

ZBIGNIEW BRODA¹**AGNIESZKA TOMKOWIAK**¹**DANUTA MACKIEWICZ**¹**DOBEK ANITA**²**HENRYK WOŚ**³**JANINA WOŚ**³**ROMAN WARZECHA**⁴**KRYSTYNA WARZECHA**⁴¹ Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademii Rolniczej w Poznaniu² Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Akademii Rolniczej w Poznaniu³ Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Oddział Borowo⁴ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Analiza zróżnicowania genetycznego linii pszenżyta przydatnych do hodowli mieszańców przy użyciu markerów molekularnych

Molecular marker based study of genetic diversity of triticale lines suitable for hybrid breeding

Praca prezentuje wyniki doświadczenia mającego na celu określenie zależności efektu heterozji mieszańców F_1 od dystansu genetycznego pomiędzy ich formami rodzicielskimi. Obiektem badań było dziewięć mieszańców pszenżyta wraz z ich komponentami rodzicielskimi. Efekt heterozji obliczono dla plonu oraz następujących cech struktury plonu: długości źdźbła, długości kłosa, liczby kłosek w kłosie, liczby ziaren w kłosie, liczby ziaren w kłosku, masy ziarna w kłosie oraz MTN. Dystans genetyczny określono przy użyciu markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). W pracy wykazano, iż u wszystkich badanych mieszańców większość cech struktury plonu przyjmowała istotnie wyższe wartości niż średnie wartości tych cech obojga rodziców. Badając korelacje dystansu genetycznego z efektem heterozji nie stwierdzono występowania zależności plonu oraz cech struktury plonu z dystansem genetycznym rodziców. W większości obliczone współczynniki korelacji dystansu genetycznego z efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu i plonu były statystycznie nieistotne, ponieważ nie przekraczały wartości krytycznej dla testowania współczynnika korelacji, która wynosi $r = 0,67$ przy $\alpha = 0,05$. Wyjątek stanowią współczynniki korelacji efektu heterozji masy ziaren w kłosie i MTZ z dystansem genetycznym, które kolejno wynoszą $r = 0,86$ i $r = 0,85$.

Słowa kluczowe: pszenżyto, dystans genetyczny, heterozja

The paper presents the results of one year experiment on the relationship between heterosis effect of nine F_1 hybrids and genetic distance between their parental forms. The heterosis effect was calculated

for yield and its components: straw length, spike length, number of spikelets in spike, number of seeds in spike, number of seeds in spikelet, mass of seeds in spike and TKW. The genetic distance was determined basing on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers. All the examined hybrids showed significantly higher values of the studied features in relation to the both parents. The study of correlations between the genetic distance and the heterosis effect showed no tendency of a dependence of crop structure features on parents' genetic distance. Generally, the calculated correlation coefficients didn't exceed the value $r = 0.67$ that was critical for their testing at $\alpha = 0.05$. The seed mass per spike and TKW were exceptional $r = 0.86$ and $r = 0.85$, respectively.

Key words: triticale, genetic distance, heterosis

WSTĘP

Jednym z etapów hodowli odmian mieszańcowych jest wybór linii wsobnych oraz ocena ich przydatności jako komponentów rodzicielskich. O przydatności linii wsobnej decyduje w znacznym stopniu wysokość plonu, jaki uzyskamy po skrzyżowaniu jej z inną linią, czyli tzw. wartość kombinacyjna. Plenność linii rodzicielskich jest zazwyczaj niewielka i nie stanowi najważniejszego kryterium przy ich wyborze. Tradycyjne sposoby określania wartości linii wsobnych wymagają dużych nakładów środków materialnych, co zwiększa koszt hodowli, dlatego też 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, określany poprzez polimorfizm markerów DNA (Broda i in., 2002; Bartkowiak i in., 1997). Najczęściej stosowanymi technikami otrzymywania markerów molekularnych są metody wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy DNA (PCR — Polymerase Chain Reaction). Do najczęściej wykorzystywanych zaliczamy RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) i DAF (DNA Amplification Fingerprinting). Wchodzą one w skład grupy markerów MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling). Metoda RAPD wykorzystuje głównie dziesięcionukleotydowe startery do amplifikacji losowo rozproszonych po genomie odcinków DNA. Tego typu test wymaga niewielkiej ilości DNA oraz jest stosunkowo prosty i szybki w wykonaniu. Duża liczba testowanych starterów zapewnia znalezienie polimorficznych markerów dla badanego materiału.

