

OCENA ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO LINII KUKURYDZY PRZYDATNYCH DO HODOWLI MIESZAŃCÓW HETEROZYJNYCH PRZY UŻYCIU MARKERÓW MOLEKULARNYCH AFLP I RAPD

Agnieszka Tomkowiak¹, Zbigniew Broda¹, Józef Adamczyk²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

² Hodowla Roślin Smolice

Streszczenie. W ostatnich latach w nowoczesnych programach hodowlanych wykorzystuje się tradycyjne metody hodowli w połączeniu z technikami molekularnymi. Daje to możliwość wprowadzenia bardziej obiektywnych kryteriów selekcji i doboru materiału rodzicielskiego, pozwala również w sposób znaczący skrócić czas niezbędny do wyhodowania nowej odmiany. Doświadczenie przeprowadzono w 2006 roku w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym w Dłoni (51° N; 17° E), należącym do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Celem badań była próba wykazania zależności efektu heterozji mieszańców pokolenia F₁ kukurydzy od dystansu genetycznego na poziomie molekularnym pomiędzy komponentami rodzicielskimi, z uwzględnieniem pochodzenia tych komponentów. Wykazanie powyższych zależności pozwoliłoby na wybór form rodzicielskich biorących udział w tworzeniu nowej odmiany, zmniejszając znacznie zakres – liczbę linii testowanych w warunkach polowych, a tym samym znacznie skróciłoby cykl hodowlany i co ważniejsze pomniejszyły koszty hodowli. Markery molekularne AFLP i RAPD mogą być użyteczne w wyborze komponentów rodzicielskich do krzyżowań dla kukurydzy przy jednoczesnym uwzględnieniu pochodzenia tych komponentów.

Słowa kluczowe: AFLP, dystans genetyczny, heterozja, kukurydza, markery molekularne, RAPD

WSTĘP

Kukurydzę (*Zea mays* L.) zalicza się do jednych z najbardziej wydajnych roślin zbożowych, jest uprawiana na znacznych obszarach [Dubas 1999]. Również w naszym kraju kukurydza jest obecnie jedną z podstawowych roślin uprawnych niezależnie od kierunku użytkowania. Na wysokość i jakość zebranego plonu kukurydzy wpływają

czynniki: agrotechniczne, warunki klimatyczne oraz dobór odpowiedniej odmiany [Adamczyk 2001].

Kukurydza odznacza się wszechstronnością użytkowania i jest wykorzystywana między innymi na cele pastewne, spożywcze oraz przemysłowe. Postęp hodowlany, wyrażający się otrzymaniem odmian mieszańcowych, plennych, o krótszym okresie wegetacji i mniejszych wymaganiach termicznych, spowodował, że wzrosło zainteresowanie uprawą kukurydzy w krajach Europy Środkowej, w tym również w Polsce [Dubas 1999]. Kukurydza nie ma dużych wymagań glebowych, może wysoko plonować zarówno na glebach pszenno-buraczanych, jak i żytnich, klasy IV b. Na glebach lekkich, poza kulturą, duży wpływ na plonowanie ma częstotliwość nawożenia obornikiem w zmianowaniu [Sulewska 2004].

Na poziom i strukturę plonowania kukurydzy duży wpływ mają: temperatura i opady. Wskazują na to w swoich pracach między innymi: Michalski [1980], Machul i Małyśiak [1983], Machul [1988], Szwejkowski i in. [1991], Machul i Małyśiak [1993], Michalski [1997]. Według niektórych badaczy najważniejszym czynnikiem plonotwórczym na glebach lekkich są opady w lipcu i sierpniu [Michalski 1990].

Obecnie hodowla kukurydzy opiera się na wykorzystaniu zjawiska heterozji mieszańców powstałych po skrzyżowaniu dwóch linii wsobnych [Kuriata i Topolski 2003]. Metodę tą zapoczątkował w pierwszych latach XX wieku Shull [1948], [Ruebenbauer 1964]. Nowoczesne rolnictwo oraz sektory produkcji z nim związane stawiają wysokie wymagania mieszańcom kukurydzy [Michalski 1997].

Uzyskanie wysokoplennych mieszańców kukurydzy charakteryzujących się dobrą jakością zależy od odpowiednio dobranych linii wsobnych o bardzo dobrej zdolności kombinacyjnej. Posiadanie dobrych linii wsobnych ma zasadnicze znaczenie zarówno dla uzyskania dużego efektu heterozji w mieszańcach, jak również dla tworzenia nowych, jeszcze lepszych linii kolejnego cyklu chowu wsobnego i możliwości wyboru dobrych testerów do ich selekcji. Zjawiska heterozji (bujności pokolenia F_1) nie udało się wyjaśnić mimo powstania licznych hipotez mających na celu przybliżenie tego zagadnienia, np. hipotezy naddominacji i dominacji. W świetle tych faktów ocena zdolności kombinacyjnej linii wsobnych i decyzja związana z doбором testerów oraz właściwa interpretacja wyników stają się jednymi z ważniejszych decyzji hodowlanych [Kuriata i Topolski 2003].

Coraz częściej w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wyselekcjonowania kombinacji mieszańcowych, które wykazywałyby wysoki efekt heterozji, próbuje się wybierać formy rodzicielskie w oparciu o dystans genetyczny pomiędzy nimi, określane poprzez polimorfizm markerów DNA.

