

Jan Bocianowski¹, Alina Liersch², Iwona Bartkowiak-Broda²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu,
Adres do korespondencji: jboc@up.poznan.pl

Wpływ zróżnicowania na poziomie genetycznym na zróżnicowanie na poziomie fenotypowym linii rodzicielskich mieszańców F₁ CMS *ogura* rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)*

**Influence of diversity at the genetic level on the phenotypic diversity
parental lines of CMS *ogura* winter oilseed rape hybrids
(*Brassica napus* L.)**

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, linie rodzicielskie mieszańców CMS *ogura*, markery molekularne, podobieństwo genetyczne, zróżnicowanie fenotypowe

Dobór komponentów do krzyżowań w celu otrzymania nowych – ulepszonych odmian populacyjnych i mieszańcowych może odbywać się zarówno na poziomie fenotypowym roślin, jak i na poziomie genetycznym.

Celem pracy było sprawdzenie, czy zróżnicowanie form rodzicielskich mieszańców F₁ CMS *ogura* rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) ocenione na podstawie obserwacji markerów molekularnych przekłada się na ich zróżnicowanie fenotypowe. Materiał do badań stanowiło 18 linii rodzicielskich mieszańców F₁ rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). Obiekty te obserwowano pod względem 19 cech fenotypowych w doświadczeniach w dwóch miejscowościach (Borowo i Zielęcín), w dwóch sezonach wegetacyjnych (2002/2003 i 2003/2004). Ponadto materiał badawczy został scharakteryzowany na poziomie genetycznym za pomocą 597 polimorficznych markerów typu AFLP, RAPD i izoenzymatycznych. Oszacowano współczynniki podobieństwa genetycznego, które posłużyły do hierarchicznego grupowania badanych obiektów rzepaku ozimego metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonego grupowania przedstawiono w formie dendrogramu. Następnie przeprowadzono analizę wariancji obserwowanych cech (z grupami wyznaczonymi na podstawie dendrogramu, jako poziomami czynnika różnicującego) w celu ustalenia, czy zmienność poszczególnych cech jest większa w obrębie wyróżnionych grup podobieństwa, czy też pomiędzy tymi grupami. Dla każdej cechy obliczono najmniejszą istotną różnicę na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Uzyskane wyniki wskazują, że zróżnicowanie na poziomie fenotypowym było zgodne ze zróżnicowaniem genetycznym dla większości obserwowanych cech. Dla zawartości kwasu oleinowego (C_{18:1}) zróżnicowanie oszacowane na podstawie obserwacji markerowych nie powodowało zróżnicowania fenotypowego w żadnym z czterech rozważanych środowisk.

* Badania molekularne zostały wykonane w ramach projektu badawczego promotorskiego KBN nr 3PO6A 027 25.

Key words: winter oilseed rape, parental lines of CMS *ogura* hybrids, molecular markers, genetic similarity, phenotypic diversity

The selection of components for crossbreeding in order to obtain new improved varieties and hybrids can be carried out both at the plant phenotype and at the genetic level as well.

The aim of this study was to examine whether the differentiation of the parental lines of F₁ hybrids based on observations of molecular markers would result in their phenotypic variation. The plant materials comprised 18 parental lines of F₁ hybrids of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Nineteen selected phenotypic traits were observed in two localities (Borowo and Zielęcín) in two growing seasons (2002/2003 and 2003/2004). Moreover, the collected material was also characterized at the genetic level by studying the 597 polymorphic molecular markers such as AFLP, RAPD and isozymes. Genetic similarity coefficients were calculated. Cluster analyses were conducted on using the unweighted pair-group method with arithmetic mean and the resulting clusters were shown in a dendrogram. An analysis of variance for the observed traits (with groups designated in the dendrogram as differentiating factor levels) was performed in order to determine whether the variability of individual traits is higher within distinguished groups, or between them. The least significant difference for each investigated trait was calculated at the significance level $\alpha = 0.05$.

The results indicate that the diversity at genetic level was consistent with differences based on phenotypic observations for most of the analyzed traits. Genetic diversity estimated using molecular markers was not consistent with the phenotypic variation for oleic acid (C_{18:1}) content in any of the four examined environments.

Wstęp

Dobór komponentów do krzyżowań w celu otrzymania nowych – o zmienionych cechach – ulepszonych odmian populacyjnych i mieszańcowych może odbywać się na podstawie zarówno cech fenotypowych roślin, jak i na poziomie genotypu. Zmienność genetyczna czy fenotypowa może być szacowana poprzez badanie obiektu lub jego potomstwa na podstawie informacji uzyskanych: *a priori* – poprzez przewidywanie oraz *a posteriori* – na podstawie obserwacji i badań potomstwa.

Pierwsze z metod wykorzystują znajomość takich danych, jak genealogia danego obiektu oraz informacje o pochodzeniu geograficznym. Znajomość genealogii pozwala na określenie stopnia pokrewieństwa z innymi genotypami lub odległości genetycznej. Zmienność pochodzenia geograficznego może informować o odmienności genetycznej, a jest ona tym większa im bardziej różnorodne były środowiska, w których prowadzono selekcję. Metoda *a posteriori* opiera się na analizach matematyczno-statystycznych danych uzyskanych z obserwacji fenotypowych oraz wyników badań genotypu na poziomie molekularnym (Lefort-Buson i in. 1988).

