

## SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku

1. Tytuł zadania: **Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych**

2. Kierownik zadania: prof. dr hab. Iwona Bartkowiak-Broda

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB – Oddział w Poznaniu

Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych

tel. 61 823 37 21; e-mail: [ibart@nico.ihar.poznan.pl](mailto:ibart@nico.ihar.poznan.pl)

3. Cele zadania

- Charakterystyka molekularna kolekcji PB14-17 genotypów rzepaku ozimego IHAR-PIB, Oddz. Poznań oraz rozpoczęcie analiz genetycznych nowej kolekcji PB17-20 (Temat badawczy 1.)

- Charakterystyka fenotypowa badanych genotypów kolekcji PB14-17 oraz rozpoczęcie obserwacji fenotypowych nowej kolekcji PB17-20 IHAR-PIB, Oddz. Poznań (Temat badawczy 2.)

- Analizy asocjacyjne pomiędzy genotypem a ważnymi gospodarczo cechami ilościowymi i jakościowymi kolekcji PB14-17 (Temat badawczy 3.)

**3.1. Temat badawczy 1 Charakterystyka molekularna kolekcji genotypów rzepaku ozimego IHAR-PIB, Oddz. Poznań**

**Cel tematu badawczego 1**

Celem tego tematu było zbadanie struktury kolekcji genotypów rzepaku ozimego PB14-17 za pomocą 10 kombinacji starterów AFLP oraz markerów dla 80 loci mikrosatelitarnych, rozpoczęcie analiz genetycznych markerami AFLP i STR nowej kolekcji genotypów rzepaku PB17-20, a także charakterystyka badanych genotypów obu kolekcji z zastosowaniem zestawu markerów dla CMS, *Rfo* (typu SCAR), FAD2 (typu CAPS) i FAD3 (typu SNaPshot), jak również określenie wzorów prążkowych (fingerprinting) charakterystycznych dla genotypów kolekcji PB14-17, z wykorzystaniem wszystkich stosowanych w realizowanym projekcie analiz molekularnych (SCAR, CAPS, SNaPshot, AFLP i STR).

**Material i metody**

Materiał roślinny kolekcji PB 14-17 obejmował 6 odmian podwójnie ulepszonych rzepaku ozimego, dwa mieszańce CMS *ogura* i ich komponenty rodzicielskie, linie podwojonych haploidów (DH), linie mutantów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w oleju nasion i ich rekombinanty, linię DH o żółtej barwie nasion, a także linię rzepaku otrzymaną w wyniku resyntezy z gatunków podstawowych. Nową kolekcję PB 17-20 tworzyły: mieszaniec F1, jego formy rodzicielskie, odmiany rzepaku ozimego podwójnie ulepszonych oraz linie DH i rekombinanty o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych.

Genomowy DNA izolowano z sześciodniowych liścieni lub młodych liści rzepaku metodą ekstrakcji buforem CTAB (Doyle i Doyle 1990). Próby DNA obejmowały 25 genotypów kolekcji PB14-17 oraz 25 genotypów kolekcji PB17-20. Jakość i stężenie otrzymanych prób DNA oceniono w 0.8% żelu agarozowym wybarwianym Roti® - GelStain (Carl Roth GmbH +Co. KG Karlsruhe, Germany), a także metodą analizy spektrofotometrycznej przy długościach fal 260, 280 i 234 nm (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific ).

Obecność męsko-sterylnej cytoplazmy typu *ogura* (CMS *ogura*), genu restorera *Rfo* oraz form allelicznych genów desaturaz FAD3 i FAD2 monitorowano, odpowiednio: markerami typu SCAR

oraz metodą SNaPshot w systemie ‘multipleks fluorescencyjny’ (Mikołajczyk i in., 2011), jak również kodominującymi markerami typu CAPS. Analizy wykonano dla obydwu badanych kolekcji, 50 analiz genotypów markerami dla CMS i *Rfo*, 50 dla FAD2 i 50 dla FAD3, łącznie 150 analiz.

