

**Marcin Matuszczak**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu

Autor korespondencyjny – M. Matuszczak, e-mail: marmat@nico.ihar.poznan.pl

DOI: 10.5604/12338273.1101231

## **Markery molekularne w badaniach rzepaku (*Brassica napus* L.)**

### **II. Przegląd praktycznych zastosowań w hodowli**

**Molecular markers for study of oilseed rape (*Brassica napus* L.)**

**II. The review of markers used for breeding programs**

Słowa kluczowe: rzepak, *Brassica napus*, hodowla, markery molekularne, MAS, genotypowanie

#### **Streszczenie**

Konkurencja na rynku nasion wymusza na hodowcach rzepaku znaczne przyspieszenie prac mających na celu uzyskiwanie nowych lepszych odmian o różnych cechach. Aby sprostać takim wyzwaniom niezbędne jest zastosowanie nowych metod wykorzystujących markery molekularne. W pracy wskazano na korzyści i trudności związane z ich stosowaniem w hodowli rzepaku oraz omówiono potencjał wybranych technik dla praktycznych zastosowań. Opisano podstawowe strategie badawcze, które pozwalają na wyszukanie markerów sprzężonych z określonymi cechami. Omówiono także metody poszukiwania markerów poprzez analizę całego genomu, które mają istotne znaczenie dla analizy cech wielogenowych. Na koniec podano liczne przykłady praktycznych zastosowań markerów molekularnych w hodowli rzepaku wspomaganą markerami molekularnymi (MAS), jak również przykłady innych zastosowań użytecznych dla hodowli tej rośliny.

Key words: oilseed rape, *Brassica napus*, breeding, molecular markers, MAS, genotyping

#### **Abstract**

To withstand the present competition on the seed market, the breeders must speed up their efforts to obtain new varieties better in various characteristics. It is hard to cope with such a challenge without using new methods, including the use of molecular markers. Both advantages and difficulties related to these methods as well as their usability in rapeseed breeding are presented here. Basic strategies of searching for molecular markers linked with selected traits of plants are described. The article includes some remarks on the analysis of the whole genome, which is the method of choice in case when the markers linked with multigenic features are to be found. Finally, the review of markers used for marker assisted selection (MAS) and other applications of these techniques in oilseed rape breeding programs are presented.

## Wstęp

---

Rzepak (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg.) to oleista roślina uprawna z rodziny *Brassicaceae* (kapustowate), która ma obecnie duże znaczenie gospodarcze i jest wykorzystywana w celach spożywczych i przemysłowych. Rzepak jest amfidiploidem o liczbie chromosomów w gametach  $n = 19$ , który powstał w wyniku spontanicznego przekrzyżowania dwóch diploidalnych gatunków z rodzaju *Brassica*: rzepiku (*Brassica rapa* syn. *Brassica campestris* L.) (genom A,  $n = 10$ ) oraz kapusty (*Brassica oleracea* L.) (genom C,  $n = 9$ ). Współistnienie w rzepaku genomów A i C, jak również występowanie w nich licznych rejonów zduplikowanych, to cechy mające istotne konsekwencje dla analizy genetycznej tej rośliny.

Hodowla rzepaku znajduje się obecnie na wysokim poziomie zaawansowania. Oczekuje się, że nowe odmiany tej rośliny będą posiadały bardzo dobre parametry pod względem plonu, cech jakościowych czy odporności na czynniki stresowe. Różne, często sprzeczne ze sobą, kierunki hodowli prowadzone są równolegle, co wymaga od hodowców coraz większej elastyczności. Aby zachować konkurencyjność w tej dziedzinie niezbędne jest szybkie reagowanie na potrzeby rynku nasiennego. Potrzeba szybkich zmian stoi jednak w sprzeczności z tradycyjnym modelem hodowli, w którym uzyskiwanie nowej odmiany wymaga trwającej wiele sezonów selekcji określonych genotypów. W związku z tym coraz częściej w tych pracach stosowane są markery molekularne (Rafalski i Tingey 1993, Bartkowiak-Broda 1997, Mohan i in. 1997, Snowdon i Friedt 2004, Sztuba-Solińska 2005, Mikołajczyk 2007, 2008). Pozwalają one na znaczne przyspieszenie procesu uzyskiwania nowych odmian poprzez skrócenie czasu niezbędnego dla oceny i selekcji posiadanych genotypów.

W niniejszej pracy omówiono strategię badawcze stosowane dla poszukiwania użytecznych markerów molekularnych. Przedstawiono także przykłady praktycznych zastosowań markerów molekularnych dla osiągnięcia określonych celów w hodowli rzepaku.

## Korzyści i trudności płynące ze stosowania markerów w hodowli

---

Dla hodowców najbardziej cenna jest informacja o zestawie cech, które posiadają poszczególne osobniki, tak aby można było wybrać te o najlepszych parametrach. W tym celu w tradycyjnej hodowli po osiągnięciu przez rośliny pełnej dojrzałości wykonuje się praco- i czasochłonne pomiary cech morfologicznych, skomplikowane analizy biochemiczne lub wykonuje się krzyżowania testowe dla stwierdzenia obecności danego genu. W związku z tym proces selekcji roślin

o odpowiednich cechach znacznie się wydłuża. Często też duży wpływ na analizowane cechy mają czynniki środowiskowe i może zdarzyć się, że wyselekcjonowane na podstawie wyników pomiarów i analiz linie nie są najlepsze pod względem genotypu.

