

AGNIESZKA TOMKOWIAK¹**ZBIGNIEW BRODA**¹**KRZYSZTOF MOLIŃSKI**²¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu²Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Wybór modelu matematycznego dla zależności efektu heterozji mieszańców F₁ od dystansu genetycznego form rodzicielskich żyta i pszenżyta

A choice of the mathematical model for the relationship between heterosis effect of F₁ hybrids and genetic distance of rye and triticale parental lines

Przedmiotem badań były mieszańce żyta i pszenżyta wraz z komponentami rodzicielskimi. Badania miały na celu określenie zależności efektu heterozji mieszańców F₁ żyta i pszenżyta od dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi przy użyciu modeli matematycznych. Zarówno dla markerów molekularnych RAPD jak i AFLP funkcjami najlepiej opisującymi zależność efektu heterozji dla plonu ziarna od dystansu genetycznego były: wielomian trzeciego stopnia $y = a + bx + cx^2 + dx^3$... oraz funkcja liniowa $y = a + bx$. W ostatnim dziesięcioleciu wielu naukowców podjęło próbę wnioskowania o efekcie heterozji poprzez badanie dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi. Selekcja przy użyciu markerów molekularnych jest podejściem, które zostało rozwinięte, aby uniknąć problemów związanych z konwencjonalną hodowlą roślin, zmieniającym kryteria selekcji z selekcji fenotypów na bezpośrednią lub pośrednią selekcję genów. Markery molekularne są wykrywalne we wszystkich fazach wzrostu rośliny, nie ma na nie wpływu środowisko w jakim rosną rośliny. Użyteczność danego markera jest zależna od jego zdolności do ujawniania polimorfizmów w sekwencji nukleotydowej, pozwalając na rozróżnienie form allelicznych. Udatne zastosowanie markerów molekularnych wspomagające programy hodowlane zależy od dostępności map genetycznych zawierających markery molekularne sprzężone z genami, bliskiego powiązania markerów i genów oraz ich wspólnej segregacji, odpowiedniej rekombinacji zachodzącej pomiędzy markerami związanymi z daną cechą i resztą genomu, możliwości analizowania dużej liczby osobników w sposób efektywny z uwzględnieniem czasu i kosztów przedsięwzięcia.

Słowa kluczowe: heterozja, dystans genetyczny, modele matematyczne, żyto, pszenżyto

The object at the work were rye and triticale hybrids and their parental components. The main goal of the research was to determine, using mathematical models, the relationship between the heterosis effect of F₁ rye and triticale hybrids and genetic distance parental lines. Both for RAPD and AFLP markers, the best function to describes the relationship between the heterosis effect and genetic distance were: cubic polynomial $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ and a linear function $y = a + bx$. In the last

decade, may did affords to conclude on the heterosis effect by examining the genetic distance between the parental lines. Selection on the basis of molecular indicators was developed in order to avoid problems related to the traditional farming, and to allow the change from phenotype selection to direct selection of genes. Molecular indicators are detectable in all phases of the plant life and these are not affected by the environment and conditions of plant growth. The usefulness of a certain indicator depends on its ability to reveal polymorphisms in the nucleotide sequence, which makes possible to distinguish between allelic forms. Successful utilization of the molecular indicators depends on: availability of the genetic map containing molecular indicators coupled with genes, close relationships between indicators and genes and their common separation and grouping, appropriate recombination between indicators of a certain feature and the rest of the genome, possibility of analysis of a large number of organisms and consideration of time and cost of the whole project.

Key words: heterosis, genetic distance, mathematical models, rye, triticale

WSTĘP

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

Niejednokrotnie długotrwały i skomplikowany cykl hodowlany można znacznie skrócić prowadząc selekcję z wykorzystaniem markerów DNA. W tym celu wykorzystuje się istnienie bliskiego sprzężenia pomiędzy markerem a *locus* odpowiedzialnym za dziedziczenie cechy użytkowej. Metoda ta często jest określana skrótem MAS (Marker Assisted Selection) i ma szerokie zastosowanie w hodowli roślin drzewiastych oraz hodowli odpornościowej.

Komponenty rodzicielskie do krzyżowań heterozyjnych można dobierać różnymi metodami, oceniając dystans genetyczny na podstawie metod statystycznych (Srivastava, Arunchalam, 1977; Węgrzyn i in., 1994), informacji o pochodzeniu linii przeznaczonych do krzyżowania, markerów białkowych (Fabrizius i in., 1998) oraz markerów molekularnych (Tams i in., 2002).

Celem badań było określenie zależności efektu heterozji mieszańców F_1 żyta i pszenżyta od dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP przy użyciu modeli matematycznych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem roślinnym użytym do badań były linie rodzicielskie żyta oraz komponenty rodzicielskie pszenżyta wraz z mieszańcami pokolenia F_1 . Linie rodzicielskie i mieszańce żyta pochodziły z Hodowli Roślin Danko Spółka z o.o. natomiast komponenty

rodzicielskie i mieszańce pszenżyta pochodziły z Hodowli Roślin Strzelce spółka z o.o. oddziału w Borowie. Użyte w doświadczeniach polowych i analizach molekularnych komponenty rodzicielskie i mieszańce F₁ zamieszczono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1

Linie rodzicielskie i mieszańce F₁ żyta
Parental lines and F₁ hybrids of rye

Linie mateczne Female lines	Linie ojcowskie Male lines	Mieszańce F ₁ Hybrids F ₁
S 66P/95	S 93N/95	C SIN 9
S 93P/95	NS 426N/91	C SIN 15
S 157P/98	S 93N/95	C SIN 23
S 213P/98	WS 66N/85	C SIN32
S 93P/95	S 44/94	C SIN2493
S 64P/95	S 93N/95	C SIN 3693

