

Olga Olejniczak¹, Katarzyna Mikołajczyk²

¹ Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu

Autor korespondencyjny – K. Mikołajczyk, e-mail: kamik@nico.ihar.poznan.pl

DOI: 10.5604/12338273.1083014

Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli molekularnej rzepaku*

The use of biotechnological methods in molecular breeding of oilseed rape

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, *Brassica napus* L., hodowla molekularna, markery genetyczne, transformacja

Streszczenie

W pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczącej badań genetycznych ważnej uprawnej rośliny oleistej strefy klimatu umiarkowanego, jaką jest rzepak ozimy. Zaprezentowano metody biotechnologiczne, takie jak transformacje genetyczne z użyciem wektorów bakteryjnych oraz metodą wyciszania genów, ukierunkowana mutagenesa, a także selekcja z użyciem markerów genetycznych, w odniesieniu do prowadzonych doświadczeń hodowlanych. Metody te stosowane są w celu modyfikacji i polepszenia ważnych gospodarczo cech, takich jak odporność na choroby i szkodniki, plon nasion, plon oleju, skład kwasów tłuszczowych w oleju nasion, występowanie związków aktywnych biologicznie w oleju i wytloku oraz zawartość włókna w okrywie nasiennej. Podkreślono znaczenie identyfikacji specyficznych markerów genetycznych i ich zastosowania do selekcji w programach hodowli. Wskazano na rozwój nowej, interdyscyplinarnej dziedziny, określonej jako hodowla molekularna. Przedstawiono również praktyczne zastosowanie różnego rodzaju markerów genetycznych, identyfikujących geny i rejony genomu sprzężone z określonymi cechami, z włączeniem markerów opracowanych w IHAR – PIB, Oddział w Poznaniu.

Key words: winter oilseed rape, *Brassica napus* L., molecular breeding, genetic markers, transformation

Abstract

This paper comprises a review of genetic studies of winter oilseed rape, an important oil crop of the moderate climate zone. Biotechnological methods, such as genetic transformation with the use of bacterial vectors and gene silencing, site-directed mutagenesis as well as selection with the use of genetic markers with respect to field experiments were presented. The methods are applied for

* Publikacja ta obejmuje znaczne fragmenty pracy licencjackiej Pani Olgi Olejniczak, obecnie studentki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, wykonanej pod kierunkiem dr Katarzyny Mikołajczyk w IHAR – PIB, w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Oddział w Poznaniu. Obrona pracy miała miejsce 8.07.2013 r. w Collegium Biologicum UAM w Poznaniu. Prezentowany materiał został przeredagowany, poprawiony i uzupełniony.

modification and improving of economically important traits, including resistance to diseases and pests, seed yield, seed oil fatty acid composition, the presence of biologically active compounds in oil and seed meal, and also the fibre content in seed coat. The importance of specific genetic markers development and their use for selection in breeding programs was highlighted. Molecular breeding was mentioned as a new, interdisciplinary domain. Finally, practical use of several genetic markers for identifying genes and genome regions linked to specific traits, including those developed at the Plant Breeding and Acclimatization Institute – NRI, Poznan Branch, was presented.

Wstęp

Ze względu na coraz szersze wykorzystanie oleju rzepakowego i śrutę do celów spożywczych i w technologiach przemysłowych oraz dla zwiększenia konkurencyjności rzepaku na rynku roślin oleistych niezbędne jest jego ulepszanie. W wielu ośrodkach na świecie prowadzi się prace badawcze i hodowlane, których celem jest podwyższenie plenności, uzyskanie rzepaku odpornego na stresi abiotyczne i biotyczne, a także modyfikacje ważnych gospodarczo cech jakościowych, takich jak zawartość kwasów tłuszczowych w oleju nasion oraz podwyższanie zawartości związków korzystnych dla zdrowia (żywność funkcjonalna) i obniżanie niekorzystnych dla organizmu człowieka i zwierząt hodowlanych.

Do połowy lat 90. XX wieku selekcja w programach hodowli roślin, w tym rzepaku, prowadzona była głównie w oparciu o analizę cech fenologicznych i fenotypowych. W wyniku dynamicznego rozwoju metod i technik badawczych biologii molekularnej i biotechnologii, możliwy był znaczny postęp, między innymi w dziedzinach genomiki strukturalnej i funkcjonalnej. Badano i identyfikowano geny oraz sekwencje regulatorowe dla ważnych cech ilościowych i jakościowych roślin uprawnych. Opracowywano markery genetyczne, pozwalające na identyfikację danej cechy na poziomie genotypu we wczesnych fazach rozwoju rośliny i niezależnie od zmiennych warunków środowiska. Dzięki temu następuje znaczne zwiększenie efektywności i skuteczności procesu selekcyjnego w programach hodowli. Rozwija się nowa dziedzina, wymagająca niezawodnej współpracy biologów molekularnych oraz hodowców, określana jako hodowla molekularna (ang. molecular breeding). Istotną rolę odgrywa selekcja przy użyciu markerów ściśle związanych z loci pożądaných cech, co określa się jako MAS (ang. marker-assisted selection) lub MAB (ang. marker-assisted breeding) (Collard i in. 2005, Collard i Mackill 2008).

Rzepak (*Brassica napus* L.) jest rośliną o genomie allotetraploidalnym AACCC (2n = 38), powstałą w wyniku spontanicznej hybrydyzacji międzygatunkowej pomiędzy rzepikiem (*B. rapa*) o genomie AA (2n = 20), a kapustą (*B. oleracea*) o genomie CC (2n = 18) (Song i Osborn 1992). Haploidalny genom rzepaku (AC) składa się z 19 chromosomów, z których A1 – A10 (nazywane wcześniej jako N1 – N10 lub LG1 – LG10) pochodzą od *B. rapa*, a C1 – C9 (N11 – N19 lub LG11 – LG19) od *B. oleracea* (<http://www.brassica.info/resource/maps/lg-assignments.php>).

Genom rzepaku złożony jest z dwóch genomów rodzicielskich, co powoduje, że każdy gen posiada przynajmniej dwie kopie, pochodzące z dwóch loci, odpowiednio w genomie A i C. Stąd segregacja alleli w procesie hodowlanym, prowadząca do ich uwsobnienia, jest długotrwała, praco- i czasochłonna, i obejmuje kilka pokoleń, a więc kilka sezonów wegetacyjnych. Dla zwiększenia efektywności procesu hodowlanego korzystne jest stosowanie linii wsobnych, linii podwojonych haploidów, a także monitorowanie danej cechy na poziomie genomu, przy użyciu markerów molekularnych (Collard i in. 2005).

Transformacja genetyczna

Wprowadzanie genów

Jedną z głównych metod wprowadzania genów stanowi transformacja genetyczna, w której wykorzystuje się mechanizmy koniugacji bakteryjnej Gram-negatywnych bakterii glebowych *Agrobacterium tumefaciens* lub rzadziej *A. rhizogenes*. Patogeny te powodują guzowatość korzeni roślin okryto- i nagozalążkowych. Mechanizm infekcji polega na przeniesieniu do genomu gospodarza fragmentu DNA (T-DNA) o długości około 20 kpz, w plazmidzie bakteryjnym (200 kpz) indukującym powstawanie guza (plazmid Ti).