Problemy te mogą zostać rozwiązane przez zastosowanie markerów molekularnych jako narzędzia wspomagającego hodowlę. Selekcja dokonywana jest wówczas w oparciu o sprzężenie pomiędzy markerem a locus odpowiedzialnym za dziedziczenie danej cechy. Taka strategia hodowlana określana jest jako hodowla wspomagana markerami (ang. Marker Assisted Selection, MAS). Próbkę do analizy mogą być pobierane z różnych części roślin, znajdujących się na dowolnym etapie rozwoju. Już na etapie siewek można w ten sposób określać cechy związane z morfologią roślin, jakością i składem chemicznym nasion, plennością, odpornością na czynniki biotyczne i abiotyczne, obecnością lub brakiem określonych genów oraz wiele innych. Tego rodzaju analizy umożliwiają bezpośrednie określenie genotypu z pominięciem zmienności niedziedzicznej. Obecnie znajdują one szerokie zastosowanie w programach hodowlanych roślin uprawnych (Tanksley i in. 1989, Krzymański 1997, Collard i Mackill 2008).

Techniki wykorzystujące markery molekularne stanowią doskonałe narzędzie dla współczesnego hodowcy. Posiadając dobry, silnie sprzężony z badaną cechą marker, można wykonać szybką i jednoznaczną analizę obecności tej cechy w materiałach hodowlanych. Należy jednak mieć na uwadze to, że identyfikacja nowych użytecznych markerów nie jest łatwym zadaniem. Proces ich wyszukiwania jest zwykle długotrwały i pracochłonny, wymaga dużych nakładów finansowych, odpowiednio przeszkolonego personelu oraz zaawansowanego sprzętu do badań. Jest to jednak inwestycja, która przynosi wymierne korzyści w przyszłości.

### **Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami cech użytkowych**

---

Aby wykorzystać potencjał markerów molekularnych, niezbędne jest zastosowanie metod umożliwiających powiązanie ich z określoną cechą badanego gatunku. Istnieją dwa podejścia badawcze często wykorzystywane w tym celu. Pierwsze z nich to analiza zbiorczych prób segregantów (ang. Bulk Segregant Analysis, BSA) (Michelmore i in. 1991, Kesseli i in. 1992). Można przyjąć, że markery muszą być blisko sprzężone z badaną cechą, jeśli różnicują one DNA wyizolowane dla dwóch grup segregantów charakteryzujących się skrajnie odmiennymi wartościami tej cechy. Dla markerów niesprzężonych, które są dziedziczone niezależnie od badanej cechy, wszelki polimorfizm jest maskowany przez wymieszanie materiału genetycznego. Drugie podejście to wykorzystanie pary linii prawie izogenicznych (ang. Near Isogenic Lines, NIL) (Young i in. 1988, Foisset

i in. 1995) w celu wykrycia markerów sprzężonych z daną cechą. Linie NIL są niemal identyczne, lecz różnią się segmentem DNA otaczającym gen odpowiedzialny za daną cechę. Uzyskiwanie takich linii wymaga wielokrotnego krzyżowania wstecznego nawet w 20 kolejnych pokoleniach. Markery, które wykażą polimorfizm pomiędzy liniami NIL niemal na pewno będą silnie sprzężone z poszukiwanym genem. Wszystkie markery związane z innymi rejonami genomu nie wykazują polimorfizmu, ponieważ rejony te są w obu liniach identyczne.

Istnieją różne metody uzyskiwania markerów molekularnych. Ich potencjał i przydatność każdej z nich dla stosowania w hodowli wspomaganą markerami (MAS) mogą się znacznie różnić. Na przykład markery typu SSR (ang. Simple Sequence Repeats) (Litt i Luty 1989, Jacob i in. 1991, Akkaya i in. 1992) mogą mieć istotne znaczenie ze względu na swoją uniwersalność, wysoki stopień polimorfizmu oraz możliwość zastosowania w wielu odległych genetycznie populacjach. Ich wadą jest brak bezpośredniego związku z funkcjonalnymi genami. Tego typu markery mogą być jednak bardzo przydatne w sytuacji, gdy nie jest znana dokładna lokalizacja i mechanizm działania genu powodującego jakąś cechę. Dużo trudniejsze do zastosowania w hodowli, ze względu na złożony układ prążków, są inne metody, takie jak RAPD (ang. Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams i in. 1990) czy AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism lub Amplified Restriction Fragment Polymorphism) (Zabeau i Vos 1993, Vos i in. 1995). Dzięki nim można jednak uzyskać duże zagęszczenie markerów w określonym rejonie genomu, a następnie wybrać te, które wykazują wysoki stopień sprzężenia z genem. Przy pomocy metod klonowania i sekwencjonowania markery RAPD lub AFLP mogą następnie zostać przekształcone w markery typu SCAR (ang. Sequence Characterized Amplified Regions) (Kesseli i in. 1992), które pozwalają w prosty sposób monitorować występowanie danej cechy w różnych populacjach i materiałach hodowlanych.

Markery molekularne mogą być zlokalizowane zarówno w pobliżu jakiegoś genu, jak i wewnątrz tego genu. W praktyce często stosowane są jedynie markery bardzo silnie sprzężone z genem. Powodem tego są zwykle trudności z identyfikacją genu, poznaniem jego sekwencji czy też ze znalezieniem specyficznych mutacji powodujących określoną zmienność. Nie zawsze możliwe jest uzyskanie tych danych w krótkim czasie. Oprócz tego często zdarza się, że sekwencje wewnątrzgenowe nie są tak polimorficzne, aby możliwe było zaprojektowanie odpowiedniego markera. Jednak dla uzyskania dobrego efektu w hodowli stosowany marker powinien być zlokalizowany wewnątrz sekwencji genu odpowiadającego za daną cechę. Dobrym sposobem na osiągnięcie tego celu jest wytworzenie mutantów powodujących zmienione działanie tego genu. Poznanie sekwencji genu w formie dzikiej i zmutowanej pozwala na opracowanie markerów allelo-specyficznych związanych z daną mutacją (Falentin i in. 2007a, 2007b, Rahman i in. 2008, Mikołajczyk i in. 2010a, 2012c, Matuszczak i in. 2013).

