

Joanna Wolko

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

Adres do korespondencji: jwolko@nico.ihar.poznan.pl

Możliwości poszerzania zmienności genetycznej u *Brassica napus* L.

Possibilities of genetic diversity broadening in *Brassica napus* L.

Słowa kluczowe: *Brassica* sp., heterozja, zmienność genetyczna, dystans genetyczny, resynteza, krzyżowanie międzygatunkowe

Streszczenie

Praca ta stanowi przegląd literatury dotyczący poszerzania zmienności genetycznej rzepaku (*Brassica napus* L.) w kontekście efektu heterozji, który jest obecnie wykorzystywany w programach hodowlanych wielu roślin, w tym także rzepaku. Dzięki heterozji możliwe jest zwiększenie plonu pierwszego pokolenia mieszańcowego uzyskanego z krzyżowania oddalonych od siebie genetycznie osobników. Wskutek intensywnej hodowli jakościowej rzepaku, zmniejszeniu uległo zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe tego gatunku. Aby poszerzyć pulę genetyczną i uzyskiwać większy efekt heterozji stosowane są różnego rodzaju krzyżowania. Wykorzystywana jest m.in. resynteza rzepaku z gatunków rodzicielskich, czyli krzyżowanie *B. rapa* z *B. oleracea*, poprzez którą możliwe jest uzyskanie roślin gatunku *B. napus* odległych genetycznie od uprawianych odmian. Wykonywane są także z powodzeniem krzyżowania *B. napus* z *B. rapa* czy *B. napus* z *B. oleracea*. Inną metodą poszerzania zmienności genetycznej jest wykorzystanie subgenomów i introgresji materiału genetycznego z gatunków pokrewnych do rzepaku. Tworzony jest nowy typ rzepaku poprzez krzyżowanie *B. napus* z *B. rapa* bądź *B. rapa* z *B. carinata*, a następnie uzyskane mieszańce krzyżowane są z uprawianymi odmianami lub liniami hodowlanymi *B. napus*. Innym sposobem pozwalającym uzyskiwać osobniki odległe genetycznie jest wykorzystanie zróżnicowania pomiędzy formą jarą, przewodkową a ozimą rzepaku.

Key words: *Brassica* sp., heterosis, genetic diversity, genetic distance, resynthesis, interspecies crosses

Abstract

This paper provides the literature review about genetic diversity in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in the context of heterosis. Heterosis effect is used nowadays in breeding programs of many crop species, including oilseed rape. Heterosis enables increasing seed yield in F₁ hybrid generation obtained via crossing of genetically distant plants. As a result of intensive quality breeding, genetic and phenotypic diversity in oilseed rape has decreased. In order to diversify gene pool and achieve higher effect of heterosis, various crosses are performed. One of the methods is resynthesis of *Brassica napus* from the parental *B. rapa* and *B. oleracea* species, in order to obtain genetically diversified *B. napus* genotypes. There are also successful interspecific crosses between *B. napus* × *B. rapa* or *B. napus* × *B. oleracea*. Diversification of genetic variation has been also achieved using subgenoms, through introgression of genetic material of closely related species. There is created a new type of *Brassica napus* through crosses between *B. napus* and *B. rapa* or *B. rapa* with *B. carinata*. Than generated hybrids are used for crosses with cultivated varieties or breeding lines of *B. napus*. Ecotypes of winter, semi-winter and spring type of *B. napus* are also used to obtain genetically distant genotypes.

Wstęp

U rzepaku efekt heterozji przejawia się głównie wzrostem plonu nasion i jest zazwyczaj większy u formy ozimej niż u jarej. Wielkość tego efektu zależy od doboru genotypów kombinacji mieszańcowej, jak również od warunków środowiskowych. Istotne też jest krzyżowanie form oddalonych od siebie pod względem genetycznym, czego następstwem są mieszańce pokolenia F_1 o zwiększonym plonie. Takiego wyniku nie uzyskuje się przy łączeniu linii blisko spokrewnionych. Znaczny efekt heterozji dla plonu nasion u rzepaku ozimego (*Brassica napus*) wykazali w swoich badaniach: Nowakowska i in. 2005, Yu i in. 2005, Gehringer i in. 2007, Qian i in. 2007, Girke 2012b, (wiele doniesień o tekstach źródłowych u Bartkowiak-Broda 1991). Maksymalny efekt heterozji dla tej cechy stwierdzili Diers i in. (1996) – 81% oraz Riaz in. (2001) – 89%. W hodowli odmian mieszańcowych rzepaku ozimego uzyskuje się o około 10 do 20% wyższy plon nasion w porównaniu z odmianami populacyjnymi. Według ostatnich wyników COBORU 2012, dotyczących plenności rzepaku ozimego w Polsce wynika, że wśród odmian populacyjnych plon nasion zawierał się w przedziale od 77 do 119% plonu odmian wzorcowych, a wśród odmian mieszańcowych pomiędzy 89 a 121%.

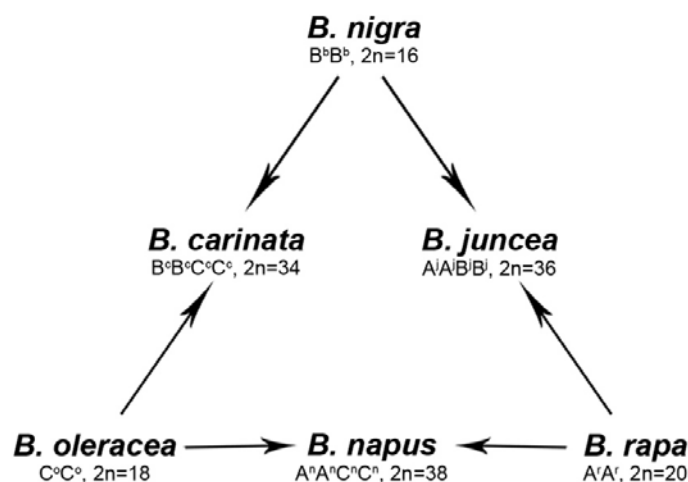
Według teorii heterozji, im bardziej oddalone od siebie pod względem genetycznym osobniki krzyżuje się ze sobą, tym większą bujność uzyskuje się u ich potomstwa (Teklewold i Becker 2006). Niezmiernie ważny jest zatem dobór komponentów rodzicielskich, a dystans genetyczny (GD – ang. genetic distance) jest jednym z głównych wytycznych wspomagających ten dobór. Potwierdzono to m.in. w badaniach na rzepaku ozimym (Nowakowska i in. 2005) i kukurydzy (Betráin i in. 2003). Nie zawsze jednak teoria ta się sprawdza. Związku między dystansem genetycznym a plonem i efektem heterozji nie udało się potwierdzić statystycznie np. w badaniach nad pszenicą (Liu i in. 1999), gorczycą sarepską (Jain i in. 1994) czy również rzepakiem ozimym (Liersch i in. 2010). Oprócz dystansu genetycznego bierze się też często pod uwagę wielkość dystansu fenotypowego, lecz i ten parametr w niektórych przypadkach nie wykazuje istotnej korelacji z efektem heterozji (Popławska i in. 2010, Liersch i in. 2011). Pomimo doniesień o braku korelacji pomiędzy dystansem genetycznym czy fenotypowym a heterozją, większość hodowców obserwuje dodatni wpływ doboru odległych genetycznie komponentów rodzicielskich mieszańców F_1 na wielkość efektu heterozji. W związku z tym, jak w przypadku rzepaku, prowadzi się prace mające na celu poszerzenie puli genetycznej w obrębie danego gatunku.

W celu zwiększenia różnorodności genetycznej materiałów hodowlanych rzepaku, pozwalającej na utworzenie odległych pul genetycznych, które z kolei wykorzystane w hodowli mieszańcowej zapewniają uzyskanie wysokiego efektu heterozji, wykonuje się różnego rodzaju krzyżowania: międzyrodzajowe, międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe.

