

Joanna Nowakowska, Katarzyna Mikołajczyk, Krystyna Krótka,
Iwona Bartkowiak-Broda

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

Ocena dystansu genetycznego linii rodzicielskich mieszańców F₁ rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) za pomocą metody RAPD

Assessment of genetic distance in parental lines of F₁ winter rapeseed hybrids (*Brassica napus* L.) using RAPD method

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, mieszańce F₁, RAPD, dystans genetyczny

Dobór odpowiednich komponentów rodzicielskich odmiany mieszańcowej jest warunkiem uzyskania wysokoplonującego pokolenia mieszańcowego F₁. Celem pracy było określenie dystansu genetycznego między liniami rodzicielskimi oraz zbadanie zależności wielkości plonu otrzymanych mieszańców od wartości dystansu genetycznego pomiędzy poszczególnymi parami linii rodzicielskich. Materiał badawczy stanowiło 5 linii CMS *ogura* oraz 6 homozygotycznych linii restorerów — komponentów 18 mieszańców pokolenia F₁. Wartości dystansu genetycznego określone dla linii rodzicielskich przy użyciu 150 markerów typu RAPD wyniosły od 0,0339 do 0,8362. Plony mieszańców ocenionych w doświadczeniu polowym wahały się od 56,2 do 69,2 dt/ha. Kombinacje rodzicielskie mieszańców z grupy najwyżej plonujących charakteryzowały się wysoką wartością dystansu genetycznego. Obliczone korelacje wykazały pozytywną zależność między wartością dystansu genetycznego pomiędzy poszczególnymi parami linii rodzicielskich a wielkością plonu mieszańców F₁. Otrzymane wyniki są wstępnym etapem badań i wymagają kilkuletnich obserwacji polowych.

Key words: winter oilseed rape, F₁ hybrids, RAPD, genetic distance

The proper selection of both parental components of hybrid cultivar is required in order to obtain F₁ hybrid generation characterized by a high yield of seeds. The aim of this work was to estimate genetic distance among parental lines and to establish a correlation between seed yield of obtained hybrids and the genetic distance values between particular parental line pairs. The objects of research were: five CMS *ogura* lines and six homozygotic restorer lines — the components of eighteen restored F₁ hybrids. The genetic distance values, estimated using 150 RAPD markers, ranged from 0.0339 to 0.8362. Seed yield of the obtained hybrids were investigated in the field trials and ranged from 56.2 to 69.2 dt/ha. High yielding hybrids were obtained as a result of combinations of parents characterized by a high genetic distance value. Positive correlations were obtained between genetic distance values and seed yield and oil content in the seeds. Obtained results are the background for further investigations, which require several years of field observations.

Wstęp

W ostatnich latach wyhodowano i zaczęto wdrażać do uprawy odmiany mieszańcowe rzepaku, w których występuje efekt heterozji przejawiający się bujniejszym rozwojem roślin i większym plonem nasion w stosunku do form rodzicielskich (Wójtowicz i in. 2003).

Efekt heterozji występujący w plonie nasion rzepaku został stwierdzony przez wielu badaczy na różnym materiale genetycznym (Bartkowiak-Broda 1977, 1998; Grabiec 1981; Grant i in. 1985; Lefort-Buson, Dattée 1982, 1983, 1985; Krzymański i in. 1993, 1994, 1998; Liersch i in. 2000).

W Europie hodowla odmian mieszańcowych rzepaku oparta jest na dwóch systemach genetycznych kontrolujących zapylenie krzyżowe: genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterility CMS *ogura* oraz genetycznej męskiej sterility MSL-NPZ Lembke (Bartkowiak-Broda i in. 2001). W Polsce w hodowli odmian mieszańcowych rzepaku wykorzystuje się system CMS *ogura*.

Uzyskanie wysokoplonujących mieszańców zależy od właściwego doboru linii rodzicielskich do krzyżowania. Hodowla mieszańcowa wymaga stosowania metod umożliwiających szybką ocenę dużej ilości linii. Jednocześnie identyfikacja komponentów rodzicielskich wytwarzających wysokoplonujące potomstwo jest jednym z najbardziej kosztownych etapów w programie hodowlanym (Riaz i in. 2001). Do niedawna kombinacje genotypów zapewniających wysokie plonowanie były wyznaczane na podstawie krzyżowań testowych poprzez ocenę ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej. Ponadto u *Brassica napus* polimorfizm określano na podstawie ekspresji fenotypowej niektórych cech jakościowych takimi metodami jak: HPLC (ang. *high pressure liquid chromatography*) — wysokociśnieniowa chromatografia gazowa (analiza glukozytanów) (Adams i in. 1989), GLC (ang. *gas liquid chromatography*) — chromatografia gazowa (profile kwasów tłuszczowych w oleju) (White i Law 1991), izoenzymy (elektroforeza białek w żelu skrobiowym) (Mundges i in. 1990). Techniki te wykazywały jednak ograniczony stopień zróżnicowania genotypów ze względu na zależność ocenianych cech od warunków środowiska (Charters i in. 1996), a w przypadku izoenzymów z powodu ograniczonej liczby poznanych enzymów i *loci* genów kodujących (Sun i in. 1999). Obecnie dzięki rozwojowi metod biologii molekularnej umożliwiających badanie polimorfizmu genotypów na poziomie DNA poszukuje się szybkich metod przewidywania wysokoplonujących kombinacji mieszańcowych. Według teorii dotyczących warunkowań genetycznych zjawiska heterozji, bujność mieszańców jest powodowana współdziałaniem allelicznych genów dominujących (hipoteza dominacji) albo heterozygotycznością *loci* (hipoteza naddominacji) (Pała 2002). Z tego względu najczęściej poszukuje się związku dystansu genetycznego z efektem heterozji i plonem.

Dystans genetyczny bada się przede wszystkim przy pomocy różnych metod pozwalających na ocenę polimorfizmu DNA, który jest niezależny od modyfikującego wpływu środowiska. Ocenę tego dystansu mogą także wspomagać cechy fenotypowe.

Od początku lat 90-tych do badania polimorfizmu genetycznego wykorzystuje się markery DNA typu: RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*), RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*), AFLP (ang. *amplified fragments length polymorphism*) oraz SSR (ang. *single sequence repeat*). Teoretyczne podstawy związku między dystansem genetycznym a heterozją przedstawił Bernardo (1992). Stwierdził on, że markery molekularne mogą być użyteczne do przewidywania heterozji jeśli: wykazują silny efekt dominacji, częstości ich alleli są negatywnie skorelowane między rodzicami, ich odziedziczalność jest wysoka oraz istnieje powiązanie między markerami a *loci* cech ilościowych (ang. QTL — *quantitative trait loci*). Markery DNA uzyskane metodą RAPD znalazły szerokie zastosowanie do badania dystansu genetycznego u wielu gatunków roślin uprawnych. Segregację markerów RAPD według praw Mendla oraz stabilność stosunków dziedziczenia obserwowano w różnych gatunkach, takich jak: jęczmień, soja, lucerna (Williams i in. 1990, Echt i in. 1992, Tinker i in. 1993 cyt. za Lannér i in. 1996). W badaniach nad *Brassica* markery RAPD są uważane za tak samo efektywne jak markery RFLP do szacowania wewnątrzgatunkowego pokrewieństwa między genotypami (Demeke i in. 1992, Thormann i in. 1994, dos Santos i in. 1994). Technika RAPD jest obecnie jedną z najszybszych, najprostszych i najtańszych metod, szczególnie dogodną do badania polimorfizmu genetycznego.