Szacowanie zmienności fenotypowej wymaga wieloletnich obserwacji przeprowadzonych w wielu środowiskach. Markery fenotypowe u rzepaku jak i u innych roślin zazwyczaj ulegają modyfikującemu wpływowi środowiska. U rzepaku polimorfizm określa się także na podstawie ekspresji fenotypowej niektórych cech jakościowych, takich jak: zawartość glukozyolanów oznaczana metodą wysokociśnieniowej chromatografii gazowej HPLC (*high pressure liquid chromatography*) (Adams i in. 1989, PN ISO 9167-1:1999) oraz profili kwasów tłuszczowych w oleju nasion

oznaczanych za pomocą chromatografii gazowej GLC (*gas liquid chromatography*) (Krzymański 1970, PN-EN ISO 5508:1996).

Rozwój genetyki molekularnej i metod badania genomu na poziomie DNA dały możliwość szybkiej oceny zmienności genetycznej niezależnej od modyfikującego wpływu środowiska (Snowdon i Friedt 2004, Teklewold i Becker 2006, Krystkowiak i in. 2009, Bocianowski 2012 a, b, c, Krajewski i in. 2012).

Wiele badań wykazało, że im większe jest zróżnicowanie genetyczne linii rodzicielskich, tym większy efekt heterozji i w wyniku krzyżowania zróżnicowanych genetycznie linii z większą częstotliwością uzyskuje się plenne mieszańce (Moll i in. 1965, Shamsuddin 1985, Melchinger i in. 1990, Messmer i in. 1992, Kantety i in. 1995, Xiao i in. 1996, Fabrizio i in. 1998, Melchinger 1999, Benchimol i in. 2000, Riaz i in. 2001, Betrán i in. 2003).

Celem pracy było zbadanie, czy zróżnicowanie form rodzicielskich mieszańców F₁ CMS *ogura* rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) ocenione na podstawie obserwacji markerów molekularnych jest skorelowane z ich zróżnicowaniem fenotypowym.

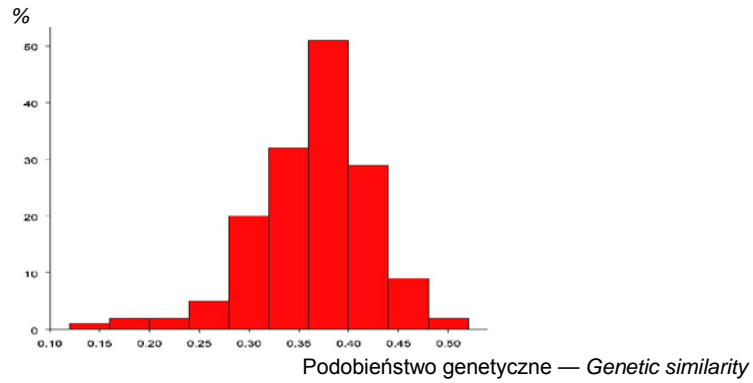
Material i metody

Material do badań stanowiło 18 linii rodzicielskich mieszańców F₁ rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.): PN 4555, PN 1265, PN 2850, BO 110RJ, PN 9288, PN 9294, PN 2824, Bor zap 2, BO 83 a, Bor zap 1, BO 120 a, BO 238 a, Samourai, Bor zap 4, PN 4539, PN 4537, PN 4533, Bor zap 3. Linie rodzicielskie badano w doświadczeniach założonych w układzie bloków losowanych kompletnych w czterech powtórzeniach, przeprowadzonych w dwóch miejscowościach (Borowo i Zielęcín) w dwóch sezonach wegetacyjnych (2002/2003 i 2003/2004). Linie zostały ocenione pod względem 19 cech fenotypowych: plon nasion, długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyń, masa 1000 nasion, początek i długość kwitnienia, zawartość tłuszczu i kwasów tłuszczowych w oleju nasion: palmitynowego C_{16:0}, stearynowego C_{18:0}, oleinowego C_{18:1}, linolowego C_{18:2}, linolenowego C_{18:3} i eikozenowego C_{20:1}, zawartość glukozyolanów: glukonapiny, progoytryny, glukobrassicapiny, 4-hydroksybrassicyny, suma glukozyolanów alkenowych, suma glukozyolanów alkenowych i indolowych. Ponadto zostały scharakteryzowane na poziomie genetycznym poprzez identyfikację 597 polimorficznych markerów typu AFLP, RAPD i izoenzymatycznych. Metodyka doświadczeń polowych została szczegółowo opisana we wcześniejszej pracy (Bocianowski i in. 2009). Współczynniki podobieństwa genetycznego oszacowano wg miary Nei i Li (1979). Następnie posłużyły one do hierarchicznego grupowania badanych obiektów rzepaku ozimego metodą nieważonych średnich połączeń (UPGMA). Metoda UPGMA skupia parami jednostki operacyjne, w tym przypadku linie rzepaku ozimego,

