

Zadanie 51

Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju *Brassica* do bazy genowej rzepaku ozimego

2014-2020

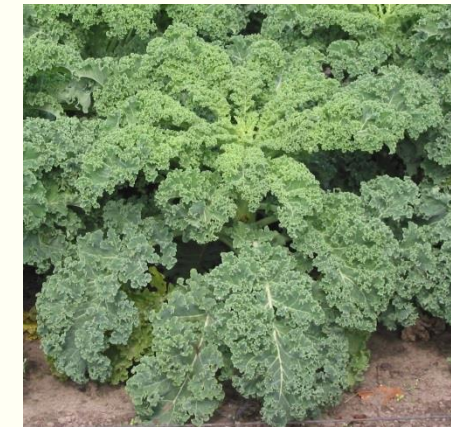
Wykonawcy:

prof. dr hab. Teresa Cegielska-Taras tceg@ihar.edu.pl

dr hab. Laurencja Szała

dr Katarzyna Sosnowska

st. technik Katarzyna Kozłowska



Cel projektu:

Uzyskanie homozygotycznych linii „nowego” rzepaku ozimego *Brassica napus*, podwójnie ulepszanego, wykazującego odrębność genetyczną od obecnego naturalnego rzepaku.

Cele szczegółowe:

- ❖ Uzyskanie roślin z rodzaju *Brassica rapa* i *Brassica oleracea* z pędami generatywnymi odpowiednimi do krzyżowań międzygatunkowych.
- ❖ Uzyskanie roślin mieszańcowych (rzepak resyntetyzowany – RS), poprzez krzyżowanie międzygatunkowe, z diploidalnych gatunków podstawowych: *Brassica rapa* i *Brassica oleracea*
- ❖ Badania nad zdolnością do wytwarzania nasion przez każdą roślinę uzyskaną z krzyżowania międzygatunkowego poprzez analizę prawidłowego wykształcenia pyłku i badanie zdolności do samozapylenia roślin mieszańcowych.
- ❖ Uzyskanie nasion z mieszańców F₁ otrzymanych z krzyżowań rzepaku RS i rzepaku podwójnie ulepszanego.
- ❖ Przygotowanie roślin dawców mikrospor do przeprowadzenia androgenезы *in vitro* i uzyskanie populacji linii DH semi-RS, spośród których będzie można wyselekcjonować linie DH semi-RS podwójnie ulepszone.
- ❖ Analiza biochemiczna nasion rzepaku semi-RS pod względem zawartości glukozynolanów (GSL) i składu kwasów tłuszczowych oraz wyselekcjonowanie linii DH rzepaku semi-RS o jakości rzepaku podwójnie ulepszanego: zero-erukowych oraz o niskiej zawartości GSL.
- ❖ Badanie odrębności genetycznej rzepaku RS i semi-RS
- ❖ Uzyskanie informacji dotyczącej sekwencji genomu rzepaków resyntetyzowanych w porównaniu do wyjściowych diploidalnych form rodzicielskich .



B. rapa L.
ssp. *oleifera*



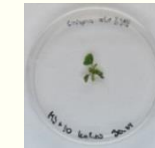
B. rapa ssp.
pekinensis



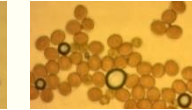
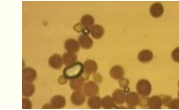
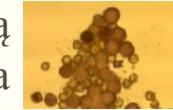
B. oleracea convar.
acephala var. *sabellica*



B. oleracea convar.
fruticosa var. *gemnifera*



Otrzymywanie roślin mieszańcowych (linie RS)



Analiza żywotności ziaren pyłku



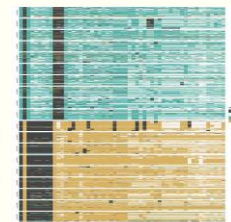
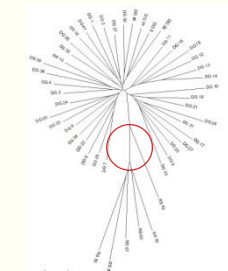
Zawijanie łuszczyń po przepyleniu linii rzepaku RS z rzepakiem naturalnym