W celu stworzenia mieszańca pokolenia F_1 krzyżuje się osobniki homozygotyczne pochodzące z chowu wsobnego. Proces uzyskiwania linii wsobnych rzepaku trwa 5–6 pokoleń. Obecnie linie homozygotyczne uzyskuje się głównie poprzez androgenezę w kulturach *in vitro*. Linie podwojonych haploidów otrzymuje się z roślin dawców w jednym pokoleniu (Cegielska-Taras i Bartkowiak-Broda 2006). Metodę tą wykorzystano m.in. do selekcji homozygotycznych linii restorerów (*Rfo*) dla genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterility CMS *ogura* wykorzystywanej w hodowli heterozyjnej rzepaku (Popławska i in. 2006).

Hodowla mająca na celu ulepszenie cech jakościowych (eliminacja kwasu erukowego i obniżenie zawartości glukozyzolanów) nasion rzepaku spowodowała zawężenie zmienności genetycznej gatunku. Wszystkie uprawiane odmiany podwójnie ulepszone (syn. canola) zawierają w swoim genotypie informację genetyczną bezerukowych linii jarej pastewnej odmiany Liho (Stefansson i in. 1961) warunkującej brak kwasu erukowego w oleju z nasion rzepaku oraz geny warunkujące niską zawartość glukozyzolanów pochodzące z jarej odmiany Bronowski (Krzymański 1968). Także bezerukowe i niskoglukozyzolanowe odmiany gatunków pokrewnych, jak *B. rapa* (Downey 1964) i *B. juncea* (Love i in. 1991) mają to samo pochodzenie. Zawężenie zmienności genetycznej u odmian mieszańcowych powoduje ograniczenie wysokości uzyskiwanego efektu heterozji, jak również ograniczenie poziomu plonowania odmian populacyjnych, ze względu na pulę genetyczną otrzymywanych rekombinantów będących podstawą hodowli tych odmian.

Możliwość poszerzenia zmienności genetycznej gatunku *B. napus* daje jego pochodzenie. Rzepak jest amfidiploidem spokrewnionym z innymi gatunkami z rodzaju *Brassica* (U 1935, rys. 1).



Rys. 1. Zależności genetyczne w obrębie rodzaju *Brassica* — *Genetic relationships among Brassica species*

Są trzy podstawowe gatunki diploidalne: *B. rapa* (AA, $2n = 20$), *B. oleracea* (CC, $2n = 18$), *B. nigra* (BB, $2n = 16$) oraz trzy allopoliploidy: *B. napus* (AACC, $2n = 38$), *B. juncea* (AABB, $2n = 36$) oraz *B. carinata* (BBCC, $2n = 34$). Allopoliploidy powstały przez spontaniczną hybrydyzację między diploidami, co zostało poparte kolejnymi badaniami (Schranz i in. 2006), w których wykazano homologię pomiędzy korespondującymi genomami. Niestety wiele lat intensywnej hodowli tych roślin doprowadziło do ograniczenia różnorodności genetycznej w obrębie poszczególnych gatunków podstawowych, a także pomiędzy allopoliploidami a ich diploidalnymi rodzicami (Nishio 2000, Pires i in. 2004). Rzepak (*Brassica napus*) pochodzi z przekrzyżowania się rzepiku (*Brassica rapa* syn. *Brassica campestris*) z kapustą (*Brassica oleracea*) (Kimber i McGregor 1995), co nastąpiło spontanicznie kilka wieków temu w regionie Morza Śródziemnego w południowo-zachodniej Europie (Friedt i in. 2007). Pomimo krótkiego okresu udomawiania i wykorzystywania rzepaku w hodowli jako rośliny oleistej, dopiero około 300–400 lat temu (Gómez-Campo and Prakash 1999) stał się on najważniejszą rośliną oleistą w Europie i Polsce oraz drugą po soi na świecie. Dawniej olej rzepakowy wykorzystywany był tylko do oświetlania i jako smar. Po opracowaniu metody rafinacji na cele spożywcze uzyskiwano niskowartościowy olej jadalny, a dopiero po wprowadzonych zmianach genetycznych, jakość produkowanego oleju polepszyła się i nastąpił gwałtowny rozwój uprawy rzepaku. Wyróżnia się trzy formy rzepaku: jarą, przewódkową oraz ozimą, która wymaga jaryzacji pobudzającej roślinę do kwitnienia. Rzepak ozimy zazwyczaj plonuje wyżej od rzepaku jarego. Ze względu na panujące warunki pogodowe w umiarkowanym klimacie krajów europejskich i w Chinach najpowszechniej uprawiany jest rzepak ozimy, w Azji jego forma przewódkowa, a rzepak jary w klimacie chłodnym i kontynentalnym, czyli w Europie północnej, Kanadzie, Chinach i Australii (Friedt i in. 2007). Pomędzy tymi trzema formami rzepaku występują wyraźne różnice genetyczne, dlatego krzyżowanie ich może być sposobem na uzyskiwanie genotypów należących do odległych pul genetycznych i zwiększenie wykorzystania efektu heterozji (Qian i in. 2006).

Ocena różnorodności genetycznej w obrębie *Brassica napus*

Proces udomawiania i udoskonalania roślin uprawnych, w tym także rzepaku, poprzez selekcję, doprowadził w dużej mierze do uzyskania pożądanych w hodowli cech, ale jednocześnie do ograniczenia różnorodności alleli w populacji. Natomiast wśród dzikich krewnych danego gatunku, różnorodność genetyczna nadal występuje (Ladizinsky 1989). Już Vavilov (1940) proponował wykorzystanie dzikich bądź niezaadaptowanych form, jako źródła doskonalenia roślin uprawnych. Krzyżowanie z dzikimi formami danego gatunku pozwala często uzyskać zwiększoną różnorodność genetyczną (Osborn i in. 2007). Aby utrzymać genetyczną zmienność

i mieć możliwość wykorzystania form pierwotnych, dla wielu gatunków stworzono banki plazmy zarodkowej.

Problem ograniczonej puli genetycznej występuje także u rzepaku. Udomowienie tego gatunku kilkaset lat temu, ograniczony zasięg geograficzny, intensywna, przez długi czas jednokierunkowa selekcja i hodowla, doprowadziły do zmniejszenia różnorodności rzepaku zarówno pod względem genetycznym, jak i fenotypowym. Występujące obecnie odmiany posiadają stosunkowo wąską bazę genetyczną w porównaniu z gatunkami rodzicielskimi *Brassica napus*. Jednocześnie rzepak jest rośliną uprawną, która nie posiada występujących w stanie naturalnym dzikich form, a co za tym idzie, nie dysponuje naturalnymi zasobami zmienności, która mogłaby być wykorzystana do zwiększania zróżnicowania genetycznego odmian uprawnych.

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania różnorodności genetycznej gatunku *Brassica napus* i gatunków pokrewnych. Bus i in. (2011) przy użyciu 89 kombinacji starterów mikrosatelitarnych genotypowali 509 linii wsobnych *B. napus*. Wybrane linie dobierano z różnych typów rzepaku tak, aby badany materiał był jak najbardziej różnorodny. Stwierdzono, że rzepak ozimy, rzepak jary oraz brukiew (*B. napus* var. *rapifera*) tworzą trzy główne grupy skupień. Wśród badanych typów *Brassica*, różnorodność genetyczna rzepaku ozimego była najniższa, a zmniejszanie się różnorodności obserwowano wraz z obniżaniem się poziomu kwasu erukowego oraz glukozynolanów w poszczególnych liniach.