Celem pracy było zbadanie polimorfizmu genetycznego linii rodzicielskich mieszańców oraz określenie związku wartości dystansu genetycznego pomiędzy poszczególnymi parami linii CMS *ogura* i linii restorerów z wielkością efektu heterozji mieszańców otrzymanych w wyniku krzyżowania tych linii.

Material i metodyka

Material badawczy stanowiły linie rodzicielskie mieszańców F_1 , których plon był oceniany w doświadczeniu polowym: 5 linii CMS *ogura* w pokoleniu BC_7 : 142/02, 152/02, 170/02, 1120/03, 1122/03 i 6 homozygotycznych linii restorerów w pokoleniu F_8 : 1015/03, 1031/03, 1133/03, 1147/03, 1171/03, 1640/03.

Ocena plonowania

Obiektami badań było 18 zrestorowanych mieszańców F_1 rzepaku ozimego otrzymanych z kombinacji krzyżowań linii CMS *ogura* i linii restorerów (tab. 1). Mieszańce te w sezonie wegetacyjnym 2003/2004 po raz pierwszy oceniano w doświadczeniu polowym założonym w Borowie (Hodowla Roślin Strzelce, Spółka z o.o.), w układzie kompletnych bloków zrandomizowanych, w czterech powtórzeniach, z dwoma odmianami wzorcowymi: Lisek i Kronos F_1 . Powierzchnia poletek doświadczalnych wynosiła 10 m^2 . Mieszańce były różnicowane pod względem zawartości glukozyolanów w nasionach siewnych F_1 (tab. 2).

Tabela 1

Charakterystyka mieszańców F₁ badanych w doświadczeniu polowym 2003/2004*Characteristics of F₁ hybrids investigated in the field trial 2003/2004*A — % wzorca Lisek — *per cent of standard Lisek*B — % wzorca Kronos F₁ — *per cent of standard Kronos F₁*

| Mieszańce <i>Hybrids</i> | Kombinacje <i>Combinations</i> | Dystans genetyczny <i>Genetic distance</i> | Plon nasion — <i>Yield of seeds</i> | | |
|---|-----------------------------------|--|-------------------------------------|--------|--------|
| | | | dt/ha | A | B |
| M4/03 | 142/02 × 1015/03 | 0,6597 | 60,52 | 91,96 | 83,67 |
| M6/03 | 142/02 × 1031/03 | 0,6864 | 62,24 | 94,58 | 86,38 |
| M7/03 | 142/02 × 1133/03 | 0,7000 | 67,81 | 102,73 | 93,99 |
| M8/03 | 142/02 × 1147/03 | 0,6729 | 66,91 | 101,20 | 93,47 |
| M9/03 | 142/02 × 1171/03 | 0,8315 | 63,00 | 95,72 | 87,19 |
| M10/03 | 142/02 × 1640/03 | 0,6597 | 61,33 | 93,20 | 84,54 |
| M15/03 | 152/02 × 1133/03 | 0,7709 | 66,06 | 100,10 | 92,06 |
| M16/03 | 152/02 × 1147/03 | 0,7419 | 63,79 | 96,68 | 89,05 |
| M17/03 | 152/02 × 1171/03 | 0,8160 | 69,22 | 105,00 | 96,10 |
| M18/03 | 152/02 × 1640/03 | 0,7000 | 59,16 | 89,93 | 81,81 |
| M24/03 | 170/02 × 1133/03 | 0,5716 | 56,24 | 85,46 | 78,56 |
| M25/03 | 170/02 × 1147/03 | 0,5476 | 62,14 | 94,20 | 86,36 |
| M26/03 | 170/02 × 1171/03 | 0,7138 | 59,20 | 89,76 | 82,38 |
| M27/03 | 170/02 × 1640/03 | 0,5596 | 60,75 | 92,32 | 84,10 |
| M33/03 | 1120/03 × 1133/03 | 0,6337 | 57,00 | 86,35 | 79,43 |
| M34/03 | 1120/03 × 1147/03 | 0,6084 | 63,52 | 96,13 | 88,39 |
| M35/03 | 1120/03 × 1171/03 | 0,7563 | 61,31 | 92,58 | 85,80 |
| M36/03 | 1122/03 × 1640/03 | 0,6729 | 59,64 | 90,23 | 83,00 |
| Średnia — <i>Mean</i> | | 0,6835 | 62,21 | 94,34 | 86,46 |
| Maksimum | | 0,8315 | 69,22 | 105,00 | 96,10 |
| Minimum | | 0,5476 | 56,24 | 85,46 | 78,56 |
| Współ. zmienności — <i>Coefficient of variability</i> | | | 5,73 | 5,68 | 5,75 |
| Średnie wzorców — <i>Means of standards</i> | | | | | |
| Lisek | | | 66,12 | 100,00 | 92,16 |
| Kronos F ₁ | | | 72,20 | 109,59 | 100,00 |
| F _{obl.} — <i>F_{cal.}</i> | | | 1,95* | | |
| NIR _{0,05} — <i>LSD_{0,05}</i> | | | 8,35 | | |
| NIR _{0,01} — <i>LSD_{0,01}</i> | | | 11,11 | | |

* istotność na poziomie — *significant at the level α = 0,05*** istotność na poziomie — *significant at the level α = 0,01*