Linie DH semi-RS



Markery molekularne AFLP

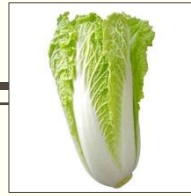


Analiza mikromacierzy Brassica 60K

Materialy i metody



kapusta chińska



kapusta pekińska



rzepik



jarmuż



kapusta brukselska



kalafior

Material roślinny:

- gatunki roślin z rodzaju Brassica:
- podwójnie ulepszone odmiany rzepaku ozimego: Tosca, Tactic, Arot, Lohana, Architect, Platinum
- linie rzepaku resyntetyzowanego (RS) i linie DH semi-RS
- linie męskosterylne CMS ogura

Metody:

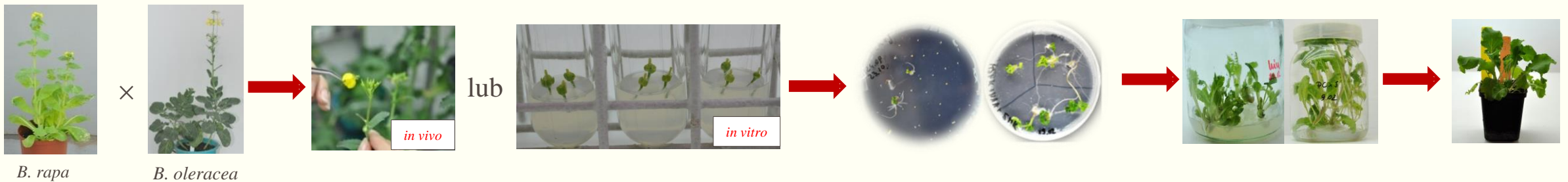
- zapylenie *in vitro* i *in vivo* w krzyżowaniach między *B. rapa* i *B. oleracea*
- hodowla *in vitro* izolowanych zarodków lub zalążków (ang. embryo rescue)
- androgeniza *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor
- pomiar jądrowego DNA metodą cytometrii przepływowej w celu określenia wielkości genomu i ploidalności roślin
- metody cytogenetyki klasycznej w celu określenia żywotności pyłku
- metoda chromatografii gazowej do oznaczania zawartości glukozynolanów i składu kwasu tłuszczowych w nasionach
- analiza bioinformatyczna w celu oszacowania zróżnicowania genetycznego na podstawie wyników z mikromacierzy Brassica 60K

Wyniki

1. Określono potrzeby jarowizacyjne niektórych gatunków z rodzaju Brassica:

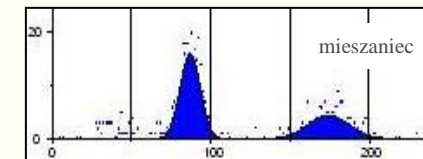
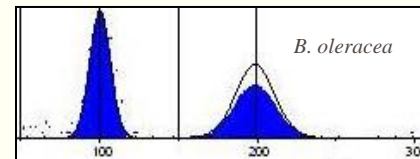
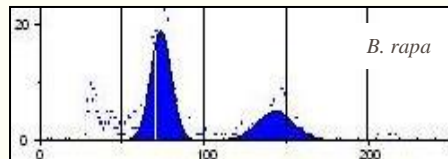
- większość badanych rzepików (*B. rapa*) wymagała jaryzacji w stadium 4-5 liści w temp. 4°C przy 8 h oświetlenia przez okres 8 tygodni
- rzepik odm. Ludowy i linia Cr2877 potrzebował 12 tygodni jaryzacji do wytworzenia prawidłowych pędów generatywnych
- dla wszystkich badanych odmian jarmużu (*B. oleracea*) stadium pięciu liści było odpowiednie do rozpoczęcia jaryzacji
- dla jarmużu odm. Vitessa ustalono 8-tygodniowy, a dla odm. Kapral i jarmużu tradycyjnego 12-tygodniowy okres jaryzacji
- do prawidłowego przebiegu jaryzacji kapusta warzywna brukselska (*B. oleracea*) wymagała 8-10 tygodni traktowania niską temperaturą (4°C) w fazie 10 liści
- kalafior (*B. oleracea*) nie wymagał okresu chłodu, a cały proces wytwarzania pędów generatywnych trwał ok. 6 miesięcy

