

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii

Dziedzina: Nauki Rolnicze

Dyscyplina naukowa: Rolnictwo i Ogrodnictwo

Justyna Szwarc

**IDENTYFIKACJA GENOTYPÓW Z PODWYŻSZONĄ ODPORNOŚCIĄ
NA WYBRANE SZKODNIKI I SUCHĄ ZGNILIZNĘ KAPUSTNYCH U
MIESZAŃCÓW ODDALONYCH Z RODZINY *BRASSICACEAE***

Identification of genotypes with increased resistance to selected pests and blackleg disease
within interspecific hybrids from the *Brassicaceae* family

Praca doktorska wykonana w Katedrze Genetyki
i Hodowli Roślin pod kierunkiem
Prof. UPP dr hab. Janetty Niemann

Uzyskane i przedstawione w pracy wyniki stanowią część projektów naukowych wykonywanych w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, finansowanych ze środków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, realizowanych pod kierownictwem Prof. UPP dr hab. Janetty Niemann:

- 1. Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterylności z pokrewnych gatunków rodzaju *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* L.).**
- 2. Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi odporność na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria* spp.) z wykorzystaniem zaawansowanych technik molekularnych.**

Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Niniejszą rozprawę doktorską przygotowano na podstawie cyklu czterech publikacji:

1. Niemann, J., **Szwarc, J.**, Bocianowski, J., Weigt, D., Mrówczyński, M. (2020). In-Field Screening for Host Plant Resistance to *Delia Radicum* and *Brevicoryne Brassicae* within Selected Rapeseed Cultivars and New Interspecific Hybrids. *Open Life Sciences*, 15(1), 711-720.

IF_{5-letni} = 1,293, IF₂₀₂₀ = 0,938, MNiSW = 40

Zakres badań wykonany przez doktorantkę: udział w tworzeniu koncepcji i hipotezy badawczej, udział w prowadzeniu analiz, opracowanie wyników, udział w przygotowaniu pierwotnej i ostatecznej wersji publikacji. Wkład w pracę: 45%.

2. **Szwarc, J.**, Niemann, J., Bocianowski, J., Jakubus, M., Mrówczyński, M. (2021). Connection between Nutrient Content and Resistance to Selected Pests Analyzed in *Brassicaceae* Hybrids. *Agriculture*, 11(2), 94.

IF_{5-letni} = 3,459, IF₂₀₂₁ = 3,408, MNiSW = 100

Zakres badań wykonany przez doktorantkę: udział w tworzeniu koncepcji i hipotezy badawczej, udział w prowadzeniu analiz, opracowanie wyników, przygotowanie pierwotnej i ostatecznej wersji publikacji. Wkład w pracę: 50%.

3. **Szwarc, J.**, Niemann, J., Kaczmarek, J., Bocianowski, J., & Weigt, D. (2022). Genetic Relationship of *Brassicaceae* Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(9), 4290–4302.

IF_{5-letni} = 3,139, IF₂₀₂₂ = 2,976, MNiSW = 70

Zakres badań wykonany przez doktorantkę: udział w tworzeniu koncepcji i hipotezy badawczej, zaplanowanie i przeprowadzenie analiz molekularnych, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie pierwotnej i ostatecznej wersji publikacji. Wkład w pracę: 50%

4. **Szwarc, J.**, Niemann, J., Bocianowski, J., Kaczmarek, J., Doğu, M. Z., & Nowicka, A. (2023). Improving the Selection Efficiency of Breeding Material within Interspecific *Brassicaceae* Hybrids with Genomic Prediction and Phenotyping. *Agriculture*, 13(5), 962.

IF_{5-letni} = 3,459, IF₂₀₂₃ = 3,408, MNiSW = 100

Zakres badań wykonany przez doktorantkę: stworzenie koncepcji i ustalenie hipotezy badawczej, zaplanowanie i przeprowadzenie analiz molekularnych i polowych, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie pierwotnej i ostatecznej wersji publikacji. Wkład w pracę: 55%

Łącznie dla cyklu publikacji wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej:

Sumaryczny pięcioletni Impact Factor prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 11,35

Suma punktów MNiSW prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 310

Najserdeczniejsze podziękowania składam

*Promotorce mojej pracy, za przekazaną wiedzę,
nieocenioną pomoc w rozwoju naukowym, oraz poświęcony czas*

Współautorom publikacji, za ich wkład w powstanie tej pracy

*Pracownikom Katedry Genetyki i Hodowli
Roślin, za cenne rady i życzliwość*

*Mojej rodzinie, za możliwość nauki
i nieustanne wsparcie przez wszystkie lata*

Spis treści

1. Streszczenie	7
2. Summary	9
3. Wprowadzenie	11
3.1. Podstawowe informacje o rodzinie <i>Brassicaceae</i> i rzepaku	11
3.2. Zagrożenia w uprawie rzepaku.....	12
3.2.1. Sucha zgnilizna kapustnych.....	12
3.2.2. Mszyca kapuściana i śmietka kapuściana	14
3.3. Hodowla odpornościowa i wykorzystanie mieszańców oddalonych <i>Brassicaceae</i>	15
3.4. Selekcja otrzymanych potomstw mieszańcowych	17
4. Hipotezy badawcze i cel pracy	20
5. Materiały i metody badawcze	21
5.1. Materiał badawczy	21
5.2. Oceny fenotypowe	24
5.2.1. Schemat doświadczeń polowych	24
5.2.2. Fenotypowa ocena odporności na owady.....	24
5.2.3. Ocena zawartości składników mineralnych	25
5.2.4. Fenotypowa ocena odporności na suchą zgniliznę kapustnych.....	26
5.2.5. Polowa ocena wybranych cech morfologicznych.....	26
5.3. Analizy molekularne.....	27
5.3.1. Izolacja materiału genetycznego.....	27
5.3.2. Molekularna ocena pokrewieństwa genetycznego.....	27
5.3.3. Molekularna identyfikacja odporności na <i>L. maculans</i>	29
6. Wyniki	32
6.1. Fenotypowa ocena odporności na owady	32
6.2. Ocena zawartości składników mineralnych	33
6.3. Fenotypowa ocena odporności na suchą zgniliznę kapustnych	33
6.4. Polowa ocena wybranych cech morfologicznych	34
6.5. Molekularna ocena pokrewieństwa genetycznego	35
6.6. Molekularna identyfikacja odporności na <i>L. maculans</i>	36
7. Dyskusja	39
8. Wnioski	47
9. Spis literatury	48

10. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	67
10.1. In-Field Screening for Host Plant Resistance to <i>Delia Radicum</i> and <i>Brevicoryne Brassicae</i> within Selected Rapeseed Cultivars and New Interspecific Hybrids.....	68
10.2. Connection between Nutrient Content and Resistance to Selected Pests Analyzed in <i>Brassicaceae</i> Hybrids.....	79
10.3. Genetic Relationship of <i>Brassicaceae</i> Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers	97
10.4. Improving the Selection Efficiency of Breeding Material within Interspecific <i>Brassicaceae</i> Hybrids with Genomic Prediction and Phenotyping	111

1. Streszczenie

Rzepak (*Brassica napus* L.) jest jedną z najważniejszych roślin oleistych na świecie. Jego wąską pulę genową można wzbogacić poprzez krzyżowanie z dzikimi i uprawnymi gatunkami z rodziny *Brassicaceae*. Międzygatunkowe mieszańce mogą być źródłem odporności na stropy biotyczne, w tym odporności na szkodliwe owady i choroby.

Podstawowym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie stopnia odporności wybranych mieszańców oddalonych *Brassicaceae* na śmietkę kapuścianą (*Delia radicum*), mszycę kapuścianą (*Brevicoryne brassicae*) oraz suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria* spp.), a także identyfikacja najbardziej odpornych potomstw mieszańcowych, które mogą zostać włączone w dalsze procesy hodowlane. Cele poboczne obejmowały ustalenie zróżnicowania genetycznego genotypów, określenie przydatności wybranych markerów molekularnych do selekcji/identyfikacji genotypów i ustalenie związku pomiędzy zawartością składników mineralnych w roślinach a ich odpornością na owady.

Materiał badawczy stanowiły 32 potomstwa międzygatunkowych mieszańców pokoleń F₅-F₁₀, 55 odmian *B. napus* oraz 15 gatunków *Brassicaceae*. Aby osiągnąć zamierzone cele prowadzono zarówno oceny fenotypowe w warunkach polowych, jak i analizy laboratoryjne. W wyniku zrealizowanych badań potwierdzono, iż mieszańce oddalone posiadają podwyższoną odporność na *D. radicum* i *B. brassicae*, która w przypadku niektórych genotypów jest stabilna na przestrzeni lat. Wykazano również związek między obserwowanym poziomem odporności na wspomniane owady, a zawartością wapnia i miedzi w tkankach roślinnych. Kontynuacja analiz fenotypowych umożliwiła ponadto selekcję kilkunastu mieszańców oddalonych o najwyższej odporności na suchą zgniliznę kapustnych. Analizy molekularne z użyciem markerów SSR pozwoliły na wyznaczenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy genotypami mieszańcowymi i gatunkami *Brassicaceae*, potwierdzając ich wysoki poziom zróżnicowania genetycznego. Wspomniane markery zostały również skorelowane z badanymi w warunkach polowych cechami morfologicznymi, co umożliwiło selekcję kilku markerów związanych z kolorem pędów i kwiatów roślin kapustnych. W ostatnim etapie badań określano przydatność markerów molekularnych związanych z rejonami genomu odpowiadającymi za odporność na *L. maculans*. W przypadku niektórych markerów potwierdzono ich użyteczność w badaniu międzygatunkowych mieszańców o zróżnicowanej strukturze genomowej.

W toku prowadzonych badań udało się zrealizować wszystkie założone cele. Spośród analizowanych międzygatunkowych potomstw mieszańcowych wyselekcjonowano genotypy o podwyższonej odporności na *D. radicum*, *B. brassicae* oraz *Leptosphaeria* spp. Ponadto, wytypowano najcenniejszą kombinację *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649096, która niosła stabilną i jednocześnie wysoką odporność na śmietkę kapuścianą, mszycę kapuścianą oraz suchą zgniliznę kapustnych. Wykazano również przydatność technik molekularnych i polowych do identyfikacji cech związanych z morfologią oraz odpornością na analizowane szkodniki i suchą zgniliznę kapustnych, a także scharakteryzowano związek pomiędzy genetyczną odpornością i odżywieniem roślin.

2. Summary

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is one of the most important oilseed crops in the world. Its narrow gene pool can be enriched by crossing with wild and cultivated species of the *Brassicaceae* family. Interspecific hybrids can provide resistance to biotic stresses, including resistance to harmful insects and diseases.

The primary aim of this study was to determine the degree of resistance of selected interspecific *Brassicaceae* hybrids to root fly (*D. radicum*), cabbage aphid (*B. brassicae*) and blackleg (*Leptosphaeria* spp.), and to identify the most resistant lines that can be incorporated into further breeding programs. Secondary objectives included investigation of the genetic diversity of the genotypes, determining the suitability of selected molecular markers for selection/identification of genotypes and establishing the relationship between plants nutrients content and insect resistance.

The study material consisted of 32 interspecific hybrids progeny of F₅-F₁₀ generations, 55 varieties of *B. napus* and 15 species of *Brassicaceae*. To achieve the objectives, both phenotype evaluations in field conditions and laboratory analyses were conducted. As a result of the studies, it was confirmed that interspecific hybrids have an increased resistance to both harmful insects, which for some genotypes is stable over the years. A relationship between the observed level of resistance to *D. radicum* and *B. brassicae* and the calcium and copper content in plant tissues was also demonstrated. Moreover, phenotypic analyses made it possible to select interspecific hybrids with the highest resistance to blackleg. Molecular analyses with the use of SSR markers allowed the determination of genetic relationship between hybrid genotypes and *Brassicaceae* species, confirming their high level of genetic diversity. The SSR markers were also correlated with morphological traits studied in field conditions, allowing the selection of several markers linked to stem and flower color of *Brassicaceae* plants. Finally, the usefulness of different molecular markers associated with regions of the genome connected to *L. maculans* resistance was determined. For some markers, the usefulness was proven for the study of interspecific hybrids with different genomic structure.

In the course of the study, all the research objectives were fulfilled. Among the analysed interspecific hybrid lines, genotypes with increased resistance to *D. radicum*, *B. brassicae* and *Leptosphaeria* spp. were selected. In addition, the most valuable line *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649096 which carried stable high resistance to the root fly, cabbage

aphid and the disease was identified. The usefulness of molecular and field techniques for identifying selected plant traits connected to the resistance to analyzed insects and blackleg was also demonstrated, and the relationship between genetic resistance and plant nutrition was characterised.

3. Wprowadzenie

3.1. Podstawowe informacje o rodzinie *Brassicaceae* i rzepaku

Rodzina *Brassicaceae* jest jedną z największych rodzin wśród roślin okrytonasiennych, liczy ponad 3700 gatunków jednorocznych, dwuletних i bylin rozproszonych w zróżnicowanych rejonach geograficznych (Hasanuzzaman, 2020). Wśród przedstawicieli tej rodziny można znaleźć gatunki o szerokim zastosowaniu gospodarczym, wykorzystywane między innymi jako źródło pożywienia dla ludzi i zwierząt, komponenty do przemysłu, a także w medycynie (Al-Shehbaz, 2011).

Gatunki z rodziny *Brassicaceae* są przedmiotem wielu badań ewolucyjnych i taksonomicznych (Haider, 2013), a na szczególną uwagę zasługują gatunki ujęte w tzw. Trójkącie U (U, 1935). Koreański badacz przedstawił związek pomiędzy sześcioma gatunkami rodzaju *Brassica*: diploidalne gatunki *B. rapa* (AA, n=10), *B. oleracea* (CC, n=9), oraz *B. nigra* (BB, n=8) uległy spontanicznej międzygatunkowej hybrydyzacji dając początek allotetraploidalnym roślinom *B. napus* (AACC, n=19), *B. carinata* (BBCC, n=17) i *B. juncea* (AABB, n=18). Prócz tych znanych i docenianych za wysoką wartość użytkową i agronomiczną gatunków, warto wspomnieć o innych przedstawicielach rodziny, takich jak np. *Arabidopsis thaliana*, która jest rośliną modelową szeroko wykorzystywaną w badaniach genomowych (Meinke i in., 1998), czy *Sinapis alba* – wykorzystywanej m.in. w kosmetyce i do produkcji biopaliw (Mitrović i in., 2020).

Jeden z najbardziej znanych przedstawicieli swojej rodziny, rzepak (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg.), jest jak wspomniano amfidiploidalną rośliną uprawną, powstałą ze skrzyżowania *B. rapa* i *B. oleracea* najprawdopodobniej 5000-7000 lat temu w rejonie Azji, choć nadal istnieje wiele wątpliwości co do miejsca pochodzenia (Chalhoub i in., 2014; Gupta i Pratap, 2007). Według danych USDA, rzepak jest trzecim największym źródłem oleju roślinnego na świecie po soi i palmie olejowej – światowa produkcja tego surowca w sezonie 2022/2023 wynosiła ponad 32 mln ton.

Unia Europejska plasuje się na pierwszym miejscu na świecie pod względem wielkości rocznej produkcji rzepaku, przy czym w Polsce produkcja nasion sięga 3,6 mln ton (wraz z rzepikiem, według danych GUS za 2022). Rzepak jest w naszym kraju podstawową rośliną oleistą. Zdecydowana większość upraw *B. napus* w Polsce to uprawy ozime, co jest związane z większym potencjałem plonowania w porównaniu do form jarych. Dominacja

upraw ozimych przekłada się na ilość zarejestrowanych odmian rzepaku: obecnie na liście odmian roślin rolniczych wpisanych do Krajowego Rejestru w Polsce znajduje się 12 odmian rzepaku jarego i 150 odmian rzepaku ozimego.

3.2. Zagrożenia w uprawie rzepaku

Rzepak jest porażany przez choroby i szkodniki w ciągu całego sezonu wegetacyjnego, co jest przyczyną zróżnicowanych strat w plonie. Według Mrówczyńskiego i in. (Mrówczyński i in., 2009) do chorób rzepaku stanowiących duże zagrożenie dla jego uprawy zaliczamy m.in. suchą zgniliznę kapustnych, zgniliznę twardzikową, czerń krzyżowych, szarą pleśń, zgorzele siewek, kiłę kapusty i werticiliozę. Istotnymi w uprawie szkodnikami są z kolei mszyca kapuściana, śmietka kapuściana, słodyszek rzepakowiec, oraz chowacz podobnik (Bruck i in., 2005; Pereira i in., 2019; Zamojska i Węgorek, 2014).

3.2.1. Sucha zgnilizna kapustnych

Sprawcą suchej zgnilizny kapustnych są należące do typu Ascomycota gatunki *Leptosphaeria maculans* i *Leptosphaeria biglobosa*, choć różnią się one patogenicznością i agresywnością wobec gospodarza (Jacques i in., 2021; Wijayawardene i in., 2018). Niegdyś klasyfikowano oba te gatunki jako *Leptosphaeria maculans* (odpowiednio: typ A/Tox⁺ i typ B/Tox⁰), jednak różnice morfologiczne umożliwiły ostateczne rozdzielenie na dwa odrębne gatunki (Shoemaker i Brun, 2001). Są one zdolne to porażania nie tylko rzepaku, ale też wielu roślin z rodziny *Brassicaceae* (Li i in., 2005). *L. maculans* jest gatunkiem o większej agresywności i odpowiedzialnym za większe straty plonu rzepaku niż *L. biglobosa* (Gwiazdowski, 2008). W warunkach kontrolowanych izolaty *L. maculans* mimo wolnego wzrostu zarodnikują obficie i są zdolne do wytwarzania fitotoksycznej simodesminy, która jest jednym z czynników wskazujących na agresywność patogena (Koch i in., 1989). Jednak mimo powszechnego traktowania *L. biglobosa* jako mniej wirulentnego, obserwacje polowe przeprowadzone w Chinach, wskazują, że patogen ten może również powodować znaczne uszkodzenia roślin (Cai i in., 2018).

Co więcej, zainteresowanie światowych hodowców i badaczy gatunkiem *L. maculans* jako głównym sprawcą suchej zgnilizny kapustnych, przyniosło w ostatnich latach nieoczekiwane skutki, gdyż obserwuje się obecnie wzrost znaczenia *L. biglobosa* w rejonach europejskich (Huang i in., 2022). Gatunek ten może powodować znaczne szkody nie tylko w warunkach ekośrodowiskowych Wielkiej Brytanii, gdzie częstość jego izolacji na

uszkodzeniach podstaw łądygi wzrosła od 14% do 95% w latach 2000-2013, ale też w Polsce, gdzie ciepłe i wilgotne okresy jesienne sprzyjają rozwojowi choroby (Brachaczek i in., 2021).

Globalne straty będące skutkiem destrukcyjnego działania gatunków z rodzaju *Leptosphaeria* w rzepaku szacuje się na ponad 900-1200 mln USD rocznie (Fitt i in., 2008; Zhang i in., 2014). Duże straty w plonie obserwuje się w Europie, Australii i Ameryce Północnej, z kolei w skali krajowej procent porażonych roślin może lokalnie sięgać nawet 55% (Walczak i in., 2014).