Do analiz markerami mikrosatelitarnymi (STR) wybrano zestaw 35 nowych loci (Li i in., 2013), innych niż analizowane w latach poprzednich 50 loci. Analizę prowadzono metodą amplifikacji PCR z zastosowaniem par specyficznych starterów w systemie ‘M13-tailing’, gdzie jeden ze starterów z każdej pary znakowano fluorescencyjnie, odpowiednio jednym z czterech znaczników. Przy pomocy markerów dla nowych loci STR analizowano genotypy kolekcji PB14-17 oraz PB17-20, łącznie 50 genotypów.

Badanie 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 analiz AFLP poddano elektroforezie w aparacie ABI PRISM 3130XL, a następnie odczytano przy użyciu oprogramowania PeakScanner1.0 i zapisano w systemie binarnym.

Zarówno podobieństwo jak i dystanse genetyczne (GS) badanych obiektów oszacowano z zastosowaniem miary Nei i Li (1979). Wyznaczone współczynniki posłużyły do hierarchicznego grupowania linii metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonych grupowań przedstawiono w formie dendrogramów. Wszystkie obliczenia wykonano z wykorzystaniem pakietu statystycznego GenStat.

## **Wyniki**

Scharakteryzowano poszczególne genotypy badanej kolekcji PB14-17 ze względu na występowanie męsko-sterylnej cytoplazmy CMS *ogura*, genu restorera *Rfo* oraz niezmutowanych (odpowiednio ‘A’ i ‘C’) i zmutowanych (‘a’ i ‘c’) alleli genów desaturazy FAD3 w genomach A i C rzepaku, a także form allelicznych genów desaturazy FAD2 w genomie A rzepaku. Wyniki genotypowania opracowano w formie ‘0/ 1’ w celu przygotowania bazy danych do wyznaczania wzorów ‘fingerprint’ dla poszczególnych genotypów. Tymi samymi markerami analizowano genotypy nowej kolekcji PB 17-20. W oparciu o analizy z zastosowaniem markerów dla 85 loci mikrosatelitarnych (STR) (50 loci badano w poprzednim roku, a kolejnych 35 nowych loci, w roku bieżącym) wyznaczono wartości podobieństw i dystansów genetycznych pomiędzy badanymi obiektami kolekcji PB14-17. Do tych analiz dołączono dwa dodatkowe genotypy: odmianę wysokoglukozynolanową Jet Neuf oraz linię podwojonych haploidów (DHER) o podwyższonej zawartości kwasu erukowego w oleju nasion. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie dendrogramu. Przeprowadzono również analizę dla kolekcji PB14-17 dla połączonej puli markerów – mikrosatelitarnych oraz AFLP wyznaczono wartości podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi obiektami, które wyrażono graficznie w formie dendrogramu. Ponadto, przeprowadzono selekcję zastosowanych dotąd markerów STR i AFLP do analiz podobieństw i dystansów genetycznych oraz analiz asocjacyjnych pod względem występowania lub nie i przypisania (‘0/ 1’) dla danego genotypu w celu utworzenia wzoru ‘fingerprint’ dla każdego badanego genotypu.

Przy użyciu zestawu 35 markerów dla nowych loci STR oraz 10 kombinacji starterów AFLP analizowano nową kolekcję PB17-20. Wartość dystansu genetycznego obliczonego za pomocą miary Nei i Li (1979), posłużyła do hierarchicznego grupowania 25 genotypów metodą średnich połączeń, które przedstawiono w formie dendrogramu.

## **Dyskusja**

Markery mikrosatelitarne stanowią dogodne narzędzie analizy genotypów, szczególnie w badaniach mapowania QTL (Piquemal i in., 2005; Delourme i in., 2006; Basunanda i in., 2010) i asocjacyjnego (Hasan i in., 2006; Basunanda i in., 2007). Ponadto, stosowane są do badań podobieństwa i zróżnicowania genetycznego w obrębie kolekcji genotypów (Hasan i in., 2008), co umożliwia badanie struktury populacji, a także optymalny dobór form rodzicielskich do dalszych krzyżowań (Zhao i in., 2007; Mikołajczyk, 2007a; Snowdon i in., 2009). Markery te są stosowane w wielu ośrodkach na świecie, stanowiąc istotne uzupełnienie nowych, wysokowydajnych metod analizy

