

Katarzyna Mikołajczyk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

## Zastosowanie genomiki strukturalnej i funkcjonalnej w nowoczesnej hodowli roślin z rodziny *Brassicaceae*

### Structural and functional genomics usage for modern breeding of *Brassicaceae*

Słowa kluczowe: *Brassica*, genomika strukturalna i funkcjonalna, mapowanie genetyczne, markery molekularne, metabolomika

Praca zawiera przegląd niektórych wyników, zaprezentowanych podczas międzynarodowej konferencji Brassica 2008 (*5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 16th Crucifer Genetics Workshop*), Lillehammer, Norwegia, 8–12.09.2008. Obejmowały one badania dotyczące struktury, funkcji i ewolucji genomu, identyfikacji określonych typów morfologicznych, genotypów, a także odporności na stres roślin z rodziny *Brassicaceae*. Ważnym zagadnieniem było oszacowanie zmienności genetycznej i zróżnicowania biologicznego w kolekcjach roślin uprawnych. Prowadzone są analizy genetyczne tych kolekcji, jak: mapowanie, określanie dystansu genetycznego i zróżnicowania. Poszukuje się genów białek funkcjonalnych, odpowiedzialnych za daną cechę. Szeroko omawiana była również jakość produktów roślinnych ze względu na ich wykorzystanie spożywcze oraz w profilaktyce zdrowotnej i leczeniu. Opracowuje się metody nieinwazyjnej analizy biochemicznej dla istotnych gospodarczo metabolitów roślinnych w celu skutecznej selekcji w obrębie dużej populacji.

Key words: *Brassica*, structural and functional genomics, genetic mapping, molecular markers, metabolomics

This review contains some results presented during the Brassica 2008, *5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 16th Crucifer Genetics Workshop*, Lillehammer, Norway, 8–12.09.2008. The results concern research on genome structure, function and evolution, as well as morphotype and genotype identification, and additionally focus on stress resistance of plants belonging to the family of *Brassicaceae*. An important subject was assessing genetic variability and biodiversity in crop plant collections. Genetic analyses performed on these collections were as follows: mapping, genetic distance and diversity assessment. Genes for functional proteins responsible for a trait of interest, were investigated. Quality of plant food products used for human nutrition and phytochemicals important for prevention and protection of human health were also broadly discussed. Methods of non-destructive biochemical analysis of commercially important plant metabolites were developed for effective selection in a big plant population.

Podczas międzynarodowej konferencji Brassica 2008 zaprezentowano wyniki badań prowadzonych w renomowanych ośrodkach naukowych i hodowlanych na całym świecie, a dotyczących analiz genomów roślin hodowlanych z rodziny

*Brassicaceae*. W przedstawionych pracach badaniom genetycznym towarzyszyły kompleksowe doświadczenia hodowlane, a do analiz fenotypów, genotypów i produktów ekspresji genów stosowano nowoczesne metody biochemiczne oraz molekularne, z wykorzystaniem najnowszych technik biometrycznych i analiz statystycznych. Przedstawione wyniki obejmowały strukturę, funkcję i ewolucję genomu, identyfikację określonych morfotypów, genotypów, a także problematykę związaną z odpornością roślin z rodziny *Brassicaceae* na stres biotyczny i abiotyczny, jak również badania metabolitów roślinnych, znajdujących zastosowanie w profilaktyce i żywieniu. Wiele uwagi poświęcono poszukiwaniom nowych źródeł zmienności genetycznej, tworzeniu banków genów oraz fenotypowej i molekularnej charakterystyce linii hodowlanych i rodów. Coraz powszechniej w celu identyfikacji genów odpowiedzialnych za daną cechę stosuje się mapowanie asocjacyjne, identyfikujące markery sprzężone z daną cechą w obrębie kolekcji linii hodowlanych, odmian lub rodów. Nie wymaga więc ono analizy populacji segregującej — przez co nie ogranicza się jedynie do cech, którymi różnią się rośliny rodzicielskie dla danej populacji.

### Poszukiwanie nowych źródeł zmienności

---

W wielu ośrodkach prowadzi się prace mające na celu poszerzanie zmienności genetycznej i uzyskiwanie zróżnicowania biologicznego w kolekcjach roślin hodowlanych. Wyprowadza się kolekcje obejmujące zbiory genetycznie zdefiniowanych linii różnych gatunków rodzaju *Brassica*. Prowadzone są analizy tych kolekcji, jak: mapowanie, analiza dystansu genetycznego i zróżnicowania typów morfologicznych.

Charakteryzowano kolekcje zasadnicze (core collections) *Brassica rapa*, pochodzące z Europy i Azji, obejmujące 376 rodów reprezentujących różne typy morfologiczne oraz różne pochodzenie geograficzne (Bonnema i in. 2008). *B. rapa* jest ważną rośliną uprawną i warzywną zawierającą metabolity istotne w żywieniu człowieka, jak fenylopropanoidy, glukozytolany, flawonoidy, pochodne kwasu foliowego oraz izoprenoidy (karotenoidy i tokoferole). Zaobserwowano szeroki zakres zmienności cech morfologicznych związanych z rozwojem rośliny, takich jak przebieg kwitnienia, pokrój rośliny, cechy liścia i kwiatu oraz występowanie różnych metabolitów u *B. rapa* (Bonnema i in. 2008). Aby zidentyfikować podłoże genetyczne istotnych cech morfologicznych, badano zmienność genetyczną poprzez analizę profili transkrypcyjnych, metabolicznych, mapowanie loci cech ilościowych (QTL, quantitative trait locus) oraz mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem markerów AFLP, SSR i genów czynników transkrypcyjnych Myb (Pino del Carpio i in. 2008). Zdefiniowano 169 rodów i wykazano, że dystans genetyczny odzwierciedlał bardziej pochodzenie geograficzne niż typ morfologiczny. Wskazuje to na

możliwość pojawienia się różnych morfotypów w Azji i Europie, wskutek długotrwałego udomowienia i hodowli w każdym z tych regionów. W tym przypadku zmienność cech morfologicznych odzwierciedlała proces ich długotrwałej selekcji (Bonnema i in. 2008).

Badano kolekcję zasadniczą *Brassica napus* składającą się z 384 rodów, utworzoną w Chinach, w celu szczegółowej charakterystyki różnych źródeł zmienności genetycznej tej ważnej rośliny oleistej. Jedną z badanych cech była zawartość oleju w nasionach. Analizowano allele niektórych genów związanych z syntezą kwasów tłuszczowych, które wpływają na jakość oleju wykorzystywanego zarówno w żywieniu człowieka, jak i w przemyśle (Xiaoming i in. 2008). Szczegółowo analizowano fenotypy i odnoszono do genotypów poprzez analizy QTL i mapowanie asocjacyjne. Wykazano, że zawartość oleju w istotny sposób zależy od warunków środowiska: te same rody hodowane w różnych ekosystemach wykazywały zmienną zawartość oleju w nasionach (Xiaoming i in. 2008).