W innych badaniach (Li i in. 2012) oceniano zmienność genetyczną oraz pokrewieństwo 92 genotypów rzepaku w różnych części świata, takich jak Chiny, Europa, Stany Zjednoczone oraz Kanada. Użyto 60 starterów RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA – losowa amplifikacja polimorficznego DNA) oraz 22 startery EST-SSR (EST – ang. Expressed Sequence Tags – sekwencyjne znaczniki ekspresji). Analiza skupień podzieliła badane obiekty na trzy główne klastry: I klaster to odmiany pochodzące głównie z Chin, gdzie występuje forma przewódkowa rzepaku, klaster II to odmiany hodowane w Europie i Stanach Zjednoczonych, gdzie uprawiany jest rzepak ozimy, a III klaster stanowiły formy ozime i jare, głównie z Chin i Kanady. Stwierdzono też, że odmiany rzepaku ze Stanach Zjednoczonych są najbardziej oddalone pod względem genetycznym od odmian z pozostałych regionów, szczególnie od tych z Chin. Dlatego też autorzy sugerują wykorzystanie odmian ze Stanów Zjednoczonych, jako źródła dla zwiększenia zmienności genetycznej odmian chińskich i odwrotnie.

W kolejnych badaniach (Qu i in. 2012) także przeprowadzono analizę zróżnicowania genetycznego oraz pokrewieństwa różnych genotypów *Brassica napus*. Wykorzystując 37 markerów mikrosatelitarnych (SSR – ang. Simple Sequence Repeats) scharakteryzowano 217 linii *B. napus*. Dzięki analizie skupień wyodrębniono dwie główne grupy: I i II. Grupa IA – to żółtonasienne i czarnonasienne odmiany oraz linie hodowlane, IB – żółtonasienne odmiany oraz linie hodowlane, głównie uprawiane w Chinach, a do grupy IC należą czarnonasienne odmiany oraz

linie hodowlane o niskim poziomie kwasu erukowego. II grupa natomiast obejmuje linie hodowlane i niemieckie odmiany charakteryzujące się czarnym kolorem nasion, wysoką zawartością kwasu oleinowego (>80%) oraz niskim poziomem kwasu erukowego i glukozynolanów. Otrzymane wyniki mogą być przydatne do pełniejszego poznania struktury genetycznej *B. napus* oraz przy dobieraniu komponentów rodzicielskich mieszańców doświadczalnych w hodowli mieszańcowej lub do tworzenia nowych rekombinantów w hodowli odmian populacyjnych.

Resynteza rzepaku (*Brassica napus*) z gatunków podstawowych (*B. rapa* × *B. oleracea*)

Jedną z metod służących do zwiększenia zróżnicowania genetycznego rzepaku jest jego resynteza, która prowadzi do uzyskania roślin wykazujących odrębność genetyczną od odmian i linii rzepaku obecnie uprawianego i hodowanego. Resynteza polega na krzyżowaniu ze sobą wysoce polimorficznych, diploidalnych gatunków, z których *B. napus* się wywodzi, czyli *B. rapa* z *B. oleracea*. Dzięki temu zabiegowi możliwe jest wprowadzanie do hodowli interesujących cech, takich jak np. odporność na choroby, suszę i inne. Rodziców dobiera się także pod względem korzystnego składu chemicznego takiego jak: niska zawartość kwasu erukowego czy glukozynolanów. Cechy takie posiadają tylko formy rzepiku, do których wprowadzono je wcześniej z rzepaku. Ważnym kryterium w doborze do programów hodowlanych odpowiedniej linii pochodzącej z resyntezy jest jej dystans genetyczny w stosunku do materiału hodowlanego. Obecnie, przy zastosowaniu technik *in vitro*, resynteza rzepaku jest bardzo efektywna (Sosnowska 2011). Jednak uzyskane linie resyntetyczne nie nadają się do bezpośredniego wykorzystania w hodowli, ponieważ często charakteryzują się niską płodnością i plennością. Niosą one gorsze wartości użytkowe, takie jak wysoka zawartość kwasu erukowego czy glukozynolanów, niższa zawartość oleju lub też inne niepożądane cechy pochodzące od jednego bądź obu form rodzicielskich (Seyis i in. 2003). Dlatego uzyskane linie pochodzące z resyntezy (RS), aby były przydatne w hodowli, muszą być krzyżowane wstecznie z wartościowymi gospodarczo odmianami, liniami czy rodami *B. napus* w celu uzyskania rekombinantów o korzystnych cechach (Becker i in. 1995). Dopiero wówczas mogą być włączone do hodowli heterozyjnej czy odmian populacyjnych.

W jednym z projektów zrealizowanych przez Beckera i in. (1995) przebadano 17 linii resyntetycznych oraz 24 odmiany hodowlane rzepaku. Porównano różnice genetyczne między nimi oraz oszacowano dystans genetyczny na podstawie markerów RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfizm długości restrykcyjnych fragmentów) i izoenzymów. Dendrogram podzielił badane odmiany rzepaku na trzy grupy: rzepak jary pochodzący z Europy i Ameryki

Północnej, rzepak ozimy tego samego pochodzenia i rzepak pochodzący z Azji. Natomiast większość linii RS różniło się od form uprawnych. Stwierdzono także, że dzięki temu, iż rzepak ozimy i jary tworzą dwie odrębne grupy, mogą być dla siebie nawzajem źródłem zmienności genetycznej.

Seyis i in. (2003) podjęli próbę porównania 165 linii pochodzących z resyntezy z 40 różnymi odmianami rzepaku jarego i pastewnego. Linie RS pochodziły z krzyżowania Indian Yellow Sarson (*B. rapa* ssp. *trilocularis*) z kalafiorem (*B. oleracea* convar. *botrytis*), a do oszacowania dystansu genetycznego wykorzystano markery AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów). Analiza skupień wykazała różnicowanie pomiędzy liniami RS, a także jak się tego spodziewano, były one genetycznie bardziej zróżnicowane od uprawnych odmian rzepaku.

Doświadczenia z liniami resyntetycznymi z wykorzystaniem linii podwojonych haploidów (DH) przeprowadził Gehringer i in. (2007). W badaniach tych skrzyżowano podwójnie ulepszone odmiany rzepaku ozimego z półsyntetycznymi liniami, które pochodziły ze zróżnicowanych genetycznie linii resyntetycznych krzyżowanych z liniami wysokoenergetycznymi i o wysokiej zawartości glukozytanów. W ten sposób uzyskano populację 190 linii DH, które następnie krzyżowano z męskosterylnym testerem. Badano wielkość plonu w dwóch lokalizacjach prezentujących dwa ekstremalnie różne środowiska pod względem warunków klimatycznych i glebowych. Heterozja plonu nasion mieszańców obliczona względem średniej rodziców wynosiła do 43%. Poziom heterozji tych mieszańców był szczególnie wysoki w środowisku glebowym ubogim w składniki odżywcze i w chłodnym klimacie, gdzie najlepsze mieszańce testowe wykazywały znacznie wyższy plon niż standardowe odmiany populacyjne i mieszańcowe. Dzięki tym badaniom stwierdzono przydatność i zdolności adaptacyjne wysoko heterozyjnych mieszańców rzepaku na glebach ubogich oraz prawdopodobieństwo silnego wpływu heterozji na efektywność pobierania substancji odżywczych.

W innych badaniach (Girke i in. 2012a) przy pomocy markerów RFLP oszacowano dystans genetyczny 142 linii resyntetycznych (RS) oraz 57 linii rzepaku ozimego i jarego hodowanego w Europie, Ameryce Północnej i Azji. Największy dystans genetyczny (0,36) zaobserwowano pomiędzy liniami pochodzącymi z resyntezy. Wśród rzepaku ozimego wynosił on 0,21, jarego 0,23, a wśród genotypów pochodzących z Azji 0,28. W innej pracy ci sami autorzy (Girke i in. 2012b) opisali wykorzystanie resyntetycznych linii rzepaku w celu utworzenia szerszej puli genowej. Skrzyżowano 44 linie resyntetyczne o zróżnicowanym tle genetycznym z dwoma męskosterylnymi liniami testowymi rzepaku ozimego MSL Lembke. Mieszańce oceniano wraz z ich rodzicami. Badano plon, wysokość roślin, zawartość tłuszczu w nasionach, zawartość białka, a także na podstawie markerów RFLP oszacowano dystans genetyczny. Plon nasion linii RS wynosił między 44,6 a 85,1%, plon mieszańców od 91,6 do 116,6%, a zawartość oleju w nasionach mieszańców

od 94,5 do 103,3% w stosunku do odmian wzorcowych. Efekt heterozji w plonie nasion względem wartości średniej rodziców wynosił od -3,4 do 47,2%. Jakkolwiek dystans genetyczny linii rodzicielskich nie był istotnie pozytywnie skorelowany z efektem heterozji dla żadnej z badanych cech, to jednak stwierdzono, że linie resyntetyczne są wartościowym źródłem dla hodowli mieszańcowej, dzięki dużej odległości genetycznej w stosunku do uprawianych obecnie odmian rzepaku.