W procesie transformacji genetycznej następuje włączenie genu wprowadzanego (docelowego) do rejonu T-DNA plazmidu Ti. Może się to odbywać metodą kointegracji, poprzez pojedynczą, homologiczną rekombinację pomiędzy wektorem pośredniczącym, zawierającym gen docelowy – a plazmidem Ti. Natomiast w metodzie binarnej włączanie genu docelowego do systemu plazmidowego *Agrobacterium* zachodzi wskutek podwójnej, homologicznej rekombinacji pomiędzy wektorem pośredniczącym a plazmidem Ti. W systemie tym konstruuje się tzw. wektor binarny T-DNA, zawierający gen docelowy i marker selekcyjny oraz wektor pomocniczy (ang. helper), obejmujący geny wirulencji (*vir*); następuje oddzielenie genu docelowego od genów *vir* (Murai 2013 i odnośniki tam zawarte).

W celu uzyskania rzepaku odpornego na glifosat i glufosynat amonu – aktywne składniki herbicydu RoundUp (rzepak Roundup Ready) – zastosowano metodę transformacji genetycznej. Użyto genu *CD4*, pochodzącego z *Agrobacterium*, kodującego syntazę 5-fosforanu 5-enoilopirogronianoszikimianu (ang. 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) odporną na glifosat oraz gen kodujący oksydoreduktazę glifosatu (ang. glyphosate oxidoreductase, GOX), pochodzący z bakterii *Ochrobactrum anthropi*. Enzym GOX degraduje glifosat do nieszkodliwych związków (Duke 2005). Pierwsza odmiana rzepaku Innovator, odporna na glufosynat amonowy firmy Monsanto została dopuszczona do produkcji w 1995 roku (Shaner 2000).

Drogą transformacji uzyskano rzepak odporny na żerującego na liściach motyla tantnisia krzyżowiaczka – *Plutella xylostella* (odporność Bt), wprowadzając do rzepaku gen *Cry* z bakterii *Bacillus thuringensis*, kodujący białko Cry1Ac toksyczne dla owadów (Sayed i in. 2003). Metoda ta nie była jednak do końca skuteczna, ponieważ niektóre owady nabyły oporność na toksynę, kodowaną przez ten gen. W związku z tym zastosowano transformację dwoma genami – chitynazy *chi*, enzymem niszczącym chitynowy pancerz owadów, wprowadzony za pomocą *Agrobacterium* oraz genem *Bmk* kodującym toksynę BmkIT skorpionia *Buthus martensii*. Analiza rzepaku transgenicznego w porównaniu z niestransformowanym po inwazji larw *P. xylostella* wykazała, że wysoki poziom ekspresji białek kodowanych przez geny *chi* i *Bmk* zwiększył odporność rzepaku na te owady; liście były jedynie w niewielkim stopniu uszkodzone (Wang i in. 2005).

W celu zwiększenia ilości tokoferoli w oleju uzyskano nadekspresję trzech genów: *HPPD*, *HPT* i *TC*, kodujących enzymy kluczowe dla syntezy tokoferoli, odpowiednio: dioksygenazę 4-hydroksyfenylopirogonianu (ang. 4-hydroxyphenylpyruvate digoxigenase), fitylotransferazę homogentyzynianu (ang. homogentisate phytyltransferase) i cyklazę tokoferolu (ang. tocopherol cyclase). Uzyskano niemal dwukrotne zwiększenie ilości tokoferoli, przy czym cecha ta była dziedziczona (Raclaru i in. 2006).

Wyciszanie genów

Obniżanie ekspresji genów lub ich niszczenie może być dokonywane przez antysensowne RNA: dwuniciowe – dsRNA, małe interferujące RNA – siRNA, krótkie jednoniciowe fragmenty RNA tworzące strukturę szpilki do włosów – shRNA oraz mikroRNA – miRNA. Mechanizm ten polega na wiązaniu się do specyficznych cząsteczek mRNA i hamowaniu translacji mRNA lub całkowitej jego degradacji (Lee i Roth 2003).

Z zastosowaniem miRNA, małych, 20–24 nukleotydowych, endogennych regulatorowych cząsteczek kwasu rybonukleinowego, przeprowadzono eksperyment w celu regulacji ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm kwasów tłuszczowych w nasionach rośliny modelowej dla rzepaku, *Arabidopsis thaliana* (Belide i in. 2012). W celu organo-specyficznej ekspresji w nasionach skonstruowano trzy binarne wektory ekspresyjne pod promotorem napiny (FP1), białka zapasowego nasion rzepaku. Każdy z wektorów zawierał sekwencje specyficzne dla genów białek, związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych wchodzących w skład oleju nasion: desaturazy 2 kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid desaturase 2, FAD2), elongazy 1 kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid elongase 1, FAE1) oraz tioesterazy FATB (ang. fatty acyl-ACP thioesterase B). Wyciszenie genu desaturazy spowodowało wzrost poziomu kwasu oleinowego z 15 do 63,3%, przy jednoczesnym obniżeniu sumy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z 46,8 do 4,8%. Wyciszenie genu elongazy spowodowało obniżenie zawartości

kwasy eikozenowe z 15,4 do 1,9%, natomiast tioesterazy – redukcję kwasu palmitynowego z 8,0 do 4,4%. Wykazano, że zastosowanie konstruktów ukierunkowanych na wyciszenie trzech genów endogennych *A. thaliana*, ulegających specyficznej ekspresji w nasionach, skutecznie zahamowało ich ekspresję i wygenerowało zmiany w genotypie, które podlegały stabilnemu dziedziczeniu przez trzy pokolenia (Belide i in. 2012).

W celu redukcji w śrucie poekstrakcyjnej zawartości antyżywnościowych estrów kwasu synapowego, głównie synapiny, dokonano supresji syntezy synapiny w nasionach rzepaku. Transformowano odmianę hodowlaną rzepaku jarego, Drakkar, przy użyciu konstruktów dwuniciowego RNAi (dsRNAi), specyficznie wyciszającego w nasionach gen glukozylotransferazy UDP-glukoza : kwas synapowy (*BnSGT1*). W efekcie uzyskano znaczący spadek zawartości estrów kwasu synapowego w nasionach pokolenia F₂, osiągając poziom redukcji wynoszący 61, a maksymalnie 76% (Hüsken i in. 2005).

Ukierunkowana mutagenеза

Opracowanie techniki ukierunkowanej mutagenезы (ang. site-directed mutagenesis, SDM) umożliwiło wprowadzenie zmian w strukturze DNA (Hutchison i in. 1978). W metodzie tej prowadzi się dwie amplifikacje PCR. Produkt pierwszej reakcji z zastosowaniem jednego startera zwykłego i zmutowanego startera z pożądanym nukleotydem służy w kolejnej amplifikacji PCR jako megastarter, wraz ze starterem zwykłym. Mutagenеза umożliwia inaktywację genu przez wprowadzenie mutacji punktowej, insercji lub delecji, prowadzących do wcześniejszej terminacji translacji (Sarkar i Sommer 1990).

Metoda ta została zastosowana jako wstęp do transformacji, w celu potwierdzenia, że cecha wysokiej zawartości kwasu erukowego w nasionach zależy od mutacji punktowej w genie elongazy *FAEI*, powodującej zamianę aminokwasu fenyloalaniny w serynę. W tym celu wyizolowano i amplifikowano gen *FAEI* z form wysokoerukowych (ang. high erucic acid, HEA) rzepaku, rzepiku i kapusty ogrodowej oraz niskoerukowego (ang. low erucic acid, LEA) rzepaku odmiany Westar, a następnie poddano ekspresji w komórkach drożdży. W komórkach drożdży, nie wytwarzających naturalnie kwasu erukowego, transformowanych genem *FAEI* z rzepaku wysokoerukowego nastąpiła synteza tego kwasu. Porównanie sekwencji genów i białek *FAEI* rzepaku HEA i LEA wykazało, że w genie *FAE1* białka rzepaku wysokoerukowego występuje substytucja powodująca zamianę aminokwasu fenyloalaniny na serynę. Dla potwierdzenia, stosując ukierunkowaną mutagenезę, dokonano substytucji w genie *FAEI* z rzepaku niskoerukowego prowadzącej do zamiany fenyloalaniny w serynę i transformowano

komórki drożdży, powodując syntezę kwasu erukowego na poziomie form wysokoerukowych (Katavic i in. 2002).

