

MARIA SURMA
TADEUSZ ADAMSKI
ZYGMUNT KACZMAREK
PAWEŁ KRAJEWSKI

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Genetyka ilościowa — przegląd przez stulecie

Quantitative genetics —review through the century

W pracy przedstawiono rozwój genetyki cech ilościowych na tle najistotniejszych osiągnięć w biometrii i naukach biologicznych. Dokonano przeglądu stosowanych podejść i metod w ujęciu historycznym wyodrębniając cztery zasadnicze okresy: 1 — powstanie hipotezy czynników wielokrotnych, 2 — rozwój metod opartych na mieszańcach wczesnych pokoleń, 3 — zastosowanie linii podwojonych haploidów (DH) w badaniach nad dziedziczeniem cech ilościowych, 4 — połączenie metod genetyki ilościowej i molekularnej. Okresy te scharakteryzowano biorąc pod uwagę możliwości oceny efektów allelicznego i nieallelicznego działania genów, liczby segregujących genów oraz wykrywania sprzężeń. Omówiono także najnowsze trendy w badaniach dotyczących molekularnych podstaw dziedziczenia cech ilościowych.

Słowa kluczowe: genomika ilościowa, loci dla cech ilościowych, niealleliczna interakcja, poligeny, sprzężenia

In the paper a development of quantitative genetics has been presented on the background of the main achievements in biometry and biology. Different approaches and methods in historical aspect have been described and four periods in quantitative genetics history were distinguished: (1) formulating the hypothesis of polygenes, (2) the development of methods based on segregating generations, (3) the use of doubled haploid populations in analysis of quantitative inheritance, (4) combining quantitative and molecular genetics. These periods have been characterized taking into account estimation of allelic and nonallelic gene action effects, number of segregating genes and presence of linkage between genes. Current trends in studies on molecular basis of quantitative inheritance were also discussed.

Key words: nonallelic interaction, linkage, polygenes, quantitative genomics, quantitative trait loci

WSTĘP

Gregor Johann Mendel, zakonnik, opat i nauczyciel czeski, żyjący w latach 1822–1884, uznawany jest za twórcę teoretycznych podstaw genetyki. Prowadząc doświadczenia nad mieszańcami grochu siewnego odkrył w zjawiskach dziedziczenia pewne prawidłowości nazwane później prawami Mendla. Zarówno Mendel, jak i jego następcy świadomie pomijali cechy o zmienności ciągłej, prawdopodobnie dlatego, że wprowadziłyby one

zaburzenia do interpretacji wyników. Tymczasem cechy roślin i zwierząt wykazujące zmienność ciągłą były już w dziewiętnastym wieku obiektem badań, głównie statystyków. Należy tu wymienić przede wszystkim Francis Galtona (1822–1911), uznawanego za „ojca chrzestnego” biometrii. W 1889 roku opublikował on „Natural inheritance”, pracę, w której podał ogólne podstawy metod analizy zmienności u rodziców i ich potomstwa.

Galton i jego uczniowie, a także Karl Pearson (1857–1936) ze swoimi uczniami negowali słuszność stosowania praw Mendla w odniesieniu do cech ilościowych i traktowali zasady dziedziczenia nieciągłego jako wyjątek od uznawanego przez nich dziedziczenia typu ciągłego i „mieszającego się”. Z kolei zwolennicy Mendla uważali uznawaną przez biometrów zasadę dziedziczenia za niezgodną z nieciągłą zmiennością genetyczną, posuwając się nawet do stwierdzenia, że istnienie ciągłej zmienności fenotypowej jest dowodem niedziedzicznego charakteru cechy.

Spór między grupą genetyków i biometrów próbował rozstrzygnąć Yule w 1906 roku twierdząc, że nie ma sprzeczności między zasadami dziedziczenia ciągłego i nieciągłego. Wykazał on, że dziedziczenie zmienności ciągłej można wytłumaczyć istnieniem wielu czynników wywołujących niewielkie i podobne efekty, przy czym każdy pojedynczy czynnik dziedziczy się zgodnie z prawami Mendla. Koncepcja tzw. czynników wielokrotnych została poparta przez dwóch genetyków szwedzkich: Johannsena, który prowadząc eksperyment z fasolą wykazał, że ciągły charakter zmienności jest wynikiem łącznego działania czynników dziedzicznych i niedziedzicznych oraz Nilsona-Ehle, który opisał naturalny model działania czynników wielokrotnych prezentowany przez Yule’a. Ostateczny dowód, że dziedziczenie cech ilościowych można przypisywać licznym genom o podobnym działaniu przedstawił East (1916). Jednakże za początek rozwoju nowoczesnej genetyki cech ilościowych można przyjąć datę ogłoszenia w roku 1918 przez Ronalda Fishera pracy pt. „The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance”. W pracy tej przedstawione zostały podstawy modelowania matematycznego dotyczące działania genów przy dziedziczeniu poligenicznym.

Wykorzystanie metod statystycznych w badaniach z zakresu genetyki ilościowej można było obserwować przez cały ubiegły wiek, a i obecnie, wraz z rozwojem biologii molekularnej nie tylko ono nie maleje, ale nabiera coraz większego znaczenia. Co więcej, im bardziej wyrafinowane metody molekularne są stosowane, tym bardziej skomplikowane metody statystyczne muszą być opracowywane i używane do poprawnej analizy i interpretacji wyników eksperymentów biologicznych.

BADANIE STRUKTURY GENETYCZNEJ POPULACJI POD WZGLĘDEM CECH ILOŚCIOWYCH POPRZEZ STATYSTYCZNĄ ANALIZĘ ZMIENNOŚCI

Wykazanie przez Johannsena występowania różnicy między genotypem i fenotypem oraz udowodnienie przez Nilssona-Ehle i Easta faktu, że cechy ilościowe dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla pozwoliło jednoznacznie stwierdzić, że zmienność fenotypu jest wynikiem łącznego działania genotypu i środowiska.

Działanie to można przedstawić w postaci liniowego modelu matematycznego.

Model matematyczny wartości fenotypowej można zapisać następująco:

$$P = G + E,$$

gdzie:

G — jest wartością genotypową, a E — efektem środowiskowym.

Korzystając ze wzoru na wariancję sumy zmiennych losowych oraz przyjmując nieskorelowanie zmiennych G i E otrzymujemy

$$\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2,$$

gdzie σ_P^2 jest wariancją fenotypową, σ_G^2 — wariancją genotypową a σ_E^2 — wariancją środowiskową.

