

JANUSZ ROGACKI ¹
ZOFIA BULIŃSKA-RADOMSKA ²
JAKUB DZIENKIEWICZ ²
JÓZEF ADAMCZYK ¹
HENRYK CYGERT ¹

¹ HR Smolice Sp. z o.o. Gr. IHAR

² Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, IHAR Radzików

Zróznicowanie genetyczne linii wsobnych kukurydzy a plonowanie odmian mieszańcowych

Genetic distance among inbred lines of maize and its association with hybrid performance

Celem pracy była ocena zróznicowania genetycznego 10 linii wsobnych o ziarnie zęboksztalnym (dent) i 7 linii o ziarnie szklistym (flint) kukurydzy w relacji do plonowania 70 mieszańców eksperymentalnych powstałych w wyniku czynnikowego układu krzyżowania „dent × flint”. Do oceny zróznicowania genetycznego 17 linii wsobnych kukurydzy użyto markerów RAPD generowanych w oparciu o technikę PCR. Do powielania znaczników (markerów) wykorzystano 12 semi-specyficznych 18.-nukleotydowych starterów. Wyliczenie wartości współczynnika dystansu genetycznego Nei'a pomiędzy poszczególnymi badanymi liniami zostało przeprowadzone w oparciu o 404 polimorficzne fragmenty DNA. Wartości współczynników dystansu genetycznego wyliczono wg metody Nei & Li (1979). Większość wykorzystanych starterów generowała obrazy z wysokim udziałem fragmentów polimorficznych. Wartości współczynników dystansu genetycznego uzyskane dla par linii były stosunkowo wysokie i zawierały się w przedziale od 0,29 do 0,72. Analiza skupień przeprowadzona metodą średnich połączeń (UPGMA) wartości współczynników dystansu genetycznego dała podstawę do wyodrębnienia trzech różniących się między sobą grup linii kukurydzy; dwóch w obrębie linii o ziarnie zęboksztalnym oraz jednej wspólnej dla linii szklistych. Średnia wartość współczynnika dystansu genetycznego w obrębie linii zęboksztalnych wyniosła 0,56, natomiast w obrębie linii szklistych 0,46. Regresja plonów 70 mieszańców (dent × flint) względem dystansu genetycznego linii rodzicielskich tworzących ich formuły, wskazuje na bardzo słaby związek obu cech. Reasumując, przedstawiona metoda jest bardziej przydatna do poprawnego zaszeregowania linii do właściwej grupy heterotycznej niż do prognozowania wysokości plonu ziarna mieszańca na podstawie dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi.

Słowa kluczowe: markery molekularne, plon mieszańców, *Zea mays* L.

The main objective of the present study was to evaluate the genetic diversity of 17 (10 dent and 7 flint) inbred lines of maize in relation to yield performance of 70 hybrids produced according to North Carolina II design “dent × flint”. To assess genetic divergence among 17 inbred lines, random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers were used. Twelve different primers consisting of 18 nucleotides were used to produce a total of 404 reproducible amplification DNA fragments, the majority

of which were polymorphic. The values of genetic distance were calculated according to Nei & Li method (1979). The genetic distance among pairs of inbred lines ranged from 0.29 to 0.72. A dendrogram was constructed by an unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). Cluster analysis divided the inbred lines into three groups: one including the flint lines only, and two groups composed of the dent type lines. The average value of genetic distance for pair comparison between the dent lines was higher ($GD = 0.56$) than that for the flint lines ($GD = 0.46$). Regression of hybrids grain yield on a genetic distance of their parental inbred lines showed very low correlation. The method used in this research is useful to allocate lines into a heterotic group rather than predict hybrid yield performance.

Key words: hybrid performance, molecular markers, *Zea mays* L.

WSTĘP

Molekularne metody w służbie konwencjonalnej hodowli rekombinacyjnej odgrywają coraz większą rolę (Niebur, 2004; Wolko, 1997). W przypadku plonu, podstawowej cechy poligenicznej branej pod uwagę przez hodowcę w procesie tworzenia nowych odmian, techniki molekularne mające wspomóc proces selekcji (MAS — marker-assisted selection) poszły w dwóch kierunkach: bezpośrednio tworzenie markerów sprzężonych z QTL (quantitative trait loci) (Frascaroli i in., 2007) oraz markerów oceniających dystans genetyczny pomiędzy liniami, które tworzą formuły mieszańców.

Związek między dystansem genetycznym użytych do krzyżówki komponentów rodzicielskich a przejawianą heterozją został wykazany jeszcze przed nadejściem metod molekularnych. Teoria genetyki ilościowej zakłada, że heterozja jest funkcją kwadratu różnicy częstości genów między komponentami krzyżówki, a także efektu dominacji wykazywanego przez allele kontrolujące rozpatrywaną cechę (Cress, 1966; Falconer, 1974). Im jest większy dystans genetyczny pomiędzy rodzicami użytymi do krzyżówki, tym teoretycznie jest większy efekt heterozji mieszańca w stosunku do rodziców, a tym samym większy plon. Badanie tej zależności w kukurydzy było najczęściej wykonywane przy pomocy: (1) markerów RFLP (restriction fragment length polymorphism), (Godshalk i in., 1990; Lee i in., 1990; Bernardo, 1994; Dudley, 1994); (2) markerów AFLP (amplified fragment length polymorphisms), (Ajmone Marsan i in., 1998; Vuylsteke i in., 2000); (3) markerów RAPD (random amplified polymorphic DNA), (Lanza, 1997; Bruel, 2006); oraz dominujących obecnie (4) markerów SSR (simple sequence repeat), (Reif, 2003; Balestre, 2008, Mohammadi, 2008).