Celem badań była analiza zróżnicowania genetycznego linii wsobnych pszenżyta, oraz ocena efektu heterozji mieszańców F_1 pszenżyta otrzymanych z linii o zróżnicowanym podobieństwie genetycznym.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie zostało założone w 2004 roku w układzie bloków losowanych, w trzech powtórzeniach, na poletkach doświadczalnych o powierzchni 10m^2 , w czterech miejscowościach: Borowo, Małyszyn, Radzików i Strzelce.

Materiałem badawczym było 9 mieszańców pszenżyta ozimego wraz z komponentami rodzicielskimi udostępnionymi przez Hodowlę Roślin Strzelce Sp. z o.o. Oddział Borowo (tab. 1).

Tabela 1

Mieszańce i ich formy rodzicielskie Hybrids and their parental forms		
Mieszaniec Hybrid	Forma mateczna — Linie męskosterylne Maternal form — Male sterile line	Forma ojcowska — restorer Paternal form — restorer
BOHT 45	CMS 112 — 15	Witon
BOHT 46	CMS 112 — 15	Krakowiak
BOHT 47	CMS 112 — 15	Pawo
BOHT 49	CMS 114 — 5	Krakowiak
BOHT 50	CMS 114 — 5	Pawo
BOHT 61	CMS Malno 53/3	MAH 3800
BOHT 62	CMS Malno 53/3	Todan
BOHT 72	CMS B1	Krakowiak
BOHT 75	CMS 113 — 3	Pawo

Otrzymywanie markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

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

Dyski liściowe o powierzchni 2mm² 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 przez 15 minut.

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5 µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1M Tris HCl o pH 8,3; 25 mM MgCl₂; BSA; 2 mM dNTP; starter-5 pmoli/µl; Taq polimeraza-5U/µl, ekstrakt DNA-25 ng/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; 100 ml buforu TBE1 × (10,8g Tris base; 5,5g Boric acid; 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0); 1 µl bromku etydyyny.

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 prążków w obu genotypach, natomiast n_x oraz n_y oznaczają liczbę prążków charakterystycznych dla danego genotypu. Wartość GS oznacza indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami. Dystans genetyczny pomiędzy komponentami rodzicielskimi każdego mieszańca obliczano korzystając ze wzoru:

$$D = 1 - GS$$

Efekt heterozji dla poszczególnych cech struktury plonu mieszańców obliczono ze wzoru:

$$E = \frac{\frac{\bar{x}}{\bar{x}_{mat} + \bar{x}_{ojc}}}{2} \times 100$$

E = efekt heterozji

$\bar{x}$ — średnia cechy mieszańca

$\bar{x}_{mat}$ — średnia cechy formy matecznej

$\bar{x}_{ojc}$ — średnia cechy ojcowskiej.

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

Istotność współczynników korelacji pomiędzy efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu a dystansem genetycznym określano na poziomie $\alpha = 0,05$

Obserwacje polowe obejmowały pomiary długości źdźbła oraz długości kłosów, określenie masy ziarna w kłosie, MTZ, liczby kłosków w kłosie, liczby ziaren w kłosie, liczby ziaren w kłosku. Obserwacje przeprowadzono na 150 losowo wybranych źdźbłach z trzech powtórzeń każdego z mieszańców oraz komponentów rodzicielskich.

WYNIKI

Spośród 85 testowanych starterów oligonukleotydowych, 10 generowało wysoki polimorfizm (426 prążków polimorficznych), który pozwolił na określenie dystansu genetycznego pomiędzy badanymi liniami pszenżyta. Startery oraz ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2

Startery i ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm w liniach triticales
Sequences of primers detecting polymorphism of triticales lines

Numer startera Primers no	Sekwencja nukleotydowa Sequences 5'-3' of primers
OPA 04	AATCGGGCTG
OPA 07	GAAACGGGTG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 12	TCGGCGATAG
OPA 14	TCTGTGCTGG
OPB 17	AGGGAACGAG
OPF 08	GGGATATCGG
OPH 09	TGTAGCTGGG
OPH 20	GGGAGACATC
OPI 12	AGAGGGCACA