Fisher (1918) zaproponował podział zmienności genetycznej na 3 składniki zmienności dziedzicznej, który stał się paradygmatem genetyki ilościowej:

- zmienność addytywną, określającą różnicę między homozygotami w każdym *locus*,
- zmienność dominacji, wynikającą ze współdziałania alleli (współdziałanie intra-alleliczne),
- zmienność epistatyczną, wynikającą ze współdziałania genów nieallelicznych (współdziałanie interalleliczne).

Oznacza to, że wariancję genotypową można przedstawić jako wariancję addytywną, σ_A^2 , i nieaddytywną σ_{NA}^2 , będącą sumą wariancji dominacji σ_D^2 i epistazy σ_I^2 , czyli

$$\sigma_G^2 = \sigma_A^2 + \sigma_{NA}^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2.$$

Stosunek wariancji genotypowej, a także genetycznej wariancji addytywnej do wariancji fenotypowej może być znaczącą właściwością populacji ze względu na badaną cechę ilościową. Udział wariancji genotypowej σ_G^2 w wariancji fenotypowej σ_P^2 świadczy o stopniu zgodności wartości fenotypowej P z wartością genotypową G u osobników danej populacji, natomiast udział genetycznej wariancji addytywnej σ_A^2 w wariancji fenotypowej σ_P^2 określa stopień współzależności (zgodności) między wartością fenotypową a sumą efektów addytywnych. Zgodności te wyrazić można za pomocą dwóch wielkości przedstawiających odpowiednio współczynnik odziedziczalności w szerszym sensie

$$h_G^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2} = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

i współczynnik odziedziczalności w węższym sensie

$$h_A^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2 + \sigma_E^2}.$$

CECHY JAKOŚCIOWE A CECHY ILOŚCIOWE

Jak stwierdziliśmy wyżej, zasadniczą różnicą między cechami jakościowymi a ilościowymi, która legła u podstaw sporu między biologami na początku ubiegłego wieku, jest ciągły charakter zmienności cech ilościowych. Fakt ten implikuje nieco inne podejścia w pracach nad poznaniem sposobu ich dziedziczenia. W przypadku cech jakościowych główny nacisk położony jest na:

- liczbę genów warunkujących cechę,
- współdziałanie alleli w jednym *locus* (dominacja, ko-dominacja, recesywność),
- współdziałanie alleli z różnych *loci* (epistaza),
- oszacowanie współczynnika rekombinacji (w przypadku cech sprzężonych).

Wszystkie te informacje można łatwo uzyskać obserwując badaną cechę u mieszańców pokolenia F_1 oraz rozszczepienia w pokoleniu F_2 lub/i w pokoleniach mieszańców uzyskanych w pokoleniach wstecznych.

W odniesieniu do cech ilościowych badania zmierzają do poznania ich dziedziczenia poprzez:

- określenie sposobu działania genów na podstawie:
 - oceny efektów addytywnych i dominacyjnych,
 - oceny efektów współdziałania genów z różnych *loci* (niealleliczna interakcja),
- oszacowanie liczby czynników efektywnych warunkujących daną cechę,
- stwierdzenie, czy geny warunkujące daną cechę dziedziczą się niezależnie.

Istotnym elementem badań związanych z cechami ilościowymi jest także określenie wpływu środowiska na obserwowaną zmienność oraz interakcji genotypowo-środowiskowej.

Jak można zauważyć, zasadnicza różnica między tymi dwiema grupami cech polega na tym, że w cechach jakościowych stwierdza się występowanie danego zjawiska na podstawie prostych obserwacji fenotypowych, natomiast w cechach ilościowych wyraża się efekty tego zjawiska liczbowo. Najczęściej szacuje się odpowiednie parametry genetyczne (na podstawie wartości średnich lub wariancji) i na podstawie ich istotności wnioskuje się sposobie działania genów. Do najczęściej stosowanych parametrów, opartych na wartościach średnich odpowiednich zestawów generacji należą (w tzw. zapisie F_∞ -metrics): [d], [h], [i], [l], i [j], charakteryzujące, kolejno, efekty addytywnego działania genów, dominacji oraz nieallelicznej interakcji *loci* homo \times homo, hetero \times hetero i homo \times hetero (Mather i Jinks, 1970; Kaczmarek i in., 1984).

W przypadku cech ilościowych analiza tylko mieszańców F_1 i F_2 jednej kombinacji krzyżówkowej, tak jak ma to miejsce w badaniu dziedziczenia cech jakościowych, nie pozwala ani na określenie sposobu działania genów, ani na oszacowanie liczby genów, czy też stwierdzenie występowania sprzężeń. Aby uzyskać choć część z tych informacji, w połowie ubiegłego wieku rozwinięto wiele metod opartych na analizie mieszańców uzyskanych z krzyżowań w odpowiednich układach, bądź też na analizie mieszańców kilku pokoleń tej samej kombinacji krzyżówkowej.

METODY OPARTE NA MIESZAŃCACH WCZESNYCH POKOLEŃ

Lata pięćdziesiąte i sześćdziesiąte dwudziestego wieku były okresem intensywnego rozwoju metod analizy dziedziczenia cech ilościowych opartych na danych uzyskiwanych z obserwacji mieszańców wczesnych pokoleń. Można podzielić je na dwie grupy:

- jednoczesna analiza tego samego pokolenia (najczęściej F_1) różnych kombinacji krzyżowań,
- jednoczesna analiza różnych pokoleń tej samej kombinacji krzyżowań.

Do pierwszej grupy zaliczyć można metody wykorzystujące różne układy krzyżowań, na przykład krzyżowania dialleliczne, linia \times tester, top-croos i inne pokrewne. Analizując mieszańce uzyskane z takich krzyżowań można oszacować wariancję addytywną i nieaddytywną, a testowanie odpowiednich hipotez dotyczących komponentów wariacyjnych pozwala na przykład stwierdzić występowanie dominacji, oszacować stosunek genów dominujących do recesywnych czy współczynnik odziedziczalności. Metody te ograniczone są jednak szeregiem założeń, z których najistotniejsze to brak nieallelicznej interakcji i brak sprzężeń (Hayman, 1954; Griffing, 1956; Dobek i in., 1978). Założenia te zawężyły zakres uzyskiwanych informacji, sprowadzających się w zasadzie do określenia podstawowego sposobu działania genów (addytywność, dominacja), co więcej, informacje te dotyczyły całego zestawu analizowanych mieszańców, a nie pojedynczych kombinacji. Przyjęcie takich założeń było konieczne, ponieważ uwzględnienie nieallelicznej interakcji oraz współczynnika rekombinacji powoduje, że wartości oczekiwane średnich i wariancji pokoleń segregujących bardzo się komplikują poprzez występowanie szeregu parametrów, których nie można oszacować.