Obecnie, dzięki zakrojonym na szeroką skalę programom sekwencjonowania i analizy genomów *Arabidopsis thaliana* oraz gatunków z rodzaju *Brassica*, uzyskano już dane o wielu sekwencjach specyficznych dla genów oraz o zmienności sekwencji występującej w obrębie poszczególnych genów. Takie informacje doskonale nadają się do opracowania wysoce specyficznych markerów molekularnych.

### **Poszukiwanie markerów dla cech wielogenowych**

---

W wielu przypadkach dziedziczenie danej cechy jest skomplikowane, ponieważ wiele genów znajdujących się w różnych rejonach genomu wywiera wpływ na tę cechę. Wpływ genów może mieć charakter addytywny, dominacyjny lub epistatyczny. Istotny jest także wpływ środowiska na ekspresję danej cechy. W takich sytuacjach nie jest możliwa identyfikacja markerów sprzężonych z tą cechą poprzez analizę pojedynczego genu lub też za pomocą metod BSA oraz NIL. W celu zastosowania markerów molekularnych do analizy cech wielogenowych potrzebna jest całościowa analiza genomu badanego organizmu. Konstruowanie map genetycznych w powiązaniu z analizą ekspresji danej cechy w populacji segregującej pozwala znaleźć rejony genomu, określane jako loci cech ilościowych (ang. Quantitative Trait Loci, QTL), które mają istotny wpływ na daną cechę. Taka wieloczynnikowa analiza sprzężeń umożliwia wytypowanie zestawu markerów powiązanych z badaną cechą.

Na świecie prowadzone są badania mające na celu skonstruowanie map genetycznych w oparciu o różnego typu markery DNA oraz znalezienie w ten sposób istotnych dla selekcji markerów cech użytkowych (Bartkowiak-Broda 1997). Aby uzyskać dobre efekty, niezbędne jest otrzymanie mapy o wysokiej gęstości markerów, pozwalającej na precyzyjny wybór markerów sprzężonych z QTL. Wiele spośród tych prac przyniosło efekty w postaci identyfikacji QTL dla różnych cech rzepaku, lecz na obecnym etapie nie jest jeszcze możliwe wytypowanie markerów sprzężonych z badaną cechą. Dotyczy to na przykład badań nad całkowitą zawartością glukozyolanów (Howell i in. 2003, Matuszczak 2010), zawartością poszczególnych glukozyolanów (Matuszczak 2010) czy też zawartością tłuszczu w nasionach (Delourme i in. 2006). Prace te są kontynuowane, co daje nadzieję na znalezienie użytecznych markerów w przyszłości. Obecnie istnieją liczne przykłady, które potwierdzają skuteczność tego podejścia w hodowli rzepaku. Zidentyfikowano w ten sposób markery dla całkowitej zawartości glukozyolanów w nasionach (Uzunova i in. 1995, Basunanda i in. 2007). Znalaziono też liczne markery sprzężone z cechą odporności rzepaku na *Leptosphaeria maculans* (Pilet i in. 1998a, 1998b, 2001, Kaur i in. 2009).

Nowe metody sekwencjonowania pozwoliły w ostatnich latach na identyfikację wielu markerów SSR i SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphisms) dla genomu rzepaku. Dzięki temu możliwe jest zastosowanie mapowania asocjacyjnego (Rafalski 2002, Gupta i in. 2005, Mackay i Powell 2007, Korte i Farlow 2013) do poszukiwania powiązań markerów z cechami wielogenowymi. W przeciwieństwie do metod wykorzystujących analizę sprzężeń, w których badana jest ściśle określona populacja segregująca pochodząca od dwóch form rodzicielskich, przy mapowaniu asocjacyjnym badaniu podlega kolekcja odmian i linii hodowlanych. Jest to korzystne, ponieważ w ten sposób można znacznie zwiększyć spektrum analizowanej zmienności wewnątrzgatunkowej. W badanej kolekcji poszukuje się korelacji pomiędzy specyficzną zmiennością genetyczną a zmiennością danej cechy. Stosując różne obliczenia statystyczne (m.in. metodę regresji logistycznej) można wytypować markery wykazujące sprzężenie z badaną cechą (Hasan i in. 2008). Aby uniknąć zafałszowania wyników, istotne jest także uwzględnienie informacji o strukturze badanej populacji (Marchini i in. 2004). Badania asocjacyjne od dawna wykorzystuje się przy analizie predyspozycji genetycznych dla chorób występujących u ludzi (Lewis i Knight 2012). Obecnie są one również stosowane w badaniach cech rzepaku istotnych dla hodowli (Snowdon i Friedt 2004, Hasan i in. 2008).

