

ZBIGNIEW BRODA <sup>1</sup>  
AGNIESZKA TOMKOWIAK <sup>1</sup>  
KRZYSZTOF MOLIŃSKI <sup>2</sup>  
JÓZEF ADAMCZYK <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademii Rolniczej w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Akademii Rolniczej w Poznaniu

<sup>3</sup>Hodowla Roślin Smolice

## Badanie podobieństwa genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi mieszańców liniowych kukurydzy przy użyciu markerów molekularnych AFLP i RAPD

### The evaluation of genetic similarity between parental components of maize hybrids by means of molecular markers AFLP and RAPD

Przedmiotem badań było dziesięć mieszańców liniowych kukurydzy wraz z komponentami rodzicielskimi. Celem pracy było wykazanie zależności efektu heterozji u form mieszańcowych od podobieństwa genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP pomiędzy formami rodzicielskimi. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że u wszystkich analizowanych mieszańców większość cech struktury plonu przyjmowała istotnie wyższe średnie wartości niż średnie wartości tych cech obojga rodziców. Efekty heterozji zarówno względem lepszego z rodziców jak i względem średniej obojga rodziców korelowały się z podobieństwem genetycznym pomiędzy ich komponentami rodzicielskimi określonym na podstawie markerów AFLP. Podobieństwo genetyczne określone przy pomocy markerów RAPD nie korelowało się z efektem heterozji u form mieszańcowych.

**Słowa kluczowe:** heterozja, kukurydza, podobieństwo genetyczne

Ten maize hybrids and their parental lines were the major object of the work. The main purpose of the study was to prove relations between heterosis effect of hybrids and genetic similarity of their parental lines, determined by means of RAPD and AFLP molecular markers. All the hybrids, compared to the parental forms, showed significantly higher values of most of yield structure features. When related both to the better parent and to the average values of both parents, the heterosis effects correlated with genetic similarity between the parental lines, as determined with the use of AFLP markers. Genetic similarity of parental lines determined by means of RAPD markers did not correlate with the heterosis effects of the resulting hybrids.

**Key words:** genetic similarity, heterosis, maize

## WSTĘP

W ostatnich latach hodowcy mają możliwość korzystania z nowych metod pomagających ocenić zmienność genetyczną, którą manipulują, na podstawie sprzężeń markerów z daną cechą (markery izoenzymatyczne) lub na podstawie bezpośredniej analizy DNA. Wykorzystanie markerów może zwiększyć efektywność procesu hodowlanego i skrócić czas potrzebny na wyhodowanie nowej odmiany. Zastosowanie markerów w programach hodowlanych umożliwia wprowadzenie obiektywnych kryteriów selekcji oraz zwiększa trafność doboru materiału wyjściowego do hodowli.

Jednym z niezbędnych etapów hodowli heterozyjnej jest ocena przydatności linii wsobnych biorących udział w tworzeniu przyszłej odmiany. O przydatności linii wsobnej do hodowli heterozyjnej, oprócz jej własnej wydajności, decyduje również przyrost plonu uzyskany po skrzyżowaniu jej z inną linią, czyli tak zwana wartość kombinacyjna. Coraz częściej w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wyselekcjonowania kombinacji mieszańcowych, które wykazywałyby wysoki efekt heterozji, próbuje się selekcjonować formy rodzicielskie w oparciu o dystans genetyczny pomiędzy nimi, określane przez polimorfizm markerów DNA.

Wielu autorów donosi, że zjawisko heterozji jest związane z genetycznym dystansem pomiędzy liniami rodzicielskimi: Dunnington i wsp. (1991) wykazali, że próbki różniące osobniki lub próby zbiorcze DNA mogą być użyte niezawodnie do oszacowania dystansu genetycznego pomiędzy nimi.

Celem badań była analiza zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy wyprowadzonych z różnych materiałów wyjściowych, oraz ocena efektu heterozji mieszańców  $F_1$  otrzymanych z tych linii.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie założono w 2005 roku w układzie bloków losowanych, w trzech powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 10 m<sup>2</sup> w RGD Dłóż.

Materiałem badawczym było 10 mieszańców kukurydzy wraz z komponentami rodzicielskimi udostępnionymi przez Hodowlę Roślin Smolice (tab. 1).