Zwalczanie suchej zgnilizny opiera się na stosowaniu fungicydów, uprawianiu odmian odpornych, usuwaniu resztek poźniwnych i utrzymywaniu wysokiego poziomu agrotechniki (Dawidziuk i in., 2012; Kutcher i in., 2011). Możliwe jest również wykorzystanie ochrony biologicznej w walce z patogenami. Aplikacja substancji chemicznych do ograniczania występowania sprawcy choroby jest częstym wyborem hodowców rzepaku, jednak pojawiają się doniesienia na temat uodparniania się *L. maculans* na działanie fungicydów (Wouw i in., 2017, 2021). Biorąc pod uwagę istotne zagrożenie wykształcenia odporności na substancje aktywne, stosowanie odmian odpornych wydaje się być najbezpieczniejszą i przyjazną środowisku metodą walki z suchą zgnilizną kapustnych.

Wyróżniamy dwa typy odporności na *L. maculans* – odporność pionową i poziomą, niewiele wiadomo jednak na temat mechanizmów odporności na *L. biglobosa*. Odporność pionowa występuje u młodych roślin i jest regulowana przez pojedyncze, rasowo-specyficzne geny główne (Neik i in., 2017). Działanie tego typu odporności wymaga rozpoznania molekularnego między genem odporności (*R*) w roślinie, a genami awirulencji patogenu (*Avr*). Dotychczas opisano w literaturze ponad dwadzieścia głównych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych w genomach gatunków *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea* i *B. nigra*: *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm5*, *Rlm6*, *Rlm7*, *Rlm8*, *Rlm9*, *Rlm10*, *Rlm11*, *Rlm12*, *Rlm13*, *LepR1*, *LepR2*, *LepR3*, *LepR4*, *LepR5*, *LepR6*, *BLMR1*, *BLMR2*, *RlmSTEE98* oraz *RlmS* (Amas i in., 2022; Thomas i in., 2022). Niektóre z zidentyfikowanych rejonów odporności są jednak formami allelicznymi tego samego genu, tak jak w przypadku genów *Rlm4* oraz *Rlm7* (Haddadi i in., 2022). Spośród rozpoznanych genów tylko pięć zostało sklonowanych: *Rlm2*, *Rlm4*, *Rlm7*, *Rlm9* oraz *LepR3* (Cantila i in., 2023). W odporność poziomą zaangażowane jest wiele genów, często zgrupowanych w rejonach QTL (*Quantitative Trait Loci* – loci cech ilościowych), przy czym ten rodzaj odporności występuje u roślin dorosłych, zwykle po wernalizacji. Lokalizacja i mechanizmy działania rejonów związanych z odpornością poligeniczną są nadal słabo

rozpoznane (Amas i in., 2021). W przeciwieństwie do odporności pionowej, która zapewnia całkowite zabezpieczenie poprzez zapobieganie kolonizacji przez patogen, odporność pozioma ma jedynie charakter częściowy i polega na ograniczaniu obszarów porażenia (Jestin i in., 2015). Chociaż odporność opierająca się na pojedynczych genach gwarantuje kompletną ochronę, to nie jest to odporność trwała. Wynika to z wcześniej wspomnianej interakcji między genami *R* oraz *Avr* – pojedyncze geny są specyficzne dla danego izolatu, co wywołuje silną presję selekcyjną, a więc dostosowanie się patogenu i namnażanie bardziej wirulentnych form (McDonald i Linde, 2002). W związku z powyższym, najskuteczniejszym sposobem wprowadzania odporności na suchą zgniliznę kapustnych jest piramidyzacja genów *R* oraz genów ilościowych, co zapewnia trwałą i kompleksową ochronę (Amas i in., 2021). Co więcej, wykazano iż odporność wielogenowa może zwiększać trwałość odporności jednogenowej (Brun i in., 2010). Ten fakt dodatkowo umacnia zasadność korzystania ze zróżnicowanych źródeł odporności w ograniczaniu występowania suchej zgnilizny kapustnych.

3.2.2. Mszyca kapuściana i śmietka kapuściana

Szkodliwe owady są kolejnym, prócz sprawców chorób, istotnym czynnikiem mogącym wpływać na występowanie strat w plonie. Jak wspomniano wcześniej, ważnymi z punktu widzenia gospodarczego agrofagami są mszyca kapuściana oraz śmietka kapuściana.

Mszyca kapuściana (*Brevicoryne brassicae* L.) to owad należący do rzędu Homoptera, rodziny Aphididae. Ten wyspecjalizowany gatunek jest szkodnikiem w uprawach wielu roślin *Brassicaceae*, żywi się przede wszystkim młodymi tkankami roślinnymi, liśćmi i pąkami kwiatowym. Ponadto, szkodniki należące do tego gatunku mogą być wektorem chorób wirusowych (Costello i Altieri, 1995; Ellis i in., 1996). Częstym wyborem w zwalczaniu mszycy kapuścianej jest deltametryna, związek z grupy syntetycznych pyretroidów, którego pozostałości w spożywanych produktach mają negatywny wpływ na zdrowie człowieka (Lu i in., 2019). Alternatywne sposoby ochrony przed *B. brassicae* mogą obejmować wykorzystanie wyciągów roślinnych. Przykładem może być wykorzystanie ekstraktu z agawy (*Agave americana*), którego aplikacja w warunkach polowych istotnie wpływa na zwiększenie śmiertelności mszyc (Pereira i in., 2019).

Kolejnym szkodnikiem rzepaku o znaczeniu gospodarczym jest śmietka kapuściana (*Delia radicum* L.), gatunek przynależny do rzędu Diptera, rodziny Anthomyiidae. Może stwarzać zagrożenie zarówno dla dzikich jak i uprawnych roślin *Brassicaceae*, żerując na tkankach u podstawy łodygi i w pobliżu korzeni (Dam i Raaijmakers, 2006). Wybór rośliny-

gospodarza przez ten gatunek opiera się na czynnikach chemicznych, takich jak np. zawartość glukozyzolanów oraz czynnikach bazujących na morfologii takich jak kształt, kolor i struktura liści (Stadler i in., 2002). Ochrona upraw przed *D. radicum* polega w głównej mierze na stosowaniu insektycydów, a do niedawna jedną z podstawowych substancji aktywnych był chlorpyrifos, który decyzją Komisji Europejskiej został wycofany z obrotu w 2019 ze względu na wysoką szkodliwość dla ludzi (EFSA, 2019). Bezpiecznymi dla środowiska i zdrowia alternatywami dla środków ochrony roślin są m.in. metody biologiczne – m.in. wykorzystanie grzyba entomopatogenicznego *Metarhizium anisopliae* (Klingen i in., 2002).

Nadmierne aplikowanie środków ochrony roślin o tym samym mechanizmie działania w ochronie przed szkodliwymi owadami spowodowało stopniowe wykształcanie odporności przez wiele gatunków (Hervé, 2018). Ponadto, skuteczne substancje aktywne są wycofywane z obrotu, ze względu na wątpliwości co do ich bezpieczeństwa dla ludzi i organizmów pożytecznych (Chrustek i in., 2018; Connolly, 2013). Biorąc pod uwagę te doniesienia, oraz regulacje dotyczące Integrowanej Ochrony Roślin w Unii Europejskiej (według Dyrektywy 2009/128/EC), które zakładają wykorzystanie przede wszystkim ochrony niechemicznej, właściwe wydaje się wykorzystanie naturalnego potencjału roślin poprzez hodowlę odmian odpornych.

Odporność roślin *Brassicaceae* na *D. radicum* i *B. brassicae* opiera się na trzech podstawowych mechanizmach, tj. antyksenozie, antybiozie i tolerancji (Painter, 1968). Antyksenozie (brak preferencji) wynika z nieatrakcyjności gospodarza, w skutek czego owad omija lub szybko opuszcza roślinę (Kogan i Ortman, 1978). Antybioza jest niekorzystnym oddziaływaniem roślin na owady czego skutkiem jest zahamowanie ich rozwoju lub płodności. Z kolei tolerancja to zdolność gospodarza do minimalizowania uszkodzeń (Smith i Chuang, 2014).

Niezwykle istotnym czynnikiem mogącym wpływać na odporność roślin na owady jest poziom odżywienia roślin. Przykładowo, optymalne odżywienie roślin azotem wpływa na ich atrakcyjność (wielkość, ilość liści, akumulacja białek i cukrów) dla owadów, co z kolei skutkować może zwiększoną populacją fitofagów (Rostami i in., 2012). Interakcję pomiędzy składnikami odżywczymi i owadami opisano również dla fosforu i potasu, których zwiększona aplikacja w uprawie *Brassica* wpływa ograniczająco na rozwój mszycy kapustnicy (*Lipaphis erysimi*) (Bala i in., 2018).

3.3. Hodowla odpornościowa i wykorzystanie mieszańców oddalonych *Brassicaceae*

Metoda hodowlana polega na otrzymywaniu nowych wyselekcjonowanych odmian rzepaku, charakteryzujących się podwyższoną lub całkowitą odpornością na dany czynnik. Jak akcentowano wcześniej, hodowla roślin o podwyższonej odporności na wybrane szkodniki i choroby jest optymalnym rozwiązaniem w ograniczaniu strat plonu, choć proces otrzymywania odmian o ulepszonych cechach może stanowić niemałe wyzwanie ze względu na dynamiczne interakcje między roślinami i organizmami szkodliwymi (Nelson i in., 2018). Uzyskana odporność nie jest cechą stałą, gdyż może być sukcesywnie przełamywana przez np. sprawców chorób o wysokim potencjale ewolucyjnym. Taki proces zaobserwowano w Australii, gdzie do przełamania monogenicznej odporności na *L. maculans* doszło już trzy lata po wprowadzeniu nowej odmiany (Sprague i in., 2006). Wobec powyższego, kluczowe wydaje się być poszukiwanie nowych źródeł odporności, aby zapewnić uprawom nieustanną ‘ochronę genetyczną’.

Naturalna zmienność genetyczna wśród gatunków *Brassicaceae* jest przyczyną obecności wielu genów odporności na stres biotyczny i abiotyczny (Kole, 2011). Odporność na *B. brassicae* została zidentyfikowana u osobników gatunków *B. fruticulosa*, *B. spinescens*, *B. juncea* oraz *Eruca sativa* (Singh i in., 1994), natomiast wysoki poziom antybiozy i tolerancji na *D. radicum* scharakteryzowano m.in. u *B. villosa*, *B. montana*, *B. hilarionis*, *B. macrocarpa* (Shuhang i in., 2016). Gatunki, u których stwierdzono podwyższoną odporność na *Leptosphaeria* spp. to m.in. *Arabidopsis thaliana*, *B. elongata*, *B. fruticulosa*, *B. juncea*, *B. carinata*, *B. nigra* i *Raphanus sativus* (Chen i Séguin-Swartz, 1999; Rimmer i van den Berg, 1992; Siemens, 2002).

Selekcja i identyfikacja roślin z rodziny *Brassicaceae* jest niezwykle istotna, gdyż poszczególne genotypy są źródłem cennych cech, które mogą być przenoszone poprzez hybrydyzację międzygatunkową (Leflon i in., 2007; Wang i in., 2007). Ta technika polega na kontrolowanym krzyżowaniu rzepaku z pokrewnymi gatunkami. Ilość potwierdzonych przypadków spontanicznej hybrydyzacji jest ograniczona, choć nie jest to zjawisko niemożliwe (Katche i in., 2019). Niski odsetek udanych krzyżowań międzygatunkowych w warunkach naturalnych jest spowodowany występowaniem barier prezygotycznych i postzygotycznych. W pierwszym przypadku może dochodzić do nieskiełkowania pyłku na znamieniu słupka, niepowodzenia wrastania lub penetracji łagiewki pyłkowej (DeVerna i in., 1987). Z kolei drugi typ barier jest związany z degradacją lub obumieraniem zarodka (De Jeu i Jacobsen, 1995). W niektórych przypadkach można pokonać ten problem poprzez wykonanie odwrotnego schematu krzyżowania, czyli przez zamianę genotypu matecznego z ojcowskim (Haig i Westoby, 1991).

Podczas krzyżowania *B. napus* z *B. fruticulosa* i *B. rapa* zgodność kojarzeniowa jest znacznie większa gdy rzepak jest traktowany jako forma mateczna (Wojciechowski i in., 2002). Ponadto, Quazi uzyskiwał mieszańce z większą łatwością, gdy gatunek o wyższej liczbie chromosomów został użyty jako rodzic żeński (Quazi, 1988).

Techniki *in vitro* takie jak fuzja protoplastów, kultury załączków, załączni i zarodków mogą pomóc w przełamaniu barier krzyżowalności i umożliwić otrzymanie roślin mieszańcowych (Ripley i Arnison, 1990), co potwierdzają doniesienia wielu badaczy. Przykładowo, zastosowanie *embryo rescue* (ratowanie zarodków poprzez usunięcie ich z matecznego środowiska i przeniesienie na sztuczną pożywkę) umożliwia otrzymanie mieszańców *Brassica* × *Sinapis*, oraz *B. rapa* × *B. oleracea* (Heath i Earle, 1996; Momotaz i in., 1998), a wsparcie krzyżowań poprzez kultury załączni pozwala na uzyskanie mieszańców *B. rapa* × *B. oleracea* (Zhang i in., 2004).

3.4. Selekcja otrzymanych potomstw mieszańcowych

Po otrzymaniu roślin będących mieszańcami oddalonymi niezbędna jest ich selekcja i ocena pod względem pożądanych przez hodowcę cech. W tym celu można wykorzystać szereg technik, m.in. metody cytogenetyczne, molekularne i oceny polowe.

Aby potwierdzić mieszańcowy charakter i zweryfikować zmienność genetyczną na poziomie chromosomalnym, genotypy uzyskane w wyniku krzyżowania międzygatunkowego można analizować metodami hybrydyzacji *in situ*. Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH, *Genomic In Situ Hybridization*) jest wykorzystywana przede wszystkim do identyfikacji genomów rodzicielskich u gatunków allopoliploidalnych. Wyniki analizy GISH dostarczają informacji na temat międzygenomowych rearanżacji strukturalnych (translokacji pomiędzy genomami) oraz podobieństw pomiędzy DNA spokrewnionych gatunków (Lim i in., 2000; Majka i in., 2017, 2018). Wysoki poziom homologii pomiędzy genomami A i C może jednak powodować niespecyficzne przyłączanie się sond fluorescencyjnych, co jest istotnym czynnikiem wpływającym na użyteczność metody GISH do analizy rodziny *Brassicaceae* (Snowdon i in., 1997).

Szeroko wykorzystywaną metodą identyfikacji cech użytkowych jest selekcja wspierana markerami (MAS, *Marker Assisted Selection*). Umożliwia ona wyodrębnienie najlepszych (pod względem celu hodowli) genotypów bez wpływu warunków środowiskowych (Francia i in., 2005). Identyfikacja może dotyczyć zarówno pojedynczych genów głównych jak i loci cech ilościowych, a do często wykorzystywanych typów markerów należą AFLP, RFLP,

CAPS, SNP, oraz RAPD. Skuteczność metody MAS zależy przede wszystkim od właściwości markera: fizycznej odległości od identyfikowanego rejonu, poziomu polimorfizmu, dystrybucji w obrębie genomu, występowania kodominacji (identyfikacja heterozygot), a także od kosztu i poziomu skomplikowania detekcji markera (Andersen, 2013).

Markery molekularne są z powodzeniem wykorzystywane w badaniach rodziny *Brassicaceae*. Przykładowo, markery typu CAPS umożliwiły detekcję linii wysokooleinowych rzepaku oraz genotypów *B. juncea* o niskiej zawartości kwasu erukowego (Saini i in., 2016; Spasibionek i in., 2020). W badaniach Pushpa i in., użyto markery molekularne do selekcji osobników *B. juncea* o niskiej zawartości glukozynolanów (Pushpa i in., 2016). Odporność na stesy biotyczne również może być monitorowana w warunkach laboratoryjnych – za pomocą MAS można wesprzeć proces piramidyzacji genów odporności na kiłę kapusty aby otrzymać nową, ulepszoną odmianę *B. rapa* ssp. *pekinensis* (Zheng i in., 2022). W *B. carinata* zidentyfikowano z kolei markery silnie sprzężone z locus genu *Xcalbc* niosącego odporność na bakteryjną czarną zgniliznę kapustnych (Sharma i in., 2016). Markery molekularne mogą być również użyteczne w ocenie zróżnicowania genetycznego roślin kapustnych. Testowanie pokrewieństwa i pochodzenia jest możliwe dzięki analizie rejonów mikrosatelitarnych (SSR, *Simple Sequence Repeats*) – tandemowo występujących powtórzeń krótkich sekwencji nukleotydowych rozproszonych w genomie (Zalapa i in., 2012). Polimorfizm długości obserwowany pomiędzy gatunkami czyni markery wysoce informatywnymi, zapewniając skuteczny i dokładny sposób testowania zmienności genetycznej również w rodzinie *Brassicaceae* (Matuszczak, 2013; Powell i in., 1996). Markery SSR były wykorzystywane m.in. w określaniu dystansu genetycznego pomiędzy odmianami i liniami rzepaku oraz oceny rozmieszczenia mikrosatelit u gatunków kapustnych (Plieske i Struss, 2001a). Ponadto, w badaniach Zhai i in. wygenerowany na bazie *Raphanus sativus* zestaw markerów posłużył do oceny zróżnicowania genetycznego rzodkwi, ale potwierdzono też jego skuteczność w analizach innych gatunków *Brassicaceae* (Zhai i in., 2014).

Oceny fenotypowe są podstawową i najstarszą metodą selekcji (Brown i Caligari, 2011). Pozwalają na określenie morfologii roślin, odporności na szkodniki i choroby, adaptacji do stresu abiotycznego oraz potencjału plonowania. Pozyskane w wyniku analiz fenotypowych dane mogą zostać połączone z informacjami genetycznymi, aby identyfikować związki genocecha (Araus i Cairns, 2014).

Kluczowe w badaniach polowych jest istnienie barier, które mogą obniżać wydajność oceny roślin. Należy do nich występowanie konkurencji między gatunkami, nierówne warunki środowiskowe, czy też brak automatyzacji (Fasoula i in., 2020). Przewyciężeniem tych i innych niedoskonałości zajmuje się fenomika. Ta gałąź nauki umożliwia wysokowydajne fenotypowanie prowadzone w celu ulepszania upraw z uwzględnieniem przyszłościowych scenariuszy demograficznych i klimatycznych (Rahaman i in., 2015).