Tabela 2

Komponenty rodzicielskie i mieszańce F₁ pszenżyta
Parental components and F₁ hybrids of triticale

Linie mateczne Female lines	Odmiany populacyjne Population strains	Mieszańce F ₁ Hybrids F ₁
CMS 112 – 15	Witon	BOHT 45
CMS 112 – 15	Krakowiak	BOHT 46
CMS 112 – 15	Pawo	BOHT 47
CMS 114 – 5	Krakowiak	BOHT 49
CMS 114 – 5	Pawo	BOHT 50
CMS Malno 53/3	MAH 3800	BOHT 61
CMS Malno 53/3	Today	BOHT 62

Trzyletnie doświadczenie z liniami rodzicielskimi i mieszańcami żyta zostało założone w 2004 roku w Stacji Doświadczalnej Katedry Genetyki i Hodowli Roślin na terenie Rolniczego Gospodarstwa Doświadczalnego Poznańskiej Akademii Rolniczej w Dłoni na poletkach o powierzchni 10 m², w układzie bloków losowanych kompletnych w trzech powtórzeniach. Doświadczenie z komponentami rodzicielskimi oraz mieszańcami pszenżyta założono również na poletkach o powierzchni 10 m² w układzie bloków losowanych kompletnych w trzech powtórzeniach w Hodowli Roślin Strzelce sp. z o.o. w Oddziale Borowo.

Zabiegi uprawowe wykonano zgodnie z zasadami poprawnej agrotechniki dla tego gatunku i kierunkiem użytkowania. W badaniach własnych w każdym roku prowadzenia doświadczenia przedplonem dla żyta i pszenżyta była pszenica ozima.

Dla obydwu gatunków wykonano pomiary biometryczne, które obejmowały: długość źdźbła oraz długość kłosa, liczbę kłosek w kłosie, liczbę ziaren w kłosie, liczbę ziaren w kłosku, masę ziarna z kłosa, masy tysiąca ziarna (MTZ) i plon ziarna. Obserwacje przeprowadzono na 10 losowo wybranych roślinach z trzech powtórzeń każdego z komponentów rodzicielskich oraz form mieszańcowych.

Otrzymywanie markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

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

Dyski liściowe o powierzchni 2 mm² 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 12,5µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1M Tris HCl o pH 8,3; 25 mM MgCl₂; BSA; 2mM dNTP; starter-5pmoli/µl; Taq polimeraza-5U/µl, ekstrakt DNA-25ng/µl. Taq polimeraza pochodziła z firmy MBI-Fermentas, pozostałe odczynniki pochodziły z firmy SIGMA.

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

Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym o składzie: 1,5 g agarozy; 100ml buforu TBE1× (10,8 g Tris base; 5,5 g Boric acid; 4ml 0,5 M EDTA pH 8,0); 1µl bromku etydyny.

Otrzymywanie markerów molekularnych AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Izolacja genomowego DNA odbywała się metodą kolumnkową. Fragmenty liści o powierzchni 6 mm² umieszczono w probówkach z ciekłym azotem i roztarto tkankę roślinną na proszek. Do każdej probówki dodano 400µl buforu AP1 oraz 3µl RNAzy. Następnie inkubowano próby przez 30 minut w temperaturze pokojowej i 30 minut w 65°C. Po inkubacji dodano 130µl buforu AP2 i mieszano na vortexie. Następnie umieszczono próby w lodzie i po 15 minutach wirowano przez 20 minut w 14000 obrotów. Po zwirowaniu zebrano supernatan, który naniesiono na kolumnki, do których dodano 60µl buforu AP3. Próby wirowano przez 2 minuty w 8000 obrotów, a następnie dodano 450µl buforu AW i 50µl buforu AE. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze — 20°C.

Trawienie DNA przeprowadzono przy użyciu enzymów restrykcyjnych EcoRI i MseI oraz 5× read buffer. Do strawionego DNA dodano 24µl adapter ligation solution i 1µl T4DNA ligazy oraz inkubowano próby w temperaturze 20°C przez 3h. Do mieszaniny po ligacji dodano 90µl buforu TE o pH 8.0. Pre-amplifikację przeprowadzono przy użyciu termocyklera T3 BIOMETRA firmy Polygen. Do rozcieńczonej matrycy DNA po ligacji dodano 40µl pre-amp primer mix, 3,5µl 10 × PCR buffer, 15 µl MgCl₂ oraz 1 µl Taq polimerazy (5 U/µl). Dorozcieńczonej matrycy po pre-amplifikacji dodano MIX1 (startery i dNTP) oraz MIX2 (Taq polimeraza, 10 PCR buffer i MgCl₂). Po zakończeniu reakcji PCR próby mrożono w temperaturze — 20°C. Elektroforezę przeprowadzono w 5% żelu akrylamidowym przez 2,5 h przy 60W, 400mA i 1400V. Detekcja produktów PCR nastąpiła w wyniku barwienia srebrem.