2. Do krzyżowań międzygatunkowych wykorzystano 10 odmian rzepiku (jare i ozime, tradycyjne, jednozerowe i dwuzerowe) i 1 odmianę kapusty pekińskiej z gatunku *B. rapa*, a z gatunku *B. oleracea* - 3 odmiany jarmużu, 1 odmianę kapusty brukselskiej i 1 odmianę kalafiora. Zastosowano dwie metody zapylenia zoptymalizowane na potrzeby realizowanego projektu: *in vivo* i *in vitro* oraz metodę hodowli *in vitro* izolowanych zarodków lub zalążków (ang. *embryo rescue*) i regeneracji z nich roślin w kulturze *in vitro*.



Wyniki

3. W trakcie realizacji projektu otrzymano 58 mieszańców międzygatunkowych będących rzepakiem RS. Metodą cytometrii przepływowej potwierdzono mieszańcowość wszystkich roślin uzyskanych w wyniku krzyżowań pomiędzy *B. rapa* a *B. oleracea*.



4. U wszystkich badanych mieszańców międzygatunkowych zaobserwowano samoniezgodność wywołaną prawdopodobnie czynnikami genetycznymi i zróżnicowaną żywotność pyłku. Wykonana analiza wykazała, że żywotność ziaren pyłku badanych roślin RS wynosiła od 38,8% u do 92,4%. Nie stwierdzono związku pomiędzy żywotnością ziaren pyłku a pochodzeniem linii RS. Na żywotność pyłku nie wpływał także ani kierunek krzyżowania, ani podgatunki rodzicielskie danego mieszańca.

Obserwacje budowy kwiatów u 10 różnych linii rzepaku RS pozwoliły wyróżnić cztery typy budowy: A – słupek wyrastał znacznie ponad pylniki; B – słupek równy pylnikom; C – zredukowany słupek mniejszy od pylników; D – silnie zredukowane pylniki pozbawione żywego pyłku.



Aby pokonać barierę samoniezgodności i nieprawidłowej budowy kwiatów, rośliny zapyłano ręcznie w zamkniętym pąku kwiatowym w celu otrzymania nasion. Analiza biochemiczna nasion rzepaku RS wykazała obecność kwasu erukowego (13,8 – 43,4%) i wysoką zawartość GSL (24,3 - 119,2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ nasion).

5. W celu poprawy cech jakości rzepaku RS wykonano krzyżowania pomiędzy odmianami rzepaku ozimego: Lohana, Arot, Tactic, Tosca i Platinum oraz linią semi-RS z trzema liniami rzepaku RS: RS63, RS68 i RS69. Odmiany rzepaku naturalnego są podwójnie ulepszone, charakteryzują się wysoką zawartością tłuszczu w nasionach i wysokim plonowaniem. Uzyskano nasiona z mieszańców F1 pochodzących z następujących kombinacji: odm. Lohana \times RS63, odm. Lohana \times RS68, odm. Tactic \times RS63, odm. Tactic \times RS68, odm. Arot \times RS63, odm. Arot \times RS69, RS69 \times odm. Arot, odm. Tosca \times RS68, RS68 \times odm. Tosca, RS68 \times odm. Platinum, RS69 \times odm. Platinum, RS61 i semi-RS S₁A/8.

Wyniki

6. W wyniku androgenozy *in vitro* mieszańców F1 (odmiana × RS) otrzymano 5 populacji linii DH semi-RS

Populacja	Liczba uzyskanych roślin	Liczba analizowanych linii	Liczba linii bez kwasu erukowego	Liczba linii z obniżoną zawartością GSL	Liczba linii podwójnie ulepszonych
D 23 (RS69 × odm. Arot)	158	97	12	2	0
D 24 (odm. Arot × RS69)	156	88	9	2	0
D 25 (odm. Lohana × RS63)	186	52	15	4	2
D 26 (odm. Tactic × RS68)	62	30	0	0	0
D 27 (odm. Tosca × RS68)	84	43	1	2	1

Uzyskane wyniki wskazują o bardzo niskiej częstotliwości występowania segregantów o obniżonej zawartości glukozynolanów i pozbawionych kwasu erukowego w populacjach linii DH. Szczególnie trudno jest uzyskać linie o normalnej zawartości GSL ze względu na wielość i różnorodność tych związków, a tym samym wysoka liczba genów odpowiedzialnych za ich syntezę.