Wielu autorów uważa, że zjawisko heterozji jest związane z genetycznym dystansem pomiędzy liniami rodzicielskimi.

Celem badań była ocena efektu heterozji mieszańców F_1 kukurydzy otrzymanych z linii o różnicowanym podobieństwie genetycznym oraz zbadanie zależności efektu heterozji od dystansu genetycznego.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie założono w 2006 roku w układzie bloków losowanych kompletnych, w trzech powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 10 m² w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym w Dłoni (51° N; 17° E), należącym do Uniwersytetu Przyrodni-

czego w Poznaniu. Doświadczenie założono na glebie kompleksu pszennego dobrego, klasy bonitacyjnej IV b. Przedplonem była pszenica ozima. Zabiegi uprawowe wykonano zgodnie z zasadami poprawnej agrotechniki dla tego gatunku i z kierunkiem użytkowania.

Materiałem badawczym było 10 mieszańców kukurydzy wraz z komponentami rodzicielskimi udostępnionymi przez Hodowlę Roślin Smolice Sp. z o.o. (tab.1).

Tabela 1. Linie rodzicielskie i mieszańce F₁
Table 1. Hybrids F₁ and their parental lines

Lp.	Linie mateczne – Maternal lines	Linie ojcowskie – Paternal lines	Mieszańce F ₁ – Hybrids F ₁
1	S160	S336A	S160 x S336A
2	S41336	S41324A-2	S41336 x S41324A-2
3	S50668-4	S56125A	S50668-4 x S56125A
4	S56122	S56125A	S56122 x S56125A
5	S245	S41789	S245 x S41789
6	S311	Co255	S311 x Co255
7	S63300	S66208A	S63300 x S66208A
8	S41796	S41324A-2	BLASK
9	S41789	S41324A-2	GROM
10	S56125A	S41324A-2	BRDA

Pomiary biometryczne wykonane w drugiej połowie listopada obejmowały: długość i średnicę kolby, długość i średnicę rdzenia, ilość rzędów, ilość ziarniaków w rzędzie, masę ziarna z kolby, masę tysiąca nasion (MTN) oraz plon ziarna. Pomiary przeprowadzano na 10 losowo wybranych kolbach z trzech powtórzeń każdego z linii rodzicielskich oraz form mieszańcowych.

Otrzymywanie markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Genomowy DNA z form mieszańcowych oraz komponentów rodzicielskich kukurydzy 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 12,5 µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana, 1 M Tris HCl o pH 8,3, 25 mM MgCl₂, BSA, 2 mM dNTP, starter – 5 pmoli·µl⁻¹, Taq polimeraza – 5 U·µl⁻¹, ekstrakt DNA – 25 ng·µl⁻¹. Taq polimeraza pochodziła z firmy MBI-Fermentas, pozostałe odczynniki – z firmy SIGMA.

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

Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym o składzie: 1,5 g agarozy, 100 ml buforu TBE1x (10,8 g Tris base, 5,5 g Boric acid, 4 ml 0,5M EDTA pH 8,0), 1 µl bromku etydyyny.

Startery oraz ich sekwencje nukleotydowe dające polimorfizm zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Startery i ich sekwencje nukleotydowe dające polimorfizm
 Table 2. Sequences of primers detecting polymorphis

Numer startera – Primers no.	Sekwencja nukleotydowa – Sequences 5' – 3' of Primers
OPA 04	5' AATCGGGCTG 3'
OPA 07	5' GAAACGGGTG 3'
OPA 10	5' GTGATCGCAG 3'
OPA 14	5' TCTGTGCTGG 3'
OPB 04	5' GGA CTGGAGT 3'
OPB 17	5' AGGGAACGAG 3'
OPF 12	5' ACGGTACCAG 3'
OPG 12	5' CAGCTACGA 3'
OPH 20	5' GGGAGACATC 3'
OPJ 08	5' CATACCGTGG 3'

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 tkanke roślinną na proszek. Do każdej probówki dodano 400 µl buforu AP1 oraz 3 µl RNAzy. Następnie inkubowano próby przez 30 minut w temperaturze pokojowej i 30 minut w 65°C. Po inkubacji dodano 130 µl buforu AP2 i mieszano na vortexie. Następnie próby umieszczono w lodzie i po 15 minutach wirowano przez 20 minut w 14000 obrotów. Po zwirowaniu zebrano supernatant i naniesiono na kolumnki, do których dodano 60 µl buforu AP3. Próby wirowano przez 2 minuty w 8000 obrotów, a następnie dodano 450 µl buforu AW i 50 µl buforu AE. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Trawienie DNA przeprowadzono przy użyciu enzymów restrykcyjnych EcoRI i MseI oraz 5x read buffor o składzie 50 mM Tris HCL (pH 7,5), 50 mM Mg-acetate, 250 mM K-acetate. Do strawionego DNA dodano 24 µl adapter ligation solution i 1 µl T4DNA ligazy oraz inkubowano próby w temperaturze 20°C przez 3 h. Do mieszaniny po ligacji dodano 90 µl buforu TE o składzie 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA. Pre-amplifikację przeprowadzono przy użyciu termocyklera T3 BIOMETRA firmy Polygen. Do rozcieńczonej matrycy DNA po ligacji dodano 40 µl pre-amp primer mix, 3,5 µl 10x PCR buffor o składzie 200 mM Tris HCl (pH 8,4), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl oraz 15 µl MgCl₂ a także 1 µl Taq polimerazy (5U·µl⁻¹). Do rozcieńczonej matrycy po pre-amplifikacji dodano MIX1 (startery i dNTP) oraz MIX2 (Taq polimeraza, 10x PCR buffor i MgCl₂). Po zakończeniu reakcji PCR próby mrożono w temperaturze -20°C. Elektroforezę przeprowadzono w 5% żelu akrylamidowym przez 2,5 h przy 60 W, 400 mA i 1400 V. Detekcja produktów PCR nastąpiła w wyniku barwienia srebrnym.