genomu i fenomu. Ze względu na ich uniwersalny charakter, mikrosatelity umożliwiają zestawianie wyników analiz genotypów różnych populacji i kolekcji (Mikołajczyk, 2007a i b; 2008; Olejniczak i Mikołajczyk, 2013; Nurasanah i Ecke., 2016). W toku realizowanych prac otrzymano powtarzalne i jednoznaczne wyniki genotypowania w postaci produktów amplifikacji poszczególnych loci o zdefiniowanych długościach, zgodnych z danymi literaturowymi. Pomimo dynamicznego rozwoju wysokowydajnej analizy genomu z zastosowaniem metod nowej generacji, markery mikrosatelitarne są w dalszym ciągu stosowane w wielu ośrodkach, szczególnie do określania zróżnicowania genetycznego jak również do charakterystyki nowych genotypów wytworzonych na drodze resyntezy z gatunków podstawowych (Yang i in., 2016). Dotąd, w tego typu badaniach prowadzonych w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu, stosowano początkowo markery RAPD (Bartkowiak-Broda i in., 2003; Nowakowska i in., 2004; Bocianowski i in., 2014), a następnie AFLP (Liersch i in., 2016). Obecne badania mają na celu wdrożenie analiz markerami mikrosatelitarnymi i zastosowanie ich do określania struktury populacji, wzorów prążkowych genotypów rzepaku, a także badań asocjacyjnych.

Analiza zmienności genetycznej metodą AFLP stanowi istotne uzupełnienie badań markerami mikrosatelitarnymi wdrożonymi do badań w ramach realizowanego projektu. Uzyskane wyniki badań potwierdziły przydatność zastosowanych 10 kombinacji starterów AFLP ze względu na dużą liczbę markerów uzyskanych dla jednej kombinacji – 37,5 markera.

## **Wnioski**

W wyniku dotychczasowych badań z zastosowaniem markerów loci STR zdefiniowano pulę 85 loci mikrosatelitarnych dogodnych do badań podobieństwa i zróżnicowania genetycznego pomiędzy różnymi genotypami form hodowlanych rzepaku: w latach poprzednich 50, i kolejne 35 - w bieżącym. Znaczna większość tych markerów wykazywała polimorfizm w obrębie badanych genotypów i cechowała się powtarzalnością. Znajdą one zastosowanie do analiz kolejnej puli 25 nowych genotypów w nowej serii doświadczeń polowych i genetycznych. Ponadto, zostały wykorzystane do badań zróżnicowania genetycznego w obrębie badanej kolekcji genotypów rzepaku oraz analiz asocjacyjnych z cechami fenotypowymi związanymi ze strukturą plonu oraz cechami jakościowymi, wpływającymi na wartość agronomiczną poszczególnych genotypów. Jednak konieczne jest dalsze poszerzenie stosowanej puli loci STR, ponieważ zwiększa to precyzyjność i wiarygodność stosowanej metody. W dalszej realizacji projektu planowane jest zastosowanie kolejnych markerów loci STR. Jednak, oprócz markerów dotychczasowych należałoby poszerzyć zakres stosowanych technik badawczych o wysoko-przepustowe metody nowej generacji (ang. New Generation, NG), szczególnie w odniesieniu dla badań mających na celu monitorowanie cech związanych z plennością i odpornością roślin na stres.

**3.2. Charakterystyka fenotypowa badanych genotypów kolekcji PB14-17 oraz założenie nowej kolekcji PB17-20 IHAR-PIB, Oddz. Poznań**

### **Cel tematu badawczego 2**

Celem tematu była ocena zmienności fenotypowej kolekcji PB14-17 - 25 linii/odmian rzepaku w wielopowtórzeniowych doświadczeniach polowych z uwzględnieniem warunków środowiskowych (trzeci rok badań w dwóch miejscowościach w trzyletnim cyklu doświadczeń polowych – zakończenie I serii doświadczeń polowych) oraz rozmnożenie 25 nowych genotypów rzepaku ozimego w celu otrzymania nasion do założenia nowej kolekcji PB 17-20 i prowadzenie dalszych badań w II serii trzyletnich doświadczeń polowych.

