

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
– PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
W RADZIKOWIE

Katarzyna Sosnowska

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Rozszerzanie puli genowej *Brassica napus* L. poprzez
resyntezę rzepaku ozimego**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych
IHAR – PIB, Oddział w Poznaniu

Promotor:

prof. dr hab. Teresa Cegielska-Taras

Promotor pomocniczy:

dr inż. Laurencja Szała

Recenzenci:

prof. dr hab. Adela Adamus
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

prof. dr hab. Piotr Masojć
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Poznań, 2018

WYKAZ PUBLIKACJI WCHDODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Sosnowska Katarzyna, Cegielska-Taras Teresa (2014) Application of *in vitro* pollination of opened ovaries to obtain *Brassica oleracea* L. × *B. rapa* L. hybrids. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 50:257–262, doi 10.1007/s11627-013-9587-8
2. Szała Laurencja, Sosnowska Katarzyna, Popławska Wiesława, Liersch Alina, Olejnik Anna, Kozłowska Katarzyna, Bocianowski Jan, Cegielska-Taras Teresa (2016) Development of new restorer lines for CMS *ogura* system with the use of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Breeding Science* 66:516–521 doi:10.1270/jsbbs.15042
3. Sosnowska Katarzyna, Cegielska-Taras Teresa, Liersch Alina, Karłowski Wojciech M., Bocianowski Jan, Szała Laurencja, Mikołajczyk Katarzyna, Popławska Wiesława (2017) Genetic relationships among resynthesized, semi-resynthesized and natural *Brassica napus* L. genotypes. *Euphytica* 213:212 doi 10.1007/s10681-017-2000-7

WPROWADZENIE

Rzepak (*Brassica napus* L.), posiadający genom AACC ($2n=38$), jest naturalnym amfidiploidem, powstałym wskutek wielokrotnej spontanicznej i niezależnej hybrydyzacji pomiędzy rzepikiem (*Brassica rapa* $2n=20$, genom AA) i kapustą (*Brassica oleracea* $2n=18$, genom CC) (Seyis i in. 2003). Udomowienie rzepaku kilkaset lat temu, jego ograniczony zasięg geograficzny, intensywne przez długi czas jednokierunkowa selekcja w kierunku uzyskania odmian podwójnie ulepszonych tzw. „00” (zeroerukowych i niskoglukozyolanowych), spowodowała znaczne zawężenie zarówno zmienności genetycznej, jak i fenotypowej tej rośliny (Girke i in. 2012). Występujące obecnie odmiany posiadają stosunkowo wąską bazę genetyczną w porównaniu z jego gatunkami rodzicielskimi. Jednocześnie rzepak jest

rośliną uprawną, która nie ma występujących w stanie naturalnym dzikich form, a co za tym idzie, nie dysponuje naturalnymi zasobami zmienności (Prakash i Hinata 1980), które mogłyby być wykorzystane do wzbogacenia genetycznego tego gatunku. Możliwość poszerzenia puli genowej gatunku *B. napus*, niezbędnej do tworzenia wysokoplonujących odmian o pożądanej jakości i odporności na stropy biotyczne i abiotyczne daje jednak jego pochodzenie. Jako amfidiploid rzepak jest spokrewniony z innymi zróżnicowanymi gatunkami z rodzaju *Brassica*, co pozwala na wzbogacenie genomu *B. napus* o różne wartościowe allele. Sztuczna resynteza rzepaku z wysoce polimorficznych gatunków podstawowych - *B. oleracea* oraz *B. rapa*, umożliwia uzyskanie nowej zmienności i poszerzenie bazy genetycznej oraz wprowadzenie wartościowych cech użytkowych (Friedt i Snowdon 2009).

Niezgodność genetyczna występująca między krzyżowanymi gatunkami często uniemożliwia efektywne krzyżowanie i tym samym powstawanie pożądanych mieszańców. Niezgodność ta może ujawnić się w różnych stadiach cyklu rozmnażania, gdy pyłek znajduje się na znamieniu, podczas przerastania łagiewki przez komórki szyjki, w momencie zapłodnienia (bariery prezygotyczne) lub w czasie embriogenezy (bariery postzygotyczne) (Zenkler 1990).

