

## WYKORZYSTANIE METOD BIOTECHNOLOGICZNYCH W HODOWLI KUKURYDZY

BARTOSZ NOWAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Smolice 146, 63-740 Kobylin

**Synopsis.** Kukurydza zwyczajna (*Zea mays*) jest rośliną uprawianą w różnych rejonach świata. Celem jaki przyświeca hodowli tego gatunku jest przede wszystkim produkcja żywności. Obecnie w hodowli roślin wykorzystuje się zarówno metody klasyczne jak i biotechnologiczne. Skrócenie cyklu hodowli poprzez zastosowanie roślin DH, markerów molekularnych oraz selekcji genomowej, dostarcza na rynek dobrze plonujące odmiany mieszańcowe. W Polsce obowiązuje zakaz rozpowszechniania oraz hodowli roślin genetycznie modyfikowanych (GMO) uzyskanych metodą inżynierii genetycznej. Również metody hodowli z użyciem mutagenyzy zostały objęte restrykcjami, które obowiązują w przypadku roślin transgenicznych.

**Słowa kluczowe:** *Zea mays*, hodowla, DH, markery molekularne, GMO

### WSTĘP

Głównym wyzwaniem rolnictwa w XXI wieku jest stałe zwiększanie produkcji żywności. Oprócz zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego, celem współczesnego rolnictwa jest również ciągły rozwój i produkcja biomateriałów pochodzenia roślinnego [Gracz i in. 2015].

W Polsce kukurydza jest chętnie wybieraną rośliną do uprawy przez rolników. Zebrany plon wykorzystuje się między innymi na ziarno, kiszonkę z całych roślin oraz cele energetyczne, np. biogaz. Według GUS powierzchnia uprawy kukurydzy w 2022 roku wynosiła ok. 1,8 mln ha. Czynniki takie jak agrotechnika, warunki klimatyczne i środowiskowe oraz wybór odpowiednich odmian wpływają znacząco na wielkość zebranego plonu [Adamczyk 2001].

Intensywny rozwój postępu biologicznego sprzyja rejestracji nowych odmian, co roku COBORU rejestruje odmiany mieszańcowe plonujące wyżej, niż te używane jako wzorcowe [Sulewska 2003]. Według Adamczyka [2001] prawie jedna trzecia wysokości zebranego plonu zależy od wyboru odpowiedniej odmiany. W związku ze zjawiskiem tak zwanego „starzenia się” wyhodowanej odmiany, jej wysokoplenny cykl życiowy najczęściej trwa od 5 do 8 lat. Odpowiedni dobór linii wsobnych oraz metod hodowli pozwala na uzyskanie wysokoplennych odmian mieszańcowych [Warzecha 2008]. W obecnej erze poznano wiele metod, dzięki którym możliwa stała się edycja genomu zarówno roślin jak i zwierząt [Gracz i in. 2015]. Ważne jest jednak by nie zapominać o klasycznych metodach hodowli i uprawy roślin. W hodowli kukurydzy pożądanym zjawiskiem jest zjawisko heterozji występujące w pokoleniu F<sub>1</sub>. Hodowla mieszańcowa, oprócz chowu wsobnego komponentów rodzicielskich, szuka sposobów przyspieszenia cyklu hodowlanego. Aby efekt ten był jak najlepszy, wykorzystuje się wiele metod biotechnologicznych. Do naj-

<sup>1</sup> Adres do korespondencji – *Corresponding address:* bartosz.nowak@hrsmolice.pl

częściej stosowanych należą metody kultur *in vitro*, między innymi wykorzystanie podwojonych haploidów (DH), markery molekularne oraz selekcja genomowa. Coraz częściej wykorzystuje się edycję genomu oraz system CRISPR/Cas9. Im bardziej zaawansowane metody hodowli tym wyższy koszt, a to determinuje ich szersze stosowanie w praktyce.