4. Hipotezy badawcze i cel pracy

Hipotezy badawcze

1. Gatunki z rodziny *Brassicaceae* istotnie wzbogacają pulę genową rzepaku i mogą być źródłem odporności na wybrane biotyczne czynniki stresowe.
2. Odporność na śmietkę kapuścianą (*D. radicum*), mszycę kapuścianą (*B. brassicae*) oraz suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria* spp.) może zostać przeniesiona z dzikich i pokrewnych gatunków z rodziny *Brassicaceae* do rzepaku na drodze międzygatunkowego krzyżowania.
3. Fenotypowe oceny odporności mieszańców oddalonych *Brassicaceae* na szkodniki i choroby umożliwiają wyselekcjonowanie obiecujących komponentów hodowlanych.
4. Odporność międzygatunkowych mieszańców *Brassicaceae* na szkodniki jest częściowo warunkowana przez czynniki pozagenetyczne, takie jak zawartość składników mineralnych.
5. Zastosowanie technik molekularnych może znacznie przyspieszyć proces selekcyjny i hodowlę nowych odmian z podwyższoną odpornością. Markery molekularne mogą zostać wykorzystane zarówno do identyfikacji genów odporności jak i do oceny zróżnicowania genetycznego mieszańców międzygatunkowych.

Cele badawcze

Podstawowym celem badawczym było określenie stopnia odporności wybranych mieszańców oddalonych *Brassicaceae* na *D. radicum*, *B. brassicae* oraz *Leptosphaeria* spp., a także identyfikacja najbardziej odpornych potomstw mieszańcowych, które mogą zostać włączone w dalsze procesy hodowlane.

Poza celem głównym wyznaczono cele dodatkowe:

1. Określenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy analizowanymi mieszańcami oddalonymi i genotypami rodzicielskimi za pomocą technik molekularnych.
2. Ocena przydatności wybranych markerów molekularnych do selekcji genotypów odpornych na suchą zgniliznę kapustnych oraz do oceny pokrewieństwa genetycznego roślin z rodziny *Brassicaceae*.
3. Określenie związku pomiędzy zawartością składników mineralnych i odpornością na szkodniki u międzygatunkowych mieszańców *Brassicaceae*.

5. Materiały i metody badawcze

5.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły 32 kombinacje potomstw mieszańców oddalonych *Brassicaceae*, 15 gatunków z rodziny *Brassicaceae* oraz 55 odmian *B. napus* (Tab. 1). Międzygatunkowe mieszańce pochodziły z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) i zostały otrzymane w wyniku prowadzenia kontrolowanych krzyżowań rzepaku (forma mateczna) z pokrewnymi gatunkami *Brassicaceae* (forma ojcowska) wspieranych metodą *embryo rescue*, zgodnie z procedurą opisaną przez Niemann i in. (2012). Przed rozpoczęciem kwitnienia usuwano pylniki z matecznych pąków kwiatowych i dokonywano ręcznego zapylenia pyłkiem gatunku ojcowskiego. Po upływie 14-19 dni niedojrzałe zarodki w stadium sercowatym i stadium torpedy izolowano z młodych łuszczyń, po czym prowadzono kultury *in vitro* izolowanych zarodków. Otrzymane młode rośliny aklimatyzowano w glebie, a następujące po sobie pokolenia hodowano w warunkach polowych, aby ocenić przystosowanie do warunków środowiskowych. Każde kolejne pokolenie otrzymywano poprzez samozapylenie genotypów wyselekcjonowanych na podstawie ocen fenotypowych uwzględniających m.in. odporność na stresy biotyczne i abiotyczne. Szczegółowe analizy uzyskanego materiału badawczego, które są podstawą niniejszej rozprawy, prowadzono etapami na pokoleniach F₅ – F₁₀. Ocenę odporności na szkodliwe owady prowadzono w latach 2017-2019 na pokoleniach F₅ – F₇, przy czym w roku 2019 pobrano również materiał do analizy zawartości składników odżywczych. Identyfikację uszkodzeń powodowanych przez suchą zgniliznę kapustnych oraz analizy molekularne przeprowadzono na pokoleniach F₉ – F₁₀ (2021-2022), a ocenę cech morfologicznych wykonano na potomstwie F₉.

Tabela 1. Lista międzygatunkowych mieszańców, odmian *B. napus* oraz gatunków *Brassicaceae* wykorzystanych w badaniach.

Lp.	Kombinacja krzyżowania	Lp.	Kombinacja krzyżowania
1 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007569	17 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. carinata</i> Dodola
2 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	18 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. fruticulosa</i> – PI649097

Lp.	Kombinacja krzyżowania	Lp.	Kombinacja krzyżowania
3 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> PI 649091	19 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> – PI649097
4 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007574	20 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> – PI649099
5 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007569	21 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> – PI 649094
6 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	22 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> – PI 649096
7 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	23 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-1
8 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. tournefortii</i>	24 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-2
9 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	25 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-3
10 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007569	26 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-4
11 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	27 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169
12 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	28 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169-1
13 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	29 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169-2
14 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	30 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169-3
15 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	31 ^{1,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> 08 007574
16 ^{1,2,3,4}	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	32 ³	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169
Lp.	Odmiana <i>B. napus</i>	Lp.	Odmiana <i>B. napus</i>
1 ^{1,4}	Amir	29 ^{1,3,4}	Anderson
2 ^{1,4}	Inspirati	30 ^{1,4}	Andromeda
3 ¹	Bufalo	31 ¹	Arsenal
4 ¹	Atora	32 ¹	Hybrirock

Lp.	Odmiana <i>B.napus</i>	Lp.	Odmiana <i>B.napus</i>
5 ¹	Dolar	33 ¹	Graf
6 ¹	Fair	34 ¹	Hary
7 ¹	Fantastik	35 ¹	Mickey
8 ¹	Jet Neuf	36 ¹	150/47
9 ¹	Jupiter	37 ¹	Prince
10 ¹	Kana	38 ¹	Sofia
11 ¹	Azurio	39 ¹	Santana
12 ¹	Memoris	40 ¹	Rubin
13 ¹	Lindora	41 ^{1,3,4}	Monolit
14 ¹	150/38	42 ¹	Metys
15 ¹	150/46	43 ¹	Chrobry
16 ¹	Walegro	44 ¹	150/42
17 ¹	Marita	45 ¹	Kabriolet
18 ¹	150/40	46 ¹	Falcon
19 ¹	150/44	47 ¹	Diger
20 ¹	Razmus	48 ¹	Corina
21 ¹	Walery	49 ¹	Kontakt
22 ¹	Aruze	50 ¹	Ceres
23 ¹	Bazyl	51 ¹	Galileus
24 ¹	Bellinda	52 ¹	Markolo
25 ¹	Californium	53 ¹	Hewelius
26 ¹	Darmor	54 ^{3,4}	Skrzeszowicki
27 ¹	PR48W26	55 ^{3,4}	Lisek
28 ¹	PX111CL		
Lp.	Gatunek <i>Brassicaceae</i>	Lp.	Gatunek <i>Brassicaceae</i>
1 ^{3,4}	<i>B. carinata</i> 1	9 ^{3,4}	<i>B. fruticulosa</i> PI 649097
2 ^{3,4}	<i>B. carinata</i> 2	10 ^{3,4}	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08, 007569
3 ³	<i>B. carinata</i> 3	11 ^{3,4}	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08, 007574
4 ³	<i>B. carinata</i> 4	12 ^{3,4}	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (COBORU)
5 ³	<i>B. carinata</i> cv. Dodola	13 ^{3,4}	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169
6 ³	<i>B. carinata</i> PI 596534	14 ^{3,4}	<i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>
7 ^{3,4}	<i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> (COBORU)	15 ^{3,4}	<i>S. alba</i> cv. Bamberka
8 ^{3,4}	<i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> PI430485 98CI		

^{1,2,3,4} – cyfry odnoszą się do numeru publikacji, w której dany genotyp został użyty jako materiał badawczy

Realizacja założonych celów rozprawy wymagała przeanalizowania powyższego materiału roślinnego za pomocą zróżnicowanych metod badawczych, obejmujących zarówno obserwacje polowe jak i techniki laboratoryjne. Ponadto, opracowanie otrzymanych wyników było możliwe dzięki wykorzystaniu analiz statystycznych. Niniejsze podrozdziały opisują poszczególne etapy badań polowych oraz analiz molekularnych.

5.2. Oceny fenotypowe

5.2.1. Schemat doświadczeń polowych (Publikacja 1, 2, 3, 4)

Polowe oceny odporności oraz oceny cech morfologicznych były prowadzone na terenie Rolniczego Gospodarstwa Doświadczalnego Dłoń, będącego Stacją Doświadczalną Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Eksperymenty zakładano w trzech lub pięciu powtórzeniach (w zależności od celu badań) w układzie blokowym całkowicie zrandomizowanym. Wielkość jednego poletka doświadczalnego wynosiła 10m², a odległość między poletkami 0,3m. Gęstość zasiewu określono na 60 nasion na m². Na obszarze doświadczalnym stosowano typowe zabiegi agrotechniczne dla panujących warunków środowiskowych.

5.2.2. Fenotypowa ocena odporności na owady (Publikacja 1 i 2)

W pierwszym etapie badań oceniano w warunkach polowych uszkodzenia powodowane przez dwa szkodniki, tj. śmietkę kapuścianą (*Delia radicum*) oraz mszycę kapuścianą (*Brevicoryne brassicae*), u 31 kombinacji mieszańcowych oraz 53 odmian rzepaku (zgodnie z Tab. 1). Oceny przeprowadzono w październiku lub listopadzie pod koniec sezonu wegetacyjnego na korzeniach (uszkodzenia powodowane przez *D. radicum*) oraz liściach roślin (uszkodzenia powodowane przez *B. brassicae*). Dla każdego genotypu wybierano losowo sześć (publikacja 1) lub dziesięć (publikacja 2) osobników, następnie określano stopień odporności według dziewięciostopniowej skali (1-9), przy czym wynik '1' oznaczający brak odporności przyznawano gdy uszkodzenia występowały na 100% powierzchni korzeni/liści, a wynik '9' wskazujący na wysoką odporność był przyznawany gdy nie obserwowano żadnych uszkodzeń na korzeniach lub liściach. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji obliczono średnie dla każdego powtórzenia, co pozwoliło na pozyskanie danych ilościowych o rozkładzie normalnym.

Otrzymane w ten sposób dane opracowywano za pomocą metod statystycznych. Normalność rozkładu testowanych zmiennych sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka (Shapiro i Wilk, 1965), po czym przeprowadzono analizę dwuczynnikową ANOVA aby ocenić wpływ czynników (roku oraz genotypu) na odporność roślin na dwa gatunki szkodników. Test najmniejszych istotnych różnic NIR (ang. LSD, *Least Significant Differences*) wykonany został aby utworzyć grupy jednorodne genotypów, a różnice między grupą mieszańców oddalonych i odmian rzepaku testowano za pomocą testu t-Studenta. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu GenStat v.18 (VSN International Ltd.)

5.2.3. Ocena zawartości składników mineralnych (Publikacja 2)

W celu ustalenia związku pomiędzy stężeniem pierwiastków w tkankach i odpornością na owady, analizowano zawartość makroskładników (N, P, K, Ca, Mg, Na, S, S-SO₄) oraz mikroskładników (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni) u dwunastu wybranych mieszańców oddalonych (zgodnie z Tab. 1). Z poletek doświadczalnych pobrano dla każdego badanego genotypu dziesięć losowo wybranych roślin, w dwóch terminach: faza rozety (BBCH 11-14) i faza kwitnienia (BBCH 63-65). Materiał badawczy składający się z liści i pędów został poddany kolejno suszeniu, mieleniu i spopieleniu. Tak przygotowany popiół zawieszono w HCl i rozcieńczono H₂O, a oznaczenie pierwiastków chemicznych przeprowadzono za pomocą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA) w urządzeniu SpectrAA 220 FS (Varian Medical Systems, Inc.), oraz wykorzystując metodę kolometryczną, metodę Kjeldahla i metodę turbidymetryczną (Bardsley i Lancaster, 1960; Butters i Chenery, 1959; Gawliński i in., 1991).

Podczas analiz statystycznych w pierwszej kolejności zbadano normalność rozkładu badanych cech (Shapiro i Wilk, 1965). Następnie przeprowadzono analizę wielowymiarową MANOVA oraz analizę dwuczynnikową ANOVA aby ocenić wpływ genotypu oraz terminu badania na zawartość związków odżywczych. Grupy jednorodne utworzono na podstawie testu NIR, a związki pomiędzy pierwiastkami określono za pomocą współczynników korelacji Pearsona. Zastosowano analizę korelacji kanonicznej, aby przedstawić wielocechową ocenę podobieństwa badanych mieszańców oddalonych przy jak najmniejszej utracie informacji (Rencher, 1992). Odległość Mahalanobisa została zastosowana jako miara wielocechowego podobieństwa mieszańców (Camussi i in., 1985; Mahalanobis, 2018; Seidler-Łożykowska i in., 2013) i obliczona została niezależnie dla faz rozwojowych. Związki pomiędzy obserwowanymi składnikami mineralnymi, odpornością na *B. brassicae* oraz odpornością na *D. radicum* oceniono za pomocą analizy regresji w obu terminach niezależnie w każdym roku badań.

Pozyskane dane na temat zawartości składników mineralnych traktowano jako zmienne niezależne i uwzględniano w poszczególnych modelach. We wszystkich analizach zastosowano krytyczne poziomy istotności równe 0,05, 0,01 i 0,001, wynikające z poprawki Bonferroniego. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego GenStat v.18 (VSN International Ltd.).

5.2.4. Fenotypowa ocena odporności na suchą zgniliznę kapustnych (Publikacja 3 i 4)

Kolejnym etapem prowadzonych badań była ocena porażenia międzygatunkowych mieszańców *Brassicaceae* (32 kombinacje, zgodnie z Tab. 1) przez suchą zgniliznę kapustnych, której sprawcą jest kompleks grzybów *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa*. Analizę prowadzono w dwóch terminach: w listopadzie podczas fazy rozwojowej BBCH 19 oraz w lipcu w fazie rozwojowej BBCH 70-89. W pierwszym terminie oceniano objawy liściowe według pięciostopniowej skali (0-4), gdzie wynik '0' oznaczał brak widocznych objawów, a wynik '4' przyznawano roślinom u których zauważono więcej niż dziesięć plam chorobowych (Brachaczek i in., 2021). W drugim terminie oceny objawów widocznych na pędach dokonywano korzystając ze skali 0-9, przy czym '0' ponownie oznaczało brak uszkodzeń, a '9' oznaczało roślinę całkowicie zniszczoną przez nasilone objawy choroby (Brachaczek i in., 2021; Jedryczka, 2007). W obydwu terminach dla każdego badanego genotypu dokonywano oceny dziesięciu osobników wybranych w sposób losowy. Otrzymane wyniki w formie skali przekształcono na wartości procentowe, a następnie obliczono średnie wartości na podstawie dziesięciu powtórzeń.

5.2.5. Polowa ocena wybranych cech morfologicznych (Publikacja 4)

Podczas ostatniego etapu badań w warunkach polowych, przeprowadzono wśród 31 potomstw mieszańcowych ocenę fenotypową (zgodnie z listą kombinacji w Tab. 1), uwzględniającą kolor kwiatów (procentowy udział żółtych, bladożółtych i białych kwiatów), kolor pędów (procentowy udział zielonych i fioletowych pędów), kolor liści oraz występowanie zjawiska protogynii. Obserwacje te prowadzono w fazie rozwojowej BBCH 60-69 (kwitnienie). Po zakończeniu zbiorów przeprowadzono dodatkowo ocenę długości łuszczyń oraz ilości nasion w łuszczyinach. Wszystkie wymienione analizy prowadzono na dziesięciu losowo wybranych roślinach w obrębie każdego genotypu za wyjątkiem oceny koloru kwiatów, którą ze względu na dużą zmienność w obrębie poszczególnych potomstw prowadzono na co najmniej 50 osobnikach.

Aby określić wpływ genotypu na obserwowaną zmienność fenotypową wykorzystano analizy statystyczne, tj. test Shapiro-Wilka oraz analizę jednoczynnikową ANOVA. Ponadto, określenie współczynników korelacji umożliwiło wyznaczenie zależności pomiędzy cechami morfologicznymi. Genotypy mieszańcowe pogrupowano na podstawie odległości euklidesowej i analizy skupień. Wyznaczono również zależności pomiędzy cechami fenotypowymi i markerami SSR na podstawie analizy regresji (Bocianowski i in., 2011).

5.3. Analizy molekularne

5.3.1. Izolacja materiału genetycznego (Publikacje 3 i 4)

W celu przygotowania materiału roślinnego do badań molekularnych, wybrane genotypy zostały wysiane na sterylnych szalkach Petriego wyłożonych zwilżoną bibułą. Tak przygotowane nasiona pozostawiono w kontrolowanych warunkach świetlnych w celu pobudzenia wzrostu. Całkowite genomowe DNA izolowano z 3-5 dniowych siewek, przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Plant (A&A Biotechnology) według załączonej przez producenta procedury. Otrzymany materiał genetyczny zawieszono w buforze 10 mM Tris-HCl, a następnie sprawdzono koncentrację DNA i jego jakość za pomocą spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Wszystkie próby doprowadzono do jednolitego stężenia 50ng/μl.

5.3.2. Molekularna ocena pokrewieństwa genetycznego (Publikacje 3 i 4)

Aby ocenić stopień pokrewieństwa pomiędzy 32 potomstwami mieszańcowymi *Brassicaceae* i dziewiętnastoma komponentami rodzicielskimi (wykaz materiału roślinnego w Tab. 1) wykorzystano zestaw piętnastu markerów SSR wybranych na podstawie danych literaturowych (Tamura i in., 2005), przy czym sekwencje markerów zostały opracowane przy użyciu metody ISSR-suppression-PCR z genomu *B. rapa*. Analizy PCR prowadzono w objętości końcowej 12,5μl, a w skład mieszaniny reakcyjnej wchodził 1μl DNA pozyskanego podczas wcześniejszej izolacji, 0,5μl każdego z pary specyficznych starterów, 4,25μl H₂O, oraz 6,25μl roztworu OptiQ Master Mix (EURx) zawierającego polimerazę DNA OptiQ, zoptymalizowany bufor reakcyjny, MgCl₂, oraz dNTP. Łącuchowe reakcje polimerazy prowadzono w zoptymalizowanych warunkach:

- wstępna denaturacja (94°C, 5 minut)
 - denaturacja (94°C, 45 sekund)
 - przyłączanie starterów (temperatura specyficzna, 45 sekund)
 - elongacja (72°C, 90 sekund)
 - końcowa elongacja (72°C, 7 minut)
- } 35 cykli

Temperatury przyłączania każdej pary starterów opracowano na podstawie ich temperatury topnienia. Wszystkie reakcje prowadzono w termocyklerze C1000 Touch (Bio-Rad). Sekwencje wykorzystanych do analiz par starterów oraz temperatury przyłączania zaprezentowane zostały w Tabeli 2.

Tabela 2. Sekwencje i temperatury przyłączania starterów wykorzystanych do detekcji markerów SSR.