CEL BADAŃ

Celem badań było uzyskanie resyntetyzowanych (RS) linii rzepaku ozimego o nowej jakości genetycznej, opracowanie systemu ich włączenia do programów hodowlanych, a także ocena zróżnicowania genetycznego linii RS i semi-resyntetyzowanych (semi-RS) w odniesieniu do rzepaku naturalnego.

Cele szczegółowe:

1. Opracowanie metod krzyżowania międzygatunkowego pomiędzy różnymi odmianami *B. oleracea* i *B. rapa* w celu uzyskania rzepaku resyntetyzowanego.
2. Wytworzenie mieszańców F₁ poprzez krzyżowanie rzepaku naturalnego podwójnie ulepszanego z liniami RS.

3. Przeprowadzenie androgenezy *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor mieszańców F₁ oraz selekcji linii DH semi-RS o jakości rzepaku podwójnie ulepszanego.
4. Ocena dystansu genetycznego pomiędzy liniami rzepaku naturalnego, resyntetyzowanego oraz semi-resyntetyzowanego przy wykorzystaniu markerów AFLP.

Założenia do prowadzonych badań

Resynteza rzepaku przy wykorzystaniu wysoce polimorficznych gatunków podstawowych *B. rapa* i *B. oleracea* umożliwia zwiększenie jego zróżnicowania genetycznego i rozwój nowych pul genowych, a zarazem wprowadzanie z gatunków rodzicielskich do rzepaku korzystnych alleli ważnych cech agronomicznych.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były:

- linie rzepaku resyntetyzowanego;
- podwójnie ulepszone linie rzepaku semi-RS z genem *Rfo*;
- diploidalne formy rodzicielskie rzepaku resyntetyzowanego: 2 podgatunki *B. oleracea* (jarmuż – odmiany: Halbhoher Grüner, Kapral, Vitessa oraz kapusta brukselska odm. Crispus) oraz 3 podgatunki *B. rapa* (kapusta chińska – pak choy, kapusta pekińska odm. Kilakin oraz rzepik: ozimy odmiany - Ludowy, Premium, Salut oraz linia BOH 2877; jary odmiany Kova i Skye);
- kolekcja naturalnych odmian/linii *B. napus* zróżnicowanych pod względem: pochodzenia i typu (ozime/jare oraz mieszańcowe/populacyjne) oraz jakości nasion (o zawartości: zerowej kwasu erukowego i niskiej glukozyzolanów tj. podwójnie ulepszone (00), o zerowej zawartości kwasu erukowego i wysokiej zawartości glukozyzolanów (0+), o wysokiej zawartości kwasu erukowego oraz niskiej zawartości glukozyzolanów (+0), a także odmiany o wysokiej zawartości kwasu erukowego i wysokiej zawartości glukozyzolanów (++)).

Metody:

1. Uzyskanie roślin rzepaku RS

Linie resyntetyzowane rzepaku ozimego otrzymano w wyniku obukierunkowego krzyżowania różnych podgatunków *B. oleracea* i *B. rapa* przy zastosowaniu zapylania *in vivo* słupków (Sosnowska i in. 2010), bądź zapylania *in vitro* załężni (Sosnowska i Cegielska-Taras 2014) oraz kultury izolowanych zarodków we wczesnym stadium rozwoju. Po około 15 dniach od zapylania, z załężni izolowano powiększone załężki i wykładano je na pożywkę MS z 2% sacharozą z dodatkiem wody kokosowej. Wykształcone zarodki przenoszono na pożywkę MS z kinetyną w celu regeneracji pędów, a potem na pożywkę ukorzeniającą MS z IBA. Uzyskane rośliny przenoszono do gleby. Mieszańcowy charakter roślin potwierdzano badając zawartość jądrowego DNA przy pomocy cytometru przepływowego. Rośliny jarowizowano, a następnie kolchicynowano w celu podwojenia liczby chromosomów.