Druga grupa metod dotyczy jednoczesnej analizy kilku różnych pokoleń tej samej kombinacji krzyżówkowej. Wydają się one bardziej interesujące zarówno dla genetyków, jak i dla hodowców, ponieważ odnoszą się do potomstwa konkretnej pary rodziców. Najprostsze z nich obejmują analizę mieszańców F_1 , F_2 , B_1 , B_2 , P_1 i P_2 bądź F_1 , F_2 , F_3 , P_1 , P_2 . Pozwalają one oszacować efekty addytywnego działania genów, dominacji oraz nieallelicznej interakcji: $[i]$, $[j]$ i $[I]$ w pierwszym przypadku oraz $[i]$ i $[I]$ w drugim (Mather i Jinks, 1970, 1982; Kaczmarek i in., 1984). Jak widać, metody te są bardziej „postępowe” w stosunku do poprzednich, gdyż nie zakładają braku nieallelicznej interakcji, zakładają jednak brak sprzężeń. Nie pozwalają także na oszacowanie liczby genów (lub, za Matherem, czynników efektywnych oznaczających gen lub grupę genów ściśle sprzężonych, których efekt fenotypowy jest taki, jak działanie jednego genu).

Oba zagadnienia, sprzężenia i liczba genów, tak proste do określenia w przypadku cech jakościowych, okazały się najtrudniejsze do oceny dla cech o zmienności ciągłej. Ponieważ w genetyce klasycznej liczba genów warunkujących cechę jakościową była podstawową informacją uzyskiwaną z doświadczeń, również na gruncie biometrii podejmowano ten temat stosunkowo wcześnie. W 1941 roku Michaelis zaproponował podejście bazujące na szacowaniu frakcji osobników homozygotycznych w kolejnych pokoleniach mieszańców pochodzących od pary homozygotycznych form rodzicielskich. W latach pięćdziesiątych Wright podał estymator oparty na wartościach średnich i wariancjach cechy ilościowej u mieszańców pokolenia F_2 i ich form rodzicielskich, a w 1976 roku Jinks i Towey

zapropowali metodę wykorzystującą oszacowanie liczby heterozygot na podstawie potomstwa F_{n+2} wyprowadzonego z pokolenia F_n . Te, jak również inne, nie wspomniane tu metody z tego okresu miały szereg niedoskonałości związanych m.in. z trudnościami w określaniu stopnia homo- lub heterozygotyczności osobników oraz z koniecznością przyjęcia szeregu założeń genetycznych, takich jak brak sprzężeń, i nieallelicznej interakcji, czy homozygotyczność form rodzicielskich (Hill i Avery, 1978).

Wykrywanie sprzężeń genów kontrolujących cechy mierzalne należało do najtrudniejszych zagadnień klasycznej genetyki ilościowej, ponieważ uwzględnienie współczynnika rekombinacji, zwłaszcza przy równoczesnym uwzględnieniu nieallelicznej interakcji powoduje, że wartości oczekiwane średnich i wariancji pokoleń segregujących wyrażone są jako funkcje wielu parametrów, których ocena na podstawie danych eksperymentalnych jest niemożliwa (Opsal, 1956). W okresie od lat czterdziestych do osiemdziesiątych ubiegłego wieku powstało kilka metod wykrywania sprzężeń genów na podstawie generacji segregujących (mówimy o wykrywaniu sprzężeń, a nie o ocenie wartości współczynnika rekombinacji (p), gdyż przy założeniu kontrolowania cechy ilościowej przez wiele genów o niewielkich efektach pojedynczego genu oszacowanie współczynnika p dla pojedynczej pary genów na gruncie klasycznej genetyki ilościowej było niemożliwe, natomiast wartość uśredniona dla wielu genów sprzężonych ze sobą nie ma sensu genetycznego). Metody te oparte były na porównywaniu wartości średnich lub wariancji odpowiednio dobranych zestawów generacji. Należy przy tym zwrócić uwagę, że w przypadku wykorzystania średnich wartości cech sprzężenia mogą być wykryte jedynie wówczas, gdy występuje niealleliczna interakcja, ponieważ współczynnik rekombinacji związany jest tylko z efektami epistatycznymi, nie obciąża natomiast efektów addytywnego działania genów i dominacji (Surma, 1996). Na przykład wartość oczekiwana średniej mieszańców pokolenia F_2 jest równa:

$$F_2 = m + \frac{1}{2}(h_a+h_b) + \frac{1}{2}(1-2p)i_{ab} + \frac{1}{2}\{(1-2p)+2p^2\}l_{ab},$$

gdzie m jest wartością stałą niezależną od segregujących genów, h_a i h_b oznaczają efekty dominacji w *loci* A- i B-, natomiast i_{ab} i l_{ab} — efekty nieallelicznej interakcji odpowiednio *loci* homo- i heterozygotycznych. Natomiast w metodach wykorzystujących wariancje pokoleń segregujących sprzężenia mogą być wykryte także wówczas, gdy niealleliczna interakcja nie występuje (Mather, 1949; Opsal, 1956; Snape i Simpson, 1981). Mather (1949) wykazał, że w wyniku sprzężeń addytywne (D) i dominacyjne (H) komponenty wariancji genetycznej zmieniają się w zależności od liczby rund rekombinacji, których wynikiem jest obserwowana zmienność. Zapropował wykrywanie sprzężeń poprzez badanie homogenności wariancji D lub/i H kolejnych pokoleń mieszańcowych (F_2 – F_3). W 1956 roku Opsal rozwinął metodę Mathera proponując jednoczesną analizę pokoleń F_2 , F_3 , $F_2 \times P_1$, $F_2 \times P_2$ i $F_2 \times F_1$. W 1969 roku Jinks i Perkins podali interesującą, aczkolwiek pracochłonną metodę wykrywania sprzężeń na podstawie jednoczesnej analizy 21 generacji (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , B_1 , B_2 , F_3 , $F_2 \times P_1$, $F_2 \times P_2$, $F_2 \times F_1$, F_{2bip} , B_{11} , B_{12} , B_{21} , B_{22} , $B_1 \times F_1$, $B_2 \times F_1$, B_{1bip} , B_{2bip} , B_{1s} , B_{2s}). Ci sami autorzy rok później zapropowali wykrywanie sprzężeń na podstawie wariancji pokoleń F_2 , $F_2 \times F_1$ i F_{2bip} (przy braku sprzężeń wariancje

tych pokoleń są równe), (Perkins, Jinks, 1970). W 1978 roku Jinks wykazał, że w badaniach dotyczących wykrywania sprzężeń mogą być wykorzystane różnice między średnimi pokoleń B_1 i $F_2 \times P_1$, B_2 i $F_2 \times P_2$ oraz F_2 i $F_2 \times F_1$, które przy braku sprzężeń są równe zero.