## WYKORZYSTANIE TECHNIK KULTUR *IN VITRO*, W CELU OTRZYMANIA ROŚLIN PODWOJONYCH HAPLOIDÓW (DH)

Zastosowanie technik kultur *in vitro* pozwala na otrzymanie roślin podwojonych haploidów (DH), dzięki czemu mamy możliwość znacznego skrócenia cyklu hodowlanego. Otrzymywanie roślin homozygotycznych metodami konwencjonalnymi (chów wsobny) trwa średnio od 6 do 8 lat. Wykorzystując technologie *in vitro*, homozygotyczne linie wsobne otrzymuje się po 2-3 pokoleniach [Forster i Thomas 2005, Geiger i Gordillo 2009, Chang i Coe 2009]. W związku z wykorzystaniem linii DH w hodowli nowych odmian kukurydzy obserwujemy wiele korzyści między innymi: cykl hodowlany skraca się do dwóch pokoleń, mniej pracochłonne oraz kosztochłonne jest wytworzenie elitarnych linii, zwiększa się precyzja i skuteczność selekcji materiałów roślinnych, odnotowuje się szybszy rozwój linii poprzez korzystne łączenie alleli poligenicznych związanych z czynnikami wpływającymi na produktywność oraz stresy. Ponadto dzięki homozygotyczności łatwo jest utrzymać wymogi OWT (odrębność, wyrównanie, trwałość), niższe są również nakłady na utrzymanie linii wsobnych w cyklu hodowlanym, możliwe jest również wykorzystanie mapowania asocjacyjnego, genomiki funkcjonalnej, cytogenetyki oraz genetyki molekularnej [Röber i in. 2005, Geiger 2009, Geiger i Gordillo 2009].

W celu uzyskania linii DH, w pierwszym etapie konieczne jest krzyżowanie roślin wybranych populacji matecznych pokolenia  $F_1$  lub  $F_2$  z genotypem posiadającym cechy induktora [Trentin i in. 2020]. W komórkach haploidalnych ( $n$ ) zostaje podwojona liczba chromosomów ( $2n$ ) spontanicznie lub sztucznie [Chase 1947, 1951, 1952, 1969]. Gallais [1990] podaje, że indukcja materiału wyjściowego pokolenia  $F_2$  pozwala zwiększyć udział nasion haploidalnych do 50% w porównaniu do pokolenia  $F_1$ .

Według Prasanna [2012] jeden ze sposobów otrzymania linii DH polega na krzyżowaniu populacji wyjściowych z odpowiednim induktorem, następnie identyfikuje się nasiona domniemanych haploidów poprzez zabarwienie antocyjanowe ziaren. W kolejnym etapie nasion haploidalne kielkują i następuje identyfikacja korzeni zarodkowych na podstawie zabarwienia, następnie stosuje się odpowiedni czynnik podwajający liczbę chromosomów np. kolchicynę. Ostatecznie siewki umieszcza się w glebie i samozapyla dorosłe rośliny w celu uzyskania pierwszego pokolenia roślin haploidalnych ( $DH_1$ ).

Identyfikacja nasion może odbywać się poprzez pigmentację warstwy aleuronowej oraz antocyjanowe zabarwienie korzeni siewek. „Mateczny” schemat otrzymywania roślin DH opiera się na obecności barwnika antocyjanowego o nazwie  $R_1$  - *Navajo*. Jego występowanie można zauważyć w zewnętrznej warstwie bielma oraz w zarodku w induktorze haploidalnym. Populacje źródłowe nie mają zabarwienia zarodka lub bielma. Barwnik ten pomaga w rozróżnieniu ziaren haploidalnych ( $n$ ) (zabarwienie korony ziarniaka ale bez zabarwienia zarodka) od ziaren diploidalnych ( $2n$ ) (zabarwienie korony ziarniaka oraz zarodka) [Nanda i Chase 1966, Greenblatt i Bock 1967, Chase 1969]. Drugim sposobem otrzymywania nasion DH jest wykrywanie nasion haploidalnych za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [Chen i Song 2003]. W tym przypadku wykorzystuje się induktor o wysokiej zawartości oleju (OC). Efekt xeni powoduje znacznie wyższy poziom oleju w nasionach diploidalnych, w porównaniu do nasion

haploidalnych. W Stanach Zjednoczonych opracowano induktory o wysokim współczynniku efektywności indukcji, posiadające allele P11 i Ga1. Ga1 powoduje niezgodność krzyżową, która zapobiega zapłodnieniu przez ziarna pyłku nieposiadające tego allelu. Jest to stosowane w hodowli kukurydzy pękającej aby zapobiegać zapyłaniu przez inne formy kukurydzy [Kermicle i in. 2006].