Startery oraz ich sekwencje nukleotydowe dające polimorfizm zamieszczono w tabeli 3.

Analiza umożliwiająca określenie podobieństwa pomiędzy odmianami w formie dendrogramu została sporządzona przy użyciu programu komputerowego UVIMAP w funkcji Nei and Li [1979]:

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

gdzie:

- $2n_{xy}$ – liczba par podobnych prążków w obu genotypach,
 n_x, n_y – liczba wszystkich prążków dla danego genotypu,
wartość GS – indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami.

Tabela 3. Startery i ich sekwencje nukleotydowe dające polimorfizm

Table 3. Sequences of primers detecting polymorphis

Numer startera – Primers no.	Sekwencja nukleotydowa – Sequences 5' – 3' of Primers
E-AAC	5' E-GACTGCGTACCAATTCAAC 3'
M-CAC	5' M-GATGAGTCCTGAGTAACAC 3'
E-ACG	5' E-GACTGCGTACCAATTCACG 3'
M-CAC	5' M-GATGAGTCCTGAGTAACAC 3'
E-ACC	5' E-GACTGCGTACCAATTCACC 3'
M-CAG	5' M-GATGAGTCCTGAGTAACAG 3'
E-AGG	5' E-GACTGCGTACCAATTCAGG 3'
M-CAG	5' M-GATGAGTCCTGAGTAACAG 3'
E-AAC	5' E-GACTGCGTACCAATTCAAC 3'
M-CTCT	5' M-GATGAGTCCTGAGTAACCTCT 3'

Efekt heterozji dla poszczególnych cech struktury plonu mieszańców obliczono względem lepszego z rodziców i względem średniej cechy obojga rodziców.

Istotność obliczonych efektów heterozji sprawdzano testem Scheffego, korzystając z programu statystycznego DGH 2.

Korelacje pomiędzy podobieństwem genetycznym a efektem heterozji obliczono przy pomocy programu Statistica. Istotność współczynników korelacji pomiędzy efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu a dystansem genetycznym określano na poziomie $\alpha = 0,05$.

WYNIKI

Dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańców F_1 kukurydzy wyznaczony na podstawie markerów molekularnych RAPD i AFLP

Dla markerów RAPD 10 wyselekcjonowanych starterów wygenerowało 72 prążki polimorficzne, jeden starter generował średnio od 3 do 9 prążków różnicujących linie rodzicielskie (tab. 4). Najbardziej efektywnym i najsilniej różnicującym badane genotypy był starter OPA 14 (9 prążków polimorficznych). Pięć wyselekcjonowanych kombinacji starterów w przypadku markerów molekularnych AFLP wygenerowało 56 prążków polimorficznych. Jedna kombinacja starterów generowała średnio od 5 do 16 prążków różnicujących (tab. 5). Największy polimorfizm uzyskano z zastosowaniem kombinacji starterów E-ACG, M-CAC (16 prążków polimorficznych). Wartość dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańców F_1 kukurydzy – określonego za pomocą markerów RAPD – mieściła się w zakresie od 64% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca S 50668-4 X S 56125 A do 93% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańców S 311 X S CO 255 i GROM (tab. 6). Markery molekularne AFLP pozwoliły na określenie dystansu genetycznego, który mieścił się w zakresie od 78% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca BLASK do 96% pomiędzy liniami rodzicielskimi mieszańca BRDA (tab. 6).

Tabela 4. Startery dające polimorfizm w liniach kukurydzy przy użyciu markerów RAPD – PCR
 Table 4. Primers detecting polymorphism of corn lines with the use of RAPD – PCR markers

Numer startera Primers no.	Liczba fragmentów DNA Number of DNA fragments	Liczba fragmentów polimorficznych Number of polymorphic fragments
OPA 04	9	8
OPA 07	9	6
OPA 10	10	7
OPA 14	10	9
OPB 04	12	8
OPB 17	12	8
OPF 12	10	8
OPG 12	5	3
OPH 20	9	8
OPJ 08	9	7

Tabela 5. Startery dające polimorfizm w liniach kukurydzy przy użyciu markerów AFLP
 Table 5. Primers detecting polymorphism of corn lines with the use of AFLP markers

Numer startera Primers no.	Liczba fragmentów DNA Number of DNA fragments	Liczba fragmentów polimorficznych Number of polymorphic fragments
E-AAC M-CAC	16	12
E-ACG M-CAC	25	16
E-ACC M-CAG	15	11
E-AGG M-CAG	15	12
E-AAC M-CTCT	9	5

