

Genetička divergentnost samooplodnih linija kukuruza i heterozis

- Originalni naučni rad -

Aleksandar RADOJČIĆ, Goran DRINIĆ i Snežana DRINIĆ-MLADENOVIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: U radu je ispitivana genetička različitost šest samooplodnih linija kukuruza na osnovu RAPD markera i odnos genetičke sličnosti između roditeljskih linija i heterozisa za prinos zrna u njihovim ukrštanjima (F_1 hibridima).

Roditeljske linije i 30 F_1 hibrida, dobijenih ukrštanjem roditeljskih linija u potpunom dijalelu, su testirani po slučajnom blok dizajnu sa četiri ponavljanja u dve gustine useva ($G_1=44.640$ i $G_2=64.935$ biljaka ha^{-1}) u Zemun Polju tokom 2003 i 2004. godine. Razlike u prinosu zrna između ispitivanih genotipova (F_1 i samooplodne linije *per se*), ispitivanih gustina i spoljnih sredina su bile statistički značajne. Najveći heterozis dobijen je kod kombinacije ZPL 173/3 x ZPL 680 i u odnosu na vrednost srednjeg roditelja (192.2 %) i u odnosu na boljeg roditelja (178.0 %) u ispitivanim gustinama i godinama.

Za određivanje korelacija između vrednosti za heterozis u kombinacijama dobijenim u poljskom ogledu i vrednosti genetičkih distanci izračunatih na osnovu RAPD markera korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije. Dobijeni rezultati ukazuju da se RAPD markeri mogu koristiti za ispitivanje genetičke divergentnosti samooplodnih linija kukuruza, mada je njihova primena za predviđanje heterozisa za prinos zrna ograničena.

Ključne reči: Genetička sličnost, heterozis, prinos zrna, RAPD markeri.

Uvod

Stepen heterotičnog efekta u F_1 generaciji tesno je povezan sa genetičkom divergentnošću roditeljskih linija. Što su roditelji genetički divergentniji do određene granice se povećava heterozis njihovih potomaka i obrnuto, *Hallauer* i *Lopez-Perez*, 1979, *Hallauer*, 1990.

Standardne metode u oplemenjivanju kukuruza podrazumevaju brojna ukrštanja samooplodnih linija sa različitim testerima kako bi se dobila informacija o genetičkoj sličnosti, odnosno različitosti ovih linija. Na osnovu toga linije se razvrstavaju

u određene heterotične grupe. Upravo ova opsežna terenska testiranja predstavljaju najskuplji i najdugotrajniji deo savremene selekcije kukuruza, a istovremeno je ova procedura veoma restriktivna zbog toga što samo mali broj linija može da bude ukršten i ocenjen.

Alternativa bi moglo da bude razvrstavanje samooplodnih linija po heterotičnim grupama zasnovano na molekularnim markerima, budući da bi ovaj pristup omogućio upotrebu većeg broja linija, *Pinto i sar.*, 2003, značajno ubrzao proces stvaranja superiornih hibrida i smanjio troškove koji opterećuju program oplemenjivanja kukuruza.

Materijal i metode

U radu je ispitano šest samooplodnih linija kukuruza standardnog kvaliteta zrna, različitog porekla. Samooplodne linije ZPL 142, ZPL 680 i ZPL 357/3 su po poreklu srodne Iowa Stiff Stalk sintetiku (BSSS), a linije ZPL 257/3, ZPL 17/5 i ZPL 173/3 su nesrodne sa Iowa Stiff Stalk sintetikom. Samooplodna linija ZPL 17/5 učestvovala je u stvaranju linije ZPL 173/3 kao jedan od roditelja.

Ogled sa šest samooplodnih linija i 30 F₁ hibrida, dobijenih ukrstanjem roditeljskih linija u potpunom dijalelu sa recipročnim kombinacijama, postavljen je u Zemun Polju tokom 2003 i 2004. godine. Ogled je postavljen po slučajnom blok dizajnu sa četiri ponavljanja u dve gustine useva (G₁=44.640 i G₂=64.935 biljaka ha⁻¹). Meren je prinos zrna ispitivanih genotipova, a heterozis za prinos zrna je izračunat u odnosu na vrednost srednjeg (HMP), odnosno boljeg roditelja (HBP).