Ocena statystyczna

- Efekty heterozji dla poszczególnych cech struktury plonu mieszańców obliczono względem średniej wartości cechy lepszego z rodziców i względem średniej wartości cechy obojga rodziców przy pomocy programu statystycznego Microsoft Excel. Istotność obliczonych efektów heterozji na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ sprawdzono testem Scheffe'go korzystając z programu DGH 2.
- Modele matematyczne służące do opisu zależności efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP wybrano przy pomocy programu Curve Expert.
- Dokumentacja wyników zarówno reakcji RAPD jak i AFLP obejmuje fotografie uzyskanych obrazów elektroforetycznych oraz ich opracowanie przy użyciu programu komputerowego UVIMAP w funkcji Nei i Li (1979).

$$GS = 2n_{xy} / (n_x + n_y),$$

gdzie $2n_{xy}$ oznacza liczbę par podobnych prążków w obu genotypach natomiast n_x oraz n_y oznaczają liczbę wszystkich prążków dla danego genotypu. Wartość GS oznacza indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami. Dystans genetyczny „D” pomiędzy komponentami rodzicielskimi każdego mieszańca obliczano korzystając ze wzoru:

$$D = 1 - GS.$$

WYNIKI

Dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańców F_1 żyta wyznaczony na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP. W przypadku markerów molekularnych RAPD 10 wyselekcjonowanych starterów wygenerowało 65 prążków polimorficznych, pojedyncze startery generowały od 4 do 11 prążków różnicujących badane genotypy (tab. 3).

Tabela 3

Startery dające polimorfizm w liniach żyta przy użyciu markerów RAPD-PCR
Primers detecting polymorphism in rye lines with the use of RAPD-PCR markers

Numer startera Primers no.	Liczba fragmentów DNA Number DNA fragments	Liczba fragmentów polimorficznych Number polymorphic fragments
OPA 04	9	7
OPA 07	12	6
OPA 09	11	5
OPA 12	9	7
OPB 10	11	11
OPB 17	6	4
OPF 08	8	6
OPG 19	8	5
OPH 20	9	7
OPI 12	10	7

Najbardziej efektywnym starterem w generowaniu polimorfizmu okazał się starter OPB 10 (11 prążków polimorficznych). Dla markerów molekularnych AFLP 5

wyselekcjonowanych kombinacji starterów wygenerowało 51 prążków różnicujących. Jedna kombinacja starterów generowała średnio od 7 do 15 prążków polimorficznych (tab. 4).

Tabela 4

Startery dające polimorfizm w liniach żyta przy użyciu markerów AFLP
Primers detecting polymorphism in rye lines with the use of AFLP markers

Numer startera Primers no.	Liczba fragmentów DNA Number DNA fragments	Liczba fragmentów polimorficznych Number polymorphic fragments
E-ACGG M-CAC	27	15
E-ACC M-CAC	12	9
E-AGG M-CTCT	18	10
E-AACA M-CAG	11	7
E-AAC M-CAG	16	10

Największy poziom zróżnicowania uzyskano wykorzystując kombinację starterów E-ACGG, M-CAC (15 prążków polimorficznych). Dla markerów molekularnych RAPD wartość dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców F₁ żyta mieściła się w zakresie od 78% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca CSIN 23 do 89% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca CSIN 15 (tab.5). Wartość dystansu genetycznego dla markerów molekularnych AFLP wynosiła od 68% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca CSIN 3693 do 84% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca CSIN 23 (tab. 5).

Tabela 5

Dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskim mieszańców F₁ żyta
Genetic distance between parental lines in F₁ rye hybrids

Mieszańce F ₁ Hybrids	Linie rodzicielskie Parental lines		Dystans genetyczny Genetic distance	
	mateczna female	ojcowska male	RAPD %	AFLP %
C SIN 9	S 66P/95	S 93N/95	87	80
C SIN 15	S 93P/95	NS 426N/91	89	78
C SIN 23	S 157P/98	S 93N/95	78	84
C SIN32	S 213P/98	WS 66N/85	85	81
C SIN2493	S 93P/95	S 44N/94	81	81
C SIN 3693	S 64P/95	S 93N/95	87	68

Dystans genetyczny pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańców F₁ pszenżyta wyznaczony na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP. Dla markerów molekularnych RAPD 10 wyselekcjonowanych starterów wygenerowało 65 prążków polimorficznych. Poszczególne startery generowały od 4 do 11 prążków różnicujących komponenty rodzicielskie (tab. 6).

Tabela 6

Startery dające polimorfizm w liniach pszenżyta przy użyciu markerów RAPD-PCR
Primers detecting polymorphism in triticale lines with the use of RAPD-PCR markers

Numer startera Primers no.	Liczba fragmentów DNA Number DNA fragments	Liczba fragmentów polimorficznych Number polymorphic fragments
OPA 02	9	7
OPA 06	10	6
OPA 09	10	7
OPA 12	10	6
OPA 14	12	7
OPB 17	12	11
OPD 19	10	6
OPH 09	5	4
OPI 11	9	6
OPI 12	9	5

Najwięcej prążków polimorficznych (11) wygenerował starter OPB 17. Dla markerów molekularnych AFLP 5 wyselekcjonowanych kombinacji starterów wygenerowało 50 prążków polimorficznych. Jedna kombinacja starterów generowała średnio od 6 do 15 prążków różnicujących badane genotypy (tab. 7).

Tabela 7

Startery dające polimorfizm w liniach pszenżyta przy użyciu markerów AFLP
Primers detecting polymorphism in triticale lines with the use of AFLP markers

Numer startera Primers no.	Liczba fragmentów DNA Number DNA fragments	Liczba fragmentów polimorficznych Number polymorphic fragments
E-AGG M-CTCT	27	15
E-ACG M-CAC	30	8
E-AAC M-CTCT	19	12
E-ACGG M-CAG	20	6
E-AAG M-CTCT	15	9

Największe zróżnicowanie analizowanych genotypów w postaci liczby prążków polimorficznych dała kombinacja starterów E-AGG, M-CTCT (15 prążków). Z wykorzystaniem markerów molekularnych RAPD otrzymano wartość dystansu genetycznego mieszcząca się w zakresie od 80% pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańca BOHT 46 do 95% pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańca BOHT 61 (Tab. 8). Dystans genetyczny w przypadku markerów molekularnych AFLP mieścił się w zakresie od 86% pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańca BOHT 61 do 94% pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańca BOHT 47 (tab. 8).

