

Rozprawa doktorska pt.
**„Fenotypowa i genotypowa analiza efektu heterozji
w mieszańcach rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)”**

Phenotypic and genotype analysis of heterosis effect
in hybrids of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)

mgr Joanna WOLKO

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie
Oddział w Poznaniu, Zakład Roślin Oleistych
o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie agronomia*/

Promotor: dr hab. Alina Liersch

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Łopatyńska

STRESZCZENIE

Rzepak ozimy (*Brassica napus* L.) jest jedną z najważniejszych roślin oleistych zarówno w Polsce jak i na świecie. Z powodu ciągłego wzrostu zapotrzebowania na nasiona rzepaku i ograniczone możliwości obszarowe, większość uprawianych obecnie odmian, ma charakter mieszańcowy. U odmian takich obserwowany jest efekt heterozji polegający na wzroście wartości pewnych cech fenotypowych pierwszego pokolenia w stosunku do zróżnicowanych genetycznie rodziców. Podstawą hodowli heterozyznej jest zatem dobór komponentów rodzicielskich. Jednak jednokierunkowa hodowla nastawiona na ulepszanie odmian dwuzerowych doprowadziła do zubożenia puli genowej rzepaku. W celu uzyskiwania nowych, wartościowych genotypów o pożądanym cechach agronomicznych konieczne jest poszerzenie zmienności genetycznej tego gatunku.

Pomimo powszechnego wykorzystywania efektu heterozji w hodowli wielu roślin uprawnych, jest to nadal zjawisko o słabo poznanych podstawach genetycznych. Efekt ten występuje dla cech agronomicznych, które są warunkowane wielogenowo. Dodatkowo, zarówno na te cechy jak i na sam efekt heterozji istotny wpływ mają warunki środowiska. Wszystkie te czynniki utrudniają identyfikację podstaw genetycznych heterozji. Jednak rozwój metod molekularnych, który doprowadził między innymi do identyfikacji pełnej sekwencji genomu rzepaku, stwarza nowe możliwości badawcze i zwiększa szansę na poznanie mechanizmów powstawania tego efektu.

W ramach wieloletnich badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej dokonano oceny zmienności badanych genotypów, zbadano efekt heterozji w dwóch pokoleniach mieszańców heterozyznych, a także zidentyfikowano markery mikrosatelitarne zasocjowane z cechami struktury plonu oraz z efektem heterozji. Wytypowano również geny kandydujące, które mogą mieć związek z obserwowanymi cechami.

Badania prowadzono na 60 liniach podwojonych haploidów (DH), 60 mieszańcach pojedynczych (CMS×DH), 60 mieszańcach trójliniowych (CMS/DH×*Rfo*) oraz liniach rodzicielskich 324/2 i 622/3, które posłużyły do wytworzenia populacji linii DH, a także linii męskosterylnej CMS *ogura* i linii z genem restorerem *Rfo*, których użyto do otrzymania dwóch pokoleń mieszańców. Badania polowe prowadzono przez dwa sezony wegetacyjne (2014/15, 2015/16) w trzech powtórzeniach w układzie bloków zrandomizowanych kompletnych i oceniono następujące cechy: początek kwitnienia, długość kwitnienia, wysokość roślin, liczbę rozgałęzień na roślinie, liczbę łuszczyń na roślinie, długość łuszczyń, liczbę nasion w łuszczyńce, masę tysiąca nasion oraz zawartość tłuszczu w nasionach.

Na podstawie wielowymiarowej oceny zmienności stwierdzono wysoce istotne zróżnicowanie testowanych obiektów. Potwierdzono występowanie interakcji genotypowo-środowiskowej w obu sezonach wegetacyjnych dla wszystkich badanych cech. Ocena genotypów pod względem wszystkich cech jednocześnie wykazała, że kwitnienie i liczba rozgałęzień na roślinie miały bardzo duży wpływ na zróżnicowanie badanych obiektów. Analiza regresji wielokrotnej wykazała wysoce istotny pozytywny wpływ na masę tysiąca nasion długości łuszczyń i liczby łuszczyń na roślinie oraz negatywny liczby nasion w łuszczyńce.

Linie DH i oba pokolenia mieszańców miały podobnie szeroki zakres zmienności pod względem cech fenotypowych w obu latach badań. Stwierdzono pozytywny efekt heterozji dla wielu mieszańców niezależnie od pokolenia i roku doświadczenia polowego dla takich cech jak: wysokość roślin, długość łuszczyń i liczba nasion w łuszczyńce, a efekt heterozji był wyższy u mieszańców trójliniowych niż u pojedynczych. Istotny związek między odległościami Mahalanobisa badanych linii rodzicielskich a efektem heterozji stwierdzono tylko u mieszańców pojedynczych dla masy tysiąca nasion w drugim roku doświadczenia polowego.

Przeprowadzono analizy molekularne przy wykorzystaniu 89 par starterów mikrosatelitarnych. Wybrano 43 markery, które wykazywały polimorfizm wśród linii rodzicielskich i przetestowano nimi wszystkie genotypy. Analiza asocjacji wykazała 354 sprzężenia z cechami fenotypowymi oraz 140 z efektem heterozji. Na 15 markerach SSR, charakteryzujących się silną asocjacją z cechami i heterozją oraz powtarzających się w obu latach, przeprowadzono mapowanie fizyczne. Przeszukując genomy rzepaku w pobliżu tych markerów, wytypowano sześć genów kandydujących związanych z rozwojem roślin, które po dokładniejszych badaniach mogą posłużyć hodowli rzepaku do selekcji genotypów pod kątem konkretnych cech.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w trzech czasopismach o zasięgu międzynarodowym i jednym ogólnopolskim osiągając łączny współczynnik wpływu (IF) 9,512.