Dla zachowania różnorodności występującej wśród wielu rodzajów roślin tworzy się banki genów roślinnych. Europejska baza danych dla roślin uprawnych z rodzaju *Brassica* zawiera ponad 24 000 rodów zgromadzonych w 53 kolekcjach (Pink i in. 2008). Istnieje jednak proporcjonalnie niewielka ilość rodów reprezentujących zmienność w obrębie danej cechy. Wynika to z redukcji różnorodności biologicznej następującej w trakcie udomowienia i hodowli roślin (Pink i in. 2008). Wyjściowe kolekcje robocze tworzą dla gatunków *Brassica* w ramach wielu programów badawczych. Kolekcje te opierały się na rodach utrzymywanych w publicznych bankach genów. Nasiona poddawano rozmnożeniu, a rody badano pod względem odporności na grzyby i inne czynniki patogenne. Chociaż kolekcje robocze umożliwiały identyfikację zmienności pożądanych cech w obrębie odpowiednich puli genowych, składały się jednak z materiału heterozygotycznego — co ograniczało możliwość ich wykorzystania przez dłuższy czas do badań korelacji i szczegółowych analiz genetycznych. W związku z tym jakiegokolwiek skoordynowane badania cech i genotypów byłyby trudne do interpretacji bez uprzedniego wytworzenia materiału o odpowiednim poziomie homozygotyczności. Aby uzyskać taki materiał, wyprowadzono tzw. DFFS (Diversity Fixed Foundation Sets), stanowiące zdefiniowane zbiory linii utrwalonych genetycznie i reprezentujących próbę strukturalną (structured sampling) zmienności występującej w obrębie danej puli genowej (Pink i in. 2008). Zbiory te zaprojektowano tak, aby reprezentowały większą część zmienności allelicznej występującej w obrębie danej puli genowej, w formie dogodnej do długotrwałego przechowywania i użytkowania przez środowisko badaczy i hodowców wykorzystujących te linie. Pierwsze DFFS utworzono dla *B. oleracea*. Zawierały one próbę strukturalną 386 rodów reprezentujących zmienność wewnątrz puli genowej. Każdy z rodów reprezentował zmienność w obrębie rzędu i rodzaju, do którego należał dany gatunek, a także pochodzenie eko-geograficzne. Zestawy DFFS zostały utrwalone poprzez wytworzenie podwo-

jonych haploidów i chów wsobny, tak aby ustanowić linie trwale ustabilizowane, służące badaczom i hodowcom do analiz jakościowych i molekularnych. Linie typu DFFS umożliwiają długofalowe analizy porównawcze, zaplanowanie powtórzeń doświadczeń polowych z wykorzystaniem rozmnożonych roślin, a także — mogą przyczynić się do poznawania: interakcji międzygenowych, oddziaływań genów i środowiska oraz ekspresji cech związanych z rozwojem rośliny i decydujących o zmienności. Dotąd zestawy DFFS utworzono dla *B. oleracea*, dla genomu C dzikich gatunków *Brassica* oraz dla *B. napus*, z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych (Pink i in. 2008).

Badano strukturę zmienności genetycznej ważnej w Europie rośliny uprawnej — *Brassica oleracea* i opracowano jej kolekcje zasadnicze w celu znalezienia źródeł odporności na choroby, stanowiącej jeden z ważnych celów hodowlanych (Laperche i in. 2008). Kolekcje te, stanowiąc źródła zasobów genowych, powinny być niewielkie i reprezentować maksimum różnorodności genetycznej. Opracowano kolekcję zasadniczą w skali europejskiej (projekt RESGEN). Jednak ta kolekcja składała się z dużej liczby rodów (396) i opierała się na kilku wyznacznikach zmienności (variability descriptors). Dlatego podjęto badania w celu: 1) charakterystyki różnorodności genetycznej występującej w kolekcji zasadniczej RESGEN z zastosowaniem dużej liczby genomowych mikrosatelitów (SSR), uważanych za wyznaczniki neutralne — nie skorelowane z cechami selekcionowanymi oraz danych fenotypowych odnoszących się do odporności na *Plasmodiophora brassicae*, uważanej za wyznacznik ukierunkowany (targeted), odnoszący się do wyznaczonego celu hodowlanego, a także 2) aby zdefiniować kolekcje zasadnicze o zredukowanej wielkości stosując analizę neutralną albo ukierunkowaną. Badano 380 rodów *B. oleracea* wybranych z kolekcji zasadniczej RESGEN (Laperche i in. 2008). Analizowano genotypy z zastosowaniem 35 markerów SSR rozproszonych po całym genomie: od 3 do 4 markerów na każdym chromosomie. Dla każdego rodu szacowano odporność na dwa izolaty *P. brassicae*: Ms6 i K92-16, w warunkach kontrolowanych. Analizy różnorodności prowadzono z zastosowaniem oprogramowania DARWIN dla danych fenotypowych oraz STRUCTURE dla danych molekularnych. Prace te umożliwią również identyfikację nowych źródeł odporności na *P. brassicae*, a wyniki analiz fenotypowych i molekularnych będą stanowić pierwszy krok do badań genetycznej determinacji odporności poprzez badania asocjacyjne. Perspektywą tego projektu jest rozszerzenie badań nad różnorodnością i włączenie do analiz *B. napus* i *B. rapa*. Ważne jest równoległe badanie różnorodności występującej w tych trzech gatunkach, jak również zwiększenie genetycznej różnorodności w programach hodowlanych *B. napus*. Analizowanie struktury i stopnia różnorodności w zasobach genetycznych *B. napus*, *B. rapa* i *B. oleracea* umożliwiłoby identyfikację nowych form rodzicielskich, a także poszerzenie bazy genetycznej *B. napus* przez wytwarzanie linii syntetycznych (Laperche i in. 2008).

Szczegółowe badania genetyczne, jak mapowanie porównawcze i analizy QTL prowadzone są dla różnych typów morfologicznych *B. rapa* i *B. oleracea*, dzięki możliwości ich wzajemnego krzyżowania (Iniguez-Luy 2008). W celu zintegrowania badań z zakresu genomiki rodzaju *Brassica* opracowano publiczne bazy danych i ogólnie dostępne zasoby genowe: opracowano 587 markerów SSR, a także wygenerowano samozgodne populacje *B. rapa* i *B. oleracea* o krótkim cyklu rozwojowym (rapid cycling lines). Z zastosowaniem markerów SSR i RFLP skonstruowano genetyczne mapy sprzężeń (Iniguez-Luy 2008). Sekwencje nukleotydowe markerów zlokalizowanych na mapach *B. rapa* i *B. oleracea* były użyte do porównania tych dwóch genomów z genomem *A. thaliana*. Znalaziono domniemane markery SSR sprzężone z fenotypem określonych mutantów *B. oleracea* (Iniguez-Luy 2008). Możliwe pozycje na mapie tych mutantów mogą stanowić punkt wyjściowy do identyfikacji genów kandydujących (candidate genes) — które mogłyby odpowiadać za daną cechę, w oparciu o analizę porównawczą z *A. thaliana*. Ponadto wykonano mapowanie zmienności kontrolującej porę kwitnienia i podłoże krótkiego cyklu rozwojowego w populacji *B. rapa*. Wyniki te naświetliły złożoną naturę genomów *Brassica*, wykazując różnorodność wyrażającą się w poziomie ekspresji genów powtarzających się, powstałych w efekcie poliploidyzacji w obrębie *Brassica*. Postępujące różnicowanie w ekspresji genów (ilościowe i przestrzenne) wskazuje, że geny wielokrotne mogły ewoluować w kierunku ich funkcjonalizacji (Iniguez-Luy 2008).