Efekt heterozji cech struktury plonu mieszańców F_1 żyta obliczony względem średniej wartości cechy lepszego z rodziców. Mieszańce, u których zaobserwowano najwyższy efekt heterozji pod względem analizowanych cech struktury plonu, to: CSIN 9, CSIN 32 i CSIN 3693 (tab. 9). Mieszańce te pod względem wszystkich cech plonotwórczych z

wyjątkiem liczby ziaren w kłosku dla CSIN 9 i CSIN 3693 przewyższały istotnie linie rodzicielskie. W przypadku mieszańca CSIN 9 efekt heterozji mieścił się w przedziale od 103% dla MTZ do 142% dla plonu ziarna, natomiast w przypadku mieszańca CSIN 32 wahał się od 106% dla liczby ziaren w kłosku do 139% dla plonu ziarna. Efekt heterozji w przypadku mieszańca CSIN 3693 mieścił się w zakresie od 104% dla MTZ do 186% dla plonu ziarna. Najslabiej plonującym mieszańcem był CSIN 23, który nie wykazywał efektu heterozji dla następujących cech: długość źdźbła, długość kłosa, liczba ziaren w kłosie, liczba ziaren w kłosku i MTZ. Istotny jest fakt, że pozostałe mieszańce CSIN 15 i CSIN 2493 również wykazywały istotny efekt heterozji dla plonu.

Tabela 8

Dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskim mieszańców F₁ pszenżyta
Genetic distance between parental lines in F₁ triticales hybrids

Mieszańce F ₁ Hybrids	Komponenty rodzicielskie Parental components		Dystans genetyczny Genetic distance	
	mateczny female	ojcowski male	RAPD %	AFLP %
BOHT 45	CMS 112 - 15	Witon	88	92
BOHT 46	CMS 112 - 15	Krakowiak	80	88
BOHT 47	CMS 112 - 15	Pawo	92	94
BOHT 49	CMS 114 - 5	Krakowiak	84	92
BOHT 50	CMS 114 - 5	Pawo	84	91
BOHT 61	CMS Malno 53/3	MAH 3800	95	86
BOHT 62	CMS Malno 53/3	Todan	85	89

Tabela 9

Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu mieszańców żyta
Heterosis effect for rye yield and its components

Mieszaniec F ₁ Hybrid F ₁	Długość źdźbła Straw length	Długość kłosa Spike length	Liczba kłosek 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	MTZ 1000 seed weight	Plon Yield
C SIN 9	109*	137*	137*	125*	89	117*	103*	142*
C SIN 15	106	155*	119	114*	93	147*	107	230*
C SIN 23	99	96	101*	93	90	112*	100*	102*
C SIN 32	107*	130*	109*	116*	106*	118*	107*	139*
C SIN 2493	99	117*	99	107*	103*	109*	102*	123*
C SIN 3693	104*	122*	112*	111*	95	123*	105*	186*

* Istotny przy $\alpha = 0,05$

* Significant at $\alpha = 0,05$

Efekt heterozji cech struktury plonu mieszańców F₁ pszenżyta obliczony względem średniej wartości cechy lepszego z rodziców. Najwyższy efekt heterozji pod względem analizowanych cech struktury plonu zaobserwowano w przypadku mieszańców BOHT 47 i BOHT 61 (tab. 10). Mieszańce te istotnie przewyższały komponenty rodzicielskie pod względem analizowanych cech plonotwórczych, z wyjątkiem liczby ziaren w kłosie i

liczby ziaren w kłosku (BOHT 47) oraz liczby ziaren w kłosku (BOHT 61). W przypadku mieszańca BOHT 47 efekt heterozji mieścił się w zakresie od 111% dla liczby kłosek w kłosie do 166% dla masy ziarna z kłosa, natomiast w przypadku mieszańca BOHT 61 wahał się od 101% dla plonu ziarna do 230% dla masy ziarna z kłosa. Najniższy vigor stwierdzono u mieszańca BOHT 46, który nie wykazywał efektu heterozji dla długości źdźbła, liczby ziaren w kłosie oraz liczby ziaren w kłosku.

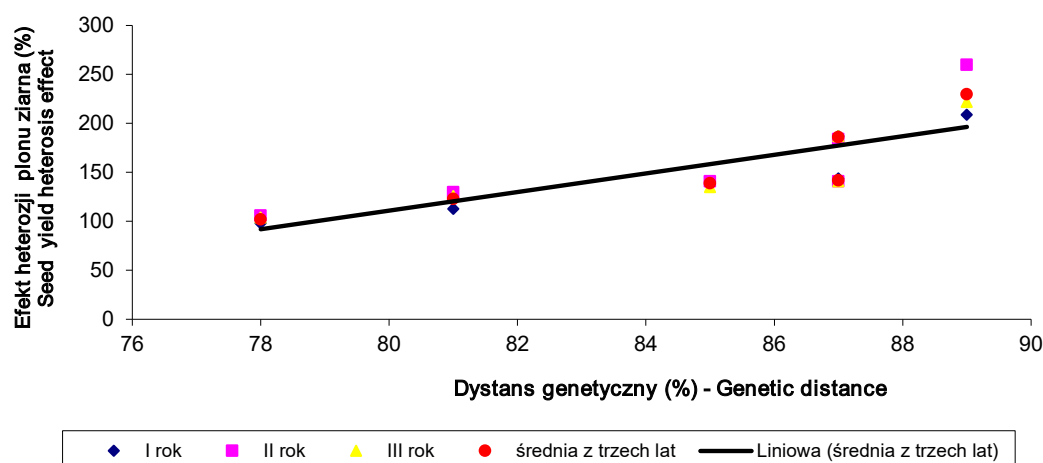
Tabela 10

Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu mieszańców pszenżyta
Heterosis effect for triticale yield and its components