Po zidentyfikowaniu markerów, które są sprzężone z badaną cechą i znajdują się po obu stronach znalezionego QTL, można przejść do kolejnego etapu jakim jest poszukiwanie genów odpowiedzialnych za występowanie tej cechy. Znalezienie i zsekwencjonowanie takich genów stanowi wstęp do uzyskania bardziej efektywnych i precyzyjnych markerów molekularnych niezbędnych dla MAS. W tym celu wykorzystuje się klonowanie pozycyjne (ang. positional cloning). Metoda ta jest stosowana wtedy, gdy brakuje charakterystyki molekularnej poszukiwanego genu lub produktów jego ekspresji. Najważniejszą informacją wykorzystywaną w tym podejściu jest lokalizacja chromosomowa określona za pomocą markerów molekularnych. Ze względu na to, że genom rzepaku powstawał w wyniku licznych poliploidyzacji oraz rearanżacji chromosomowych, wiele jego rejonów występuje w kilku powtórzeniach, które tylko nieznacznie różnią się od siebie. Taka sytuacja znacznie utrudnia poszukiwanie funkcjonalnych genów. Mimo to, dzięki zastosowaniu procedury wykorzystującej dane z rośliny modelowej *A. thaliana*, metoda klonowania pozycyjnego umożliwia zidentyfikowanie takich genów (Brown i Gaborieau 2011). W tym celu przeprowadza się precyzyjne mapowanie (ang. fine mapping) rejonu zawartego pomiędzy znalezionymi wcześniej markerami. Aby tego dokonać niezbędne jest ich przekształcenie w markery, które można szybko analizować, ponieważ przy tego rodzaju mapowaniu wykorzystuje się populację złożoną z dużej liczby osobników. Na podstawie analizy dwóch markerów można wybrać te osobniki badanej populacji, dla których w badanym rejonie nastąpiła rekombinacja. Równolegle identyfikuje się kolinearny z badanym rejo-

nem fragment genomu *A. thaliana*, który służy jako źródło markerów do precyzyjnego mapowania. Po wykonaniu genotypowania na utworzonej mapie analizowanego rejonu można zlokalizować markery bardzo mocno sprzężone z poszukiwanym genem. Tych markerów używa się następnie do identyfikacji odpowiednich klonów BAC (ang. Bacterial Artificial Chromosome) z biblioteki zawierającej fragmenty genomowego DNA badanej rośliny. Po wykonaniu analizy sekwencji znalezionej klonu dokonuje się adnotacji tej sekwencji w celu identyfikacji genów kandydujących oraz wstępnej analizy ich funkcji. Aby ostatecznie stwierdzić, który z genów odpowiada za badaną cechę, stosuje się metodę transformacji przy użyciu poszczególnych zidentyfikowanych wcześniej genów kandydujących. Klonowanie pozycyjne pozwoliło m.in. na identyfikację w genomie rzepaku genów restorerów dla systemu CMS *ogura* (*Rfo*) (Brown i in. 2003) i dla systemu CMS *polima* (*Rfp*) (Fourmanová i in. 2006), a ostatnio także genu związanego z występowaniem cechy klejstogamii (*CLG1A*) (Lu i in. 2012).

### **Hodowla wspomagana markerami molekularnymi (MAS)**

---

Obecnie wiele markerów molekularnych jest praktycznie wykorzystywanych w programach hodowlanych rzepaku. Już dość dawno zidentyfikowano markery RAPD oraz RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein i in. 1980) sprzężone z karłowatością rzepaku (gen *Bzh*) (Foisset i in. 1995, Barret i in. 1998). Znalazły one zastosowanie dla oceny materiałów hodowlanych pod względem tej cechy morfologicznej.

Opracowano także markery związane z genami odpowiedzialnymi za występowanie cechy cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS). Dla systemu CMS typu *polima* wykryto markery RFLP i RAPD sprzężone z genem restorerem (*Rfp1*) (Jean i in. 1997, 1998). Dla systemu CMS typu *ogura* opracowano marker DNA typu SCAR sprzężony z genem mitochondrialnym powodującym męską niepłodność (Krishnasamy i Makaroff 1993). Markery tego typu są także z powodzeniem stosowane w ZGiHRO IHAR-PIB w Poznaniu (Mikołajczyk i in. 1998). Oprócz tego wykryto markery RAPD sprzężone z genem restorerem (*Rfo*) dla systemu CMS *ogura* (Delourme i in. 1994, 1998). Na podstawie jednego z nich opracowano marker typu SCAR (Mikołajczyk i in. 2008), który opatentowano (Mikołajczyk i in. 2012b) i obecnie stosuje się go w praktyce (zbadano już ponad 2 tysiące genotypów). W innym zespole badawczym dla genu *Rfo* zostały natomiast opracowane allelo-specyficzne markery SNP (Hu i in. 2007). Na uwagę zasługuje także opracowanie testu molekularnego pozwalającego na jednoczesne wykrywanie obecności genu męskiej niepłodności typu CMS *ogura* oraz genu restorera (*Rfo*) dla tego systemu (Mikołajczyk i in. 2010b, 2012c).