Wartość dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców mieści się w zakresie od 80% w przypadku mieszańca BOHT 45 do 95% w przypadku mieszańca BOHT 61 (tab. 3), przedstawia to dendrogram UPGMA

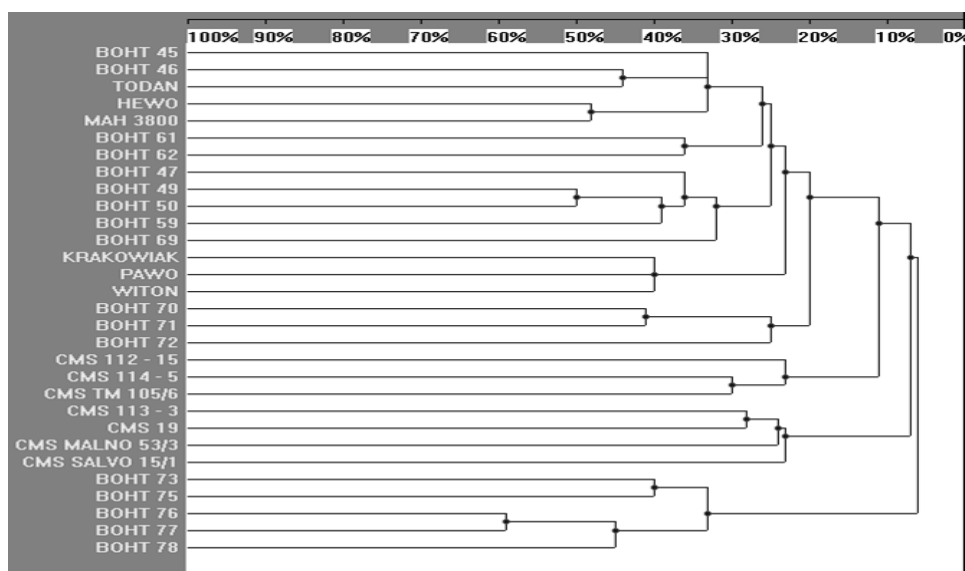
(Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means) (rys. 1) wykreślony na podstawie indeksu podobieństwa.

Tabela 3

Dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców oraz poziom ich plonowania

Genetic distance between parental forms of individual hybrids and their yields

Mieszańce Hybrids	Formy rodzicielskie Parental forms		Dystans genetyczny Genetic distance	Plon nasion Seed yield	
	mateczna — linie męskosterylne maternal male sterile lines	ojcowska — restorery paternal form — restorers		dt/ha	względem kontroli Woltario + Lamberto % of control
BOHT 45	CMS 112-15	Witon	0,88	88,38	104,61
BOHT 46	CMS 112-15	Krakowiak	0,80	87,03	103,02
BOHT 47	CMS 112-15	Pawo	0,92	93,96	111,21
BOHT 49	CMS 114-5	Krakowiak	0,84	83,99	99,42
BOHT 50	CMS 114-5	Pawo	0,84	89,86	106,36
BOHT 61	CMS Malno 53/3	MAH 3800	0,95	87,85	103,98
BOHT 62	CMS Malno 53/3	Todan	0,85	87,71	103,82
BOHT 72	CMS B1	Krakowiak	0,88	78,74	93,19
BOHT 75	CMS 113-3	Pawo	0,86	87,36	103,4
NIR _{0,05} —LSD _{0,05}				7,68	



Rys. 1. Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne pomiędzy mieszańcami i ich komponentami rodzicielskimi

Fig. 1. Dendrogram showing similarity between the hybrids and their parental forms

Pod względem długości źdźbła wszystkie mieszańce charakteryzują się istotnym efektem heterozji. W przypadku tej cechy efekt heterozji nie jest jednak istotnie

skorelowany z dystansem genetycznym gdyż współczynnik korelacji $r = 0,64$ jest niższy od wartości krytycznej $r = 0,67$ przy $\alpha = 0,05$ (tab. 4 i 5).