Mieszaniec F ₁ Hybrid F ₁	Długość źdźbła Straw length	Długość kłosa Spike length	Liczba kłosek 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	MTZ 1000 seed weight	Plon Yield
BOHT 45	126*	108*	108*	85	78	152*	119*	128*
BOHT 46	100	102*	104	83	79	140*	106	108*
BOHT 47	133*	120*	111*	97	97	166*	127*	140*
BOHT 49	115*	112*	113*	87	77	121*	115*	127*
BOHT 50	113*	113*	107*	94	87	108*	108*	118*
BOHT 61	144*	143*	117*	106*	90	230*	141*	101*
BOHT 62	123*	120*	107*	106*	99	140*	120*	112*

* - Istotny przy $\alpha = 0,05$

* - Significant at $\alpha = 0,05$



Funkcja liniowa: $y = a + bx$; ($a = -648,8419$; $b = 9,4971429$)

Współczynnik dopasowania funkcji $r = 0,85$

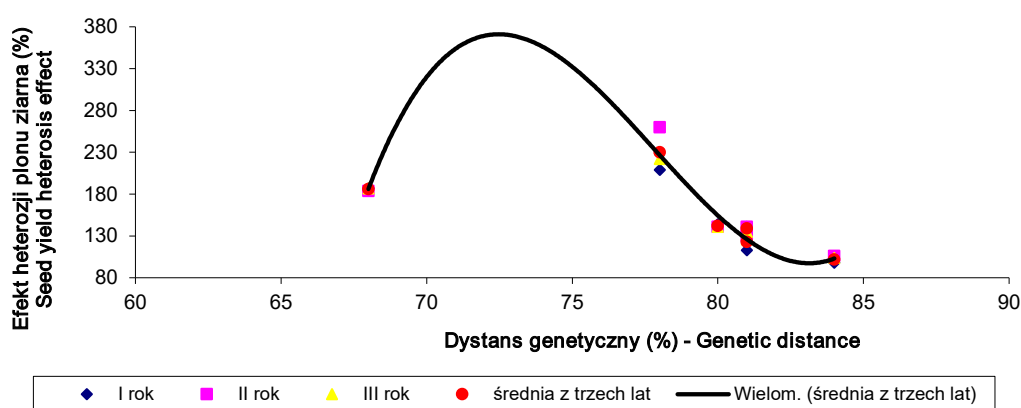
Rys. 1. Zależność efektu heterozji plonu ziarna żyta od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD

Linear fit: $y = a + bx$; ($a = -648.8419$; $b = 9.4971429$)

Coefficient adjust function $r = 0.85$

Fig. 1. Relationship between seed yield heterosis in rye and genetic distance determined with the use of RAPD molecular markers

Przewidywanie efektu heterozji dla plonu ziarna żyta w zależności od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP przy zastosowaniu modeli matematycznych. Dla markerów molekularnych RAPD funkcją opisującą zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego była funkcja liniowa (rys. 1). Wykorzystując tę funkcję, można podjąć próbę predykcji efektu heterozji, o ile wartość dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi mieści się będzie w zakresie od 78% do 89%. Współczynnik dopasowania funkcji wyniósł $r = 85$. W przypadku markerów molekularnych AFLP funkcją opisującą zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego był wielomian trzeciego stopnia (rys. 2), aby móc wykorzystać tę funkcję do przewidywania efektu heterozji, wartość dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi powinna mieścić się w zakresie od 68% do 84%. Współczynnik dopasowania funkcji $r = 0,96$ był wyższy od współczynnika dopasowania funkcji dla markerów RAPD i precyzyjniej opisywał tę zależność.



Wielomian trzeciego stopnia: $y = a + bx + cx^2 + dx^3 \dots$ ($a = -209490,97$, $b = 8163,6144$, $c = -105,41937$, $d = 0,45164107$)
Współczynnik dopasowania funkcji $r = 0,96$

Rys. 2. Zależność efektu heterozji plonu ziarna żyta od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych AFLP

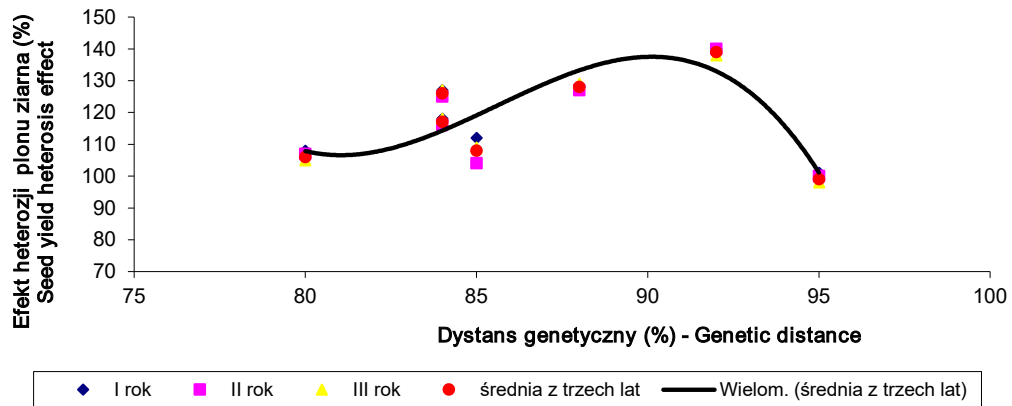
Polynomial fit: $y = a + bx + cx^2 + dx^3 \dots$ ($a = -209490,97$, $b = 8163,6144$, $c = -105,41937$, $d = 0,45164107$)
Coefficient adjust function $r = 0,96$

Fig. 2. Relationship between seed yield heterosis in rye and genetic distance determined with the use of AFLP molecular markers

Przewidywanie efektu heterozji dla plonu ziarna pszenżyta w zależności od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP przy zastosowaniu modeli matematycznych

Zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego przy pomocy markerów molekularnych RAPD opisywał wielomian trzeciego stopnia (rys. 3). Wykorzystując tę funkcję można podjąć próbę przewidywania efektu heterozji gdy wartość dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi mieści się będzie w zakresie od 80% do 95%. Współczynnik dopasowania funkcji wyniósł $r = 84$. Funkcja liniowa

opisywała zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych AFLP (rys. 4).