Selekcja z użyciem markerów genetycznych w kierunku ważnych gospodarczo cech rzepaku

Najczęściej stosowane markery molekularne opierają się na ujawnieniu polimorfizmu sekwencji DNA. Mogą być związane z cechą objawiającą się morfologicznie lub z zawartością różnych substancji. Marker genetyczny powinien być ściśle sprzężony z danym locus w odległości co najwyżej 5 cM (częstość rekombinacji do 5%) (Collard i Mackill 2008). Markery genetyczne umożliwiają identyfikację na poziomie DNA, we wczesnych fazach rozwoju rośliny, zanim ujawni się cecha fenotypowa i niezależnie od zmiennych, modyfikujących warunków środowiska. Stosowane są do charakteryzowania loci cech ilościowych (ang. quantitative trait loci, QTL), identyfikacji genów lub regionów genomu sprzężonych z daną cechą, monitorowania czystości genetycznej danej formy hodowlanej, dzięki czemu możliwe jest wyselekcjonowanie genotypów zawierających pożądane allele i wykorzystanie ich do dalszej hodowli, wprowadzając pożądane cechy do nowej odmiany. Ponadto markery są stosowane do określania dystansu genetycznego i pokrewieństwa w obrębie badanej populacji oraz monitorowania danego genu w programach hodowli rekombinacyjnej (MAS) (Diers i in. 1996, Romagosa i in. 1999). Zastosowanie markerów genetycznych w hodowli zwiększa efektywność i skuteczność selekcji. Stanowią one dogodne narzędzie selekcyjne, wspomagające i uzupełniające tradycyjne metody w oparciu o czaso- i pracochłonną analizę cech morfologicznych, fenologicznych i fenotypowych, których ekspresja ulega często modyfikującemu wpływowi środowiska (Hospital i Charcosset 1997).

Do powszechnie stosowanych markerów genetycznych należą między innymi: RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism), RAPD (ang. random amplified polymorphic DNA), SCAR (ang. sequence characterized amplified region), AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism), CAPS (ang. cleaved amplified polymorphic sequences), markery mikrosatelitarne (ang. short tandem repeats, STR, short sequence repeats, SSR), SRAP (ang. sequence-related amplified polymorphism) oraz SNP (ang. single nucleotide polymorphism).

Odporność na choroby grzybowe

Markery genetyczne wykorzystano do skonstruowania mapy genetycznej i zidentyfikowania genów odporności na grzyb *Leptosphaeria maculans*, wywołujący suchą zgniliznę kapustnych (Ferreira i in. 1994). Badano populację 105 linii podwojonych haploidów (ang. doubled haploid, DH) wyprowadzonych

z mieszańca F_1 otrzymanego w wyniku krzyżowania pomiędzy linią rzepaku ozimego odmiany Major, odpornej na izolat PHW 1245 *L. maculans* i linią rzepaku jarego odmiany Stellar, podatnej na *L. maculans*. Jako kontrolę wykorzystano odmiany: Westar, Glacier i Quinta, wykazujące zróżnicowany stopień odporności na patogen. Mapę skonstruowano za pomocą 138 markerów RFLP i zidentyfikowano 7 markerów sprzężonych z locus *LEM1* zlokalizowanym na 6. grupie sprzężeń (ang. linkage group, LG), odpowiedzialnym za odporność na suchą zgniliznę kapustnych oraz genem *PR2* odpowiedzialnym za patogenezę (Ferreira i in. 1995a). Wykryto linie rzepaku 16S i 61446, odporne na zgniliznę kapustnych, uzyskane poprzez hybrydyzację międzygatunkową pomiędzy rzepakiem a rzepikiem, *B. rapa* subsp. *sylvestris*, a następnie krzyżowanie wsteczne z rzepakiem. Locus *LepR4* związane z odpornością zidentyfikowano dzięki dwóm markerom SSR na grupie sprzężeń N6, odpowiadającej grupie A6 (Fengqun i in. 2013). W celu identyfikacji loci odpowiedzialnych za odporność rzepaku na *L. maculans* skonstruowano mapę genetyczną z użyciem 255 markerów: SSR, SRAP, EST-SSR. Badania prowadzono na populacji linii DH rzepaku, otrzymanych z krzyżowania odmiany Skipton i Ag-Spectrum. Zidentyfikowano co najmniej 14 regionów genomowych, związanych z odpornością na patogen, obejmujących od 4,6 do 88,9% zmienności fenotypowej. Główne locus *RlmSkipton* (*Rlm4*), zmapowane markerem SSR *Xbrms075*, znajdowało się na chromosomie A7 (Raman i in. 2012).

Przy pomocy markerów genetycznych wykryto również geny odporności na białą plamistość liści wywołaną przez grzyb *Pyrenopeziza brassicae* oraz geny odporności na grzyb *Leptosphaeria maculans* (Pilet i in. 1998). Badano liście i pędy linii DH otrzymanych w wyniku krzyżowania rzepaku ozimego odmiany Darmor-*bzh*, podatnej na białą plamistość i odmiany Yudal, podatnej na obie choroby. Do badań prowadzonych przez 2 lata wykorzystano 288 markerów, głównie RAPD i RFLP. Zidentyfikowano następujące grupy sprzężeń związane z odpornością liści na infekcję *P. brassicae*: DY5 (marker OPN18.940), DY6 (OPB08.2950 i 1NG3b), DY10 (OPA14.880 i OPC02.1375), DY12 (OPK11.1020 i OPU13.2160), obejmujące 57% zmienności fenotypowej, natomiast główne grupy sprzężeń związane z odpornością pędów to: DY5 (OPN18.940) oraz DY10 (OPA14.880 i OPC02.1375), obejmujące 43% zmienności (Pilet i in. 1998).

Markery RFLP zastosowano również do identyfikacji genu odporności na białą rdzę krzyżowych wywołaną przez *Albugo candida* (Ferreira i in. 1995b). W wyniku krzyżowania odpornej na *A. candida* odmiany rzepaku Major i wrażliwej odmiany Stellar wyprowadzono populację mapującą linii DH. Zmapowano locus *ACA1* odpowiedzialne za odporność na białą rdzę krzyżowych, stosując w tym celu 138 markerów typu RFLP, z których 7 było sprzężonych z locus *ACA1* (Ferreira i in. 1995b).

Zidentyfikowano loci sprzężone z odpornością na grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* powodujący zgniliznę twardzikową (Zhao i Meng 2003). W tym celu przeprowadzono mapowanie QTL populacji segregującej wyprowadzonej z mieszańca F₁ otrzymanego w wyniku krzyżowania linii częściowo odpornej na *S. sclerotiorum* z linią podatną, posiadającą geny przywracające płodność dla męskosterylnej cytoplazmy typu *polima*. Analizowano rośliny w stadium siewki (ang. leaf resistance at the seedling stage, LRS) oraz roślin dojrzałych (ang. stem resistance at the mature plant stage, SRM). Stosując 72 markery RFLP, 30 AFLP, 3 SSR i 2 RAPD zidentyfikowano 6 loci: *qLRS1* (grupa sprzężeń LG17, odpowiadająca C7), *qLRS2* (LG3 – A3), *qLRS3* (LG12 – C2) oraz *qSRM1* (LG15 – C7), *qSRM2* (LG10 – A10), *qSRM3* (LG7 – A7). Loci związane z LRS obejmowały 40,7% zmienności fenotypowej, natomiast w przypadku SRM – 49% (Zhao i Meng 2003).