Tabela 6. Dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskim mieszańców F₁
 Table 6. Genetic distance between parental lines of hybrids F₁

Mieszańce F ₁ Hybrids F ₁	Linie rodzicielskie – Parental lines		Dystans genetyczny – Genetic distance	
	mateczna – maternal	ojcowska – paternal	RAPD, %	AFLP, %
S 160 X S 336A	S 160	S 336A	91	92
S 41336 X S 41324A-2	S 41336	S 41324A-2	76	86
S 50668-4 X S 56125A	S 50668-4	S 56125A	64	83
S 56122 X S 56125A	S 56122	S 56125A	73	89
S 245 X S 41789	S 245	S 41789	78	90
S 311 X CO 255	S 311	Co255	93	90
S 63300 X S 66208A	S 63300	S 66208A	78	89
BLASK	S 41796	S 41324A-2	91	78
GROM	S 41789	S 41324A-2	93	92
BRDA	S 56125A	S 41324A-2	89	96

Efekt heterozji cech struktury plonu mieszańców F₁ obliczony względem średniej wartości cechy lepszego z rodziców

Najwyższy efekt heterozji pod względem analizowanych cech struktury plonu zaobserwowano u mieszańców: S160XS336A, S245XS41789, GROM oraz BRDA (tab. 7). Istotnie przewyższały one linie rodzicielskie wartościami wszystkich analizowanych cech plonotwórczych oraz samego plonu ziarna. Na szczególną uwagę zasługują obie odmiany, czyli mieszańiec BRDA, w przypadku którego efekt heterozji wahał się od 143% dla średnicy rdzenia kolby do 327% dla masy ziarna z kolby, oraz mieszańiec GROM, dla którego efekt heterozji mieścił się w zakresie od 122% dla średnicy rdzenia kolby do 288% dla masy ziarna z kolby. Najslabiej plonującymi mieszańcami były: S50668-4XS56125A – nie wykazywał efektu heterozji dla plonu ziarna i następujących cech: średnicy kolby, długości rdzenia kolby, średnicy rdzenia kolby, liczby rzędów ziarniaków, MTN oraz mieszańiec BLASK, u którego heterozja nie wystąpiła dla średnicy kolby, długości rdzenia kolby, średnicy rdzenia kolby, liczby rzędów ziarniaków i MTN.

Tabela 7. Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu oraz plonu mieszańców
Table 7. Heterosis effect for hybrid yield and its components

Mieszańce F ₁ Hybrids F ₁	Długość kolby Ear length	Średnica kolby Ear diameter	Długość rdzenia Cob length	Średnica rdzenia Cob diameter	Liczba rzędów Number of rows	Liczba ziarniaków w rzędzie Number of kernels per row	Masa ziarna z kolby Weight of kernels per ear	MTN TKW	Plon Yield
S 160 X S 336A	150*	146*	144*	118*	125*	187*	279*	129*	117*
S 41336 X S 41324A-2	112*	112*	116*	89	112*	138*	246*	100	109*
S 50668-4 X S 56125A	101	100	100	88	85	125*	200*	85	97
S 56122 X S 56125A	120*	113*	120*	99	115*	174*	277*	103	98
S 245 X S 41789	144*	125*	138*	117*	119*	178*	263*	108*	111*
S 311 X CO 255	125*	118*	137*	104*	113*	159*	235*	112*	118*
S 63300 X S 66208A	126*	108*	125	98	116*	160*	199*	104	153*
BLASK	112*	97	94	63	93	129*	211*	84*	116*
GROM	158*	144*	151*	122*	140*	190*	288*	135*	127*
BRDA	176*	169*	170*	143*	156*	205*	327*	160*	172*

* istotny przy $\alpha = 0,05$ – significant at $\alpha = 0.05$

Efekt heterozji cech struktury plonu mieszańców F₁ obliczony względem średniej wartości cechy obu komponentów rodzicielskich

Największy wigor pod względem analizowanych cech struktury plonu zaobserwowano u mieszańców: S160XS336A, S245XS41789, GROM oraz BRDA (tab. 8). Przewyższały one istotnie linie rodzicielskie zarówno pod względem wszystkich analizowanych cech plonotwórczych, jak również samego plonu ziarna. Spośród nich najwyżej ocenić można obie odmiany, czyli mieszańca BRDA, w przypadku którego efekt heterozji wahał się od 150% dla średnicy rdzenia kolby do 350% dla masy ziarna z kolby, oraz mieszańca GROM, dla którego efekt heterozji mieścił się w zakresie od 130% dla średnicy rdzenia kolby do 319% dla masy ziarna z kolby. Najslabiej plonującymi mieszańcami były: S50668-4XS56125A, nie wykazujący efektu heterozji dla następujących cech: średnicy rdzenia kolby, liczby rzędów ziarniaków i MTN, oraz mieszańiec

BLASK, u którego heterozja nie wystąpiła dla: średnicy kolby, długości rdzenia kolby, średnicy rdzenia kolby, ilości rzędów ziarniaków i MTN.