ciąg dalszy tabeli 1

| Mieszańce <i>Hybrids</i> | Masa 1000 nasion <i>1000 seeds weight [g]</i> | Liczba nasion w łuszczyńce <i>Number of seeds per pod</i> | Długość łuszczyń <i>Length of pods [mm]</i> | Zawartość chlorofilu <i>Chlorophyll content [jedn. SPAD]</i> | Zawartość tłuszczu <i>Fat content [%]</i> |
|--|---|---|---|--|---|
| M4/03 | 4,59 | 28,18 | 84,80 | 830,33 | 46,78 |
| M6/03 | 4,67 | 25,95 | 79,83 | 844,67 | 47,80 |
| M7/03 | 4,68 | 26,70 | 82,48 | 842,33 | 48,33 |
| M8/03 | 4,77 | 24,63 | 80,60 | 821,33 | 49,33 |
| M9/03 | 4,47 | 25,58 | 82,58 | 812,33 | 49,23 |
| M10/03 | 4,77 | 25,98 | 81,05 | 839,33 | 48,78 |
| M15/03 | 4,72 | 24,45 | 79,15 | 808,33 | 49,55 |
| M16/03 | 4,79 | 25,30 | 80,63 | 820,00 | 49,20 |
| M17/03 | 4,60 | 21,78 | 78,43 | 785,67 | 51,28 |
| M18/03 | 4,41 | 25,68 | 80,60 | 811,00 | 49,33 |
| M24/03 | 4,94 | 27,53 | 85,73 | 815,67 | 47,28 |
| M25/03 | 4,72 | 24,88 | 84,75 | 809,33 | 46,83 |
| M26/03 | 4,82 | 23,03 | 84,13 | 759,67 | 49,15 |
| M27/03 | 4,74 | 27,70 | 84,43 | 798,67 | 47,67 |
| M33/03 | 4,34 | 27,60 | 80,75 | 774,67 | 47,85 |
| M34/03 | 4,43 | 26,50 | 79,65 | 795,67 | 48,23 |
| M35/03 | 4,28 | 24,90 | 81,68 | 753,33 | 49,50 |
| M36/03 | 4,29 | 26,35 | 79,55 | 791,33 | 48,18 |
| Średnia — <i>Mean</i> | 4,61 | 25,71 | 81,70 | 806,31 | 48,57 |
| Maksimum | 4,94 | 28,18 | 85,73 | 844,67 | 51,28 |
| Minimum | 4,28 | 21,78 | 78,43 | 753,33 | 46,78 |
| Współ. zmienności <i>Coefficient of variability</i> | 4,12 | 6,38 | 2,75 | 3,27 | 2,33 |
| Średnie wzorców — <i>Means of standards</i> | | | | | |
| Lisek | 4,35 | 29,65 | 85,85 | 767,67 | 46,65 |
| Kronos F ₁ | 4,14 | 30,48 | 90,68 | 767,33 | 48,00 |
| F obl. — <i>F cal.</i> | 9,38** | 7,87** | 4,78** | 4,33** | 8,59** |
| NIR _{0,05} — <i>LSD_{0,05}</i> | 0,21 | 2,08 | 3,91 | 38,06 | 1,12 |
| NIR _{0,01} — <i>LSD_{0,01}</i> | 0,27 | 2,77 | 5,21 | 50,96 | 1,49 |

* istotność na poziomie — *significant at the level $\alpha = 0,05$* ** istotność na poziomie — *significant at the level $\alpha = 0,01$*

Tabela 2

Suma glukozynolanów w nasionach siewnych i zebranych z roślin pokolenia F₁
Sum of glucosinolates in sowing and harvested seeds from F₁ plants

| Mieszańce <i>Hybrids</i> | Suma glukozynolanów w nasionach siewnych <i>Sum of glucosinolates in sowing seeds</i> [μM/g nasion] | Suma glukozynolanów w nasionach zebranych <i>Sum of glucosinolates in harvested seeds</i> [μM/g nasion] |
|--|--|--|
| M4/03 | 10,6 | 9,1 |
| M6/03 | 13,8 | 9,1 |
| M7/03 | 12,5 | 10,0 |
| M8/03 | 12,4 | 7,8 |
| M9/03 | 12,1 | 6,7 |
| M10/03 | 9,7 | 8,9 |
| M15/03 | 15,6 | 7,9 |
| M16/03 | 14,4 | 8,1 |
| M17/03 | 14,5 | 6,8 |
| M18/03 | 16,6 | 8,3 |
| M24/03 | 12,9 | 9,5 |
| M25/03 | 10,7 | 7,3 |
| M26/03 | 10,7 | 6,1 |
| M27/03 | 12,9 | 8,4 |
| M33/03 | 10,9 | 9,6 |
| M34/03 | 12,3 | 9,3 |
| M35/03 | 3,7 | 7,8 |
| M36/03 | 12,6 | 7,9 |
| Średnia — <i>Mean</i> | 12,2 | 8,3 |
| Maksimum | 16,6 | 10,0 |
| Minimum | 3,7 | 6,1 |
| Współczynnik zmienności <i>Coefficient of variability</i> | 22,9 | 13,1 |
| Średnie wzorców — <i>Means of standards</i> | | |
| Lisek | | 9,2 |
| Kronos F ₁ | | 8,9 |

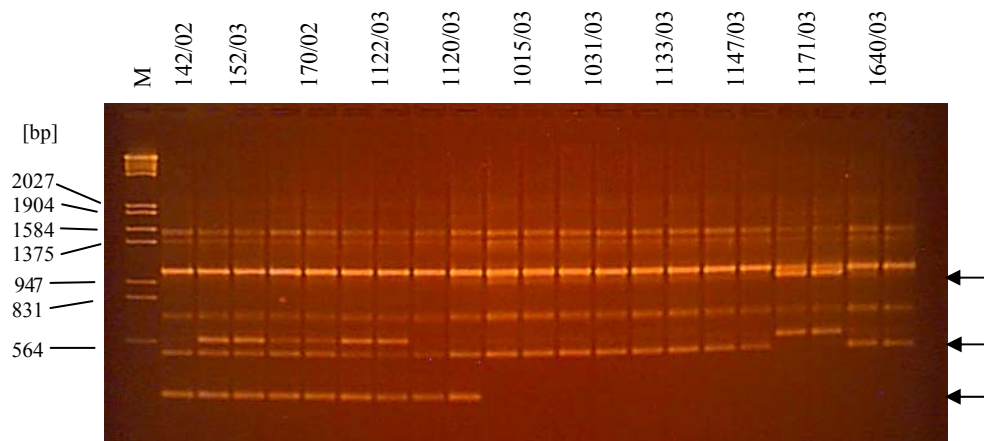
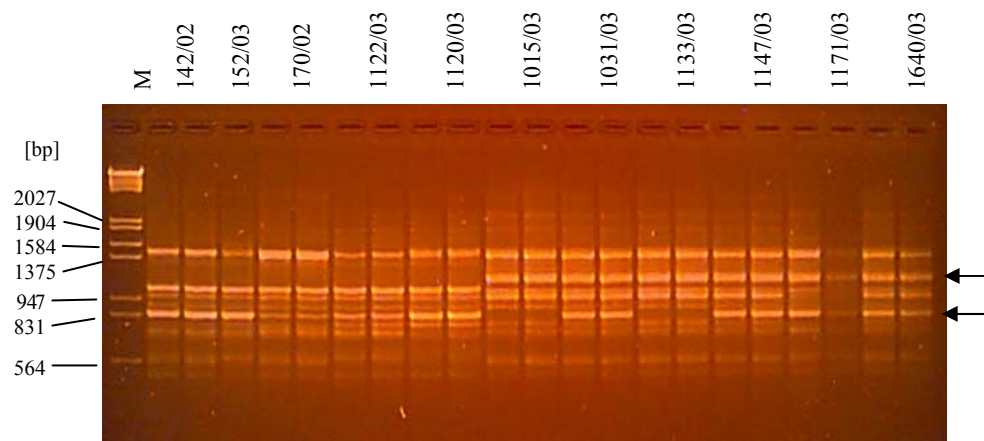
Ocena plonu została dokonana na podstawie zbioru nasion z całych polettek. Oceniono także składniki plonu: masę 1000 nasion, liczbę nasion w łuszczyńce oraz długość łuszczyń. Pomiar masy 1000 nasion został wykonany dla 4 prób z każdej kombinacji mieszańcowej. Liczba nasion w łuszczyńce i długość łuszczyń została określona na 25 roślinach z każdej kombinacji. Łuszczyńy pobierano ze