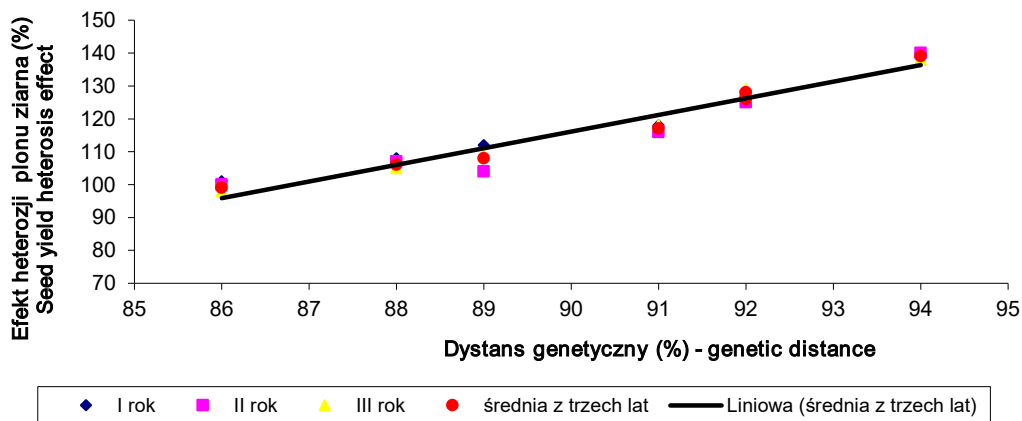


Wielomian trzeciego stopnia: $y = a+bx+cx^2+dx^3...$ ($a = 51436,586$, $b = -1809,0503$, $c = 21,198483$, $d = -0,082568274$)
 Współczynnik dopasowania funkcji $r = 0,84$

Rys. 3. Zależność efektu heterozji plonu ziarna pszenżyta od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD

Polynomial fit: $y = a+bx+cx^2+dx^3...$ ($a = 51436.586$, $b = -1809.0503$, $c = 21.198483$, $d = -0.082568274$)
 Coefficient adjust function $r = 0.84$

Fig. 3. Relationship between seed yield heterosis in rye and genetic distance determined with the use of RAPD molecular markers



Funkcja liniowa: $y = a+bx$; ($a = -339,25157$, $b = 5,0597484$)
 Współczynnik dopasowania funkcji $r = 0,98$

Rys. 4. Zależność efektu heterozji plonu ziarna pszenżyta od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów molekularnych AFLP

Linear fit: $y = a+bx$; ($a = -339.25157$, $b = 5.0597484$)
 Coefficient adjust function $r = 0.98$

Fig. 4. Relationship between seed yield heterosis in rye and genetic distance determined with the use of AFLP molecular markers

Funkcję tę można wykorzystać do przewidywania efektu heterozji jeżeli wartość dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi mieści się będzie w zakresie od 86% do 94%. Współczynnik dopasowania funkcji $r = 0,98$ był wyższy od współczynnika dopasowania funkcji dla markerów RAPD.

DYSKUSJA

Żyto prawdopodobnie pochodzi z Azji Mniejszej, gdzie znajduje się wiele jego form dzikich. Początkowo było chwastem w zasiewach pszenicy i jęczmienia (Herseg, 1986). Żyto zajmuje w Polsce czołowe miejsce wśród roślin zbożowych, a w uprawie są głównie odmiany populacyjne. Polskie odmiany populacyjne stosunkowo dobrze plonują i trudniej je zastąpić odmianami heterozyjnymi plonującymi średnio o 10-15% wyżej. Korzyści płynące z uzyskania wyższego plonu pochłaniają bowiem relatywnie wysokie koszty produkcji materiału siewnego odmian heterozyjnych.

Pszenżyto (*Triticosecale* Witt.) jest syntetycznym mieszańcem międzyrodzajowym pszenicy z żytem, łączącym w sobie cechy gatunków użytych do krzyżowania. Pszenżyto do uprawy wprowadzono stosunkowo niedawno. Było to możliwe dzięki hodowli tzw. wtórnych mieszańców.

Heterozja jest zjawiskiem genetycznym do dzisiaj nie w pełni wyjaśnionym. Wysunięto wiele hipotez usiłujących je wytłumaczyć, ale żadna do końca nie wyjaśnia zjawiska. Przymuszczalnie jest tak dlatego, że objawy heterozji są zbyt złożone, aby można je było tłumaczyć za pomocą jednego, prostego sformułowania — teorii (Adamczyk, 2004).

We współczesnej hodowli roślin coraz częściej wykorzystywane są techniki biologii molekularnej oparte na analizie DNA, w związku z tym nieustannie prowadzi się badania nad opracowaniem nowych, skutecznych i tańszych metod otrzymywania markerów molekularnych, które będą narzędziem badawczym wszędzie tam, gdzie niezbędna jest analiza genotypu.