### **Materiał i metody**

Materiał roślinny stanowiły dwie kolekcje: badana dotąd PB14-17 oraz nowa PB 17-20, jak w temacie badawczym 1. Doświadczenia polowe z kolekcją PB14-17 (trzeci rok badań w dwóch miejscowościach w trzyletnim cyklu doświadczeń polowych – zakończenie I serii doświadczeń polowych) prowadzono na polach doświadczalnych HR Smolice Oddział Łagiewniki i HR Strzelce Oddział w Borowie. W sezonie wegetacyjnym 2017, w okresie od końca marca do zbioru wykonano zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne zgodnie z obowiązującą metodyką. Obserwacje fenotypowe i fenologiczne obejmowały: bonitację przezimowania, obsadę roślin po zimie, pomiar zawartości

chlorofilu w liściach, oznaczenie daty początku i końca kwitnienia, pomiar wysokości roślin oraz bonitację wylegania. Ocena cech struktury plonu obejmowała: liczbę rozgałęzień, liczbę łuszczyń na roślinie, długość łuszczyń, liczbę nasion w łuszczyńce oraz masę 1000 nasion. Po zbiorze oceniono plon nasion z całych poletek (przeliczony na jednostkę  $dt \cdot ha^{-1}$ ), a w zebranych nasionach zbadano cechy biochemiczne: zawartość tłuszczu (NMR), skład kwasów tłuszczowych (chromatografia gazowa), zawartość i skład glukozydów (chromatografia gazowa), a zawartość włókna pokarmowego frakcji ADF i NDF, białka i tłuszczu metodą bliskiej podczerwieni (NIRS).

W roku 2017 utworzono kolekcję PB17-20 obejmującą 25 nowych genotypów rzepaku ozimego pochodzących z kolekcji IHAR-PIB oraz innych ośrodków hodowlanych. Materiał ten namnożono w warunkach szklarniowych i na poletkach doświadczalnych IHAR-PIB w Poznaniu w ilości pozwalającej na założenie doświadczeń w ramach II serii trzyletnich doświadczeń polowych (25 genotypów x 4 powtórzenia x 2 środowiska). Przed siewem zbadano cechy biochemiczne nasion oraz zweryfikowano genotypy z zastosowaniem odpowiednich markerów genetycznych w ramach Tematu badawczego 1. Doświadczenia polowe z 25 genotypami kolekcji PB17-20 wysiano w dwóch środowiskach, w układzie bloków kompletnie zrandomizowanych, w czterech powtórzeniach na polu doświadczalnym HR Strzelce, Oddział Borowo (29.08.2017) oraz HR Smolice Oddział Łagiewniki (28.08.2017).

W okresie przed i po siewie wykonano zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne zgodnie z metodyką prowadzenia doświadczeń polowych z rzepakiem ozimym. W doświadczeniach polowych w obu miejscowościach wykonano: ocenę punktową wschodów i stanu przed zimą w skali 1-9 na wszystkich obiektach doświadczenia, określono obsadę roślin przed zimą oraz zawartość chlorofilu w roślinach. Pomiar zawartości chlorofilu w liściach wykonano przy użyciu chlorometru N tester SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development).

## Wyniki

Wszystkie badane genotypy kolekcji PB14-17 wykazały istotne różnice pod względem plonu nasion, cech struktury plonu oraz innych cech fenotypowych. Najniżej plonowała linia PN43 o wysokiej zawartości kwasu oleinowego, a najwyższą linią PN 35 pochodząca z mieszańca Dante x Californium. Analiza chemiczna badanych linii/odmian także uwidoczniła dużą zmienność pod względem zawartości w nasionach: kwasu oleinowego (od 61,35 do 76,46%), kwasu linolowego (od 8,56 do 21,40%), kwasu linolenowego (od 7,05 do 10,90%) oraz tłuszczu od 43,42 do 46,65%. Duże zróżnicowanie badane obiekty wykazały także w zawartości sumy glukozydów (od 7,36 do 40,83  $\mu mol g^{-1}$ ) oraz glukozydów alkenowych (od 3,70 do 36,03  $\mu mol g^{-1}$ ). Analizy nasion wykonane uproszczoną metodą NIRS (bliskiej podczerwieni) potwierdziły zróżnicowanie jakościowe nasion badanych genotypów pod względem zawartości białka i włókna (ADF, NDF). Zawartość włókna wahała się od 19,20% (NDF) i 12,88% (ADF) dla genotypu o żółtej barwie nasion PN 36 – Z114 do 26,76% (NDF) i 21,50% (ADF) dla genotypu o czarnej barwie nasion PN 32 – odmiana Brendy. Zawartość białka wahała się od 22,29% dla PN 33- odmiana Starter do 24,85% dla PN 48- linia o wysokiej zawartości kwasu oleinowego