Prezentowany w przytoczonych pracach tzw. „distance” model nie daje satysfakcjonujących wyników w przewidywaniu plonów mieszańców na podstawie dystansu genetycznego linii rodzicielskich. Związek ten był wyraźnie silniejszy wśród linii skrzyżowanych w obrębie tej samej grupy pochodzeniowej (intra-heterotic crosses) aniżeli linii skrzyżowanych pomiędzy grupami (inter-heterotic crosses) (Melchinger, 1999). Należy nadmienić, że tylko mieszańce powstałe ze skrzyżowania linii należących do odrębnych grup heterotycznych (np. Stiff Stalk \times Lancaster, czy Dent \times Flint) tworzą formuły zarejestrowanych odmian mieszańcowych kukurydzy. Dlatego najważniejszym zastosowaniem wymienionych wyżej markerów molekularnych z punktu widzenia hodowcy, wydaje się być oszacowanie zmienności badanego materiału oraz jego pogrupowanie

w odrębne grupy heterotyczne (Dudley i in., 1991; Melchinger i in., 1991; Lübberstedt i in., 2000).

Technika RAPD polega na powielaniu polimorficznych fragmentów DNA dzięki zastosowaniu krótkich starterów (najczęściej 10. nukleotydowych) hybrydujących do DNA genomowego w sposób losowy. Stosowane są również modyfikacje wyjściowej techniki RAPD w postaci dłuższych starterów 15. lub 18. nukleotydowych oraz starterów częściowo komplementarnych do sekwencji styku intron-egzon (Rafalski i in., 1998).

Celem prezentowanej pracy jest analiza genetycznego zróżnicowania linii wsobnych kukurydzy pochodzących z programu hodowlanego HR Smolice za pomocą markerów RAPD. Na wartości dystansu genetycznego linii nałożono wartości plonu ziarna i heterozji uzyskane przez mieszańce, powstałe ze skrzyżowania linii poddanych analizie molekularnej, co pozwala ocenić związek dystansu między liniami rodzicielskimi a plonami mieszańców.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy do analizy molekularnej stanowiło 10 linii wsobnych kukurydzy o ziarnie zębkształtnym i 7 linii o ziarnie szklistym, pochodzących z ostatnich 40 lat Smolickiego programu hodowli mieszańcowej (tab. 1).

Tabela 1

Charakterystyka linii wsobnych kukurydzy
Characteristics of inbred lines of maize

L.p. No.	Linia wsobna Inbred line	Typ ziarna Grain type	Grupa pochodzeniowa Heterotic group	Rok wyhodowania linii ¹ Year of development
1.	S72	Dent	nieznana — unknown(miesz. — mix FUNK 72-75)	1965
2.	S245	Dent	Idt ² , SSS ³	1988
3.	S41796	Dent	Idt	1996
4.	S68911	Dent	Idt, SSS	2001
5.	S63322-3	Dent	SSS, (Idt)	2001
6.	S63322-1	Dent	SSS, (Idt)	2002
7.	S67816	Dent	SSS, (Idt)	2001
8.	S63775	Dent	Idt, SSS, 354	2003
9.	S63963	Dent	354, SSS, (Idt)	2003
10.	S72846A-2	Dent	SSS, (Idt)	2004
11.	F ₂	Flint	F ₂ (populacja Lacaune)	1955
12.	S14	Flint	nieznana — unknown (popul. — population Wielkopólanka)	1964
13.	S41324A-2	Flint	F ₂ , EP1	1995
14.	S61328	Flint	F ₂ , EP1	2001
15.	S66191	Flint	F ₂ , EP1	2002
16.	S64673	Flint	F ₂ , EP1	2003
17.	S56601-2	Flint	F ₂ , CM7, EP1, Lancaster	2003

¹ Za rok wyhodowania linii przyjęto ten, w którym weszła ona pierwszy raz do formuły odmiany mieszańcowej badanej w doświadczeniach wstępnych, zwykle po 8–10 pokoleniach chowu wsobnego

² Idt = Iowa Dent

³ SSS = Stiff Stalk Synthetic

Dla każdej wytypowanej do badań linii wysiano w warunkach szklarniowych po 20 roślin, z czego do analizy pobrano materiał z 10 roślin. Izolację DNA przeprowadzono ze

świeżych liści przy zastosowaniu zestawu „Dneasy Plant Mini Kit” firmy QIAGEN, a następnie określono stężenie DNA metodą spektrofotometryczną przy zastosowaniu spektrofotometru ND-1000 Spectrophotometer. Do powielania zastosowano następujące semi-specyficzne startery ukierunkowane na sekwencje styku intron-ekson: ET 1/18, ET 2/18, ET 3/18, ET 4/18, ET 5/18, ET 6/18, ET 7/18, ET 8/18, ET 9/18, ET 10/18, ET 11/18, ET 12/18 (tab. 2).

Tabela 2

Sekwencje 18. nukleotydowych starterów użytych do reakcji semi-PCR. Fragment pogrubiony jest komplementarny do styku intron-egzon
Base sequences of the primers used in semi-PCR reaction. The bases that match intron-egzon sequence are shown in bold

Starter — Primer	Sekwencja nukleotydów — Base sequence
ET 1/18	ACTTACCTGAGGCGCGAC
ET 2/18	ACTTACCTGCTGGCCGGA
ET 3/18	ACTTACCTGGCCAGTCGC
ET 4/18	ACTTACCTGCCTGCCGAG
ET 5/18	ACTTACCTGGCACGCCTC
ET 6/18	ACTTACCTGCCTACGCGG
ET 7/18	ACTTACCTGAGGCTGCCG
ET 8/18	ACTTACCTGTGCCACGCC
ET 9/18	ACTTACCTGGCCGAGAGG
ET 10/18	ACTTACCTGGTCGGTGGG
ET 11/18	ACTTACCTGCCGCATCCG
ET 12/18	ACTTACCTGGGGCCGATC