W badaniach, które są przedmiotem tej pracy wykorzystano dwa typy markerów molekularnych RAPD i AFLP. W niniejszej pracy w przypadku markerów molekularnych RAPD liczba wygenerowanych prążków polimorficznych, pozwalających na określenie dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańców F_1 , wynosiła od 4 do 11 dla żyta i od 4 do 11 dla pszenżyta. Markery molekularne RAPD okazały się mniej efektywne w generowaniu polimorfizmu niż markery molekularne AFLP.

Markery molekularne AFLP generowały więcej prążków różnicujących analizowane genotypy niż startery użyte w przypadku markerów RAPD, co pozwoliło na bardziej precyzyjne oszacowanie dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi. Liczba wygenerowanych prążków polimorficznych wynosiła od 7 do 15 dla żyta i od 6 do 15 dla pszenżyta. Mimo różnic w liczbie wygenerowanych prążków polimorficznych pomiędzy obydwoimi typami markerów oszacowany na ich podstawie dystans genetyczny pomiędzy analizowanymi komponentami rodzicielskimi był stosunkowo duży. Dla żyta dystans genetyczny określony przy użyciu markerów RAPD mieścił się w zakresie od 78% do 89%, a dla markerów AFLP od 68% do 84%. W przypadku pszenżyta dla markerów

RAPD dystans genetyczny mieścił się w zakresie od 80% do 95% a w przypadku markerów AFLP od 86% do 94%.

Bardzo ważna z punktu widzenia hodowli roślin jest możliwość użycia markerów molekularnych w badaniach cech ilościowych. Najistotniejszym miernikiem tego typu badań jest analiza komponentów genetycznych cechy i ustalenie, które części genomu są odpowiedzialne za dziedziczenie analizowanej cechy przy użyciu markerów molekularnych. W celu uzyskania wystarczającego rozkładu statystycznego podczas mapowania cech wielogenowych lub ilościowych wymagane jest badanie dużych populacji. Zmienność cech ilościowych ma charakter ciągły, wynikający z nakładania się skokowej zmienności mutacyjnej i modyfikujących wpływów środowiska.

Dużym przełomem w hodowli roślin było zastosowanie markerów molekularnych do badania pokrewieństwa pomiędzy analizowanymi obiektami oraz ustalenie ich filogenezy. Badania taksonomiczne stanowią istotne źródło informacji pozwalających zoptymalizować wykorzystanie istniejących zasobów genowych, na przykład poprzez wybranie najodpowiedniejszych form do krzyżowań oddalonych (Grzebelus, Barański, 1996).

Song i wsp. (1990) przy zastosowaniu markerów RFLP opracowali dendrogram obrazujący podobieństwo między 38 genotypami z rodzaju *Brassica*. Udowodnili między innymi istnienie bliskiego pokrewieństwa pomiędzy genomami brokuła i kalafiora oraz kapusty głowiastej i jarmużu. Wykazali, że wraz z ewolucją rodzaju *Brassica* zwiększyła się liczba chromosomów w jego genomie.

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 w takich gatunkach jak: jęczmień, soja i lucerna (Williams i in., 1990; Echt i in., 1992).

W rodzaju *Brassica* markery RAPD są uważane za tak samo efektywne jak markery RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) do szacowania wewnątrz gatunkowego podobieństwa między genotypami (Demke i in., 1992; Thorman i in., 1994; dos Santos i in., 1994).

Badania nad podobieństwem genetycznym u różnych linii rzepaku ozimego prowadził Liersch i Broda (1996) dowiedli, że linie pochodzenia europejskiego wykazały duże podobieństwo genetyczne, znacznie się jednak różniły od linii azjatyckich, świadczy to, że metoda RAPD może być narzędziem mogącym ujawniać różnicowanie genetyczne.

W przeprowadzonych badaniach w przypadku żyta potwierdzono, że wysokie zdolności kombinacyjne występują pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańców F₁: CSIN 9, CSIN 32, CSIN 2493 i CSIN 3693. Mieszańce te charakteryzowały się istotnymi efektami heterozji dla większości analizowanych cech struktury plonu. Linie rodzicielskie mieszańców żyta w większości były ze sobą spokrewnione. Niezależnie od stopnia pokrewieństwa dystans genetyczny pomiędzy tymi liniami był duży i wahał się od 68% do 84% dla markerów molekularnych AFLP i od 78% do 89% dla markerów RAPD. Mieszańcami charakteryzującymi się największym wigorem były CSIN 9 i CSIN 3693.

W badaniach własnych potwierdzono, że najwyższa zdolność kombinacyjna dla pszenżyta występuje pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańców F₁ BOHT 41 i

BOHT 61. Mieszkańce te charakteryzowały się istotnymi efektami heterozji dla większości cech struktury plonu. W świetle otrzymanych wyników można przypuszczać, że stosunkowo niskie efekty heterozji dla pszenżyta mogą, podobnie jak dla żyta, wynikać ze spokrewnienia większości komponentów rodzicielskich. Warto nadmienić, że dystans genetyczny pomiędzy komponentami rodzicielskimi pszenżyta, tak samo jak w przypadku żyta był duży i wahał się od 86% do 94% dla markerów AFLP i od 80% do 95% dla markerów RAPD. Można więc przypuszczać, że na różnice w wielkości efektu heterozji u poszczególnych gatunków większy wpływ ma pochodzenie komponentów rodzicielskich niż dystans genetyczny pomiędzy nimi określony na podstawie markerów molekularnych, gdyż u spokrewnionych gatunków pomiędzy którymi był duży dystans genetyczny występował mniejszy efekt heterozji niż u gatunków nie spokrewnionych przy równie dużym dystansie genetycznym.