DNK je izolovana iz klica samooplodnih linija, *Sagai-Marooof i sar.*, 1984. Kvalitet DNK je proveren elektroforezom na agaroznom gelu, a koncentracija određena spektrofotometrijski. PCR analiza sa 10 RAPD prajmera je urađena po metodi *Williams-a*, 1990, a nakon PCR-a uzorci su analizirani elektroforezom na 1,4 % agaroznom gelu.

Na osnovu broja (N) i rasporeda traka izračunata je genetička distanca (GD) za parove (ij) ispitivanih genotipova prema formuli *Nei-a* i *Li-a*, (1979):

$$GD = 1 - \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j},$$

gde je N_{ij} broj traka identičnih za linije (i) i (j), N_i ukupan broj traka za linije (i), a N_j ukupan broj traka za linije (j). Vrednost za genetičku distancu se kreće od 0 (sve trake su zajedničke) do 1 (nema zajedničkih traka).

Klaster analiza, bazirana na podacima za genetičku distancu je urađena pomoću UPGMA metode primenom NTSYS-pc v2.0 softvera, *Rohlf*, 2000. Korelacija između heterozisa za prinos zrna i genetičke distance utvrđena je primenom Spearman-ovog koeficijenta korelacije ranga, *Hadživuković*, 1974.

Rezultati i diskusija

Analizom varijanse u programu ANOVA utvrđena je statistički značajna razlika u prinosu zrna između ispitivanih genotipova i gustina (podaci nisu prikazani u radu). Prinos zrna je bio značajno viši u gustini sa 64.935 biljaka·ha⁻¹. Najviši prinos zrna je izmeren kod kombinacije ZPL 275/3 x ZPL 142 u obe ispitivane gustine, dok je najniži prinos zrna dala kombinacija ZPL 173/3 x ZPL 17/5 u prvoj gustini. Kod samooplodnih linija (*per se*) najviši prinos zrna je ostvarila linija ZPL 357/3, a najniži linija ZPL 680 u obe ispitivane gustine.

Heterozis za prinos zrna je izračunat u odnosu na vrednost srednjeg, odnosno

Tabela 1. Hetrozis za prinos zrna 30 F₁ hibrida (%) - Grain Yield Heterosis of 30 F₁ Crosses (%)

Genotip - Genotype	HMP	HBP
ZPL 142 x ZPL 275/3	145,7	130,7
ZPL 142 x ZPL 680	145,0	112,4
ZPL 142 x ZPL 17/5	147,7	130,0
ZPL 142 x ZPL 357/3	47,6	36,4
ZPL 142 x ZPL 173/3	162,3	137,8
ZPL 275/3 x ZPL 142	173,3	156,7
ZPL 275/3 x ZPL 680	169,2	147,1
ZPL 275/3 x ZPL 17/5	96,5	94,1
ZPL 275/3 x ZPL 357/3	135,2	105,1
ZPL 275/3 x ZPL 173/3	140,0	131,1
ZPL 680 x ZPL 142	162,7	127,8
ZPL 680 x ZPL 275/3	155,0	134,1
ZPL 680 x ZPL 17/5	181,0	160,8
ZPL 680 x ZPL 357/3	145,9	99,4
ZPL680 x ZPL 173/3	189,1	175,0
ZPL 17/5 x ZPL 142	151,9	133,9
ZPL 17/5 x ZPL 275/3	113,0	110,5
ZPL 17/5 x ZPL 680	166,2	147,0
ZPL 17/5 x ZPL 357/3	96,7	69,8
ZPL 17/5 x ZPL 173/3	66,3	62,0
ZPL 357/3 x ZPL 142	72,3	59,2
ZPL 357/3 x ZPL 275/3	114,9	87,4
ZPL 357/3 x ZPL 680	127,2	84,2
ZPL 357/3 x ZPL 17/5	116,8	87,1
ZPL 357/3 x ZPL 173/3	143,0	105,2
ZPL 173/3 x ZPL 142	166,3	141,4
ZPL 173/3 x ZPL 275/3	131,5	122,9
ZPL 173/3 x ZPL 680	192,2	178,0
ZPL 173/3 x ZPL 17/5	89,8	84,9
ZPL 173/3 x ZPL 357/3	140,3	102,9
Korelacija - Correlation	r _s =0,69**	r _s =0,59*