Jesske i in. (2011) także podjęli próbę poszerzenia puli genetycznej rzepaku poprzez jego resyntezę. Przebadano 56 różnorodnych odmian rzepaku oraz 70 linii resyntetycznych, z czego 40 linii pochodziło z krzyżowania *B. rapa* z dzikimi formami *B. oleracea* (*B. bourgeaui*, *B. cretica*, *B. incana*, *B. insularis*, *B. hilarionis*, *B. macrocarpa*, *B. montana*, *B. rupestris*, *B. taurica*, *B. villosa*). Na podstawie markerów AFLP oceniono dystans genetyczny. Stwierdzono, że linie resyntetyczne utworzone przy udziale dzikich podgatunków *B. oleracea* są bardziej zróżnicowane genetycznie oraz występuje większy dystans z uprawianymi odmianami niż między odmianami a liniami resyntetycznymi powstałymi z form uprawnych gatunków podstawowych. Dlatego też użycie dzikich typów *B. oleracea* do tworzenia linii resyntetycznych może być bardziej efektywne w zwiększaniu efektu heterozji. Także dzięki resyntezie rzepaku ozimego przez skrzyżowanie kapusty chińskiej – pak choy (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *Chinensis*) z jarmuzem (*Brassica oleracea* ssp. *acephala* var. *sabellica*) uzyskano rośliny odrębne genetycznie od linii DH oraz odmian rzepaku ozimego podwójnie ulepszonych aktualnie uprawianego i hodowanego (Sosnowska i in. 2010).

Tworzenie półsyntetycznych form rzepaku

B. napus × *B. rapa*

Brassica rapa – rzepik – roślina udomowiona ponad 1000 lat temu w Azji jako oleista roślina uprawna, wyróżnia się znaczną zmiennością genetyczną (Liu 2000). Podobnie jak w gatunku *B. napus*, u *B. rapa* można wyróżnić trzy formy: ozimą, przewodkową i jarą. Rzepik jest powszechnie wykorzystywany do poszerzania puli genetycznej rzepaku w programach hodowlanych w Chinach (Qian i in. 2006) i Australii (Chen i in. 2008a). Największy efekt daje użycie genotypu *Brassica rapa* posiadającego subgenom A najbardziej oddalony od subgenomu A w *B. napus*. Mei i in. (2011a) unikając konieczności wykonywania krzyżowań międzygatunkowych, zaproponowali wykorzystanie wirtualnych linii rzepaku w celu zbadania genetycznych różnic między subgenomem A naturalnego rzepaku a różnymi formami *B. rapa*. Utworzono 168 wirtualnych linii rzepaku, a ich potencjał genetyczny został oszacowany na podstawie zmienności markerów mikrosatelitarnych (SSR) u linii rodzicielskich. Jako genotypy rodzicielskie użyto 3 genotypy *B. oleracea*, 56 *B. rapa* oraz 9 *B. napus*. Średnie wartości dystansu genetycznego wewnątrz

badanych gatunków wynosiły: 0,424 dla *B. oleracea*, 0,535 dla *B. rapa* oraz 0,359 dla *B. napus*. Dystans genetyczny pomiędzy *B. napus* i *B. rapa* wynosił 0,900, a pomiędzy *B. napus* i *B. oleracea* 0,701. Tym samym potwierdzono, że wykorzystanie *B. rapa* może w większym stopniu przyczynić się do poszerzenia puli genetycznej rzepaku. Stwierdzono jednocześnie, że dystans genetyczny między *B. napus* i *B. rapa* (0,900) był większy niż między naturalnym i wirtualnym rzepakiem (0,653), natomiast największy występował między naturalnym rzepakiem a liniami wirtualnymi pochodzącymi od formy przewodkowej *B. rapa*. Autorzy badań przypuszczają, że ta forma *B. rapa* może być najbardziej efektywna przy poszerzaniu puli genetycznej rzepaku.

B. napus* × *B. oleracea

Mei i in. (2011b) przeprowadzili doświadczenia przybliżające pochodzenie subgenomu C *Brassica napus*. Za pomocą markerów SSR przeanalizowano 39 genotypów *B. oleracea* oraz 4 *B. rapa* i na tej podstawie stworzono 156 wirtualnych linii rzepaku, których strukturę genetyczną następnie porównywano z występującymi w hodowli i uprawie liniami rzepaku oraz z liniami rodzicielskimi. Stwierdzono, że subgenom C uprawianego *B. napus* jest zbliżony genetycznie do genomu uprawianego *B. oleracea* oraz do odpowiadających mu dzikich typów takich jak *B. incana*, *B. bourgeauii*, *B. montana*, *B. oleracea ssp. oleracea* i *B. cretica*. Przedstawione badania pokazują, że typy te mogą być źródłem subgenomu C dla *B. napus*. Można je zatem wykorzystać do krzyżowań prowadzących do zwiększenia różnorodności genetycznej rzepaku oraz do zwiększenia efektu heterozji w mieszańcach pokolenia F₁.

Zamierzeniem badań Bennett i in. (2012) była ocena możliwości introgresji pożądanych cech jakościowych z *B. oleracea* do *B. napus* celem zwiększenia zmienności genetycznej rzepaku. Krzyżowano linie *B. napus* z *B. oleracea*, a uzyskane linie wsobne krzyżowano następnie z liniami *B. oleracea*. Użyte do badań genotypy *B. napus* były podwójnie ulepszone, typu jarego, a *B. oleracea* były wysoce wsobne i charakteryzowały się wysoką zawartością kwasu erukowego (40%) oraz glukozynolanów (>80 μmol/g nasion). Badane populacje weryfikowano pod względem jakości nasion. Markery SSR posłużyły do oceny ich różnorodności genetycznej, a wykorzystując cytometrię przepływową oszacowano ploidalność oraz przeprowadzono obserwacje podziałów meiotycznych chromosomów. Genotypy zeroerukowe i niskoglukozynolanowe wyselekcjonowano ze stosunkowo niewielkiej populacji segregującej. Oceniono, że u uzyskanego potomstwa zawartość jądrowego DNA była podobna jak u rodzicielskich linii *B. napus*, co wskazuje na to, że linie pochodzące z krzyżowań wstecznych z *B. oleracea* są stabilizowane do ploidalnego poziomu *B. napus* (2n = 38). Dzięki markerom molekularnym ujawniono wysoki poziom alleli pochodzących z *B. oleracea* wśród linii wsobnych. Sugeruje to, iż introgresja genetycznie zróżnicowanego genomu C z *B. oleracea* do *B. napus* jest realna i może przyczynić się do poszerzenia zmienności u rzepaku jarego.