Tabela 1

**Mieszańce i ich formy rodzicielskie**  
**Hybrids and the parental forms**

Mieszaniec Hybrid	Forma mateczna Female form	Forma ojcowska Male form
1	S160	S336A
2	S41336	S41324A-2
3	S50668-4	S56125A
4	S56122	S56125A
5	S245	S41789
6	S311	Co255
7	S63300	S66208A
Blask	S41796	S41324A-2
Grom	S41789	S41324A-2
Brda	S56125A	S41324A-2

Obserwacje polowe obejmowały pomiary długości kolby, średnicy kolby, długości rdzenia, średnicy rdzenia, liczby rzędów, liczby ziarniaków w rzędzie, masy ziarna z kolby, MTN i plonu. Obserwacje przeprowadzono na 10 losowo wybranych kolbach z trzech powtórzeń każdego z mieszańców oraz komponentów rodzicielskich.

#### **Otrzymywanie markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Genomowy DNA izolowano z form mieszańcowych oraz komponentów rodzicielskich kukurydzy zmodyfikowaną metodą Thompsona i Henry'ego (1995).

Dyski liściowe o powierzchni 2 mm<sup>2</sup> traktowano 200 µl buforu TPS o składzie: 100 mM Tris HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA. Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C w czasie 15 minut.

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1M Tris HCl o pH 8,3; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; BSA; 2 mM dNTP; starter-5pmoli/µl; Taq polimeraza-5U/µl, ekstrakt DNA-25ng/µl. Taq polimeraza pochodziła z firmy MBI-Fermentas, pozostałe odczynniki pochodziły z firmy SIGMA.

Amplifikację DNA przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 Biometra firmy Polygen. Po wyjęciu prób z termocyklera do każdej z nich dodano 1µl barwnika (0,25% błękit bromofenolowy; 40% sacharoza; woda dejonizowana)

Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym o składzie: 1,5g agarozy; 100ml buforu TBE1x (10,8g Tris base; 5,5g Boric acid; 4ml 0,5M EDTA pH 8,0); 1µl bromku etydyny.

#### **Otrzymywanie markerów molekularnych AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Izolacja genomowego DNA odbywała się metodą kolumienkową. Fragmenty liści o powierzchni 6 mm<sup>2</sup> umieszczono w probówkach z ciekłym azotem i roztarto tkanke roślinną na proszek. Do każdej próbki dodano 400 µl buforu AP1 oraz 3 µl RNAzy. Następnie inkubowano próby przez 30 minut w temperaturze pokojowej i 30 minut w 65°C. Po inkubacji dodano 130 µl buforu AP2 i mieszano na vortexie. Następnie umieszczono próby w lodzie i po 15 minutach wirowano przez 20 minut w 14000 obrotów. Po wirowaniu zebrano supernatan, który naniesiono na kolumienki, do których dodano 60 µl buforu AP3. Próby wirowano przez 2 minuty w 8000 obrotów, a następnie dodano 450 µl buforu AW i 50 µl buforu AE. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Trawienie DNA przeprowadzono przy użyciu enzymów restrykcyjnych EcoRI i MseI oraz 5x read buffer. Do strawionego DNA dodano 24µl adapter ligation solution i 1µl T4DNA ligazy oraz inkubowano próby w temperaturze 20°C przez 3h. Do mieszaniny po ligacji dodano 90 µl buforu TE o pH 8,0. Pre-amplifikację przeprowadzono przy użyciu termocyklera T3 BIOMETRA firmy Polygen. Do rozcieńczonej matrycy DNA po ligacji dodano 40µl pre-amp primer mix, 3,5µl 10 × PCR buffer, 15 µl MgCl<sub>2</sub> oraz 1µl Taq polimerazy (5U/µl). Do rozcieńczonej matrycy po pre-amplifikacji dodano MIX1 (startery i dNTP) oraz MIX2 (Taq polimeraza, 10 × PCR buffer i MgCl<sub>2</sub>). Po zakończeniu reakcji PCR próby mrożono w temperaturze -20°C. Elektroforezę przeprowadzono w 5% żelu

akrylamidowym przez 2,5 h przy 60 W, 400 mA i 1400 V. Detekcja produktów PCR nastąpiła w wyniku barwienia srebrem.