* Značajno na nivou 0.05 - significant at the probability level $P < 0.05$.

** Značajno na nivou 0.01 - significant at the probability level $P < 0.01$.

boljeg roditelja (Tabela 1). Najviši heterozis za prinos zrna ostvarila je kombinacija ZPL 173/3 x ZPL 680, dok je najniži heterozis ustanovljen kod kombinacije ZPL 142 x ZPL 357/3. Poredeći vrednosti za prinos zrna samooplodnih linija *per se* i vrednosti za heterozis F₁ hibrida može se zaključiti da je ukrštanjem linija sa najnižim prinosom dobijena kombinacija sa najvišim heterozisom i obrnuto, ukrštanjem linija sa najvišim prinosom dobijena je kombinacija sa najnižim heterozisom za prinos zrna.

Analiza polimorfizma RAPD markera pokazala je da svi ispitivani genotipovi imaju specifične profile. Analizom pomoću slučajnog seta od 10 RAPD markera došlo se do rezultata da je 30 od ukupno 42 detektovana alela (71 %) bilo polimorfno. Ovo je u saglasnosti sa drugim radovima u kojima je dobijen sličan nivo polimorfizma kod kukuruza, *Amorim i sar.*, 2003, *Subramanian i Subbaraman*, 2004. Broj alela je varirao od 4 do 8, prosečno 5,2.

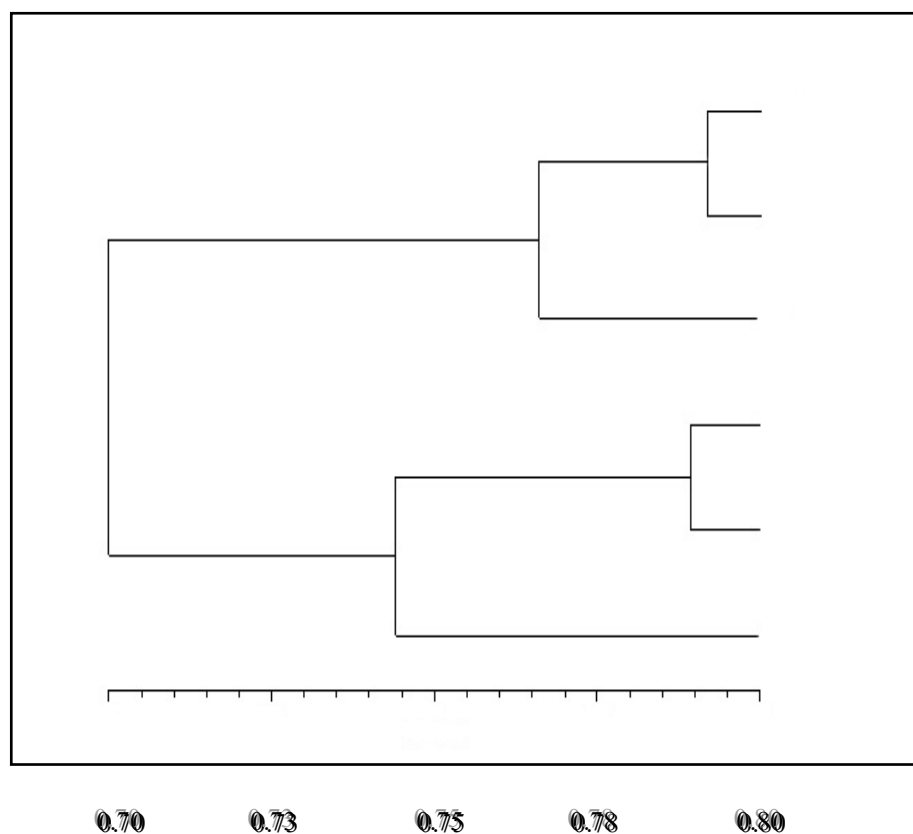
Prosečna genetička distanca (GD) analiziranih linija kukuruza je iznosila 0,60 (Tabela 2). Najveća genetička distanca ustanovljena je između samooplodnih linija ZPL 173/3 i ZPL 142, a najmanja između linija ZPL 17/5 i ZPL 173/3. Dobijeni rezultati su saglasni sa poreklom ovih linija.