Tabela 8. Wielkość efektu heterozji poszczególnych cech struktury plonu oraz plonu mieszańców
Table 8. Heterosis effect for hybrid yield and its components

Mieszańce F ₁ Hybrids F ₁	Długość kolby Ear length	Średnica kolby Ear diameter	Długość rdzenia Cob length	Średnica rdzenia Cob diameter	Liczba rzędów Number of rows	Liczba ziarniaków w rzędzie Number of kernels per row	Masa ziarna z kolby Weight of kernels per ear	MTN TKW	Plon Yield
S 160 X S 336A	152*	148*	147*	120*	128*	195*	298*	141*	134*
S 41336 X S 41324A-2	113*	115*	119*	93	130*	145*	254*	104*	116
S 50668-4 X S 56125A	103	103	101	90	97	140*	250*	94	105*
S 56122 X S 56125A	123*	116*	122*	102	110*	150*	230*	106*	100
S 245 X S 41789	148*	128*	142*	119*	122*	181*	290*	114*	116*
S 311 X CO 255	128*	121*	138*	106*	116*	164*	251*	110*	108*
S 63300 X S 66208A	135*	111*	134*	103	180*	162*	215*	111*	154*
BLASK	112*	99	94	65	100	141*	221*	85	119*
GROM	159*	148*	153*	130*	142*	195*	319*	141*	134*
BRDA	179*	171*	173*	150*	159*	217*	350*	162*	177*

* istotny przy $\alpha = 0,05$ – significant at $\alpha = 0,05$

Korelacje dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi z efektem heterozji cech struktury plonu mieszańców F₁, obliczonym względem średniej wartości cechy lepszego z rodziców

Współczynnik korelacji dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi, określonego na podstawie markerów molekularnych AFLP z efektem heterozji mieszańców, wykazywał wysoki stopień istotności na poziomie $\alpha = 0,05$ dla wszystkich analizowanych cech struktury plonu z wyjątkiem samego plonu ziarna (tab. 9). Najwyżej skorelowany z dystansem genetycznym był efekt heterozji dotyczący średnicy rdzenia, gdzie współczynnik korelacji wynosił $r = 0,96$, najniżej skorelowany był efekt heterozji dla plonu ziarna ($r = 0,54$). W przypadku dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi – określonego na podstawie markerów molekularnych RAPD – nie stwierdzono istotnych korelacji z efektem heterozji mieszańców w odniesieniu do wszystkich analizowanych cech struktury plonu. Najwyżej skorelowany był efekt heterozji dla długości kolby ($r = 0,58$), a najniżej – dla średnicy rdzenia kolby ($r = 0,31$).

Korelacje dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi z efektem heterozji cech struktury plonu mieszańców F₁, obliczonym względem średniej wartości cechy linii rodzicielskich

W przypadku dystansu genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi, określonego na podstawie markerów molekularnych AFLP, stwierdzono, że jest on istotnie skorelowany z efektem heterozji dla wszystkich analizowanych cech struktury plonu z wyjątkiem samego plonu ziarna (tab. 10). Najwyższy współczynnik korelacji uzyskano dla długości rdzenia kolby i średnicy rdzenia kolby ($r = 0,96$), a najniższy – dla plonu ziarna ($r = 0,54$). Dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskimi – określony na podstawie markerów molekularnych RAPD – nie był istotnie skorelowany z efektem hete-

rozi w odniesieniu do wszystkich analizowanych cech struktury plonu. Najwyższy współczynnik korelacji stwierdzono dla ilości ziarniaków w rzędzie ($r = 0,56$), a najniższy – dla średnicy rdzenia kolby ($r = 0,32$).

Tabela 9. Korelacje dystansu genetycznego z efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu oraz plonu mieszańców

Table 9. Correlations between genetic distance and heterosis effect for hybrid yield and its components

Korelacje Correlations	Cecha – Character								MTN TKW	Plon Yield
	typ markera type of marker	długość kolby ear length	średnica kolby ear diameter	długość rdzenia cob length	średnica rdzenia cob diameter	liczba rzędów number of rows	liczba ziarniaków w rzędzie number of kernels per row	masa ziarna z kolby weight of kernels per ear		
Współczynnik korelacji dystansu genetycznego z efektem heterozji Correlation coefficient of genetic similarity with heterosis effect	AFLP	0,84*	0,86*	0,95*	0,96*	0,89*	0,92*	0,78*	0,89*	0,54*
	RAPD	0,58	0,52	0,52	0,31	0,51	0,46	0,40	0,55	0,43

* istotny przy $\alpha = 0,05$ – significant at $\alpha = 0.05$

Tabela 10. Korelacje dystansu genetycznego z efektem heterozji poszczególnych cech struktury plonu oraz plonu mieszańców

Table 10. Correlations between genetic distance and heterosis effect for hybrid yield and its components

Korelacje Correlations	Cecha – Character								MTN TKW	Plon Yield
	typ markera type of marker	długość kolby ear length	średnica kolby ear diameter	długość rdzenia cob length	średnica rdzenia cob diameter	liczba rzędów number of rows	liczba ziarniaków w rzędzie number of kernels per row	masa ziarna z kolby weight of kernels per ear		
Współczynnik korelacji dystansu genetycznego z efektem heterozji Correlation coefficient of genetic similarity with heterosis effect	AFLP	0,86*	0,87*	0,96*	0,96*	0,42	0,86*	0,73*	0,90*	0,54
	RAPD	0,55	0,52	0,48	0,32	0,46	0,56	0,41	0,49	0,38

* istotny przy $\alpha = 0,05$ – significant at $\alpha = 0.05$

DYSKUSJA

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.