Analiza umożliwiająca określenie podobieństwa pomiędzy odmianami w formie dendrogramu została sporządzona przy użyciu programu komputerowego UVIMAP w funkcji Nei i Li (1979):

$$GS = \frac{2n_{xy}}{(n_x + n_y)}$$

gdzie  $2n_{xy}$  oznacza liczbę par podobnych prążków w obu genotypach, natomiast  $n_x$  oraz  $n_y$  oznaczają liczbę wszystkich prążków dla danego genotypu. Wartość  $GS$  oznacza indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami.

Efekt heterozji dla poszczególnych cech struktury plonu mieszańców obliczono względem lepszego z rodziców i względem średniej cechy obojga rodziców.

Istotność obliczonych efektów heterozji sprawdzano testem Scheffe'go korzystając z programu statystycznego DGH 2.

Korelacje pomiędzy podobieństwem genetycznym a efektem heterozji obliczono przy pomocy programu Statistica. Istotność współczynników korelacji pomiędzy efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu a dystansem genetycznym określano na poziomie  $\alpha = 0,05$

Mieszaniec Blask jest wysokoplenną odmianą komercyjną, jego linie rodzicielskie wykazują po skrzyżowaniu zdolność dawania wysokiego efektu heterozji w plonie ziarna. Świadczy to o ich dużym zróżnicowaniu genetycznym. Mieszance Grom i Brda są również zarejestrowanymi odmianami komercyjnymi.

## WYNIKI

Przetestowano 93 startery oligonukleotydowe przy pomocy markerów RAPD, 10 z nich generowało wysoki polimorfizm (79 prążków polimorficznych), z markerów AFLP przetestowano 52 kombinacje starterów, z tego 5 wygenerowało 69 prążków polimorficznych, co pozwoliło na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi liniami kukurydzy. Startery, kombinacje starterów oraz ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm przedstawiono w tabeli 2.

Stopień podobieństwa genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców określonego przy pomocy markerów AFLP mieścił się w zakresie od 7% dla mieszańca 6 i mieszańca GROM do 36% dla mieszańca 3. Stopień podobieństwa genetycznego określonego przy pomocy markerów RAPD mieścił się w zakresie od 4% dla mieszańca BRDA do 22% dla mieszańca Blask (tab. 3).

Dla długości kolby i średnicy kolby wszystkie mieszańce, z wyjątkiem 6 i 7, charakteryzowały się istotnym efektem heterozji obliczonym względem lepszego z rodziców (rys. 1 a, b, c). W przypadku tych cech efekt heterozji nie był jednak istotnie skorelowany z podobieństwem genetycznym wyznaczonym przy pomocy markerów molekularnych RAPD (tab. 4 i tab. 6).

Tabela 2

**Startery i ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm w liniach kukurydzy**  
**Sequences of primers detecting polymorphism of maize lines**

Numer startera — Primers No.	Sekwencja nukleotydowa — Sequences 5' – 3' of primers		
RAPD	OPA 04	AATCGGGCTG	
	OPA 07	GAAACGGGTG	
	OPA 09	GGGTAACGCC	
	OPA 12	TCGGCGATAG	
	OPB 10	CTGCTGGGAC	
	OPB 17	AGGGAACGAG	
	OPF 08	GGGATATCGG	
	OPH 09	TGTAGCTGGG	
	OPH 20	GGGAGACATC	
	OPI 12	AGAGGGCACA	
	AFLP	M-CTCT	GATGAGTCCTGAGTAACTCT
		E-ACGG	GACTGCGTACCAATTCACGG
M-CTCT		GATGAGTCCTGAGTAACTCT	
E-AATT		GACTGCGTACCAATTC AATT	
M-CTCT		GATGAGTCCTGAGTAACTCT	
E-AACA		GACTGCGTACCAATTC AACA	
M-CACA		GATGAGTCCTGAGTAA CACA	
E-AATT		GACTGCGTACCAATTC AATT	
M-CAAG		GATGAGTCCTGAGTAA CAAG	
E-ACGG		GACTGCGTACCAATTCACGG	

Tabela 3

**Podobieństwo genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców**  
**Genetic similarity between parental forms of individual hybrids**