Marker SSR	Sekwencje starterów	Temperatura przyłączania
mstg001	F: CAT GAG TTT TCA TAA ATA AAA R: TAT GCA ACT TGT CTT TGA TAT	41°C
mstg004	F: CAT ATA TAG CAT GAG TGG TGC R: CTT AAA GGG CAC TCT TTC ATG	47°C
mstg008	F: TCT CTT TGA AAT CTC AAC CCA R: AGA TGG CAT GTT AAA CTG AAC	47°C
mstg012	F: TGA TAC ATA GAC TTG GTG GTG R: CGG CAT TAT CTT GAA CAC GTT	48°C
mstg013	F: AGA TTT GGC TTA CAC GAC GAC R: ATA TAC CAG GTA CCG TCA CTC	50°C
mstg016	F: CGT TAC ATT CGG GTA TCA CTA R: TCA TCG AAA GCC TTG TAA CTG	48°C
mstg025	F: AGA GGC AGT TAC GTT CAC GTC R: CAT CGC ACT CGT GTC TCT TTC	52°C
mstg027	F: CTC TTT TGG TCA GCT TCC TCA R: TTG TTA GTT AGA TCC TCG TAG	48°C
mstg028	F: GCC AAG AAG ACG AAG ATT CTC R: AGG TTC TCG ATT TAG GAA CCG	49°C
mstg033	F: ATG TAA GCA TCT TTG ATC TGC R: CTT GAT CTT CCT GAT GTA CTC	46°C
mstg034	F: CGA CTG GTA ATA TTC TGA TAC R: CAT GAA AGA CTC TCA AAT CCC	46°C
mstg038	F: GAA TGG TGG TTC TTG TGT GTC R: CAA AGC GAA GCT CTT GAA TTG	49°C
mstg039	F: TAC TCG CTC TTG TTG AAG CTG R: GAC AAT CTT GGA GTC ATC TCG	50°C
mstg042	F: GAT ATT CGA TCC GCT TCG ACA R: CGA ATA TCT CAT CCA CTT TGT	49°C
mstg052	F: AGT AAC ATG TTT TCT TTT GTG R: CAT CAG ATG CTC AAG GAA CTT	46°C
mstg055	F: ACA CGC GCC TAT GCA GAA TAC R: CTT AGC GAT TAC GGT GAA GCC	52°C

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR prowadzono na żelu agarozowym o stężeniu 2% (2g agarozy na 100ml buforu TBE 1X) z dodatkiem barwnika Midori Green Advance (Nippon Genetics) w ilości 5 μ l/100ml buforu. W zależności od wielkości rozdzielanych produktów, elektroforeza trwała 1,5-3h, przy stałym napięciu 120V. Wizualizacja otrzymanych elektroforegramów została wykonana w transiluminatorze Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR System (Bio-Rad), zintegrowanego z programem ImageLab (Bio-Rad). Wszystkie uzyskane wyniki w formie wzorów prążkowych analizowano tworząc binarną macierz danych: dla każdego markera, oceniano obecność lub brak produktu PCR o danej wielkości odpowiednio jako '1' lub '0'. Następnie wykorzystano program Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems) w celu dalszej analizy utworzonego zbioru danych.

Dla każdego badanego markera obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie (ang. PIC, *Polymorphic Information Content*) aby określić jego użyteczność diagnostyczną (Anderson i in., 1993; Wolko i in., 2014). Podobieństwo genetyczne (ang. GS, *Genetic Similarity*) zostało skalkulowane dla każdej pary markerów według założeń Nei i Li (1979). Do skonstruowania dendrogramu zależności genetycznych z wykorzystaniem metody UPGMA (ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) wykorzystano macierz podobieństwa, na podstawie której dokonano również analizy głównych składowych (ang. PCA, *Principal Component Analysis*). Wszystkie analizy wykonano za pomocą oprogramowania statystycznego GenStat 18.2 (VSN International Ltd.). Analiza AMOVA umożliwiająca ocenę wariacji pomiędzy i w obrębie grup genotypów została wykonana przy użyciu GenAlEx 6.5 (Peakall i Smouse, 2006). Ponadto, obliczono współczynnik utrwalenia F_{ST} określający dystans genetyczny.

5.3.3. Molekularna identyfikacja odporności na *L. maculans* (Publikacja 4)

W kolejnym etapie analiz molekularnych identyfikowano obecność rejonów związanych z odpornością na *L. maculans* (jednego ze sprawców suchej zgnilizny kapustnych) dla 31 genotypów mieszańcowych *Brassicaceae* i osiemnastu gatunków rodzicielskich (zgodnie z listą przedstawioną w Tab. 1). Identyfikację prowadzono za pomocą siedemnastu markerów molekularnych wybranych na podstawie literatury (Ferdous i in., 2019; Huang i in., 2016; Larkan i in., 2013; Plieske i Struss, 2001b; Raman i in., 2012a; Raman i in., 2012b; Rashid i in., 2018). Wykorzystane do analiz markery były związane z odpornością pionową jak i poziomą (Tab. 3). Reakcje amplifikacji przeprowadzono dla każdej pary starterów z uwzględnieniem ich specyficznej temperatury przyłączenia, po czym wykonano rozdział

elektroforetyczny, który umożliwił wizualizację produktów PCR. Metodyka wykonania tych dwóch etapów pozostała taka sama jak przy analizach markerów SSR. Uzyskane elektroforegramy analizowano pod kątem obecności spodziewanych produktów reakcji.

Tabela 3. Lista markerów wykorzystanych do określenia odporności na *L. maculans*, wraz z sekwencjami i temperaturą przyłączania starterów (T_p) oraz identyfikowanym genem/rejonem odporności.

Marker	Sekwencje starterów	T_p	Identyfikowany gen/rejon	Źródło
Xbrms075	F: GTTTCACATATTTTCTCTGTTTATT R: ACCTTAAATGTTAAGTAAGCTAAAC	51°C	<i>Rlm4</i>	Raman i in., 2012b
ScJ14	F: CACCCGGATGGTCGTACGAGGATA R: CACCCGGATGCACTTCTCAAGAT	68°C	Rejon QTL	Huang i in., 2016
Fad8	F: TCTCAGACATAGGRTGCCANGA R: GTATACGACCTCTCCCNAGNAT	53°C		
CB10449	F: TTGGATCATTTTGGCATC R: TCATCCAGGTAATGTTGTTG	54°C		
B5-1520	F: TGCCTTCTCACTTCTTCTCTC R: AGCGTCTATGTCCGGTCTTCAA	59°C	<i>Rlm6</i>	Rashid i in., 2018
B5Rlm6_1	F: GTTACAGAGGGTTGTATCTCATTC R: ACCAGGAGTGGTTAGAAGCTAAT	55,5°C		
pRP1513	F: TGTTACTGATTGTGCAGAACGCCTTG R: CTGGACGAAATTGACTGTGGTT	65°C	Gen odporności zlokalizowany na genomie B	Plieske i Struss, 2001b
Bol023847	F: GCAGACCACTTCAACTTGTAACC R: GGGTACTTTAGTCATCTAGCC	59°C	Rejon na chromosomie A zawierający geny odporności	Ferdous i in., 2019
Bol021435	F: TGCCATATGCTCCTTGTGTT R: CCGTTTGACTGGTTCGATTC	59°C		
Bol040029	F: CTTGAGTGGTCTGCACGGTA R: GCCCATTATAGGCCGAGTTA	60°C		
Bol040038	F: TGAGCACGATGTTGGAAAAA R: GGTTATTACCATTGCTTAGTGT	58°C		
Bol040045	F: GGACTTTTCTCTGCTCGAA R: GGATGGACTGATCGGCTTAT	59°C		
Bol040099	F: TGGGTTGATTAGGGATTIGA R: GCTCACCAAGTTCGTCAGGT	59°C		

BLRC InDel	F: CTATACCGAACTACACCAAGT R: CAGCTCTAGCAACACAACCTCC	55°C		
Xol12-e03	F: CTTGAAGAGCTTCCGACACC R: GACGGCTAACAGTGGTGGAC	50,5°C		Raman i
Xna12- a02a	F: AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R: AGTGAATCGATGATCTCGCC	45°C	<i>Rlm1</i>	in., 2012a
Ind10-12 InDel	F: GGACGGTGTCATGGGTGAATAACAG R: CGTTTGTAACCGACCTTCA	54°C	<i>LepR3</i>	Larkan i in., 2013

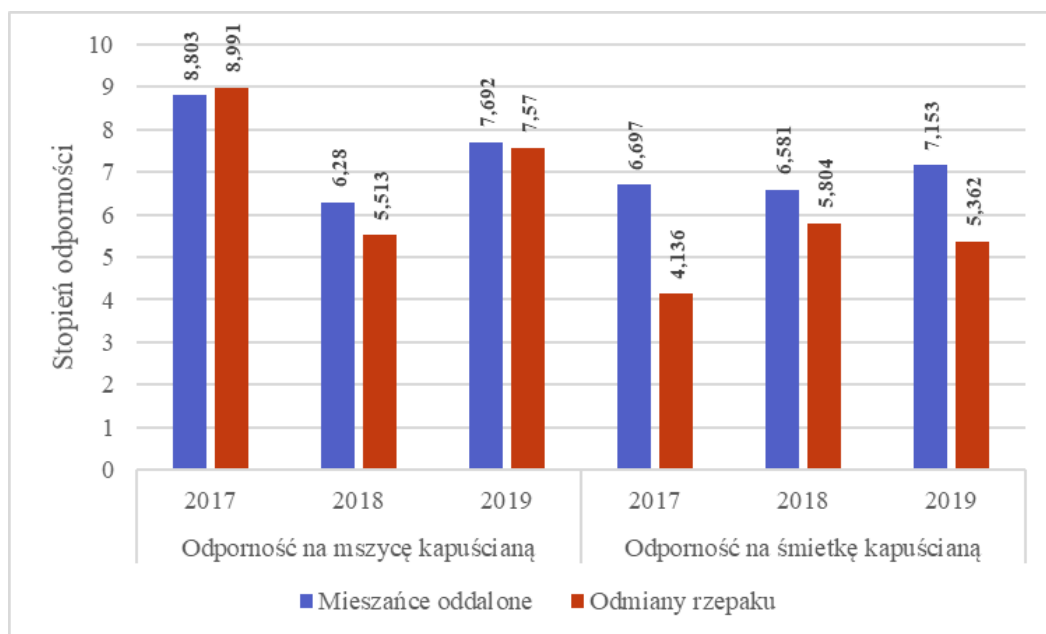
6. Wyniki

Rozdział ten podsumowuje najważniejsze wyniki uzyskane w toku realizowanych badań, które zostały opublikowane i włączone w cykl publikacji pod wspólnym tytułem rozprawy „Identyfikacja genotypów z podwyższoną odpornością na wybrane szkodniki i suchą zgniliznę kapustnych u mieszańców oddalonych z rodziny *Brassicaceae*”. Rozdział został podzielony na podrozdziały tematyczne, w których zaprezentowane zostały rezultaty badań polowych i laboratoryjnych.

6.1. Fenotypowa ocena odporności na owady (Publikacja 1 i 2)

W toku badań ustalono, iż genotyp oraz termin badań (a także ich interakcja) były istotnymi czynnikami wpływającymi na poziom odporności na oba badane owady. Przeprowadzone analizy pozwoliły na porównanie stopnia odporności na mszycę kapuścianą (*B. brassicae*) oraz śmietkę kapuścianą (*D. radicum*) w obrębie oddalonych mieszańców oraz odmian rzepaku, a także pomiędzy tymi grupami. Średnie wartości pomiarowe dla międzygatunkowych mieszańców oraz odmian *B. napus* w trzech latach badań zostały przedstawione w formie wykresu (Ryc. 1). W porównaniu z odmianami, średnia odporność potomstw mieszańcowych na *B. brassicae* była wyższa w 2018 (oraz w 2019 bez istotnej różnicy statystycznej), a odporność na *D. radicum* była wyższa we wszystkich latach. Ponadto zaobserwowano, że poziom uszkodzeń był zróżnicowany w grupie oddalonych mieszańców i odmian *B. napus*, co pozwoliło na wyróżnienie 35 genotypów o podwyższonej, utrzymującej się przez wszystkie lata badań odporności na co najmniej jednego ze szkodliwych owadów (8 potomstw mieszańcowych oraz 27 odmian rzepaku). Kombinacje mieszańcowe należące do statystycznie najlepszej grupy pod względem odporności na śmietkę kapuścianą przez trzy lata to *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649091, *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08.007574, *B. napus* cv. Lisek × *B. carinata* Dodola, *B. napus* cv. Lisek × *B. fruticulosa* PI649099 oraz *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* – PI 649096. Z kolei potomstwami mieszańcowymi, wśród których zidentyfikowano najwyższą, utrzymującą się w latach badań odporność na mszycę kapuścianą były *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* Pak Choi 08 007574, *B. napus* cv. Californium × *B. oleracea* var. *alboglabra*, *B. napus* cv. Californium × *B. fruticulosa* – PI 649097 oraz *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* – PI 649096. Należy zaznaczyć, iż do grupy utrzymującej wysoką odporność jednocześnie na *B. brassicae* oraz *D. radicum* przez wszystkie trzy lata badań należał międzygatunkowy mieszaniec *B. napus*

cv. Jet Neuf × *B. carinata* – PI 649096, oraz odmiany *B. napus* cv. Galileus oraz *B. napus* cv. Markolo.



Rycina 1. Wykres przedstawiający uśrednioną odporność oddalonych mieszańców *Brassicaceae* oraz odmian rzepaku na mszycę kapuścianą (*B. brassicae*) oraz śmietkę kapuścianą (*D. radicum*) w trzech latach badań.

6.2. Ocena zawartości składników mineralnych (Publikacja 2)

Przeprowadzone analizy wskazały, że na poziom składników mineralnych w tkankach roślinnych wpływ miał zarówno genotyp, termin badania jak i ich interakcja. Obserwowano dużą zmienność zawartości pierwiastków u badanych 12 genotypów mieszańców oddalonych, co więcej zidentyfikowano występowanie korelacji między poziomami mikro i makroskładników. Wynikiem połączenia analiz odporności na *B. brassicae* oraz *D. radicum* z zawartością składników odżywczych była analiza asocjacyjna, która pozwoliła na określenie związku pomiędzy cechami. Zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy poziomem Ca i odpornością na *B. brassicae* w 2019 roku, pozytywną interakcję pomiędzy zawartością Cu i odpornością na *B. brassicae* w 2019 roku, oraz negatywną zależność między Ca i odpornością na *D. radicum* (2019).

6.3. Fenotypowa ocena odporności na suchą zgniliznę kapustnych (Publikacja 3 i 4)

Analizy prowadzone w kolejnym etapie doświadczeń polowych umożliwiły wyłonienie 16 genotypów mieszańcowych *Brassicaceae*, które cechowały się najniższym poziomem porażenia w obu terminach obserwacji, a więc charakteryzowały się najwyższą

odpornością na suchą zgniliznę kapustnych spośród badanych międzygatunkowych mieszańców (Tab. 4).

Tabela 4. Genotypy mieszańcowe *Brassicaceae* o najwyższej połowej odporności na suchą zgniliznę kapustnych (należące do statystycznie najlepszej grupy w obu terminach obserwacji).

Numer genotypu*	Kombinacja krzyżowania	Poziom porażenia % (termin I/II)
2	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf x <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	5/6
3	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf x <i>B. carinata</i> PI 649091	0/3
7	<i>B. napus</i> cv. Lisek x <i>S. alba</i> cv. Bamberka	4/4
11	<i>B. napus</i> cv. Górczański x <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	7/8
15	<i>B. napus</i> cv. Californium x <i>S. alba</i> cv. Bamberka	0/3
16	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf x <i>S. alba</i> cv. Bamberka	0/3
17	<i>B. napus</i> cv. Lisek x <i>B. carinata</i> Dodola	0/3
18	<i>B. napus</i> cv. Californium x <i>B. fruticulosa</i> - PI649097	0/4
19	<i>B. napus</i> cv. Lisek x <i>B. fruticulosa</i> - PI649097	0/5
20	<i>B. napus</i> cv. Lisek x <i>B. fruticulosa</i> - PI649099	0/5
21	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf x <i>B. carinata</i> - PI 649094	0/4
22	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf x <i>B. carinata</i> - PI 649096	0/3
27	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 x <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	3.33/9
28	<i>B. napus</i> MS8 line x <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 1	4/6
29	<i>B. napus</i> MS8 line x <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 2	6/6
30	<i>B. napus</i> MS8 line x <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 3	6/6

* numeracja genotypów zgodna z Tabelą 1.

6.4. Połowa ocena wybranych cech morfologicznych (Publikacja 4)

W toku badań zaobserwowano istotne zróżnicowanie pomiędzy poziomem badanych cech morfologicznych u badanych międzygatunkowych mieszańców. Spośród analizowanych 31 kombinacji większość wykształciła żółte kwiaty (23 genotypy), u pięciu stwierdzono dodatkowy udział białych kwiatów nie przekraczający 25%, a u czterech kombinacji występowały prócz żółtych również białe kwiaty (ogólny udział nie większy niż 5%). U siedmiu badanych genotypów stwierdzono obecność fioletowych pędów (udział 25-100%),

ponadto u większości (28 z 31) potomstw mieszańcowych występowały tylko zielone liście. Zjawisko protogynii zauważono tylko u pojedynczych osobników czterech potomstw mieszańcowych rzepaku z *B. rapa* (*B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* ssp. *chinensis*, *B. napus* cv. Lisek × *B. rapa* Pak Choi 08 007574, *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* Pak Choi 08 007574 oraz *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08.007574). Wysokie zróżnicowanie zauważono również dla dwóch cech badanych po zbiorach łuszczyn, mianowicie średnia długość strąków wahała się od 49 do 97 mm, a ilość nasion w pojedynczych łuszczynach wynosiła od 5 do nawet 34 sztuk.

Dla wszystkich par cech przeprowadzono analizę korelacji, przy czym dodatnią zależność stwierdzono dla par: protogynia – długość łuszczyn, ilość nasion – długość łuszczyn. Ujemną zależność zaobserwowano dla par: żółte kwiaty – bladożółte kwiaty, zielone pędy – fioletowe pędy.