ABSTRACT

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is one of the most important oilseeds in Poland and in the world. Due to the continuous increase in the demand for rapeseed and limited area possibilities, most of the varieties currently grown are hybrids. In hybrid cultivars, the heterosis effect, which is based on an increase the value of specific phenotypic traits of the first generation concerning genetically diverse parents is observed. The basis of heterosis breeding is therefore the selection of the parental components. However, one-way breeding of oilseed rape focused on the improvement of double-low varieties led to the depletion of the gene pool of this species. In order to obtain new, valuable genotypes with the desired agronomic traits, it is necessary to extend the genetic variability.

Despite the widespread use of the heterosis effect in breeding many crops, the genetic mechanisms underlying this phenomenon are not well understood. This effect occurs for agronomic traits that are controlled by many genes. Additionally, both these features and the heterosis effect itself are significantly influenced by environmental conditions. All these factors make it challenging to identify the genetic basis of heterosis. However, the development of molecular methods, which has led, among other things, to the knowledge of the complete sequence of the rapeseed genome, creates new research opportunities and increases the chance of discovering the mechanisms of heterosis.

During the many years of the research described in this doctoral dissertation, the variability of the studied genotypes was assessed, the heterosis effect in two generations of hybrids was examined, and microsatellite markers associated with the yield related traits and the heterosis effect were identified. Candidate genes that may be related to the observed traits were also selected.

The research was carried out on 60 doubled haploid lines (DH), 60 single cross hybrids (CMS × DH), 60 three-way cross hybrids (CMS / DH × *Rfo*), parental lines 324/2 and 622/3, which were used to generate the population of DH lines, as well as one male sterile CMS *ogura* line and one restorer (*Rfo*) line, which were used to obtain two generations of hybrids. Field experiments were conducted for two growing seasons (2014/15, 2015/16) in the system of randomized block design with three replications. Traits evaluated in the field trials were: flowering time, duration of flowering, plant height, number of branches per plant, number of siliques per plant, silique length, number of seeds per silique, thousand seed weight, and oil content in seeds.

Based on the multivariate analysis of variance, a highly significant variability of the tested objects was found. Genotype-environmental interactions were confirmed in both growing seasons for all the studied traits. The assessment of genotypes in terms of all traits simultaneously showed that flowering time and the number of branches per plant greatly impacted the diversity of the studied objects. The multivariate regression analysis on the thousand seed weight showed a highly significant positive effect of the silique length and the number of siliques per plant, and a negative effect of the number of seeds per silique.

The DH lines and both generations of hybrids had a similarly wide range of variation in phenotypic traits in both years of the study. A positive heterosis effect for many hybrids was found, regardless of the generation and year of the field experiment, for such traits as plant height, silique length, and the number of seeds per silique. The heterosis effect was higher in three-way cross hybrids than in single cross hybrids. A significant relationship between the Mahalanobis distances of the studied parental lines and the heterosis effect was found only in single cross hybrids for the thousand seed weight in the second year of the field experiment.

Molecular analyzes were performed using 89 microsatellite primer pairs. 43 markers that showed polymorphism among parental lines were selected and all genotypes were tested with them. Association analysis showed 354 links with phenotypic traits and 140 with the heterosis effect. Physical mapping was performed on 15 SSR markers that showed a strong association with the features and were repeated in both years. By searching the rapeseed genomes in the vicinity of these markers, six candidate genes related to plant development were selected, which, after more detailed research, can be used in oilseed rape breeding to select genotypes for specific traits.

The results of the research presented in this doctoral dissertation have been published in three international and one nationwide journals, achieving a total impact factor (IF) of 9.512.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Agnieszka Dobrzycka, **Joanna Wolko**, Jan Bocianowski, Kamila Nowosad (2016) Phenotypic variation of yield related traits in DH lines and hybrids of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops XXXVII*: 37-52
Punktacja wg MNiSW 7 pkt

2. **Joanna Wolko**, Agnieszka Dobrzycka, Jan Bocianowski, Iwona Bartkowiak-Broda (2019) Estimation of heterosis for yield-related traits for single cross and three-way cross hybrids of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 215:156, DOI:10.1007/s10681-019-2482-6. IF₂₀₁₉ 1,614 IF_{5-letni} 2,181 Punktacja wg MNiSW 70 pkt.

3. Agnieszka Łopatyńska, Jan Bocianowski, Adrian Cyplik, **Joanna Wolko*** (2021) Multidimensional analysis of diversity in DH lines and hybrids of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Agronomy* 11: 645, DOI: 10.3390/agronomy11040645

IF₂₀₂₁ 3,949 IF_{5-letni} 4,117 Punktacja wg MeiN100 pkt *autor korespondencyjny

4. **Joanna Wolko**, Agnieszka Łopatyńska, Łukasz Wolko, Jan Bocianowski, Katarzyna Mikołajczyk, Alina Liersch (2022) Identification of SSR markers associated with yield-related traits and heterosis effect in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Agronomy* 12: 1544, DOI: 10.3390/agronomy12071544.

IF₂₀₂₁ 3,949 IF_{5-letni} 4,117 Punktacja wg MeiN 100 pkt

Łączny IF/IF_{5-letni} w/w prac wynosi 9,512/10,415 oraz 277 pkt MNiSW i MeiN (od 2021 roku). IF podano wg roku opublikowania oraz wg IF za 5 lat w bazie Journal Citation Reports.

Poznań, 14.10.2022 r.

(-) mgr Joanna Wolko

*/ przewód doktorski wszczęty do 30 kwietnia 2019 r. realizowany jest w dyscyplinie agronomia, nadanie stopnia doktora po 30 kwietnia 2019 r. następuje w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.