Przytoczono wyżej tylko niektóre metody analizy dziedziczenia cech ilościowych, opracowane do lat 80. dwudziestego wieku. Wśród nich najszersze zastosowanie w badaniach genetycznych i hodowlanych znalazły krzyżowania dialleliczne, z dwóch względów. Z jednej strony pozwalały uzyskać informacje o sposobie dziedziczenia cechy, z drugiej natomiast oszacować parametry hodowlane (ogólną i specyficzną zdolność kombinacyjną), których znajomość ułatwiała wybór par rodzicielskich do krzyżowań (Dobek i in., 1978). Inne metody, szczególnie te, które związane były z koniecznością analizowania wielu pokoleń, nie znalazły szerszego zastosowania w badaniach genetycznych, szczególnie w przypadku roślin samopylnych, ponieważ wymagały dużego nakładu pracy w przygotowaniu materiału roślinnego.

Omawiając wykorzystanie pokoleń segregujących w analizie dziedziczenia cech ilościowych nie można pominąć współczynnika odziedziczalności, wspomnianego w rozdziale 2. Wiele kontrowersji wzbudzały zarówno bardzo zróżnicowane wartości tego parametru uzyskiwane dla tej samej cechy w obrębie gatunku, jak i niekiedy, szczególnie w odniesieniu do współczynnika odziedziczalności w wąskim sensie, wartości ujemne. Wynikały one z różnego zestawu badanych genotypów, różnych warunków środowiska, w których przeprowadzono doświadczenia, a w przypadku odziedziczalności w wąskim sensie — także z niespełnienia założeń o braku sprzężeń i nieallelicznej interakcji (Kaczmarek i in., 1983).

W literaturze z tego okresu można spotkać opinię, że osiągnięcia teoretyczne genetyki ilościowej były znacznie większe niż eksperymentalne.

KLASYCZNE METODY OPARTE NA POPULACJACH HOMOZYGOTYCZNYCH

W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, wraz z rozwojem metod *in vitro* umożliwiających haploidyzację roślin i uzyskiwanie tą drogą linii podwojonych haploidów (DH), w badaniach nad dziedziczeniem cech ilościowych zaczęto stosować populacje linii homozygotycznych, które zastępowały generacje segregujące. Populacje takie mogą tworzyć linie podwojonych haploidów (DH) lub formy uzyskane technikami tradycyjnymi, w tym techniką pojedynczego ziarna (SSD — single seed decent).

Linie DH uzyskuje się poprzez haploidyzację mieszańców wczesnych pokoleń, a następnie podwojenie u tych form liczby chromosomów. Populacja roślin haploidalnych otrzymanych z mieszańców F_1 odpowiada losowej próbie gamet wytwarzanych przez heterozygoty. Podwajając liczbę chromosomów u haploidów można więc uzyskać populację form całkowicie homozygotycznych o „utrwalonej” segregacji na poziomie gametycznym, odpowiadającą nioselekcjonowanej populacji linii prawie homozygotycznych otrzymanych tradycyjnymi technikami.

Pierwsze formy haploidalne u roślin otrzymano już w połowie lat 60. dwudziestego wieku, jednak zbyt niska efektywność stosowanych metod nie pozwalała na ich

wykorzystanie w praktyce. Zasadniczy przełom nastąpił w 1970 roku wraz z opracowaniem efektywnej metody otrzymywania form haploidalnych jęczmienia uprawnego (*Hordeum vulgare*) drogą krzyżowania z *H. bulbosum* (Kasha i Kao, 1970). W ciągu kolejnych 5 lat dopracowana została także metoda androgenyzy, pozwalająca na uzyskanie haploidów z przeszło 200 gatunków roślin. W Polsce pierwsze haploidy jęczmienia drogą eliminacji chromosomów uzyskano tu już w pierwszej połowie lat siedemdziesiątych, a pierwsze prace na ten temat ukazały się na początku lat osiemdziesiątych (Adamski i in., 1983).

Wraz z rozwojem metod uzyskiwania linii podwojonych haploidów pojawiły się prace dotyczące wykorzystania tych form w analizie genetycznej cech ilościowych. Pierwszym, który zwrócił uwagę na linie podwojonych haploidów jako na dobry materiał do badań genetycznych był Gardner (1977). Autor ten podkreślał przede wszystkim fakt, iż możliwe jest uzyskanie, w wyniku kontrolowanego rozmnożenia, wielu kopii tego samego genotypu, co w przypadku cech ilościowych oznacza możliwość prowadzenia doświadczeń z powtórzeniami tego samego genotypu, czego nie można dokonać np. z mieszańcami pokoleń segregujących. Okazało się także z wielu opracowań teoretycznych, że populacje linii homozygotycznych w porównaniu z mieszańcami wczesnych pokoleń znacznie upraszczają schematy analizy dziedziczenia ilościowego, ponieważ nie występują w nich efekty dominacji oraz nieallelicznej interakcji typu [j] i [l] (Choo, 1981). Rozwinięto szereg metod opartych na analizie linii podwojonych haploidów. Opracowano między innymi metodę estymacji parametrów genetycznych związanych z addytywnym działaniem genów i interakcją *loci* w stanie homozygotycznym na podstawie linii o maksymalnej i minimalnej wartości cechy, (Surma i in., 1984). Opracowano także metodę oceny efektów działania genów na podstawie serii doświadczeń z liniami DH, co pozwoliło na znalezienie średnich ocen parametrów, a także na określenie interakcji każdego parametru ze środowiskiem i zbadanie struktury tej interakcji (Adamski, 1993).