Tabela 2. Genetička distanca između samooplodnih linija kukuruza dobijena na osnovu RAPD markera
Genetic Distance Among Inbred Lines Based on RAPD Markers

Genotip Genotype	ZPL 275/3	ZPL 680	ZPL 17/5	ZPL 357/3	ZPL 173/3
ZPL 142	0.64	0.58	0.63	0.50	0.66
ZPL 275/3		0.63	0.57	0.62	0.54
ZPL 680			0.60	0.61	0.65
ZPL 17/5				0.62	0.48
ZPL 357/3					0.65

Korišćenjem UPGMA klaster metode i primenom NTSYS-pc programa, samooplodne linije su grupisane u odgovarajuće heterotične grupe (Grafikon 1). Prvi klaster obuhvata linije nesrodne sa BSS sintetikom, a drugi klaster linije BSSS tipa. U okviru prvog klastera linije ZPL 17/5 i ZPL 173/3 su grupisane zajedno, a linija ZPL 275/3 im je pridružena. Klaster dva čini podgrupa u kojoj su linije ZPL 142 i ZPL 357/3, a linija ZPL 680 je povezana sa njima.

Rezultati pokazuju da za osobinu prinos zrna postoji pozitivna korelacija ranga srednje jačina ($r_s = 0,69^{**}$) između heterozisa u odnosu na srednjeg roditelja (HMP) i genetičke distance (GD) na osnovu RAPD analize (Tabela 1). Iako se radi o statistički veoma značajnoj korelaciji, veza između heterozisa u odnosu na srednjeg roditelja (HMP) i genetičke distance (GD) još uvek nije dovoljno jaka da bi se RAPD markeri mogli koristiti za predviđanje performansi hibrida sa većom pouzdanošću. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa objavljenim rezultatima drugih autora, u kojima je takođe dobijena srednje jaka ili slaba, pozitivna korelacija između heterozisa za prinos zrna i genetičke distance izračunate pomoću molekularnih markera, *Melchinger*, 1990, *Drinić-Mladenović i sar.*, 2002.



Grafikon 1. Dendrogram na osnovu genetičke distance dobijene RAPD analizom
Dendrogram Based on Genetic Distance from RAPD Data

Zaključak

Potvrđen je visok nivo polimorfizma RAPD markera kod kukuruza i jasno su izdvojene BSSS srodne i BSSS nesrodne heterotične grupe. Najmanja genetička distanca (GD) ustanovljena je između linija ZPL 17/5 i ZPL 173/3, što se i očekivalo obzirom na njihovo poreklo. Najveća genetička distanca utvrđena je između linija ZPL 142 i ZPL 173/3. Vrednosti za genetičku distancu između linija su u saglasnosti sa rezultatima heterozisa za prinos zrna. Viši heterozis za prinos zrna je dobijen u kombinaciji linija između kojih je ustanovljena veća genetička distanca i obrnuto, niži heterozis za prinos zrna je zabeležen u kombinaciji linija između kojih je genetička distanca bila manja.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se RAPD markeri mogu koristiti za ispitivanje genetičke divergentnosti samooplodnih linija kukuruza, ali je njihova primena za predviđanje heterozisa za prinos zrna još uvek ograničena.