Selekcja subgenomowa (nowy typ rzepaku): *B. napus* × *B. carinata* i *B. rapa*

W obrębie rodzaju *Brassica*, w celu rozróżnienia poszczególnych gatunków rodzimych oraz kolejnych się z nich wywodzących, wprowadzono pojęcie subgenomu oznaczanego dodatkowo literą w indeksie górnym (Li i in. 2004, 2006, 2007, Qian i in. 2005). Dla przykładu: *B. rapa* (A^rA^r); *B. oleracea* (C^oC^o), *B. napus* ($A^nA^nC^nC^n$); *B. carinata* ($B^cB^cC^cC^c$). *Brassica carinata* istnieje w Afryce i w Azji od tysięcy lat jako roślina oleista i uprawna. Jest ona dobrym źródłem zmienności genetycznej w obrębie rodzaju *Brassica* (Liu i in. 2000). Zaobserwowano znaczny wigor wzrostu u mieszańców międzygatunkowych powstałych z krzyżowania *B. napus* z *B. carinata* (Meng i in. 1998), a także silną heterozję dla plonu po krzyżowaniu *B. napus* z *B. rapa* (Liu i in. 2002, Qian i in. 2003). Dlatego też zaproponowano wykorzystanie heterozji subgenomowej w hodowli odmian mieszańcowych rzepaku poprzez wyhodowanie nowego typu *B. napus*. Pierwszym krokiem w jego tworzeniu jest uzyskanie genomu $A^rA^rC^nC^n$ lub $A^rA^rC^cC^c$ przez międzygatunkowe krzyżowanie odpowiednio *B. napus* z *B. rapa* lub *B. rapa* z *B. carinata*. Następnie linie te krzyżowano z naturalnym *B. napus*. W ten sposób uzyskiwano mieszańce międzygatunkowe o genomach: $A^rA^nC^nC^n$ lub $A^rA^rC^cC^n$ (Li i in. 2005, Qian i in. 2005). W celu oceny heterozji mieszańców międzygatunkowych z pierwszym pokoleniem nowego typu rzepaku *B. napus*, przez 2–4 lata prowadzono serie prób polowych w kilku strefach klimatycznych, w których uprawiane są różne formy rzepaku: Chiny -rzepak przewodkowy, Niemcy i Dania – rzepak ozimy, Kanada i Australia – rzepak jary. W doświadczeniach z każdego obszaru zaobserwowano znaczącą heterozję dla plonu nasion (obliczoną w stosunku do średniej wartości rodziców) wynoszącą od 21,73 do 86,50%, średnio 43,15%. Stwierdzono jednocześnie, że najlepsze mieszańce subgenomowe przewyższały nawet lokalne mieszańce testowe, wśród których efekt heterozji wynosił do 75% (Li i in. 2006, Qian i in. 2005, 2006, 2007). Niestety większość linii pierwszego pokolenia nowego typu rzepaku nie zaadaptowała się do lokalnych warunków środowiska. Srogie zimy w północnej Europie oraz choroba – sucha zgnilizna kapustnych – wywoływana przez grzyby *Leptosphaeria maculans* w Australii i Kanadzie spowodowały duże straty w plonie wielu kombinacji. Ponadto, tylko niewielka część komponentów obcego subgenomu uległa introgresji do linii pierwszego pokolenia nowego typu rzepaku.

Dla zwiększenia zawartości obcego subgenomu, a tym samym uzyskania lepszego efektu heterozji, w następnych doświadczeniach (Zou i in. 2010) tworzone drugie pokolenie nowego typu rzepaku poprzez kolejne introgresje komponentów obcego subgenomu. Linie pierwszego pokolenia nowego typu rzepaku krzyżowano między sobą, a następnie poddawano intensywnej selekcji na podstawie markerów molekularnych w celu uzyskania drugiego pokolenia nowego typu rzepaku. Poziom wprowadzonych komponentów w nowym typie rzepaku oceniano na pod-

stawie markerów AFLP. Introgresję komponentów pochodzących z genomu *B. carinata* i *B. rapa* w pierwszym pokoleniu oceniono na 30–40% (A^r/C^c), a podobieństwo genetyczne między uzyskanymi liniami pierwszego pokolenia nowego typu wahało się od 0,47 do 0,96. W drugim pokoleniu natomiast poziom wprowadzonych komponentów A^r/C^c oszacowano na poziomie 20–86%. Oceniono różnice genetyczne pomiędzy liniami nowego typu rzepaku. Drugie pokolenie wykazywało lepsze cechy agronomiczne, większą introgresję obcego subgenomu oraz zwiększony efekt heterozji w porównaniu z pokoleniem pierwszym. Stwierdzono znaczącą dodatnią korelację pomiędzy wielkością efektu heterozji i stopniem wprowadzenia komponentów subgenomów w rodzicielskich liniach rzepaku nowego typu. Niestety dalszy wzrost heterozji był trudny do uzyskania z powodu ograniczonego źródła dla tworzenia linii drugiego pokolenia, na które składało się oryginalnie siedem odmian *B. rapa* oraz z dwie odmiany *B. carinata*. W celu maksymalnego wykorzystania heterozji subgenomowej w rzepaku zaproponowano wyhodowanie trzeciego pokolenia linii nowego typu, przez ustalenie puli genetycznej zawierającej znaczną zmienność genetyczną w subgenomach A^r/C^c (Zou i in. 2010).

Kolejnym etapem tych badań prowadzonych przez Xiao i in. (2010) było wytworzenie pentaploidalnych mieszańców. W tym celu wykorzystano ok. 300 roślin heksaploidalnych ($A^rA^rB^cB^cC^cC^c$) (Jiang i in. 2007) utworzonych przez krzyżowanie wielu kombinacji *B. carinata*/*B. rapa* z liniami drugiego pokolenia nowego typu rzepaku (Zou i in. 2010). W wyniku intensywnej selekcji kolejnych pokoleń roślin pentaploidalnych (AABCC), w pokoleniu F_4 utworzono populację nowego typu rzepaku głównie z genomem o składzie $A^rA^rC^cC^c$. Różnorodność genetyczna powstałej populacji pochodziła od 25 odmian *B. rapa* i 72 genotypów *B. carinata*. Populacja ta została cytologicznie zweryfikowana pod względem obecności prawidłowych chromosomów AACC. Stwierdzono, że różni się ona od tradycyjnego *B. napus* w zakresie elementów genomu A^r/C^c i B^c , jak również posiada nową zmienność genetyczną pochodzącą z krzyżowania międzygatunkowego. Na podstawie badań przy użyciu markerów mikrosatelitarnych oszacowano u powstałego pokolenia *B. napus* blisko 90% introgresję subgenomów A^r i C^c . W badanej populacji zaobserwowano dużą zmienność fenotypową oraz pojawienie się nowych wartościowych cech. W porównaniu z rodzicielskimi gatunkami, także z drugim pokoleniem nowego typu rzepaku, populacja ta posiadała korzystniejsze cechy plonu nasion – większą zawartość oleju oraz jego korzystniejszy skład chemiczny.

Jedne z najnowszych badań heterozji subgenomowej u *Brassica* przedstawili Fu i in. (2012). Wykorzystali oni populację rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL – ang. recombinant inbred line) nowego typu rzepaku powstałego z krzyżowania *B. napus* z *B. rapa*, a także populację powstałą z krzyżowania wstecznego z rodzicielskimi liniami *B. napus*, do identyfikacji pojedynczych loci cech ilościowych oraz interakcji par QTLi z efektem heterozji w plonie nasion i cech związanych z plonem. Wykryto 71 QTLi oraz 372 pary QTLi powiązane z heterozją. Ponad

połowa QTLi była związana z nowymi allelami uzyskanymi przez introgresję z *B. rapa*. Stwierdzono, że alleliczne i niealleliczne interakcje nowych alleli powstałych przez introgresję (A^n i C^n) oraz allele (A^r) bezpośrednio z genomu A *B. rapa* przyczyniają się do powstawania efektu heterozji pomiędzy tradycyjnym rzepakiem a nowym typem rzepaku z wprowadzonym genomem z *B. rapa*.