środkowej części roślin. Bonitację cech fenotypowych wykonano w skali 5-stopniowej, gdzie 5 stanowiło najlepszą ocenę. Pomiaru chlorofilu dokonano chlorometrem N tester SPAD-502 (ang. *Soil Plant Analysis Development*) po wiosennym ruszeniu wegetacji. Zawartość tłuszczu oznaczano za pomocą analizatora NMR firmy Newport, a zawartość glukozyzolanów metodą silylowych pochodnych glukozyzolanów za pomocą chromatografu firmy Perkin Elmer (Michalski i in. 1995). Wyniki opracowano statystycznie z zastosowaniem programu ANVAR.

Ocena dystansu genetycznego — izolacja i analiza DNA

DNA izolowano z liścieni sześciodniowych siewek rzepaku metodą opisaną przez Doyle'a i Doyle'a (1990). Jakość wyizolowanego DNA oceniano na 0,8% żelu agarozowym. DNA amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem 64 starterów RAPD firmy Operon Technologies (Williams i in. 1990). Podstawą do wyboru starterów było ich rozłożenie na mapie genetycznej rzepaku opracowanej przez Lombard i Delourme (2001). Zastosowano następujące startery: OPA-01, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-11, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-18, OPC-02, OPC-04, OPC-09, OPC-15, OPC-18, OPD-08, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-09, OPF-14, OPF-15, OPF-20, OPG-03, OPG-04, OPG-05, OPG-11, OPG-12, OPG-13, OPG-14, OPG-15, OPJ-07, OPK-08, OPL-12, OPN-01, OPN-02, OPN-07, OPN-13, OPN-18, OPN-20, OPP-03, OPP-05, OPP-07, OPP-08, OPP-09, OPP-11, OPP-14, OPW-02, OPW-03, OPW-05, OPW-08, OPW-09, OPW-11, OPW-13, OPW-15, OPW-19, OPW-20, OPV-07, OPY-01, OPY-02, OPY-04, OPY-05, OPY-10, OPY-13, OPY-15. Analizę DNA prowadzono z zastosowaniem reakcji PCR w termocyklerze w następujących warunkach: denaturacja wstępna w temp. 95°C przez 30 s, a następnie 45 cykli obejmujących denaturację — 95°C przez 30 s, przyłączenie starterów — 35°C przez 1 min. oraz elongację — 72°C przez 2 min. 30 s i elongację końcową — 72°C przez 5 min. Mieszanina reakcyjna, o objętości 12,5 µl zawierała: bufor do reakcji PCR [1 × stężony], MgCl₂ [2 mM], dNTP [0,1 mM], starter [0,2 µM] oraz 0,4 jednostki enzymatyczne polimerazy *Taq* firmy MB i Fermentas. Produkty amplifikacji analizowano na 1,8% żelach agarozowych (rys. 1).

Wartości dystansu genetycznego i dendrogram wynikające z polimorfizmu linii uzyskano na podstawie wzoru opracowanego przez Nei (1972) w pakiecie PHYLIP 3,5 (programy Seqboot, Gendist, Neighbor, Consense, Drawgram) (Felsenstein 1993). Dane zapisywano w systemie zero/jedynkowym (0 — brak prążka dla danej linii, 1 — występowanie prążka). Dendrogram utworzono stosując metodę UPGMA (ang. *unweighted pair — group method using arithmetic averages*) — analiza grup oparta na podobieństwie matryc.

OPF-04**OPC-02**

Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział na 1,8% żelu agarozowym produktów reakcji PCR-RAPD z zastosowaniem starterów OPF-04 i OPC-02. Na górze numery badanych linii. M – marker wielkości – DNA faga λ trawione enzymami restrykcyjnymi Eco RI i Hind III. Strzałki wskazują prążki polimorficzne — *1,8% agarose gel electrophoresis of PCR-RAPD products obtained using OPF-04 and OPC-02 primers. Numbers of studied lines above the photos. M – molecular marker – phage DNA λ digested with endonuclease Eco RI and Hind III. Arrows indicate polymorphic bands*

Wyniki

Plon

Ocenił na podstawie doświadczenia polowego plony mieszańców były zróżnicowane istotnie i wahały się od 56,2 do 69,2 dt/ha. Plon najlepszych mieszańców M17/03, M7/03, M8/03 i M15/03 wynosił odpowiednio 105,0, 102,7, 101,2 i 100,1% plonu odmiany wzorcowej Lisek. Żadna z kombinacji mieszańcowych nie plonowała istotnie lepiej od odmiany wzorcowej Kronos F₁ (tab. 1).

Badane mieszańce różniły się wysoce istotnie pod względem cech będących składnikami plonu, tj. masy 1000 nasion, liczby nasion w łuszczyńce i długości łuszczyń.

Średnia wartość masy 1000 nasion dla mieszańców wyniosła 4,61 g i była istotnie wyższa od średniej wartości dla odmiany wzorcowej Kronos F₁ (4,14 g). Najwyższą masą 1000 nasion charakteryzował się mieszaniec M24/03 (4,94 g), a najniższą M35/03 (4,28 g) (tab. 1).

Liczba nasion w łuszczyńce wynosiła od 25,7 do 28,2 i wszystkie mieszańce miały niższą liczbę nasion w łuszczyńce niż odmiany wzorcowe.

Najdłuższymi łuszczyńcami charakteryzował się mieszaniec M24/03 (85,73 mm), natomiast najmniejszą wartość dla tej cechy uzyskał mieszaniec M17/03 (78,43 mm). Średnia długość łuszczyń dla mieszańców (81,70 mm) była niższa od średnich wartości odmian wzorcowych (Lisek — 85,85 mm, Kronos F₁ — 90,68 mm) (tab. 1).

Średnia zawartość chlorofilu dla mieszańców wyniosła 806,3 jednostek SPAD i była wyższa od średnich wartości odmian wzorcowych (Lisek — 767,7 jedn. SPAD, Kronos F₁ — 767,3 jedn. SPAD). Mieszańce różniły się istotnie między sobą pod względem zawartości chlorofilu. Największą wartością charakteryzował się mieszaniec M6/03 (844,7 jedn. SPAD), a najmniejszą mieszaniec M35/03 (753,3 jedn. SPAD).