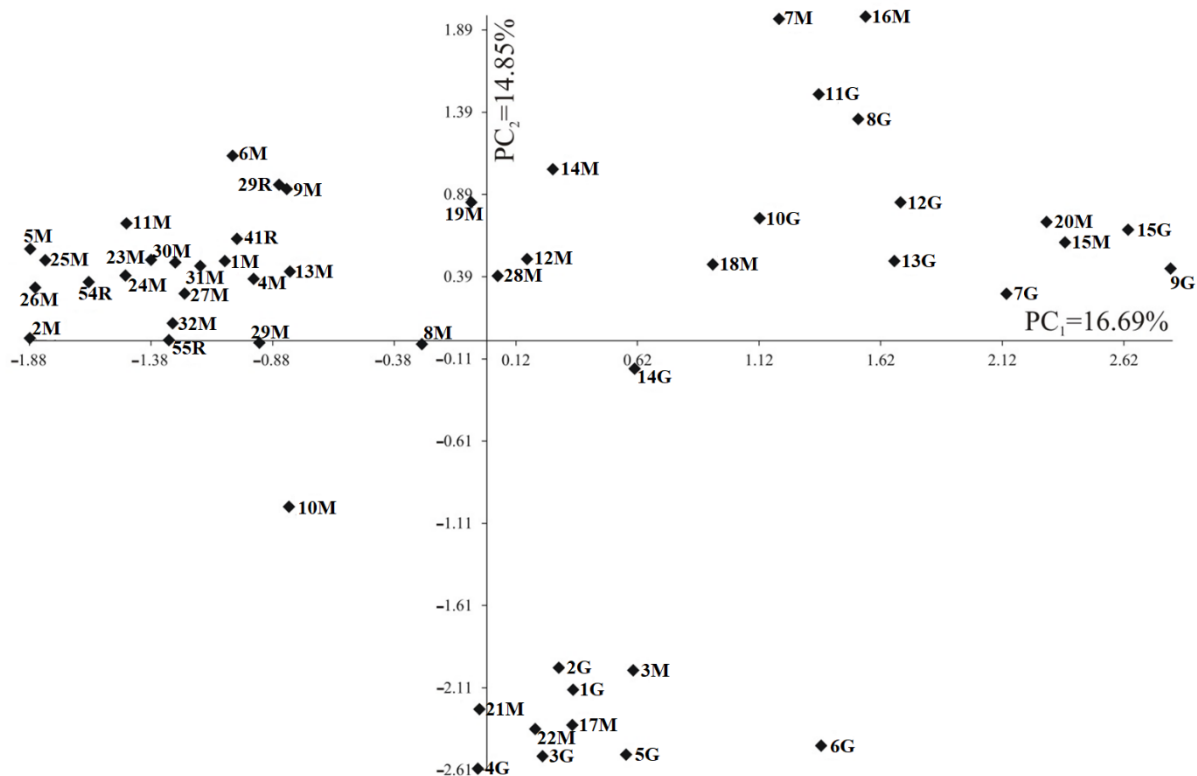
Ponadto, wykonane badania asocjacyjne pomiędzy cechami morfologicznymi i markerami SSR pozwoliły na powiązanie właściwości fenotypowych z zamplifikowanymi rejonami genomu. W ten sposób zidentyfikowano 22 allele związane z co najmniej jedną z cech. Najsilniejszy związek występował pomiędzy markerami mstg004 (allel o wielkości 300pz) i mstg027 (allel o wielkości 500pz) a procentowym udziałem bladożółtych kwiatów. Oba te markery wyjaśniały zmienność cechy na poziomie 44,5%.

6.5. Molekularna ocena pokrewieństwa genetycznego (Publikacja 3)

Warto podkreślić, iż zastosowanie piętnastu wyselekcjonowanych na podstawie literatury markerów typu SSR umożliwiło określenie zróżnicowania genetycznego pomiędzy oddalonymi mieszańcami i komponentami rodzicielskimi. Analiza elektroforegramów pozwoliła na identyfikację łącznie 98 alleli polimorficznych i dwóch alleli monomorficznych. Najliczniejszy wzór prążkowy (15 alleli) wygenerował marker mstg039, ponadto dla 13 markerów odnotowano obecność wyłącznie prążków polimorficznych. Oceniono również użyteczność zastosowanych markerów SSR. Wartości PIC zawierały się w zakresie od 0,594 do 0,989, co wskazuje na ich wysoką przydatność.

Na podstawie analizy UPGMA podzielono badane genotypy na dziewięć grup w zależności od ich pokrewieństwa. Największy stopień podobieństwa wyznaczono wynoszący 0.97 wyznaczono dla dwóch międzygatunkowych mieszańców rzepaku odmiany Zhongshuang9 z *B. rapa* ssp. *pekinensis*. Najmniejszą miarę podobieństwa odnotowano dla gatunków *B. carinata* i *B. fruticulosa* (0,22). Na podstawie macierzy podobieństwa i analizy

PCA stworzono diagram podsumowujący dystans pomiędzy genotypami i procent zmienności wyjaśniony przez markery molekularne – pierwsze dwa komponenty składowe wyjaśniły łącznie 31,54% wariacji markerów SSR (Rycina 2).



Rycina 2. Diagram UPGMA, przedstawiający dystans genetyczny pomiędzy genotypami oraz procent zmienności wyjaśniony przez markery molekularne. Numeracja zgodna z Tab. 1., przy czym zastosowano oznaczenia literowe: M – mieszaniec oddalony, R – odmiana rzepaku, G – gatunek *Brassicaceae*.

6.6. Molekularna identyfikacja odporności na *L. maculans* (Publikacja 4)

W celu identyfikacji rejonów związanych z odpornością na *L. maculans* wśród mieszańców oddalonych *Brassicaceae* i komponentów rodzicielskich wybrano 17 markerów. Dla wszystkich identyfikowanych markerów podjęto próby jak najlepszego zoptymalizowania reakcji poprzez nanoszenie zmian w profilach reakcji. Mimo tego, produkty PCR otrzymano w przypadku 12 z 17 par specyficznych starterów. Wyniki przeprowadzonych analiz podsumowano w Tabeli 5.

Tabela 5. Lista dwunastu markerów wraz z wielkością amplifikowanego produktu i ilością genotypów dla których otrzymano produkt.

Marker	Wielkość uzyskanego produktu reakcji	Ilość genotypów u których zaobserwowano produkt reakcji
ScJ14	700pz	39
CB10449	280pz	38
pRP1513	83pz /83pz i 150pz ¹	18
	150pz ²	2
Bol023847	789pz	32
Bol040029	1213pz ¹	6
	1300pz ²	7
Bol040038	899pz	20
Bol040045	960pz	127
	750pz	1
Bol040099	1145pz	27
BLRC InDel	305pz ¹	26
	433pz ²	1
Xol12-e03	128pz	8
	128pz i 214pz	39
	177pz	1
Xna12-a02a	193pz ¹ / 191pz i 162pz ¹ / 158pz i 172pz ²	49
Ind10-12	506pz ¹	32
	794pz ²	4

¹ wynik oznacza obecność zidentyfikowanego przez marker genu/rejonu odporności

² wynik oznacza brak zidentyfikowanego przez marker genu/rejonu odporności

Dla części markerów zaobserwowano produkty odmienne od spodziewanych – tak jak w przypadku markera Bol040045 opisywanego jako monomorficzny (Ferdous i in., 2019), dla którego uzyskano w jednej próbie produkt o wielkości ok. 750pz zamiast 960pz. Ponadto dla markera Xol12-e03 wzory prążkowe były inne od oczekiwanych, gdyż według literatury o obecności genu *Rlm1* świadczy uzyskanie produktu PCR wielkości 214pz, a o jego braku produkty wielkości 128pz i 177pz (Raman i in., 2012a). Podobną sytuację zaobserwowano dla

markera Xna12-a02a, dla którego produkty PCR mieściły się w oczekiwanych wartościach, lecz ich odróżnienie było niemożliwe.

7. Dyskusja

Obecnie, programy hodowlane rzepaku skupiają się na otrzymywaniu odmian o udoskonalonych cechach użytkowych zapewniających stabilne plonowanie oraz wysoką jakość plonu, a także na zapewnieniu odporności roślin na stesy abiotyczne i biotyczne, w tym na szkodniki i choroby. Hodowcy rzepaku tworzą odmiany korzystając z dostępnej zmienności genetycznej, identyfikując i selekcyjując komponenty hodowlane pod względem pożądaných cech. Podstawową metodą, która może prowadzić do wytworzenia nowych gatunków albo do międzygatunkowej introgresji genów jest krzyżowanie międzygatunkowe. Ten rozpowszechniony w przyrodzie proces może zostać wykorzystany do ukierunkowanego ulepszania roślin w rolniczych systemach hodowlanych. Należy podkreślić, że istnieje konieczność wzbogacania puli genowej rzepaku o nową zmienność genetyczną. Ta potrzeba wynika z faktu, że przez lata prowadzono intensywną selekcję względem cech jakościowych plonu, co z kolei doprowadziło do silnego zawężenia puli genetycznej *B. napus* (Shiranifar i in., 2020). Rodzina *Brassicaceae* obfituje w dzikie i uprawne gatunki o zróżnicowanych cechach użytkowych, które mogą stać się źródłem nowej zmienności genetycznej. Jednakże wprowadzanie nowych genów z pokrewnych gatunków jest procesem znacznie bardziej skomplikowanym niż proste krzyżowanie między odmianami rzepaku. Mimo dużego poziomu trudności prowadzenia hodowli międzygatunkowej, w dłuższej perspektywie jest to właściwa strategia prowadząca do zwiększania plonów roślin uprawnych (Rahman, 2013), dlatego też niniejsza rozprawa podejmuje tematykę identyfikacji oddalonych mieszańców *Brassicaceae* o podwyższonej odporności na szkodniki i choroby. Jest to istotny etap na drodze do poszerzania zasobów genowych rzepaku.

W pierwszym etapie badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej potwierdzono, iż mieszańce międzygatunkowe *Brassicaceae* posiadają podwyższoną odporność na *D. radicum* i *B. brassicae*, co jest zgodne z założoną hipotezą badawczą pracy. W wyniku prowadzonych obserwacji zidentyfikowano osiem kombinacji mieszańcowych o stabilnej na przestrzeni trzech lat badań odporności, przy czym na szczególną uwagę zasługuje *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649096 – genotyp utrzymujący odporność na oba analizowane szkodliwe owady. Warto też podkreślić, że inne potomstwa mieszańcowe, których rodzicem była *B. carinata* również wykazywały wysoki poziom odporności, choć nie we wszystkich latach. Podobne obserwacje zostały opisane przez zespół kanadyjskich badaczy, gdzie odporność *B. carinata* była relatywnie wysoka, ale wahała się istotnie między latami badań

(Dosdall i in., 2000). Wy tłumaczeniem takiego zjawiska może być wpływ środowiska (roku badań) na odporność, co potwierdza przeprowadzona analiza wariancji. Dynamika rozwoju populacji owadów może być modyfikowana przez temperaturę, wilgotność, opady oraz inne rodzaje stresu abiotycznego i biotycznego (Hervé, 2018; Ladányi i Horváth, 2010). Mnogość interakcji pomiędzy środowiskiem i genotypem może więc znacznie utrudniać poszukiwania odpornych genotypów.

Oprócz międzygatunkowych mieszańców, odporność na szkodniki analizowano również wśród zarejestrowanych odmian rzepaku. W ich przypadku także znaleziono obiecujące źródła odporności, które teoretycznie można wykorzystać w dalszej hodowli. Należy jednak wziąć pod uwagę wspomnianą wcześniej konieczność wzbogacania puli genowej rzepaku o nową zmienność genetyczną. W związku z tym, dobrym rozwiązaniem wydaje się być dywersyfikacja źródeł odporności i ich piramidyżacja, poprzez łączenie zidentyfikowanej wśród zarejestrowanych odmian *B. napus* odporności na suchą zgniliznę kapustnych z odpornością pozyskaną z pokrewnych gatunków *Brassicaceae*.

Jak wcześniej podkreślono, odporność roślin na owady może być zależna od warunków środowiskowych. Dlatego też, w kolejnym etapie badań analizowano związek pomiędzy zawartością składników mineralnych w roślinach *Brassicaceae* a odpornością na *D. radicum* i *B. brassicae*. Badania te miały na celu odkrycie dodatkowych czynników wpływających na genetyczną odpowiedź odpornościową. Założono, iż rośliny o optymalnym poziomie odżywienia powinny być mniej podatne na uszkodzenia, co udało się częściowo potwierdzić.

W toku prowadzonych analiz zaobserwowano negatywny związek pomiędzy akumulacją Ca i odpornością na śmietkę kapuścianą i mszycę kapuścianą. Wapń jest wtórnym przekaźnikiem uczestniczącym w transferze sygnałów ze środowiska, również tych związanych z odpowiedzią na zagrożenie (Lecourieux i in., 2006). W reakcji na różne bodźce, w tym światło, grawitację, stresy abiotyczne i biotyczne oraz hormony, cytozolowe oraz jądrowe stężenie jonów wapnia w roślinach gwałtownie wzrasta (Pauly i in., 2000; Reddy, 2001). Sygnały przekazywane przez wapń oraz aktywowaną przez wapń kalmodulinę modulują aktywność białek odpowiedzialnych m.in. za transport jonów, strukturę komórkową, ekspresję genów, co prowadzi do odpowiedzi fizjologicznej – np. śmierci komórki, zahamowania wzrostu lub tolerancji na stres (Yang i Poovaiah, 2003). Na podstawie badań będących przedmiotem pracy doktorskiej stwierdzono jednak, że w niektórych przypadkach zwiększona

zawartość wapnia wpłynęła negatywnie na odporność roślin, a dokładniej wiązało się to z obserwacją większych uszkodzeń powodowanych przez *D. radicum* i *B. brassicae*. Ten fenomen można wytłumaczyć toksycznością nadmiaru Ca bądź stresem osmotycznym (White i Broadley, 2003), który zaburzył wzrost roślin, a przez to upośledził ich zdolność odpowiedzi na szkodliwe owady.

Kolejnym ważnym składnikiem mineralnym, którego zasobność analizowano w trakcie prowadzonych badań była miedź. Ten pierwiastek jest elementem strukturalnym niektórych białek złożonych (metaloprotein), biorących udział w transporcie elektronów w chloroplastach i mitochondriach, a także w odpowiedzi roślin na stres oksydacyjny. Jony Cu działają jako kofaktor w enzymach, a na poziomie komórkowym miedź odgrywa istotną rolę między innymi w metabolizmie ściany komórkowej, oraz sygnalizacji w mechanizmach transportu białek transkrypcyjnych, fosforylacji oksydacyjnej i mobilizacji żelaza (Yruela, 2009). Pierwiastek ten jest ponadto wykorzystywany w środkach ochrony roślin – fungicydach i bakteriocydach (Torre i in., 2018). Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że w pewnych przypadkach zwiększona ilość miedzi w tkankach roślinnych może łączyć się z odpornością na mszycę kapuścianą, co mogłoby potencjalnie świadczyć o wpływie tego pierwiastka na kolejną - poza bakteriami i grzybami – grupę organizmów.

Dla pozostałych analizowanych składników odżywczych nie zauważono istotnych związków z odpornością na *D. radicum* i *B. brassicae*, co częściowo potwierdzają również obserwacje prowadzone przez innych autorów. Przykładowo, w badaniach Mochiah i in., stwierdzono, że zwiększone nawożenie NPK oraz obornikiem drobiowym nie wpłynęło w sposób istotny na występowanie *B. brassicae* (Mochiah i in., 2011). Z drugiej strony, wykazano, że zwiększone dawki azotu mogą pozytywnie wpływać na zdolność rozrodczą tego owada, choć nadmierne nawożenie azotem obniża płodność mszyc kapuścianych (Chesnais i in., 2016). W przypadku siarki natomiast, standardowa i podwójna dawka nawożenia zwiększyła ilość i wielkość osobników *D. radicum* żerujących na rzepaku (Marazzi i Städler, 2005).

Niewielka ilość zidentyfikowanych korelacji pomiędzy zawartością składników mineralnych i odpornością na śmietkę kapuścianą i mszycę kapuścianą, wskazuje na możliwe znaczenie wielu innych czynników, w tym czynnika genetycznego. Optymalne odżywienie roślin jest niezwykle istotne i jak wykazano może wpływać na odpowiedź roślin na obecność agrofagów, jednak kluczowe jest zapewnienie dobrej bazy genetycznej odporności. Idealnym

rozwiązaniem wydaje się łączenie aspektów środowiskowych (kontrola nawożenia i warunków gleby) z doбором odpornych odmian, co wpisuje się w koncepcję zrównoważonego rolnictwa. Podsumowując, zaobserwowane w trakcie realizacji badań korelacje pomiędzy czynnikami pozagenetycznymi (rok badań i poziom odżywienia) oraz odpornością na szkodliwe owady potwierdzają założoną hipotezę badawczą niniejszej rozprawy.

Kolejnym etapem prowadzonych prac była połowa ocena odporności badanych kombinacji mieszańcowych na suchą zgniliznę kapustnych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż poziom porażenia był zróżnicowany pomiędzy genotypami, a ponadto przeprowadzona ocena umożliwiła selekcję szesnastu najlepszych pod kątem odporności międzygatunkowych mieszańców. Wszystkie analizowane genotypy, których komponentem ojcowskim były gatunki *B. carinata*, *B. fruticulosa* lub *S. alba* charakteryzowały się najniższym poziomem porażenia. Można więc wnioskować, że to właśnie te gatunki powinny stać się obiektem szczególnej uwagi hodowców, gdyż mogą zawierać cenne geny odporności które przyczynią się do ograniczenia występowania choroby. Badania innych autorów w pełni potwierdzają to przypuszczenie (Marcroft i in., 2002; Niemann i in., 2016; Rimmer i van den Berg, 1992). Jak wspomniano w rozdziale wcześniejszym tej pracy, sucha zgnilizna kapustnych może istotnie ograniczyć wielkość plonu, ale co ważne może też wpłynąć na jego jakość. Genetyczne korelacje cech przeprowadzone na przestrzeni lat wykazały, że porażenie przez sprawcę suchej zgnilizny kapustnych wpływa na poziom kwasów tłuszczowych nasion, który jest istotnym parametrem oleju używanego w gastronomii (Fikere i in., 2020).

Odporność pionowa na *L. maculans* podlega interakcji genowej, w której każdemu genowi rośliny *R* odpowiada gen awirulencji *Avr* patogena (Howlett, 2004). Jak zauważono już wcześniej, tylko pięć genów rasowo-specyficznych zostało dotychczas sklonowanych, pozostałe nie są w pełni scharakteryzowane. Z racji tego, że do ich pierwotnej identyfikacji używano różnych systemów markerów (Neik i in., 2017), prawdopodobnym jest, iż niektóre z nich są zduplikowane (tj. ten sam gen opisany jako dwa różne). Jest to dodatkowym utrudnieniem dla hodowców, ponieważ może wystąpić sytuacja w której korzystają z tego samego źródła odporności przez kilka lat mimo zmiany odmiany rzepaku. Proces ten może przyspieszyć zjawisko wykształcania się odporności patogenu. Ten poważny problem może być stopniowo rozwiązywany poprzez poszukiwanie i wprowadzanie odporności ze zróżnicowanych źródeł – pokrewnych rzepakowi gatunków rodziny *Brassicaceae* (Amas i in., 2021).

Podsumowując, po przeanalizowaniu otrzymanych wyników dotyczących odporności na *D. radicum*, *B. brassicae* oraz *Leptosphaeria* spp., zidentyfikowano jeden genotyp, który utrzymywał się w statystycznie najlepszych grupach odporności zarówno na szkodniki jak i na analizowaną chorobę we wszystkich latach badań. Jest to międzygatunkowy mieszaniec *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649096. Warto zauważyć, że potencjał *B. carinata* jako donora istotnych cech został już wcześniej potwierdzony przez innych badaczy. Wybrane genotypy tego gatunku mogą być źródłem odporności zarówno na zgniliznę twardzikową (Navabi i in., 2010), czarną zgniliznę kapustnych (Tonguç i Griffiths, 2004), a także suchą zgniliznę kapustnych (Subramanian i in., 2005) i śmietkę kapuścianą (Dosdall i in., 2000). Włączenie gatunku *B. carinata* do krzyżowań oddalonych z komercyjnymi odmianami rzepaku okazało się być skuteczną metodą wprowadzenia kompleksowej odporności na stres biotyczny, co spełnia założenia tej pracy i potwierdza zakładaną hipotezę rozprawy.