Analizowano utratę równoważności sprzężeń (LD, linkage disequilibrium) u *B. napus* (Ecke i in. 2008). Mapowanie QTL u rzepaku prowadzi się zwykle w populacji segregującej, pochodzącej z krzyżowania dwóch rodziców, stosując mapowanie w pewnych nieciągłych przedziałach genomu (interval mapping). Podejście to umożliwia identyfikację loci wpływających na daną cechę ilościową, a także oszacowanie ich efektu. Ma ono jednak pewne ograniczenia z powodu limitowanej liczby rekombinacji dostępnych w populacji segregującej, co wyraża się w tzw. przedziałach zaufania (confidence intervals) dla pozycji QTL, w zakresie od kilku do kilkudziesięciu cM. Ponadto tylko te QTL mogą być wykryte, które są polimorficzne pomiędzy dwoma rodzicami. Alternatywą może być mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem kolekcji odmian lub linii hodowlanych. W związku z większą liczbą rekombinacji zachodzących w takim materiale można uzyskać wyższą rozdzielczość mapowania. Ponadto różnicowanie genetyczne nie jest wtedy ograniczone różnicowaniem występującym pomiędzy dwiema liniami rodzicielskimi. Z drugiej strony to podejście jest wysoce zależne od stopnia LD w użytej populacji roślin. Aby ocenić możliwość zastosowania podejścia globalnego do mapowania asocjacyjnego we współczesnych formach hodowlanych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego, analizowano LD — w populacji 85 odmian hodowlanych (populacja LD) oraz w mapującej populacji 94 segregujących linii DH otrzymanych z krzyżowania odmiany 'Express' rzepaku ozimego i rzepaku

resyntetyzowanego, 'R53' (Ecke i in. 2008). Zastosowano 132 kombinacje startów AFLP – Eco RI/MseI. Łącznie zidentyfikowano ponad 1000 polimorficznych markerów AFLP. Następnie określono zakres nierównowagi sprzężeń dla populacji LD w oparciu o pozycje na mapie markerów AFLP. Wysoką LD wykazano jedynie pomiędzy markerami blisko sprzężonymi, ale zanikała ona wraz ze wzrostem odległości i zbliżała się do ogólnego niskiego poziomu przy około 6 cM odległości pomiędzy markerami. LD pomiędzy markerami niesprzężonymi była w większości niska i nieznaczająca (Ecke i in. 2008). Powyższe obserwacje wskazują na brak LD, będący skutkiem selekcji w procesie hodowlanym struktury populacji lub dryftu genetycznego w podwójnie ulepszonym rzepaku ozimym. Biorąc pod uwagę, że wartości LD użyteczne dla mapowania asocjacyjnego obejmują od ponad jednego do dwóch cM — konieczne będzie stosowanie dużej liczby markerów do tego typu mapowania. Zakładając, że całkowita długość genomu rzepaku wynosi 2000 cM, do globalnej analizy należałoby zastosować od 1000 do 2000 markerów równomiernie rozprzestrzenionych w genomie (Ecke i in. 2008).

### **Produkty żywnościowe pochodzenia roślinnego a zdrowie człowieka**

---

Ostatnio, w związku z szeroko zakrojoną kampanią na rzecz ochrony zdrowia człowieka, wzrosło zainteresowanie opinii publicznej produktami żywnościowymi — wspomagającymi i poprawiającymi zdrowie człowieka. Tendencja ta wyraża się zapotrzebowaniem konsumentów nie tylko na żywność o wysokich walorach smakowych, ale także na produkty o wysokiej zawartości substancji biologicznie czynnych, korzystnych dla zdrowia człowieka. Produkty roślinne są ważnym elementem tego trendu żywnościowego, stanowiąc bogate źródło korzystnych dla zdrowia związków chemicznych. W tym kontekście badania koncentrują się na gatunkach z rodzaju *Brassica*, ponieważ rośliny te syntetyzują określone grupy związków fitochemicznych, takich jak fenylopropanoidy, glukozynolany, flawonoidy, pochodne kwasu foliowego oraz izoprenooidy ( tokoferole, karotenoidy) — posiadające właściwości antynowotworowe, antyutleniające i przeciwbakteryjne.

Badano efekt izotiocyjanianu sulforafaniny, będącej głównym induktorem enzymów cytotatycznych u ssaków — oksydoreduktazy, transferazy czy ligazy (Dinkova-Kostova 2008). Opracowanie induktorów w oparciu o związki chemiczne występujące w roślinach jadalnych jest korzystniejsze niż wytwarzanie środków syntetycznych, ponieważ związki fitochemiczne są mniej toksyczne, relatywnie tanie i możliwe jest szybkie przeniesienie odkryć laboratoryjnych do praktycznego wykorzystania. Do naturalnie występujących induktorów należą izotiocyjaniany, powstające wskutek enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów katalizowanej przez myrozynazy. Rodzina *Brassicaceae* stanowi bogate źródło różnych glukozyno-

lanów (do kilku procent masy nasion). Prawie wszystkie właściwości biologiczne glukozynolanów, zarówno u roślin jak i zwierząt, są przypisywane odpowiednim izotiocyjanowym produktom ich hydrolizy. Chociaż myrozynazy nie występują w przewodzie pokarmowym ssaków, hydroliza glukozynolanów zachodzi wskutek działania mikroflory przewodu pokarmowego. Z ekstraktu brokułów (*B. oleracea*) wyizolowano izotiocyjanian sulforafaninę, aktywującą transkrypcję genów cytostaticznych poprzez szlak Keap1/Nrf2/ARE (Dinkova-Kostova 2008). Badano ogólny profil ekspresji genów i wykazano, że ekspozycja na sulforafaninę wywołała Nrf 2 — zależną indukcję genów cytostaticznych (Dinkova-Kostova i in. 2008). Ponadto, poza aktywacją szlaku enzymatycznego, sulforafanina i inne induktory enzymów cytostaticznych mają działanie przeciwzapalne. Miejscowe, regularne podawanie myszom standaryzowanego ekstraktu z kiełków brokułów (ok. 100 nmoli sulforafaniny/cm<sup>2</sup>) prowadziło do ok. 50% redukcji powstawania, namnażania i objętości nowotworu skóry. U ludzi miejscowa aplikacja ekstraktu z brokułów indukowała enzymy cytostaticzne i chroniła przed uszkodzeniami skóry światłem UV (Dinkova-Kostova 2008). Efekt ochronny sulforafaniny jest radykalnie odmienny od działania filtrów przeciwsłonecznych, ponieważ jest on długotrwały, katalityczny i nie interferuje z biosyntezą witaminy D (Dinkova-Kostova 2008). Wykazano również rolę izotiocyjanianów pochodzących z brokułów, polegającą na zmniejszaniu zarówno ryzyka powstania nowotworu prostaty, jak i rozwoju jego formy złośliwej (Traka 2008).