2. Tworzenie linii semi-resyntetyzowanych rzepaku podwójnie ulepszonych

Wybrane linie RS wykorzystano jako zapylacze w krzyżowaniu z naturalnymi podwójnie ulepszonymi liniami restorerami zawierającymi gen *Rfo* w systemie kontrolowanego zapylania CMS *ogura*. Utworzono mieszańce F₁ z krzyżowania w układzie linie z genem *Rfo* (00) × linie RS. Z kilku mieszańców F₁ metodą kultury izolowanych mikrospor uzyskano populacje podwojonych haploidów (Cegielska-Taras i in. 2002). W populacjach linii DH zbadano segregację genu restorera przy pomocy izoenzymatycznego markera PGI-2 związanego z allelami genu *Rfo*. W nasionach linii DH rzepaku semi-RS analizowano skład kwasów tłuszczowych i glukozyolanów. Do dalszych badań wybierano linie DH rzepaku semi-RS z genem *Rfo*, podwójnie ulepszone.

3. Analiza biochemiczna nasion

Skład kwasów tłuszczowych w oleju oraz zawartość glukozyolanów w nasionach oznaczono metodą chromatografii gazowej (Byczyńska i Krzymański 1969; Michalski i in. 1995).

4. Badania molekularne nad zróżnicowaniem genetycznym oraz ocena dystansu genetycznego pomiędzy gatunkami z rodzaju *Brassica*

Z młodych liści badanych roślin izolowano całkowite DNA według metody Doyle and Doyle (1990). Jakość i stężenie w otrzymanych próbach DNA oceniano stosując elektroforezę w 0,8% żelu agarozowym wybarwianym Roti® - GelStain (Carl Roth GmbH +Co. KG Karlsruhe, Germany), a także metodą analizy spektrofotometrycznej przy długościach fal 260 i 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Badanie zróżnicowania genetycznego oraz analizę dystansu genetycznego markerami AFLP wykonano według metody opracowanej przez Vos'a i in. (1995) z zastosowaniem kombinacji 10 starterów AFLP znakowanych fluorescencyjnie, opartych na enzymach restrykcyjnych *EcoRI* [FAM (niebieski), JOE (zielony) i NED (żółty)] i *MseI*. Produkty reakcji poddano elektroforezie kapilarnej w aparacie ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems), a następnie odczytano przy użyciu oprogramowania program Gene Marker v.2.2.0.

5. Analiza statystyczna

Dystans genetyczny obliczono za pomocą miary Jaccard'a (1908) i utworzono dendrogram, który przyporządkował badane genotypy do odrębnych pul genetycznych. Przeprowadzono analizę wariancji molekularnej (AMOVA) w celu porównania wyników analiz w obrębie poszczególnych grup (podział ze względu na pochodzenie analizowanych genotypów) i pomiędzy badanymi populacjami. Wszystkie kalkulacje wykonano przy wykorzystaniu pakietu statystycznego GenStat v. 7.1 (Payne i in. 2003).

6. Doświadczenie polowe

Otrzymane linie DH semi-RS podwójnie ulepszone z genem *Rfo* wykorzystano jako komponenty ojcowskie i wysiano w układach z męskosterylnymi liniami CMS *ogura* w celu wytworzenia nasion mieszańców testowych do badań nad zjawiskiem heterozji. Pierwszy mieszańiec doświadczalny F₁ - PN 54/2014, uzyskany w warunkach szklarniowych w wyniku krzyżowania linii CMS *ogura* z linią DH semi-RS S2, testowany był w czteropowtórzeniowym doświadczeniu założonym w układzie bloków kompletnie zrandomizowanych w dwóch miejscowościach - Borowo i Łagiewniki, w celu oceny jego plenności.

WYNIKI

Opracowano metodę uzyskania rzepaku resyntetyzowanego, poprzez krzyżowania międzygatunkowe pomiędzy jarmuzem (*B. oleracea*) a pięcioma odmianami rzepiku (*B. rapa*) (Sosnowska i Cegielska-Taras 2014). W celu ominięcia barier prezygotycznych wykonano zapylenie *in vitro* odciętych zalążni. Ogółem w doświadczeniu zapylono 420 zalążni. Po 14 dniach od zapylenia z zalążni izolowano powiększone zalążki i przenoszono je do nowych stymulujących warunków (w celu ominięcia barier postzygotycznych). Przeprowadzona obserwacja embriologiczna części zapylnych zalążni/zalążków oraz rozwoju powstałych zarodków wykazała występowanie różnorodnych zaburzeń. Jedynie 18% powiększonych zalążków zawierało zarodek i bielmo. Część analizowanych zalążków zawierała tylko zarodek bez bielma (32%), tylko bielmo (24%), bądź zaobserwowano puste woreczki zalążkowe (26%). Po kolejnych 10 dniach z powiększonych zalążków izolowano zarodki i przenoszono je na nową pożywkę (pożywka MS wzbogacona wodą kokosową, kinetyną oraz NAA), stymulującą ich dalszy rozwój. Następnie prawidłowo wykształcone zarodki przenoszono na pożywkę MS z kinetyną, w celu pobudzenia wykształcenia pędów, a następnie na pożywkę ukorzeniającą MS z IBA. Wydajność uzyskania roślin w stosunku do wyłożonych powiększonych zalążków wynosiła 13,4%. Mieszańcowy charakter roślin uzyskanych z zapylenia *in vitro* potwierdzono badając zawartość jądrowego DNA metodą cytometrii przepływowej. Wszystkie analizowane rośliny okazały się allodiploidami, dlatego poddano je podwojeniu liczby chromosomów przy pomocy kolchicyny. Po okresie regeneracji rośliny te przeniesiono do dużych pojemników z glebą i dalej rozwijały się w szklarni.