Wykonana przed siewem ocena biochemiczna nasion siewnych rzepaku 25 badanych obiektów z nowej kolekcji PB17-20, wykazała ich zróżnicowanie pod względem: procentowej zawartości tłuszczu w nasionach w zakresie od 33,4 do 49,0%, zawartości włókna NDF od 16,4 do 28,4%, zawartości włókna ADF od 10,3 do 23,4% oraz zawartości białka ogólnego w zakresie od 18,1 do 28,7%. Analiza chemiczna składu kwasów tłuszczowych nasion uwidoczniła również dużą zmienność badanych obiektów pod względem zawartości: kwasu oleinowego (od 52,3 do 81,2%), kwasu linolowego (od 7,3 do 26,9%), kwasu linolenowego (od 2,3 do 13,8%). Duże zróżnicowanie badane obiekty wykazały także pod względem zawartości sumy glukozydów (od 4,4 do 20,3  $\mu mol g^{-1}$ ) oraz glukozydów alkenowych (od 1,7 do 17,6  $\mu mol g^{-1}$ ).

Wykonana w doświadczeniach polowych w obu miejscowościach ocena stanu roślin (kolekcja PN 17-20) przed zimą na wszystkich obiektach doświadczenia wykazała statystycznie wysokie istotnie ich zróżnicowanie. Istotne zróżnicowanie obiektów stwierdzono w obsadzie roślin na poletkach doświadczalnych oraz w zawartości chlorofilu w liściach badanych obiektów, która kształtowała się w zakresie od 40,25 do 49,70 Jedn. SPAD.

## Dyskusja

W badanych doświadczeniach polowych stwierdzono istotne zróżnicowanie 25 genotypów kolekcji PB14-17 pod względem większości obserwowanych cech. Plon nasion, początek kwitnienia oraz skład chemiczny nasion był determinowany przez genotyp, a także modyfikowany przez warunki środowiskowe. Bocianowski i in. (2009), Nowosad i in. (2016), Wójtowicz i Muśnicki (2001) uzyskali podobne wyniki w doświadczeniach polowych dla kilku środowisk podkreślając, że plon nasion zależy od uwarunkowanego genetycznie potencjału plonotwórczego danego genotypu, od jego reakcji na warunki środowiskowe i stanowi wypadkową wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi elementami plonotwórczymi. W przeprowadzonej analizie cech struktury plonu istotne zróżnicowanie w obu środowiskach obserwowano dla masy tysiąca nasion, liczby rozgałęzień oraz liczby nasion w łuszczyńce, natomiast nie stwierdzono istotnej zmienności dla liczby łuszczyń na roślinie. O znaczącym oddziaływaniu warunków środowiska na te cechy wspominają Szała (2012) w badaniach dwóch populacji linii DH, Radoyev i in. (2008) oraz Marjanović-Jeromela i in. (2007).