Systemy męskiej sterility

Jedną z metod podwyższania plenności jest prowadzenie hodowli heterozyjnej, inaczej – mieszańcowej, wykorzystującej efekt heterozji, czyli bujności mieszańców pokolenia F₁ otrzymanych w efekcie skrzyżowania osobników danego gatunku, optymalnie o jak największym dystansie genetycznym. Aby zapobiec samozapyleniu stosowane są systemy męskiej sterility, powodujące zaburzenia w wytwarzaniu funkcjonalnego pyłku w roślinie matecznej. Jednym z nich jest system cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS) typu *ogura*, INRA-Ogura CMS (Ogura 1968), wprowadzony do rzepaku z rzodkwi (*Raphanus sativus* L.) metodą fuzji protoplastów (Bannerot i in. 1974, Pelletier i in. 1983). Cecha ta jest dziedziczona matecznie i wynika ze specyficznej interakcji pomiędzy genomem mitochondrialnym a jądrowym (Brown 1999). Męska sterility typu *ogura* powodowana jest przez gen mitochondrialny *orf138* (ang. 138-codon open reading frame), którego produkt białkowy zapobiega powstawaniu funkcjonalnego pyłku (Bonhomme i in. 1992). W systemie tym męska płodność przywracana jest dzięki obecności genu *Rfo* (ang. restorer of fertility *ogura*), kodującego białko typu PPR (ang. pentatricopeptide repeat protein), zaburzające ekspresję *orf138* na poziomie posttranskrypcyjnym, przez co następuje przywrócenie zdolności wytwarzania funkcjonalnego pyłku (Schnable i Wise 1998, Brown 1999, Brown i in. 2003). Zidentyfikowano 4 markery RAPD sprzężone z genem restorerem *Rfo* u rzepaku (Delourme i in. 1994) oraz 11 markerów AFLP (Trendelkamp i in. 1999). Marker RAPD OPC02₁₁₅₀ został przekształcony w bardziej dogodny marker SCAR C02 i wdrożony do selekcji genotypów z genem restorerem *Rfo* w programach hodowli rzepaku (Mikołajczyk i in. 2008). Zsekwencjonowanie genu mitochondrialnego *orf138* umożliwiło opracowanie specyficznego markera typu SCAR do identyfikacji męsko-sterylnej cytoplazmy typu *ogura* u *B. oleracea* (Sigareva i Earle 1997). Marker ten został zaadaptowany do identyfikacji CMS *ogura* u *B. napus* (Mikołajczyk i in. 1998). Oba markery SCAR połączono w jednym teście

genetycznym z wykorzystaniem metody multipleks PCR, z włączeniem kontroli wewnętrznej, markera SCAR dla zachowawczego fragmentu genu *aktyny7* *B. napus* (Mikołajczyk i in. 2010a). Opracowany test genetyczny znalazł szerokie zastosowanie w hodowli heterozyznej i rekombinacyjnej rzepaku ozimego w IHAR – PIB, Oddział Poznań oraz w Spółce Hodowli Roślin, Oddział Strzelce, Sp. z o.o. Służy on monitorowaniu czystości linii restorerów z genem *Rfo*, a także ich rekombinantów z odmianami populacyjnymi, jak również mieszańców zrestorowanych F_1 ; wszystkie te formy hodowlane są fenotypowo identyczne z odmianami populacyjnymi – są męskopłodne (wytwarzają pyłek).

Prowadzono badania w celu identyfikacji, a także dalszych szczegółowych analiz ewolucyjnych, strukturalnych i funkcjonalnych locus genu restorera *Rfp* (ang. restorer of fertility *pol*), przywracającego płodność w jednym z natywnych systemów cytoplazmatycznej męskiej sterility u *B. napus* – typu *polima* (CMS *pol*) (Formanová i in. 2010). Analizowano populacje segregujące ze względu na obecność genu *Rfp*, wyprowadzone w wyniku krzyżowań dwóch linii CMS *Pol*, odpowiednio – odmian Karat i Westar z linią restorującą Westar-Rf, z genem *Rfp*, a następnie krzyżowań wstecznych otrzymanych form F_1 z trzema roślinami z cytoplazmą CMS *pol* odmiany Karat. Zidentyfikowano 12 markerów RFLP, polimorficznych dla form sterility i płodnych, identyfikujących region genomu *B. napus*, ortologiczny dla zdefiniowanego fragmentu o długości 115 kb na chromosomie 1 *A. thaliana*. Osiem markerów RFLP zostało wykorzystanych do dalszych szczegółowych analiz populacji mapujących, a także badań kolinearności genomów *B. napus* i *A. thaliana* (Formanová i in. 2010). Ponadto, zidentyfikowano dwa markery AFLP sprzężone z locus *Rfp* i przekształcono w odpowiadające markery typu SCAR. Zsekwencjonowano ortologiczne dla genów *A. thaliana* z chromosomu 1 geny *B. napus*, odpowiednio z form męskosterylnych i płodnych, zidentyfikowano polimorfizmy SNP i opracowano specyficzne testy genetyczne dla ich precyzyjnej detekcji (Formanová i in. 2010).

Pora kwitnienia

Faza kwitnienia jest bardzo istotna, ponieważ w tym czasie niesprzyjające zmiany klimatyczne, takie jak susza, przyczyniają się do obniżenia plonu rzepaku. W celu identyfikacji loci związanych z porą kwitnienia, analizowano przy pomocy 132 markerów RFLP populację mapującą linię DH rzepaku wyprowadzoną z mieszańca F_1 otrzymanego w wyniku krzyżowania między odmianą jarą rzepaku Stellar, która jest jednoroczna i kwitnie w roku wysiewu, a ozimą Major, która jest dwuletnia i wymaga okresu wernalizacji (niskich temperatur), aby indukować kwitnienie (Ferreira i in. 1994). Badano korelację z cechami wzrostu oraz z porą kwitnienia, wykorzystując populacje nie poddane wernalizacji oraz poddane wernalizacji wynoszącej 4 tygodnie i 8 tygodni (Ferreira i in. 1994, 1995c). Prowadzono badania w celu określenia genów odpowiadających za kwitnienie, poprzez analizę

linii DH otrzymanych w wyniku krzyżowania odmian Stellar i Major z zastosowaniem 480 markerów RFLP oraz 268 AFLP (Osborn i in. 1997). Przeprowadzono analizę bez procesu wernalizacji, jak i po wernalizacji wynoszącej 8 tygodni. Wszystkie linie rzepaku poddane wernalizacji zakwitły wcześniej niż w przypadku braku tego procesu, jednak odmiana Major zakwitła później od Stellar. Wykryto, że główne loci odpowiadające za porę kwitnienia to *VFN1*, *VFN2* i *VFN3*, zlokalizowane w grupach sprzężeń, odpowiednio: LG9 (odpowiadającej chromosomowi A9), LG12 (C2) i LG16 (C6) (Osborn i in. 1997). Skonstruowanie mapy genetycznej z użyciem łącznie 674 markerów typu: SSR, SRAP i SCAR, umożliwiło wykrycie loci ilościowych dla pory kwitnienia (Raman i in. 2013). W tym celu badano 186 linii podwojonych haploidów otrzymanych z krzyżowania rzepaku odmiany Skipton i Ag-Spectrum. Zidentyfikowano 24 grupy sprzężeń na co najmniej 17 chromosomach. Na 10 chromosomach: A2, A3, A4, A6, A7, C2, C3, C5, C6, C8, wykryto 20 loci, warunkujących 2,4–28,6% zmienności. Niektóre loci na A2, A3, A7 i C6 odpowiedzialne za porę kwitnienia mogą wykazywać podobieństwo z genami *Arabidopsis*: *VIN3* (ang. VERNALISATION INSENSITIVE 3), *API* (ang. APETALA1), *CAL* (ang. CAULIFLOWER), *FLC* (ang. FLOWERING LOCUS C), *FT* (ang. FLOWERING LOCUS T), *CLF* (ang. CURLY LEAF), *SVP* (ang. SHORT VEGETATIVE PHASE), *GA3* (ang. GA3 OXIDASE) i *LFY* (ang. LEAFY) (Raman i in. 2013).