Wykorzystywane są liczne markery powiązane z występowaniem cech jakościowych rzepaku. Znalaziono markery RAPD, AFLP i SCAR oraz markery CAPS (ang. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Konieczny i Ausubel 1993) użyteczne dla selekcji linii żółtonasiennych (Somers i in. 2001, Xiao i in. 2007). Zidentyfikowano także markery sprzężone z genami *FAEI* kontrolującymi zawartość kwasu erukowego (Jourden i in. 1996b, Fourmann i in. 1998). Ostatnio dla testowania alleli genu *FAEI.1* z genomu A opracowano genowo-specyficzne markery SNP wykrywane przy pomocy analizy SNaPshot. Z kolei dla testowania alleli genu *FAEI.2* z genomu C zastosowano markery SCAR znakowane fluorescencyjnie (Rahman i in. 2008). W innych badaniach zidentyfikowano zmutowane allele genu *fad3* powodujące wystąpienie cechy niskiej zawartości kwasu linolenowego w nasionach rzepaku. Opracowano powiązane z tymi mutacjami specyficzne markery (Jourden i in. 1996a, Hu i in. 1999). Ostatnio uzyskano nowe formy rzepaku posiadające mutacje tego genu (Spasibionek 2006). Po dokonaniu identyfikacji miejsc mutacji opracowano i wdrożono allelo-specyficzne markery dla cechy niskiej zawartości kwasu linolenowego, które wykrywane są przy pomocy opatentowanej metody wykorzystującej analizę SNaPshot (obecnie wykonano już ponad tysiąc takich analiz) (Mikołajczyk i in. 2010a, 2012a, 2012c). Opracowano także markery dla cechy wysokiej zawartości kwasu oleinowego w nasionach rzepaku. Są one powiązane z różnymi mutacjami występującymi w genie *fad2*. Mutacje te zostały scharakteryzowane, a następnie opatentowane jako doskonałe narzędzie do selekcji odmian zawierających zmutowane geny (Falentin i in. 2007a, 2007b). Na podstawie znanej sekwencji genu *fad2* z genomu A, dla cechy wysokiej zawartości kwasu oleinowego pochodzącej z mutagenezy (Spasibionek 2006) opracowano i wdrożono allelo-specyficzne markery typu CAPS (Matuszczak i in. 2013).

Liczne prace opisują próby znalezienia markerów sprzężonych z odpornością rzepaku na rozmaite patogeny. Przykładem mogą być markery RAPD i AFLP znalezione dla cechy specyficznej odporności siewek na *Leptosphaeria maculans* (Chèvre i in. 1997, Leflon i in. 2007), markery RFLP sprzężone z odpornością na wirusa TuMV (Walsh i in. 1999) czy też markery RAPD związane z głównym genem odporności na *Plasmodiophora brassicae* (Manzanares-Dauleux i in. 2000). Opisano także markery RFLP i AFLP sprzężone z loci, które wpływają na odporność na *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhao i Meng 2003).

Ostatnio opracowano test pozwalający na jednoczesne badanie wielu cech rzepaku w pojedynczej analizie (ang. multiplexing), co pozwala zminimalizować nakłady pracy i koszty. Test umożliwia wykrywanie markerów SNP specyficznych dla mutantów genu *fad3* oraz dwóch markerów typu SCAR związanych z systemem CMS *ogura* (Mikołajczyk i in. 2012c).



## Inne zastosowania markerów w hodowli rzepaku

---

Dla uzyskania pełnego obrazu wykorzystania markerów molekularnych w hodowli należy także wspomnieć o pozostałych zastosowaniach. Hodowcy korzystają z markerów molekularnych nie tylko w celu wykrywania określonych cech, lecz często także z innych powodów. Prace te przynoszą wiele korzyści, stanowiąc istotny wkład w poznanie roślin uprawnych oraz uzyskiwanie nowych odmian.

Przykładem takich zastosowań jest analiza dystansu genetycznego form wyjściowych dokonywana dla poprawienia efektu heterozji u mieszańców rzepaku (Liersch i in. 2010a). Badania zjawiska heterozji mają na celu zwiększenie plonu nowych odmian rzepaku. Dane markerowe są wykorzystywane w celu obliczenia współczynników dystansu/pokrewieństwa (m.in.: Jaccarda (1908), Dice (1945)/Nei i Li (1979), MDR (ang. Modified Rogers' Distance) (Rogers 1972), Sokala i Michenera (1958) oraz wielu innych). Dla praktycznego zastosowania tej metody w hodowli mieszańcowej niezbędne jest wykazanie korelacji pomiędzy dystansem genetycznym określonym za pomocą markerów molekularnych oraz efektem heterozji (Ali i in. 1995, Betrán i in. 2003, Yu i in. 2005, Liersch i in. 2010b).

Do innych zastosowań markerów, w których wykorzystywana jest analiza dystansu genetycznego należy testowanie pochodzenia i pokrewieństwa odmian lub gatunków. Tego typu badania prowadzono przy użyciu markerów RFLP (Song i in. 1988), RAPD (Shiran i in. 2006), a ostatnio także AFLP i SSR (Lombard i in. 2000, Allender i King 2010). Do określenia pochodzenia i pokrewieństwa rzepaku wykorzystywano zarówno markery zlokalizowane w DNA jądrowym, jak i markery SSR specyficzne dla DNA z chloroplastów (Allender i in. 2007).

Markery molekularne mogą być także przydatne do identyfikacji odmian i ochrony praw ich twórców (Jondle 1992). Na podstawie analizy 83 odmian rzepaku oceniono, że potencjał markerów AFLP do identyfikacji tych odmian jest bardzo duży i znacząco lepszy od innych stosowanych technik. Stwierdzono, że ustalone za pomocą markerów pokrewieństwo między odmianami dobrze odpowiada ich pochodzeniu. Dzięki temu markery AFLP stanowią dobre narzędzie zarówno dla badania odmian w kontekście ich rejestracji i ochrony, jak również w celu oceny zgodności przekazanego materiału siewnego z deklaracją hodowcy (Lombard i in. 2000). Ostatnio coraz większego znaczenia nabiera także analiza danych markerowych wykonywana w celu rozstrzygnięcia statusu odmiany pochodnej (ang. Essentially Derived Variety, EDV). Aby oceniany w różnych laboratoriach status EDV nie budził żadnych wątpliwości natury prawnej, dla badanego gatunku ustala się uniwersalną procedurę. Określa ona, który współczynnik podobieństwa oraz jaka metoda pozyskiwania markerów molekularnych będzie standardem w prowadzonych badaniach. Spośród różnych rodzajów markerów zwykle wybierane są markery AFLP oraz SSR ze względu na ich powtarzalność i wiarygodność (Lombard i in. 2000, Matuszczak 2004).