Tabela 4

Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu oraz samego plonu mieszańców
Heterosis effect for yield and its components

Mieszaniec Hybrid	Długość żdźbła Straw length	Długość kłosa Spike length	Liczba kłosków w kłosie Number of spikelets in spike	Liczba ziaren w kłosie Number of seeds in spike	Liczba ziaren w kłosku Number of seeds in spikelet	Masa ziarna w kłosie Mass of seeds in spike	MTN TKW	Plon Yield
BOHT 45	104*	96*	106*	100	95*	103	108*	105*
BOHT 46	110*	94*	111*	121*	108*	109	104*	117*
BOHT 47	115*	101	106*	128*	121*	139*	115*	111*
BOHT 49	104*	107*	102*	104*	104*	101	104*	113*
BOHT 50	107*	106*	100	99	100	118*	108*	106*
BOHT 61	119*	116*	108*	123*	115*	166*	133*	110*
BOHT 62	111*	102	115*	102	95*	110*	114*	104*
BOHT 72	108*	100	112*	133*	119*	126*	107*	106*
BOHT 75	114*	101	102*	107*	104	110*	110*	103*

* Istotny przy $\alpha = 0,05$

* Significant at $\alpha = 0.05$

Tabela 5

Korelacja dystansu genetycznego z efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu oraz samego plonu mieszańców
Correlations between genetic distance and heterosis effect for yield and its components

Cechy Characters	Długość żdźbła Straw length	Długość kłosa Spike length	Liczba kłosków w kłosie Number of spikelets in spike	Liczba ziaren w kłosie Number of seeds in spike	Liczba ziaren w kłosku Number of seeds in spikelet	Masa ziarna w kłosie Mass of seeds in spike	MTN TKW	Plon Yield
Współczynnik korelacji dystansu genetycznego z efektem heterozji Correlation coefficients	0,64	0,63	0,03	0,45	0,54	0,86*	0,85*	-0,13

* Istotna przy $\alpha = 0,05$

* Significant at $\alpha = 0.05$

Dla długości kłosa, liczby kłosków w kłosie, liczby ziaren w kłosie i liczby ziaren w kłosku, obserwuje się nieistotny lub istotny efekt heterozji, który nie jest istotnie skorelowany z dystansem genetycznym gdyż wartości współczynnika korelacji są również niższe od wartości krytycznej $r = 0,67$ przy $\alpha = 0,05$ (tab. 4 i 5). W przypadku masy ziarna w kłosie i MTN wszystkie mieszańce z wyjątkiem mieszańców BOHT 45, BOHT 46 i BOHT 49 wykazują istotny efekt heterozji, który jest skorelowany z dystansem genetycznym, gdyż wartości współczynnika korelacji wynoszą odpowiednio $r = 0,86$ i $r = 0,85$. Wszystkie mieszańce z wyjątkiem mieszańca BOHT 75 wykazują istotny efekt heterozji dla plonu, który nie jest skorelowany z dystansem genetycznym (tab. 4 i 5).

DYSKUSJA

Dotychczasowy stan badań nie przyniósł jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy dystans genetyczny może być podstawą do wnioskowania o efekcie heterozji. Rzeczywiście mało jeszcze wiemy o zjawisku heterozji i mechanizmach heterozji, potrafimy tylko wykorzystać wigor mieszańców F_1 tworząc odmiany heterozyjne. Jest to problem od strony genetycznej mało poznany, aktualny, ważny dla metodologii hodowli roślin. Postęp hodowlany w istocie będzie efektywny poprzez badania genomu jądrowego, plazmonu, i ich współzależności oraz interakcji ze środowiskiem.

Jednocześnie identyfikacja kombinacji rodzicielskich tworzących potomstwo wysoko plonujące jest jednym z najbardziej kosztownych etapów w programie hodowlanym (Riaz i in., 2001). Kombinacje genotypów zapewniających wysokie plonowanie były i są wyznaczone na podstawie krzyżowań testowych oraz oceny ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej. Ponadto w rzepaku (*Brassica napus* var. *oleifera*) polimorfizm określono na podstawie ekspresji fenotypowej niektórych cech jakościowych takimi metodami jak: HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wysokociśnieniowa chromatografia gazowa (analiza glukozyzolanów) (Adams i in., 1989), chromatografia gazowa GLC (Gas Liquid Chromatography) (profile kwasów tłuszczowych w oleju) (White i Law, 1991), izoenzymy (elektroforeza białek w żelu skrobiowym) (Mundges i in., 1990). Techniki te wykazały jednak ograniczony stopień polimorfizmu ze względu na zależność od warunków środowiska (Charters i in., 1996), a w przypadku izoenzymów z powodu ograniczonej liczby poznanych enzymów i loci genów kodujących (Sun i in., 1999).