W celu wprowadzenia nowej zmienności genetycznej do materiałów hodowlanych wyselekcjonowane podwójnie ulepszone linie DH semi-RS skrzyżowano z liniami męskosterylnymi CMS ogura w układzie: CMS 896 x semi-RS 25/4 oraz CMS 430 x semi-RS 27/25, a w następnych pokoleniach prowadzono krzyżowania wsteczne.

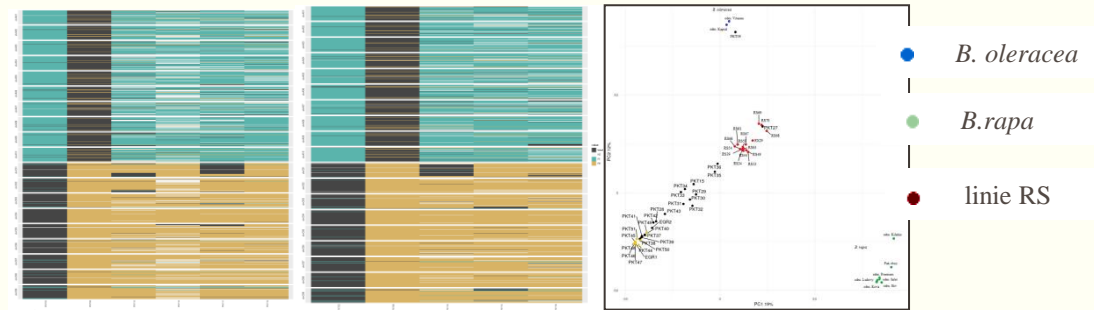


Populacja D 23 w szklarni, rok 2017.

Wyniki

7. W celu uzyskania informacji genetycznej o liniach RS rzepaku i ich komponentach rodzicielskich wykonano badania molekularne poddając analizie za pomocą mikromacierzy Brassica 60K (Traits Genetics) DNA wyizolowane z 12 genotypów. Do badań wybrano: 7 linii RS, 2 odmiany jarmużu (*B. oleracea*) i trzy podgatunki *B. rapa*: kapustę pekińską, kapustę chińską i bezerukową odmianę rzepiku.

Mikromacierz zawierała sondy charakterystyczne dla poszczególnych markerów SNP, stanowiące sekwencje komplementarne do sekwencji badanych. Analiza prowadzona była na zasadzie hybrydyzacji sond zlokalizowanych na płycie z badanym DNA. Wizualizacja uzyskanych wyników ujawniła liczne zmiany w genomie linii RS w porównaniu do linii rodzicielskich, a rozmieszczenie badanych genotypów w układzie dwóch składowych głównych wykazało odrębność genetyczną linii RS od rzepaku naturalnego.



8. W 2020 roku w firmie Genomed S.A. wykonano sekwencjonowanie NGS dla 4 próbek DNA z roślin różnych gatunków rodzaju *Brassica*. Próbki DNA (tabela) zostały wyizolowane w IHAR-PIB w Poznaniu z liści rzepiku, kapusty i rzepaku resyntetyzowanego (z indywidualnych roślin), za pomocą zmodyfikowanej metody z CTAB (Doyle i Doyle 1990), a następnie ich jakość i stężenie sprawdzano za pomocą spektrofotometru Nanodrop. Próbki stężone po izolacji (DNA rozpuszczone w buforze TE), były rozcieńczane różnymi objętościami buforu TE do końcowego stężenia DNA 40 ng/μl. Każda próbka przesłana do firmy Genomed S.A. (ok 50 μl) zawierała ok. 2 μg DNA w buforze TE. Jakość i ilość DNA w przesłanym materiale była też sprawdzana w ramach procedur stosowanych przez firmę Genomed S.A. – wszystkie 4 próby przeszły pozytywnie kontrole ilościową.