Literatura

- Amorim E.P., C.C. de Souza Almeida, M.J.C. Melo Sereno, F. Bered and J.F. Barbosa Neto** (2003): Genetic variability in sweet corn using molecular markers. *Maydica* 48: 177-181.
- Drinić Mladenović, S., S. Trifunović, G. Drinić and K. Konstantinov** (2002): Genetic diversity and its correlation to heterosis in maize as revealed by SSR-based markers. *Maydica* 47: 1-8.
- Hadživuković, S.** (1974): Statistički metodi, izd. Radnički univerzitet "Radivoj Čiparov", Novi Sad.
- Hallauer, A.R.** (1990): Methods used in developing maize inbred. *Maydica* 35: 1-16.
- Hallauer, A.R. and E. Lopez-Perez** (1979): Comparisons among testers for evaluating lines of corn. *Proc. Ann. Corn and Sorghum Res. Conf.* 34: 57-75.
- Melchinger, A.E., M. Lee, K.R. Lamkey, A.R. Hallauer and W.L. Woodman** (1990): Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimated genetic effect in maize inbreds. *Crop Sci.* 30: 1033-1040.
- Nei, M. and W.H. Li** (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Pinto, R. de M.C., C.L. de Souza Jr., L.A. Carlini-Garcia, A.A.F. Garcia and A. Pereira de Souza** (2003): Comparison between molecular markers and diallel crosses in the assignment of maize lines to heterotic groups. *Maydica* 48: 63-73.
- Rohlf, F.J.** (2000): NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0 Exeter Software, Setaket, N.Y.
- Sagai-Marooof, M.A., K.M. Soliman, R. Jorgenson and R.W. Allard** (1984): Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8014-8018.
- Subramanian, A. and N. Subbaraman** (2004): Molecular marker based validation of genetic relatedness among maize (*Zea mays* L.) inbred lines and its influence on heterosis. *Trop. Agr. Res.* 16: 91-98.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.

Primljeno: 01.12.2005.
Odobreno: 06. 06.2006.

* *
*

Genetic Diversity of Maize Inbred Lines and Heterosis

- Original scientific paper -

Aleksandar RADOJČIĆ, Goran DRINIĆ and Snežana DRINIĆ MLADENVIĆ
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

Summary

The genetic diversity of six maize inbred lines, as well as, the genetic similarity between parental inbred lines and heterosis for yield in their F₁ crosses was studied. Three inbred lines (ZPL 142, ZPL 680 and ZPL 357/3) are of the BSSS origin and another three (ZPL 257/3, ZPL 17/5 and ZPL 173/3) are of the non-BSSS genetic background.

Molecular markers provide a direct determination of a number for which two inbred lines are different for a given number of loci. Maize inbred lines were genetically characterised with RAPD markers. Genetic similarity among genotypes was done by a statistical analysis with NTSYSpc v2.0 and by the application of the cluster analysis.

Parental inbred lines, 30 F₁ crosses with reciprocals, were included in a randomised complete block design with four replications in two densities (44,640 and 64,935 plants ha⁻¹) at the location of Zemun Polje in 2003 and 2004. The differences among genotypes (F₁ and inbreds line *per se*), densities and years were statistically significant. The highest value of mid-parent heterosis (192.2 %), as well as, the best-parent heterosis (178.0 %) was obtained for the cross ZPL 173/3 x ZPL 680 over investigated densities and years.

The Spearman's correlation coefficient was used to determine correlations between the values of heterosis obtained in the field experiment and the value of genetic distances based on RAPD markers. The obtained results indicate that RAPD markers can be used to study the genetic diversity of maize inbred lines, although their application in the prediction of heterosis for grain yield is limited.

Received: 01/12/2005

Accepted: 06/06/2006

Adresa autora:

Aleksandar RADOJČIĆ

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 1

11185 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: radojcica@hotmail.com ili radojcica@neobee.net