Linie DH posłużyły również do analizy sprzężeń genów kontrolujących cechy ilościowe. Jak wiadomo zmienność populacji linii DH wynika z segregacji i rekombinacji zachodzącej podczas gametogenezy. Zmienność linii DH uzyskiwanych z mieszańców F_1 i F_2 będzie taka sama, o ile geny kontrolujące rozpatrywane cechy nie są sprzężone (Snape i Simpson, 1981; Kaczmarek i in., 1994). Wykazano, iż przy braku sprzężeń częstość rekombinantów w populacjach linii F_1DH i F_2DH , a także linii uzyskanych techniką SSD jest taka sama, a co za tym idzie — średnie i wariancje cech ilościowych tych populacji nie różnią się. Porównanie populacji otrzymanych z różnych pokoleń, a więc z wykorzystaniem różnej liczby rund rekombinacji (np. F_1DH , F_2DH , SSD_{F_6}) daje możliwość wnioskowania o występowaniu sprzężeń, gdyż wraz z zwiększeniem liczby rund rekombinacji wzrasta prawdopodobieństwo przerwania sprzężeń. Powoduje to, iż korelacje między dwiema cechami, będące wyraźne i znaczące w populacji linii F_1DH (1 runda rekombinacji) stają się znacznie słabsze w populacji F_2DH (dwie rundy rekombinacji). W przypadku występowania sprzężeń częstość rekombinantów w populacji SSD jest zawsze większa niż w liniach DH wyprowadzonych z mieszańców wczesnych pokoleń (F_1 , F_2), czego konsekwencją są różnice w średnich i wariancjach tych populacji (Snape, 1976; Surma i in., 2002). Wykorzystując średnie i wariancje pojedynczych cech

oraz kowariancję dla pary cech w populacjach linii F_1DH , F_2DH i SSD opracowano metodę analizy występowania sprzężeń między genami kontrolującymi daną cechę, jak również pary cech ilościowych (Kaczmarek i in., 1993, 1994, 2004).

Populacje linii homozygotycznych zostały także wykorzystane do określenia liczby czynników efektywnych. W 1982 roku Choo i Reinbergs, a dwa lata później Snape i współautorzy podali metodę oceny liczby segregujących *loci* na podstawie oceny efektów addytywnych i wariancji addytywnej (Snape i in., 1984). Metody te wymagają jednak spełnienia założeń o równości efektów addytywnych ze wszystkich *loci*, braku sprzężeń, a także o braku nieallelicznej interakcji. Przeprowadzone przez Kaczmarka i wsp. (1988) badania wykazały, że nawet niewielkie efekty nieallelicznej interakcji powodują znaczne obciążenie uzyskanych tymi metodami ocen liczby genów. Znaczącym postępowaniem było więc opracowanie metodyki szacowania liczby czynników efektywnych uwzględniającej występowanie nieallelicznej interakcji (Adamski i in., 1987; Kaczmarek i in., 1988).

W licznych badaniach wykorzystujących zarówno pokolenia segregujące, jak i populacje linii homozygotycznych okazało się, że uzyskiwane oceny parametrów genetycznych były inne nie tylko dla różnych kombinacji krzyżówkowych, ale także dla tej samej kombinacji krzyżowań różniły się w zależności od warunków środowiska, w których przeprowadzano doświadczenia (Adamski, 1993; Surma, 1996; Kaczmarek i in., 2000, 2002). Niemożliwe więc okazało się uogólnienie wyników uzyskiwanych przez różnych autorów i stworzenie jednolitego schematu dziedziczenia cechy ilościowej w odniesieniu do danego gatunku roślin, tak jak ma to miejsce w przypadku cech jakościowych. Nadzieja taka pojawiła się z chwilą rozwoju metod genetyki molekularnej.

METODY WYKORZYSTUJĄCE BADANIA MOLEKULARNE

Lata osiemdziesiąte i dziewięćdziesiąte ubiegłego wieku to okres intensywnego rozwoju biologii molekularnej. Szczególnie odkrycie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) zaowocowało opracowaniem wielu markerów DNA, które umożliwiły konstruowanie map genetycznych wysyconych w stopniu nieporównywalnie większym, aniżeli w przypadku wykorzystania tylko markerów fenotypowych czy izoenzymatycznych. Przed genetyką ilościową pojawiła się nowa szansa: możliwość mapowania *loci* determinujących cechy ilościowe (QTL) poprzez wykorzystanie zjawiska sprzężenia pomiędzy cechami ilościowymi uwarunkowanymi poligenicznie a jakościowymi (w tym wypadku markerami molekularnymi) determinowanymi przez jeden gen. Wraz z rozwojem genetyki molekularnej wzrosło zapotrzebowanie genetyków na odpowiednie metody statystyczne. Tak rozpoczęła się współpraca genetyków z dwóch dotychczas odległych obszarów: genetyki ilościowej posługującej się metodami statystyczno-matematycznymi i genetyków molekularnych badających strukturę molekularną czynników i mechanizmów chemicznych związanych z procesem dziedziczenia.

Mapowanie cech ilościowych można określić jako ocenę związków między zmienną ciągłą a wieloma cechami jakościowymi w modelu regresyjnym. Literatura dotycząca metod statystycznych stosowanych do analizy danych obejmujących obserwacje cechy ilościowej oraz genotypów markerowych jest bardzo obszerna (por. Tanksley, 1993;

Jansen, 1997; Doerge i in., 1997). Do mapowania QTL wymagane są stosunkowo duże populacje mieszańców (F_2 , BC_1 , BC_2) lub linii homozygotycznych (DH, SSD). W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskuje się informacje o położeniu i efektach poszczególnych *loci* wpływających na daną cechę ilościową. Tak więc korzystając z metod molekularnych można wypowiadać się o działaniu poszczególnych genów, podczas gdy genetyka klasyczna bada złożone zestawy pokoleń umożliwiające ocenę parametrów opisujących sposób działania zespołu wszystkich segregujących genów. Należy jednak zaznaczyć, że badanie markerów sprowadza się najczęściej do populacji linii homozygotycznych, co umożliwi ocenę tylko efektów addytywnych. Ocena efektów dominacji wymaga użycia pokoleń F_2 lub BC, natomiast ocena efektów epistatycznych wymaga bardzo dużych wielkości prób (Krajewski i in., 2004). Stąd też charakterystyka działania genów otrzymana na podstawie obserwacji markerowych jest na ogół niepełna; ciągle poszukiwane są nowe rozwiązania poprzez zastosowanie bardziej złożonych pokoleń lub populacji (Tanksley i Nelson, 1996; Jansen, 1997; Pillen i in., 2003).