W ostatnim dziesięcioleciu wielu naukowców podjęło również próbę wnioskowania o efekcie heterozji poprzez badanie dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi (Fabrizius i in., 1998; Tams i in., 2002).

Problem dystansu genetycznego, pokrewieństwa i zjawiska heterozji podejmowany był wielokrotnie między innymi przez: Ajmone Marsan i wsp. (1998); Boppenmaier i wsp. (1993); Chareosset, Essioux, (1994); Dubreuil i wsp. (1996).

Publikacje dotyczące tematu, które są efektem dotychczasowych badań nie przyniosły jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy podobieństwo genetyczne lub pokrewieństwo 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 lecz aktualny i ważny hodowli roślin.

W badaniach własnych dotyczących żyta podjęto również próbę predykcji efektu heterozji dla plonu w oparciu o wartość dystansu genetycznego pomiędzy analizowanymi liniami rodzicielskimi. Zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów AFLP opisywał wielomian trzeciego stopnia, a współczynnik dopasowania dla tej funkcji wynosił $r = 0,96$. Zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów RAPD opisywała funkcja liniowa, a współczynnik dopasowania funkcji wynosił $r = 0,85$.

Dla pszenżyta, podobnie jak dla żyta, podjęto próbę przewidywania efektu heterozji dla plonu w oparciu o wartość dystansu genetycznego pomiędzy analizowanymi liniami rodzicielskimi. Zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów AFLP opisywała funkcja liniowa, a współczynnik dopasowania dla tej funkcji wynosił $r = 0,98$. Zależność efektu heterozji dla plonu od dystansu genetycznego określonego na podstawie markerów RAPD opisywał wielomian trzeciego stopnia, a współczynnik dopasowania funkcji wynosił $r = 0,84$.

Na podstawie uzyskanych w tej pracy wyników stwierdzono, że zarówno markery molekularne AFLP jak i RAPD w przypadku żyta i pszenżyta mogą być wykorzystane do grupowania linii pod względem pochodzenia oraz linii o niepełnych danych o pochodzeniu. Dobór linii rodzicielskich do krzyżowań powinien odbywać się głównie z wykorzystaniem

analizy istniejącego pomiędzy nimi pokrewieństwa, linie te powinny być również testowane w warunkach polowych.

WNIOSKI

1. Badania wykazały, że markery molekularne RAPD i AFLP są przydatne do określania dystansu genetycznego komponentów rodzicielskich żyta i pszenżyta dla krzyżowań heterozyjnych.
2. Frekwencja polimorficznych produktów amplifikacji była większa w przypadku markerów AFLP w stosunku do markerów RAPD, co pozwoliło na bardziej precyzyjne oszacowanie dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi w tych gatunkach.
3. Zarówno dla zastosowanych markerów RAPD i AFLP zależności efektu heterozji plonu ziarna od dystansu genetycznego najlepiej opisują funkcje matematyczne: wielomian trzeciego stopnia $y=a+bx+cx^2+dx^3...$ oraz funkcja liniowa $y = a+bx$.

LITERATURA

- Adamczyk J., 2004. Genetyczne podstawy hodowli kukurydzy. Zarys Genetyki Zbóż. Tom 2. Pszenżyto, kukurydza i owies (pr. zbior., red. A. G. Górny), wyd. IGR PAN Poznań: 279 — 310.
- 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: 61 — 64.
- Boppenmaier J. A., Melchinger G., Seitz H. H. 1993 Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds; III. Performance of crosses within versus between heterotic groups for grain traits. *Plant Breeding* 111: 217 — 226.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dubas A. 1999. Kukurydza (8). Praca zbiorowa: „Szczegółowa uprawa roślin”, pod redakcją Z. Jasińskiej i A. Koteckiego. Tom 1. Wyd. AR Wrocław: 263 — 289.
- Dubreuil P., Dufour E., Krejci M., Cause D. 1996. Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups. *Crop Sci.* 36: 790 — 799.
- Echt C. S., Erdahl L. A., McCoy T. J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome.* 35: 84 — 87.
- Fabrizius M. A., Busch R. H., Khan K., Huckle L. 1998. Genetic diversity and heterosis of spring wheat crosses. *Crop Sci.* 38: 1108 — 1112.
- Grzebelus D., Barański R. 1996. Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin.” Praca zbiorowa pod redakcją Barbary Michalik: 35 — 47.
- Herseg J. 1986. Szczegółowa uprawa roślin. PWN, Warszawa: 81 — 97.
- Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. 1998. Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals. Chapman and Hall, London.
- Liersch A., Broda I. 1996. Polimorfizm różnych linii dihaploidalnych rzepaku ozimego określony metodą PCR – RAPD. *Rośliny Oleiste, Oilseed Crops.* Tom XVII: 53 — 60.

- Nei M., and Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Song K., Osborn T. C., Williams P. H. 1990. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLP). *Theor. Appl. Genet.* 79: 497 — 506.
- Srivastava H. K., Arunchalam V. 1977. Heterosis as a function of genetic divergence in triticale. *Zeit. Pflanzenzüchtung* 78: 269 — 275.
- Tams S. H., Melchinger A. E., Oettler G., Bauer E. 2002. Assessment of genetic diversity in European winter triticale using molecular markers and pedigree data. *Proc. 5th Int. Triticale Symp., IHAR Radzików, Poland, 30 June-5 July 2002, I*: 95 — 103.
- 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.
- Węgrzyn S. 1996. Teoretyczne oszacowanie komponentów wariancji genetycznych w czynnikiem modelu krzyżowania. *Biul. IHAR* 200: 7 — 13.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 (22): 6531 — 6535.