Do ważnych elementów diety człowieka należy witamina E, której bogatym źródłem jest olej nasion rzepaku. Witamina E (tokochromanol) obejmuje grupę ośmiu antyoksydantów — czterech tokoferoli i czterech tokotrienoli. Każda grupa obejmuje formy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ . Olej rzepakowy zawiera do 1000 ppm tokoferoli, z czego głównym składnikiem jest  $\gamma$ -tokoferol, a następnie:  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\delta$ -tokoferol. Dla żywienia człowieka najbardziej korzystny jest  $\alpha$ -tokoferol, ale dla stabilności oleju potrzebne są duże ilości tokoferoli  $\gamma$  i  $\delta$ . Dlatego pożądane są odmiany rzepaku o zwiększonej zawartości tokoferoli lub o zmienionym ich składzie w oleju nasion. Dotąd nie ma niezawodnej i nieinwazyjnej metody pomiaru zawartości tokoferoli. Zawartość tokoferoli w nasionach jest oznaczana analizą HPLC, która jest pracochłonna i kosztowna. Dlatego efektywną metodą selekcji byłoby zastosowanie markerów genetycznych. Podjęto badania nad poszukiwaniem tego typu markerów, przyjmując metodę genu kandydującego, przy założeniu, że na skład tokoferoli mają bezpośredni wpływ enzymy szlaku ich biosyntezy (Endrigkeit i in. 2008). Byłyby to również markery funkcjonalne, które mogłyby być użyte do analiz genomu. Sklonowano i zsekwencjonowano siedem genów *B. napus*, z których dwa (BnVTE4 i BnAPG1) zostały potwierdzone testem komplementacji, poprzez ekspresję heterologiczną w *A. thaliana* (Endrigkeit i in. 2008). W transformowanych roślinach oznaczono tokoferol metodą HPLC. Oba geny zmieniały skład tokoferoli w transformowanych roślinach. BnVTE4 powodował wzrost frakcji

$\alpha$ -tokoferolu z jednoczesnym spadkiem frakcji  $\gamma$ . BnAPG1 prowadził do wyższych ilości  $\alpha$ -tokoferolu i niższej zawartości  $\delta$ -tokoferolu. Sekwencje siedmiu sklonowanych genów: PDS1, VTE1, VTE2, APG1, VTE3, VTE4 i GGR użyto jako sondy podczas przeszukiwania biblioteki BAC *B. napus*. Zidentyfikowano łącznie 151 klonów BAC (bacterial artificial chromosomes — sztuczne chromosomy bakteryjne) (Endrigkeit i in. 2008). Będą one mapowane na istniejącej mapującej populacji linii DH pochodzącej z krzyżowania Tapidor  $\times$  Ningyou7, analizowanej uprzednio na cechy fenotypowe takie, jak zawartość glukozyolanów, czas kwitnienia, zawartość oleju i tokoferoli. Łącznie zmapowano 52 QTL dla składu i dla zawartości tokoferoli. W drugim podejściu eksperymentalnym kolekcja zasadnicza *B. napus* będzie analizowana ze względu na zawartość tokoferoli oraz mapowana z wykorzystaniem wyodrębnionych genów kandydujących w celu zbadania asocjacji pomiędzy składem i zawartością tokoferoli a układem alleli w loci dla odpowiednich markerów (Endrigkeit i in. 2008).

Badano profile glukozyolanowe odmian hodowlanych kapusty w celu ujawnienia możliwości selekcji i hodowli nowych odmian o wysokich walorach smakowych i wartościach zdrowotnych (Hansen i in. 2008). Glukozyolany (GLS) i produkty ich rozpadu odpowiadają w większości za smak i zapach warzyw i przypraw z rodzaju *Brassica*. Glukozyolany alkenowe, a szczególnie progoitryna, wpływają na właściwości antyżywniowe paszy zwierzęcej. Natomiast wzrasta ilość dowodów, że inne GLS, takie jak glukorafanina, glukobrasycyna, glukoberyna i glukonasturecyna, wykazują działanie przeciwnowotworowe. Trzydziestoletnie badania wskazują, że istnieje znaczna zmienność GLS u kapusty, przy czym kapusta czerwona z punktu widzenia zdrowotnego ma lepszy profil GLS niż kapusta biała. Badane odmiany kapusty czerwonej zawierały więcej glukozyolanów o działaniu antynowotworowym (w porównaniu z kapustą białą). Kapusta biała miała najwyższy poziom synigriny, co wpływa na jej bardziej ostry smak niż kapusty czerwonej (Hansen i in. 2008).

### **Agronomia i choroby, z uwzględnieniem uprawy zrównoważonej**

---

Gatunki roślin z rodzaju *Brassica* wykazują pewne cechy charakterystyczne, związane z wykorzystaniem nawozów roślinnych, odróżniające je od innych roślin uprawnych (Thorup-Kristensen 2008). Do tych cech należy gromadzenie azotu w tkankach liściowych. Powoduje ono, że nawet niewielkie ograniczenia w dostępie azotu hamują wzrost i rozwój roślin. Dlatego rośliny te nawozi się intensywnie. Jeśli po zbiorach resztki roślin bogate w azot pozostają na polu — możliwa jest utrata azotu wskutek wyflukiwania w głębsze warstwy gleby, niedostępne dla większości roślin uprawnych. Jednak może on być odzyskany poprzez bardzo



głęboki system korzeniowy (ok. 2,5 m) roślin z rodzaju *Brassica*. Poza tym, ze względu na wysoką zawartość azotu w liściach, rośliny te mogą być stosowane jako przedplon, używając glebę dla głównej rośliny uprawnej (Thorup-Kristensen, 2008).