## Podsumowanie

---

Obecnie badania markerów molekularnych wpisują się już do kanonu prac nad roślinami uprawnymi. Dotyczy to także prac nad rzepakiem. Wyszukiwanie użytecznych zastosowań markerów nierzadko wymaga wieloletnich badań. Jednak po ich zakończeniu możliwa jest szybka analiza określonych fragmentów genomu w posiadanych materiałach hodowlanych, co znacznie przyspiesza prowadzone prace i tworzenie nowych odmian.

Do analiz markerów molekularnych mających na celu wspomaganie prac hodowlanych stosowano na kolejnych etapach rozwoju wiele różnych technik. Jednak starsze metody, takie jak RFLP, RAPD czy AFLP, ustępują miejsca nowszym, które są prostsze w użyciu, tańsze lub bardziej powtarzalne i wiarygodne. Coraz częściej podstawową techniką analityczną staje się sekwencjonowanie DNA. Istnieją już metody szybkiego sekwencjonowania drugiej i trzeciej generacji, które znacznie ułatwiają wykrywanie nowych markerów molekularnych i szybkie ich powiązanie z cechami użytkowymi (Kircher i Kelso 2010, Deschamps i Campbell 2010, Glenn 2011, Liu i in. 2012, Quail i in. 2012, Poland i Rife 2012). Postęp w technologiach analizy molekularnej powoduje także przyspieszenie i zwiększenie przepustowości prowadzonych analiz, umożliwiając zbadanie większych populacji lub kolekcji linii hodowlanych w tym samym czasie. Dlatego w przyszłości można się spodziewać jeszcze szerszego wykorzystania metod molekularnych w pracach hodowlanych nad rzepakiem, co przyczyni się do dalszego postępu w uprawie tej rośliny.

## Literatura

---

- Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Cregan P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132: 1131-1139.
- Ali M., Copeland L.O., Elias S.G., Kelly J.D. 1995. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 91: 118-121.
- Allender C.J., Allainguillaume J., Lynn J., King G.J. 2007. Simple sequence repeats reveal uneven distribution of genetic diversity in chloroplast genomes of *Brassica oleracea* L. and (n = 9) wild relatives. *Theor. Appl. Genet.*, 114: 609-618.
- Allender C.J., King G.J. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology*, 10: 54.
- Barret P., Delourme R., Foisset N., Renard M. 1998. Development of a SCAR (sequence characterised amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (*Bzh*) gene in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 828-833.
- Bartkowiak-Broda I. 1997. Markery molekularne w hodowli rzepaku. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVIII (2): 581-585.

- Basunanda P., Spiller T.H., Hasan M., Gehringer A., Schondelmaier J., Lühs W., Friedt W., Snowdon R.J. 2007. Marker-assisted increase of genetic diversity in a double-low seed quality winter oilseed rape genetic background. *Plant Breeding*, 126: 581-587.
- 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 Sci.*, 43: 797-806.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.V. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.
- Brown G.G., Formanová N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W.Y., Landry B.S. 2003. The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *The Plant Journal*, 35: 262-272.
- Brown G.G., Gaborieau L. 2011. Positional cloning in *Brassica napus*: Strategies for circumventing genome complexity in a polyploid plant. [W:] Brown G.G. (ed.). *Molecular Cloning – Selected Applications in Medicine and Biology*. InTech, <http://www.intechopen.com/books/molecular-cloning-selected-applications-in-medicine-and-biology/positional-cloning-in-brassica-napus-strategies-for-circumventing-genome-complexity-in-a-polyploid-p>.
- Chèvre A.M., Barret P., Eber F., Dupuy P., Brun H., Tanguy X., Renard M. 1997. Selection of stable *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of introgression. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 1104-1111.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc.*, B 363: 557-572.
- Delourme R., Bouchereau A., Hubert N., Renard M., Landry B.S. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 88: 741-748.
- Delourme R., Falentin C., Huteau V., Clouet V., Horvais R., Gandon B., Specel S., Hanneton L., Dheu J.E., Deschamps M., Margale E., Vincourt P., Renard M. 2006. Genetic control of oil content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 113: 1331-1345.
- Delourme R., Foisset N., Horvais R., Barret P., Champagne G., Cheung W.Y., Landry B.S., Renard M. 1998. Characterization of the radish introgression carrying the *Rfo* restorer gene for the *Ogu*-INRA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 97: 129-134.
- Deschamps S., Campbell M.A. 2010. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Mol. Breeding*, 25: 553-570.
- Dice L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Falentin C., Brégeon M., Lucas M.O., Deschamps M., Leprince F., Fournier M.T., Delourme R., Renard M. 2007a. Identification of *fad2* mutations and development of Allele-Specific Markers for High Oleic acid content in rapeseed (*Brassica napus* L.). Proc. 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China, March 2007, 2: 117-119.
- Falentin C., Brégeon M., Lucas M.O., Renard M. 2007b. Genetic markers for high oleic content in plants. International Patent Publication WO 2007/138444.
- Foisset N., Delourme R., Barret P., Renard M. 1995. Molecular tagging of the dwarf *BREIZH* (*Bzh*) gene in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 756-761.
- Formanová N., Li X.Q., Ferrie A.M.R., DePauw M., Keller W.A., Landry B., Brown G.G. 2006. Towards positional cloning in *Brassica napus*: generation and analysis of doubled haploid