Rośliny haploidalne oraz diploidalne można rozróżnić podczas obserwacji połowych roślin dorosłych. Pod uwagę brane są takie cechy jak: wigor, wyprostowanie liści, ograniczenie lub brak męskiej płodności, różnice w wysokości roślin oraz wielkości wiech [Chaikam i in. 2016]. Induktorami wykorzystywanymi do otrzymywania haploidów są zazwyczaj linie wsobne. Po skrzyżowaniu rośliny – induktora z populacją segregującą można zaobserwować w otrzymanym potomstwie wysoką heterozję roślin diploidalnych. Pokolenie diploidalne jest znacznie bardziej bujne niż potomstwo haploidalne.

W celu zapobiegania tworzeniu się mikrotubul, stosuje się kolchicynę. Dzięki niej chromosomy nie rozdzielają się podczas podziału mitotycznego, co powoduje duplikację chromosomów w komórce. Kolchicyna posiada właściwości rakotwórcze, ale jest jedną z najskuteczniejszych substancji służących do podwajania genomu u roślin haploidalnych [Melchinger i in. 2016, Prigge i Melchinger 2012]. W związku z wysoką toksycznością tej substancji, personel powinien być przeszkolony do stosowania kolchicyny oraz należy zabezpieczyć środek, w celu nierozprzestrzenienia się do środowiska. W literaturze można znaleźć informacje o alternatywnych środkach dla kolchicyny. Pierwszą substancją jest podtlenek azotu ( $N_2O$ ) [Kato 2006]. Podtlenek azotu stosuje się *in vivo* u roślin dorosłych. Jest to trudne do zastosowania na szeroką skalę. Drugi sposób to wykorzystanie cykloalkanu [Cori Cui i in. 2013].

## ZASTOSOWANIE MARKERÓW MOLEKULARNYCH

Dzięki wykorzystaniu markerów molekularnych jest możliwość badania polimorfizmu DNA, a tym samym analizowania zmienności cech. Polimorfizm jest to całokształt różnic pomiędzy gatunkami, odmianami, komórkami. Do najczęściej używanych markerów używa się tych, które ujawniają zmienność sekwencji nukleotydowej DNA [Sztuba-Solińska 2005]. Markerem molekularnym nazywamy fragment DNA lub polipeptyd, który jest dziedziczony według praw Mendla [Masojć 2004, Sharma i in. 2008]. O szerokim zastosowaniu i użyteczności decyduje wysoka powtarzalność i łatwość w aplikowaniu markerów.

Można wyróżnić różne typy markerów molekularnych między innymi: oparte na hybrydyzacji DNA (RFLP), bazujące na reakcji PCR z zastosowaniem arbitralnego startera (RAPD, ISSR), bazujące na reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów (SSR, STS), bazujące na reakcji PCR i trawieniu restrykcyjnym (AFLP, CAPS, SAMPL), oparte na polimorfizmie pojedynczych nukleotydów (SNP). W hodowli kukurydzy do najczęściej stosowanych typów markerów zaliczamy: RAPD, SSR, SNP, AFLP, RFLP [Sztuba-Solińska 2005].

RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism) – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych. Technika ta opiera się na trawieniu enzymami restrykcyjnymi DNA, produkty trawienia poddawane są rozdzielaniu w żelu agarozowym. Po modyfikacji tej techniki wprowadzono zastosowanie specyficznej sondy znakowanej radioaktywnie lub fluorescencyjnie [Southern 1975, Neuhaus-Url i Neuhaus 1993]. Zaletą metody RFLP jest możliwość stwierdzenia homo- lub heterozygotyczności osobnika oraz jego polimorfizmu. Wadą tej metody jest wysoki koszt otrzymania sondy. Technika ta znajduje zastosowanie w mapowaniu genów roślin uprawnych, m. in. kukurydzy [Malyshev i in. 2003] i lokalizacji loci cech ilościowych [Jordan i Khush 2004]. Zastosowanie tych markerów umożliwia podział materiałów hodowlanych na grupy heterotyczne.

RAPD (ang. random amplified polymorphic DNA) – losowo amplifikowany polimorfizm DNA. Technika ta bazuje na reakcji PCR z zastosowaniem startera o długości 9-11 pz [Williams i in. 1990]. Metoda ta w porównaniu do RFLP jest szybsza i bardziej wydajna, ale nie daje możliwości odróżnienia homo- od heterozygot, ponieważ wykazuje dominujący charakter dziedziczenia [Tomkowiak i in. 2009].