Chen i in. (2008b) w celu zrozumienia genetycznego mechanizmu efektu heterozji subgenomowej wykorzystali technikę c-DNA-AFLP, aby znaleźć różnice w ekspresji genów pomiędzy liniami nowego typu *B. napus* (A^r/C^c) (Qian i in. 2005, Li i in. 2006), uprawnymi odmianami *B. napus* oraz mieszańcami pomiędzy nimi. Porównano 3 linie nowego typu rzepaku z ich formami rodzicielskimi. Jedna z linii posiadała w swoim genomie komponenty pochodzące z *B. rapa*, a dwie pozostałe linie z *B. rapa* i *B. carinata*. Stwierdzono, że introgresja fragmentów genomu A^r i C^c prowadzi do znacznych różnic w profilu ekspresji genów w nowym typie rzepaku w odniesieniu do ich rodziców. Porównano profile ekspresji genów dziewięciu krzyżówek wykonanych pomiędzy 3 liniami nowego typu rzepaku oraz trzema odmianami *B. napus*. Następnie fragmenty potranskrypcyjne (TDFs – ang. transcript-derived fragments) związane z heterozją subgenomową przekształcano w markery molekularne oparte o technikę PCR. Część z nich zmapowano jako QTL dla plonu oraz cech związanych z plonem w trzech segregujących populacjach *B. napus*. Stwierdzono, że mieszańce międzygatunkowe wykazywały istotnie wyższą heterozję plonu nasion niż ich rodzice, z czego można wywnioskować, że zmienność alleli wprowadzonych do genomu nowego typu rzepaku z genomu A^r/C^c może powodować wiele pozytywnych kombinacji alleli u mieszańców międzygatunkowych.

Krzyżowanie różnych form rzepaku rzepak ozimy × rzepak jary

Dwie podstawowe formy rzepaku: jara i ozima różnią się pod względem genetycznym i w wyniku analizy skupień tworzą dwie oddzielne grupy (Qian i in. 2006). Z tego względu krzyżowanie rzepaku ozimego z jarym może także przyczynić się do poszerzenia puli genowej w obrębie tego gatunku. Podejmowane są próby polepszenia plonu przez krzyżowanie ze sobą osobników różnych form i z różnych środowisk czy obszarów geograficznych. Wykorzystano m.in. chińskie linie rzepaku przewódkowego (nowy typ rzepaku powstały przez introgresję części genomu *B. rapa* do *B. napus*), które krzyżowano z europejskimi męskosterylnymi liniami rzepaku jarego (Qian i in. 2007) i ozimego (Qian i in. 2009). W doświadczeniach prowadzonych na terenie Europy i Kanady oceniano zarówno uzyskane mieszańce doświadczalne (F_1) i ich formy rodzicielskie, jak i mieszańce handlowe, pod względem plonu nasion, zawartości oleju oraz białka. Chińskie linie rodzi-

cielskie mieszańców nie zaadaptowały się do nowego środowiska i nisko plonowały, natomiast stwierdzono dość wysoki efekt heterozji w plonie nasion ich mieszańców z rzepakiem jarym (ok. 15%) i ozimym. Stwierdzono niską korelację pomiędzy dystansem genetycznym rodziców a zdolnością mieszańców do wydawania wysokiego plonu. Oceniono natomiast, że ogólna zdolność kombinacyjna (GCA – ang. general combining ability) w obu przypadkach była wyższa od specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA – ang. specific combining ability), a korelacja pomiędzy GCA a zdolnością mieszańców do wydawania wysokiego plonu była znacząca. U mieszańców F₁ pomiędzy rzepakiem przewodkowym i jarym ten współczynnik korelacji wynosił średnio 0,87 dla plonu nasion i 0,89 dla zawartości oleju, natomiast u mieszańców F₁ formy przewodkowej z ozimą: 0,95 dla plonu nasion, 0,87 dla zawartości oleju i 0,91 dla zawartości białka. Wyniki tych badań pokazują, że ogólna zdolność kombinacyjna może być użyta do przewidywania zdolności mieszańców do wydawania wysokiego plonu, a także, że rzepak przewodkowy pochodzący z Chin ma duży potencjał, który można wykorzystać w hodowli dla zwiększenia plonu nasion rzepaku jarego i ozimego.

W innych doświadczeniach (Rameeh 2011a, 2011b) wykonano krzyżowania sześciu linii rzepaku ozimego z dwoma liniami testerami rzepaku jarego. Oszacowano zdolność kombinacyjną, efekt heterozji dla składników plonu oraz w plonie nasion (Rameeh 2011a). Stwierdzono znaczną różnorodność genetyczną wśród genotypów rodzicielskich oraz istotny efekt heterozji u ich mieszańców pod względem badanych cech, z wyjątkiem ilości łuszczyń na roślinie. Niska odziedziczalność (w wąskim sensie) tej cechy może świadczyć o tym, że jej uwarunkowanie zależy głównie od nieaddytywnego działania genów, czyli jest związane z epistazą. Wysoka odziedziczalność (w wąskim sensie) masy 1000 nasion wskazuje na istotność addytywnego działania genów i dlatego efektywność hodowli opartej na selekcji według tej cechy powinna być wysoka. Stwierdzono znaczną, dodatnią ogólną zdolność kombinacyjną dla plonu nasion linii rodzicielskich, które wykazywały jednocześnie dodatnią ogólną zdolność kombinacyjną dla cechy ilości łuszczyń na roślinie. Większość mieszańców wykazujących istotną dodatnią wartość specyficznej zdolności kombinacyjnej dla ilości łuszczyń na roślinie miała też podobną wartość dla plonu nasion. Efekt heterozji w plonie nasion u przeważającej części mieszańców między liniami rzepaku jarego i ozimego był wysoki w porównaniu do rodzicielskich linii rzepaku jarego, co świadczy o tym, że rzepak ozimy może być wykorzystywany do zwiększenia plonu nasion.

Rameeh (2011b) na tym samym materiale oszacował także zdolność kombinacyjną i heterozję dla cech fenotypowych związanych z kwitnieniem roślin, wysokością roślin oraz plonem nasion. Badając rodziców i ich potomstwo stwierdzono heterozję dla wszystkich ocenianych cech. Wysoka odziedziczalność (w wąskim sensie) dla cech fenotypowych wskazuje na istotę addytywnego efektu genetycznego. Większość mieszańców rzepaku jarego z ozimym wykazywała wysoki efekt heterozji dla wszystkich badanych cech w odniesieniu do linii

rodzicielskich. U całego potomstwa występował istotnie negatywny efekt heterozji dla początku i końca kwitnienia w porównaniu z rodzicielskim rzepakiem ozimym. Natomiast istotnie dodatni efekt heterozji u większości krzyżówek w stosunku do linii rodzicielskich rzepaku jarego występował dla ilości dni do osiągnięcia dojrzałości przez roślinę i wysokości rośliny, co oznacza, że większość potomstwa była wyższa i dojrzewała później w porównaniu z rodzicielskim rzepakiem jarym. U części osobników pokolenia F_1 obserwowano wyższy plon nasion w porównaniu z rodzicielskimi liniami rzepaku ozimego i jarego.

Wykorzystując fakt genetycznej różnorodności pomiędzy dwoma formami rzepaku sprawdzono możliwość udoskonalenia rzepaku jarego przez introgresję alleli z rzepaku ozimego (Kebede i in. 2010). Do krzyżowania użyto dwóch europejskich odmian rzepaku ozimego oraz kanadyjskiej linii DH rzepaku jarego. Przez samozapylenie roślin pierwszego pokolenia uzyskano pokolenie F_2 , które wykorzystano do produkcji dwóch populacji, po 50 linii DH. Podobieństwo genetyczne pomiędzy rodzicami oszacowano na podstawie 134 markerów mikrosatelitarnych. Pomiędzy dwoma liniami rzepaku ozimego wynosiło ono 0,49, natomiast pomiędzy liniami rzepaku jarego i ozimego tylko 0,27. Przetestowano 37 wybranych markerów polimorficznych na dwóch populacjach linii DH, co ujawniło 94 allele. Występowanie alleli pochodzących od rodzicielskiego rzepaku ozimego wynosiło dla jednej populacji DH od 17,0 do 59,9%, a dla drugiej od 13,8 do 50,0%. Na podstawie analiz statystycznych wydzielono grupę linii DH, wyraźnie zbliżoną do formy ozimej. Plon nasion w tej populacji był znacznie wyższy niż u rzepaku jarego. Dlatego też introgresja materiału genetycznego z rzepaku ozimego do jarego jest odpowiednim podejściem dającym możliwości poszerzenia genetycznej bazy rzepaku jarego.