Powielanie fragmentów DNA przeprowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) w układzie zawierającym w objętości 20 µl: 10 ng DNA roślinnego, 1× bufor (MBI Fermentas, Wilno), 2,5 mM MgCL₂, 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1-1.2 µM startera i 1 jednostkę termostabilnej polimerazy (MBI Fermentas). Powielanie DNA było prowadzone dwustopniowo, w pierwszych siedmiu cyklach temperatura przyłączania startera była o 2°C wyższa od wyliczonej na podstawie sekwencji i długości startera, a w następnych 33 cyklach temperaturę tę podwyższono o dalsze 4°C. We wszystkich cyklach powielania denaturację przeprowadzano przez 40 sek. w temperaturze 94°C, przyłączanie startera trwało 1 min., a wydłużanie łańcuchów DNA 2 min. w 72°C. Produkty powielania rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym w buforze TBE i wizualizowano przy użyciu bromku etydyny. Wyniki badań molekularnych poddano analizie za pomocą programu komputerowego BioGene Windows Application V 11.9. Przedstawiono je w porządku klasyfikującym dane na poziomie ciężaru cząsteczkowego, przy zastosowaniu tolerancji na poziomie 3%. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu 12 wybranych starterów stanowiły podstawę do wyliczenia wartości wskazań odległości genetycznej Nei'a pomiędzy badanymi liniami kukurydzy (Nei i Li, 1979). Do wyliczenia tych wartości wykorzystano arkusz N50_1500 w programie Excel. Analizę skupień metodą średnich połączeń (UPGMA) na podstawie wartości odległości genetycznej przeprowadzono w programie SAS 9.1.

W doświadczeniach polowych na ziarno badano 70 mieszańców eksperymentalnych powstałych w wyniku czynnika układu krzyżowań Dent × Flint oraz 17 linii

rodzicielskich. Doświadczenia założono w dwóch sezonach wegetacyjnych 2005 i 2006 w miejscowościach:

- (1) Dłoń, woj. wielkopolskie, powiat rawicki, gmina Miejska Górka,
- (2) Kobierzyce, woj. dolnośląskie, powiat wrocławski, gmina Kobierzyce,
- (3) Łagiewniki, woj. wielkopolskie, powiat krotoszyński, gmina Kobylin.

Doświadczenia polowe założono metodą bloków kompletnych w trzech powtórzeniach na poletkach dwurzędkowych o powierzchni 5,0 m². Uzyskano stałą dla wszystkich obiektów obsadę w Dłoni i Łagiewnikach wynoszącą 8,0 roślin/m², a w Kobierzycach 7,2 rośliny/m². Obserwacje i pomiary wykonane w okresie wegetacji dla doświadczeń z mieszańcami i liniami rodzicielskimi, wchodziły w skład standardowych obserwacji dla doświadczeń ziarnowych kukurydzy. Spójny układ miejscowości i lat umożliwił analizę statystyczną plonu ziarna przy 15% zawartości wody, korzystając z metodyki i programu statystycznego SERGEN 3 opracowanego w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu.

WYNIKI

Ocena dystansu genetycznego wytypowanych linii oparta była o 404 fragmenty DNA. Większość wykorzystanych starterów generowała obrazy z wysokim udziałem pasm polimorficznych, co umożliwiło precyzyjne określenie dystansu genetycznego badanych linii.

Tabela 3

Wartości odległości genetycznej Nei'a dla 17 linii kukurydzy wyliczone na podstawie analizy 404 fragmentów DNA
Values of genetic distances for 17 inbred lines of maize obtained from the analysis of 404 amplification products

Linia wsobna Inbred line	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
(01) S72	0																
(02) S245	0,39	0															
(03) S41796	0,53	0,46	0														
(04) S68911	0,53	0,52	0,40	0													
(05) S63322-3	0,60	0,55	0,56	0,44	0												
(06) S63322-1	0,66	0,60	0,61	0,54	0,38	0											
(07) S67816	0,63	0,60	0,60	0,50	0,51	0,47	0										
(08) S63775	0,70	0,65	0,69	0,64	0,59	0,56	0,39	0									
(09) S63963	0,65	0,64	0,61	0,64	0,60	0,52	0,47	0,37	0								
(10) S72846A-2	0,72	0,66	0,64	0,60	0,53	0,59	0,53	0,52	0,50	0							
(11) F2	0,61	0,61	0,62	0,63	0,62	0,61	0,65	0,62	0,58	0,49	0						
(12) S14	0,63	0,62	0,61	0,64	0,64	0,62	0,63	0,59	0,52	0,52	0,40	0					
(13) S41324A-2	0,67	0,69	0,64	0,66	0,65	0,60	0,62	0,59	0,57	0,51	0,47	0,37	0				
(14) S61328	0,72	0,71	0,65	0,66	0,65	0,63	0,66	0,67	0,65	0,57	0,49	0,47	0,29	0			
(15) S66191	0,62	0,64	0,60	0,56	0,59	0,57	0,65	0,66	0,64	0,56	0,52	0,47	0,40	0,29	0		
(16) S64673	0,71	0,71	0,66	0,67	0,63	0,64	0,64	0,67	0,64	0,59	0,61	0,52	0,50	0,44	0,42	0	
(17) S56601-2	0,62	0,65	0,67	0,64	0,61	0,62	0,64	0,69	0,63	0,58	0,60	0,50	0,54	0,52	0,47	0,45	0

Wartości współczynników dystansu genetycznego uzyskane dla par linii są generalnie bardzo wysokie i świadczą o wysokim genetycznym zróżnicowaniu badanych materiałów.

Wartości tego współczynnika dla par badanych linii kukurydzy zawierały się w przedziale od 0,29 do 0,72 (tab. 3). Dla wszystkich możliwych 136 par porównywanych linii, średni dystans genetyczny wyniósł 0,58. Średni dystans w obrębie linii szklitych wyniósł 0,46; linii zębokształtnych 0,56 a najwyższy był dla 70 par Dent × Flint — 0,63 (tab. 4).