Analizowano wpływ struktury genomu i zabiegów hodowlanych na molekularny mechanizm ewolucji genów awirulencji *Leptosphaeria maculans* (Rouxel i in. 2008). Genom tego patogenu grzybowego oddziałuje z genomem gospodarza — rzepaka (*B. napus* L.) i gatunkami pokrewnymi (*B. rapa*, *B. juncea*). Takie interakcje powodują bezpośrednie lub pośrednie rozpoznanie produktów genu awirulencji ('*AvrLm*', dla genu wirulencji *L. maculans*) przez geny odporności ('*Rlm*', gen odporności na *L. maculans*). Ostatnio sklonowano trzy geny: *AvrLm1*, *AvrLm2* i *AvrLm3*, co stanowiło punkt wyjścia do analizy procesów odpowiedzialnych za utratę funkcji awirulencji w sytuacji, gdy populacje grzybów napotykają na rozwój nowych genów *Rlm* (Rouxel i in. 2008). Wszystkie trzy geny *AvrLm* występowały w szczególnym kontekście genomowym — jako pojedyncze geny w obrębie dużych, niekodujących heterochromatyno-podobnych regionów bogatych w rozproszone i nieaktywne powtórzenia. Takie otoczenie prawdopodobnie warunkuje mechanizmy ewolucyjne w kierunku wirulencji. Obserwowano dwa zjawiska: albo duże delecje segmentów chromosomowych obejmujących gen awirulencji, albo inaktywację tego genu przez mutacje RIP ('Repeat Induced Point'). Ponadto, praktyki uprawowe opierające się na niskim poziomie kultury i nieodpowiednim płodozmianie sprzyjają tej chorobie, jak również dramatycznie przyspieszają tempo ewolucji od awirulencji do wirulencji, prawdopodobnie poprzez faworyzowanie rekombinacji płciowej u grzyba. Te niekonwencjonalne mechanizmy ewolucji, silnie zależne od rozmnażania płciowego przebiegającego co roku w cyklu życiowym grzyba, wyjaśniają dlaczego populacje *L. maculans* adaptują się tak szybko do presji selekcyjnej wywieranej przez odmiany hodowlane niosące nowe geny odporności. Zabiegi hodowlane są więc niezbędne dla zintegrowanego zarządzania wirulencją, redukującego tempo ewolucji od awirulencji do wirulencji (Rouxel i in. 2008).

## Genomika porównawcza i stosowana

---

Ważnym zagadnieniem, poruszonym przy okazji różnych zadań badawczych było poznanie struktury i funkcji genomów roślin hodowlanych. Służy temu, między innymi, tworzenie map genetycznych o wysokim nasyceniu markerami sprzężonymi. Mapy wykorzystywane są do identyfikacji loci cech ilościowych (QTL), wykrywania genów sprzężonych z daną cechą, a także do badania struktury genomów. Coraz powszechniej stosuje się tzw. populacje TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomics) uzyskane poprzez działanie mutagenem na nasiona.

Służą one do badania zmian w sekwencji nukleotydowej DNA związanych z nową cechą danego mutantu. Opracowuje się allelo-specyficzne markery SNP zasocjowane z określoną cechą funkcjonalną w celu efektywnej selekcji genotypów, prowadzącej do uzyskania wsobnych linii rekombinantów (RIL – Recombinant Inbred Lines), jak również linii podwojonych haploidów (DH – doubled haploids), służących dalszej selekcji i hodowli. Prowadzone są analizy transkryptomów w celu identyfikacji genów ulegających ekspresji różnicowej w trakcie rozwoju nasion i odpowiedzialnych za syntezę związków mających znaczenie gospodarcze. Wykorzystuje się często do tego celu linie o krótkim cyklu rozwojowym, dające do 10 pokoleń w ciągu roku. Prowadzi się badania nad poszerzaniem zmienności genetycznej poprzez wprowadzanie nowych alleli do danej puli genowej. Opracowuje się efektywne metody nieinwazyjnej analizy biochemicznej dla istotnych gospodarczo metabolitów roślinnych w celu skutecznej i szybkiej selekcji w obrębie dużej populacji. Wykorzystuje się do tego najnowocześniejsze metody analizy chemicznej.

Porównywano genomy rodzaju *Brassica* z blisko spokrewnionymi — *Arabidopsis* i *Sisymbrium* (Town i in. 2008). Chociaż zsekwencjonowany genom *A. thaliana* ma duże znaczenie dla badaczy, genomy *Brassica* są znacznie bardziej złożone i wymagają badań same w sobie. W wielu ośrodkach na świecie postępuje sekwencjonowanie najmniejszego, diploidalnego genomu *B. rapa*, dostarczając znacznej ilości informacji o strukturze i ewolucji tego genomu. Badany jest również genom *B. oleracea*, w aspekcie poznania zależności pomiędzy *B. oleracea* i *B. rapa* oraz ortologicznymi regionami genomów *Arabidopsis* i *Sisymbrium* (Town i in. 2008). Podjęto międzynarodowy projekt w celu zmapowania i zsekwencjonowania genomu *B. rapa* (ok. 530 Mb). Przeanalizowano 410 sekwencji nakładających się (comparative-tiled) *Brassica* pochodzących z 589 klonów BAC. Sekwencje te obejmowały 65,8 Mb, wykazując syntenię genomów *Arabidopsis* i *Brassica* (Kwon i Park 2008). Prowadzone jest również sekwencjonowanie chromosomów 1 i 2 *B. rapa* w oparciu o zmapowanych 850 klonów BAC. Uzyskano rozkład markerów 1 SSR na 2,9 kb. Łącznie określono 22 000 SSR w 521 sekwencjach BAC (Kim i in. 2008).

Rozpoczęto badania zmienności epigenetycznej w genomach *Brassica* (King i in. 2008). Zrozumienie podstaw zjawisk epigenetycznych w obrębie większych i bardziej złożonych genomów roślin uprawnych jest istotne dla poznania oddziaływań genotypu i środowiska, wpływających na QTL na poziomie ekspresji genów i decydujących o plastyczności genotypu. Regulacja epigenetyczna odgrywa znaczną rolę w rozwoju rośliny — poprzez modulację struktury chromatyny, związaną często z metylacją DNA i zmianami ułożenia nukleosomu. W genomie A w większości następują metylacje *de novo*, w genomie C — *de novo* oraz demetylacje, zależnie od danego locus. Opracowuje się konsensusowe mapy sprzężeń dla genomów A i C *Brassica* i odnosi się je do kolinearnych bloków *Arabidopsis* i fragmentów sekwencji uzyskanych z Projektu Sekwencjonowania Genomu *Brassica rapa*. Zmienność epigenetyczna może znaleźć zastosowanie do ulepszenia roślin