Mieszańce Hybrids	Formy rodzicielskie Parental forms		Podobieństwo Genetyczne Genetic Similarity	
	forma mateczna — female form	forma ojcowska — male form	AFLP (%)	RAPD (%)
1	S 160	S 336A	9	8
2	S 41336	S 41324A-2	24	14
3	S 50668-4	S 56125A	36	17
4	S 56122	S 56125A	27	11
5	S 245	S 41789	22	10
6	S 311	Co255	7	10
7	S 63300	S 66208A	22	11
Blask	S 41796	S 41324A-2	9	22
Grom	S 41789	S 41324A-2	7	8
Brda	S 56125A	S 41324A-2	11	4

Dla długości rdzenia, średnicy rdzenia i ilości rzędów uzyskano nieistotny lub istotny efekt heterozji obliczony względem lepszego z rodziców, który był istotnie skorelowany z podobieństwem genetycznym wyznaczonym przez markery AFLP (tab. 4 i tab. 6). Dla liczby ziarniaków w rzędzie i masy ziarna z kolby wszystkie mieszańce charakteryzowały się istotnym efektem heterozji obliczonym względem lepszego z rodziców, który był istotnie skorelowany z podobieństwem genetycznym wyznaczonym przy pomocy markerów AFLP (tab. 4 i tab. 6). W przypadku MTN i plonu dla wszystkich mieszańców z wyjątkiem 3, 4 i Blask uzyskano istotny efekt heterozji obliczony względem lepszego

z rodziców, który również był istotnie skorelowany z podobieństwem genetycznym określonym na podstawie markerów AFLP (tab. 4 i tab. 6). Mieszańce charakteryzowały się nieistotnym lub istotnym efektem heterozji obliczonym względem średniej obojga rodziców, dla wszystkich analizowanych cech struktury plonu, który był istotnie skorelowany z podobieństwem genetycznym wyznaczonym przez markery AFLP i nieistotnie skorelowany z podobieństwem genetycznym wyznaczonym przez markery RAPD (tab. 5 i tab. 7).

Tabela 4

**Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu mieszańców obliczonego względem lepszego z rodziców (w %) Heterosis effect for yield and its components calculated for average feature of better parent (in %)**

Mieszańce Hybrids	Długość kolby Ear length	Średnica kolby Ear diameter	Długość rdzenia Cob length	Średnica rdzenia Cob diameter	Liczba rzędów Number of rows	Liczba ziarniaków w rzędzie Number of kernels per row	Masa ziarna z kolby Weight of kernels per ear	MTN TKW	Plon Yield
1	155*	140*	146*	128*	130*	176*	281*	125*	117*
2	110*	110*	114*	87*	111	133*	232*	100*	101*
3	102*	96*	104*	86*	86*	118*	167*	85*	94*
4	121*	110*	117*	98	114*	156*	250*	102	101*
5	141*	121*	137*	124*	114*	170*	247*	117*	114*
6	129	118	135*	102*	114*	158*	237*	113*	113*
7	119	108	111*	97*	113*	165*	196*	102*	116*
Blask	103*	96*	98*	69*	95*	123*	209*	90*	114*
Grom	156*	145*	153*	128*	132*	182*	274*	131*	129*
Brda	168*	167*	168*	143*	156*	191*	325*	159*	172*