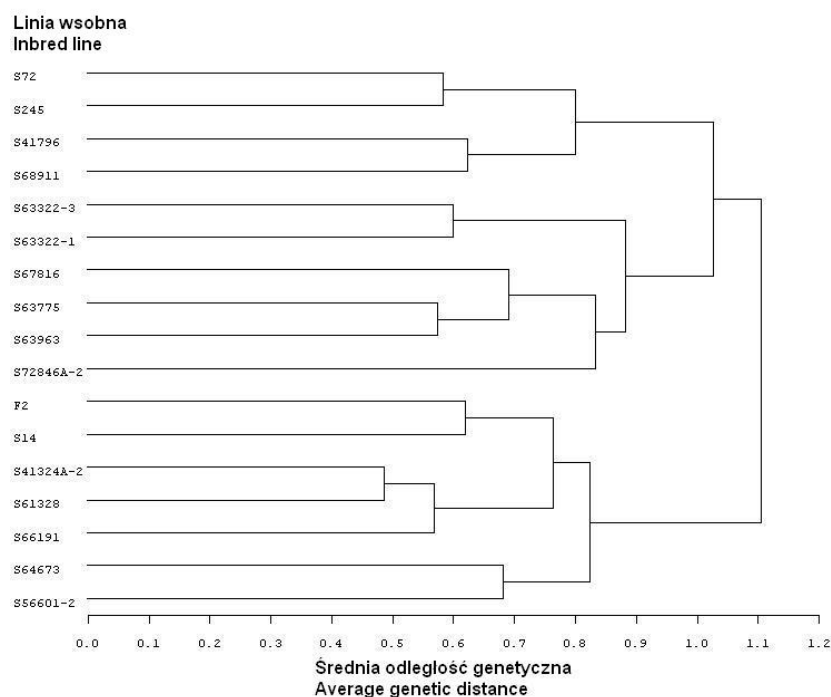
Tabela 4

Zestawienie grup ocenianych par linii, ich liczebność a także wartość średnia, minimalna, maksymalna oraz odchylenie standardowe wartości dystansu genetycznego
Compilation of groups of evaluated pairs of lines, their quantity, mean value, minimum, maximum and standard deviation of their genetic distance

Grupa par linii Group of inbred pairs	Liczba ocenianych par No. of evaluated pairs	Średnia Mean	Min. Min.	Maks. Max.	OS SD
Flint × Flint	21	0,46	0,29	0,61	0,08
Dent × Dent	45	0,56	0,37	0,72	0,09
Dent × Flint	70	0,63	0,49	0,72	0,05
Gr.I × Gr.I	6	0,47	0,39	0,53	0,06
Gr.II × Gr.II	15	0,50	0,37	0,60	0,07
Gr.III × Gr.III	patrz — see "Flint x Flint"				
Gr.I × Gr.II	24	0,61	0,44	0,72	0,06
Gr.I × Gr.III	28	0,65	0,56	0,72	0,04
Gr.II × Gr.III	42	0,61	0,49	0,69	0,05

Najwyższe wartości tego współczynnika uzyskano dla par linii S72846A-2 i S72 (Dent i Dent) oraz S61328 i S72 (Flint i Dent). Linie te należy uznać za najbardziej różniące się od siebie. Na dość wysokim poziomie kształtował się również współczynnik dystansu genetycznego pomiędzy liniami S64673 i S72 (Flint i Dent), S64673 i S245 (Flint i Dent), S61328 i S245 (Flint i Dent) oraz S63775 i S245 (Dent i Dent). Natomiast najniższa wartość współczynnika dystansu wynoszącą 0,29 obserwowano pomiędzy liniami szklitymi S61328 i S41324A-2 oraz S66191 i S61328. Świadczy to o najwyższym genetycznym podobieństwie pomiędzy wymienionymi liniami w obrębie badanego materiału.

Diagram uzyskany w analizie skupień (rys. 1) przedstawia arbitralnie wyodrębnione trzy różniące się między sobą zgrupowania linii kukurydzy świadczące o ich najwyższym wzajemnym podobieństwie w obrębie grup i mniejszym w stosunku do pozostałych linii. W skład grupy I weszły 4 linie zębokształtne: S72, S245, S41796 i S68911, generalnie reprezentujące plazmę Iowa Dent (Idt). W skład grupy II weszło 6 linii zębokształtnych: S63322-3, S63322-1, S67816, S63775, S63963 oraz S72846A-2, reprezentujących linie z dużym udziałem plazmy Stiff Stalk Synthetic (SSS). III grupa, umiejscowiona w dolnej części diagramu, zawiera wszystkie linie szklite, które stanowią wyodrębnioną grupę najbardziej różniących się genetycznie linii od pozostałych dziesięciu linii zębokształtnych. W obrębie poszczególnych grup wyróżnić można szereg dwuliniowych zgrupowań, a więc par linii najbardziej do siebie genetycznie podobnych.



Rys. 1. Dendrogram dla linii kukurydzy wyznaczony za pomocą metody UPGMA z wykorzystaniem odległości genetycznej Nei'a

Fig. 1. A dendrogram for the maize lines as determined based on the UPGMA method using Nei's genetic distance

Wartości średnie dla plonu ziarna uzyskane przez mieszańce na podstawie wyników z 6 środowisk przedstawia tabela 5. Zawiera ona również wykazywaną przez mieszańce heterozję względem średniej rodziców. Średni plon całego doświadczenia był wysoki i wyniósł 11,58 t/ha dla mieszańców i 5,07 t/ha dla linii wsobnych. Wpłynęły na to wysokie plony w sezonie 2005, gdzie w Dłoni i Łagiewnikach osiągnięto średnie plony odpowiednio 12,86 t/ha i 12,81 t/ha (dla linii odpowiednio 6,37 t/ha i 6,27 t/ha). Kobierzyce ze średnią 10,98 t/ha uzyskały najniższy plon w wyniku lipcowego gradobicia (dla linii odpowiednio 4,65 t/ha). Sezon 2006 zmienił tę kolejność, gdyż lipcowa susza obniżyła plony najbardziej w Dłoni (10,55 t/ha dla mieszańców i 3,56 t/ha dla linii), następnie w Łagiewnikach (11,09 t/ha dla mieszańców i 4,51 t/ha dla linii), a najmniej w Kobierzycach, gdzie średni plon był najwyższy i wyniósł 11,20 t/ha dla mieszańców i 5,06 t/ha dla linii. Wyliczone efekty heterozji przybrały wartości od 81,5% do 381,1%. Skrajnie wysokie wartości, powyżej 230%, uzyskały mieszańce z linią S72846A-2, której problemy z zawiązaniem ziarna skutkowały najniższym plonem ziarna w doświadczeniu z liniami wsobnymi (1,11 t/ha).