uprawnych, szczególnie w obrębie złożonych genomów roślin uprawnych, np. *Brassica* — należących do ‘trójkąta U’. W perspektywie są długoterminowe, kompleksowe i koordynowane programy w celu odkrycia, indukcji i selekcji epi-alleli (King i in. 2008). Badano rozkład metylacji w genomie *Brassica* i ich wpływ na ekspresję ważnych cech jakościowych (Long i in. 2008). W organizmach eukariotycznych metylacja DNA została sklasyfikowana jako ważne zjawisko, ponieważ ma zarówno epigenetyczny, jak i mutagenny efekt. Aby wykryć dystrybucję metylacji DNA w całym genomie *B. napus* i jej związek z istotnymi cechami agronomicznymi zastosowano 300 par starterów dla wygenerowania wrażliwych na metylowanie (MS – methylation sensitive) markerów AFLP (MS-AFLP) w populacji mapującej linii DH. Wykryto łącznie 595 loci zmetylowanych, które były rozłożone nierównomiernie w 19 grupach sprzężeń, wahając się od 5 do 59 loci w każdej z grup. Gęstość metylacji była także nierównomierna i wahała się od 1 locus/cM do 7 loci/cM — bardziej zagęszczona wokół centromerów. Wynik uzyskany z analizy pojedynczym markerem wykazał, że cechy jakościowe nasion, takie jak zawartość oleju, kwasu erukowego, były umiarkowanie zależne, a cechy związane z plonem były mniej zależne od metylacji DNA. Jednakże cechy związane z rozwojem rośliny, takie jak pora kwitnienia i dojrzewania nasion, wykazywały wysoką korelację z poziomem metylacji genomu. Docelowy QTL cech rozwojowych będzie dalej analizowany ze względu na zmiany struktury (remodelling) chromatyny, z zastosowaniem metody alternatywnej — MS-HRM (methylation sensitive high resolution melting) (Long i in. 2008).

## Genetyka cech jakościowych

---

Mapowano różne cechy u *Brassica rapa* i *Raphanus sativus* (Hirai 2008), jak geny zabarwienia, geny decydujące o krótkim cyklu rozwojowym, loci cech ilościowych, kształt korzenia, zawiązywanie głowy u kapusty chińskiej, odporność na patogeny u *Raphanus*. Poszukiwano genów odpowiedzialnych za siłę kiełkowania nasion (Morris i in. 2008). Wysoka siła kiełkowania nasion jest istotna dla zrównoważonej produkcji roślin uprawnych. Jednakże zrozumienie genetycznych podstaw tej cechy jest ograniczone. Szybkie kiełkowanie jest jedną z kluczowych cech żywotności nasienia. W celu zbadania loci sprzężonych z cechami wpływającymi na wigor nasienia wykorzystano szereg różnych źródeł genetycznych *B. oleracea*. Zidentyfikowano QTL wpływający na szybkość kiełkowania (Morris i in. 2008). Badano linie substytucyjne, z których jedna miała wstawiony region z szybko kiełkującego rodzica, w otoczeniu genomu wolno kiełkującego rodzica. Ten nowy, „mendlowski” QTL — ROG1 (Rate of Germination) odpowiadał za większość różnicy w kiełkowaniu pomiędzy liniami rodzicielskimi. Obecnie

badane są geny kandydujące ROG1, a w perspektywie — fizjologiczne podstawy tej ważnej cechy (Morris i in. 2008).

W celu efektywnej analizy ekspresji genów opracowano metodę seryjnej analizy ekspresji genów (Serial Analysis of Gene Expression – SAGE) (Obermeier i in. 2008). Technika ta polega na wycięciu krótkich fragmentów z poli-A<sup>+</sup> RNA i ligacji dwóch fragmentów dla uformowania konkatamerów. Dopasowanie tych fragmentów do sekwencji genomowych umożliwia ich lokalizację w genomie. Celem przedstawionych badań było zaadaptowanie techniki SAGE do analizy globalnej ekspresji genów u *B. napus* i innych podobnie złożonych genomów roślin poliploidalnych. Szczególnie interesujące jest objęcie całego transkryptomu i identyfikacja genów, które ulegają ekspresji różnicowej podczas rozwoju nasienia *B. napus* i mogłyby być zasocjowane z syntezą komercyjnie wartościowych związków. Zastosowano modyfikację protokołu oryginalnego, Robust-Long SAGE, która generuje 20–21 fragmentów, w celu efektywnego klonowania i identyfikacji transkryptów z dużego genomu *B. napus* (Obermeier i in. 2008). Zidentyfikowano trzy punkty w rozwoju nasienia w odmianie ‘Express’, w których nastąpiły istotne zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych nasion. Utworzono biblioteki cDNA z całkowitego RNA wyizolowanego z roślin w momentach rozwoju, odpowiednio 23 i 35 dni po zapyleniu, w celu dalszych analiz (Obermeier i in. 2008).

Poszukiwano genów odporności na ograniczone zasoby wody — kontrolujących efektywność wykorzystania wody (WUE – water-use-efficiency) u *B. oleracea* (Ryder i in. 2008). Stosowano dostępne źródła genetyczne *B. oleracea* i *Arabidopsis* do identyfikacji dziedzicznych składników zmienności WUE. Celem była identyfikacja genów kandydujących oraz markerów, które znalazłyby zastosowanie do selekcji roślin o zwiększonej WUE. Dokonano charakterystyki fenotypowej populacji mapującej, segregującej ze względu na cechy związane z WUE, w celu identyfikacji odpowiedniego QTL. Następnie w warunkach polowych charakteryzowano panel linii *B. oleracea*: substytucyjnych oraz linii zróżnicowanych genetycznie, DFS (Diversity Foundation Set). Charakterystyka osobników DFS ze względu na cechy WUE umożliwiła oszacowanie genetycznej różnorodności WUE dla istniejących odmian hodowlanych (Ryder i in. 2008). Rośliny charakteryzowano ze względu na zużycie wody, z odniesieniem do ogólnego wzrostu i rozwoju. Równolegle badane linie były genotypowane z wykorzystaniem markerów zorientowanych na regiony QTL dla WUE (ulożone na chromosomach Chr5, Chr6, Chr7). Uzyskane wyniki zostaną wykorzystane do analiz asocjacyjnych. Badania będą kontynuowane na liniach substytucyjnych, w celu identyfikacji markerów molekularnych dla WUE. W perspektywie jest genetyczne polepszenie roślin uprawnych w celu ich zrównoważonej produkcji w rejonach, gdzie ograniczone są zasoby wody (Ryder i in. 2008).

W wielu ośrodkach prowadzi się prace nad uzyskaniem linii hodowlanych rzepaku charakteryzujących się zmienioną zawartością kwasów tłuszczowych

w oleju nasion. Z zastosowaniem techniki mutagenezy chemicznej otrzymano mutanty rzepaku jarego o obniżonej zawartości kwasu linolenowego (Rakow 1973) i ozimego o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (Spasibionek 2006). Zidentyfikowano po dwa miejsca mutacji punktowej w genach desaturaz: *fad2* — z linii mutanta rzepaku ozimego wysokooleinowego oraz *fad3* — z linii mutanta niskolinolenowego odmiany jarej oraz opracowano markery allelo-specyficzne dla wysokiej zawartości kwasu oleinowego i niskiej zawartości kwasu linolenowego mutantów *B. napus* otrzymanych w wyniku mutagenezy chemicznej (Falentin i in. 2008). Wykazano, że na cechę wysokiej zawartości kwasu oleinowego ma większy wpływ zmutowany allel z *fad2A* niż *fad2C*, natomiast na niską zawartość kwasu linolenowego — allel *fad3C* niż *fad3A* (Falentin i in. 2008). Opracowano i wdrożono do selekcji allelo-specyficzne markery funkcjonalne dla genów desaturazy *fad3A* i *fad3C* dla mutantów niskolinolenowego rzepaku ozimego, w których zidentyfikowano dwie mutacje punktowe (Mikołajczyk i in. 2008). Wykazano, że mutacja punktowa w genie *fad3A* ma wpływ na zaburzenie ekspresji genu poprzez splicing alternatywny (Mikołajczyk i in. 2008). Na uwagę zasługuje fakt, że poza omówionymi powyżej nie prezentowano innych doniesień o opracowanych markerach funkcjonalnych.