W badaniach wykazano, iż wartość dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców mieści się w zakresie od 80% w przypadku mieszańca BOHT 45 do 95% w przypadku mieszańca BOHT 61. Stwierdzono również, że dla wszystkich analizowanych cech struktury plonu mieszańce przewyższały pod względem tych cech formy rodzicielskie. Badania dowiodły, że dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi nie jest skorelowany z efektem heterozji. Nie wyklucza się, iż brak korelacji może być wynikiem zbyt małej liczby badanych populacji mieszańców.

W ostatnim dziesięcioleciu wielu naukowców podjęło próbę wnioskowania o efekcie heterozji poprzez badanie dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi.

Dzięki rozwojowi metod biologii molekularnej umożliwiającym badanie polimorfizmu genotypów na poziomie DNA poszukuje się szybkich metod przewidywania wysokoplennych kombinacji mieszańcowych. Według teorii dotyczących uwarunkowań genetycznych zjawisko heterozji, bujności mieszańców jest wynikiem współdziałania genów dominujących (hipoteza dominacji) albo w obrębie heterozygotycznych loci (hipoteza naddominowania) (Pala, 2002). Z tego względu poszukuje się związku dystansu genetycznego z efektem heterozji wyrażającym się w plonie.

Markery DNA uzyskane metodą RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) znalazły szerokie zastosowanie do badania dystansu genetycznego u wielu gatunków roślin uprawnych. Segregacje markerów RAPD według praw Mendla oraz ich dziedziczenie

obserwowano u takich gatunków jak: jęczmień, soja, lucerna (Williams i in., 1990; Echt i in., 1992; Tinker i in., 1993). W rodzaju *Brassica* markery RAPD są uważane za tak samo efektywne jak markery RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) do szacowania wewnątrzgatunkowego pokrewieństwa między genotypami (Demke i in., 1992; Thorman i in., 1994; dos Santos i in., 1994).

Broda i wsp. (2002) wykorzystując markery RAPD do analizy zróżnicowania genetycznego linii wsobnych żyta wykazali, że można oczekiwać wyższego efektu heterozji w mieszańcach F_1 , których formy rodzicielskie pochodzą z puli genowej o znacznym dystansie genetycznym. Podobne zależności obserwował Becker i inni (2000), który badał zależności dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy i efekty heterozji. W badaniach mieszańce kukurydzy Dent $\times$ Dent pochodzące z form rodzicielskich o dużym dystansie genetycznym dały największy efekt heterozji wyrażony plonem ziarna.

Rafalski i wsp. (1998) wykorzystali do oceny podobieństwa genetycznego linii wsobnych kukurydzy dwie metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Doświadczenia prowadzono systemem RAPD oraz z zastosowaniem starterów o sekwencjach częściowo komplementarnych do sekwencji styku intron-egzon. Wykazali, że zastosowanie starterów o sekwencjach częściowo komplementarnych do sekwencji styku intron-egzon pozwala na dokładne wyliczenie dystansu genetycznego, nawet między genotypami o dużym stopniu pokrewieństwa.

Stuber i wsp. (1992) przy użyciu markerów molekularnych zidentyfikowali genetyczne czynniki związane z heterozją w mieszańcu utworzonym z dwu linii wsobnych kukurydzy.

Już w latach siedemdziesiątych wielu autorów, w tym Cross (1966) próbowało skorelować oszacowany dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi z efektem heterozji w mieszańcach F_1 .

Na możliwość prognozowania heterozji na podstawie heterogenności loci-markerów, ale tylko dla linii z tej samej grupy pochodzeniowej, wskazali Charcosset i Essioux (1994). Brak związku między plonem mieszańców a heterogennością markerów molekularnych dla niespokrewnionych linii rodzicielskich stwierdził także Godshalk i wsp. (1990).