Tabela 5

Średnie plony ziarna mieszańców (t/ha), heterozja w stosunku do średniej rodziców (%) oraz wartości dystansu genetycznego (GD) pomiędzy liniami rodzicielskimi

Grain yield of hybrids (t/ha), mid-parent heterosis (%) and values of genetic distance (GD) between parental inbred lines

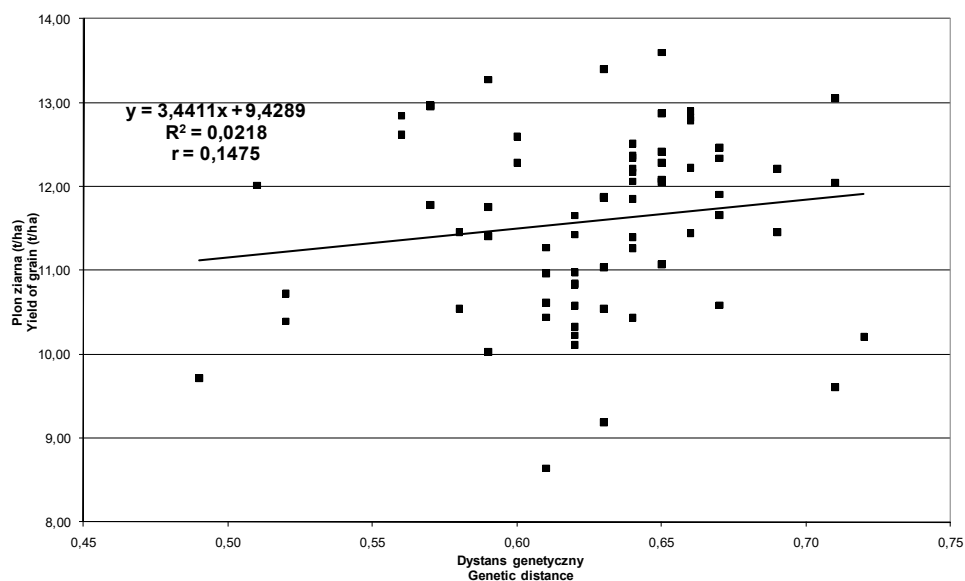
Nr No.	Mieszaniec Hybrid	Śr. (t/ha) Mean t/ha	Het. (%) Het. (%)	GD GD	Nr No.	Mieszaniec Hybrid	Śr. (t/ha) Mean t/ha	Het. (%) Het. (%)	GD GD
1	S72 * F2	8,64	95,7	0,61	36	S63322-1 * F2	10,61	109,4	0,61
2	S72 * S14	9,19	88,9	0,63	37	S63322-1 * S14	10,58	91,8	0,62
3	S72 * S41324A-2	10,58	95,5	0,67	38	S63322-1 * S41324A-2	12,60	107,8	0,60
4	S72 * S61328	10,21	73,8	0,72	39	S63322-1 * S61328	13,40	105,3	0,63
5	S72 * S66191	10,97	130,0	0,62	40	S63322-1 * S66191	12,96	139,0	0,57
6	S72 * S64673	9,61	94,4	0,71	41	S63322-1 * S64673	12,06	115,5	0,64
7	S72 * S56601-2	10,23	81,5	0,62	42	S63322-1 * S56601-2	11,43	81,8	0,62
8	S245 * F2	10,44	133,8	0,61	43	S67816 * F2	11,07	142,0	0,65
9	S245 * S14	10,83	120,4	0,62	44	S67816 * S14	11,04	119,8	0,63
10	S245 * S41324A-2	12,21	123,6	0,69	45	S67816 * S41324A-2	11,65	109,2	0,62
11	S245 * S61328	13,05	120,3	0,71	46	S67816 * S61328	12,79	112,0	0,66
12	S245 * S66191	12,51	159,6	0,64	47	S67816 * S66191	12,08	145,1	0,65
13	S245 * S64673	12,04	141,2	0,71	48	S67816 * S64673	12,17	138,5	0,64
14	S245 * S56601-2	12,28	116,0	0,65	49	S67816 * S56601-2	11,85	104,5	0,64
15	S41796 * F2	10,33	133,4	0,62	50	S63775 * F2	10,11	104,0	0,62
16	S41796 * S14	10,96	124,9	0,61	51	S63775 * S14	10,03	85,6	0,59
17	S41796 * S41324A-2	12,34	127,7	0,64	52	S63775 * S41324A-2	11,76	97,6	0,59
18	S41796 * S61328	12,42	111,1	0,65	53	S63775 * S61328	12,46	94,2	0,67
19	S41796 * S66191	12,28	156,9	0,60	54	S63775 * S66191	12,83	141,6	0,66
20	S41796 * S64673	11,45	131,2	0,66	55	S63775 * S64673	11,66	112,6	0,67
21	S41796 * S56601-2	12,34	118,6	0,67	56	S63775 * S56601-2	11,46	85,5	0,69
22	S68911 * F2	10,54	129,3	0,63	57	S63963 * F2	10,54	177,8	0,58
23	S68911 * S14	11,40	126,0	0,64	58	S63963 * S14	10,40	145,1	0,52
24	S68911 * S41324A-2	12,22	118,6	0,66	59	S63963 * S41324A-2	11,78	146,0	0,57
25	S68911 * S61328	12,90	113,1	0,66	60	S63963 * S61328	12,06	129,6	0,65
26	S68911 * S66191	12,84	159,4	0,56	61	S63963 * S66191	12,37	198,2	0,64
27	S68911 * S64673	11,91	132,5	0,67	62	S63963 * S64673	12,22	182,8	0,64
28	S68911 * S56601-2	11,26	93,6	0,64	63	S56601-2 * S63963	11,86	136,5	0,63
29	S63322-3 * F2	10,84	135,2	0,62	64	S72846A-2 * F2	9,71	333,2	0,49
30	S63322-3 * S14	10,43	106,3	0,64	65	S72846A-2 * S14	10,72	298,5	0,52
31	S63322-3 * S41324A-2	12,87	129,7	0,65	66	S72846A-2 * S41324A-2	12,01	271,1	0,51
32	S63322-3 * S61328	13,60	124,2	0,65	67	S72846A-2 * S61328	12,97	250,6	0,57
33	S63322-3 * S66191	13,28	167,6	0,59	68	S72846A-2 * S66191	12,62	386,1	0,56
34	S63322-3 * S64673	11,88	131,3	0,63	69	S72846A-2 * S64673	11,41	312,1	0,59
35	S63322-3 * S56601-2	11,27	93,4	0,61	70	S56601-2 * S72846A-2	11,45	230,8	0,58
Średnia — Mean		11,57	139,7	0,63					
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}		0,96							