Markery molekularne dziedziczą się zgodnie z genetyką mendelowską i nie podlegają modyfikującemu wpływowi czynników środowiska, a więc są użyteczne w badaniach i manipulacji cechami użytkowymi oraz pozwalają na dokładną analizę genomu. Wzory prążkowe charakterystyczne dla poszczególnych roślin mogą być wykorzystywane podobnie jak pewne cechy morfologiczne [Grzebelus i Barański 1996]

Najpowszechniej stosowanymi technikami służącymi do otrzymywania markerów molekularnych są metody wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy DNA (PCR – Polymerase Chain Reaction), do najczęściej wykorzystywanych zalicza się: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AP – PCR (Arbitrarily Primed PCR) i DAF (DNA Amplification Fingerprinting). Wchodzą one w skład grupy markerów MAAP (Multiple Arbitrary Amplificon Profiling). Łańcuchową reakcję polimerazy wykorzystuje się również przy analizie sekwencji mikrosatelitarnych wykonywanej techniką STMS (Sequence Tagged Microsatellite Sites), jak również w celu uzyskania markerów AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Jedną z najstarszych jest pochodząca z lat siedemdziesiątych technika RFLP (Restriktion Fragment Length Polymorphism).

W badaniach własnych zastosowano dwa typy markerów molekularnych: RAPD i AFLP. Markery RAPD zaczęto stosować na początku lat 90. Wykorzystują one reakcję PCR (Polymerase Chain Reaction) do generowania prążków. Wykazują dominujący charakter dziedziczenia, co uniemożliwia odróżnienie homozygot od heterozygot. Używane 9-11-nukleotydowe startery przyłączają się losowo, zapoczątkowując amplifikację w wielu rejonach genomu jednocześnie. Produkty reakcji amplifikacji rozdzielane są na żelu agarozowym, a ich detekcja odbywa się z użyciem znaczników fluorescencyjnych lub srebra. Technika AFLP opatentowana w 1993 roku łączy trawienie enzymami restrykcyjnymi z reakcją PCR. Obydwa enzymy generują tzw. lepkie końce, do których przyłączają się 20-30-nukleotydowe fragmenty, zwane adaptorami. Połączenie jest możliwe dzięki T4 DNA ligazie. Po ligacji adaptorów wykonuje się reakcję pre-amplifikację, po której prowadzi się amplifikację specyficzną. Rozdział produktów PCR następuje na żelu poliakrylamidowym, a detekcja – poprzez barwienie srebrem lub autoradiograficznie. Markery te wykazują szeroki polimorfizm, niekiedy możliwe jest rozróżnienie homo- i heterozygot poprzez ocenę intensywności prążka. Nie zaleca się jednak tej techniki dla markerów dziedziczonych na zasadzie kodominacji.

Badania wykazały, że podobieństwo genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi poszczególnych mieszańców – określone za pomocą markerów AFLP – mieści się w zakresie od 7% dla mieszańca 6 i mieszańca GROM do 36% dla mieszańca 3. Wartość podobieństwa genetycznego – określonego za pomocą markerów RAPD – mieści się w zakresie od 4% dla mieszańca BRDA do 22% dla mieszańca BLASK. Obecny stan badań nie pozwala na jednoznaczne stwierdzenie, czy dystans genetyczny może być podstawą do wnioskowania o efekcie heterozji. Wigor mieszańców F_1 wykorzystuje się do tworzenia odmian heterozyjnych, jednak zjawisko heterozji i jej mechanizmy nie są do końca wyjaśnione. Na podstawie badań wykazano, że podobieństwo genetyczne

określone na podstawie markerów RAPD nie koreluje z efektem heterozji u form mieszańcowych w przeciwieństwie do podobieństwa określonego na podstawie markerów AFLP, które jest istotnie skorelowane z efektem heterozji mieszańców F_1 . Wykorzystując markery AFLP stwierdzono, że im formy rodzicielskie są bardziej spokrewnione, tym efekt heterozji u form mieszańcowych jest mniejszy.

Dobór odpowiednich linii wsobnych jest zasadniczym elementem w hodowli heterozyjnej. Liczebność linii włączonych do formuły zarejestrowanych mieszańców kukurydzy wyraża się w setkach, a nawet w tysiącach, z czego tylko kilkanaście odegrało rolę znaczącą [Adamczyk 1998].

Pierwsze próby skorelowania oszacowanego dystansu genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi z efektem heterozji podjęto już w 1966 r. [Cross 1966].

Song i Messing [2003] wyizolowali określony obszar genomu dwóch krzyżowanych ze sobą linii wsobnych kukurydzy, który następnie zsekwencjonowali i zmapowali. Stwierdzili, że wielkość tego obszaru i obecność w nim genów z danej rodziny genowej były istotnie różne. Geny obecne w jednej linii, nie występowały w drugiej, mimo że w tej drugiej linii były widoczne fenotypowe objawy ich ekspresji. Jest to dowód na to, że geny z tej samej rodziny genowej, wywołujące podobne efekty fenotypowe, były ulokowane w innych partiach genomu w każdej z badanych linii. Zdaniem Songa i Mesinga heterozja może więc być następstwem różnic w strukturze genomu, zwłaszcza w dystrybucji i obecności pewnych genów z danej rodziny genowej w krzyżowanych ze sobą liniach wsobnych.