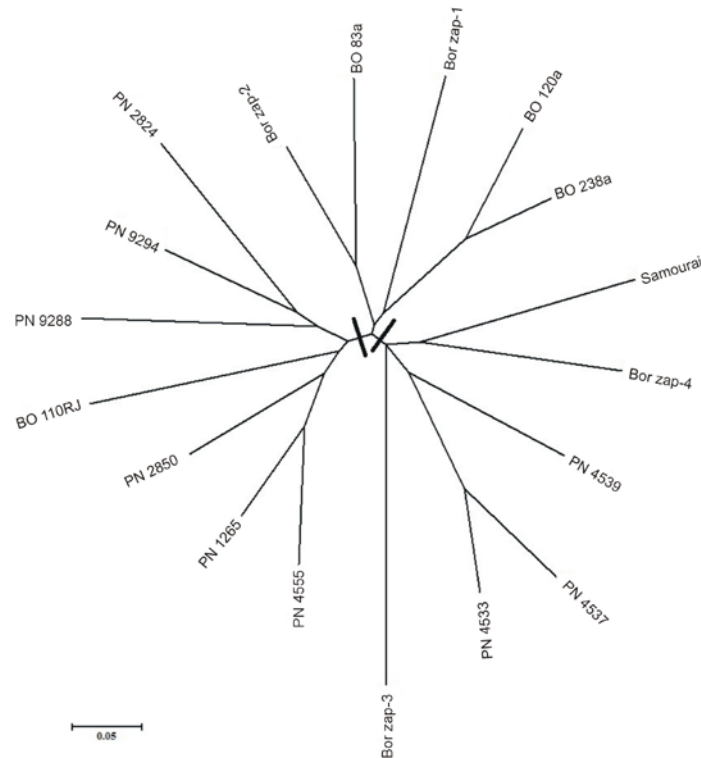
porównując nieważone średnie arytmetyczne grup. Jest to metoda najczęściej stosowana ze względu na jej znaczną skuteczność (wysoki poziom korelacji macierzy współczynników podobieństwa oraz macierzy wartości konfenetycznych, czyli poziomów łączenia jednostek operacyjnych w dendrogramie). Wyniki przeprowadzonego grupowania przedstawiono w formie dendrogramu. Dendrogram grupuje badane linie rodzicielskie mieszańców F_1 rzepaku ozimego na trzy odrębne skupienia zgodnie z ich genealogią i miejscem pochodzenia. Następnie przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) obserwowanych cech (z grupami wyznaczonymi na podstawie dendrogramu jako poziomami czynnika różnicującego) w celu ustalenia, czy zmienność poszczególnych cech fenotypowych jest większa w obrębie wyróżnionych grup podobieństwa genetycznego, czy też pomiędzy tymi grupami. Dla każdej cechy obliczono najmniejszą istotną różnicę (NIR) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wszystkie obliczenia wykonano korzystając z pakietu statystycznego GenStat v. 7.1 (Payne i in. 2003).

Wyniki

Genetyczny polimorfizm linii rodzicielskich mieszańców F_1 analizowano na podstawie 597 markerów: RAPD (225 – 37,7% wszystkich markerów), AFLP (354 – 59,3%), izoenzymów (18 – 3%). Obliczone współczynniki podobieństwa genetycznego badanych form charakteryzowały się dużą rozpiętością (tab. 1, rys. 1). Wartości tych współczynników przedstawiono w innej pracy (Liersch i in. 2013). Przeprowadzone na podstawie współczynników podobieństwa genetycznego grupowanie hierarchiczne badanych linii metodą średnich połączeń przedstawiono w formie dendrogramu (rys. 2). Na podstawie dendrogramu wyodrębniono trzy rozdzielne grupy linii rodzicielskich zgodnie z ich genealogią i miejscem pochodzenia. Do grupy pierwszej zaliczono linie: PN 4555, PN 1265, PN 2850, BO 110RJ, PN 9288, PN 9294, PN 2824, do grupy drugiej: Bor zap 2, BO 83 a, Bor zap 1, BO 120 a, BO 238 a, natomiast do grupy trzeciej: Samourai, Bor zap 4, PN 4539, PN 4537, PN 4433, Bor zap 3. W celu zweryfikowania hipotez zerowych o braku wpływu zróżnicowania linii rodzicielskich na poziomie genetycznym na ich zróżnicowanie fenotypowe przeprowadzono analizę wariancji 19 cech z grupami jako poziomami czynnika różnicującego. Wyniki trójczynnikowej analizy wariancji przedstawiono w tabeli 2. Ze względu na szereg istotnych statystycznie interakcji grupy \times rok, grupy \times miejscowość i/lub grupy \times rok \times miejscowość przeprowadzono jednoczynnikowe (grupy) analizy wariancji dla środowisk (lata oraz miejscowości) niezależnie. Średnie kwadraty z tych analiz wariancji przedstawiono w tabeli 3. Istotne statystycznie (na poziomie co najmniej $\alpha = 0,05$) zróżnicowanie grup we wszystkich czterech rozważanych środowiskach otrzymano dla plonu nasion, liczby nasion w łuszczyźnie, początku kwitnienia, długości kwitnienia, zawartości kwasu palmitynowego, linolenowego, glukonapiny oraz gluko-



Rys. 1. Współczynniki podobieństwa genetycznego 18 linii rodzicielskich mieszańców CMS *ogura* otrzymane na podstawie 597 markerów — *Coefficients of genetic similarity of 18 parental lines of CMS ogura hybrids obtained on the basis of the 597 markers*



Rys. 2. Dendrogram podobieństwa genetycznego 18 linii rodzicielskich mieszańców CMS *ogura* utworzony na podstawie 597 markerów — *Dendrogram of genetic similarity of 18 parental lines of CMS ogura hybrids based on 597 markers. The hybrids were grouped hierarchically using the UPMGA method.*