Połączenie metod molekularnych i biometrycznych pozwoliło jednak rozwiązać dwa najtrudniejsze problemy genetyki ilościowej: ocenę liczby genów oraz sprzężeń między genami warunkującymi cechę/cechy ilościowe. Ocena liczby *loci* w badaniach związanych z mapowaniem QTL jest wynikiem *per se* przeprowadzonych analiz. Zależnie od przyjętego kryterium statystycznego znajduje się pewną liczbę *loci*, których segregacja jest związana z poziomem cechy ilościowej. Badania dotyczące porównania ocen liczby czynników efektywnych uzyskanych metodami klasycznymi i metodami wykorzystującymi markery molekularne wykazały najczęściej mniejszą ich liczbę w przypadku zastosowania metod klasycznych (Snape, 1997; Krajewski, Bocianowski, 2003).

Na podstawie mapowania QTL można bezpośrednio wnioskować, czy *loci* kontrolujące cechy są sprzężone i czy występują sprzężenia między genami warunkującymi różne cechy. Stwierdzono, że *loci* dla różnych cech są często położone w tym samym regionie genomu. W genomie jęczmienia można wyróżnić osiem takich regionów, na przykład w regionie położonym na chromosomie 7 znaleziono *loci* dla plonu, wysokości roślin, wczesności i odporności na wyleganie, natomiast na chromosomie 3 w pobliżu *locus denso* zlokalizowano *loci* odpowiedzialne za plon, wysokość i wczesność (Hayes i in., 1993). Mimo licznych prac dotyczących lokalizacji *loci* dla cech ilościowych nie wyodrębniono takich markerów molekularnych, o których z całą pewnością można by sądzić, że będą właściwe dla dowolnej kombinacji krzyżówkowej w obrębie danego gatunku. Liczba i lokalizacja wykrytych QTL odnoszą się głównie do populacji, na podstawie której zostały zmapowane. W różnych populacjach zlokalizowane są różne QTL, ponieważ mogą segregować różne allele, ponadto doświadczenia wykorzystujące różne próby tej samej populacji mogą prowadzić do wykrycia innych QTL, czy wreszcie badania prowadzone z zastosowaniem różnych systemów markerowych mogą lokalizować QTL w innych rejonach genomu (Tinker i in., 1996).

GENOMIKA ILOŚCIOWA

Połączenie metod genetyki ilościowej z mapowaniem genomów z jednej strony rozwiązało niektóre problemy związane z analizą dziedziczenia cech ilościowych, z drugiej potwierdziło ich pewną „nieuchwytność”, o której świadczyły już wyniki badań prowadzonych tylko metodami klasycznymi, takie jak zróżnicowanie fenotypowych efektów działania genów w zależności od środowiska i analizowanej populacji, co w dużym stopniu utrudnia ustanowienie jednolitego systemu dziedziczenia danej cechy właściwego dla danego gatunku ze wskazaniem konkretnych miejsc w genomie, w których z całą pewnością znajdują się czynniki genetyczne warunkujące daną cechę.

Można jednak mieć nadzieję, że dynamicznie rozwijająca się genetyka molekularna pozwoli w niedalekiej przyszłości poznać molekularne podłoże cech ilościowych. Pod koniec XX i na początku XXI wieku jesteśmy świadkami formowania się nowego obszaru (dziedziny?) badań zwanego „genomiką ilościową” (por. np. Kadarmideen i in., 2006). Idea genomiki ilościowej polega na studiowaniu złożonych cech fenotypowych w odniesieniu do fragmentów sekwencji genomowych poznanych eksperymentalnie i zlokalizowanych na mapach fizycznych genomów lub wręcz w sekwencjach całogenomowych znanych dla wielu organizmów. Poprzez cechy fenotypowe rozumie się tu nie tylko klasyczne cechy „produkcyjne”, lecz także ilościowo określone w organizmach poziomy transkryptów, białek, metabolitów lub pierwiastków chemicznych. Jeżeli chodzi o sekwencje, to mogą to być tzw. etykiety ekspresyjne (EST) oraz znane lub potencjalne geny kodujące białka oraz geny kodujące różne rodzaje RNA, np. mikro RNA.

Ważną częścią genomiki ilościowej jest fenotypowanie organizmów, na dużą skalę, na poziomie cech „widzialnych”, ale także na poziomie transkryptomu, proteomu i metabolomu, oraz odnoszenie zmienności tych cech do map sprzężeniowych reprezentujących polimorfizm markerów DNA i ich rozmieszczenie w genomie. Podejście takie jest podstawą szukania tzw. eQTL, *loci* związanych z ekspresją pewnych genów (Jansen i Nap, 2001; Potokina i in., 2008), czy też mQTL, *loci* związanych z poziomem metabolitów (Lisec i in., 2008). Należy zauważyć, że analogiczna idea w odniesieniu do zmienności poziomu białek powstała już znacznie wcześniej (Damerval i in., 1994). Integracja wyników mapowania cech z różnych „poziomów” pozwoli na wyjaśnienie szlaków metabolicznych i dziedziczenia cech produkcyjnych. Obszar ten korzysta w sposób istotny z szybko rozwijających się możliwości technologicznych (mikromacierze, sekwencjonowanie).

Jednym z pierwszych świadectw, że takie podejście może być skuteczne, są wyniki w zakresie rozwoju systemów markerów funkcjonalnych DNA (FM). Markery takie obejmują regiony genomu (geny) scharakteryzowane pod względem sekwencji i funkcji. Warunkiem jest, aby marker był polimorficzny i aby polimorfizm ten związany był ze zmiennością fenotypową obserwowanej cechy ilościowej (Lübberstedt i in., 2005). Pierwszy tego typu marker opracowano dla kukurydzy, gdzie stwierdzono związek między zmiennością terminu kwitnienia a polimorfizmem sekwencji ośmiu motywów genu *dwarf 8* (Thomsberry i in., 2001). Opracowanie i wykorzystanie markerów FM jest jednak, jak dotąd, limitowane ze względu na bardzo ograniczoną znajomość genów (i ich sekwencji),

które mają bezpośredni związek z cechami ilościowymi (Bagge i in., 2007). Jednak, według Mackay (2001), badania nad markerami funkcjonalnymi winny przenieść genetyków od epoki QTL, które właściwie są regionami genomu zawierającymi wiele genów (np. u *Drosophila* średnio 1 QTL obejmuje region, w którym znajduje się ok. 500 genów), do „nukleotydów determinujących cechę ilościową”, QTN (Quantitative Trait Nucleotides).