- B. rapa* possessing the *B. napus pol* CMS and *Rfp* nuclear restorer gene. *Plant Molecular Biology*, 61: 269-281.
- Fourmann M., Barret P., Renard M., Pelletier G., Delourme R., Brunel D. 1998. The two genes homologous to *Arabidopsis FAE1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 852-858.
- Glenn T.C. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11: 759-769.
- Gupta P.K., Rustgi S., Kulwal P.L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57: 461-485.
- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann J., Freitag N.M., Link K., Snowdon R.J. 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus ssp. napus*). *Theor. Appl. Genet.*, 116: 1035-1049.
- Howell P.M., Sharpe A.G., Lydiate D.J. 2003. Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 46 (3): 454-460.
- Hu J., Li G., Struss D., Quiros C.F. 1999. SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed, *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 118: 145-150.
- Hu X., Sullivan-Gilbert M., Kubik T., Danielson J., Hnatiuk N., Marchione W., Gupta M., Armstrong K., Thompson S. 2007. Development of molecular markers specific to the Ogura fertility restorer gene *Rfo* in canola (*Brassica napus* L.). *Proc. 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China, March 2007*, 2: 314-316.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Soc. Vaud. Sci. Nat. Bull.*, 44: 223-270.
- Jacob H.J., Lindpaintner K., Lincoln S.E., Kusumi K., Bunker R.K., Mao Y.P., Ganten D., Dzau V.J., Lander E.S. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*, 67: 213-224.
- Jean M., Brown G.G., Landry B.S. 1997. Genetic mapping of nuclear fertility restorer genes for the 'Polima' cytoplasmic male sterility in canola (*Brassica napus* L.) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 321-328.
- Jean M., Brown G.G., Landry B.S. 1998. Targeted mapping approaches to identify DNA markers linked to the *Rfp1* restorer gene for the 'Polima' CMS of canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 97: 431-438.
- Jondle R.J. 1992. Legal aspects of varietal protection using molecular markers. [W:] *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Proceedings of the Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992, Minneapolis, USA: 50-52.*
- Jourdren C., Barret P., Brunel D., Delourme R., Renard M. 1996a. Specific molecular marker of the genes controlling linolenic acid content in rapeseed. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 512-518.
- Jourdren C., Barret P., Horvais R., Foisset N., Delourme R., Renard M. 1996b. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic acid level in rapeseed. *Molecular Breeding*, 2: 61-71.
- Kaur S., Cogan N.O.I., Ye G., Baillie R.C., Hand M.L., Ling A.E., Mcgearey A.K., Kaur J., Hopkins C.J., Todorovic M., Mountford H., Edwards D., Batley J., Burton W., Salisbury P., Gororo N., Marcroft S., Kearney G., Smith K.F., Forster J.W., Spangenberg G.C. 2009. Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 120: 71-83.
- Kesseli R.V., Paran I., Michelmore R.W. 1992. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. [W:]

- Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, Proceedings of the Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992, Minneapolis, USA: 31-37.
- Kircher M., Kelso J. 2010. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *Bioessays*, 32: 524-536.
- Konieczny A., Ausubel F.A. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4: 403-410.
- Korte A., Farlow A. 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9: 29.
- Krishnasamy S., Makaroff C. 1993. Characterization of the radish mitochondrial *orf B* locus: possible relationship with male sterility in *Ogura radish*. *Curr. Genet.*, 24: 156-163.
- Krzymański J. 1997. Hodowla jakościowa roślin. Hodowla roślin – materiały z I Krajowej Konferencji, 19-20 listopada 1997, Poznań: 333-337.
- Leflon M., Brun H., Eber F., Delourme R., Lucas M.O., Vallée P., Ermel M., Balesdent M.H., Chèvre A.M. 2007. Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 115: 897-906.
- Lewis C.M., Knight J. 2012. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harbor Protoc.* doi:10.1101/pdb.top068163, 297-306.
- Liersch A., Krótka K., Bartkowiak-Broda I. 2010a. Możliwości zastosowania markerów molekularnych w badaniu dystansu genetycznego linii hodowlanych rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (2): 221-228.
- Liersch A., Popławska W., Ogrodowczyk M., Krótka K., Bartkowiak-Broda I., Bocianowski J. 2010b. Oszacowanie dystansu genetycznego linii rodzicielskich mieszańców F<sub>1</sub> rzepaku ozimego oraz określenie związku z dystansem fenotypowym i efektem heterozji. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (2): 229-242.
- Litt M., Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 397-401.
- Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: Article ID 251364.
- Lombard V., Baril C.P., Dubreuil P., Blouet F., Zhang D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars using AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Sci.*, 40: 1417-1425.
- Lu Y.H., Arnaud D., Belcram H., Falentin C., Rouault P., Piel N., Lucas M.O., Just J., Renard M., Delourme R., Chalhoub B. 2012. A dominant point mutation in a RINGv E3 ubiquitin ligase homoeologous gene leads to cleistogamy in *Brassica napus*. *The Plant Cell*, 24: 4875-4891.
- Mackay I., Powell W. 2007. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends in Plant Science*, 12: 57-63.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F., Thomas G. 2000. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 885-891.
- Marchini J., Cardon L.R., Phillips M.S., Donnelly P. 2004. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nature Genetics*, 36: 512-517.
- Matuszczak M. 2004. Ochrona praw hodowców odmian rzepaku – koncepcja odmiany w istocie pochodnej (EDV). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXV (2): 655-669.
- Matuszczak M. 2010. Identyfikacja loci cech jakościowych rzepaku ozimego (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). Praca doktorska, ZGiHRO IHAR-PIB, Poznań.