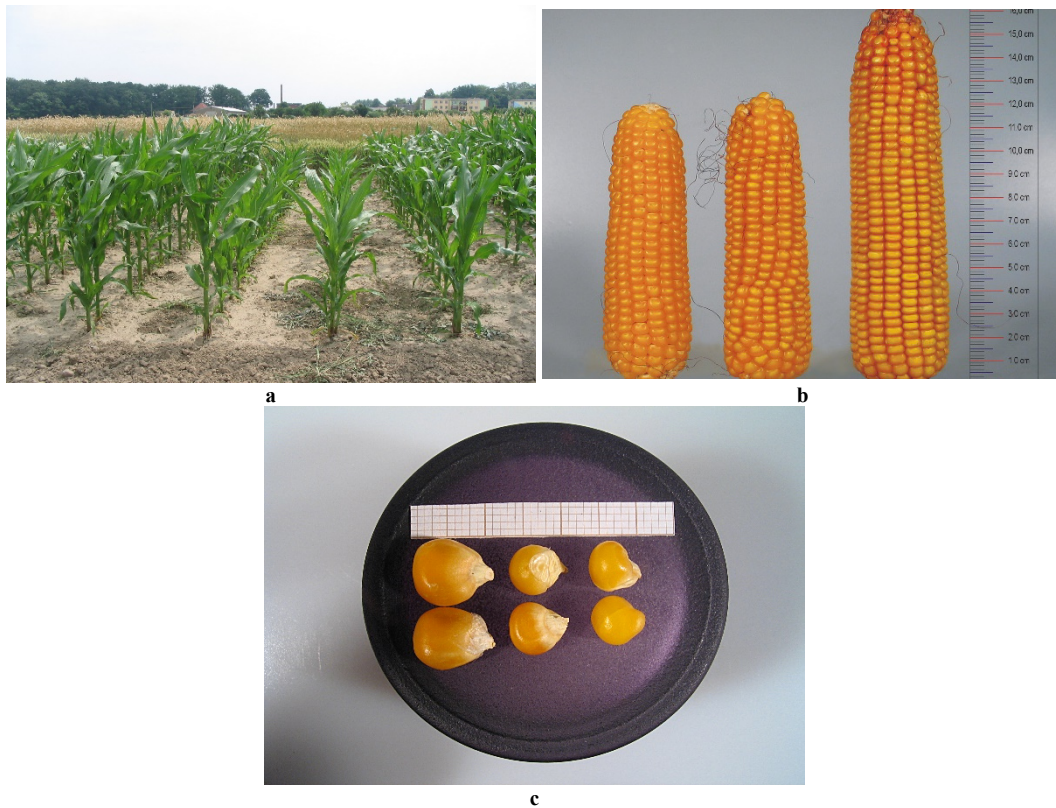
\* Istotny przy  $\alpha = 0,05$ ; \*Significant at  $\alpha = 0.05$

Tabela 5

**Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu mieszańców obliczonego względem średniej obojga rodziców (w %) Heterosis effect for yield and its components calculated for average feature of better parent (in %)**

Mieszańce Hybrids	Długość kolby Ear length	Średnica kolby Ear diameter	Długość rdzenia Cob length	Średnica rdzenia Cob diameter	liczba rzędów Number of rows	liczba ziarniaków w rzędzie Number of kernels per row	Masa ziarna z kolby Weight of kernels per ear	MTN TKW	Plon Yield
1	162*	141*	151*	134*	134*	172*	268*	121*	126*
2	115*	109	116*	90*	113*	137*	230*	106	100*
3	112*	97*	108	88*	95*	127*	177*	88*	97*
4	126*	114*	118*	103	115*	169*	257*	105*	111*
5	150*	125*	138*	133*	120*	165*	268*	121*	126*
6	133*	120*	135*	106	117*	164*	263*	111*	113*
7	125*	112*	116*	102*	115*	162*	215*	111*	104*
Blask	100	97*	103	75*	101	137*	211*	97*	120*
Grom	151*	152*	153*	138*	136*	180*	293*	130*	133*
Brda	174*	172*	170*	155*	158*	193*	367*	162*	173*

\* Istotny przy  $\alpha = 0,05$ ; \*Significant at  $\alpha = 0.05$



Rys. 1. Efekty heterozji  
Fig. 1. Heterosis effects

Tabela 6

**Korelacja podobieństwa genetycznego z efektem heterozji mieszańców obliczonym względem średniej cechy lepszego z rodziców**  
**Correlation between genetic similarity and heterosis effect calculated for average feature of better parent in respect of yield and its components**

Rodzaj markera Type of marker	Długość kolby Ear length	Średnica kolby Ear diameter	Długość rdzenia Cob length	Średnica rdzenia Cob diameter	Liczba rzędów Number of rows	Liczba ziarniaków w rzędzie Number of kernels per row	Masa ziarna z kolby Weight of kernels per ear	MTN TKW	Plon Yield
współczynniki korelacji podobieństwa genetycznego z efektem heterozji correlation coefficient of genetic similarity with heterosis effect									
AFLP	0,90*	0,85*	0,91*	0,93*	0,87*	0,91*	0,82*	0,87*	0,65*
RAPD	0,53	0,57	0,56	0,40	0,55	0,55	0,57	0,58	0,54