Korzystając z dokonań biologii molekularnej można rozwinąć i pogłębić analizę takich zjawisk genetyki ilościowej, jak np. heterozja, badając to zjawisko w odniesieniu do transkryptomu (Vuylsteke i in., 2005; Użarowska i in., 2007; Pea i in., 2008).

Inną szansę mogą dostarczyć badania nad mikroRNA. Są to małe cząsteczki RNA występujące powszechnie w organizmach roślin wyższych. Regulują one ekspresję genów po transkrypcji, na poziomie dojrzałego mRNA. Poprzez regulację m.in. poziomu czynników transkrypcyjnych i splicingowych wpływają na procesy wzrostu i rozwoju roślin oraz odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku.

Być może wyniki badań mikroRNA „odsłonią” molekularną naturę zmienności cech ilościowych i być może okaże się prawdziwa sugestia Mathera, sformułowana w latach czterdziestych, że w początkowej fazie rozwoju ontogenetycznego istotną rolę odgrywają geny główne o kluczowym znaczeniu dla kierunku rozwoju rośliny (np. geny karłowatości, wczesności), natomiast poligeny (o niewielkich efektach) mają znaczenie dopiero w fazie późniejszej, kiedy fenotyp przybiera ostateczny kształt pod wpływem czynników genetycznych i środowiskowych (Mather, 1949).

LITERATURA

- Adamski T. 1993. Wykorzystanie linii podwojonych haploidów w analizie statystyczno-genetycznej cech ilościowych. Rozprawy i Monografie IGR PAN nr 2.
- Adamski T., Jeżowski S., Kurhańska G., Surma M. 1983. Zastosowanie metody bulbosowej w hodowli jęczmienia. *Hodowla Roślin* 4: 1 — 5.
- Adamski T., Kaczmarek Z., Surma M. (1987). Ocena liczby czynników efektywnych na podstawie linii autodiploidalnych. Siedemnaste Colloquium Metodologiczne z Agrobiometrii, PAN, Warszawa, 247 — 256.
- Bagge M., Xia X., Lübberstedt T. 2007. Functional markers in wheat. *Current opinion in plant biology*, 10: 211 — 216.
- Choo T. M. 1981. Doubled haploids for studying the inheritance of quantitative characters. *Genetics* 99: 525 — 540.
- Choo T. M., Reinbergs E. 1982. Estimation of number of genes in doubled haploid populations of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 337 — 341.
- Dammerval C., Maurice A., Josse J.M., Vienne, D. de 1994. Quantitative trait *loci* underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of gene expression. *Genetics* 137: 289 — 301.
- Dobek A., Kaczmarek Z., Kiełczewska F., Łuczkiwicz T. 1978. Podstawy i założenia analizy statystycznej krzyżówek diallelicznych. II. Analiza genetyczna. Ósme Colloquium Metodologiczne z Agro-Biometrii, PAN, Warszawa: 146 — 168.
- Doerge R. W., Zeng Z. B., Weir B. S. 1997. Statistical issues in the search for genes affecting quantitative traits in experimental populations. *Statistical Science* 12: 195 — 219.
- East E. M. 1916. Studies on size inheritance in *Nicotiana*. *Genetics* 1: 164 — 176.
- Fisher R. A. 1918. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh* 52: 399 — 433.

- Gardner C. O. 1977. Quantitative genetic research in plants: past accomplishments and research needs. W: Proceedings of the International Conference Quantitative Genetics (Pollak E., Kempthorne O., Bailey T.B. Jr., red.), Iowa State Univ. Press, Ames: 29 — 37.
- Griffing B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci. 9: 463 — 492.
- Hayes P. M., Blake T., Chen T. H. H., Tragoonrung S., Chen F., Pan A., Liu B. 1993. Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winterhardiness. Genome 36: 66 — 71.
- Hayman B. I. 1954. The theory and analysis of diallel crosses. Genetics 39: 789 — 809.
- Hill W. G., Avery P. J. 1978. On estimating number of genes by genotype assay. Heredity 40: 397 — 403.
- Jansen R. C. 1997. Mapping QTLs in experimental and breeding populations. In: Advances in biometrical genetics. (P. Krajewski, Z. Kaczmarek red.), Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu: 27 — 34.
- Jansen R., Nap J. P. 2001. Genetical genomics: the added value from segregation. Trends in Genetics 17: 338 — 391.
- Jinks J. L. 1978. Unambiguous test for linkage of genes displaying nonallelic interaction for a metrical trait. Heredity 40: 171 — 173.
- Jinks J. L., Perkins J. H. 1969. The detection of linked epistatic genes for a metrical trait. Heredity 24: 465 — 475.
- Jinks J. L., Towey P. 1976. Estimating the number of genes in a polygenic system by genotype assay. Heredity 37: 69 — 81.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T. 1984. Parametry genetyczne — ich interpretacja i sposoby wyznaczania. Listy Biometryczne 21: 3 — 20.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T. 1988. Epistatic effects in estimation of the number of genes on the basis of doubled haploid lines. Genet. Pol. 29: 253 — 259.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T. 1993. Szacowanie wariancji i kowariancji genetycznej linii podwojonych haploidów z uwzględnieniem współczynnika rekombinacji. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Rolnictwo LVIII: 33 — 42.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T. 1994. Theoretical bases for detection of linkage of genes between two quantitative characters in the presence of nonallelic interaction. Genet. Pol. 35: 53 — 62.
- Kaczmarek Z., Surma M., Świącicki W. K. 1983. Wyznaczanie współczynnika odziedziczalności w wąskim sensie w aspekcie addytywno-dominującego modelu działania genów. Postępy Nauk Rolniczych 290: 23 — 41.
- Kaczmarek Z., Adamski T., Surma M., Leśniewska-Frątczak M. 2000. Estimation of gene effects in various environmental conditions. W: EUCARPIA Quantitative genetics and breeding methods: the way ahead (Gallais A., Dillmann C., Goldringer I., ed.), INRA, Paris: 27 — 34.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T., Jeżowski S., Madajski R., Krystkowiak K., Kuczyńska A. 2002. Interaction of gene effects with environments for malting quality of barley doubled haploids. J. Appl. Genet. 43: 33 — 42.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T., Czajka S. 2004. Numerical method for detection of linkage between genes for two metrical traits. J. Appl. Genet. 45: 27 — 35.
- Kadarmideen H. N., Rohr, P. von, Janns L. L. G. 2006. From genetical genomics to system genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. Mammalian Genome 17: 548 — 564.
- Kasha K. J., Kao K. N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225: 874 — 876.
- Krajewski P., Bocianowski J. 2003. A comparison of the methods of estimation of the number of genes for quantitative traits. Listy Biometryczne — Biometrical Letters 40: 84.
- Krajewski P., Surma M., Kaczmarek Z., Adamski T., Jeżowski S. 2004. Genetyka ilościowa i molekularna — razem czy osobno?. W: Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych (P. Krajewski, Z. Zwierzykowski, P. Kachlicki, red.). Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu: 223 — 242.
- Lisec J., Meyer R. C., Steinfath M., Redestig H., Becher M., Witucka-Wall H., Fiehn O., Torjek O., Selbig J., Altmann T., Willmitzer L. 2008. Identification of metabolic and biomass QTL in *Arabidopsis thaliana* in a parallel analysis of RIL and IL populations. Plant Journal 53: 960 — 972.