Podsumowanie

Proces udomawiania rzepaku, ukierunkowany pod względem określonych cech, intensywne selekcja oraz ograniczony zasięg geograficzny doprowadziły do zmniejszenia jego różnorodności zarówno genetycznej, jak i fenotypowej. Pozostałe dzikie gatunki rodzaju *Brassica* nie utraciły w takim stopniu swej bioróżnorodności, a pokrewieństwo z tymi gatunkami pozwala na krzyżowania międzygatunkowe *B. napus*, dzięki czemu możliwe jest zwiększenie puli genetycznej rzepaku i uzyskanie genetycznie odrębnych form. Zróżnicowanie genetyczne jest istotnym elementem zwłaszcza hodowli heterozyznej, gdyż jak pokazuje praktyka hodowlana, tworzenie mieszańców przy wykorzystaniu różnych genetycznie form rodzicielskich pozwala na uzyskanie wysokiego efektu heterozji. Przedstawiony przegląd prac prezentuje wiele możliwości zwiększenia bioróżnorodności u rzepaku. Jedną z podstawowych metod jest resynteza, czyli krzyżowanie *B. rapa* z *B. oleracea* (rodzicielskich gatunków *B. napus*) w celu uzyskania form odbiegających pod względem genetycznym

czy fenotypowym od uprawianych odmian rzepaku. Tworzenie półsyntetycznego rzepaku poprzez krzyżowanie *B. napus* z *B. rapa* czy *B. napus* z *B. oleracea* także powoduje poszerzenie zmienności genetycznej. Wiele doświadczeń doprowadziło do opracowania metod uzyskiwania nowego typu rzepaku przez wykorzystanie zmienności subgenomowej. Pierwszy etap stanowi krzyżowanie *B. napus* z *B. rapa* bądź *B. rapa* z *B. carinata*, a następnie uzyskane potomstwo krzyżuje się z ustalonymi formami *B. napus*. Kolejną możliwość daje zróżnicowanie genetyczne pomiędzy poszczególnymi formami rzepaku. W wielu pracach dowiedziono bowiem, że tworzenie mieszańców pomiędzy rzepakiem ozimym, jarym i przewódkowym prowadzi do zwiększenia bioróżnorodności. Istnieje więc wiele możliwości prowadzących do poszerzenia zmienności genetycznej, których stosowanie przyczynia się do zwiększania efektywności zarówno hodowli mieszańcowej, jak i rekombinacyjnej rzepaku.

Literatura

- Bartkowiak-Broda I. 1991. Studia nad systemami męskiej niepłodności u rzepaku *Brassica napus* L. var. *oleifera*. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 35 (3/4): 3-60.
- Becker H.C., Engqvist G.M., Karlsson B. 1995. Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 62-67.
- Bennett R.A., Seguin-Swartz G., Rahman H. 2012. Broadening Genetic Diversity in Canola Using the C-Genome Species *Brassica oleracea* L. *Crop Sci.*, 52: 2030-2039.
- Betráin F.J., Ribaut J.M., Beck D., Gonzales de León D. 2003. Genetic diversity, specific combining ability, and heterosis in tropical maize under stress and nonstress environments. *Crop Sci.*, 43: 797-806.
- Bus A., Körber N., Snowdon R.J., Stich B. 2011. Patterns of molecular variation in a species-wide germplasm set of *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 123 (8): 1413-1423.
- Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2006. Postęp i status produkcji podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). *Biotechnologia*, 4 (75): 107-115.
- Chen S., Nelson M., Ghamkhar K., Fu T., Cowling W. 2008a. Divergent patterns of allelic diversity from similar origins: the case of oilseed rape (*Brassica napus* L.) in China and Australia. *Genome*, 51: 1-10.
- Chen X., Li M., Shi J., Fu D., Qian W., Zou J., Zhang C., Meng J. 2008b. Gene expression profiles associated with intersubgenomic heterosis in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 117: 1031-1040.
- COBORU 2012. Wstępne wyniki plonowania odmian. Rzepak ozimy. COBO-42/2012 n. 400 http://www.coboru.pl/DR/PublWynikowPDO/WWPO_RZPO_2012.pdf.
- Diers B.W., Mc Vetty P.B.E., Osborn T.C. 1996. Relationship between heterosis and genetic distance based on restriction fragment length polymorphism markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Science*, 36: 79-83.
- Downey R.K. 1964. A selection of *Brassica campestris* L. containing no erucic acid in its seed oil. *Can. J. Plant Sci.*, 44: 295-297.
- Friedt W., Snowdon R., Ordon F., Ahlemeyer J. 2007. Plant Breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding. *Progress in Botany*, 168: 152-177.

- Fu D., Qian W., Zou J., Meng J. 2012. Genetic dissection of intersubgenomic heterosis in *Brassica napus* carrying genomic components of *B. rapa*. *Euphytica*, 184: 151-164.
- Gehring A., Snowdon R., Spiller T., Basunanda P., Friedt W. 2007. New Oilseed Rape (*Brassica napus*) Hybrids with High Levels of Heterosis for Seed Yield under Nutrient-poor Conditions. *Breeding Science*, 57: 315-320.
- Girke A., Schierholt A., Becker H.C. 2012a. Extending the rapeseed gene pool with resynthesized *Brassica napus* L. I: Genetic diversity. *Genet Resour Crop Evol.*, 59: 1441-1447.
- Girke A., Schierholt A., Becker H.C. 2012b. Extending the rapeseed gene pool with resynthesized *Brassica napus* L. II: Heterosis. *Theor. Appl. Genet.*, 124 (6): 1017-1026.
- Gómez-Campo C., Prakash S. 1999. Origin and domestication. W: *Biology of Brassica coenospecies*. C. Gómez-Campo (ed.), Elsevier, Netherlands, 33-58.
- Jain A., Bhatia S. S., Prakash S., Lekshmikumaran 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: 123-128.
- Jesske T., Olberg B., Becker H.C. 2011. Resynthesized rapeseed with *Brassica* species as new genetic resource for breeding. 13th International Rapeseed Congress, Prague, Czech Republic, CD, 816-819.
- Jiang Y., Tian E., Li R., Chen L., Meng J. 2007. Genetic diversity of *Brassica carinata* with emphasis on the interspecific crossability with *B. rapa*. *Plant Breeding*, 126: 487-491.
- Kebede B., Thiagarajah M., Zimmerli C., Rahman M.H. 2010. Improvement of open-pollinated spring rapeseed (*Brassica napus* L.) through introgression of genetic diversity from winter rapeseed. *Crop Sci.*, 50: 1236-1243.
- Kimber D.S., McGregor D.I. 1995. The species and their origin, cultivation and world production. W: Kimber D., McGregor D.I. (eds.), *Brassica Oilseeds: Production and Utilization*. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 1-9.
- Krzymański J. 1968. Variation in thioglucosides in rapeseed meal (*Brassica napus*). Meeting of the Associate Committees of National Research Council in Plant Breeding. Winnipeg, Manitoba, Canada.
- Ladizinsky G. 1989. Ecological and genetic considerations in collecting and using wild relatives. W: A.H.D. Brown et al. (ed.). *The use of plant genetic resources*. Cambridge Univ. Press, New York, 297-305.
- Li M.T., Qian W., Meng J.L., Li Z.Y. 2004. Construction of novel *Brassica napus* genotypes through chromosomal substitution and elimination using interplod species hybridization. *Chromosome Res.*, 12: 417-426.
- Li M.T., Li ZY., Zhang C.Y., Qian W., Meng J.L. 2005. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from crosses between *Brassica carinata* and *B. rapa*. *Theor. Appl. Genet.*, 110: 1284-1289.
- Li M.T., Chen X., Meng J.L. 2006. Intersubgenomic heterosis in rapeseed production with a partial new-typed *Brassica napus* containing subgenome A^r from *B. rapa* and C^c from *Brassica carinata*. *Crop Sci*, 46: 234-242.
- Li M., Liu J., Wang Y., Yu L., Meng J. 2007. Production of Partial New-typed *Brassica Napus* by Introgression of Genomic Components from *B. rapa* and *B. carinata*. *Journal of Genetics and Genomics*, 34 (5): 460-468.
- Li W., Jiang W., Zhao H.X., Vyvadilova M., Stamm M., Hu S.W. 2012. Genetic Diversity of Rapeseed Accessions from Different Geographic Locations Revealed by Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat and Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Crop Sci.*, 52: 201-210.