Tabela 1
 Wartości współczynników podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi genotypami oszacowane na podstawie 597 polimorficznych markerów — *Genetic similarities among the studied genotypes based on 597 polymorphic markers*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Bor zap 1	1	0,72	0,57	0,61	0,63	0,63	0,63	0,61	0,63	0,61	0,59	0,71	0,66	0,61	0,72	0,66	0,58	0,61
2 Bor zap 2		1	0,61	0,63	0,63	0,69	0,68	0,67	0,63	0,62	0,64	0,65	0,67	0,74	0,63	0,67	0,65	0,67
3 Bor zap 3			1	0,59	0,62	0,56	0,6	0,59	0,6	0,56	0,52	0,58	0,61	0,56	0,59	0,55	0,5	0,55
4 Samourai				1	0,63	0,59	0,62	0,59	0,63	0,57	0,58	0,65	0,71	0,63	0,62	0,57	0,6	0,59
5 PN 4537					1	0,61	0,68	0,65	0,87	0,6	0,58	0,65	0,65	0,57	0,64	0,61	0,6	0,58
6 PN 9294						1	0,69	0,8	0,6	0,72	0,65	0,71	0,65	0,64	0,65	0,68	0,62	0,69
7 PN 4539							1	0,72	0,67	0,66	0,68	0,63	0,67	0,64	0,63	0,68	0,65	0,69
8 PN 2824								1	0,66	0,71	0,61	0,7	0,66	0,64	0,62	0,67	0,61	0,63
9 PN 4533									1	0,62	0,61	0,66	0,63	0,54	0,62	0,59	0,57	0,6
10 PN 9288										1	0,65	0,7	0,67	0,59	0,58	0,61	0,61	0,65
11 PN 4555											1	0,73	0,63	0,67	0,64	0,7	0,7	0,81
12 PN 2850												1	0,66	0,7	0,73	0,71	0,71	0,77
13 Bor zap 4													1	0,62	0,61	0,62	0,59	0,59
14 BO 83a														1	0,64	0,68	0,67	0,69
15 BO 120a															1	0,85	0,64	0,69
16 BO 238a																1	0,71	0,73
17 BO 110-RJ-4-103																	1	0,74
18 PN 1265																		1

Wyniki zawarte w tabeli 1 stanowią część innej pracy (Liersch i in. 2013)

Tabela 2
Średnie kwadraty z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla obserwowanych cech rzepaku ozimego — *Mean squares from three-way analysis of variance (ANOVA) for observed traits of oilseed rape*

Źródło zmienności <i>Source of variation</i>	Grupa, G <i>Group, G</i>	Miejsce, M <i>Location, L</i>	Rok, R <i>Year, Y</i>	G × M <i>G × L</i>	G × R <i>G × Y</i>	M × R <i>L × Y</i>	G × M × R <i>G × L × Y</i>	Błąd <i>Error</i>
Stopnie swobody <i>Degrees of freedom</i>	2	1	1	2	2	1	2	276
Plon nasion — <i>Seed yield</i>	2685,8***	31,5	23576,9***	30,8	3906***	4207,5***	645,2**	127,6
Długość łuszczyń — <i>Length of pod</i>	10,485***	4,664*	0,636	0,004	0,14	5,851**	0,077	0,83
Liczba nasion w łuszczyńce <i>Number of seeds per pod</i>	610,3***	1,0	268,7***	62,2*	77,4*	352,7***	66,4*	17,1
Masa tysięcy nasion <i>1000 seeds weight</i>	8,222***	2,812**	0,026	2,913***	2,704**	10,991***	2,758**	0,393
Początek kwitnienia <i>Beginning of flowering</i>	142,1***	35,4*	92,2***	52,2***	160,3***	63,2**	20,4	6,9
Długość kwitnienia <i>Length of flowering</i>	13,3	982,5***	506,5***	27,0**	27,9**	945,9***	98,6***	4,7
Zawartość tłuszczu — <i>Oil content</i>	32,243***	0,005	33,744***	9,081*	3,949	242,333***	28,333***	2,919
Zawartość kwasu — <i>Acid content:</i>								
– palmitynowy — <i>palmitic C_{16:0}</i>	6,3684***	5,7344***	0,044	0,3298	0,4308	0,2092	0,0857	0,1854
– stearynowy — <i>stearic C_{18:0}</i>	0,749***	1,807***	0,406**	0,014	0,081	1,471***	0,241**	0,042
– oleinowy — <i>oleic C_{18:1}</i>	2,648	233,972***	38,439*	17,656	3,446	8,548	3,936	8,388
– linolowy — <i>linoleic C_{18:2}</i>	41,992***	143,029***	73,65***	6,679	11,887	0,072	1,459	4,905
– linolenowy — <i>linolenic C_{18:3}</i>	35,2***	2,0	12,5***	0,7	4,3**	1,9	1,9	0,8
– eikozenowy — <i>eicosenoic C_{20:1}</i>	1,108***	0,182	3,566***	0,182	0,164	2,523***	0,008	0,125
Zawartość glukozy <i>Glucanapin content</i>	22,699***	2,162*	50,295***	1,045	17,299***	1,524	0,338	0,535
Zawartość glukobraszaniny <i>Glucobrasicanapin content</i>	4,223***	0,004	3,064***	0,017	0,676***	0,578**	0,007	0,083
Zawartość progoininy <i>Progoitrin content</i>	61,808***	0,159	108,25***	3,662	59,067***	45,099***	3,524	2,666

ciąg dalszy tabeli 2

Źródło zmienności <i>Source of variation</i>	Grupa, G <i>Group, G</i>	Miejsce, M <i>Location, L</i>	Rok, R <i>Year, Y</i>	G × M G × L	G × R G × Y	M × R L × Y	G × M × R G × L × Y	Błąd <i>Error</i>
Zawartość 4-hydroksybrassicyny <i>4-hydroxybrassicin content</i>	1,605*	26,514***	3,248**	1,269	0,151	1,102	1,115	0,468
Suma glukozyzolanów <i>Total glucosinolates content</i>	164,655***	23,467	399,008***	16,872	178,618***	117,543***	16,627	7,032
Suma glukozyzolanów alkenowych <i>Alkenyl glucosinolates content</i>	182,639***	0,879	467,447***	9,904	181,386***	93,062***	10,238	6,45