L. p.	Nazwa próbki	Stężenie [ng/μl]	Współczynnik A260/280	Gatunek organizmu, z którego pochodzi materiał do sekwencjonowania
1.	091/01-R1-rzepik	40	1,93	rzepik (<i>Brassica rapa</i>)
2.	091/02-R1-kapusta	40	1,88	kapusta (<i>Brassica oleracea</i>)
3.	091/03-R1-RS68	40	1,89	rzepak (<i>Brassica napus</i>)
4.	091/04-R1-RS69	40	1,89	rzepak (<i>Brassica napus</i>)

Wyniki

8. W ramach zlecenia firma Genomed S.A. wykonała usługi sekwencjonowania genomowego dla czterech prób *Brassica*. Analizy te obejmowały przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie na urządzeniu HiSeq4000 / NovaSeq6000 (Illumina) w trybie sparowanych końców (ang.: *paired end*) w dwóch odczytach, po 150 zasad (tryb PE150), z gwarancją 50-krotnego pokrycia genomu.

Wykonano podstawową analizę bioinformatyczną dla otrzymanych danych z sekwencjonowania – filtrowanie uzyskanych sekwencji oraz usuwanie sekwencji adapterów. Etap ten wykonano przy użyciu programu Cutadapt w wersji 1.18. Filtrowanie zostało przeprowadzone przy zastosowaniu parametru jakości $q=25$ oraz minimalnej długości odczytów $m=15$. Zestawienie wyników po filtrowaniu i przycinaniu sekwencji przedstawiono w tabeli.

	091-04-R1- RS69_S30_R1_001.fastq.gz	091-04-R1- RS69_S30_R2_001.fastq.gz	091-03-R1- RS68_S31_R1_001.fastq.gz	091-03-R1- RS68_S31_R2_001.fastq.gz
Liczba sekwencji	321979701	321979701	276506844	276506844
Długość sekwencji (pz)	15-151	15-151	15-151	15-151
%GC	38	38	38	38
%AT	62	62	62	62
%Q20	99.99	99.97	100	99.98
%Q30	97.23	96.75	97.19	96.9
	091-02-R1- kapusta_S32_R1_001.fastq.gz	091-02-R1- kapusta_S32_R2_001.fastq.gz	091-01-R1- rzepik_S33_R1_001.fastq.gz	091-01-R1- rzepik_S33_R2_001.fastq.gz
Liczba sekwencji	116530708	116530708	107681495	107681495
Długość sekwencji (pz)	15-151	15-151	15-151	15-151
%GC	36	36	39	39
%AT	64	64	61	61
%Q20	100	99.97	100	99.98
%Q30	97.28	96.56	97.28	97.31

Obecnie przeprowadzana jest dalsza analiza bioinformatyczna. Obejmuje ona m.in. wykonanie mapowań odczytów do genomów referencyjnych dla każdego z genomów badanych roślin. Dla próbki z rzepiku wykonane zostanie mapowanie do genomu A, natomiast dla próbki z kapusty mapowanie do genomu C. Z kolei dla rzepaku resyntetyzowanego wykonane zostaną mapowania do obu genomów (A i C) (tabela). Planowane jest także wskazanie mutacji różnicujących badane rośliny względem zastosowanych genomów referencyjnych oraz wytypowanie wariantów wspólnych i unikalnych dla badanych prób.

Genomy referencyjne dla opracowania uzyskanych sekwencji:

Genom rzepiku (*Brassica rapa*, genom A) (genom **GCF_000309985.2_CAAS_Brap_v3.01** w bazie NCBI)
https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/refseq/plant/Brassica_rapa/latest_assembly_versions/GCF_000309985.2_CAAS_Brap_v3.01/

Genom kapusty (*Brassica oleracea*, genom C) (genom **GCF_000695525.1_BOL** w bazie NCBI)
https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/refseq/plant/Brassica_oleracea/latest_assembly_versions/GCF_000695525.1_BOL/