Problem dystansu genetycznego, pokrewieństwa i zjawiska heterozji podejmowany był wielokrotnie w badaniach: Ajmone Marsana i in. [1998], Boppenmaiera i in. [1993], Charcosseta i Essioux [1994] oraz Dubreuilu i in. [1996].

Zgodnie z teoriami dotyczącymi uwarunkowań genetycznych, zjawisko heterozji jest wynikiem współdziałania genów dominujących (hipoteza dominacji) lub w obrębie heterozygotycznych loci (hipoteza naddominowania) [Pala 2002]. Dlatego też poszukuje się związku dystansu genetycznego z efektem heterozji wyrażającym się w plonie.

Dotychczas opublikowane wyniki nie rozstrzygnęły, czy podobieństwo genetyczne lub pokrewieństwo mogą być podstawą do wnioskowania o efekcie heterozji. Zjawisko heterozji i jej mechanizmy są problemem od strony genetycznej mało poznanym, lecz aktualnym i ważnym dla metodologii hodowli roślin. Postęp hodowlany w istocie będzie efektywny poprzez badania genomu jądrowego, plazmonu i ich współzależności oraz interakcji ze środowiskiem.

Godshalk i in. [1990] wykazali brak związku pomiędzy plonem mieszańców a heterogennością markerów molekularnych dla nie spokrewnionych linii rodzicielskich.

Melchinger i in. [1999] stwierdzili, że prognozowanie efektu heterozji pomiędzy grupami wykazującymi genetyczne podobieństwo plazmy zarodkowej nie jest możliwe na podstawie dystansu genetycznego określonego przy wykorzystaniu markerów DNA, lecz powinno być określone w doświadczeniach polowych. Na podstawie danych doświadczalnych wykazali, że podzielenie plazmy zarodkowej na zróżnicowane pule genowe jest korzystne dla optymalnego wykorzystania zjawiska heterozji.

Według Adamczyka i in. [2001], zmodyfikowana metoda PCR może być użyta do podziału materiałów hodowlanych na grupy pochodzeniowe, jednak możliwość jej bezpośredniego zastosowania do prognozowania formuł mieszańców wymaga dalszych badań.

Becker i in. [2000], badając zależność dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy z efektem heterozji, stwierdzili, iż mieszańce kukurydzy DentxDent pochodzące

z form rodzicielskich o dużym dystansie genetycznym dały największy efekt heterozji wyrażony plonem ziarna. Podobne zależności obserwowali Broda in. [2002]. Wykorzystując markery RAPD do analizy zróżnicowania genetycznego linii wsobnych żyta, wykazali, że można oczekiwać wyższego efektu heterozji w mieszańcach F_1 , których formy rodzicielskie pochodzą z puli genowej o znacznym dystansie genetycznym.

Na podstawie wyników badań własnych stwierdzono, że markery molekularne RAPD mogą znaleźć zastosowanie do grupowania linii pod względem pochodzenia, szczególnie tych, dla których dane o pochodzeniu są niepełne, jednakże są nie przydatne w prognozowaniu formuł mieszańców. Z kolei dające większy polimorfizm markery AFLP można wykorzystać do wstępnej selekcji komponentów rodzicielskich, które dalej będą testowane w warunkach polowych.

WNIOSKI

1. U wszystkich analizowanych mieszańców większość cech struktury plonu przyjmowała istotnie wyższe wartości niż średnie tych cech obojga rodziców.

2. Wyselekcjonowane startery – zarówno w przypadku markerów RAPD, jak i AFLP – generowały polimorfizm, który pozwolił na zbadanie podobieństwa genetycznego pomiędzy formami rodzicielskimi mieszańców.

3. Wstępne wyniki wskazują na to, iż podobieństwo genetyczne oparte o analizę polimorfizmu markerów molekularnych AFLP koreluje z efektem heterozji. Markery te mogą więc być wykorzystane do wstępnej selekcji komponentów rodzicielskich, które dalej będą testowane w warunkach polowych.

4. W przypadku markerów molekularnych RAPD liczba polimorficznych produktów amplifikacji – pozwalających na określenie dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi mieszańców F_1 – wynosiła od 3 do 9. Wyselekcjonowane kombinacje starterów w przypadku markerów molekularnych AFLP generowały więcej produktów różnicujących analizowane genotypy, co pozwoliło na bardziej precyzyjne oszacowanie dystansu genetycznego pomiędzy komponentami rodzicielskimi. Liczba wygenerowanych produktów polimorficznych wynosiła od 5 do 16.

5. Markery molekularne RAPD dające mniejszy polimorfizm w porównaniu z markerami AFLP nie są przydatne w prognozowaniu formuł mieszańców, ponieważ podobieństwo genetyczne określone przy ich wykorzystaniu nie jest skorelowane z efektem heterozji.