Masa 1000 nasion

Masa 1000 nasion, MTN, jest cechą o istotnym znaczeniu w hodowli, ponieważ wpływa na wysokość plonu (Shi i in. 2009), a ponadto wskazuje na wielkość nasion; im większe, tym lepiej przeżywają trudniejsze warunki (Geritz i in. 1999).

W celu przeprowadzenia badań nad determinacją genetyczną MTN analizowano linie DH otrzymane ze skrzyżowania odmiany rzepaku jarego SW Hickory (SvalÖf Weibull) z rzepakiem ozimym JA177 oraz linie DH z pokolenia F₂ pochodzące ze skrzyżowania linii rzepaku ozimego J7046 i J7005. Skonstruowano mapę genetyczną linii DH przy pomocy 297 markerów SSR, dzięki którym zidentyfikowano 9 loci, z których dwa główne, *TSWA7a* i *TSWA7b*, zawierały geny *MIN13a* i *TTG2a*, związane z cechą MTN, obejmując 27,6–37,9% zmienności fenotypowej (Fan i in. 2010).

Wykryto również locus związane z liczbą nasion w łuszczyńcu. Badano linie DH otrzymane z krzyżowania rzepaku HZ396 o małej liczbie nasion z rzepakiem Y106 o dużej liczbie nasion w łuszczyńcu. Za pomocą markera AFLP EA02MG05-210 i SSR CB10B64 zidentyfikowano na grupie sprzężeń chromosomu A8 locus *cqSS.A8*, obejmujące 85,8% zmienności fenotypowej dla liczby nasion w łuszczyńcu i 55,7% dla cechy długości łuszczyzny (Zhang i in. 2012).

Do identyfikacji loci odpowiadających za długość łuszczyń i masę nasion wykorzystano 186 linii wsobnych rzepaku, pochodzących z krzyżowania pomiędzy rzepakiem S1, otrzymanym poprzez chemiczną mutagenезę metanosulfonianem etylu (ang. ethyl methanesulfonate, EMS), o bardzo długich łuszczyńach i dużych nasionach, z linią wsobną S2, o normalnych łuszczyńach i nasionach. Zidentyfikowano locus *cqSLA9*, warunkujące 53,4% zmienności dotyczącej długości łuszczyń oraz mniej istotne loci warunkujące 10% zmienności SL. Wykryto 9 loci dla masy nasion, z których głównym jest locus *cqSWA9*, odpowiadające za 28,2% zmienności SW. W związku z tym, że główne loci dla SL i SW zlokalizowane zostały na tym samym chromosomie, włączono je w unikalny QTL – *uqA9* (Yang P. i in. 2012).

Zawartość włókna

Prace nad obniżeniem zawartości włókna w nasionach mają na celu zwiększenie strawności i przyswajalności śruty wykorzystywanej jako pasza dla zwierząt. Redukcja włókna powoduje, że okrywa nasienna jest cienka, dzięki czemu nasiona są żółte (Naczki i in. 1998). Do badań wykorzystano 3 populacje rzepaku otrzymane z dwóch krzyżowań pomiędzy dwiema odmianami rzepaku żółtonasiennego i dwiema odmianami rzepaku czarnonasiennego. Skonstruowano mapy genetyczne w celu identyfikacji loci odpowiadających za barwę nasion i ilość włókna, stosując markery typu AFLP oraz SSR. W jednej z dwóch populacji mapujących zidentyfikowano 144 markery AFLP i 49 SSR, w drugiej – 212 markerów AFLP i 51 STR. Loci barwy nasion zidentyfikowano na chromosomach A1, A5 i C3, loci zawartości włókna na chromosomie C3, natomiast loci odpowiadające za obie te cechy na chromosomie C8 (Badani i in. 2006, Xiao i in. 2007).

W celu identyfikacji loci QTL sprzężonych z zawartością ligniny kwaśno deterгентowej (ang. acid detergent lignin, ADL), związku fenolowego łupiny nasiennej stanowiącego najważniejszy antyżywniowy komponent włókna, analizowano populację 232 linii wsobnych (ang. recombinant inbred lines RIL), wyprowadzonych z krzyżowania chińskich linii rzepaku, GH06 (żółte nasiona, niska zawartość ADL) oraz P174 (czarne nasiona, wysoka zawartość ADL), z zastosowaniem markerów AFLP i SSR (Liu i in. 2012). Wykryto jedno dominujące locus QTL dla zawartości ADL, ortologiczne z genem enzymu regulatorowego biosyntezy ligniny *B. rapa*, reduktazy cynamoilo-CoA (ang. *cinnamoyl CO-A reductase 1, CCR1*). Sekwencjonowanie ampliconów PCR zawierających pełnej długości sekwencje kodujące homologów *Bna.CCR1* wykazało w genomie formy czarnonasiennej *B. napus* (P174) locus odpowiadające allelowi typu dzikiego *B. oleracea*, zlokalizowane na chromosomie C8 (Liu i in. 2012). Natomiast u badanej formy żółtonasiennej rzepaku, GH06, allel typu dzikiego został zastąpiony przez homolog pochodzący z chromosomu A9, zawierający mutację w egzonie 1, polegającą na przesunięciu ramki odczytu, prowadzącym do utraty funkcji enzymu

(ang. knockout mutation). Mapowanie genetyczne i fizyczne wykazało, że ten zmutowany allel zastąpił funkcjonalne locus *Bna.CCR1* na chromosomie C8 wskutek homeologicznej, niezrównoważonej translokacji (ang. homeologous non-reciprocal translocation) z chromosomu A9 (Liu i in. 2012).

Składniki śruty poekstrakcyjnej

W celu wykrycia loci cech ilościowych związanych z zawartością związków fenolowych, obniżających wartość żywieniową śruty poekstrakcyjnej (głównie kwasu synapowego, jego estrów oraz frakcji rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych tanin), metodą mapowania asocjacyjnego analizowano 49 odrębnych genetycznie form hodowlanych rzepaku ozimego o czarnych nasionach, z wykorzystaniem 559 markerów SSR. Zidentyfikowano 52 markery SSR związane z zawartością związków fenolowych, przy czym 5 z nich wykazywało sprzężenie, stanowiąc dogodne narzędzie selekcyjne w hodowli molekularnej (Rezaeizad i in. 2011).