Zawartość tłuszczu w nasionach zebranych z mieszańców F₁ wahała się od 46,8% (M4/03) do 51,3% (M17/03). Mieszańce M17/03, M15/03 i M35/03 charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością tłuszczu w porównaniu z odmianą wzorcową Kronos F₁ (tab. 1).

Zawartość glukozydów w zebranych nasionach mieszańców wyniosła od 6,1 μM/g nasion (M26/03) do 10 μM/g nasion (M7/03). Średnia zawartość glukozydów wyniosła 8,3 μM/g nasion i była niższa od średnich wartości tej cechy dla odmian wzorcowych: Lisek — 9,2 μM/g nasion, Kronos F₁ — 8,9 μM/g nasion (tab. 2).

Obliczone korelacje dla badanych cech wykazały dodatnią zależność między wartością dystansu genetycznego a wielkością plonu i zawartością tłuszczu w nasionach. Plon nasion był dodatnio skorelowany z zawartością tłuszczu, natomiast odwrotna zależność wystąpiła między plonem a liczbą nasion w łuszczyńce i dłu-

gością łuszczyn. Wszystkie cechy wykazały brak korelacji z masą 1000 nasion. Zawartość chlorofilu była dodatnio skorelowana z sumą glukozynolanów. Dodatnią korelację otrzymano dla liczby nasion w łuszczynie i zawartości glukozynolanów, natomiast zawartość glukozynolanów była ujemnie skorelowana z zawartością tłuszczu (tab. 3).

Tabela 3

Współczynniki korelacji badanych cech — *Correlation coefficients of investigated traits*

| Cechy — <i>Traits</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|---------|--------|-------|---------|---------|-------|--------|---|
| 1. Dystans genetyczny <i>Genetic distance</i> | – | | | | | | | |
| 2. Plon nasion <i>Yield of seeds</i> | 0,48* | – | | | | | | |
| 3. Masa 1000 nasion <i>1000 seeds weight</i> | –0,24 | 0,14 | – | | | | | |
| 4. Liczba nasion w łuszczynie <i>Number of seeds per pod</i> | –0,61** | –0,53* | –0,11 | – | | | | |
| 5. Długość łuszczyn <i>Length of pod [mm]</i> | –0,48* | –0,47* | 0,42 | 0,39 | – | | | |
| 6. Zawartość chlorofilu <i>Chlorophyll content (SPAD)</i> | –0,17 | 0,26 | 0,44 | 0,35 | 0,04 | – | | |
| 7. Zawartość tłuszczu <i>Fat content [%]</i> | 0,81** | 0,55* | –0,12 | –0,78** | –0,63** | –0,31 | – | |
| 8. Suma glukozynolanów <i>Sum of glucosinolates [μM/g nasion]</i> | –0,51* | –0,19 | –0,02 | 0,78** | 0,04 | 0,48* | –0,53* | – |

* istotność na poziomie — *significant at the level $\alpha = 0,05$*

** istotność na poziomie — *significant at the level $\alpha = 0,01$*

Dystans genetyczny

DNA linii rodzicielskich mieszańców przebadano za pomocą 64 starterów RAPD Operon Technologies, z których 44 wykazywało polimorfizm między badanymi liniami (tab. 4). Uzyskano łącznie 351 prążków, w tym 150 różnicujących (rys. 1). Liczba prążków polimorficznych dla pojedynczego startera wynosiła od 1 do 7. Najwięcej prążków różnicujących otrzymano w reakcji ze starterem OPY-04 (7). Największy polimorfizm wykazały startery OPG-13 i OPY-10 (100%) (tab. 4). Spośród przebadanych starterów najczęściej na mapie genetycznej rzepaku Lombarda i Delourme (2001) wystąpiły: OPC 04, OPF 14 i OPF 15 (6 razy) (tab. 5), ale nie wygenerowały polimorficznych prążków w badanym materiale roślinnym. Wartości dystansu genetycznego dla wszystkich par badanych linii wyniosły od 0,0339 do 0,8362 (tab. 6). Dla par linii CMS *ogura* i restorerów dystans genetyczny wyniósł od 0,5333 do 0,8362. Kombinacje mieszańcowe z grupy najwyższej plonujących także charakteryzowały się wysoką wartością dystansu genetycznego

Tabela 4

Różnicujące startery RAPD Operon Technologies użyte do analizy 11 badanych linii rzepaku
Polymorphic RAPD Operon Technologies primers used in analysis of investigated eleven rapeseed lines

(a) — całkowita liczba prążków — *number of all bands*

(b) — liczba polimorficznych prążków — *number of polymorphic bands*

(c) = (b/a × 100) — % polimorfizmu — *per cent of polymorphism*

| Startery <i>Primers</i> | (a) | (b) | (c) | Startery <i>Primers</i> | (a) | (b) | (c) |
|----------------------------|-----|-----|--------|----------------------------|-----|-----|--------|
| OPA-01 | 7 | 3 | 42,86 | OPN-02 | 6 | 3 | 50,00 |
| OPA-07 | 7 | 4 | 57,14 | OPN-07 | 6 | 2 | 33,33 |
| OPA-08 | 5 | 3 | 60,00 | OPN-13 | 3 | 1 | 33,33 |
| OPA-09 | 6 | 2 | 33,33 | OPN-18 | 6 | 4 | 66,67 |
| OPA-11 | 6 | 4 | 66,67 | OPN-20 | 9 | 6 | 66,67 |
| OPA-15 | 6 | 5 | 83,33 | OPP-08 | 7 | 2 | 28,57 |
| OPA-18 | 7 | 3 | 42,86 | OPP-09 | 4 | 2 | 50,00 |
| OPC-02 | 7 | 2 | 28,57 | OPP-11 | 12 | 6 | 50,00 |
| OPC-09 | 7 | 5 | 71,43 | OPP-14 | 6 | 4 | 66,67 |
| OPC-18 | 7 | 4 | 57,14 | OPW-02 | 7 | 4 | 57,14 |
| OPF-01 | 6 | 5 | 83,33 | OPW-05 | 6 | 3 | 50,00 |
| OPF-04 | 8 | 4 | 50,00 | OPW-08 | 4 | 2 | 50,00 |
| OPF-06 | 3 | 2 | 66,67 | OPW-09 | 6 | 3 | 50,00 |
| OPF-09 | 5 | 1 | 20,00 | OPW-11 | 9 | 5 | 55,56 |
| OPF-20 | 2 | 1 | 50,00 | OPW-13 | 5 | 4 | 80,00 |
| OPG-03 | 4 | 3 | 75,00 | OPY-01 | 7 | 3 | 42,86 |
| OPG-04 | 5 | 3 | 60,00 | OPY-02 | 6 | 4 | 66,67 |
| OPG-05 | 4 | 2 | 50,00 | OPY-04 | 10 | 7 | 70,00 |
| OPG-13 | 4 | 4 | 100,00 | OPY-05 | 4 | 2 | 50,00 |
| OPG-14 | 3 | 1 | 33,33 | OPY-10 | 3 | 3 | 100,00 |
| OPK-08 | 5 | 3 | 60,00 | OPY-13 | 9 | 6 | 66,67 |
| OPL-12 | 9 | 4 | 44,44 | OPY-15 | 9 | 6 | 66,67 |

(tab. 1). Dendrogram stworzony w oparciu o markery RAPD ukazuje przyporządkowanie badanych genotypów do 3 grup: linie CMS *ogura*, linie restorery oraz linia CMS 142/02, która tworzy oddzielną grupę (rys. 2).