DYSKUSJA

Większość prac próbujących empirycznie sprawdzić słuszność modelu opartego o dystans genetyczny linii wsobnych w przewidywaniu plonu mieszańców, dysponowało danymi z krzyżowania w częściowych układach diallelicznych (Bruehl i in., 2006). Do dyspozycji są wówczas plony ziarna zarówno mieszańców z przeciwstawnymi grup

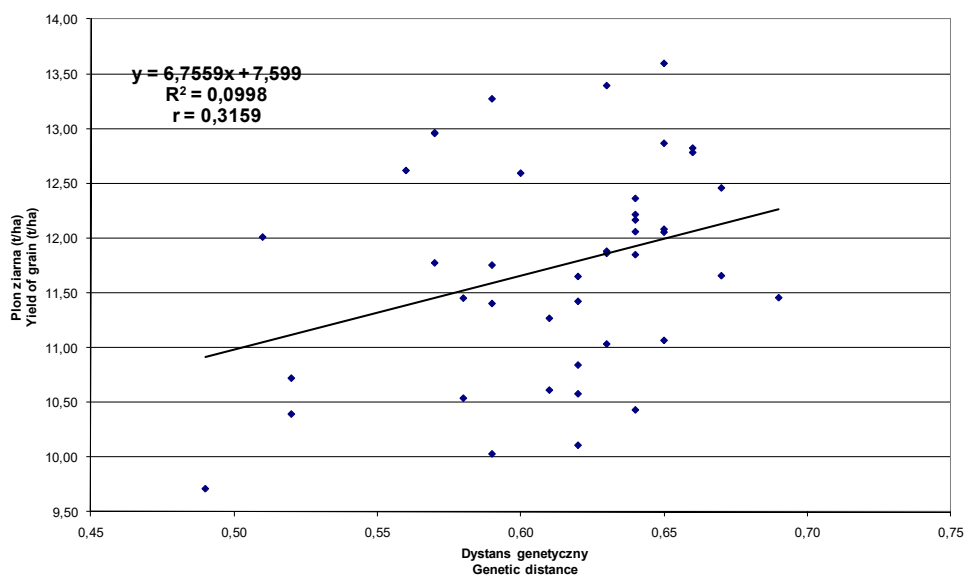
heterotycznych (inter-heterotic crosses), ale także mieszańców powstałych w obrębie poszczególnych grup pochodzeniowych (intra-heterotic crosses). Ma to duży wpływ na związek plonu mieszańców (oraz wykazywanej heterozji) i dystansu genetycznego linii rodzicielskich. Związek ten jest silniejszy wśród mieszańców powstałych ze skrzyżowania linii w obrębie tej samej grupy pochodzeniowej, a następnie maleje w kierunku mieszańców powstałych z linii niespokrewnionych (Melchinger, 1999). Hipoteza, że związek dystansu genetycznego i uzyskiwanych plonów nie ma postaci liniowej, została postawiona już w latach 60. ubiegłego wieku (Moll i in., 1965). Autorzy sugerują, że dla uzyskania maksymalnej heterozji potrzebny jest optymalny dystans pomiędzy komponentami krzyżówki — zwiększanie dystansu powyżej optimum wcale nie powoduje wzrostu heterozji. Wręcz przeciwnie, prowadzi do jej zmniejszenia, co przez niektórych biologów jest określane jako „outbreeding depression” (Lynch, 1990).

W omawianej pracy dysponowano plonami mieszańców powstałych ze skrzyżowania linii z grup przeciwstawnych, tzn. Dent × Flint. Brak mieszańców typu Dent × Dent oraz Flint × Flint niewątpliwie wpłynął na osiągnięte wartości korelacji dystansu linii rodzicielskich i uzyskanych plonów mieszańców. Ocena tej współzależności dla 70 mieszańców jest dodatnia (rys. 2), jednak o bardzo niskim współczynniku korelacji wynoszącym zaledwie 0,15. Wyższy, statystycznie istotny współczynnik korelacji wynoszący 0,32 zaobserwowano dla 42 mieszańców powstałych ze skrzyżowania 6 linii zębokształtnych (grupa II na diagramie odległości) z liniami szklistymi (rys. 3).