Markery RFLP i AFLP posłużyły lokalizacji loci QTL związanych z zawartością fitosteroli i estrów kwasu synapowego w liniach DH rzepaku otrzymanych w wyniku krzyżowania linii odmian Mansholt i Samourai. Wykryto 3 markery odpowiadające za obecność fitosteroli: MG21-GATA.H3, OPAG10.630-RP318a.E1, OPAG4.620-MG87 w grupach sprzężeń, odpowiednio: A8, C3 i C8, obejmujące 54% zmienności fenotypowej, oraz cztery markery sprzężone z estrami kwasu synapowego: OPC19.1090-WG4C5.H1, WG1F6.H1-OPB5.910, GATA.H3-OPS7.970 i RP1218.H1-OPAG10.630, w grupach sprzężeń, odpowiednio: A5, A6, A8 i C3, obejmujące 46% zmienności fenotypowej (Amar i in. 2008). W liniach DH rzepaku pochodzących z krzyżowania rzepaku odmiany Samourai i Mansholt zmapowano za pomocą 185 markerów typu RFLP, RAPD oraz STR loci związane z zawartością fitosteroli, obejmujące od 7,5 do 29,2% zmienności fenotypowej. Wykazano, że loci kontrolujące obecność α - i γ -tokoferoli dziedziczą się niezależnie (Marwede i in. 2005).

Skonstruowano mapę genetyczną sprzężonych markerów RFLP w populacji uzyskanej z krzyżowania między liniami DH pochodzącymi z dwóch odmian ozimych rzepaku – tradycyjnej Mansholt (o wysokiej zawartości kwasu erukowego i glukozyzolanów) i podwójnie ulepszonej odmiany Samourai. Stosując 204 markery typu RFLP, 2 RAPD i 1 marker fenotypowy zidentyfikowano 4 loci QTL sprzężone z zawartością glukozyzolanów: *GSL1*, *GSL2*, *GSL3* i *GSL4*, zlokalizowane w grupach sprzężeń: LG1 (A1), LG18 (C8), LG4 (A4). Loci te obejmowały około 62% zmienności fenotypowej w obrębie badanej populacji oraz 74% – między odmianami rodzicielskimi (Uzunova i in. 1995). Natomiast metodą mapowania asocjacyjnego zidentyfikowano szereg loci związanych z zawartością glukozyzolanów w nasionach rzepaku oraz geny białek regulatorowych zaangażowanych w pierwsze etapy biosyntezy glukozyzolanów (Hasan i in. 2008).

Skład kwasów tłuszczowych w oleju nasion

Odpowiednie proporcje nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych służą ulepszeniu oleju z nasion rzepaku dla celów zdrowotnych czy przemysłowych (Trautwein i Erbersdobler 1998). Na przykład dla podniesienia termostabilności oleju wymagana jest podwyższona zawartość kwasu oleinowego i obniżona – linolenowego (Wittkop i in. 2009), a wysoki udział kwasów wielonienasyconych, jak linolowy i linolenowy, jest korzystny w produkcji smarów o wysokich właściwościach adhezyjnych (Töpfer i in. 1995). Natomiast duża ilość kwasu erukowego powoduje gorzki smak oleju, a także przyczynia się do problemów ze zdrowiem, szczególnie do chorób serca (Wittkop i in. 2009).

Stosując markery RAPD w liniach DH rzepaku pochodzących z krzyżowania odmian o niskiej zawartości kwasu erukowego, poniżej 1% (Darmor) i wysokiej zawartości, powyżej 50% (Yudal), zmapowano dwa loci genu elongazy 1: *BnFAE1* i *BnFAE2*, homologiczne do genu *Arabidopsis thaliana* (Jourden i in. 1996a). Metodą mapowania genetycznego z zastosowaniem markerów RAPD wykryto 2 loci QTL sprzężone z zawartością kwasu linolenowego w oleju nasion rzepaku, określone jako L1 i L2 (Jourden i in. 1996b). Natomiast przy użyciu markerów SSR zidentyfikowano na grupach sprzężeń A1 i A5 2 loci desaturazy FAD2, enzymu przekształcającego kwas oleinowy w linolowy, związane z wysoką zawartością kwasu oleinowego (18:1) w oleju nasion linii hodowlanych rzepaku, uzyskanych wskutek mutagenyzy chemicznej poprzez działanie EMS (Hu i in. 2006, Yang i in. 2012). W grupach sprzężeń A4 i C4 zlokalizowano dwa loci desaturazy FAD3 (ang. fatty acid desaturase 3), enzymu przekształcającego kwas linolowy (18:2) w linolenowy (18:3) (Hu i in. 2006, Yang i in. 2012). Porównując sekwencje nukleotydowe alleli desaturaz FAD2 i FAD3 form dzikich oraz wysokooleinowych i niskolinolenowych mutantów rzepaku, wykryto mutacje punktowe, zmieniające kodowane aminokwasy, co przyczyniło się do nieprawidłowego funkcjonowania enzymów. Badania te umożliwiły opracowanie allelo-specyficznych markerów SNP dla skutecznej selekcji wysokooleinowych i niskolinolenowych form rzepaku (Hu i in. 2006, Mikołajczyk i in. 2010b, Yang i in. 2012). W IHAR – PIB, Oddział Poznań, stosowane są opracowane, unikalne markery SNaPshot, umożliwiające precyzyjną detekcję zmienności allelicznej niezmutowanych i zmutowanych genów desaturazy *FAD3* w genomach A i C rzepaku (Mikołajczyk i in. 2010b) w programach hodowli rekombinacyjnej i heterozyjnej, do których zostały włączone linie niskolinolenowego mutantu M681 rzepaku ozimego, otrzymane poprzez działanie EMS (Spasibionek 2006). Do hodowli rekombinacyjnej i heterozyjnej włączane są nowe formy hodowlane rzepaku, takie jak linie resyntetyzowane, czy linie mutantów wysokooleinowych i niskolinolenowych, poprzez ich krzyżowanie z liniami CMS i *Rfo*, stanowiącymi składniki rodzicielskie mieszańca F₁. W tym przypadku selekcja w oparciu o badanie fenotypu linii rekombinantów, jak również odpowiednich mieszańców F₁ jest

długotrwała i pracochłonna. W związku z tym, do identyfikacji linii niskolinolenowych rekombinantów z genem *Rfo*, jak również męsko-sterylną cytoplazmą typu *ogura*, a także niskolinolenowych mieszańców F_1 opracowano nowoczesną, unikalną metodę detekcji genotypów, określoną jako multipleks fluorescencyjny (Mikołajczyk i in. 2012).

Badania populacji segregujących linii podwojonych haploidów, otrzymanych w wyniku krzyżowania pomiędzy odmianą Sollux, a Gaoyou umożliwiły identyfikację loci związanych z zawartością oleju w nasionach rzepaku. Wykonano mapę sprzężeń, wykorzystując do tego 100 markerów CAPS, 339 SSR i 19 SRAP, w odniesieniu do 249 ortologicznych genów *Arabidopsis*. Zidentyfikowano 33 regiony kolinearne między rzepakiem i *Arabidopsis*, z których połowę stanowiły loci ortologiczne, związane z zawartością oleju. Wykryto 9 loci, których numery oznaczają położenie na danym chromosomie: *OilA1*, *OilA5*, *OilA7*, *OilA9*, *OilC2*, *OilC3*, *OilC6*, *OilC8-1* i *OilC8-2*, obejmujące 57,79% zmienności fenotypowej (Zhao i in. 2012).