Uzyskane linie RS nie mogą być włączone bezpośrednio do hodowli rzepaku. Przede wszystkim charakteryzują się niską płodnością i plennością oraz niosą gorsze wartości użytkowe, takie jak np. wysoka zawartość kwasu erukowego czy glukozyolanów, cechy pochodzące od jednego bądź obu form rodzicielskich. Introgresja do hodowli linii RS wymaga kolejnych cykli hodowlanych w celu poprawy ich cech agronomicznych. Jedną z wielu możliwości uzyskania nowych genotypów o jakości rzepaku podwójnie ulepszanego, o pożądanych cechach, jest krzyżowanie linii RS z wartościowymi pod względem cech gospodarczych odmianami, liniami naturalnymi *B. napus*.

Linie rzepaku resyntetyzowanego otrzymane w wyniku hybrydyzacji kapusty chińskiej typu pak choy (*B. rapa* ssp. *chinensis* var. *chinensis*) z jarmuzem odm. Halbhoher Grüner (*B. oleracea* ssp. *acephala* var. *sabellica*) skrzyżowano z wyselekcjonowanymi, dobrze plonującymi liniami restorerami, zawierającymi gen *Rfo* dla systemu kontrolowanego zapylenia CMS *ogura* (Szała i in. 2016). Z mieszańców F₁ w procesie androgenezy, metodą kultur izolowanych mikrospor, uzyskano dwie populacje androgenicznych roślin semi-RS, oznaczone 12r i 17r, które liczyły odpowiednio 406 i 395 roślin. Następnie w otrzymanych populacjach podwojonych haploidów (w sumie 801 roślin) przeprowadzono analizę identyfikującą rośliny zawierające gen restorer *Rfo*. W systemie CMS *ogura*, gen restorer *Rfo* jest ściśle związany z kodominującym markerem izoenzymem fosfoglucoizomerazą (PGI-2) (Delourme i Eber 1992). Ten marker jest z powodzeniem wykorzystywany do analizy obecności genu *Rfo* w genotypach licznych populacji stanowiących materiał wyjściowy do hodowli. Łącznie wyselekcjonowano 281 roślin z genem restorerem, a częstotliwość występowania genu *Rfo* w populacji 12r wynosiła 29,6%, a w populacji 17r - 40,8 % linii DH.

W liniach semi-RS, z których zebrano nasiona, oznaczono zawartość kwasu erukowego i glukozynolanów. Zawartość kwasu erukowego wynosiła od 0,0 do 58,3%, a glukozynolanów od 3,1 do 117,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ nasion. Z obu populacji linii DH semi-RS wyselekcjonowano cztery linie, jedną z populacji 12r (S3) oraz trzy z populacji 17r (S1, S2, S4), które spełniały kryteria rzepaku podwójnie ulepszanego, tj. zawartość kwasu erukowego wynosiła poniżej 1% w oleju, a glukozynolanów poniżej 15 $\mu\text{mol g}^{-1}$ nasion.

Przy wykorzystaniu 10 kombinacji starterów AFLP badano stopień podobieństwa genetycznego pomiędzy dwoma liniami RS, trzema liniami semi-RS oraz 96 liniami rodzicielskimi rzepaku naturalnego do tworzenia mieszańców F₁.