SSR (ang. simple sequence repeats) – mikrosatelitarny polimorfizm krótkich tandemowych powtórzeń. System ten wykazuje duży polimorfizm i analizuje sekwencje mikrosatelitarne DNA. Aby dokonać analizy sekwencji przy użyciu tych markerów, stosuje się biblioteki genomowe [Sztuba-Solińska 2005]. Startery te w porównaniu do AFLP i RAPD dostarczają więcej informacji genetycznej [Powell i in. 1996]. Według Shehata i in. [2009] markery te mogą być używane do oceny dystansu genetycznego oraz stopnia heterozygotyczności linii wsobnych kukurydzy.

SNP (ang. single nucleotide polymorphism) – polimorfizm pojedynczych nukleotydów. W reakcji PCR następuje amplifikacja fragmentu genomu oraz sekwencjonowanie otrzymanego produktu [Sztuba-Solińska 2005]. Aby określić obecność mutacji w danym genomie, porównuje się obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji. Wysoka wydajność identyfikacji polimorfizmu jest zaletą tych markerów, jednak do wad zalicza się wysoki koszt analizy.

AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism) – polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu. Technika ta łączy trawienie enzymami restrykcyjnymi z reakcją PCR. Dwa enzymy restrykcyjne posiadają tzw. lepkie końce, które są niezbędne do połączenia produktów trawienia oligonukleotydowymi odcinkami (adaptory) [Sztuba-Solińska 2005, Tomkowiak i in. 2009]. Markery te, dzięki wykazywaniu dużego polimorfizmu, pozwalają na odróżnienie homo- od heterozygot poprzez intensywność prążka. Możliwe jest zautomatyzowanie tej techniki. Według Tomkowiak i in. [2009] efekt heterozji koreluje z podobieństwem genetycznym opartym o analizę polimorfizmu markerów AFLP. Markery te również generują więcej produktów różnicujących analizowane genotypy w porównaniu do markerów RAPD. Pozwala to na bardziej precyzyjne szacowanie dystansu genetycznego.

Tradycyjne techniki, które często bywają czasochłonne, pozwalają ocenić zasoby genowe pod różnym kątem, np. produktywności, tolerancji na stresy abiotyczne i biotyczne, opierają się na krzyżowaniach oraz selekcji fenotypowej [Karp i in. 1998]. W celu szybszej analizy zróżnicowania genetycznego, alternatywą okazały się być techniki molekularne. Dużą rolę odgrywają przy szacowaniu dystansu genetycznego, który umożliwia dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań oraz uzyskanie większego efektu heterozji [Stuber i in. 1992]. Z drugiej strony, aktualny stan wiedzy nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, że dystans genetyczny może być podstawą do wnioskowania o wielkości efektu heterozji. Na pozytywny wpływ oceny dystansu genetycznego na wielkość efektu heterozji wskazują wyniki badań Melchingera [1999] oraz Tomkowiak i in. [2017].

## SELEKCJA GENOMOWA

Po raz pierwszy selekcję genomową (SG) opisał Meuwissen i in. [2001]. Wykorzystywane w niej są modele statystyczne oraz szeroko pojęta bioinformatyka wraz z kompleksową wiedzą na temat genomów roślin. Jedną z podstaw SG jest bardzo precyzyjne fenotypowanie materiałów hodowlanych, np. linii kukurydzy. Skrót GEBV (Genetic Estimated Breeding Value) określa genomową szacunkową wartość hodowlaną [Heffner i in. 2009]. Im wyższa wartość tego współczynnika, tym materiał lub komponent jest bardziej pożądanym do krzyżowań [Jonas i Koning 2013].

Chcąc wprowadzić tę metodę do programów hodowlanych, trzeba wyznaczyć liczbę genotypów, tzw. populację treningową, w celu określenia GEBV. Populacja ta powinna zawierać mini-

mum 500 linii [Jarska i in. 2015]. Na wybranych formach niezbędne jest dobrze zrobione fenotypowanie oraz genotypowanie. Zbiór tych danych zawiera charakterystykę poszczególnych linii.