Z wykorzystaniem 353 markerów SRAP i 34 SSR skonstruowano mapę genetyczną, która umożliwiła identyfikację loci cech ilościowych dla zawartości oleju, pory kwitnienia i plonu nasion rzepaku. Badania prowadzono na populacji segregującej 150 linii DH otrzymanych z krzyżowania pomiędzy liniami rzepaku o wysokiej i niskiej zawartości oleju. Zidentyfikowano 27 loci w 14 grupach sprzężeń (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A10, C2, C3, C4, C6 i C8), obejmujących od 4,20 do 30,20% zmienności fenotypowej. Dla plonu nasion wykryto 18 loci w 11 grupach sprzężeń (A3, A5, A6, A7, A9, C1, C2, C3, C4, C5, C7), które wyjaśniały 4,61–24,44% zmienności fenotypowej, a dla pory kwitnienia 22 loci w 13 grupach sprzężeń (A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8, C1, C3, C4, C6, C7, C8), które wyjaśniały 4,41–48,28% zmienności (Chen i in. 2010).

Podsumowanie

Od połowy lat 90. XX w. prowadzone są w wielu ośrodkach na świecie intensywne badania w aspekcie struktury i funkcji genomu rzepaku, z zastosowaniem nowoczesnych metod biotechnologii i biologii molekularnej. Umożliwiły one podjęcie prób modyfikacji cech – na drodze transformacji genetycznej – wpływających na wartość gospodarczą tej ważnej rośliny oleistej, takich jak odporność rośliny na działanie herbicydów, na szkodniki, zwiększenie ilości tokoferoli w nasionach rzepaku, zmiany poziomu ekspresji genów poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju nasion czy redukcji zawartości synapiny w nasionach. W wyniku kompleksowych doświadczeń hodowlanych, prowadzonych obserwacji fenotypowych i analiz genetycznych zidentyfikowano loci QTL związane z określonymi cechami, jak również markery genetyczne sprzężone z daną

cechą lub specyficzne. Znajdują one zastosowanie do selekcji w programach hodowli, określanej jako MAS. Wskutek analizy genów ortologicznych *B. napus*, *B. oleracea* i *B. rapa*, a także w oparciu o kolinearność genomów *B. napus* i rośliny modelowej *A. thaliana*, sklonowano i zsekwencjonowano szereg genów odpowiedzialnych za ekspresję ważnych gospodarczo cech. Prowadzone badania miały aspekt poznawczy i praktyczny, przyczyniając się do rozwoju nowej, interdyscyplinarnej dziedziny, określanej jako hodowla molekularna.

Nowa jakość i perspektywa w badaniach nad rzepakiem pojawia się wraz z postępowaniem w rozwoju metod wysoko wydajnego sekwencjonowania DNA, umożliwiającego poznanie sekwencji całych genomów i transkryptomów, a w związku z tym detekcję polimorfizmów SNP i ich korelację z określonymi cechami, jak również tzw. selekcję genomową, umożliwiającą monitorowanie całych segmentów genomu w programach hodowli rekombinacyjnej. Istotne jest to, że cele praktyczne implikują podejmowanie kompleksowych badań podstawowych, wnoszących znaczący wkład w rozwój wiedzy z dziedziny genetyki, fizjologii i biochemii roślin.

Literatura

- Amar S., Ecke W., Becker H.C., Möllers C. 2008. QTL for phytosterol and sinapate ester content in *Brassica napus* L. collocate with the two erucic acid genes. *Theor. Appl. Genet.*, 116: 1051-1061.
- Badani A.G., Snowdon R.J., Wittkop B., Lipsa F.D., Baetzel R., Horn R., De Haro A., Font R., Lühs W., Friedt W. 2006. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 49: 1499-1509.
- Bannerot T., Boulidard L., Cauderon Y., Tempe J. 1974. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. *Proc. Eucarpia Meeting on Cruciferae*, Dundee, UK, 52-54.
- Belide S., Petrie J.R., Shrestha P., Singh S.P. 2012. Modification of seed oil composition in *Arabidopsis* by artificial microRNA-mediated gene silencing. *Frontiers in Plant Science*, 3: 168.
- Bonhomme S., Budar F., Lancelin D., Small I., Defrance M.C., Pelletier G. 1992. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* hybrids. *Mol. Gen. Genet.*, 235: 340-348.
- Brown G.G. 1999. Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Brassica napus*. *Heredity*, 90: 351-356.
- Brown G.G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W.Y., Landry B.S. 2003. The radish Rfo restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *The Plant Journal*, 35: 262-272.
- Chen G., Geng J., Rahman M., Liu X., Tu J., Fu T., Li G., McVetty P.B.E., Tahir M. 2010. Identification of QTL for oil content, seed yield, and flowering time in oilseed rape (*Brassica napus*). *Euphytica*, 175: 161-174.

- Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.
- Collard B., Mackill D. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 363: 557-572.
- Delourme R., Bouchereau A., Hubert N., Renard M., Landry B.S. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 88: 741-748.
- Diers B.W., McVetty 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 Sci.*, 36: 79-83.
- Duke S.O. 2005. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Manag. Sci.*, 61: 211-218.
- Fan C., Cai G., Qin J., Li Q., Yang M., Wu J., Fu T., Liu K., Zhou Y. 2010. Mapping of quantitative trait loci and development of allele-specific markers for seed weight in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 121: 1289-1301.
- Fengqun Y., Gugel R.K., Kutcher H.R., Peng G., Rimmer S.R. 2013. Identification and mapping of a novel blackleg resistance locus *LepR4* in the progenies from *Brassica napus* x *B. rapa* subsp. *sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.*, 126: 307-315.
- Ferreira M.E., Williams P.H., Osborn T.C. 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled haploid lines. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 615-621.
- Ferreira M.E., Rimmer S.R., Williams P.H., Osborn T.C. 1995a. Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology*, 85: 213-217.
- Ferreira M.E., Williams P.H., Osborn T.C. 1995b. Mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica napus* using molecular markers. *Phytopathology*, 85: 218-222.
- Ferreira M.E., Satagopan J., Yandell B.S., Williams P.H., Osborn T.C. 1995c. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 727-732.
- Formanová N., Stollar R., Geddy R., Mahé L., Laforest M., Landry B.S., Brown G.G. 2010. High-resolution mapping of the *Brassica napus* *Rfp* restorer locus using *Arabidopsis*-derived molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 120: 843-851.
- Geritz S., Meijdenb E., Metz J. 1999. Evolutionary dynamics of seed size and seedling competitive ability. *Theor. Popul. Biol.*, 55: 1324-1343.
- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann J., Freitag N.M., Link K., Snowdon R. 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolates content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theor. Appl. Genet.*, 116: 1035-1049.
- Hansen G., Wright M.S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.*, 4: 226-231.
- Hospital F., Charcosset A. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, 147: 1469-1485.
- <http://www.brassica.info/resource/maps/lg-assignments.php>.
- Hu X., Sullivan-Gilbert M., Gupta M., Thompson S.A. 2006. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of *fad2* and *fad3* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 113: 497-507.