Dendrogram podobieństwa genetycznego utworzony na podstawie 344 polimorficznych markerów AFLP wykazał odrębność linii RS R33/13 i R34/13 oraz linii DH semi-RS R12 125/13, S1 i S2 od 96 naturalnych genotypów *B. napus*. Również analiza składowych głównych (PCA) wykonana na podstawie tych samych markerów AFLP wyjaśniała znaczną zmienność genetyczną związaną z pochodzeniem linii RS (RS 33/13 i RS 34/13), linii restorerów semi-RS (S1, S2 i R12 125/13) od sześciu odmian rzepaku ozimego.

Pierwsze wyniki uzyskane w doświadczeniu polowym, przeprowadzonym w dwóch środowiskach wykazały, że dwa mieszańce F₁ otrzymane z udziałem tej samej

linii matecznej CMS *ogura* (PN 40), ale z dwoma różnymi restorerami – naturalnym (PN 38) i linią semi-RS-S1 (PN 50), plonowały na podobnym poziomie. Jednakże efekt heterozji w porównaniu do średniej plonu linii rodzicielskich, osiągnięty przez mieszańca F₁, powstałego na bazie linii semi-RS, wyniósł 124,7%, a dla mieszańca F₁, z naturalną linią restorującą rzepaku, wyniósł 112,2%.

Określono także stopień polimorfizmu DNA przy użyciu markerów AFLP pomiędzy rzepakiem naturalnym i resyntetyzowanym, ich liniami rodzicielskimi, jak również podwójnie ulepszonymi liniami semi-RS z genem *Rfo* (Sosnowska i in. 2017). Badano 33 linie rzepaku resyntetyzowanego, 6 linii semi-RS rzepaku podwójnie ulepszanego, 4 odmiany *B. oleracea* i 8 odmian *B. rapa*, będących diploidalnymi rodzicami rzepaku RS oraz 49 odmian/linii *B. napus* o różnej jakości, pochodzeniu i typie. Pula wybranych genotypów analizowana była za pomocą 10 kombinacji starterów AFLP znakowanych fluorescencyjnie. Uzyskano 537 markerów AFLP, z czego 522 były polimorficzne. Dla pojedynczej kombinacji starterów uzyskano od 20 (E-ACTfam/M-CTT) do 84 polimorficznych markerów AFLP (E-AACned/MCAC). Analiza wariacji molekularnej (AMOVA) wykazała, że 85% całej wariacji wystąpiło wewnątrz populacji i 15% między badanymi populacjami. Wartość dystansu genetycznego obliczonego za pomocą miary Jaccard'a wyniosła od 0,207 do 0,937. Dendrogram utworzony w oparciu o współczynnik dystansu genetycznego podzielił badane genotypy na 4 zasadnicze grupy. Pierwszą grupę (I) tworzyły dwie mniejsze podgrupy. Jedną z nich (Ia) zawierała 22 linie RS, powstałe ze skrzyżowania trzech odmian jarmużu z odmianami rzepiku bądź kapusty chińskiej. Natomiast druga – Ib, podzieliła się na 2 mniejsze: podgrupę z 3 liniami RS, gdzie jednym z rodziców była kapusta pekińska oraz podgrupę z 7 liniami – gdzie kapusta brukselska odm. Crispus była formą mateczną w krzyżowaniu. Druga grupa (II) składała się z największej liczby genotypów i podzieliła się na dwie mniejsze podgrupy: do pierwszej należy 49 linii, odmian naturalnego *B. napus*, natomiast do drugiej 6 linii rzepaku semi-RS. Trzecią grupę (III) utworzyły odmiany *B. oleracea* - 3 odm. jarmużu i osobno wyodrębniona kapusta brukselska. Do ostatniej grupy (IV) przyporządkowane były odmiany *B. rapa*. Grupa ta dzieliła się na dwie mniejsze podgrupy: pierwsza zawiera 5 odmian i jedną linię rzepiku, natomiast w drugiej podgrupie znalazły się: kapusta chińska i kapusta pekińska. Analizę głównych składowych (PCA) sporządzono dla potwierdzenia i scharakteryzowania struktury różnorodności badanych genotypów. Pierwsze dwie