Kolejnym etapem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej były analizy molekularne testowanego materiału roślinnego, które po pierwsze miały umożliwić ocenę zróżnicowania genetycznego potomstw mieszańcowych *Brassicaceae* oraz komponentów rodzicielskich, a ponadto umożliwić wykazanie przydatności wybranego zestawu markerów genetycznych do tego typu badań. Mimo, że wykorzystane do tego celu markery SSR zostały opracowane na bazie gatunku *B. rapa* zawierającego tylko genom A, udowodniono ich przydatność dla mieszańców *Brassicaceae* o zróżnicowanej kompozycji genomowej. Było to możliwe najprawdopodobniej dzięki obecności rejonów konserwatywnych w genomie różnych gatunków rodziny *Brassicaceae* (Suwabe i in., 2004), oraz dzięki licznej obecności rejonów mikrosatelitarnych i ich dużemu polimorfizmowi pomiędzy gatunkami (Thakur i in., 2017).

Wiadomym jest, iż na podstawie obliczonego współczynnika informacji o polimorfizmie można określić przydatność markera molekularnego do badania pokrewieństwa lub oceny zależności (Serrote i in., 2020). W niniejszej pracy dla dwunastu markerów molekularnych (mstg001, mstg004, mstg008, mstg012, mstg025, mstg028, mstg033, mstg038, mstg039, mstg042, mstg052, oraz mstg055) wartość współczynnika PIC wynosiła ponad 0,7 co świadczy o ich wysokiej użyteczności w detekcji zróżnicowania genetycznego (Berg i Singer, 1992).

Zgodnie z założeniami pracy, analiza materiału badawczego przy wykorzystaniu zestawu markerów SSR wspierana przez metody statystyczne pozwoliła na określenie dystansu genetycznego pomiędzy genotypami, jednak niektóre wyniki okazały się zaskakujące. *B. rapa*

ssp. *chinensis* (COBORU) oraz *B. fruticulosa* PI 649097 nie wykazały silnego związku z swoim potomstwem oraz z innymi osobnikami z tego samego gatunku, zarówno przy użyciu analizy UPGMA jak i PCA. Niski poziom pokrewieństwa pomiędzy przedstawicielami gatunku można wytłumaczyć różnym pochodzeniem geograficznym (Das i in., 1999), z kolei w przypadku rodzica i mieszańca przyczyną może być duży udział chromosomów drugiego rodzica w genomie potomka. W podobny sposób można wytłumaczyć zidentyfikowanie wysokiego podobieństwa genetycznego pomiędzy parami *B. napus* cv. Lisek × *B. fruticulosa* - PI649099 i *B. napus* cv. Californium × *S. alba* cv. Bamberka, oraz *B. napus* MS8 line × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08 006169 i *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. oleracea* var. *alboglabra*. Ich komponenty ojcowskie prezentują całkowicie odmienną strukturę genomową, a mimo tego wyznaczono między nimi mały dystans genetyczny. Tak jak powyżej, przyczyną może być nierówne odziedziczenie liczby chromosomów od obojga rodziców, z przewagą genomu *B. napus*. Wyjaśnić to można przez fakt, że rzepak posiada genom AACC, a jak wspomniano wcześniej, markery molekularne zostały opracowane na bazie gatunku zawierającego tylko genom A.

Analiza wyników otrzymanych na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych wykazała ponadto, że podobieństwo genetyczne badanych w niniejszej pracy genotypów mieściło się w przedziale 0,22 do 0,97. Szeroki obserwowany zakres podobieństwa świadczy o zróżnicowaniu i niejednorodności rodziny *Brassicaceae*, co potwierdzają badania innych autorów, którzy analizowali pokrewieństwo pomiędzy różnymi przedstawicielami roślin kapustnych (Kumari i in., 2009; Westman i Kresovich, 1999).

Kontynuacją badań dotyczących podobieństwa genetycznego roślin, było przeprowadzenie polowych ocen wybranych cech morfologicznych, które następnie skorelowano z markerami SSR. Według Yu i in., obserwacje fenotypowe roślin mogą być przydatne w określaniu pokrewieństwa genotypów, choć istotny jest też wpływ warunków środowiskowych na otrzymywane wyniki (Yu i in., 2005).

W wyniku przeprowadzonych obserwacji dotyczących morfologii roślin *Brassicaceae*, wykazano istnienie korelacji pomiędzy czterema parami cech. Trzy z nich, tj. długość łuszczyn i ilość nasion w łuszczynie, procentowy udział żółtych i bladożółtych kwiatów, oraz procentowy udział zielonych i fioletowych pędów nie są zaskoczeniem. Jednak wykazany silny związek pomiędzy występowaniem zjawiska protogynii i długością łuszczyn jest niespodziewany, gdyż dotychczas nie opisywano w literaturze związku pomiędzy tymi

cechami. Protogynia jest jednym z mechanizmów zapobiegania samozapyleniu (Friedman i Barrett, 2009), a jego korelacja z długością torebki nasiennej jest nieoczywista.

W efekcie przeprowadzonych badań mających na celu korelację obserwowanych cech z wynikami analiz molekularnych zidentyfikowano 22 markery SSR związane z charakterystykami morfologicznymi. Dwa markery (mstg004 i mstg027) generowały prążki wyjaśniające w ponad 40% występowanie białych i żółtych kwiatów. Z danych literaturowych wynika, że mechanizmy kontrolujące kolor kwiatów nie są w pełni rozpoznane, choć udało się zidentyfikować pojedyncze geny u *B. rapa* i *B. carinata* związane odpowiednio z występowaniem białych i żółtych kwiatów (Zhang i in., 2020; Zhang i in., 2018). W przypadku innego markera (mstg038), potwierdzono jego korelację z występowaniem fioletowych pędów. Barwa pędu związana jest z występowaniem antocyjanin i jest kontrolowana zarówno przez geny główne jak i loci cech ilościowych (Li i in., 2019; Tang i in., 2017). Jednak na podstawie przeprowadzonych badań nie można stwierdzić z jakim rejonem lub genem są związane powyższe markery. Mimo tego, zgodnie z założoną hipotezą badawczą pracy, mogą one być użyteczne w prowadzeniu selekcji pod kątem opisanych cech. Należy jednak pamiętać, że cechy morfologiczne mogą być modyfikowane przez czynniki środowiskowe takie jak np. dostępność wody (El-Soda i in., 2014; Khalid i in., 2010; Song i in., 1995).

Podczas kolejnego etapu analiz prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, testowano markery związane z rejonami genomu odpowiadającymi za odporność na *L. maculans* na grupie mieszańców oddalonych i gatunków *Brassicaceae*. Podstawowym celem tego badania nie była identyfikacja konkretnych genów, lecz ocena przydatności markerów wybranych na podstawie danych literaturowych w prowadzeniu selekcji.

W przypadku niektórych markerów obserwowano występowanie niespecyficznego produktu, bądź też produktów PCR, które były połączeniem wzoru prążkowego oczekiwanego zarówno dla podatnej jak i odpornej rośliny. Produkty niespecyficzne mogą być efektem niewystarczającej specyficzności starterów, które przyłączyły się w wielu miejscach genomu (Shigemori i in., 2005). Przyczyną otrzymania innych niż oczekiwane produkty może być także korzystanie z innego materiału badawczego. Markery Xol12-e03 oraz Xna12-a02a były pierwotnie testowane na liniach podwojonych haploidów rzepaku, z kolei marker Ind10-12 walidowano na genotypach powstałych z krzyżowania wstecznego *B. napus* (Larkan i in., 2013; Raman i in., 2012a). Genotypy mieszańcowe charakteryzują się zdecydowanie większym zróżnicowaniem genomowym, co mogło wpłynąć na uzyskane wyniki. Mimo tego, w

przypadku markerów Bol050029, BLRC InDel, Ind10-12 oraz pRP1513 udało się zidentyfikować osobniki zawierające gen/rejon odporności, choć nie dla wszystkich genotypów obserwowano produkt amplifikacji. Według niektórych autorów (Ferdous i in., 2019), marker Bol040045 związany z loci odporności na chromosomie A, nie umożliwia wykrycia polimorfizmu amplifikowanego regionu. Jednak w toku prowadzonych badań udało się wykryć produkt o innej niż spodziewana wielkości dla *S. alba*, choć prążek nie pojawił się u genotypów potomnych. Przyczyną zaobserwowanego polimorfizmu może być różnica w sekwencji flankowanego przez specyficzne startery fragmentu genomu. Możliwe, że jest to związane bezpośrednio z odpornością genotypu na *L. maculans*, choć to przypuszczenie należałoby potwierdzić na podstawie dalszych badań, np. sekwencjonowania polimorficznego produktu PCR.

Podsumowując, analizy molekularne wykonane na genotypach o zróżnicowanej kompozycji genomowej, umożliwiły ocenę przydatności dostępnych w literaturze markerów w selekcji mieszańców oddalonych pod kątem występowania genów odporności. Choć zbadane markery można ocenić jako potencjalnie użyteczne, to niezbędne są dalsze badania, które bezsprzecznie potwierdzą ich skuteczność.

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki są zbiorem istotnych danych na temat odporności międzygatunkowych mieszańców na *D. radicum*, *B. brassicae* i *Leptosphaeria* spp., oraz dostarczają informacji na temat sposobów prowadzenia efektywnej analizy cech fenotypowych i genotypowych. Hodowla odpornościowa jest skuteczną i przyjazną środowisku metodą ochrony rzepaku przed szkodliwymi czynnikami biotycznymi, a włączenie do procesu hodowlanego mieszańców oddalonych *Brassicaceae* o zweryfikowanej, podwyższonej odporności na szkodniki i choroby może skutkować otrzymaniem nowych udoskonalonych odmian. Ponadto, uprawa odpornych na agrofagi roślin, może pomóc w ograniczeniu wykorzystywania insektycydów i fungicydów zgodnie z obecnymi wymogami prawnymi i tendencjami społecznymi. Należy również podkreślić, iż wsparcie hodowli metodami molekularnymi może znacznie przyspieszyć selekcję genotypów pod względem ich odrębności genetycznej i cech użytkowych, co umożliwi szybszą reakcję na potrzeby rynku nasiennego poprzez skrócenie procesu otrzymywania nowych odmian.

8. Wnioski

W toku prowadzonych badań udało się zrealizować wszystkie założone cele. Poniżej wypunktowano najważniejsze wnioski podsumowujące wyniki otrzymane w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

1. Zastosowanie krzyżowania międzygatunkowego jest skutecznym sposobem wzbogacania puli genowej rzepaku o nowe źródła odporności.
2. Wśród analizowanych potomstw mieszańcowych zidentyfikowano pięć kombinacji mieszańcowych o utrzymującej się podwyższonej odporności na śmietkę kapuścianą (*D. radicum*), cztery o podwyższonej, stabilnej odporności na mszycę kapuścianą (*B. brassicae*) oraz szesnaście potomstw mieszańcowych z podwyższoną odpornością na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria* spp.). Wyselekcjonowane kombinacje mieszańcowe mogą zostać wykorzystane w dalszych procesach hodowlanych.
3. Kombinacja mieszańcowa *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649096 nosiła stabilną i wysoką odporność na *D. radicum*, *B. brassicae* oraz *Leptosphaeria* spp., co czyni ją wyjątkowo cenną.
4. Istnieje pozytywna korelacja pomiędzy odpornością mieszańców oddalonych na *B. Brassicae* a zawartością miedzi w tkankach, oraz ujemna zależność pomiędzy odpornością na *D. radicum* i *B. brassicae* a poziomem wapnia w tkankach.
5. Testowany zestaw 15 markerów SSR umożliwia detekcję polimorfizmu rejonów mikrosatelitarnych w rodzinie *Brassicaceae* co czyni go użytecznym narzędziem w ocenie dystansu genetycznego.
6. Markery mstg004 oraz mstg027 są istotnie związane z rejonami genomu regulującymi kolor kwiatów, a marker mstg038 jest skorelowany z kolorem pędu analizowanych mieszańców *Brassicaceae*. Te markery mogą być przydatne w molekularnej selekcji materiału roślinnego pod względem wskazanych cech.
7. Markery związane z odpornością na *L. maculans* można potencjalnie wykorzystać w selekcji mieszańców oddalonych. Szczególnie przydatne mogą okazać się markery Bol050029, BLRC InDel, Ind10-12 oraz pRP1513, których zastosowanie umożliwiło otrzymanie oczekiwanych produktów reakcji i identyfikację genotypów zawierających geny/rejony odporności.

9. Spis literary

1. Al-Shehbaz, I. A. (2011). Brassicaceae (Mustard Family). W *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
2. Amas, J., Anderson, R., Edwards, D., Cowling, W., & Batley, J. (2021). Status and advances in mining for blackleg (*Leptosphaeria maculans*) quantitative resistance (QR) in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics*, *134*(10), 3123–3145.
3. Amas, J. C., Thomas, W. J. W., Zhang, Y., Edwards, D., & Batley, J. (2022). Key Advances in the New Era of Genomics-Assisted Disease Resistance Improvement of *Brassica* Species. *Phytopathology*, PHYTO-08-22-0289-FI.
4. Andersen, S. B. (2013). *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. InTech.
5. Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., & Sorrells, M. E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, *36*(1), 181–186.
6. Araus, J. L., & Cairns, J. E. (2014). Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science*, *19*(1), 52–61.
7. Bala, K., Sood, A. K., Pathania, V. S., & Thakur, S. (2018). Effect of plant nutrition in insect pest management: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *7*(4), 2737–2742.
8. Bardsley, C. E., & Lancaster, J. D. (1960). Determination of Reserve Sulfur and Soluble Sulfates in Soils. *Soil Science Society of America Journal*, *24*(4), 265–268.
9. Berg, P., & Singer, M. (1992). *Dealing with Genes: The Language of Heredity*. University Science Books.
10. Bocianowski, J., Kozak, M., Liersch, A., & Bartkowiak-Broda, I. (2011). A heuristic method of searching for interesting markers in terms of quantitative traits. *Euphytica*, *181*(1), 89–100.

11. Brachaczek, A., Kaczmarek, J., & Jedryczka, M. (2021). Warm and Wet Autumns Favour Yield Losses of Oilseed Rape Caused by Phoma Stem Canker. *Agronomy*, *11*(6), Article 6.
12. Brown, J., & Caligari, P. (2011). *An Introduction to Plant Breeding*. John Wiley & Sons.
13. Bruck, D. J., Snelling, J. E., Dreves, A. J., & Jaronski, S. T. (2005). Laboratory bioassays of entomopathogenic fungi for control of *Delia radicum* (L.) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *89*(2), 179–183.
14. Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., & Andrivon, D. (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, *185*(1), 285–299.
15. Butters, B., & Chenery, E. M. (1959). A rapid method for the determination of total sulphur in soils and plants. *Analyst*, *84*(997), 239–245.
16. Cai, X., Huang, Y., Jiang, D., Fitt, B. D. L., Li, G., & Yang, L. (2018). Evaluation of oilseed rape seed yield losses caused by *Leptosphaeria biglobosa* in central China. *European Journal of Plant Pathology*, *150*(1), 179–190.
17. Camussi, A., Ottaviano, E., Calinski, T., & Kaczmarek, Z. (1985). Genetic Distances Based On Quantitative Traits. *Genetics*, *111*(4), 945–962.
18. Cantila, A., Thomas, W., Mohd Saad, N. S., Severn-Ellis, A., Anderson, R., Bayer, P., Edwards, D., Wouw, A., & Batley, J. (2023). Identification of candidate genes for *LepRI* resistance against *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, *14*.
19. Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A. P., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C., Samans, B., Corrêa, M., Da Silva, C., Just, J., Falentin, C.,

Koh, C. S., Le Clainche, I., Bernard, M., Bento, P., Noel, B., ... Wincker, P. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 345(6199), 950–953.

20. Chen, C. Y., & Séguin-Swartz, G. (1999). Reaction of wild crucifers to *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg of crucifers. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(4), 361–367.

21. Chesnais, Q., Couty, A., Catterou, M., & Ameline, A. (2016). Cascading effects of N input on tritrophic (plant–aphid–parasitoid) interactions. *Ecology and Evolution*, 6(21), 7882–7891.

22. Chrustek, A., Hołyńska-Iwan, I., Dziembowska, I., Bogusiewicz, J., Wróblewski, M., Cwynar, A., & Olszewska-Słonina, D. (2018). Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. *Medicina*, 54(4), Article 4.

23. Connolly, C. (2013). The risk of insecticides to pollinating insects. *Communicative & Integrative Biology*, 6(5), e25074.

24. Costello, M. J., & Altieri, M. A. (1995). Abundance, growth rate and parasitism of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on broccoli grown in living mulches. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 52(2), 187–196.

25. Dam, N. M. van, & Raaijmakers, C. E. (2006). Local and systemic induced responses to cabbage root fly larvae (*Delia radicum*) in *Brassica nigra* and *B. oleracea*. *CHEMOECOLOGY*, 16(1), 17–24.

26. Das, S., Rajagopal, J., Bhatia, S., Srivastava, P. S., & Lakshmikumaran, M. (1999). Assessment of genetic variation within *Brassica campestris* cultivars using amplified fragment length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA markers. *Journal of Biosciences*, 24(4), 433–440.

27. Dawidziuk, A., Kaczmarek, J., & Jedryczka, M. (2012). The effect of winter weather conditions on the ability of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* to release ascospores. *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 329–343.
28. De Jeu, M. J., & Jacobsen, E. (1995). Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica*, 86(1), 15–23.
29. DeVerna, J. W., Myers, J. R., & Collins, G. B. (1987). Bypassing prefertilization barriers to hybridization in *Nicotiana* using in vitro pollination and fertilization. *Theoretical and Applied Genetics*, 73(5), 665–671.
30. Dossall, L. M., Good, A., Keddie, B. A., Ekuere, U., & Stringam, G. (2000). Identification and evaluation of root maggot (*Delia* spp.) (Diptera: Anthomyiidae) resistance within *Brassicaceae*. *Crop Protection*, 19(4), 247–253.
31. EFSA. (2019, sierpień 28). *Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos*. (<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5809>)
32. Ellis, P. R., Singh, R., Pink, D. A. C., Lynn, J. R., & Saw, P. L. (1996). Resistance to *Brevicoryne brassicae* in horticultural brassicas. *Euphytica*, 88(2), 85–96.
33. El-Soda, M., Boer, M. P., Bagheri, H., Hanhart, C. J., Koornneef, M., & Aarts, M. G. M. (2014). Genotype–environment interactions affecting preflowering physiological and morphological traits of *Brassica rapa* grown in two watering regimes. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 697–708.
34. Fasoula, D. A., Ioannides, I. M., & Omirou, M. (2020). Phenotyping and Plant Breeding: Overcoming the Barriers. *Frontiers in Plant Science*, 10.
35. Ferdous, M. J., Hossain, M. R., Park, J.-I., Robin, A. H. K., Jesse, D. M. I., Jung, H.-J., Kim, H.-T., & Nou, I.-S. (2019). Inheritance Pattern and Molecular Markers for Resistance to Blackleg Disease in Cabbage. *Plants*, 8(12), Article 12.