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Tabela 3

Średnie kwadraty z jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla obserwowanych cech rzepaku ozimego rozpatrując lokalizację i lata osobno — *Mean squares from one-way analysis of variance (ANOVA) for observed traits of oilseed rape in locations and years independently*

Źródło zmienności <i>Source of variation</i>	Borowo 2003		Borowo 2004		Zielęcin 2003		Zielęcin 2004	
	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>
Stopnie swobody <i>Degrees of freedom</i>	2	69	2	69	2	69	2	69
Plon nasion — <i>Seed yield</i>	2604,25***	75,33	2796,8***	236,4	554,89***	42,84	1311,7***	158,2
Długość łuszczyń — <i>Length of pod</i>	3,51	1,2	1,7	0,76	2,80*	0,87	2,69**	0,49
Liczba nasion w łuszczyńce <i>Number of seeds per pod</i>	498,15***	17,58	168,74**	23,16	64,36*	15,41	85,06**	12,18
Masa tysiąca nasion <i>1000 seeds weight</i>	9,2913***	0,95	5,79***	0,16	0,55*	0,14	0,96	0,33
Początek kwitnienia <i>Beginning of flowering</i>	240,39***	12,14	88,86***	6,18	28,24**	5,43	17,49*	4,07

ciąg dalszy tabeli 3

Źródło zmienności <i>Source of variation</i>	Borowo 2003		Borowo 2004		Zielęcín 2003		Zielęcín 2004	
	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>	grupa <i>group</i>	błąd <i>error</i>
Długość kwitnienia <i>Length of flowering</i>	50,22***	4,82	90,38***	10,17	4,76*	1,35	21,44***	2,64
Zawartość tłuszczu — <i>Oil content</i>	41,91***	2,95	20,42**	3,92	0,53	2,03	10,75*	2,77
Zawartość kwasu — <i>Acid content:</i>								
– palmitynowy — <i>palmitic C_{16:0}</i>	1,38***	0,18	3,83***	0,295	0,57*	0,16	1,43***	0,11
– stearynowy — <i>stearic C_{18:0}</i>	0,03	0,06	0,62***	0,035	0,35***	0,04	0,086	0,029
– oleinowy — <i>oleic C_{18:1}</i>	5,07	13,85	6,06	10,86	12,94	4,94	3,62	3,98
– linolowy — <i>linoleic C_{18:2}</i>	13,73	6,33	2,21	6,55	38,35***	3,36	7,74	3,42
– linolenowy — <i>linolenic C_{18:3}</i>	20,98***	1,33	5,73**	1,08	9,80***	0,39	5,63***	0,54
– eikozenowy — <i>eicosenoic C_{20:1}</i>	0,24**	0,05	0,211***	0,015	0,62	0,33	0,39*	0,11
Zawartość glukonapiny <i>Glucosapin content</i>	24,74***	0,65	1,97***	0,195	12,21***	0,86	2,46**	0,43
Zawartość glukobrasycanapiny <i>Glucobrassicapin content</i>	1,74***	0,14	0,54***	0,03	1,81***	0,11	0,84***	0,05
Zawartość progoitryny <i>Progoitrin content</i>	91,01***	3,26	0,17	1,83	36,60***	3,01	0,29	2,54
Zawartość 4-hydroksybrassicyny <i>4-hydroxybrassicin content</i>	1,32*	0,32	0,05	0,66	2,23*	0,47	0,54	0,43
Suma glukozynolanów <i>Total glucosinolates content</i>	280,70***	9,32	5,03	4,02	77,29***	8,68	13,75	6,03
Suma glukozynolanów alkenowych <i>Alkenyl glucosinolates content</i>	267,08***	8,76	4,66	3,698	101,89***	8	10,53	5,27

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

brassicinapiny (tab. 3). Pod względem trzech cech (MTN, zawartości tłuszczu i kwasu eikozenowego) różnicowanie pomiędzy grupami zaobserwowano w trzech środowiskach (tab. 3). Dla zawartości kwasu linolowego istotne różnicowanie pomiędzy grupami wystąpiło jedynie w Zielęcinie w 2003 r. (tab. 3). Natomiast dla zawartości kwasu oleinowego ($C_{18:1}$) różnicowanie obliczone na podstawie obserwacji markerowych nie determinowało różnicowania fenotypowego w żadnym z czterech rozważanych środowisk (tab. 3). Dla pozostałych sześciu cech różnicowanie pomiędzy grupami zaobserwowano w dwóch środowiskach (tab. 3). Środowiskiem, w którym najczęściej odrzucano hipotezę zerową o braku różnic pomiędzy grupami pod względem danej cechy był Zielęcin w 2003 r. (16 przypadków, co stanowi 84,21% wszystkich rozważanych w tym środowisku), natomiast najrzadziej w Zielęcinie w 2004 r. (11 przypadków, 57,89%). W Borowie takich przypadków było 15 (78,95%) i 12 (63,16%), odpowiednio w 2003 i 2004 roku (tab. 3).