Rys. 2. Regresja plonu ziarna 70 mieszańców (Dent × Flint) względem dystansu genetycznego odpowiadających im linii rodzicielskich

Fig. 2. Yield of grain of 70 hybrids regressed on genetic distance of their parental inbred lines

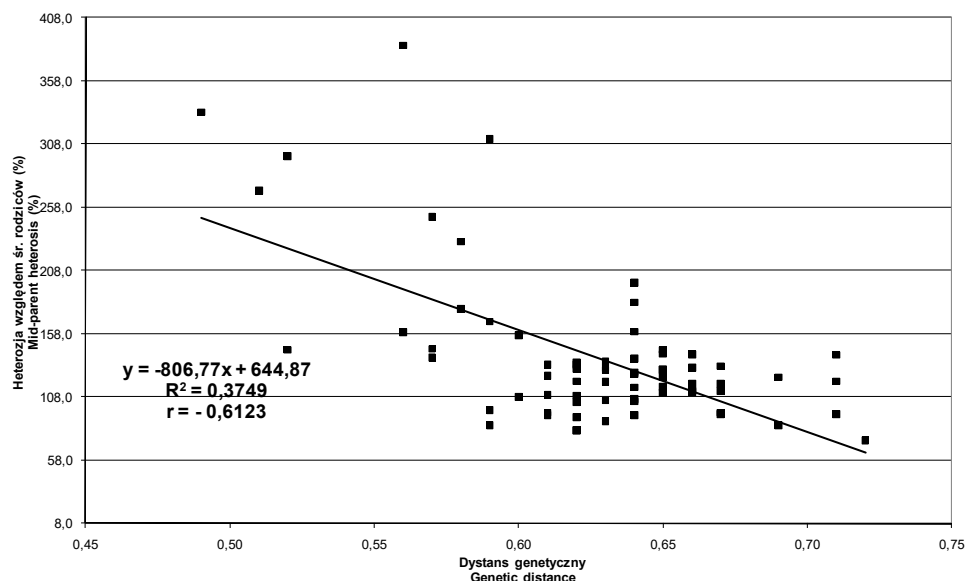


Rys. 3. Regresja plonu ziarna 42 mieszańców (6 linii Dent grupy II × Flint) względem dystansu genetycznego odpowiadających im linii rodzicielskich
Fig. 3. Yield of grain of 42 hybrids (6 Dent lines of group II × Flint lines) regressed on genetic distance of their parental inbred lines

Nie uzyskano natomiast dodatniej korelacji dystansu genetycznego i heterozji wykazywanej przez mieszańce w stosunku do średniej rodziców (rys. 4). Niewątpliwym wpływem na wartość współczynnika korelacji miały mieszańce z linią S72846A-2, których nienaturalnie wysokie efekty heterozji nałożyły się na niskie wartości dystansu genetycznego. Pomijając nawet wartości dla mieszańców z tą linią, wyliczony współczynnik korelacji pozostawał ujemny. Związku dystansu genetycznego z heterozją nie wykazał również Lanza (1997). Lee (2007) z pomocą markerów SSR, uzyskał statystycznie istotny związek pomiędzy wyliczonym podobieństwem genetycznym a heterozją, niemniej w przeciwieństwie do omawianej pracy, materiał roślinny stanowiły 3 grupy mieszańców wewnątrz-grupowych, powstałych ze skrzyżowania linii siostrzanych.

W pracy Adamczyka (2001) zastosowano zbliżoną metodykę RAPD, niemniej uzyskane wartości dystansu pomiędzy 14 liniami zębokształtnymi były niższe i wynosiły od 0,30 do 0,55 przy średniej 0,44. Większy zakres zmienności w omawianej pracy był niewątpliwie związany z materiałem roślinnym badanym w doświadczeniu, obejmującym podgatunki kukurydzy zarówno zębokształtnej jak i szklistej, a także różnic w wieku linii (wyhodowanych w latach 60. oraz współcześnie).

Średnie wartości dystansu genetycznego były mniejsze w obrębie grup pochodzeniowych, a większe dla par linii z różnych grup (tab. 4). Dla linii szklistych średni dystans wyniósł 0,46; dla zębokształtnych 0,56 a dla par Dent × Flint wyniósł 0,63.



Rys. 4. Regresja dla heterozji (plon ziarna 70 mieszańców względem średniej rodziców) i dystansu genetycznego odpowiadających im linii rodzicielskich
Fig. 4. Mid-parent heterosis for yield of grain of 70 hybrids regressed on genetic distance of their parental inbred lines

Podobne wartości uzyskali Bruel (2006) i Lanza (1997) używając również markerów RAPD w formach kukurydzy tropikalnej.

Diagram odległości ukazuje przynależność linii wsobnych do grup heterotycznych zgodną z zapisami rodowodowymi. Oprócz zaszeregowania wszystkich form szklistych do jednej grupy, diagram wyróżnia dodatkowe dwie grupy w obrębie linii zęboksztalnych, jedną z przewagą plazmy Idt, a drugą z przewagą plazmy SSS. Z uwagi na potwierdzony również w przytoczonej literaturze fakt poprawnego zaszeregowania linii do właściwych grup heterotycznych, ten aspekt prezentowanej metodyki opartej o stosunkowo niedrogi markery RAPD ma największe zastosowanie praktyczne w hodowli mieszańcowej kukurydzy.

Przykładowo, powszechna praktyka używania jako materiału wyjściowego wyróżniających się odmian mieszańcowych powoduje problemy z zaszeregowaniem wyprowadzonych linii wsobnych do ustalonych grup heterotycznych. Często hodowca, chcąc przeciwdziałać kurczącej się zmienności w obrębie grupy pochodzeniowej, świadomie krzyżuje linie należące do przeciwstawnych grup heterotycznych. W europejskich programach hodowlanych dotyczy to głównie form szklistych, których mały polimorfizm genetyczny został wykazany również w prezentowanej pracy (tab. 4). W obu przypadkach powstaje problem ze zbadaniem zdolności kombinacyjnej linii o nieokreślonej przynależności heterotycznej, gdyż utrudnia to dobranie partnera do krzyżowania

testowego. Dodanie kolejnych linii testujących reprezentujących więcej grup pochodzeniowych oznacza zwielfokrotnienie liczby mieszańców testowych zgodnie z czynnikiem układem krzyżowań: linie \times testery. Tym samym analiza molekularna, poprzez właściwe zaszeregowanie linii do grup heterotycznych ograniczy ilość zbędnych krzyżowań testowych, a w konsekwencji zmniejszy liczbę doświadczeń polowych.