Do najczęściej stosowanych metod statystycznych używa się najbliższą liniową nieobciążoną predykcję (BLUP, ang. Best Linear Unbiased Prediction), rozszerzenie BLUP czyli RR-BLUP (Ridge Regression BLUP), GBLUP (Genomic BLUP) lub metodę Bayesian [Meuwissen i in. 2001, Habier i in. 2013]. Metoda Bayesian zakłada, że parametr taki jak wariancja określona przez dany locus pochodzi z wcześniejszego rozkładu. Wariancja może się różnić w różnych loci. W przypadku modelu BayesA, dane są modelowane na dwóch poziomach: na poziomie danych oraz na poziomie sekwencji chromosomów. Na poziomie danych model jest taki sam jak w przypadku metody BULB. W metodzie BayesB rozkład wariancji genetycznych w loci pokazuje, że jest wiele loci bez wariancji genetycznej (niesegregujących) i kilka z wariancją genetyczną.

Wartościowe linie do krzyżowań wybiera się na podstawie genotypowej wartości hodowlanej oraz współczynnikowi GEBV, dzięki temu populacja zawiera allele, które są pożądane przez hodowcę. Na tym etapie pomija się fenotypowanie. Aby tak uzyskana populacja była wyrównana i trwała, prowadzi się następnie chów wsobny lub wykorzystuje metody *in vitro* [Jarska i in. 2015]. Do zalet tej metody zalicza się zachowanie wyjściowej zmienności genetycznej, minimalizację fenotypowania oraz skrócenie cyklu hodowlanego [Jonas i Koning 2013].

## ORGANIZMY GENETYCZNIE MODYFIKOWANE (GMO)

Najnowsze metody genetyczne pozwalają na edycję oraz przenoszenie genów do innych organizmów. Następuje to w sposób kontrolowany za pomocą inżynierii genetycznej [Korbutowicz 2019]. Za pomocą transgenezy fragment genomu jednego organizmu zostaje wprowadzony do genomu innego.

Do najczęściej stosowanych technik inżynierii genetycznej w celu zmiany genomu zalicza się: rekombinację kwasów nukleinowych, mikroiniekcję, makroiniekcję fuzję protoplastów, techniki hybrydyzacji [Korbutowicz 2019].

W hodowli konwencjonalnej, w celu zwiększenia zmienności genetycznej stosuje się różne techniki, takie jak: krzyżowane (proste, złożone, wsteczne), mutagenezę i inne. Dzięki poznaniu budowy komórki roślinnej oraz szeroko stosowanym technikom DNA, możliwe jest wprowadzenie interesujących nas genów kodujących do innego organizmu bez konieczności wprowadzania całej puli genowej, tak jak w przypadku tradycyjnego krzyżowania. W przypadku konwencjonalnej hodowli roślin, hodowca skupia się na wyhodowanym całym nowym organizmie, natomiast w przypadku GMO interesującym produktem jest konkretna pożądana cecha. Poprzez krzyżowanie wsteczne cecha ta jest ustalana oraz wprowadzana do dalszego programu hodowlanego [Quaim 2016].

W Unii Europejskiej obowiązuje zakaz rozpowszechniania oraz uprawy materiału siewnego wytworzonego przy wykorzystaniu inżynierii genetycznej. W 2017 roku do obrotu została dopuszczona jedyna odmiana kukurydzy MON 810, która jest uprawiana w Portugalii i Hiszpanii [Zimny i Twardowski 2019].

## TECHNIKA CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) składa się z białka Cas9 oraz pojedynczego RNA. Dzięki identyfikacji specyficznej sekwencji DNA, można celować w odpowiednie miejsce w genomie [Bonea 2022]. Syste-

my naprawcze komórki są aktywowane przez enzymatyczne cięcie DNA. Następstwem tego jest ponowne połączenie obydwu nici. Identyfikacja odcinek występujących przed naprawą jest przeciwny przez gRNA/Cas9 tak długo, aż systemy naprawcze popełnią błąd. Zmiana nukleotydów w określonym miejscu nazywana jest mutacją lub edytowaniem [Orczyk 2019]. Metodę tą wykorzystuje się w celu poprawy plonowania, a także w celu zwiększania tolerancji na stresy biotyczne lub abiotyczne.

Decyzją C-528/16, TSUE (Trybunał Sprawiedliwości Unii Europejskiej) zakwalifikował wszystkie organizmy uzyskane drogą mutagenyzy, z wyjątkiem mutagenyzy konwencjonalnej, do restrykcji obowiązujących dla technologii GMO.