\* Istotny przy  $\alpha = 0,05$ ; \*Significant at  $\alpha = 0.05$

Tabela 7

**Korelacja podobieństwa genetycznego z efektem heterozji mieszańców obliczonym względem średniej obojga rodziców****Correlation between genetic similarity and heterosis effect calculated for average feature of both parents in respect of yield and its components**

Rodzaj markera Type of marker	Długość kolby Ear length	Średnica kolby Ear diameter	Długość rdzenia Cob length	Średnica rdzenia Cob diameter	Liczba rzędów Number of rows	Liczba ziarniaków w rzędzie Number of kernels per row	Masa ziarna z kolby Weight of kernels per ear	MTN TKW	Plon Yield
	współczynniki korelacji podobieństwa genetycznego z efektem heterozji correlation coefficient of genetic similarity with heterosis effect								
AFLP	0,89*	0,87*	0,90*	0,92*	0,89*	0,93*	0,79*	0,87*	0,64*
RAPD	0,57	0,56	0,56	0,39	0,55	0,51	0,59	0,57	0,56

\* Istotny przy  $\alpha = 0,05$ ; \*Significant at  $\alpha = 0.05$ 

## DYSKUSJA

Nadrzędnym celem hodowli roślin jest doskonalenie istniejących form w celu uzyskania odmian o wyższej odporności na choroby, odporności na szkodniki, plenności, jakości oraz innych cech ważnych z punktu widzenia hodowlanego. Jednym z pierwszych etapów hodowli jest dobór form rodzicielskich z dostępnej puli genowej istniejących odmian. Dotychczas, aby właściwie ocenić zasoby genowe pod kątem produktywności, parametrów jakości oraz podatności na biotyczne i abiotyczne czynniki stresogenne stosowano kosztowne i pracochłonne metody opierające się na wielokrotnych krzyżowaniach i selekcji fenotypowej lub też analizie profili izoenzymatycznych (Karp i in., 1998).

We współczesnej hodowli roślin coraz szerzej stosuje się systemy markerów molekularnych, które są niezbędnym narzędziem diagnostycznym i umożliwiają pokonanie barier, których nastroczą konwencjonalne metody hodowli. Markery molekularne charakteryzują się wyższym poziomem polimorfizmu w porównaniu z markerami morfologicznymi. Obecnie najczęściej stosowanymi markerami są markery RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) oraz SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Przy wyborze określonego typu markera do badań powinno brać się pod uwagę następujące czynniki: typ i poziom polimorfizmu jaki dany marker potrafi zidentyfikować, ilość i czystość DNA jaka jest wymagana do analiz, typ sondy potrzebnej do detekcji sygnału, wymagania dotyczące znajomości sekwencji starterów, powtarzalność, wiarygodność, trudności techniczne jak również koszt analiz.

W niniejszej pracy wykorzystano dwa typy markerów molekularnych RAPD i AFLP. Markery RAPD zaczęto stosować na początku lat 90. Wykorzystują one reakcję PCR (Polymerase Chain Reaction) do generowania prążków. Wykazują dominujący charakter dziedziczenia, co uniemożliwia odróżnienie homozygot od heterozygot. Używane 9–11



nukleotydowe startery przyłączają się losowo zapoczątkowując amplifikację w wielu rejonach genomu jednocześnie. Produkty reakcji amplifikacji rozdzielane są na żelu agarozowym, a ich detekcja odbywa się z użyciem znaczników fluorescencyjnych lub srebra. Technika AFLP opatentowana w 1993 roku łączy trawienie enzymami restrykcyjnymi z reakcją PCR. Obydwa enzymy generują tzw. lepkie końce, do których przyłączają się 20–30 nukleotydowe fragmenty zwane adaptorami. Połączenie jest możliwe dzięki T4 DNA ligazie. Po ligacji adaptorów prowadzona jest reakcja pre-amplifikacji, po której prowadzi się amplifikację specyficzną. Rozdział produktów PCR następuje na żelu poliakrylamidowym a detekcja poprzez barwienie srebrem lub autoradiograficznie. Markery te wykazują szeroki polimorfizm, niekiedy możliwe jest rozróżnienie homo i heterozygot poprzez ocenę intensywności prążka. Nie zaleca się jednak tej techniki dla markerów dziedziczonych na zasadzie kodominacji.