### **Hodowla *Brassica* i ulepszanie genetyczne, z uwzględnieniem transgenezy**

---

Rzepak (*B. napus*, genom AACCC) jest gatunkiem allotetraploidalnym, pochodzącym z naturalnej hybrydyzacji pomiędzy *B. rapa* (AA) i *B. oleracea* (CC). Głównym powodem powstania allopoliploidów są korzystne oddziaływania pomiędzy genami na chromosomach homeologicznych, podobne do pozytywnych interakcji pomiędzy różnymi allelami. Jest to przyczyną heterozji u genotypów allopoloidalnych. Takie pozytywne oddziaływania epistatyczne określane są terminem heterozja utrwalona (fixed heterosis). Jako model do analiz tego zjawiska poprzez mapowanie QTL zastosowano rzepak, ponieważ można z łatwością generować sztuczne resyntetyzowane linie z diploidalnych gatunków rodzicielskich *B. rapa* (AA) i *B. oleracea* (CC) i badać wpływ poszczególnych genów na efekt utrwalonej heterozji (Wespeł i Becker 2008).

Podjęto prace nad przeniesieniem zmienności allelicznej poprzez krzyżowania międzygatunkowe *B. napus* × *B. carinata* (Nelson i in. 2008) z *B. napus* — jakością nasion i wczesność kiełkowania, a z *B. carinata* — odporność na *Sclerotinia sclerotiorum* i suszę. Oboje rodzice są roślinami oleistymi, allotetraploidalnymi — stosunkowo łatwo je skrzyżować, a mieszańce są stosunkowo płodne. Badano dziedziczenie chromosomów genomów A, B i C w 28 roślinach wyprowadzonych z kultur mikrosporowych pochodzących z międzygatunkowych mieszańców (ABC<sup>n</sup>C<sup>c</sup>)

uzyskanych z krzyżowania *B. napus* (AAC<sup>n</sup>C<sup>n</sup>) × *B. carinata* (BBC<sup>c</sup>C<sup>c</sup>). W celu wyprodukowania roślin z mieszańców ABC<sup>n</sup>C<sup>c</sup> zastosowano zmodyfikowaną metodę kultur mikrosporowych stosowaną dla *B. napus*, jednak bez kolchicynowania. Kariotypy tych 28 linii określono z wykorzystaniem 92 loci markerów mikrosatelitarnych, o znanym umiejscowieniu w genomach A, B i C, a wyniki były porównane do całkowitej zawartości DNA mierzonej metodą cytometrii przepływowej. Duża część (26 na 28) linii pochodzenia mikrosporowego pochodziła z gamet niezredukowanych (2n), podczas gdy dwie pozostałe — z gamet zredukowanych (n). Stwierdzono homologiczną rekombinację we wszystkich dziewięciu parach chromosomów C, w niezredukowanych oraz zredukowanych liniach pochodzących z mikrospor. Wykazano homeologiczną rekombinację pomiędzy chromosomami A i C oraz B i C, poprzez mechanizm duplikacji / delecji (Nelson i in. 2008).

Badano częstość występowania crossing-over w zależności od stopnia ploidalności rośliny i oddziaływań między genomami tetraploidalnego *B. napus* a jednym z diploidalnych przodków — *B. rapa* (Leflon i in. 2008). Krzyżowania międzygatunkowe pomiędzy pokrewnymi gatunkami są zwykle stosowane w hodowli roślin do introgresji genów w celu zwiększenia zmienności genetycznej gatunków hodowlanych. Efektywność introgresji genów zależy od podobieństwa między genomami, które warunkuje parowanie chromosomów i rekombinację genetyczną w procesie mejozy. Introgresja genów z roślin rodzicielskich do *B. napus* jest znacznie ułatwiona przez bliskie pokrewieństwo genomów. Prowadzono badania w celu analizy zmian częstości rekombinacyjnej w zależności od hybrydów otrzymanych z różnych krzyżowań pomiędzy *B. napus* i *B. rapa*. Wykazano, że skład kariotypowy mieszańca (diploid vs. dwugenomowy triploid vs. tetraploid) i podłoże genetyczne mają wpływ na rekombinację genetyczną. Podczas mejozy triploidalnego mieszańca AAC, powstałego z krzyżowania *B. napus* i *B. rapa*, częstość crossing-over była od 1,6 do 3,2 wyższa niż w mieszańcach allotetraploidalnych AACC, otrzymanych z krzyżowań *B. napus* i resyntetyzowanego *B. napus* (*B. rapa*, AA × *B. oleracea*, CC). Aby bardziej dokładnie zbadać efekt struktury mieszańca wytworzono dodatkowe mieszańce, aby zanalizować częstość crossing-over pomiędzy genotypami *B. rapa* w diploidalnym (AA), digenomowym triploidzie (AAC) i tetraploidzie (AACC). Wykazano, że zmienność częstości crossing-over zależała od kariotypu mieszańca. Te wyniki sugerują, że struktura triploidalna promuje rekombinację i stąd introgresję z diploidalnych gatunków *Brassica* do spokrewnionych gatunków tetraploidalnych (Leflon i in. 2008).

Periodyczna duplikacja genomów stanowi ważną prawidłowość w powstawaniu gatunków roślin. Allopoliploidalne formy syntetyczne dostarczają istotnego materiału do analiz różnych mechanizmów zaangażowanych w regulację redundancji genetycznej, ponieważ znane są dokładne genotypy diploidalnych rodziców oraz mogą być one wytwarzane w różny sposób. Badano zależność form synte-

tycznych *B. napus* od genotypów rodziców i sposobu poliploidyzacji (Dauvergne i in. 2008). Rzepak (*Brassica napus*, AACC,  $2n = 38$ ) jest gatunkiem allopoliploidalnym, o pochodzeniu polifiletycznym. Zaprezentowano nowe wyniki dotyczące wpływu efektu diploidalnych genotypów rodzicielskich, krzyżowań przemiennych i sposobu wytwarzania pierwotnego amfidiploidu na modyfikacje strukturalne i funkcjonalne. Otrzymano 8 hybrydów F1 (AC,  $n = 19$ ) z różnych kombinacji roślin rodzicielskich — *B. rapa* i *B. oleracea*. Amfidiploidy (AACC,  $2n = 38$ ) wprowadzono bądź przez kolchicynowanie, bądź z niezredukowanych gamet żeńskich, a następnie poddano rozmnożeniu. Analizowano strukturalne i funkcjonalne modyfikacje w uzyskanych pokoleniach F0 i F1 amfidiploidów (Dauvergne 2008). Wykazano, że zjawiska odpowiedzialne za zmiany funkcjonalne, takie jak metylacje genomowego DNA, zmiany profili transkrypcyjnych i białkowych zachodzą na etapie formowania mieszańców, natomiast analizy markerami molekularnymi (analizy strukturalne) wykazały profile addytywne loci rodzicielskich. W następnych pokoleniach występowały dynamiczne zmiany strukturalne i funkcjonalne, zarówno ze względu na badane cechy, jak i samonieźgodność. Wykazano, że regulacje strukturalne i funkcjonalne zależały od: podłoża genetycznego diploidalnych rodziców, stabilności mejotycznej z danego krzyżowania oraz wykorzystania gamet niezredukowanych, generującego więcej modyfikacji strukturalnych (Dauvergne i in. 2008).