Dyskusja

Selekcja pod względem specyficznych cech jakościowych zawęży pule genów materiałów hodowlanych rzepaku, zmienność genetyczna wielu cech pożądanых dla celów hodowlanych zostaje ograniczona. Analizy z zastosowaniem markerów molekularnych umożliwiają odkrycie genetycznej różnorodności w obrębie gatunków, a wyznaczony na ich podstawie dystans genetyczny pozwala na przewidywanie efektu heterozji (Snowdon i Friedt 2004).

Tabela 5

Częstość występowania badanych starterów RAPD Operon Technologies na mapie genetycznej rzepaku — *Frequencies of occurrence of investigated RAPD Operon Technologies primers on rapeseed genetic map* (Lombard i Delourme 2001)

| 6 razy <i>six times</i> | 5 razy <i>five times</i> | 4 razy <i>four times</i> | 3 razy <i>three times</i> | 2 razy <i>twice</i> | 1 raz <i>once</i> |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------|
| OPC-04 | OPA-07 | OPA-16 | OPA-08 | OPA-09 | OPA-01 |
| OPF-14 | OPK-08 | OPV-07 | OPA-18 | OPA-11 | OPA-14 |
| OPF-15 | OPW-05 | OPW-08 | OPC-15 | OPC-02 | OPA-15 |
| | | OPY-04 | OPC-18 | OPF-01 | OPC-09 |
| | | OPY-15 | OPG-05 | OPF-04 | OPD-08 |
| | | | OPN-02 | OPF-06 | OPF-09 |
| | | | OPN-18 | OPG-04 | OPF-20 |
| | | | OPN-20 | OPG-13 | OPG-03 |
| | | | OPP-05 | OPG-14 | OPG-11 |
| | | | OPP-08 | OPL-12 | OPG-12 |
| | | | OPW-09 | OPN-01 | OPG-15 |
| | | | OPW-11 | OPN-13 | OPJ-07 |
| | | | OPW-19 | OPP-03 | OPN-07 |
| | | | OPY-01 | OPW-03 | OPP-07 |
| | | | | OPW-15 | OPP-09 |
| | | | | OPW-20 | OPP-11 |
| | | | | OPY-02 | OPP-14 |
| | | | | OPY-05 | OPW-02 |
| | | | | | OPW-13 |
| | | | | | OPY-10 |
| | | | | | OPY-13 |

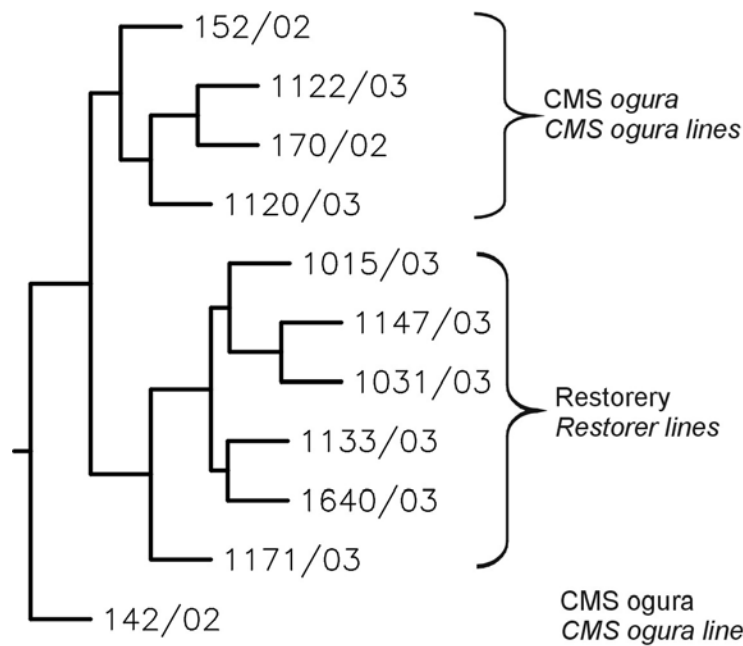
Użyteczność oceny dystansu genetycznego do przewidywania efektu heterozji badano u mieszańców wielu gatunków roślin uprawnych. Uzyskane wyniki były bardzo zróżnicowane, prawdopodobnie ze względu na duże różnice materiału badawczego oraz zastosowanych metod. Stosując markery RFLP u kukurydzy obserwowano zarówno znaczącą (Lee i in. 1989, Smith i in. 1990, Benchimol i in. 2000), jak i słabą korelację (Godshalk i in. 1990, Dudley i in. 1990, Bernardo 1994) między dystansem genetycznym a wielkością heterozji. Pejje i in. (1998) badając różne typy markerów DNA do oceny polimorfizmu między genotypami kukurydzy stwierdzili, że markery SSR wykazują największy poziom polimorfizmu, natomiast metoda AFLP pozwala na uzyskanie największej korelacji podobieństwa genetycznego z rodowodem analizowanych genotypów. Burton i in. (2004) uzyskali wysoką korelację dystansu genetycznego z heterozją ($r = 0,90$) stosując markery AFLP u *Brassica juncea*. Badając markery RFLP u rzepaku Knaak i Ecke (1995) uzyskali dodatnią korelację ($r = 0,72$) między dystansem genetycznym a heterozją