Obok plonu i cech struktury plonu w nasionach zebranych w obu środowiskach oceniono zawartość tłuszczu, glukozyolanów, białka, włókna oraz skład kwasów tłuszczowych. Wszystkie badane cechy jakościowe nasion wykazywały istotne różnice i w różnym stopniu były uzależnione od warunków środowiskowych. Nowosad i in. (2017) w badaniach 25 genotypów rzepaku ozimego wykazali istotną interakcję genotypu ze środowiskiem odnośnie zawartości tłuszczu w nasionach. Liersch i in. (2004) oraz Wójtowicz i Jajor (2006) w pracach nad rzepakiem ozimym wykazali, że zawartość tłuszczu w nasionach, poszczególnych kwasów tłuszczowych oraz glukozyolanów w różnym stopniu jest uzależniona od warunków środowiskowych. Istotną interakcję genotypu ze środowiskiem dla składu chemicznego nasion kilku odmian populacyjnych i mieszańcowych rzepaku ozimego wykazała także Liersch i in. (2013). Przebieg warunków atmosferycznych w sezonie wegetacyjnym 2016/2017 był zróżnicowany i mógł w dużym stopniu wpłynąć na wzrost, rozwój, plonowanie oraz skład chemiczny nasion po zbiorze. Cechy takie jak skład kwasów tłuszczowych, zawartość tłuszczu i glukozyolanów są modyfikowane przez zmienne warunki środowiska w okresie dojrzewania nasion (Friedt i Snowdon 2009, Liersch i in. 2013, Spasibionek 2013).

## Wnioski

Badane w sześciu środowiskach linie/odmiany rzepaku ozimego wchodzące w skład populacji PB14-17 w badanych środowiskach wykazały istotne zróżnicowanie pod względem większości ocenianych cech, co uprawnia do wykorzystania tych materiałów do wykonania analiz asocjacyjnych z markerami molekularnymi.

### 3. 3. Temat badawczy 3. Analizy asocjacyjne pomiędzy genotypem a ważnymi gospodarczo cechami ilościowymi i jakościowymi kolekcji PB14-17.

#### Cel tematu badawczego 2

Celem tematu było poszukiwanie związku pomiędzy genotypem a ważnymi gospodarczo cechami fenotypowymi rzepaku ozimego.

#### Material i metody

Analizy asocjacyjne pomiędzy 10 cechami ilościowymi (plon nasion, procent tłuszczu, kwasy: C18:1, C18:2, C18:3; suma glukozyolanów, glukozyolany alkenowe, procent białka, ADF i NDF) (Tab. 17) kolekcji 25 genotypów rzepaku ozimego PB14-17, a 685 markerami [2 markery typu SCAR –CMS i Rfo; 2 markery CAPS dla FAD2-HOR3 i HOR 4, 4 markery typu SNAPshot dla FAD3, 10 kombinacji starterów AFLP oraz 80 loci STR - łącznie **98** różnych analiz molekularnych] były estymowane z użyciem analizy regresji. Obserwacje markerów molekularnych były traktowane jako zmienne niezależne i rozpatrywane w osobnych modelach. Analizy asocjacyjne wykonano niezależnie dla wyników doświadczeń przeprowadzonych w Borowie i Łagiewnikach w latach 2015, 2016 i 2017 oraz dla średniej z wymienionych sześciu środowisk. Wszystkie analizy wykonano z zastosowaniem pakietu GenStat 17.

#### Wyniki

W sumie zaobserwowano 3132 asocjacje z przynajmniej jedną cechą w przynajmniej jednym środowisku. Dla każdej z cech opracowano wyniki gdy procent zmienności badanej cechy wyjaśnianej przez dany marker wynosił powyżej 20% i gdy marker ten występował przynajmniej w trzech środowiskach. Markery determinujące poszczególne cechy na poziomie istotności 0,05 scharakteryzowano pięcioma parametrami: wartością estymatora, błędem standardowym tej oceny, wartością statystyki testowej  $t$ , wartością prawdopodobieństwa popełnienia błędu pierwszego rodzaju oraz procentem zmienności badanej cechy wyjaśnianej przez dany marker.