Obydwa typy markerów zostały użyte do badania podobieństwa genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi 10 mieszańców liniowych kukurydzy. Badania wykazały, że podobieństwo genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców określone przy pomocy markerów AFLP mieści się w zakresie od 7% dla mieszańca 6 i mieszańca Grom do 36% dla mieszańca 3. Wartość podobieństwa genetycznego określonego przy pomocy markerów RAPD mieści się w zakresie od 4% dla mieszańca Brda do 22% dla mieszańca Blask (tab. 3). Obecny stan badań nie daje nam jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy dystans genetyczny może być podstawą do wnioskowania o efekcie heterozji. Potrafimy wykorzystać wigor mieszańców  $F_1$  tworząc odmiany heterozyjne, nie znamy jednak do końca zjawiska heterozji i jej mechanizmów. Na podstawie badań wykazano, że podobieństwo genetyczne określone na podstawie markerów RAPD nie koreluje się z efektem heterozji u form mieszańcowych w przeciwieństwie do podobieństwa określonego na podstawie markerów AFLP, które jest istotnie skorelowane z efektem heterozji mieszańców  $F_1$ . Wykorzystując markery AFLP stwierdzono, że im formy rodzicielskie są bardziej spokrewnione tym efekt heterozji u form mieszańcowych jest mniejszy.

Pierwsze próby skorelowania oszacowanego dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi z efektem heterozji podjęto już w 1966 roku (Cross, 1966).

Godshalk i wsp. (1990) wykazali brak związku pomiędzy plonem mieszańców a heterogennością markerów molekularnych dla niespokrewnionych linii rodzicielskich.

Melchinger i wsp. (1999) w swojej pracy stwierdzili, że prognozowanie efektu heterozji pomiędzy grupami wykazującymi genetyczne podobieństwo plazmy zarodkowej nie jest możliwe na podstawie dystansu genetycznego określonego przy wykorzystaniu markerów DNA, lecz powinno być określone w doświadczeniach polowych. Na podstawie danych doświadczalnych wykazali, że podzielenie plazmy zarodkowej na zróżnicowane pule genowe jest korzystne dla optymalnego wykorzystania zjawiska heterozji.

Adamczyk i wsp. (2001) stwierdzili, że zmodyfikowana metoda PCR może być użyta do podziału materiałów hodowlanych na grupy pochodzeniowe, jednak możliwość jej bezpośredniego zastosowania do prognozowania formuł mieszańców wymaga dalszych badań.

Prowadząc analizy molekularne dla niektórych gatunków roślin uprawnych wykazano, że detekcja pokrewieństwa genetycznego pomiędzy liniami bywa niewystarczająca w przypadku tworzenia odmian mieszańcowych. Zidentyfikowano, bowiem geny kontrolujące proces rozszczepiania użytecznych cech mieszańców oraz sprzężenia genów obniżające żywotność potomstwa mieszańcowego (Fu, 1999).

Według teorii dotyczących uwarunkowań genetycznych, zjawisko heterozji jest wynikiem współdziałania genów dominujących (hipoteza dominacji) lub w obrębie heterozygotycznych *loci* (hipoteza naddominowania) (Pala, 2002). Dlatego też poszukuje się związku dystansu genetycznego z efektem heterozji wrażliwym się w plonie.

Joanna Sztuba-Solińska (2005) stwierdza, iż techniki molekularne są najbardziej efektywne w ocenie dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi i umożliwiają prognozę efektywności tworzenia nowych odmian mieszańcowych wykazujących ważne użytkowo cechy.

W 1992 roku Stubber i wsp. przy użyciu markerów molekularnych zidentyfikowali czynniki związane z heterozją w mieszańcu utworzonym z linii wsobnych kukurydzy.

Ajmone Marson i wsp. (1998) stwierdzili, że istnieje związek pomiędzy plonem ziarna mieszańców a współczynnikiem dystansu genetycznego dla ich linii rodzicielskich.

Becker i wsp. (2000), którzy badali zależność dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy z efektem heterozji stwierdzili, iż mieszańce kukurydzy DentxDent pochodzące z form rodzicielskich o dużym dystansie genetycznym dały największy efekt heterozji wyrażony plonem ziarna. Podobne zależności obserwowali Broda i wsp. (2002). Wykorzystując markery RAPD do analizy zróżnicowania genetycznego linii wsobnych żyta wykazali, że można oczekiwać wyższego efektu heterozji w mieszańcach F<sub>1</sub>, których formy rodzicielskie pochodzą z puli genowej o znacznym dystansie genetycznym.