Wpływ analizowanych czynników różnicujących oraz ich interakcji jest szczególnie widoczny, gdy prześledzi się wartości średnie poszczególnych cech zawarte w tabeli 4. Najstabilniejszą grupą (w sensie najbardziej zbliżonych – nieistotnych statystycznie – wartości średnich w obu latach prowadzenia badań) była grupa druga. Jedynie dla trzech cech (początku kwitnienia, długości kwitnienia i zawartości 4-hydroksybrassicyny w Borowie oraz zawartości kwasów stearynowego, linolenowego i eikozenowego w Zielęcinie) zaobserwowano istotne statystycznie różnicowanie pomiędzy wartościami średnimi dla grupy drugiej między latami (tab. 4). Natomiast największe różnicowanie między latami badań, w Borowie i w Zielęcinie, zaobserwowano dla grupy 3 (tab. 4).

Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że różnicowanie fenotypowe dla większości obserwowanych cech było zgodne ze różnicowaniem na poziomie genetycznym. Wyjątek stanowił kwas oleinowy ($C_{18:1}$), różnicowanie ocenione na podstawie obserwacji markerowych nie determinowało różnicowania fenotypowego tej cechy w żadnym z czterech rozważanych środowisk. Podobnie Bocianowski i Goszczurna (2011) badając linie podwojonych haploidów jęczmienia zaobserwowali brak wpływu różnicowania genetycznego na różnicowanie fenotypowe dla większości obserwowanych cech.

Najkorzystniejsza wydaje się selekcja form rodzicielskich mieszańców F_1 CMS *ogura* rzepaku ozimego przeprowadzona równocześnie ze względu na fenotyp i genotyp rośliny. Tezę tą potwierdzają badania przeprowadzone na różnych gatunkach roślin: na jęczmieniu (Bocianowski i in. 2003), na pszenicy (Krystkowiak i in. 2009), a także na rzepaku (Bocianowski i in. 2009, Liersch i in. 2009). Szczególnie, że – jak pokazano we wcześniejszych badaniach – różnicowanie

Tabela 4

Wartości średnie obserwowanych cech w czterech rozważanych środowiskach — *Mean values of observed traits of oilseed rape in four environments*

Cecha <i>Trait</i>	Rok <i>Year</i>	Borowo			Zielęcín			NIR _{0,05} <i>LSD_{0,05}</i>
		Gr1	Gr2	Gr3	Gr1	Gr2	Gr3	
Plon nasion <i>Seed yield</i>	2003	11,33	30,62	12,01	20,50	30,04	22,74	6,51
	2004	36,31	36,59	55,12	28,03	33,71	42,25	
Długość łuszczyń <i>Length of pod</i>	2003	7,81	8,57	8,01	7,29	7,97	7,49	0,52
	2004	7,72	8,24	7,81	7,71	8,36	7,80	
Liczba nasion w łuszczyń <i>Number of seeds per pod</i>	2003	15,61	24,82	20,07	20,53	23,84	22,15	2,38
	2004	21,23	24,48	26,24	19,84	23,44	22,45	
Masa tysiąca nasion <i>1000 seeds weight</i>	2003	5,52	4,31	5,31	4,95	4,73	5,04	0,36
	2004	5,21	4,66	4,27	5,45	5,07	5,40	
Początek kwitnienia <i>Beginning of flowering</i>	2003	124,60	118,70	124,30	122,90	121,30	123,50	1,52
	2004	122,60	120,60	118,90	123,00	122,80	121,50	
Długość kwitnienia <i>Length of flowering</i>	2003	15,54	18,45	17,04	16,54	16,50	17,29	1,26
	2004	23,21	20,85	24,92	15,93	16,80	14,83	
Zawartość tłuszczu <i>Oil content</i>	2003	43,63	46,11	43,79	46,12	46,11	46,37	0,99
	2004	46,02	47,05	47,78	44,74	45,93	44,68	
Zawartość kwasu — <i>Acid content:</i>								
– palmitynowy — <i>palmitic C_{16:0}</i>	2003	4,79	5,11	4,60	4,44	4,68	4,36	0,25
	2004	4,57	5,26	4,50	4,44	4,82	4,33	
– stearynowy — <i>stearic C_{18:0}</i>	2003	1,69	1,75	1,68	1,40	1,54	1,28	0,12
	2004	1,56	1,85	1,55	1,56	1,69	1,63	
– oleinowy — <i>oleic C_{18:1}</i>	2003	59,45	59,77	60,33	61,99	62,81	61,28	1,67
	2004	60,96	60,31	61,35	62,03	62,82	62,38	
– linolowy — <i>linoleic C_{18:2}</i>	2003	21,59	21,42	22,82	19,89	19,78	22,03	1,28
	2004	20,68	21,27	21,07	19,36	19,02	20,16	
– linolenowy — <i>linolenic C_{18:3}</i>	2003	10,87	10,56	9,14	10,49	9,73	9,28	0,53
	2004	10,96	10,13	10,15	10,94	10,27	10,05	
– eikozenowy — <i>eicosenoic C_{20:1}</i>	2003	1,31	1,11	1,24	1,15	0,87	0,90	0,20
	2004	1,27	1,15	1,35	1,50	1,24	1,42	
Zawartość glukonapiny <i>Gluconapin content</i>	2003	2,54	1,35	3,48	2,67	1,67	3,15	0,42
	2004	1,82	1,27	1,44	2,19	1,65	1,65	
Zawartość glukobrassicapiny <i>Glucobrassicapin content</i>	2003	0,85	0,34	0,80	0,79	0,26	0,70	0,17
	2004	0,55	0,26	0,34	0,68	0,31	0,44	
Zawartość progoitryny <i>Progoitrin content</i>	2003	4,26	3,79	7,41	3,65	3,83	5,86	0,94
	2004	3,22	3,06	3,19	4,09	3,87	4,00	
Zawartość 4-hydroksybrassicyny <i>4-hydroxybrassicin content</i>	2003	3,41	2,95	3,15	2,52	2,78	2,15	0,39
	2004	3,29	3,34	3,24	2,91	2,85	2,63	
Suma glukozynolanów <i>Total glucosinolates content</i>	2003	11,91	8,79	15,90	10,10	8,79	12,45	1,53
	2004	9,20	8,39	8,48	10,22	8,90	9,00	
Suma glukozynolanów alken. <i>Alkenyl glucosinolates content</i>	2003	8,28	5,71	12,55	7,48	5,97	10,18	1,46
	2004	5,74	4,91	5,12	7,21	5,96	6,27	