Osiągnięcia

- a/ Opracowanie schematu uzyskiwania rzepaku ozimego resyntetyzowanego (RS) poprzez krzyżowania międzygatunkowe pomiędzy różnorodnymi diploidalnymi liniami rodzicielskimi *B. rapa* i *B. oleracea*, odrębnego genetycznie zarówno od odmian tradycyjnych, jak i odmian podwójnie ulepszonych rzepaku naturalnego.
- b/ Opracowanie metody zapylenia „*in vitro*” *B. rapa* × *B. oleracea* w obu kierunkach w celu uzyskania roślin mieszańcowych RS. Metoda ta pozwala ominąć niektóre z prezygotycznych barier krzyżowalności występujących pomiędzy gatunkami o zróżnicowanej liczbie chromosomów.
- c/ Opracowanie metody otrzymywania linii DH semi-RS rzepaku ozimego o jakości canoli na drodze androgenyzy *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor z mieszańców F1 uzyskanych z krzyżowania rzepaku RS i rzepaku podwójnie ulepszanego oraz selekcji linii podwójnie ulepszonych (00): bez kwasu erukowego i o obniżonej zawartości glukozynolanów.
- d/ Wykazanie odrębności genetycznej linii RS i semi-RS od obecnie uprawianego i hodowanego rzepaku ozimego za pomocą markerów molekularnych.
- e/Włączenie do doświadczeń hodowlanych genotypów rzepaku ozimego wzbogaconych o rzepak RS we współpracy z H R Strzelce.
- f/ Złożenie projektu badawczego pt: „Identification of markers for the traits that vary between resynthesized and natural genotypes of winter *Brassica napus* „ w ramach konkursu OPUS NCN
- g/ Przygotowanie projektu do złożenia w konkursie „Szybka ścieżka” NCBiR dotyczącego wprowadzenia rzepaku pochodzącego z resyntezy do hodowli mieszańcowej rzepaku ozimego

Publikacje

1. Cegielska-Taras T., Szała L., Matuszczak M., Babula D., Mikołajczyk K., Popławska W., Sosnowska K., Hernacki B., Olejnik A., Bartkowiak-Broda I. 2015. Doubled haploid as a material for biotechnological manipulation and a modern tool for breeding of oilseed rape (*Brassica napus*). *BioTechnologia* 96(1): 171-177. **MNiSW₂₀₁₅=13pkt.**
2. Szała L., Sosnowska K., Popławska W., Liersch A., Olejnik A., Kozłowska K., Bocianowski J., Cegielska-Taras T. 2016. Development of new restorer lines for CMS ogura system with the use of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Breeding Science* 66(4): 516-521. doi:10.1270/jsbbs.15042. **IF₂₀₁₆=1,792; MNiSW₂₀₁₆=30 pkt**
3. Sosnowska K., Cegielska-Taras T., Liersch A., Karłowski W.M., Bocianowski J., Szała L., Mikołajczyk K., Popławska W. 2017. Genetic relationships among resynthesized, semi-resynthesized and natural *Brassica napus* L. genotypes. *Euphytica* 213:212, 1-12. **IF₂₀₁₇=1,803; MNiSW₂₀₁₆=35 pkt.**
4. Sosnowska K., Majka M., Majka J., Bocianowski J., Kasproicz M., Książczyk T., Szała L., Cegielska-Taras T. 2020. Chromosome instabilities in resynthesized *Brassica napus* revealed by FISH. *Journal of Applied Genetics* 61: 323–335. **IF₂₀₁₉=2,027; MNiSW₂₀₁₉=70 pkt.**
5. Szała L., Sosnowska K., Cegielska-Taras T. 2020. Induced chromosome doubling in microspores and regenerated haploid plants of *Brassica napus*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 62/1: 23-31. **IF₂₀₁₉=0,606; MNiSW₂₀₁₉=40pkt.**

