flower bearing and rooting ability based on a linkage map of sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 45–50.
- Zhang J., Xu X., Wu Y., Zhu L. 2002. A bentazol and sulfonylureal sensitive mutant: breeding, genetics, and potential application in seed production of hybrid rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 16–22.