36. Fikere, M., Barbulescu, D. M., Malmberg, M. M., Maharjan, P., Salisbury, P. A., Kant, S., Panozzo, J., Norton, S., Spangenberg, G. C., Cogan, N. O. I., & Daetwyler, H. D. (2020). Genomic Prediction and Genetic Correlation of Agronomic, Blackleg Disease, and Seed Quality Traits in Canola (*Brassica napus* L.). *Plants*, 9(6), Article 6.
37. Fitt, B. D. L., Hu, B. C., Li, Z. Q., Liu, S. Y., Lange, R. M., Kharbanda, P. D., Butterworth, M. H., & White, R. P. (2008). Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathology*, 57(4), 652–664.
38. Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., & Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317–342.
39. Friedman, J., & Barrett, S. C. H. (2009). The consequences of monoecy and protogyny for mating in wind-pollinated *Carex*. *New Phytologist*, 181(2), 489–497.
40. Gawliński, S., Ostrowska, A., & Szczubiałka, Z. (1991). *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin. Katalog*. Wydaw. Inst. Ochr. Środ.
41. Gupta, S. K., & Pratap, A. (2007). History, Origin, and Evolution. W *Advances in Botanical Research* (T. 45, s. 1–20). Academic Press.
42. Gwiazdowski, R. (2008). Hamowanie wzrostu *Leptosphaeria maculans* i *Leptosphaeria biglobosa* przez wybrane fungicydy w testach płytkowych. *Rośliny Oleiste - Oilseed Crops*, 29(1).
43. Haddadi, P., Larkan, N. J., Van deWouw, A., Zhang, Y., Xiang Neik, T., Beynon, E., Bayer, P., Edwards, D., Batley, J., & Borhan, M. H. (2022). *Brassica napus* genes *Rlm4* and *Rlm7*, conferring resistance to *Leptosphaeria maculans*, are alleles of the *Rlm9* wall-associated kinase-like resistance locus. *Plant Biotechnology Journal*, 20(7), 1229–1231.

44. Haider, N. (2013). *Haider N (2013). Recent Advances in Phylogenetic Relationships among the U-triangle Six Brassica L. Species. In: C.P. Malik, G.S. Sanghera, S.H. Wani, P. Sharma (eds.). Crop improvement: biotechnological, physiological and nanotechnological approaches. Jaipur: Aavishkar Publishers, Distributors, pp. 134. (s. 134).*
45. Haig, D., & Westoby, M. (1991). Genomic Imprinting in Endosperm: Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 333(1266), 1–13.
46. Hasanuzzaman, M. (2020). *The Plant Family Brassicaceae*. Springer Nature Singapore Pte Ltd.
47. Heath, D. W., & Earle, E. D. (1996). Resynthesis of rapeseed (*Brassica napus* L.): A comparison of sexual versus somatic hybridization. *Plant Breeding*, 115(5), 395–401.
48. Hervé, M. R. (2018). Breeding for insect resistance in oilseed rape: Challenges, current knowledge and perspectives. *Plant Breeding*, 137(1), 27–34.
49. Howlett, B. J. (2004). Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(3), 245–252.
50. Huang, Y. J., Jestin, C., Welham, S. J., King, G. J., Manzanares-Dauleux, M. J., Fitt, B. D. L., & Delourme, R. (2016). Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics*, 129(1), 169–180.
51. Huang, Y.-J., Sidique, S. N. M., Karandeni Dewage, C. S., Gajula, L. H., Mitroussia, G. K., Qi, A., West, J. S., & Fitt, B. D. (2022). Effective control of *Leptosphaeria maculans* increases importance of *L. biglobosa* as a cause of phoma stem canker epidemics on oilseed rape. *Pest Management Science*, n/a(n/a).

52. Jacques, N., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., & Laval, V. (2021). New specific quantitative real-time PCR assays shed light on the epidemiology of two species of the *Leptosphaeria maculans*–*Leptosphaeria biglobosa* species complex. *Plant Pathology*, *70*(3), 643–654.
53. Jedryczka, M. (2007). Epidemiology and damage caused by stem canker of oilseed rape in Poland. *Phytopathologia Polonica*, *45*.
54. Jestin, C., Bardol, N., Lodé, M., Duffé, P., Domin, C., Vallée, P., Mangin, B., Manzanares-Dauleux, M. J., & Delourme, R. (2015). Connected populations for detecting quantitative resistance factors to phoma stem canker in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding*, *35*(8), 167.
55. Kathe, E., Quezada-Martinez, D., Kathe, E. I., Vasquez-Teuber, P., & Mason, A. S. (2019). Interspecific Hybridization for *Brassica* Crop Improvement. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, *1*(1).
56. Khalid, M., Farhatullah, D., Khan, Dr. N., Din, R., Khan, M., Akmal, M., & Ali, N. (2010). Linkage of morphological markers in *Brassica*. *Pakistan Journal of Botany*, *42*, 2995–3000.
57. Klingen, I., Hajek, A., Meadow, R., & Renwick, J. A. A. (2002). Effect of brassicaceous plants on the survival and infectivity of insect pathogenic fungi. *BioControl*, *47*(4), 411–425.
58. Koch, E., Badawy, H. M. A., & Hoppe, H. H. (1989). Differences Between Aggressive and Non-Aggressive Single Spore Lines of *Leptosphaeria maculans* in Cultural Characteristics and Phytotoxin Production. *Journal of Phytopathology*, *124*(1), 52–62.
59. Kogan, M., & Ortman, E. F. (1978). Antixenosis—A New Term Proposed to Define Painter’s “Nonpreference” Modality of Resistance¹. *Bulletin of the Entomological Society of America*, *24*(2), 175–176.

60. Kole, C. (Ed.). (2011). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Oilseeds*. Springer.
61. Kumari, P., Rathore, R. K. S., Yadav, R., Singh, K. P., & Kumar, R. (2009). Utility of SSR and ISSR markers for assessment of genetic diversity in Brassicas and their related genera. *Progressive Agriculture*, 9(1), 71–78.
62. Kutcher, H., Fernando, D., Turkington, T., & McLaren, D. (2011). Best Management Practices for Blackleg Disease of Canola. *Prairie Soils and Crops*, 4, 122–134.
63. Ladányi, M., & Horváth, L. (2010). A review of the potential climate change impact on insect populations—General and agricultural aspects. *Applied Ecology and Environmental Research*, 8(2), 143–152.
64. Larkan, N. J., Lydiate, D. J., Parkin, I. a. P., Nelson, M. N., Epp, D. J., Cowling, W. A., Rimmer, S. R., & Borhan, M. H. (2013). The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector *AVRLM1*. *New Phytologist*, 197(2), 595–605.
65. Lecourieux, D., Ranjeva, R., & Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, 171(2), 249–269.
66. Leflon, M., Brun, H., Eber, F., Delourme, R., Lucas, M. O., Vallée, P., Ermel, M., Balesdent, M. H., & Chèvre, A. M. (2007). Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(7), 897–906.
67. Li, G.-H., Chen, H.-C., Liu, J.-L., Luo, W.-L., Xie, D.-S., Luo, S.-B., Wu, T.-Q., Akram, W., & Zhong, Y.-J. (2019). A high-density genetic map developed by specific-locus amplified fragment (SLAF) sequencing and identification of a locus controlling anthocyanin pigmentation in stalk of Zicaitai (*Brassica rapa* L. ssp. *Chinensis* var. *Purpurea*). *BMC Genomics*, 20(1), 343.

68. Li, H., Barbetti, M. J., & Sivasithamparam, K. (2005). Hazard from reliance on cruciferous hosts as sources of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease. *Field Crops Research*, *91*(2), 185–198.
69. Lim, K. Y., Matyášek, R., Lichtenstein, C. P., & Leitch, A. R. (2000). Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma*, *109*(4), 245–258.
70. Lu, Q., Sun, Y., Ares, I., Anadón, A., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., Wang, X., & Martínez, M.-A. (2019). Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research*, *170*, 260–281.
71. Mahalanobis, P. C. (2018). On the Generalized Distance in Statistics. *Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series A (2008-)*, *80*, S1–S7.
72. Majka, J., Majka, M., Kwiatek, M., & Wiśniewska, H. (2017). Similarities and differences in the nuclear genome organization within *Pooideae* species revealed by comparative genomic in situ hybridization (GISH). *Journal of Applied Genetics*, *58*(2), 151–161.
73. Majka, J., Zwierzykowski, Z., Majka, M., & Kosmala, A. (2018). Karyotype reshufflings of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrids. *Protoplasma*, *255*(2), 451–458.
74. Marazzi, C., & Städler, E. (2005). Influence of sulphur plant nutrition on oviposition and larval performance of the cabbage root fly. *Agricultural and Forest Entomology*, *7*(4), 277–282.
75. Marcroft, S. J., Wratten, N., Purwantara, A., Salisbury, P. A., Potter, T. D., Barbetti, M. J., Khangura, R., & Howlett, B. J. (2002). Reaction of a range of *Brassica* species under Australian conditions to the fungus, *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *42*(5), 587–594.

76. Matuszczak, M. (2013). Markery molekularne w badaniach rzepaku (*Brassica napus* L.). I. Przegląd stosowanych technik. *Rośliny Oleiste - Oilseed Crops*, 34(2).
77. McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 349–379.
78. Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282(5389), 662–682.
79. Mitrović, P. M., Stamenković, O. S., Banković-Ilić, I., Djalović, I. G., Nježić, Z. B., Farooq, M., Siddique, K. H. M., & Veljković, V. B. (2020). White Mustard (*Sinapis alba* L.) Oil in Biodiesel Production: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 11.
80. Mochiah, M. B., Baidoo, P. K., & Owusu-Akyaw, M. (2011). Influence of different nutrient applications on insect populations and damage to cabbage. *Journal of Applied Biosciences*, 38, 2564–2572.
81. Momotaz, A., Kato, M., & Kakihara, F. (1998). Production of intergeneric hybrids between *Brassica* and *Sinapis* species by means of embryo rescue techniques. *Euphytica*, 103(1), 123–130.
82. Mrówczyński, M., Korbas, M., Praczyk, T., Gwiazdowski, R., Jajor, E., Pruszyński, G., & Wachowiak, H. (2009). Ochrona roślin w integrowanej produkcji rzepaku. *Rośliny Oleiste - Oilseed Crops*, 30(2).
83. Navabi, Z. K., Strelkov, S. E., Good, A. G., Thiagarajah, M. R., & Rahman, M. H. (2010). *Brassica* B-genome resistance to stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in a doubled haploid population of *Brassica napus* × *Brassica carinata*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(2), 237–246.

84. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269–5273.
85. Neik, T. X., Barbetti, M. J., & Batley, J. (2017). Current Status and Challenges in Identifying Disease Resistance Genes in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 8.
86. Nelson, R., Wiesner-Hanks, T., Wissner, R., & Balint-Kurti, P. (2018). Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics*, 19(1), Article 1.
87. Niemann, J., Kaczmarek, J., Wojciechowski, A., & Jędryczka, M. (2016). Resistance to stem canker (*Leptosphaeria* spp.) in interspecific *Brassica* hybrids. *Progress in Plant Protection*, 56(2), 245–250.
88. Niemann, J., Wojciechowski, A., & Janowicz, J. (2012). Broadening the variability of quality traits in rapeseed through interspecific hybridization with an application of immature embryo culture. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 93(2).
89. Painter, R. H. (1968). *Insect resistance in crop plants*. Lawrence, Kansas : The University Press of Kansas.
90. Pauly, N., Knight, M. R., Thuleau, P., van der Luit, A. H., Moreau, M., Trewavas, A. J., Ranjeva, R., & Mazars, C. (2000). Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature*, 405(6788), Article 6788.
91. Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295.
92. Pereira, A. J., Cardoso, I. M., Araújo, H. D., Santana, F. C., Carneiro, A. P. S., Coelho, S. P., & Pereira, F. J. (2019). Control of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae)

with extracts of *Agave americana* var. *Marginata* Trel. in *Brassica oleracea* crops. *Annals of Applied Biology*, 174(1), 14–19.

93. Plieske, J., & Struss, D. (2001a). Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(5), 689–694.

94. Plieske, J., & Struss, D. (2001b). STS markers linked to *Phoma* resistance genes of the *Brassica* B-genome revealed sequence homology between *Brassica nigra* and *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(4), 483–488.

95. Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215–222.

96. Pushpa, H. D., Yadava, D. K., Singh, N., Vasudev, S., Saini, N., Muthusamy, V., & Prabhu, K. V. (2016). Validation of molecular markers linked to low glucosinolate QTLs for marker assisted selection in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss). *INDIAN JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING*, 76(01), Article 01.

97. Quazi, M. H. (1988). Interspecific hybrids between *Brassica napus* L. and *B. oleracea* L. developed by embryo culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 309–318.

98. Rahaman, Md. M., Chen, D., Gillani, Z., Klukas, C., & Chen, M. (2015). Advanced phenotyping and phenotype data analysis for the study of plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 6.

99. Rahman, H. (2013). Review: Breeding spring canola (*Brassica napus* L.) by the use of exotic germplasm. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(3), 363–373.

100. Raman, R., Taylor, B., Lindbeck, K., Coombes, N., Barbulescu, D., Salisbury, P., Raman, H. (2012a). Molecular mapping and validation of *Rlm1* gene for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola (*Brassica napus* L.). *Crop and Pasture Science*, 63(10), 1007–1017.

101. 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. (2012b). Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *125*(2), 405–418.
102. Rashid, M. H., Zou, Z., & Fernando, W. G. D. (2018). Development of molecular markers linked to the *Leptosphaeria maculans* resistance gene *Rlm6* and inheritance of SCAR and CAPS markers in *Brassica napus* × *Brassica juncea* interspecific hybrids. *Plant Breeding*, *137*(3), 402–411.
103. Reddy, A. S. N. (2001). Calcium: Silver bullet in signaling. *Plant Science*, *160*(3), 381–404.
104. Rencher, A. C. (1992). Interpretation of Canonical Discriminant Functions, Canonical Variates, and Principal Components. *The American Statistician*, *46*(3), 217–225.
105. Rimmer, S. R., & van den Berg, C. G. J. (1992). Resistance of oilseed *Brassica* spp. To blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *14*(1), 56–66.
106. Ripley, V. L., & Arnison, P. G. (1990). Hybridization of *Sinapis alba* L. and *Brassica napus* L. via Embryo Rescue. *Plant Breeding*, *104*(1), 26–33.
107. Rostami, M., Zamani, A. A., Goldasteh, S., Shoushtari, R. V., & Kheradmand, K. (2012). Influence of Nitrogen Fertilization on Biology of *Aphis Gossypii* (Hemiptera: Aphididae) Reared on *Chrysanthemum Indicum* (Asteraceae). *Journal of Plant Protection Research*.
108. Saini, N., Singh, N., Kumar, A., Vihan, N., Yadav, S., Vasudev, S., & Yadava, D. K. (2016). Development and validation of functional CAPS markers for the FAE genes in *Brassica juncea* and their use in marker-assisted selection. *Breeding Science*, *66*(5), 831–837.

109. Seidler-Łożykowska, K., Bocianowski, J., & Król, D. (2013). The evaluation of the variability of morphological and chemical traits of the selected lemon balm (*Melissa officinalis* L.) genotypes. *Industrial Crops and Products*, 49, 515–520.
110. Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., Rabaiolli, S. M. dos S., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, 726, 144175.
111. Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611.
112. Sharma, B. B., Kalia, P., Yadava, D. K., Singh, D., & Sharma, T. R. (2016). Genetics and Molecular Mapping of Black Rot Resistance Locus *Xcalbc* on Chromosome B-7 in Ethiopian Mustard (*Brassica carinata* A. Braun). *PLOS ONE*, 11(3), e0152290.
113. Shigemori, Y., Mikawa, T., Shibata, T., & Oishi, M. (2005). Multiplex PCR: Use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Research*, 33(14), e126.
114. Shiranifar, B., Hobson, N., Kebede, B., Yang, R.-C., & Rahman, H. (2020). Potential of rutabaga (*Brassica napus* var. *Napobrassica*) gene pool for use in the breeding of *B. napus* canola. *Crop Science*, 60(1), 157–171.
115. Shoemaker, R. A., & Brun, H. (2001). The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany*, 79(4), 412–419.
116. Shuhang, W., Voorrips, R. E., Steenhuis-Broers, G., Vosman, B., & van Loon, J. J. A. (2016). Antibiosis resistance against larval cabbage root fly, *Delia radicum*, in wild *Brassica*-species. *Euphytica*, 211(2), 139–155.
117. Siemens, J. (2002). Interspecific Hybridisation between Wild Relatives and *Brassica napus* to Introduce New Resistance Traits into the Oilseed Rape Gene Pool. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*.

118. Singh, R., Ellis, P. R., Pink, D. a C., & Phelps, K. (1994). An investigation of the resistance to cabbage aphid in *brassica* species. *Annals of Applied Biology*, 125(3), 457–465.
119. Smith, C. M., & Chuang, W.-P. (2014). Plant resistance to aphid feeding: Behavioral, physiological, genetic and molecular cues regulate aphid host selection and feeding. *Pest Management Science*, 70(4), 528–540.
120. Snowdon, R. J., Köhler, W., Friedt, W., & Köhler, A. (1997). Genomic in situ hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(8), 1320–1324.
121. Song, K., Slocum, M. K., & Osborn, T. C. (1995). Molecular marker analysis of genes controlling morphological variation in *Brassica rapa* (syn. *Campestris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 90(1), 1–10.
122. Spasibionek, S., Mikołajczyk, K., Ćwiek–Kupczyńska, H., Piętka, T., Krótka, K., Matuszczak, M., Nowakowska, J., Michalski, K., & Bartkowiak-Broda, I. (2020). Marker assisted selection of new high oleic and low linolenic winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) inbred lines revealing good agricultural value. *PLOS ONE*, 15(6), e0233959.
123. Sprague, S. J., Balesdent, M.-H., Brun, H., Hayden, H. L., Marcroft, S. J., Pinochet, X., Rouxel, T., & Howlett, B. J. (2006). Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. W B. D. L. Fitt, N. Evans, B. J. Howlett, & B. M. Cooke (Red.), *Sustainable strategies for managing Brassica napus (oilseed rape) resistance to Leptosphaeria maculans (phoma stem canker): Under the aegis of a European-Australian workshop held at INRA, Versailles, France, in association with the EU SECURE project (QLK5-CT-2002-01813)* (s. 33–40). Springer Netherlands.