- Hutchison C.A., Phillips S., Edgell M.H., Gillam S., Jahnke P., Smith M. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.*, 253: 6551-6560.
- Hüsken A., Baumert A., Starck D., Becker H.C., Möllers C., Milkowski C. 2005. Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of *BnSGTI* gene expression. *Molecular Breeding*, 16: 127-138.
- Jourden C., Barret P., Horvais R., Foisset N., Delourme R., Renard M. 1996a. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic acid level in rapeseed. *Molecular Breeding*, 2: 61-71.
- Jourden C., Barret P., Horvais R., Delourme R., Renard M. 1996b. Identification of RAPD marker linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica*, 90: 351-357.
- Katavic V., Mietkiewska E., Barton D.L., Giblin E.M., Reed D.W., Taylor D.C. 2002. Restoring enzyme activity in nonfunctional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution. *Eur. J. Biochem.*, 269: 5625-5631.
- Lee L.K., Roth C.M. 2003. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 505-511.
- Liu L., Stein A., Wittkop B., Sarvari P., Li J., Yan X., Dreyer F., Frauen M., Friedt W., Snowdon R.J. 2012. A knockout mutation in the lignin biosynthesis gene *CCR1* explains a major QTL for acid detergent lignin content in *Brassica napus* seeds. *Theor. Appl. Genet.*, 124: 1573-1586.
- Marwede V., Gül M.K., Becker H.C., Ecke W. 2005. Mapping of QTL controlling tocopherol content in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*, 124: 20-26.
- Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Popławska W., Spasibionek S., Dobrzycka A., Dabert M. 2012. A multiplex fluorescent PCR assay in molecular breeding of oilseed rape. In *Tech. Plant Breeding*, 185-200.
- Mikołajczyk K., Dobrzycka A., Podkowiński J., Popławska W., Spasibionek S., Barkowiak-Broda I. 2010a. A multiplex PCR assay for identification of the ogura male sterile cytoplasm and the *Rfo* restorer gene among oilseed rape breeding forms. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 31: 201-210.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W.M., Spasibionek S., Nowakowska J., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2010b. Allele-specific SNP markers for the new low linolenic mutant genotype of winter oilseed rape. *Plant Breeding*, 129: 502-507.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Nowakowska J., Podkowiński J., Popławska W., Bartkowiak-Broda I. 2008. Conversion of the RAPD OPC02₁₁₅₀ marker of the *Rfo* restorer gene into a SCAR marker for rapid selection of oilseed rape. *Plant Breeding*, 127: 647-649.
- Mikołajczyk K., Matuszczak M., Piętka T., Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. 1998. Zastosowanie markerów DNA do badań odmian składników mieszańcowych rzepaku. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 19: 463-470.
- Murai N. 2013. Review: Plant Binary Vectors of Ti Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a Broad Host-Range Replicon of pRK2, pRi, pSa or pVS1. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 932-939.
- Nacz M., Amarowicz R., Sullivan A., Shahidi F. 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola a review. *Food Chemistry*, 62: 489-502.
- Ogura H. 1968. Studies on the new male-sterility in japanese radish with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, 6: 39-78.
- Osborn T.C., Kole C., Parkin I.A., Sharpe A.G., Kuiper M., Lydiate D.J., Trick M. 1997. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 146: 1123-1129.

- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rousselle P., Renard M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Molecular and General Genetics*, 191: 244-250.
- Pilet M.L., Delourme R., Foisset N., Renard M. 1998. Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 97: 398-406.
- Raclaru M., Gruber J., Kumar R., Sadre R., Lühs W., Zarhloul K.M., Friedt W., Frentzen M., Weier D. 2006. Increase of the tocopherol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Molecular Breeding*, 18: 93-107.
- Raman H., Raman R., Eckermann P., Coombes N., Manoli S., Zou X., Edwards D., Meng J., Prangnell R., Stiller J., Batley J., Luckett D., Wratten N., Dennis E. 2013. Genetic and physical mapping of flowering time loci in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 126: 119-132.
- Raman R., Taylor B., Marcroft S., Stiller J., Eckermann P., Coombes N., Rehman A., Lindbeck K., Luckett D., Wratten N., Batley J., Edwards D., Wang X., Raman H. 2012. Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 125: 405-418.
- Rzaeizad A., Wittkop B., Snowdon R., Hasan M., Mohammadi V., Zali A., Friedt W. 2011. Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. *Euphytica*, 177: 335-342.
- Romagosa I., Han F., Ullrich S.E., Hayes P.M., Wesenberg D.M. 1999. Verification of yield QTL through realized molecular marker-assisted selection responses in a barley cross. *Molecular Breeding*, 5: 143-152.
- Rosa E.A.S., Heaney R.K., Fenwick G.R., Portas C.A.M. 1997. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews*, 19: 99-215.
- Sarkar G., Sommer S.S. 1990. The „megaprimer” method of site-directed mutagenesis, *Biotechniques*, 8: 404-407.
- Sayed A.H., Schuler T.H., Wright D.J. 2003. Inheritance of resistance to Bt canola in a field-derived population of *Plutella xylostella*. *Pest Manag. Sci.*, 59: 1197-1202.
- Schnable S.P., Wise R.P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 3: 175-180.
- Shaner D.L. 2000. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. *Pest Manag. Sci.*, 56: 320-326.
- Shi J.Q., Li R.Y., Qiu D., Jiang C.C., Long Y., Morgan C., Bancroft I., Zhao J.Y., Meng J.L. 2009. Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus*. *Genetics*, 182: 851-861.
- Sigareva M.A., Earle E.D. 1997. Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* spp. *capitata*) via protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 213-220.
- Song K., Osborn T.C. 1992. Polyphyletic origins of *Brassica napus*: New evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome*, 35: 992-1001.
- Spasibionek S. 2006. New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) with changed fatty acid composition. *Plant Breeding*, 125: 259-267.
- Töpfer R., Martini N., Schell J. 1995. Modification of plant lipid synthesis. *Science*, 268: 681-686.
- Trautwein E.A., Erbersdobler H.F. 1998. Rapsöl-ein wertvolles Speiseöl. UFOP-Schriften, Heft 6. Bonn: Union zur Foerderung von Oel- und Proteinpflanzen.

- Trendelkamp H., Uzunova M.I., Ecke W. 1999. Mapping restorer gene for CMS tour 25-143 cytoplasm in rapeseed (*Brassica napus* L.). Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress.
- Uzunova M., Ecke W., Weissleder K., Röbbelen G. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 194-204.
- Walden R., Wingender R. 1995. Gene transfer and plant regeneration techniques. *Trends Biotech.*, 13: 324-331.
- Wang J., Chen Z., Du J., Sun Y., Liang A. 2005. Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Rep.*, 24: 549-555.
- Wittkop B., Snowdon R., Friedt W. 2009. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. *Euphytica*, 170: 131-140.
- Yang P., Shu C., Chen L., Xu J., Wu J., Liu K. 2012. Identification of a major QTL for silique length and seed weight in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 125: 285-296.
- Yang Q., Fan C., Guo Z., Qin J., Wu J., Li Q., Fu T., Zhou Y. 2012. Identification of FAD2 and FAD3 genes in *Brassica napus* genome and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents. *Theor. Appl. Genet.*, 125: 715-729.
- Yu F., Gugel R.K., Kutcher H.R., Peng G., Rimmer S.R. 2012. Identification and mapping of a novel blackleg resistance locus *LepR4* in the progenies from *Brassica napus* × *B. rapa* subsp. *sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.*, 126: 307-315.
- Xiao S.S., Xu J.S., Li Y., Zhang L., Shi S.J., Wu J.S., Liu K.D. 2007. Generation and mapping of SCAR and CAPS markers linked to the seed coat color gene in *Brassica napus* using a genome-walking technique. *Genome*, 50: 611-618.
- Zhang L., Li S., Chen L., Yang G. 2012. Identification and mapping of a major dominant quantitative trait locus controlling seeds per silique as a single Mendelian factor in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 125: 695-705.
- Zhao J., Huang J., Chen F., Xu F., Ni X., Xu H., Wang Y., Jiang C., Wang H., Xu A., Huang R., Li D., Meng J. 2012. Molecular mapping of *Arabidopsis thaliana* lipid-related orthologous genes in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 124: 407-421.
- Zhao J.W., Meng J.L. 2003. Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 106: 759-764.