genetyczne i różnicowanie fenotypowe opisują różne aspekty (Kozak i in. 2011). Teklewold i Becker (2006) dokonali selekcji komponentów rodzicielskich do tworzenia mieszańców gorczycy abisyńskiej, charakteryzujących się wysokim efektem heterozji na podstawie dystansu genetycznego wyznaczonego za pomocą markerów molekularnych oraz dystansu fenotypowego uzyskanego na podstawie 14 cech fenotypowych. Yu i in. (2005) do przewidywania wielkości plenności i efektu heterozji mieszańców rzepaku typu Shaan2A zastosowali dystans genetyczny linii rodzicielskich, wyznaczony na podstawie polimorfizmu cech fenotypowych, izoenzymów, białek i markerów RAPD.

Wielowymiarowa analiza wariancji oraz oparta na niej analiza skupień z wykorzystaniem odległości Mahalanobisa została przeprowadzona na prezentowanym materiale badawczym w każdym środowisku niezależnie (ze względu na występowanie interakcji) i przedstawiona we wcześniejszej pracy autorów (Bocianowski i in. 2009). Uzyskane tam wyniki wskazują na istotne różnicowanie genotypów oraz różnicowanie ekspresji genotypów w miejscowościach i latach pod względem wszystkich cech traktowanych łącznie. Zastosowana metoda zmiennych kanonicznych ujawniła różne zachowanie obiektów w poszczególnych środowiskach (Bocianowski i in. 2009). Liersch (2005) stwierdziła korelację między odległością fenotypową (Mahalanobisa) i dystansem genetycznym. Wskazuje to na znaczenie oceny cech fenotypowych i genotypowych dla kwalifikacji genotypów do grup heterotycznych oraz przy wyborze form rodzicielskich do tworzenia mieszańców F_1 . Z przeprowadzonych badań wynika, że sama ocena zmienności fenotypowej może być niewystarczająca dla tworzenia odrębnych pul genetycznych. Natomiast może stanowić cenne uzupełnienie oceny zmienności genetycznej. Jak zaobserwował u rzepaku jarego Bocianowski i in. (2008) występują przypadki stwierdzenia istotnych statystycznie korelacji pomiędzy odległościami Mahalanobisa a specyficzną zdolnością kombinacyjną oraz efektami heterozji.

Podobnie Hu i in. (2007) zbadali zmienność 63 genotypów rzepaku ozimego pochodzących z Azji, Europy i Kanady na podstawie dziewięciu cech agronomicznych. Podział genotypów na odpowiednie klastry był zgodny z rodowodem i pochodzeniem geograficznym oraz wcześniej wykonanymi analizami zmienności genetycznej na poziomie DNA metodą RAPD.

Podsumowanie

Zróżnicowanie fenotypowe obiektów nie zawsze jest zgodne ze zróżnicowaniem genetycznym oszacowanym na podstawie markerów molekularnych. Wydaje się, że podczas selekcji komponentów linii rodzicielskich mieszańców F_1 najkorzystniejszym rozwiązaniem byłoby rozpatrywanie obu rodzajów zmienności.