PIŚMIENNICTWO

- Adamczyk J., 1998. Przegląd metod hodowli kukurydzy i ich przydatność w praktyce. Biul. IHAR 208, 123-130.
- Adamczyk J., 2001. Rola nowych mieszańców w podnoszeniu efektywności różnych kierunków użytkowania kukurydzy. Dodatek pisma Agro Serwis, Biznes-Press Warszawa, 7-12.
- 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.
- Becker H.C., Link W., 2000. Heterosis and hybrid breeding. MCC 2000 Mendel Centenary Congress, 319-327.

- 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 Breed.* 111, 217-226.
- Broda Z., Gniazdowska A., Mikołajczyk S., Szołkowski A., 2002. Wykorzystanie markerów RAPD do analizy genetycznej różnorodności linii wsobnych żyta (*Secale cereale* L.) i ich doboru do krzyżowań hetwrozyjnych (F₁). *PTPN* 93, 87-92 – Prace Komisji Nauk Rolniczych I Nauk Leśnych.
- 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.
- Cross C.E., 1966. Heterosis at the hybrid related to gene frequency differences between two populations. *Genetics* 53, 269-274.
- Dubas A., 1999. Kukurydza. [W:] *Szczegółowa uprawa roślin*, pod red. Z. Jasińskiej i A. Kotckiego, 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. *Crpo. Sci.* 36, 790-799.
- Godshalk E.B., Lee M., Lamken K.R., 1990. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single – cross hybrid performance of maize. *Theor. Appl. Genet. biotechnologich.* 80, 273-280.
- Grzebelus D., Barański R., 1996. Markery DNA 35-47. Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. [W:], pod red. B. Michalik.
- Kuriata R., Topolski A., 2003. Wartość hodowlana linii wsobnych kukurydzy z hodowli w Kobierzcach. *Biul. IHAR* 240/241, 232-239.
- Machul M., 1988. Reakcja dwu mieszańców kukurydzy na zróżnicowaną obsadę roślin w uprawie na kiszonkę i na ziarno. *IUNG Puławy R* 239.
- Machul M., Małysiak B., 1983. Wpływ terminu i głębokości siewu na wzrost kukurydzy i plon ziarna. *Pam. Puł.* 81, 37-48.
- Machul M., Małysiak B., 1993. Plonowanie kukurydzy uprawianej na kiszonkę z całych roślin, kiszonkę z kolb (CCM) i na ziarno w zależności od obsady roślin. *Pam. Puł.* 102, 91-104.
- Melchinger A.E., 1999. Genetic diversity and heterosis. [W:] *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. Wisconsin, 99-118.
- Michalski T., 1980. Wpływ obsady roślin, wczesności odmian oraz terminu zbioru na plony i wartość pastewną kukurydzy kiszonkowej. *Rocz. AR w Poznaniu, Rozp. Nauk.* 104.
- Michalski T., 1990. Wpływ stopnia dojrzałości i struktury kolb kukurydzy na plony i jakość uzyskanej z nich kiszonki. *Rocz. AR w Poznaniu, Rozp. Nauk.* 194.
- Michalski T., 1997. Wartość pastewna plonów kukurydzy w zależności od sposobów i terminów zbioru. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 450, 133-162.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269-5273.
- Pala J., 2002. Genetyczne, fizjologiczno-biochemiczne i ekologiczne uwarunkowania plonowania roślin. [W:] *Fizjologia plonowania roślin*, Wyd. UWM.
- Ruebenbauer T., 1964. *Kukurydza*. PWRiL Warszawa.
- Shull G.H., 1948. What is heterosis? *Genet.* 33, 439-446.
- Song R., Messing J., 2003. Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(15), 9055-9060.
- Sulewska H., 2004. Wymagania środowiskowe kukurydzy i możliwości jej uprawy w Polsce. [W:] *Technologia produkcji kukurydzy*, pod red. A. Dubasa, Wyd. Wieś Jutra Warszawa, 16-23.
- Szwejkowski Z., Nowicki J., Wanic M., 1991. Produkcyjność kukurydzy pastewnej w zależności od warunków siedliskowych i miejsca w zmianowaniu. *Fragm. Agron.* 2, 151-158.
- Thompson D., Henry R., 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19, 394-400.

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF CORN LINES SUITABLE FOR BREEDING OF HETEROSIS HYBRIDS, BASED ON MOLECULAR MARKERS AFLP AND RAPD

Abstract. In the recent years, traditional methods combined with molecular techniques have been used in many modern breeding programs. This gives the opportunity to introduce more objective selection criteria and parental material selection. It can also allow the time needed to breed a new hybrid to be significantly shortened. Many scientists tried to foresee the effect of heterosis by examining the genetic distance between the parental lines. The experiment was established in 2006 at the Agricultural Experiment Station in Dłóń (51° N; 17° E) of Poznań University of Life Sciences. The aim of this study was to prove the relation between the heterosis effect of the generation F_1 of corn and the molecular level genetic distance between the parental components, with respect to their origin. Proving those relations could make it possible to choose the parental forms which take part in the creation of a new hybrid, and to decrease the number of lines tested in nature. This shortens the breeding cycle and decreases the cost of breeding. The molecular markers: AFLP and RAPD can be useful in selecting the parental components for the purpose of corn hybridization.

Key words: AFLP, genetic distance, corn, heterosis, molecular markers, RAPD

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.02.2009