- Matuszczak M., Tokarczuk I., Spasibionek S., Bartkowiak-Broda I. 2013. Analiza DNA rzepaku za pomocą markera specyficznego dla mutacji w genie *fad2*. Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane, 4-8.02.2013, Streszczenia: 147-148.
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828-9832.
- Mikołajczyk K. 2007. Nowe osiągnięcia analiz genetycznych w hodowli molekularnej rzepaku. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXVIII (1): 27-38.
- Mikołajczyk K. 2008. Zastosowanie genomiki strukturalnej i funkcjonalnej w nowoczesnej hodowli roślin z rodziny *Brassicaceae*. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXIX (2): 273-290.
- Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Dabert M., Karłowski W.M., Spasibionek S. 2012a. Patent nr PAT.211126 udzielony dnia 11.05.2012 r., Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej.
- Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Dabert M., Podkowiński J. 2012b. Patent nr PAT.212433 udzielony dnia 02.11.2012 r., Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej.
- Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Popławska W., Spasibionek S., Dobrzycka A., Dabert M. 2012c. A multiplex fluorescent PCR assay in molecular breeding of oilseed rape. [W:] Abdurakhmonov I. (ed.). *Plant Breeding. InTech*, <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/a-multiplex-fluorescent-pcr-assay-in-molecular-breeding-of-oilseed-rape>.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W.M., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2007. Development of allele-specific SNP markers for the new low-linolenic mutant of winter oilseed rape. *Proc. 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China, March 2007*, 2: 282-284.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W.M., Spasibionek S., Nowakowska J., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2010a. Allele-specific SNP markers for the new low linolenic mutant genotype of winter oilseed rape. *Plant Breeding*, 129: 502-507.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Nowakowska J., Podkowiński J., Popławska W., Bartkowiak-Broda I. 2008. Conversion of the RAPD OPC02<sub>1150</sub> marker of the *Rfo* restorer gene into a SCAR marker for rapid selection of oilseed rape. *Plant Breeding*, 127: 647-649.
- Mikołajczyk K., Dobrzycka A., Podkowiński J., Popławska W., Spasibionek S., Bartkowiak-Broda I. 2010b. A multiplex PCR assay for identification of the *ogura* male sterile cytoplasm and the *Rfo* restorer gene among oilseed rape breeding forms. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (2): 201-210.
- Mikołajczyk K., Matuszczak M., Piętka T., Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. 1998. Zastosowanie markerów DNA do badań odmian składników mieszańcowych rzepaku. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XIX (2): 463-471.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R., Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-103.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 5269-5273.
- Pilet M.L., Delourme R., Foisset N., Renard M. 1998a. Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 96: 23-30.
- Pilet M.L., Delourme R., Foisset N., Renard M. 1998b. Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 97: 398-406.

- Pilet M.L., Duplan G., Archipiano H., Barret P., Baron C., Horvais R., Tanguy X., Lucas M.O., Renard M., Delourme R. 2001. Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Sci.*, 41: 197-205.
- Poland J.A., Rife T.W. 2012. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*, 5: 92-102.
- Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13: 341.
- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 94-100.
- Rafalski J.A., Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.*, 9: 275-279.
- Rahman M., Sun Z., McVetty P.B.E., Li G. 2008. High throughput genome-specific and gene-specific molecular markers for erucic acid genes in *Brassica napus* (L.) for marker-assisted selection in plant breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 117: 895-904.
- Rogers J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics VII*. University of Texas Publ., 7213: 145-153.
- Shiran B., Azimkhani R., Mohammadi S., Ahmadi M.R. 2006. Potential use of Random Amplified Polymorphic DNA marker in assessment of genetic diversity and identification of rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *Biotechnology*, 5 (2): 153-159.
- Snowdon R.J., Friedt W. 2004. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 123: 1-8.
- Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear fragment length polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 784-794.
- Sokal R.R., Michener C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.*, 38: 1409-1438.
- Somers D.J., Rakow G., Prabhu V.K., Friesen K.R. 2001. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome*, 44: 1077-1082.
- Spasibionek S. 2006. New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) with changed fatty acid composition. *Plant Breeding*, 125: 259-267.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos – Problemy Nauk Przyrodniczych*, 54 (2-3): 227-239.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology*, 7: 257-264.
- Uzunova M., Ecke W., Weissleder K., Röbbelen G. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theor. Appl. Genet.*, 90 (2): 194-204.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23 (21): 4407-4414.
- Walsh J.A., Sharpe A.G., Jenner C.E., Lydiat D.J. 1999. Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of *TuRB01*. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 1149-1154.

- 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. *Nucleic Acid Res.* 18 (22): 6531-6535.
- Xiao S., Xu J., Li Y., Zhang L., Shi S., Shi S., Wu J., Liu K. 2007. Generation and mapping of SCAR and CAPS markers linked to the seed coat color gene in *Brassica napus* using a genome-walking technique. *Genome*, 50: 611-618.
- Young N.D., Zamir D., Ganai M.W., Tanksley S.D. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics*, 120: 579-585.
- Yu C.Y., Hu S.W., Zhao H.X., Guo A.G., Sun G.L. 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.
- Zabeau M., Vos P. 1993. European Patent Publication EP 0534858.
- Zhao J., Meng J. 2003. Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 106: 759-764.