## PODSUMOWANIE

Konwencjonalne metody hodowli roślin oraz opisane powyżej techniki wykorzystujące narzędzia molekularne wciąż pozwalają hodowcom na osiągnięcie zadowalających wyników związanych z otrzymywaniem nowych odmian. Niestety, stosowanie niektórych technik, sprzyjających postępowi biologicznemu jest niemożliwe z uwagi na ograniczenia prawne. Obecnie na świecie wielką rolę odgrywają technologie wykorzystujące narzędzia inżynierii genetycznej. Technologie te sprawdzają się w medycynie lub innych dziedzinach życia i z powodzeniem mogłyby być wykorzystywane w procesie hodowli roślin, w tym również kukurydzy. Mimo to, akceptacja społeczna jest bardzo ważnym czynnikiem, który wpływa na obostrzenia ustawodawcy. Dzięki biotechnologii są dostępne inne metody, które z czasem stają się mniej kosztowne poprzez ich wdrażanie i komercjalizację. Dziedzina ta zapewne dostarczy wiele ciekawych rozwiązań, które znacząco przyczynią się do dalszego zwiększenia postępu biologicznego.

## PIŚMIENNICTWO

- Adamczyk J. 2001. Rola nowych mieszańców w podnoszeniu efektywności różnych kierunków użytkowania kukurydzy. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR, 13.
- Bonea D. 2022. Applications of the CRISPR/CAS9 technique in maize and wheat breeding. *Ann. Univ. Craiova-Agriculture. Montanology, Cadastre Series* 52(1): 51–58.
- Chaikam V., Martinez L., Melchinger A.E., Schipprack W., Boddupall P.M. 2016. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. *Crop Sci.* 56: 1678–1688.
- Chang M.T., Coe E.H. 2009. Doubled haploids. In: Kriz A.L., Larkins B.A. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 63: 127–142.
- Chase S.S. 1947. Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.* 34, 582.
- Chase S.S. 1951. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44: 263–267.
- Chase S.S. 1952. Monoploids in maize. Iowa State College Press. Ames, Iowa, 389–399.
- Chase S.S., 1969. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Reviews* 35: 117–167.
- Chen S.J., Song, T. 2003. Identification haploid with high oil xenia effect in maize. *Acta Agron.* 29: 587–590.
- Cori Cui Y., Schmitzer P.R., Young D.H. 2013. Induced chromosome doubling in plants. U.S. Patent 8558,061 B2. Date issued: 15 October.
- Forster B.P., Thomas W.T.B. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25: 57–88.
- Gallais A. 1990. Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics* 124: 199–206.

- Geiger H.H., 2009. Doubled haploids. In: Bennetzen J.L., Hake S. (ed.). *Maize handbook – vol. II: Genetics and genomics*. Springer Science and Business Media. New York, 641–657.
- Geiger H.H., Gordillo G.A. 2009. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54: 485–499.
- Gracz J., Tyczewska A., Twardowski T. 2015. Perspektywy i wyzwania hodowli roślin w erze postgenomowej. *Nauka* 2: 109–126.
- Greenblatt I.M., Bock M. 1967. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.* 58: 9–13.
- Habier D., Fernando R. L., Garrick D. J. 2013. Genomic BLUP Decoded: A look into the black box of genomic prediction. *Genetics* 194(3): 597–607.
- Heffner E.L., Jannink J., Sorrells M.E. 2011. Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. *Plant Genome* 4: 65–75.
- Jarska W., Niedziela A., Orłowska R., Bednarek P.T. 2015. Strategie molekularne w nowoczesnej hodowli roślin. *Biuletyn IHAR* 275: 17–28.
- Jonas E., Koning D.J. 2013. Does genomic selection have a future in plant breeding? *Trends in Biotechnology* 31(9): 497–509.
- Karp A., Isaac P.G., Ingram D. S. (ed.) 1998. *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. London: Chapman and Hall, ss. 498.
- Kato A. 2006. Chromosome doubling method. U.S. Patent 7135,615 B2. Date issued: 14 November.
- Kermicle J.L., Taba S., Evans M.M.S. 2006. The Gametophyte-1 locus and reproductive isolation among *Zea mays* subspecies. *Maydica* 51: 219–225.
- Korbutowicz T. 2020. Organizmy transgeniczne w Unii Europejskiej. *Studenckie Prace Prawnicze, Administracyjne i Ekonomiczne* 32: 31–60.
- Malyshev S.V., Korzun V.N., Zaben'kova K.I., Voilokov A.V., Berner A., Kartel N.A. 2003. Comparative molecular-genetic mapping of genomes of rye (*Secale cereale* L.) and other cereals. *Tsitol. Genet.* 37: 9–20.
- Masojć P. 2004. Ustalenie tożsamości genetycznej. W: *Biotechnologia roślin*. Malepszy S. (red.). PWN, Warszawa.
- Melchinger A., Gumber R. 1998. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops. Concepts and breeding of heterosis in crop plants. *CSSA Special Publication* 25: 29–44.
- Melchinger A.E., Molenaar W.S., Mirdita V., Schipprack W. 2016. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled-haploid production. *Crop Sci.* 56: 559–569.
- Meuwissen T.H.E., Hayes B.J., Goddard M.E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.
- Nanda D.K., Chase S.S. 1966. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6: 213–215.
- Neuhaus-Url G., Neuhaus G. 1993. The use of thenonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. *Transgenic Res.* 2: 115–120.
- Orczyk W. 2019. Edytowanie genomów roślin uprawnych. Minimum faktów, bez mitów. *Nauka* 4: 35–46.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanagey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. The comparison of RLFP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gerplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225–238.
- Prasanna B. M. 2012. Doubled haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. *Mexico. D.F. CIMMYT*, 1–8.
- Prigge V., Melchinger A.E. 2011. Production of haploids and doubled haploids in maize. In: Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. (ed.). *Plant cell culture protocols*, 3rd edition. Humana Press – Springer Verlag, Totowa, New Jersey.
- Qaim M. 2020. Role of new plant breeding technologies for food security and sustainable agricultural development. *Appl. Econ. Perspect. Policy* 42(2): 129–150.
- Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H. 2005. In vivo haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50: 275–283.
- Sharma A., Namdeo A.G., Mahagik K.R. 2008. Molecular markers in plant genome analysis. *Pharmacognosy Rev.* 2: 23–34.
- Shehata A., Al-Ghethar H., Al-Homaidan A. 2009. Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines. *Saudi J. Biol. Sci.* 16: 57–62.

- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517.
- Stuber C.W., Lincoln S.E., Wolff D.W., Helentjaris T., Lander E.S. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid form elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823–839.
- Sulewska H. 2003. Kalkulacja ekonomiczna uprawy kukurydzy na ziarno i surowiec do produkcji etanolu. W: *Kukurydza rośliną przyszłości. Poradnik dla producentów*. Biznes-Press, Warszawa. 13–15.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos. Probl. Nauk Biolog.* 54: 227–239.
- Tomkowiak A., Broda Z., Adamczyk J. 2009. Ocena zróżnicowania genetycznego linii kukurydzy przydatnych do hodowli mieszańców heterozyjnych przy użyciu markerów molekularnych AFLP i RAPD. *Acta Sci. Pol., Agricultura* 8(1): 69–82.
- Tomkowiak A., Kociszewska K., Bocianowski J., Mikołajczak S., Kurasiak-Popowska D., Weigt D., Nowosad K., Bujak H., Nawracała J. 2017. Badanie podobieństwa genetycznego między liniami wsobnymi kukurydzy przy użyciu markerów molekularnych SSR. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 591: 97–106.
- Trentin H.U., Frei U. K., Lübberstedt T. 2020. Breeding Maize Maternal Haploid Inducers. Department of Agronomy, Iowa State University, Ames, IA 50011-1051.
- Warzecha R. 2008. Hodowla odmian kukurydzy. *Agrotechnika* 3: 38–40.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Zimny T., Twardowski T. 2019. The special situation of GM feeds in Poland in the light of the latest case law of the Court of Justice of the European Union. *Nauka* 1: 159–171.

B. NOWAK

## USE OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN CORN BREEDING

### Summary

Corn (*Zea mays*) is a crop grown in various regions of the world. The goal set for this species is food production. Plant breeding uses classical as well as biotechnological methods. Shortening the breeding cycle through the use of DH plants, molecular markers and genomic selection, delivers high-yielding hybrid varieties to the market. Poland prohibits the dissemination and breeding of plants obtained by GMO methods. Also, breeding methods using mutagenesis have been restricted as in the case of transgenic plants.

**Key words:** *Zea mays*, breeding, DH, molecular markers, GMOs.

Zaakceptowano do druku – *Accepted for print* – 3.07.2023

Do cytowania – *For citation*:

Nowak B. 2023. Wykorzystanie metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy. *Fragm. Agron.* 40(1): 25–32.