Na podstawie uzyskanych w tej pracy wyników stwierdzono, że markery molekularne RAPD są nie przydatne w prognozowaniu formuł mieszańców jednakże mogą znaleźć zastosowanie do grupowania linii pod względem pochodzenia, szczególnie tych, dla których dane o pochodzeniu są niepełne. Z kolei dające większy polimorfizm markery AFLP można wykorzystać do wstępnej selekcji komponentów rodzicielskich, które dalej będą testowane w warunkach polowych.

Linie należące do grup o zróżnicowanym pochodzeniu mogą być użyte do wstępnego prognozowania krzyżowań testowych w aspekcie osiągnięcia efektu heterozji (Broda i in., 2002).

#### WNIOSKI

1. U wszystkich analizowanych mieszańców większość cech struktury plonu przyjmowała istotnie wyższe wartości niż średnie wartości tych cech obojga rodziców.
2. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wyselekcjonowane startery zarówno w przypadku markerów RAPD, jak i AFLP generowały polimorfizm, który pozwolił na zbadanie podobieństwa genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi mieszańców.

3. Wstępne wyniki wskazują na to, iż podobieństwo genetyczne oparte o analizę polimorfizmu markerów molekularnych AFLP koreluje z efektem heterozji. Markery te mogą być wykorzystane do wstępnej selekcji komponentów rodzicielskich, które dalej będą testowane w warunkach polowych.
4. Markery molekularne RAPD dające mniejszy polimorfizm w porównaniu z markerami AFLP są nie przydatne w prognozowaniu formuł mieszańców, ponieważ podobieństwo genetyczne określone przy ich wykorzystaniu nie jest skorelowane z efektem heterozji.

#### LITERATURA

- Adamczyk J. 2001. Wprowadzenie do krajowych materiałów hodowlanych plazmy zarodkowej kukurydzy północnoamerykańskiej (*Zea mays* L.). Monografie i rozprawy naukowe IHAR. Nr 13: 52 ss.
- Ajmone Marsan P., Castiglioni P., Fusari F., Kuiper M., Motto M. 1998. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 219 — 227.
- Becker H. C., Link W. 2000. Heterosis and hybrid breeding. MCC 2000 Mendel Centenary Congress: 319 — 327.
- Broda Z., Gniazdowska A., Mikołajczyk S., Szolkowski A. 2002. Wykorzystanie markerów RAPD do analizy genetycznej różnorodności linii wsobnych żyta (*Secale cereale* L.) i ich doboru do krzyżowań heterozyjnych (F<sub>1</sub>). *PTPN Tom 93*: 149 — 157.
- Cross C. E. 1966. Heterosis at the hybrid related to gene frequency differences between two populations. *Genetics* 53: 269 — 274.
- Dunnington E. A., Gal O., Siegel P. B., Haberfeld A., Cahaner A., Aavi U., Plotzky Y., Hillel J. 1991. Genetic mapping of wheat genomes using RAPD markers. *Poult. Sci.* 70: 463 — 467.
- Fu Y. B. 1999. Patterns of the purging of deleterious genes with synergistic interactions in different breeding schemes. *Theor. Appl. Genet.* 98: 337 — 346.
- Godshalk E. B., Lee M., Lamken K. R. 1990. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single — cross hybrid performance of maize. *Theor. Appl. Genet.* 80: 273 — 280.
- Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. 1998. *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals.* Chapman and Hall, London.
- Melchinger A. E. 1999. Genetic diversity and heterosis. In: *The genetics and exploitation of heterosis in crops.* Wisconsin: 99 — 118.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 79: 5269 — 5273.
- Pala J. 2002. Genetyczne, fizjologiczno-biochemiczne i ekologiczne uwarunkowania plonowania roślin. W: *Fizjologia plonowania roślin.* Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie 27 — 73.
- Stubber C., Lincoln S. E., Wolff T., Helentjaris T. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823 — 839.
- Sztuba-Solińska J. 2006. *Kosmos — problemy nauk biologicznych PTP Tom 54*: 227 — 239.
- Thompson D., Henry R. 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19: 394 — 400.