WNIOSKI

1. Dla ocenianych w pracy linii, które pochodziły z przeciwstawnych grup heterotycznych (Dent \times Flint), dodatni współczynnik korelacji był za niski, by na podstawie dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi przewidywać wyniki plonowania mieszańców.
2. Jeszcze trudniej znaleźć związek heterozji przejawianej przez mieszańce w stosunku do dystansu genetycznego rodziców — w omawianym doświadczeniu uzyskano ujemny współczynnik korelacji pomimo oczekiwanej wartości dodatniej.
3. W zróżnicowanym materiale roślinnym prezentowanym w pracy, markery RAPD okazały się wystarczające do poprawnego zaszeregowania linii do grup heterotycznych, zgodnych z informacjami rodowodowymi.
4. Z uwagi na mniejszy koszt wykonania analizy RAPD w stosunku do pozostałych metod molekularnych, mogą one znaleźć zastosowanie w praktyce hodowlanej do eliminacji zbędnych krzyżowań testowych w materiałach o nieznanym pochodzeniu.

LITERATURA

- Adamczyk J. 2001. Wprowadzenie do krajowych materiałów hodowlanych plazmy zarodkowej kukurydzy północnoamerykańskiej (*Zea mays* L.). Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR. Nr 13. Radzików.
- 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.
- Balestre M., Machado J. C., Lima J. L., Souza J. C., Nóbrega Filho L. 2008. Genetic distance estimates among single cross hybrids and correlation with specific combining ability and yield in corn double cross hybrids. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): 65 — 73.
- Bernardo R. 1994. Prediction of single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci.* 34: 20 — 25.
- Bruel D. C., Carpentieri-Pípolo V., Gerage A. C., da Silva Fonseca Júnior N., Cavenaghi Prete C. E., de Fátima Ruas C., Ruas P. M., de Souza S.G.H., Garbuglio D. D. 2006. Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, vol. 41, n. 10.
- Cress C. E. 1966. Heterosis of the hybrid related to gene frequency differences between two populations. *Genetics* 53: 269 — 274.
- Dudley J. W., Saghai Maroof M. A., Ruffener G. K. 1991. Molecular markers and grouping parents in maize breeding programs. *Crop Sci.* 31:718–723.
- Dudley J.W. 1994. Comparison of genetic distance estimators using molecular-marker data. In: *Proc. Symp. Analysis of Molecular-Marker Data. Joint Plant Breeding Symposia Series, American Society for Horticultural Science, Crop Science Society of America, 5–6 August 1994, Corvallis Oregon*: 3 — 7.
- Falconer D. S. 1974. *Dziedziczenie cech ilościowych*. PWN, Warszawa.

- Frascaroli E., Cane M.A., Landi P., Pea G., Gianfranceschi L., Villa M., Morgante M., Pe M. E. 2007. Classical genetic and quantitative trait loci analyses of heterosis in a maize hybrid between two elite inbred lines. *Genetics* 176: 625 — 644.
- Godshalk E. B., Lee M., Lamkey K. R. 1990. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. *Theor. Appl. Genet.* 80: 273 — 280.
- Lanza L. L. B., Souza Júnior C. L., Ottoboni L. M. N., Vieira M. L. C., Souza A. P. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 1023 — 1030.
- Lee E.A., Lee M., Lamkey K. R. 1990. RFLP analysis of isogenic lines B14 and B14A. *Maize Genet Coop Newslett* 64: 20.
- Lübberstedt T., Melchinger, A. E., Dußle C., Vuylsteke M., Kuiper M. 2000. Relationships among early European maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD, and pedigree data. *Crop Sci.* 40: 783 — 791.
- Lynch M. 1990. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution.* 45 (3): 622 — 629.
- Melchinger A. E. 1999. Genetic diversity and heterosis. In: *The genetics and exploitation of heterosis in crops.* Coors J.G., Pandey S. (red.) ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wisconsin, p. 99 — 118.
- Melchinger A. E., Messmer M. M., Lee M., Woodman W. L., Lamkey K. R. 1991. Diversity and relationships among U.S. maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 31: 669 — 678.
- Mohammadi S. A., Prasanna B. M., Sudan C., Singh N. N. 2008. SSR heterogenic patterns of maize parental lines and prediction of hybrid performance. *Biotechnol. & Biotechnol. EQ.* 22/2008/1: 541 — 547.
- Moll R. H., Lonnquist J. H., Velez Fortuno J., Johnson E. C. 1965. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics* 52: 139 — 144.
- Nei M.; Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Sciences, Allahabad*, 76: 5269 — 5273.
- Niebur W. S., Rafalski J. A., Smith O. S., Cooper M. 2004. Applications of genomics technologies to enhance rate of genetic progress for yield of maize within a commercial breeding program. New directions for a diverse planet. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia.*
- Rafalski A., Gidzińska M., Wiśniewska I. 1998. Systemy PCR w badaniach pokrewieństwa genetycznego linii kukurydzy. *Biul. IHAR* 208: 131 — 140.
- Reif, J. C., Melchinger A. E., Xia X. C., Warburton M. L., Hoisington D. A., Vasal S. K., Srinivasan G., Bohn M., Frisch M. 2003. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. *Crop Sci.* 43:1275 — 1282.
- Wolko B., Bartkowiak-Broda I. 1997. Metody diagnostyki molekularnej w hodowli roślin. W: *Hodowla Roślin, mat. z I Krajowej Konferencji, Bartkowiak-Broda I, Święcicki W. (red.).* Poznań, 1997: 389 — 402.
- Vuylsteke M., Kuiper M., Stam P. 2000. Chromosomal regions involved in hybrid performance and heterosis: their AFLP®-based identification and practical use in prediction models. *Heredity* 85: 208 — 218.