Wykłady

1. Cegielska-Taras T. i in. 2014. Resynteza *Brassica napus* L. nowe możliwości i wyzwania w hodowli rzepaku ozimego. XXXII Konferencja Naukowa Rośliny Oleiste, Poznań, 19-22.05.2014 r., streszcz. str. 10-20.
2. Sosnowska K. i in. 2014. Extending the oilseed rape gene pool with resynthesized *Brassica napus* L. Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany; III Ogólnopolska Konferencja IGR PAN, Poznań 5-7.11.2014 r., streszczenia str. 78.
3. Szała L. i in. 2015. Wykorzystanie resyntetyzowanych linii DH w hodowli mieszańcowej rzepaku ozimego. Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Zakopane, 2-6.02.2015 r., streszczenia str. 83-85.
4. Szała L. i in. 2017. Wykorzystanie resyntetyzowanych linii *Brassica napus* w hodowli mieszańcowej rzepaku ozimego. XI Międzynarodowe Sympozjum „Genetyka Ilościowa Roślin Uprawnych”, Świeradów Zdrój, 6-9.06.2017 r., streszczenia str. 42-43.
5. Szała L. i in. 2018. Tworzenie nowej puli genowej dla linii restorerów w oparciu o resyntetyzowany rzepak. Development a new gene pool for the restorer lines based on resynthesized oilseed rape. XXXIV Konferencja Naukowa “Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analizie Lipidów”. Poznań, 10-11.04.2018 r. streszczenia str. 17-18.
6. Sosnowska i in. 2019. Resynteza *Brassica napus* L. impulsem do tworzenia odrębnych pul genowych dla hodowli mieszańcowej rzepaku ozimego. IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych”, 5-7.11.2019 r., streszczenia str. 26.

Plakaty

1. Sosnowska K. i in. 2014. Wstępna ocena odporności na kiłkę kapusty komponentów do resyntezy *Brassica napus*, resyntetyzowanych linii i wybranych odmian rzepaku ozimego. XXXII Konferencja Naukowa „Rośliny Oleiste”, Poznań, 19-20.05.2014 r., streszczenia str. 105-106.
2. Cegielska-Taras T. i in. 2014. Development of double low quality DH lines with the *Rfo* gene from semi-resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.), International Association for Plant Biotechnology Congress, Melbourne, Australia 10-15.08.2014. www.iapb2014congress.com
3. Szała L. i in. 2015. Introgression of resynthesized *Brassica napus* L. into parental lines of winter oilseed rape F1 hybrids. 14th International Rapeseed Congress, Saskatoon, Kanada 5-9.07.2015; Abstracts p. 287.
4. Sosnowska K. i in. 2015. Application of new biotechnologies in *Brassica napus* L. resynthesis. *BioTechnologia*; XIV Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin - Strukturalne, fizjologiczne i molekularne podstawy różnicowania roślin” Poznań, 14-17.09.2015 r., *Biotechnologia* 96 (1): str.59
5. Sosnowska K. i in. 2016. Phenotypic variability of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). 20th EUCARPIA General Congress Plant Breeding, Zurich, Szwajcaria, 29.08. -1.12., Abstracts p. 298.
6. Sosnowska K. i in. 2016. Study of the development of distinct gene pools in *Brassica napus* L. 5th Polish Congress of Genetics, Łódź, September 19-22, 2016, Abstracts p. 309.
7. Sosnowska K. i in. 2017. Assessment of genetic relationship among resynthesized, semi-resynthesized and natural *Brassica napus* L. genotypes. Technical Meeting GCIRC Alnarp-Malmö, Szwecja, 8-11.05.2017.
8. Szała L. i in. 2018. Introduction of the resynthesized *Brassica napus* for breeding of winter oilseed rape. 21st Crucifer Genetics Conference – Brassica 2018. Saint-Malo, Francja, 1-4.08.2018, Abstracts – Posters p. 11
9. Szała L. i in. 2018. Biotechnological methods used in *Brassica napus* resynthesis. Zastosowanie metod biotechnologicznych w resyntezie rzepaku. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin. Rogów, 17-20.09.2018 r. *BioTechnologia* 99 (3), p. 266.
10. Szała L. i in. 2019. Selection for double low quality semi-resynthesized DH lines of oilseed rape (*Brassica napus* L.) 15th International Rapeseed Congress 2019 Berlin, Niemcy, 16-19.06.2019.
11. Matuszczak M. i in. 2019. Zastosowanie mikromacierzy Brassica 60K w analizie zróżnicowania genetycznego rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych”, 5-7.11.2019 r., streszczenia str. 73.