W swojej pracy Melchinger i wsp. (1999) wykazał, że dane doświadczalne jak i rozważania teoretyczne wskazują, iż podzielenie plazmy zarodkowej na zróżnicowane pule genetyczne jest korzystne dla optymalnego wykorzystania zjawiska heterozji. Stwierdził, że prognozowanie efektu heterozji pomiędzy grupami o genetycznym podobieństwie plazmy zarodkowej nie jest możliwe na podstawie dystansu genetycznego określanego markerami DNA i powinno być określone w doświadczeniach polowych, jednakże markery molekularne w tym markery RAPD są efektywnym narzędziem dla identyfikacji tych grup.

Na podstawie uzyskanych w tej pracy wyników stwierdzono, iż markery molekularne RAPD są nie przydatne w prognozowaniu formuł mieszańców jednakże mogą znaleźć zastosowanie do grupowania linii pod względem pochodzenia oraz linii o niepełnych danych o pochodzeniu.

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 badanych mieszańców większość cech struktury plonu przyjmowała istotnie wyższe wartości niż średnie tych cech obojga rodziców
2. W pracy wykazano, że dystans genetyczny oparty o analizę polimorfizmu markerów molekularnych nie koreluje z efektem heterozji dla poszczególnych cech struktury plonu, wyjątek stanowi masa ziarna w kłosie i MTZ, które są istotnie skorelowane z dystansem genetycznym.

LITERATURA

- Adams H., Vaughan J. G., Fenwick G. R. 1989. The use of cultivar identification in Sweden, *Brassica napus* L. Var. *Apobrassica* (L.). *Peterm. J. Sci. Food Agric.* 46: 319 — 324.
- Bartkowiak S., Kalinowska A., Radłowski M., Królikowski Z., Adamczyk J. 1997. Wykorzystanie markerów molekularnych do oznaczania podobieństwa genetycznego linii wsobnych kukurydzy z zasobów ZDHAR Smolice, w: *Hodowli Roślin — materiały z I Krajowej Konferencji*. Poznań, 19–20 XI 1997: 409 — 412.
- 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_1). *PTPN* Tom 93: 149 — 157.
- Charcosset A., Essioux L. 1994. The effect of population structure on the relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci. *Theor. Appl. Genet.* 89: 336 — 343.
- Charters Y. M., Robertson A., Wilkinson M. J., Ramsay G. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. Ssp. *Oleifera*) using 5' -anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* 92: 442 — 447.
- Cross C. E. 1966. Heterosis at the hybrid related to gene frequency differences between two populations. *Genetics* 53: 269 — 274.
- Demeke T., Adams R. P., Chibbar R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 990 — 994.
- Echt C. S., Erdahl L. A., Mc Coy T. J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome*. 35: 84 — 87.
- 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.
- Melchinger A. E. 1999. Genetic diversity and heterosis. In: *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. Wisconsin: 99 — 118.
- Mundges H., Kohler W., Friedt W. 1990. Identification of rape seed cultivars (*Brassica napus*) by starch — gel electrophoresis of enzymes. *Euphytica* 45: 179 — 187.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction end nucleases. *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.
- Rafalski A., Gidzińska M., Wiśniewska I. 1998. Systemy PCR w badaniach pokrewieństwa genetycznego linii kukurydzy. *Biul. IHAR* 208: 131 — 140.
- Riaz A., Quresh. Z. Swati M. S., Quiros C. F. 2001. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence — related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding* 120: 411 — 415.
- dos Santos J. B., Nienhuis J., Skroch P., Tivang J., Slocum M. K. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87: 909 — 915.

- Stuber 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.
- Sun G. L., Diaz O., Salomon B., Von Bothmer R. 1999. Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme RAPD and microsatellite markers. *Genome* 42: 420 — 431.
- Thompson D., Henry R. 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques*, 19: 394 — 400.
- Thorman C. E., Ferreira M. E., Camargo L. E. A., Tivang J. G., Osborn T. C. 1994. Comparison of RAPD and RFLP markers for estimating genetic relationship within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88:973 — 980.
- Tinker N. A., Fortin M. G., Mather D. E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 976 — 984.
- White J., Law J. 1991. Differentiation between varieties of oilseed rape *Brassica napus* L. On the fatty acid composition of the oil. *Plant Var. Seeds* 4: 125 — 132.
- 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.