Procent całkowitej zmienności fenotypowej dla: plonu nasion wyjaśnianej przez poszczególne markery wynosił od 22,4 do 36,1%, procentowej zawartości tłuszczu w nasionach – od 20,9 do 42,9%, zawartości kwasu oleinowego C18:1 – od 22,0 do 30,5%, kwasu linolowego C18:2 – od 22,1 do 39,6%, kwasu linolenowego C18:3 – od 23,1 do 35,7%, sumy glukozyolanów – od 23,5 do 36,7%, glukozyolanów alkenowych – od 22,7 do 35,3%, białka – od 20,1 do 35,3% natomiast dla włókna ADF – od 29,8 do 73,2% i NDF – od 25,5 do 71,2%. Analizując plon nasion stwierdzono, że genotypy wyżej plonujące były związane z 12 markerami. Sześć markerów było związanych z wyższą zawartością tłuszczu w nasionach. Dla najważniejszych nienasyconych kwasów tłuszczowych: oleinowego C18:1 – siedem markerów było związanych z wyższą zawartością tego kwasu; dla linolowego C18:2 genotypy nie posiadające markerów charakteryzowały się niższą zawartością kwasu linolowego (wartość ujemna estymatora); a dla linolenowego C18:3 – 9 markerów związanych było z niższą zawartością tego kwasu w oleju nasion (ujemna wartość estymatora). Dziewięć markerów było związanych z zawartością glukozyolanów w nasionach rzepaku ozimego, a osiem z zawartością glukozyolanów alkenowych. Trzy markery były związane z wyższą zawartością białka w nasionach, natomiast w przypadku włókna 13 markerów wiązało się z wyższą zawartością włókna ADF, a 16 markerów molekularnych wskazywało na wyższą zawartość włókna NDF.

## Dyskusja

Wyniki uzyskane w doświadczeniach polowych w sześciu środowiskach wskazują na istotne zróżnicowanie kolekcji genotypów PB 14-17 pod względem większości badanych cech. Tak istotne zróżnicowanie materiału roślinnego pozwoliło na przeprowadzenie badań związku markerów molekularnych w wybranych cechami fenotypowymi.

Współczesna hodowla roślin obok klasycznych metod hodowli stosuje selekcję z wykorzystaniem różnych typów markerów molekularnych – MAS (ang. *marker assisted selection*). Lande i Thompson (1990) wykazali, że skuteczność selekcji w oparciu o MAS jest wyższa w porównaniu z klasycznymi metodami opartymi na selekcji fenotypowej, zwłaszcza dla cech o niskim poziomie odziedziczalności. Snowdon i Friedt (2004) potwierdzili możliwość zastosowania markerów molekularnych w hodowli rzepaku. Bocianowski i in. (2011) oraz Liersch i in. (2012) selekcjonowali markery molekularne typu RAPD i AFLP dla takich cech jak wczesność i długość kwitnienia rzepaku ozimego oraz innych cech fenotypowych linii rodzicielskich mieszańców CMS *ogura*. W badaniach 25 genotypów rzepaku w aktualnie realizowanym projekcie uzyskano markery AFLP i SSR związane z plonowaniem, przy czym 12 z nich związane było ze wzrostem wartości tej cechy, a 5 z jej obniżeniem. Bocianowski i in. (2011) w badaniach linii rodzicielskich mieszańców CMS *ogura* spośród 597 różnego typu markerów (izoenzymy, RAPD i AFLP) wyselekcjonował markery typu RAPD i AFLP związane z takimi cechami jak plon nasion i zawartość sumy glukozyolanów. W obecnie prowadzonych badaniach szczególną wartość obok związku z plonem nasion będą miały markery związane ze składem chemicznym nasion, cechami takimi jak wysoka zawartość tłuszczu, kwasu oleinowego, białka przy jednoczesnym obniżeniu zawartości związków antyżywnościowych takich jak glukozyolany alkenowe, suma glukozyolanów oraz włókno. Badania nad poszukiwaniem loci cech ilościowych oraz związków markerów molekularnych z cechami fenotypowymi jest realizowana w wielu ośrodkach badawczych nad rzepakiem w świecie (Delourme i in. 2006; Javidfar i in. 2006; Cheng i in. 2009; Wang i in. 2012).

## Wnioski

Wyniki badań uzyskane dla kolekcji genotypów PB14-17 w sześciu środowiskach (2 miejscowości x 3 lata) pozwoliły na wyselekcjonowanie markerów związanych z plonem nasion oraz najważniejszymi cechami jakościowymi nasion. Wybrane markery zostaną w pierwszej kolejności użyte do analiz nowej kolekcji genotypów PB 17-20 badanych w kolejnych sezonach wegetacyjnych, a następnie do charakterystyki kolekcji hodowlanych rzepaku ozimego.