## Literatura

---

- Book of Abstracts of the Brassica. 2008. (5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 16th Crucifer Genetics Workshop), 8-12 September 2008, Lillehammer, Norway:
- Bonnema G., Pino del Carpio D., Zhao J., Artemyeva A., Paulo J. 2008. Genetic diversity in *Brassica rapa*: 22.
- Dauvergne X., Salmon A., Hadj-Arab H., Pourtau N., Eber F., Letanneur J.C., Pouilly N., Huteau V., Coriton O., Lucas M.O., Duffé P., Szadkowski E., Belcram H., Huneau C., Chalhoub B., Albertin W., Marmagne A., Brabant P., Thiellement H., Alix K., Jenczewski E., Chèvre A.M. 2008. Structural and functional modifications in *Brassica napus* synthetic forms vary with progenitors genotype and the way polyploids are formed: 65.
- Dinkova-Kostova A.T. 2008. The effectiveness of the isothiocyanate sulforaphane in chemoprotection: 27.
- Ecke W., Clemens R., Becker H.C. 2008. Analysis of linkage disequilibrium in canola-quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.): 52.
- Endrigkeit J., Wang X., Zhang C., Meng J., Jung C. 2008. Development of functional markers for tocopherol: 29.
- Fallentin C., Barret P., Bregnon M., Lucas M.-O., Deschamps M., Leprince F., Fournier M.-T., Delourme R., Renard M. 2008. Identification of *fad2* and *fad3* mutations and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid content in rapeseed (*Brassica napus* L.): 54.

- Hansen M., Wold A.-B., Berge L., Bengtsson G.B., Borge G.I. 2008. Red cabbage, a vegetable rich on health-related glucosinolates: 58.
- Hirai M. 2008. Mapping of various traits in *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*: 38
- Iniguez-Luy F.L. 2008. Development of genetic tools in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* and their use to study the evolutionary fate of redundant genes: 49.
- Kim H.R., Choi S.R., Bae J., Hossain Md.J., Lee S.Y., Nguyen V.D., Jin M., Hong C.P., Koo D.H., Park B.-S., Bang J.W., Lim Y.P. 2008. Sequenced BAC anchored reference genetic map that reconciles with individual ten chromosomes of *Brassica rapa*: 36.
- King G.J., Amoah S., Barker J., Carion P., Clare H., Kurup S., Usher S. 2008. Investigating epigenetic variation in *Brassica* crop genomes: 37.
- Kwon S.-J., Park B.-S. 2008. An understanding of *Brassica* genome based on comparative genomics with *Arabidopsis*: sequencing progress of chromosome 1 and 2: 68.
- Laperche A., Falentin C., Wagner J., Boutet G., Glory P., Label A., Manzanares-Dauleux M.J., Renard M. 2008. Structure of genetic diversity and elaboration of core collections in *Brassica oleracea*: 51.
- Leflon M., Eber F., Grandont L., Chelysheva L., Jenczewski E., Chèvre A.M. 2008. Variation of crossover rates due to the ploidy level and genetic factor in interspecific hybrids between the tetraploid *Brassica napus* and *B. rapa*, one of its diploid progenitor: 64.
- Long Y., Shao M., Xia W., Wang J., Meng J. 2008. Genome distribution of DNA methylation loci and its relationship with important agronomic traits in oilseed *Brassica*: 69.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W.M., Spasibonek S., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2008. Development of allele-specific SNP markers for the low-linolenic mutant genotype of winter oilseed rape: 134.
- Morris K., Clay H.A., Dent K.C., Barker G., Finch-Savage W.E. 2008. Seed vigour in *Brassica oleracea*: using natural variation to identify candidate genes: 39.
- Nelson M.N., Castello M.-C., Mason A.E., Thomson L., Yan G., Cowling W.A. 2008. High frequencies of unreduced gametes and recombination in male meioses in *Brassica napus* L. × *B. carinata* Braun interspecific hybrids: 63.
- Obermeier C., Hosseini B., Friedt W., Snowden R. 2008. Serial analysis of gene expression (SAGE) during *Brassica napus* seed development: 41.
- Pink D., Teakle G., Barker G., Allender C., Astley D. 2008. Accessing biodiversity in brassica genetic resource collections through development of diversity fixed foundation sets: 26.
- Pino del Carpio D., de Vos R., Paulo J., van der Linden G., Bonnema G. 2008. Association mapping of metabolites and developmental traits in *Brassica rapa*: 24.
- Rouxel T., Fudal I., Daverdin G., Gout L., Parlange F., Aubertot J.-N., Balesdent M.H. 2008. Genome structure and cultural practices impact mechanisms and speed of molecular evolution of the avirulence alleles in the stem canker pathogen *Leptosphaeria maculans*: 43.
- Spasibonek S. 2006. New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) with changed fatty acid composition. *Plant Breed.*, 125: 259-267.
- Rakow G. 1973. Selektion auf Linol- und Linolensäuregehalt in Rapssamen nach mutagener Behandlung. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 69: 62-82.
- Ryder C., Barker G., Teakle G., Lynn J., Pink D., Deswarte J.-C., Farquar G., White P., Thompson A. 2008. Water-use-efficiency genes in *Brassica oleracea*: 42.
- Thorup-Kristensen K. 2008. Brassicas in sustainable production and organic farming: 30.



- Town C.D., Pires C., Paterson A.J., Bancroft J. 2008. Comparative genomics of the *Brassicaceae*: sequence relationships within the genus *Brassica* and to close relatives including *Arabidopsis* and *Sisymbrium*: 34.
- Traka M. 2008. Broccoli consumption interferes with prostate cancer progression: Mechanisms of action: 28.
- Wespeł F., Becker H. 2008. Rapeseed as a model to analyse “fixed heterosis” in allopolyploid plants: 66.
- Xiaoming W., Guangyuan L., Biyun C., Kun X., Guizhen G. 2008. Rapeseed elite core collection: a high-resolution platform for genetic dissection of important traits by linkage disequilibrium: 25.