Literatura

- Adams H., Vaughan J.G., Fenwick G.R. 1989. The use of glucosinolates for cultivar identification in swede, *Brassica napus* L. var. *napobrassica* (L.) peterm. J. Sci. Food Agric., 46 (3): 319-324.
- Benchimol L.L., de Souza Jr. C.L., Garcia A.A.F., Kono P.M.S., Mangolin C.A., Barbosa A.M.M., Coelho A.S.G., de Souza A.P. 2000. Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. Plant Breeding, 119 (6): 491-496.
- Betrán F.J., Ribaut J.M., Beck D., Gonzalez de León D. 2003. Genetic diversity, specific combining ability, and heterosis in tropical maize under stress and nonstress environments. Crop Science, 43: 797-806.
- Bocianowski J. 2012 a. A comparison of two methods to estimate additive-by-additive interaction of QTL effects by a simulation study. Journal of Theoretical Biology, 308: 20-24.
- Bocianowski J. 2012 b. Analytical and numerical comparisons of two methods of estimation of additive \times additive interaction of QTL effects. Scientia Agricola, 69 (4): 240-246.
- Bocianowski J. 2012 c. The use of weighted multiple linear regression to estimate QTL-by-QTL epistatic effects. Genetics and Molecular Biology, 35 (4): 802-809.
- Bocianowski J., Chelkowski J., Kuczyńska A., Wiśniewska H., Surma M., Adamski T. 2003. Assessment of RAPD markers for barley doubled haploid lines resistant and susceptible to *Fusarium culmorum* at seedling and adult plant growth stages. J. of Applied Genetics, 44 (3): 355-360.
- Bocianowski J., Goszczurna T. 2011. Czy zróżnicowanie na poziomie genotypowym determinuje zróżnicowanie na poziomie fenotypowym linii podwojonych haploidów jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)? Nauka Przyroda Technologie, 5 (6): #120.
- Bocianowski J., Liersch A., Bartkowiak-Broda I. 2009. Badanie zmienności fenotypowej mieszańców F₁ CMS *ogura* rzepaku ozimego i ich form rodzicielskich za pomocą statystycznych metod wielowymiarowych. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXX (2): 161-184.
- Bocianowski J., Luczkiewicz T., Kozak M., Brzeskwiniowicz H. 2008. Does genetic distance of parental forms effect specific combining ability and heterosis effects in F₁ and F₂ of spring rape diallel cross? Agriculturae Conspectus Scientificus, 73 (4): 211-215.
- Fabrizius M.A., Busch R.H., Khan K., Huckle L. 1998. Genetic diversity and heterosis of spring wheat crosses. Crop Science, 38 (4): 1108-1112.
- Hu S., Yu C., Zhao H., Sun G., Zhao S., Vyvadilova M., Kucera V. 2007. Genetic diversity of *Brassica napus* L. germplasm from China and Europe assessed by some agronomically important characters. Euphytica, 154: 9-16.
- Kantety R.V., Zeng X., Bennetzen J.L., Zehr B.E. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding, 1 (4): 365-373.
- Kozak M., Bocianowski J., Liersch A., Tartanus M., Bartkowiak-Broda I., Piotto F.A., Azevedo R.A. 2011. Genetic divergence is not the same as phenotypic divergence. Molecular Breeding, 28: 277-280.
- Krajewski P., Bocianowski J., Gawłowska M., Kaczmarek Z., Pniewski T., Święcicki W., Wolko B. 2012. QTL for yield componenets and protein content: a multienviroment study of two pea (*Pisum sativum* L.) populations. Euphytica, 183: 323-336.
- Krystkowiak K., Adamski T., Surma M., Kaczmarek Z. 2009. Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the specific combining ability and heterosis effects in wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica, 165: 419-434.
- Krzymański J. 1970. Genetyczne możliwości ulepszania składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 14 (2): 95-133.

- Lefort-Buson M., Hebert Y., Damerval C. 1988. Les outils d' évaluation de la diversité génétique et phénotypique. *Agronomie*, 8 (3): 173-178.
- Liersch A. 2005. Wpływ zmienności genetycznej na efekt heterozji u rzepaku ozimego (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). Praca doktorska. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Poznań.
- Liersch A., Bocianowski J., Kozak M., Bartkowiak-Broda I. 2013. Genetic similarity assessment of CMS *ogura* F₁ hybrids of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) parental lines by isozymes, RAPD and AFLP markers. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, w przygotowaniu do druku.
- Liersch A., Bocianowski J., Ogrodowczyk M., Bartkowiak-Broda I. 2009. The relationship between different types of markers and fatty acid composition of parental lines of F₁ CMS *ogura* hybrids of winter oilseed rape (*B. napus* L.). W: Naganowska B., Kachlicki P., Krajewski P. (red.). *Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych*. Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. *Rozprawy i Monografie*, 18: 247-254.
- Melchinger A.E. 1999. Genetic diversity and heterosis. In: Coors J.G., Pandey S. (eds.). *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, 99-118.
- Melchinger A.E., Lee M., Lamkey K.R., Hallauer A.R., Woodman W.L. 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. *Theor. Appl. Genet.*, 80 (4): 488-496.
- Messmer M.M., Melchinger A.E., Boppenmaier J., Brunklaus-Jung E., Herrmann R.G. 1992. Relationships among early European maize inbreds: I. Genetic diversity among flint and dent lines revealed by RFLPs. *Crop Science*, 32 (6): 1301-1309.
- Moll R.H., Lonquist J.H., Vélez Fortuno J., Johnson E.C. 1965. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics*, 52 (1): 139-144.
- Nei M., Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269-5273.
- Payne R., Murrey D., Harding S., Baird D., Soutou D., Lane P. 2003. *GenStat for Windows – Introduction*, 7th edition. VSN International, Oxford, England.
- PN-EN ISO 5508:1996 — Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- PN ISO 9167-1:1999 — Nasiona rzepaku. Oznaczanie zawartości glukozyolanów. Metoda z zastosowaniem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej.
- Riaz A., Li G., Quresh Z., Swati M.S., Quiros C.F. 2001. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding*, 120 (5): 411-415.
- Shamsuddin A.K.M. 1985. Genetic diversity in relation to heterosis and combining ability in spring wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 70 (3): 306-308.
- Snowdon R.J., Friedt W. 2004. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 123: 1-8.
- Teklewold A., Becker H.C. 2006. Comparison of phenotypic and molecular distances to predict heterosis and F₁ performance in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun). *Theor. Appl. Genet.*, 112: 752-759.
- Xiao J., Li J., Yuan L., McCouch S.R., Tanksley S.D. 1996. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.*, 92 (6): 637-643.
- Yu C.Y., Hu S.W., Zhao H.X., Guo A.G. 2005. Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 110: 511-518.