Tabela 6

Wartości dystansu genetycznego dla każdej z par badanych linii
Genetic distance values for each pair of the investigated lines

| | CMS | | | | | Restorer | | | | |
|---------|---------------|--------|--------|---------|---------|----------|---------------|---------|---------|---------|
| | 142/02 | 152/02 | 170/02 | 1122/03 | 1120/03 | 1015/03 | 1031/03 | 1133/03 | 1147/03 | 1171/03 |
| 142/02 | | | | | | | | | | |
| 152/02 | 0,3759 | | | | | | | | | |
| 170/02 | 0,3102 | 0,3193 | | | | | | | | |
| 1122/03 | 0,3378 | 0,2921 | 0,2148 | | | | | | | |
| 1120/03 | 0,3011 | 0,3102 | 0,2657 | 0,2744 | | | | | | |
| 1015/03 | 0,6539 | 0,7480 | 0,5333 | 0,6412 | 0,5680 | | | | | |
| 1031/03 | 0,6799 | 0,7480 | 0,5333 | 0,6931 | 0,5918 | 0,0690 | | | | |
| 1133/03 | 0,6931 | 0,7621 | 0,5680 | 0,7066 | 0,6286 | 0,0762 | 0,0762 | | | |
| 1147/03 | 0,6668 | 0,7340 | 0,5447 | 0,7066 | 0,6039 | 0,0907 | 0,0339 | 0,0834 | | |
| 1171/03 | 0,8362 | 0,8210 | 0,7202 | 0,8210 | 0,7621 | 0,5680 | 0,5918 | 0,5563 | 0,5563 | |
| 1640/03 | 0,6539 | 0,6931 | 0,5563 | 0,6668 | 0,5680 | 0,0834 | 0,0980 | 0,0762 | 0,0907 | 0,5220 |

Pogrubionym drukiem wyróżniono najwyższe i najniższe wartości
The highest and the lowest values are marked with a bold type



Rys. 2. Dendrogram określający podobieństwo linii CMS *ogura* i restorerów — *Dendrogram of relationship among CMS ogura and restorer lines*

mieszkańców F_1 . Brak znaczącej korelacji dystansu genetycznego szacowanego na podstawie markerów RAPD z wielkością heterozji obserwowano u pszenicy (Liu i in. 1999) i *Brassica juncea* (Jain i in. 1994).

W prezentowanej pracy uzyskano dodatnią istotną korelację pomiędzy wartościami dystansu genetycznego a plonem nasion ($r = 0,48$). Także Lanza i in. (1997) wykazali u kukurydzy dodatnią korelację plonu nasion z dystansem genetycznym ocenionym w oparciu o markery RAPD. Riaz i in. (2001) uzyskali wyniki wskazujące, że ze wszystkich badanych cech agronomicznych tylko plon nasion mieszańców rzepaku był dodatnio skorelowany z dystansem genetycznym opartym na analizie markerów SRAP (ang. *sequence related amplified polymorphism*). Autorzy przypuszczają, że korelacja taka może być wynikiem powiązania badanych markerów z loci cech QTL wpływających na wielkość plonu nasion. Według Zhang i in. (1996) heterozję można łatwiej przewidzieć stosując zestaw markerów związanych z interesującymi hodowcą cechami.

W przedstawionej pracy przebadano 11 linii komponentów rodzicielskich mieszańców 64 starterami RAPD uzyskując 150 różnicujących prążków wygenerowanych przez 44 spośród użytych starterów. Według Halldéna i in. (1994) prawdopodobieństwo błędu w technice RAPD zależy od liczby starterów oraz od stopnia spokrewnienia badanych linii i przy dużej liczbie ściśle spokrewnionych linii jest ono wyższe. Autorzy wyliczyli, że dla markerów RAPD przy 10–12 starterach prawdopodobieństwo błędu wynosi poniżej 1/100, a przy 20–22 starterach poniżej 1/1000. Równocześnie stwierdzili, że markery RAPD są informatywne przy szacowaniu pokrewieństwa między genotypami *Brassica napus*. Pejje i in. (1998) badając 33 linie kukurydzy różnymi markerami DNA, uzyskali wyniki wskazujące, że 40–50 starterów RAPD wystarczy do rzetelnego oszacowania genetycznego podobieństwa między analizowanymi liniami. Według Jain i in. (1994) u *Brassica juncea* wystarczyło 15–20 starterów RAPD aby uzyskać około 200 produktów amplifikacji. Wartości dystansu genetycznego i dendrogram uzyskane na podstawie markerów RAPD potwierdziły stopień pokrewieństwa między badanymi liniami wynikający z analizy ich pochodzenia. Podobne wyniki uzyskali także Mailer i in. (1994) oraz Fürguth in. (2000).

W celu określenia, które z badanych starterów mogły mieć wpływ na wielkość uzyskanego polimorfizmu linii, z plonem nasion porównano dystans genetyczny wygenerowany na podstawie 95 markerów pochodzących z reakcji z najbardziej różnicującymi starterami (tab. 4) oraz 86 markerów uzyskanych w reakcji ze starterami występującymi więcej niż jeden raz na mapie genetycznej rzepaku (Lombard i Delourme 2001) (tab. 5). W obydwu przypadkach nie stwierdzono istotnej korelacji między wielkością dystansu genetycznego a plonem nasion, prawdopodobnie ze względu na zbyt małą liczbę markerów. Według Pejje i in. (1998) błędy w szacowaniu dystansu genetycznego metodą RAPD mogą być wynikiem zastosowania niewystarczającej liczby starterów i uzyskania zbyt małej

ilości polimorficznych prążków. Wraz ze wzrostem starterów lub prążków użytych do analizy u rzepaku (Halldén i in. 1994) i fasoli (Skroch i in. 1992) zaobserwowano obniżenie wariancji w ocenie genetycznej różnorodności materiału roślinnego.

Z drugiej strony metoda matematyczna definiująca dystans genetyczny między populacjami na podstawie częstości polimorfizmu DNA osobników opiera się na porównaniu częstości prążków RAPD między parami (każda roślina jest porównywana z każdą z puli badanych). Metoda ta nie mierzy więc realnego dystansu między populacjami, ale wyróżnia populacje według ich fingerprintingu (Ghérardi i in. 1998). Bez odpowiedzi pozostaje więc pytanie, czy statystyczne szacowanie dystansu ma rzeczywiste odbicie w jego biologicznym znaczeniu.

Otrzymane wyniki są wstępnym etapem badań nad związkiem między dystansem genetycznym a wielkością efektu heterozji w pokoleniu F_1 i wymagają kilkuletnich obserwacji polowych.

Wnioski

1. Wartości dystansu genetycznego uzyskane na podstawie markerów RAPD potwierdzają genetyczne zróżnicowanie badanych linii CMS *ogura* i linii restorerów.
2. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy wartościami dystansu genetycznego linii rodzicielskich a plonem nasion mieszańców F_1 .

Literatura

- Adams H., Vaughan J.G., Fenwick G.R. 1989. The use of glucosinolates for cultivar identification in Swede, *Brassica napus* L. var. *napobrassica* (L.). *Plant Food Sci. Food Agric.*, 46: 319-324.
- Bartkowiak-Broda I. 1977. Ocena heterozji i zdolności kombinacyjnej kilku linii wsobnych rzepaku. *Biuletyn IHAR*, 146: 109-111.
- Bartkowiak-Broda I. 1998. Odmiany mieszańcowe rzepaku – osiągnięcia i perspektywy. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XIX (2): 359-370.
- Bartkowiak-Broda I., Liersch A., Ogrodowczyk M., Popławska W. 2001. Zawartość glukozyolanów w nasionach siewnych i konsumpcyjnych odmian mieszańcowych rzepaku ozimego z cytoplazmą CMS *ogura*. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXII (2): 423-440.
- Benchimol L.L., de Souza Jr C.L., Garcia A.A.F., Kono P.M.S., Mangolin C.A., Barbosa A.M.M., Coehlo A.S.G., de Souza A.P. 2000. Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. *Plant Breeding*, 119: 491-496.
- Bernardo R. 1992. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 628-634.