- Lübberstedt T., Zein I., Andersen J. R., Wenzel G., Krützfeldt B., Eder J., Ouzunova M., Chun S. 2005. Development and application of functional markers in maize. *Euphytica* 146: 101 — 108.
- Mackay T. F. C. 2001. The genetic architecture of quantitative traits. *Ann. Rev. Genet.* 35: 303 — 339.
- Mather K. 1949. *Biometrical genetics*. Methuen & Co. LTD London.
- Mather K., Jinks J. L. 1970. *Biometrical Genetics* (2nd edn.). Chapman and Hall, London.
- Mather K., Jinks J. L. 1982. *Biometrical Genetics* (3rd edn.). Chapman and Hall, London.
- Michaelis P. 1941. Die Vererbung. *Handbuch der Pflanzenzüchtung*: 99 — 140.
- Opsahl B. 1956. The discrimination of interactions and linkage in continuous variation. *Biometrics*: 415 — 432.
- Pea G., Ferron S., Gianfranceschi L., Krajewski P., Pe' M. E. 2008. Gene expression non-additivity in immature ears of a heterotic F₁ maize hybrid. *Plant Science* 174: 17 — 24.
- Perkins J. M., Jinks J. L. 1970. Detection and estimation of genotype-environmental, linkage and epistatic components of variation for a metrical trait. *Heredity* 25: 157 — 177.
- Pillen K., Zacharias A., Leon J. 2003. Advanced backcrosses QTL analysis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 340 — 352.
- Potokina E., Druka A., Luo Z., Wise R., Waugh R., Kearsley M. 2008. Gene expression quantitative trait locus analysis of 16 000 barley genes reveals a complex pattern of genome-wide transcriptional regulation. *Plant Journal* 53: 90 — 101.
- Snape J. W. 1976. A theoretical comparison of diploised haploid and single seed descent populations. *Heredity* 36: 275 — 277.
- Snape J. W. 1997. Application of doubled haploid lines in plant breeding and genetical research: current issues and approaches. In: *Advances in biometrical genetics* (P. Krajewski, Z. Kaczmarek red.), Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu: 27 — 34.
- Snape J. W., Simpson E. 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. *Theor. Appl. Genet.* 60: 123 — 128.
- Snape J. W., Wright A. J., Simpson E. 1984. Methods for estimating gene numbers for quantitative characters using doubled haploid lines. *Theor. Appl. Genet.* 67: 143 — 148.
- Perkins J. H., Jinks J. L. 1970. Detection and estimation of genotype-environmental, linkage and epistatic components of variation for a metrical trait. *Heredity* 25: 157 — 177.
- Surma M. 1996. Biometryczno-genetyczna analiza cech ilościowych mieszańców i linii podwojonych haploidów jęczmienia jarego. *Rozprawy i Monografie nr 3, IGR PAN, Poznań*, str. 110.
- Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z. 1984. The use of doubled haploid lines for estimation of genetic parameters. *Genet. Pol.* 25: 27 — 32.
- Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z. 2001. Doubled haploids for studying the linkage of genes controlling quantitative traits. W: *Quantitative Genetics and Breeding Methods: the Way Ahead* (A. Gallais, C. Dillmann., I. Goldringer, eds.). INRA, Paris: 274 — 274.
- Surma M., Kaczmarek Z., Adamski T. 2002. A simple test for detection of linkage. *J. Appl. Genet.* 43: 171 — 174.
- Tanksley S. D. 1993. Mapping polygene's. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205 — 233.
- Tanksley S. D., Nelson J. C. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 92: 191 — 203.
- Thomsberry J. M., Goodman M. M., Doebley J., Kresovich S., Nielsen D., Buckler E. S. 2001. Dwarf polymorphism associate with variation in flowering time. *Nat. Genet.* 28: 286 — 289.
- Yule G. V. 1906. On the theory of inheritance of quantitative compound characters on the basis of Mendel's laws — a preliminary note. *Rept. Third Intern. Conf. Gen.* 140 — 142.
- Tinker N. A., Mather D.E., Rosnagel B. G., Kasha K. J., Kleinhofs A., Hayes P. M., Falk D. E., Ferguson T., Shugar L. P., Legge W. G., Irvine R. B., Choo T. M., Briggs K. G., Ullricg S. E., Franckowiak J. D., Blake T. K., Graf R. J., Dofing S. M., Saghai Maroof M. A., Scoles G. J., Hoffman D., Dahleen L. S., Kilian A., Chen F., Biyashev R. M., Kudrna D., Steffenson A. 1996. Regions of the genome that affect agronomic performance in two-row barley. *Crop Sci.* 36: 1053 — 1062.

- Użarowska A., Keller B., Piepho H. P., Schwarz G., Ingvaridsen C., Wenzel G., Lübberstedt T. 2007. Comparative expression profiling in meristems of inbred-hybrid triplets of maize based on morphological investigations of heterosis for plant height. *Plant Mol. Biol.* 63: 21 — 34.
- Vuylsteke M., van Eeuwijk F., van Hummel P., Kuiper M., Zabeau M. 2005. Genetic analysis of variation in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171: 1267 — 1275.