główne składowe stanowiły 27,56% całkowitej zmienności wśród rzepaku naturalnego, linii RS i ich rodziców, a także podwójnie ulepszonych linii semi-RS. Linie RS i genotypy naturalnego *B. napus* usytuowały się po przeciwnych stronach pierwszej osi. Jednocześnie grupa linii RS ułożyła się między formami rodzicielskimi: *B. oleracea* oraz *B. rapa*, po tej samej stronie drugiej osi. Cztery linie semi-RS (S1-S4) znajdują się stosunkowo blisko grupy rzepaku RS, ale linie S5 i S6 znajdują się bliżej naturalnego *B. napus*. Te ostatnie dwie linie powstawały poprzez krzyżowanie linii semi-RS o wysokiej zawartości kwasu erukowego a niskiej zawartości glukozynolanów z zeroerukową linią semi- RS o wysokiej zawartości glukozynolanów.

Wyniki obecnych badań potwierdziły genetyczną odmienność resyntetyzowanych allotetraploidów oraz linii semi-RS o jakości podwójnie ulepszonej od rzepaku naturalnego. Zgodnie z oczekiwaniami, linie RS były ściśle związane genetycznie z ich rodzicielskimi diploidami (*B. rapa* i *B. oleracea*). Natomiast badane 49 odmiany/linie naturalnego rzepaku wykazywały mniejsze genetycznie zróżnicowanie niż 33 linie sztucznie resyntetyzowanego *B. napus*.

Wytworzone odrębne pule genowe z materiałów hodowlanych, posiadanych przez hodowców, będą mogły być wykorzystane w hodowli odmian mieszańcowych, jak i populacyjnych i pozwolą na efektywne ukierunkowanie krzyżowań i selekcji.

WNIOSKI

1. Metoda zapylania *in vitro*, a następnie kultura *in vitro* zarodków mieszańcowych we wczesnym stadium ich rozwoju, wydatnie ułatwiają otrzymanie rzepaku resyntetyzowanego z gatunków rodzicielskich *B. rapa* i *B. oleracea*.
2. W prowadzonych badaniach nad zapylaniem *in vitro* wydajność uzyskania roślin mieszańcowych w stosunku do wyłożonych powiększonych zalążków wynosiła 13,4%.
3. Tworzenie linii semi-RS oraz selekcja linii DH semi-RS podwójnie ulepszonych jest efektywną drogą wprowadzania nowej zmienności genetycznej do *Brassica napus*.

4. Analiza polimorfizmu DNA metodą AFLP potwierdziła znaczną odrębność genetyczną linii rzepaku RS oraz linii semi-RS podwójnie ulepszonych od rzepaku naturalnego uprawianego i hodowanego obecnie.
5. Należy się spodziewać, że wytworzone mieszańce F₁ z udziałem linii ojcowskich będących liniami semi-RS wykażą wyższy efekt heterozji, wyższą zdolność do plonowania niż mieszańce utworzone z udziałem naturalnych linii restorerów.

SPIS LITERATURY

- Byczyńska B., Krzymański J. (1969) Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne* 13: 108-114
- Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szała L., Kuraś M., Krzymański J. (2002) Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzger. *Euphytica* 124: 341–347
- Delourme R., Eber F. (1992) Linkage between an isozyme marker and a restorer gene in radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 85: 222–228
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15
- Friedt W., Snowdon R. (2009) Oilseed Rape. Ed. J. Vollmann, I. Rajcan. *Oil Crops*. Springer, 91-126
- Girke A., Schierholt A., Becker H.C. (2012) Extending the rapeseed gene pool with resynthesized *Brassica napus* L. I: Genetic diversity. *Genet Resour Crop Ev* 59: 1441-1447
- Jaccard P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44: 223–270
- Michalski K., Kołodziej K., Krzymański J. (1995) Quantitative analysis of glucosinolates in seeds of oilseed rape. Effect of sample preparation on analytical results. Proc. of 9th Intern. Rapeseed Congress, Cambridge, UK 1: 6-8
- Payne R., Murrey D., Harding S., Baird D., Soutou D., Lane P. (2003) *GenStat for Windows* (7th edition) – Introduction. VSN International, Oxford, England

- Prakash S., Hinata K. (1980) Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. *Opera Botanica* 55: 1-57
- 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 Breed* 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
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407–4414
- Zenkter M. (1990) *In vitro* fertilization and wide hybridization in higher plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 9: 267–279