- Bernardo R. 1994. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci.*, 34: 718-723.
- Burton W.A., Ripley V.L., Potts D.A., Salisbury P.A. 2004. Assessment of genetic diversity in selected breeding lines and cultivars of canola quality *Brassica juncea* and their implications for canola breeding. *Euphytica*, 00: 1-12.
- Charters Y.M., Robertson A., Wilkinson M.J., Ramsay G. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 442-447.
- Demeke T., Adams R.P., Chibbar R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 990-994.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, 12: 13-15.
- Dudley J.W., Saghai Maroof M.A., Rufener G.K. 1991. Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. *Crop Sci.*, 31: 718-723.
- Echt C.S., Erdahl L.A., McCoy T.J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome*, 35: 84-87.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (PHYLogenetic Inference Package) version 3.5c (distributed by the author). Dept. of Genetics, Univ. of Washington, Seattle.
- Fürguth A., Bartkowiak-Broda I., Matuszczak M. 2000. Ocena dystansu genetycznego pomiędzy liniami GMS Janpol za pomocą markerów molekularnych PCR-RAPD. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI (2): 369-379.
- Ghérardi M., Mangin B., Goffinet B., Bonnet D., Huguët T. 1998. A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 406-412.
- Godshalk E.B., Lee M., Lamkey K.R. 1990. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 273-280.
- Grabiec B. 1981. Badanie efektów heterozji u rzepaku ozimego. *Biul. IHAR*, 146: 121-128.
- Grant I., Beversdorf W.D. 1985. Heterosis and combining ability estimates in spring-planted oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Genet. Cytol.*, 27: 472-478.
- Halldén C., Nilsson N-O., Rding I.M., Säll T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 123-128.
- Jain A., Bhatia S., Banga S.S., Prakash S., Lakshmikumaran M. 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 116-122.
- Knaak C., Ecke W. 1995. Genetic diversity and hybrid performance in European winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK 4-7 July 1995, Hybrid Technology Section: 110-112.
- Krzymański J., Piętka T., Krótka K. 1993. Zdolność kombinacyjna i heterozja mieszańców diallelicznych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. I. Pokolenie F₁. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5: 41-52.
- Krzymański J., Piętka T., Krótka K. 1994. Zdolność kombinacyjna i heterozja mieszańców diallelicznych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. II. Pokolenia F₁ i F₂. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XV (1): 21-32.
- Krzymański J., Piętka T., Krótka K., Michalski K. 1998. Relationship between seed yield and glucosinolate content in F₁ hybrid generation of double low winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XIX (2): 389-398.

- Lannér C., Bryngelsson T., Gustafsson M. 1996. Genetic validity of RAPD markers at the intra- and inter-specific level in wild *Brassica* species with $n = 9$. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 9-14.
- Lanza L.B., de Souza Jr C.L., Ottoboni M.M., Vieira M.L.C., de Souza P. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 1023-1030.
- Lee M., Godshalk E.B., Lamkey K.R., Woodman W.W. 1989. Association of restriction fragment length polymorphism among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Sci.*, 29: 1067-1071.
- Lefort-Buson M., Datté Y. 1982. Genetic study of some agronomic characters in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). I. Heterosis *Agronomie*, 2 (4): 315-322.
- Lefort-Buson M., Datté Y. 1983. L'hétérosis chez le colza oléagineux (*Brassica napus* L.). Proc. 6th Intern. Rapeseed Congress, 17-19 May 1983, Paris, France, vol. 1: 558-564.
- Lefort-Buson M., Datté Y. 1985. Etude de l'hétérosis chez le colza oléagineux d'hiver (*Brassica napus* L.). Comparision de deux populations, l'une homozygote et l'autre heterozygote. *Agronomie*, 5 (2): 101-110.
- Liersch A., Bartkowiak-Broda I., Ogrodowczyk M. 2000. Ocena plonowania i cech jakościowych różnego typu odmian mieszańcowych rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI (2): 341-358.
- Liu Z-Q., Pei Y., Pu Z-J. 1999. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat *Triticum aestivum* L. *Plant Breeding*, 118: 119-123.
- Lombard V., Delourme R. 2001. A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 491-507.
- Mailer R.J., Scarth R., Fristensky B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 697-704.
- Michalski K., Kołodziej K., Krzymański J. 1995. Quantitative analysis of glucosinolates in seeds of oilseed rape. Effect of sample preparation on analytical results. Proc. 9th Intern. Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7.07.1995, vol. 1: 6-8.
- Mundges H., Kohler W., Friedt W. 1990. Identification of rape seed cultivars (*Brassica napus*) by starch-gel electrophoresis of enzymes. *Euphytica*, 45: 179-187.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Pala J. 2002. Genetyczne, fizjologiczno-biochemiczne i ekologiczne uwarunkowania plonowania roślin. W: *Fizjologia plonowania roślin*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, 27-73.
- Pejje I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplick V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1248-1255.
- Riaz A., Li G., Quresh Z., Swati M.S., Quiros C.F. 2001. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding*, 120: 411-415.
- dos Santos J.B., Nienhuis J., Skroch P., Tivang J., Slocum M.K. 1994. Comparision of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 909-915.

- Skroch P., Tivang J., Nienhuis J. 1992. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. Application of RAPD Technology to Plant Breeding-Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992, Minneapolis, Minnesota, 26-30.
- Smith O.S., Smith J.S.C., Bowen S.L., Tenborg R.A., Wall S.J. 1990. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, heterosis and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 833-840.
- Snowdon R.J., Friedt W. 2004. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 123: 1-8.
- Sun G-L., Diaz O., Salomon B., von Bothmer R. 1999. Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD and microsatellite markers. *Genome*, 42: 420-431.
- Thormann C.E., Ferreira M.E., Camargo L.E.A., Tivang J.G., Osborn T.C. 1994. Comparison of RAPD and RFLP markers for estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 973-980.
- Tinker N.A., Fortin M.G., Mather D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 976-984.
- White J., Law J.R. 1991. Differentiation between varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.) on the basis of the fatty acid composition of the oil. *Plant Var. Seeds*, 4: 125-132.
- 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 Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wójtowicz M., Wielebski F., Bartkowiak-Broda I. 2003. Polskie odmiany mieszańcowe rzepaku ozimego. Monografia IHAR. Poznań 2003.
- Zhang Q., Zhou Z.Q., Yang G.P., Xu C.G., Liu K.D., Saghai Maroof M.A. 1996. Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 1218-1224.