- Liersch A., Popławska W., Ogrodowczyk M., Krótka K., Bartkowiak-Broda I., Bocianowski J. 2010. Oszacowanie dystansu genetycznego linii rodzicielskich mieszańców F₁ rzepaku ozimego oraz określenie związku z dystansem fenotypowym i efektem heterozji. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (2): 229-241.
- Liersch A., Popławska W., Bartkowiak-Broda I., Nowakowska J., Krótka K., Ogrodowczyk M., Woś H. 2011. Investigation of the relationship of genetic and phenotypic distance of parental lines of F₁ winter oilseed rape hybrids with yielding ability and heterosis. 13th International Rapeseed Congress, Proceedings: 758-760, 765-766/www.Orc 2011.org.
- Liu H. 2000. Genetics and breeding in rapeseed. Chinese Agricultural Universitatis, Beijing, 144-177.
- Liu R., Qian W., Meng J. 2002. Association of RFLP markers and biomass heterosis in trigonomic hybrids of oilseed rape (*Brassica napus* × *B. campestris*). *Theor. Appl. Genet.*, 105: 1050-1057.
- 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.
- Love H.R., Rakow R.G., Raney J.P., Downey R.K. 1991. Breeding improvements towards canola quality *Brassica juncea*. W: Proceedings of 8th International Rapeseed Congress, Saskatoon, Canada, 164-169.
- Mei J., Fu Y., Qian L., Xu X., Li J., Qian. 2011a. Effectively widening the gene pool of oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using Chinese *B. rapa* in a virtual allopolyploid approach. *Plant Breeding*, 130: 333-337.
- Mei J., Li Q., Qian L., Fu Y., Li J., Frauen M., Qian W. 2011b. Genetic investigation of the origination of allopolyploid with virtually synthesized lines: Application to the C subgenome of *Brassica napus*. *Heredity*, 106: 955-961.
- Meng J., Shi S., Gan L., Li Z., Qu X. 1998. The production of yellowseeded *Brassica napus* (AACC) through crossing interspecific hybrids of *B. campestris* (AA) and *B. carinata* (BBCC) with *B. napus*. *Euphytica*, 103: 329-333.
- Nishio T. 2000. Polyploidy and genome analysis of *Brassicaceae*. *Genes Genet Syst*, 75: 360.
- Nowakowska J., Bartkowiak-Broda I., Ogrodowczyk M. 2005. Wstępne badania związku między efektem heterozji mieszańców F₁ rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) a dystansem genetycznym linii rodzicielskich. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXVI (1): 19-34.
- Osborn T.C., Kramer C., Graham E., Braun C.J. 2007. Insights and Innovations from Wide Crosses: Examples from Canola and Tomato. *Crop Sci.*, 47 Supplement 3: S-228-S-237.
- Pires J.C., Zhao J.W., Schranz M.E., Leon E.J., Quijada P.A., Lukens L.N., Osborn T.C. 2004. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (*Brassicaceae*). *Biol. J. Linn. Soc.*, 82: 675-688.
- Popławska W., Szała L., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2006. Genetyczna i hodowlana ocena linii podwojonych haploidów z genem restorerem dla systemu CMS *ogura* u rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) W: Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin. Adamski T., Surma M. (red). Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 11: 151-157.
- Popławska W., Ogrodowczyk M., Bartkowiak-Broda I., Krótka K. 2010. Analiza zmienności składników plonu oraz wielkości efektu heterozji u mieszańców F₁ rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (1): 21-34.
- Qian W., Liu R., Meng J. 2003. Genetic effects on biomass yield in interspecific hybrids between *Brassica napus* and *B. rapa*. *Euphytica*, 134: 9-15.
- Qian W., Chen X., Fu D., Zou J., Meng J. 2005. Intersubgenomic heterosis in seed yield potential observed in a new type of *Brassica napus* introgressed with partial *Brassica rapa* genome. *Theor. Appl. Genet.*, 110: 1187-1194.

- Qian W., Meng J., Li M., Frauen M., Sass O., Noack J., Jung C. 2006. Introgression of genomic components from Chinese *Brassica rapa* contributes to widening the genetic diversity in rapeseed (*B. napus* L.), with emphasis on the evolution of Chinese rapeseed. *Theor. Appl. Genet.*, 113: 49-54.
- Qian W., Sass O., Meng J., Li M., Frauen M., Jung C. 2007. Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Crosses between spring and Chinese semi-winter lines. *Theor. Appl. Genet.*, 115: 27-34.
- Qian W., Li Q., Noack J., Sass O., Meng J., Frauen M., Jung C. 2009. Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.). II. Crosses between European winter and Chinese semi-winter lines. *Plant Breeding*, 128, 466-470.
- Qu C., Hasan M., Lu K., Liu L., Liu X., Xie J., Wang M., Lu J., Odat N., Wang R., Chen L., Tang Z., Li J. 2012. Genetic diversity and relationship analysis of the *Brassica napus* germplasm using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11 (27): 6923-6933.
- Rameeh V. 2011a. Line \times tester analysis for seed yield and yield components in spring and winter type varieties of oil seed rape. *Journal of Cereals and Oilseeds*, 2 (5): 66-70.
- Rameeh V. 2011b. Heterosis and combining ability assessment for phenological traits, plant height and grain yield in winter \times spring combinations of rapeseed varieties. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 5 (4): 349-357.
- Riaz A., Li G., Quresh Z., Swatt M.S., Quiros C.F. 2001. Genetic diversity of oilseed *Brassica* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding* 120: 411-415.
- Schranz M.E., Lysak M.A., Mitchell-Olds T. 2006. The ABC's of comparative genomics in the *Brassicaceae*: building blocks of crucifer genomes. *Trends Plant Sci.*, 11: 535-542.
- Seyis F., Snowdon R.J., Lühs W., Friedt W. 2003. Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breeding*, 122: 473-478.
- Sosnowska K., Szala L., Olejnik A., Cegielska-Taras T. 2010. Preliminary study on resynthesis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (2): 257-266.
- Sosnowska K. 2011. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego do poszerzenia zmienności genetycznej w rodzaju *Brassica* sp. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXII (2): 211-222.
- Stefansson R.R., Hougen F.W., Downey R.K. 1961. Note on the isolation of rape plants with seed oilfree from erucic acid. *Canadian Journal of Plant Science*, 41: 218-219.
- Teklewold A., Becker H.C. 2006. Comparison of phenotypic and molecular distances to predict heterosis and F1 performance in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun). *Theor. Appl. Genet.*, 112: 752-759.
- U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.*, 7: 389-452.
- Vavilov N.I. 1940. *The new systematics*. Clarendon, Oxford, UK.
- Xiao Y., Chen L., Zou J., Tian E., Xia W., Meng J. 2010. Development of a population for substantial new type *Brassica napus* diversified at both A/C genomes. *Theor. Appl. Genet.*, 121: 1141-1150.
- 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 relationship with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 110: 511-518.
- Zou J., Zhu J., Huang S., Tian E., Xiao Y., Fu D., Tu J., Fu T., Meng J. 2010. Broadening the avenue of intersubgenomic heterosis in oilseed *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.*, 120: 283-290.