124. Stadler, E., R. Baur, & R. de Jong. (2002). Sensory basis of host-plant selection: In search of the „fingerprints” related to oviposition of the cabbage root fly. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 48, 265–280.
125. Subramanian, B., Bansal, V. K., & Kav, N. N. V. (2005). Proteome-Level Investigation of *Brassica carinata*-Derived Resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 313–324.
126. Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Ohyama, A., Hirai, M., & Fukuoka, H. (2004). Characteristics of Microsatellites in *Brassica rapa* Genome and their Potential Utilization for Comparative Genomics in *Cruciferae*. *Breeding Science*, 54(2), 85–90.
127. Tamura, K., Nishioka, M., Hayashi, M., Zhang, Z., Lian, C., Hougetsu, T., & Harada, K. (2005). Development of Microsatellite Markers by ISSR-suppression-PCR Method in *Brassica rapa*. *Breeding Science*, 55(2), 247–252.
128. Tang, Q., Tian, M., An, G., Zhang, W., Chen, J., & Yan, C. (2017). Rapid identification of the purple stem (Ps) gene of Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *Alboglabra*) in a segregation distortion population by bulked segregant analysis and RNA sequencing. *Molecular Breeding*, 37(12), 153.
129. Thakur, A. K., Singh, K. H., Singh, L., Nanjundan, J., Khan, Y. J., & Singh, D. (2017). SSR marker variations in *Brassica* species provide insight into the origin and evolution of *Brassica* amphidiploids. *Hereditas*, 155, 6.
130. Thomas, W. J. W., Amas, J. C., Wu, T., Cantila, A. Y., Ton, L. B., & Batley, J. (2022). The Impact of Genomics in Identifying Blackleg Disease Resistance Genes in Canola. *Next-Generation Sequencing and Agriculture*, 24–38.
131. Tonguç, M., & Griffiths, P. D. (2004). Evaluation of *Brassica carinata* Accessions for Resistance to Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*). *HortScience*, 39(5), 952–954.

132. Torre, A. la, Iovino, V., & Caradonia, F. (2018). Copper in plant protection: Current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(2), 201–236.
133. U, N. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7, 389–452.
134. Walczak, F., Bandyk, A., Jakubowska, M., Roik, K., Tratwal, A., Wielopolan, B., Złotkowski, J., & PIORiN, I. W. I. (2014). Evaluation of damage to main crops caused by the most important agrophages in Poland in 2013. *Progress in Plant Protection*, 54(4), 491–514.
135. Wang, R., Ripley, V. L., & Rakow, G. (2007). Pod shatter resistance evaluation in cultivars and breeding lines of *Brassica napus*, *B. juncea* and *Sinapis alba*. *Plant Breeding*, 126(6), 588–595.
136. Westman, A. L., & Kresovich, S. (1999). Simple sequence repeat (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. *Euphytica*, 109(2), 85–92.
137. White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487–511.
138. Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Lumbsch, H. T., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Ekanayaka, A. H., Tian, Q., & Phookamsak, R. (2018). Outline of *Ascomycota*: 2017. *Fungal Diversity*, 88(1), 167–263.
139. Wojciechowski, A., Springer, B., Pieskiewicz, M., & Maslankiewicz, J. (2002). Przełamywanie barier prezygotycznych w krzyżowaniach oddalonych *Brassica*. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 488(1).

140. Wolko, Ł., Bocianowski, J., Antkowiak, W., & Słomski, R. (2014). Genetic diversity and population structure of wild pear (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.) in Poland. *Open Life Sciences*, 10(1).
141. Wouw, A. P. V. de, Elliott, V. L., Chang, S., López-Ruiz, F. J., Marcroft, S. J., & Idnurm, A. (2017). Identification of isolates of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans* with resistance to the triazole fungicide fluquinconazole using a novel In Planta assay. *PLOS ONE*, 12(11), e0188106
142. Wouw, A. P. V. de, Scanlan, J. L., Marcroft, S. J., Smith, A. J., Sheedy, E. M., Perndt, N. W., Harrison, C. E., Forsyth, L. M., Idnurm, A., Huyghe, C. (2021). Fungicide sensitivity and resistance in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, across canola growing regions in Australia. *Crop and Pasture Science*, 72(12), 994–1007.
143. Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, 8(10), 505–512.
144. Yruela, I. (2009). Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409–430.
145. Yu, C. Y., Hu, S. W., Zhao, H. X., Guo, A. G., & Sun, G. L. (2005). Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3), 511–518.
146. Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R., & Simon, P. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, 99(2), 193–208.
147. Zamojska, J., & Węgorzek, P. (2014). Preliminary Studies on the Susceptibility Level of *Ceutorchynhus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae) to Acetamiprid and Chlorpyrifos

in Poland and Resistance Mechanisms of the Pest to Acetamiprid. *Journal of Insect Science*, *14*(1), 265.

148. Zhai, L., Xu, L., Wang, Y., Cheng, H., Chen, Y., Gong, Y., & Liu, L. (2014). Novel and useful genic-SSR markers from de novo transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.). *Molecular Breeding*, *33*(3), 611–624.

149. Zhang, G. Q., Tang, G. X., Song, W. J., & Zhou, W. J. (2004). Resynthesizing *Brassica napus* from interspecific hybridization between *Brassica rapa* and *B. oleracea* through ovary culture. *Euphytica*, *140*(3), 181–187.

150. Zhang, N., Chen, L., Ma, S., Wang, R., He, Q., Tian, M., & Zhang, L. (2020). Fine mapping and candidate gene analysis of the white flower gene *Brwf* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1.

151. Zhang, X., Li, R., Chen, L., Niu, S., Chen, L., Gao, J., Wen, J., Yi, B., Ma, C., Tu, J., Fu, T., & Shen, J. (2018). Fine-mapping and candidate gene analysis of the *Brassica juncea* white-flowered mutant Bjpg2 using the whole-genome resequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, *293*(2), 359–370.

152. Zhang, X., White, R. P., Demir, E., Jedryczka, M., Lange, R. M., Islam, M., Li, Z. Q., Huang, Y. J., Hall, A. M., Zhou, G., Wang, Z., Cai, X., Skelsey, P., & Fitt, B. D. L. (2014). *Leptosphaeria* spp., phoma stem canker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China. *Plant Pathology*, *63*(3), 598–612.

153. Zheng, J., Zhao, H., Ma, Y., Jiang, M., Zhan, Z., Li, X., & Piao, Z. (2022). Marker-Assisted Pyramiding of Genes for Multilocular Ovaries, Self-Compatibility, and Clubroot Resistance in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*). *Horticulturae*, *8*(2), Article 2.

10. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

10.1. In-Field Screening for Host Plant Resistance to *Delia Radicum* and *Brevicoryne Brassicae* within Selected Rapeseed Cultivars and New Interspecific Hybrids



Research Article

Janetta Niemann, Justyna Szwarz*, Jan Bocianowski, Dorota Weigt, Marek Mrówczyński In-field screening for host plant resistance to *Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae* within selected rapeseed cultivars and new interspecific hybrids

<https://doi.org/10.1515/biol-2020-0074>

received May 29, 2020; accepted July 06, 2020

Abstract: Rapeseed (*Brassica napus*) can be attacked by a wide range of pests, for example, cabbage root fly (*Delia radicum*) and cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). One of the best methods of pest management is breeding for insect resistance in rapeseed. Wild genotypes of *Brassicaceae* and rapeseed cultivars can be used as a source of resistance. In 2017, 2018, and 2019, field trials were performed to assess the level of resistance to *D. radicum* and *B. brassicae* within 53 registered rapeseed cultivars and 31 interspecific hybrid combinations originating from the resources of the Department of Genetics and Plant Breeding of Poznań University of Life Sciences (PULS). The level of resistance varied among genotypes and years. Only one hybrid combination and two *B. napus* cultivars maintained high level of resistance in all tested years, i.e., *B. napus* cv. *Jet Neuf* × *B. carinata* – PI 649096, Galileus, and Markolo. The results of this research indicate that resistance to insects is present in *Brassicaceae* family and can be transferred to rapeseed cultivars. The importance of continuous improvement of rapeseed pest resistance and the search for new sources of resistance is discussed; furthermore, plans for future investigations are presented.

Keywords: *Brassica napus*, rapeseed, pest resistance, hybrids, cabbage root fly, cabbage aphid

* Corresponding author: Justyna Szwarz, Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632, Poznań, Poland, e-mail: justyna.szwarz@up.poznan.pl
Janetta Niemann, Dorota Weigt: Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632, Poznań, Poland

Jan Bocianowski: Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637, Poznań, Poland

Marek Mrówczyński: Institute of Plant Protection – National Research Institute, Władysława Węgorka 20, 60-318, Poznań, Poland

1 Introduction

Rapeseed (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg.) is one of the three most important sources of vegetable oil in the world. The European Union (EU) was the world leader in rapeseed production in 2017 (22 million tons), followed by Canada (21 million tons), China (13 million tons), India (7.9 million tons), Australia (4.3 million tons), and Ukraine (2.1 million tons) [1]. The greatest producers of rapeseed in the EU are France, Germany, Poland, Romania, Great Britain, the Czech Republic, Hungary, Denmark, and Slovakia, respectively [2,3]. Protection from pests is an essential part of breeding programmes – for example, yield losses caused by pests in Poland can range from 15 to 50% [4]. Moreover, a significant increase in the threat from pests is expected, related both to climatic changes and to agrotechnical simplifications [5,6].

Rapeseed plants in Poland are attacked by a wide range of pests. Among them, two economically important insects can be distinguished – cabbage root fly (*Delia radicum* L.) (Diptera: Anthomyiidae) and cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) (Homoptera: Aphididae). The cabbage aphid is one of the most important and commonly occurring insect pests of rapeseed worldwide [7]. *Brevicoryne brassicae* causes significant yield losses in many crops in the family *Brassicaceae*, including mustards and crucifers. Heavy infestation can result in severe plant damage, causing death of seedlings and young transplants. Symptoms in larger plants include curling and yellowing of leaves, stunting of plants, and deformation of developing heads [8,9].

The cabbage root fly is one of the most important pests of many *Brassica* crops in the temperate regions of Europe and North America. After overwintering as pupae and hatching in early spring, females lay eggs in close proximity to the host plant. Depending on the temperature, eggs hatch in about 4 days [8]. The number of generations varies each year from one to four, depending on climatic conditions [10]. Larvae of *D. radicum* can damage plants by feeding on root tissue, resulting in

wilting of leaves or the entire plant and eventually reducing the yield and quality of the crop. Moreover, roots attacked by *D. radicum* are more susceptible to secondary root pathogens, such as *Fusarium* spp. [10,11].

To date, three resistance mechanisms have been recognized in the interaction of *Delia*–*Brassica* and *Brevicoryne*–*Brassica*: antixenosis, antibiosis, and tolerance [12]. Antixenosis (non-preference, avoidance) denotes morphological or chemical plant traits that make it unattractive for insects. For example, variation in cabbage leaf colour makes it less attractive to *B. brassicae* [13]. Antibiosis resistance is based on adverse effects of the plant after feeding [14]. Antibiosis does not prevent infestation, but rather causes increased mortality or delayed development of insects. Tolerance means the ability of a plant to reduce inflicted damage. A tolerant host is able to grow and reproduce despite the presence of a high number of insects [12,13]. In contrast to antixenosis and antibiosis, tolerance is independent of the herbivore response but is an adaptive mechanism helping plants to grow normally under biotic stress [15].

For most growers, the use of pesticides is an essential form of protection against harmful organisms [16]. However, there has been an increasing emphasis on the use of environmentally friendly methods of pest control. For example, in 2013, the EU restricted the use of certain neonicotinoids, and in 2018, banned three main neonicotinoids (Commission Implementing Regulation [EU] 2018/783, 2018/784, 2018/785). Moreover, Integrated Pest Management, which focuses on reducing the use of pesticides, has become compulsory for all farmers in the EU since 2014 (Directive 2009/128/EC). Therefore, breeding cultivars with resistance to insect pests fits perfectly into the currently applicable requirements and modern environmentally friendly trends [17,18]. The natural genetic variation among the wild relatives of crop species can provide good sources of novel host plant resistance [19].

Wild and related species of the *Brassicaceae* family are proved to be a valuable source of desirable agronomic traits. For example, *Sinapis alba* has been shown to be tolerant to crucifer flea beetle [20]; *B. juncea*, *B. carinata*, and *B. nigra* can be used to transfer blackleg resistance genes [21]; and *B. rapa*, *B. carinata*, and *S. alba* may act as a source of pod shattering resistance [22]. The assessment of the level of resistance within various *Brassicaceae* wild species or *Brassicaceae* hybrids may help identify genotypes with desired traits, which then can be included into rapeseed breeding programmes.

The aim of this research was to determine the range of pest resistance levels among selected rapeseed

cultivars and new *Brassica* hybrid combinations obtained from the Department of Genetics and Plant Breeding of Poznań University of Life Sciences (PULS). This study has been conducted to identify the sources of resistance not only in rapeseed cultivars but also in other brassicaceous species. Consequently, this strategy will allow the assessment of the genetic resistance of interspecific *Brassica* hybrids in comparison with the parental forms in the future.

To the best of our knowledge, this is one of the few studies in which in-field comparison of resistance has been made among rapeseed cultivars and interspecific hybrids towards economically important insect pests.

2 Materials and methods

2.1 Experimental design

The experiment was conducted for three consecutive years (2017, 2018, and 2019) on the testing fields in PULS experimental station Dłóń (51°41'23"N, 17°04'10"E) located 100 km south from Poznań, Poland. The whole experiment was set up in a completely randomized block design with five replications (on the basis of six plants) in each year ($N = 90$), and each single plot size was 10 m² with a 0.30 row distance and a sowing density of 60 seeds/m². The field experiment in Dłóń was conducted on typical heavy soil of quality class III [23]. Agricultural practices were optimal for local agroecological conditions in Dłóń. Plots were harvested using a plot harvester. In crop seasons 2016/2017, 2017/2018, and 2018/2019, the weather conditions were normal for Poland. The seasonal rainfall in Dłóń was 667 mm in 2017, 372 mm in 2018, and 393 mm in 2019, whereas the mean annual temperatures in 2017, 2018, and 2019 were 9.6, 10.8, and 11.1°C, respectively.

2.2 Plant material

Seeds of 53 rapeseed cultivars and 31 hybrid combinations were used as the research material (Table 1). All *Brassica* interspecific hybrids were generated in the Department of Genetics and Plant Breeding of PULS with the application of *in vitro* culture of isolated embryos according to the method described by Niemann et al. [24]. In order to obtain interspecific hybrids with genetic

Table 1: List of Brassicaceae hybrids and *B. napus* cultivars used as the research material

No. of line	Cross-combination	No. of line	Cross-combination
H1	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007569	H17	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. carinata</i> Dodola
H2	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	H18	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>B. fruticulosa</i> – P1649097
H3	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>B. carinata</i> PI 649091	H19	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. fruticulosa</i> – P1649097
H4	<i>B. napus</i> cv. <i>Górczański</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007574	H20	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. fruticulosa</i> – P1649099
H5	<i>B. napus</i> cv. <i>Górczański</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007569	H21	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>B. carinata</i> – PI 649094
H6	<i>B. napus</i> cv. <i>Górczański</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>Chinensis</i>	H22	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>B. carinata</i> – PI 649096
H7	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>S. alba</i> cv. <i>Bamberka</i>	H23	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-1
H8	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. tournefortii</i>	H24	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-2
H9	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	H25	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-3
H10	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007569	H26	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-4
H11	<i>B. napus</i> cv. <i>Górczański</i> × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	H27	<i>B. napus</i> cv. <i>Zhongshuang9</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169
H12	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	H28	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169-1
H13	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	H29	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169-2
H14	<i>B. napus</i> cv. <i>Lisek</i> × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	H30	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169-3
H15	<i>B. napus</i> cv. <i>Californium</i> × <i>S. alba</i> cv. <i>Bamberka</i>	H31	<i>B. napus</i> cv. <i>Zhongshuang9</i> × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> 08 007574
H16	<i>B. napus</i> cv. <i>Jet Neuf</i> × <i>S. alba</i> cv. <i>Bamberka</i>		
No. of line	Cultivar name	No. of line	Cultivar name
C1	Amir	C28	PX111CL
C2	Inspirati	C29	Anderson
C3	Bufalo	C30	Andromeda
C4	Atora	C31	Arsenal
C5	Dolar	C32	Hybrirock
C6	Fair	C33	Graf
C7	Fantastik	C34	Hary
C8	Jet Neuf	C35	Mickey
C9	Jupiter	C36	150/47
C10	Kana	C37	Prince
C11	Azurio	C38	Sofia
C12	Memoris	C39	Santana
C13	Lindora	C40	Rubin
C14	150/38	C41	Monolit
C15	150/46	C42	Metys
C16	Walegro	C43	Chrobry
C17	Marita	C44	150/42
C18	150/40	C45	Kabriolet
C19	150/44	C46	Falcon
C20	Rasmus	C47	Diger
C21	Walery	C48	Corina
C22	Anuze	C49	Kontakt
C23	Bazyl	C50	Ceres
C24	Bellinda	C51	Galileus
C25	Californium	C52	Markoto
C26	Darmor	C53	Hewelius
C27	PR48W26		

pest resistance, paternal forms harbouring high level of resistance to *B. brassicae* and *D. radicum* were selected according to the literature data.

All interspecific cross-derived lines were sister-pollinated (five plants were enclosed in one paper bag during flowering) for four generations in order to stabilize the fertility [25]. Morphotypes of plants of the F₅-F₇ generations were compared with the parental lines, as described by Wojciechowski [26]. Analysis of selected morphological traits was performed in order to determine whether the obtained plants resembled the *B. napus* type or the paternal type. The examination was based on (a) leaf colour, (b) presence of trichomes on the lower side of the leaf blade, (c) position of the buds relative to the open flowers, (d) growth habit, (e) type of inflorescence, and (f) flower characteristics (sterile or fertile).

2.3 Assessment of pest resistance

The assessment of pest resistance was carried out for two insects (*Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae*) and consisted of plant damage evaluation. General damage by insects was assessed at the end of the season, in late October 2017, 2018, or in early November 2019 in Dłóń. All assessments, i.e., direct damage on roots for *D. radicum* and on leaves for *B. brassicae*, were performed according to the EPPO standards [27] on randomly chosen individuals. For every genotype, six plants were assessed. The severity of insect damage on plants was evaluated at physiological maturity on a 1 to 9 scoring scale, used commonly by the Research Centre for Cultivar Testing in Poland, which corresponds with the International Union for the Protection of New Varieties of Plants [28] system of assessment. According to this scale, score 9 means no visible damage on plants (highly resistant), and score 1 means a completely damaged plant (fully susceptible)

(Table 2). No pesticides were used on the plots. The average values from six plants were calculated for each replication. In this way, we obtained quantitative trait data with normal distributions.

2.4 Statistical analysis

The normality of the distributions of the studied traits (resistance to *B. brassicae* and resistance to *D. radicum*) was tested using the Shapiro–Wilk normality test [29]. Two-way analyses of variance (ANOVA) with blocks were carried out to determine the effects of year, genotype (cultivars and hybrids, independently), and year × genotype interaction on the variability of resistance to *B. brassicae* and resistance to *D. radicum*. The mean values and standard deviations of the observed traits were calculated for each genotype in all years of study. Fisher's least significant differences (LSDs) were estimated for individual traits, and on this basis, homogeneous groups were determined. Differences between cultivars and hybrids were tested on the basis of a *t*-test, independently for resistance to *B. brassicae* and resistance to *D. radicum*. We used the critical significance level equal to 0.05, resulting from a Bonferroni correction. All the analyses were conducted using the GenStat v. 18 statistical software package (VSN International, Hemel Hempstead, UK).

3 Results

3.1 Morphology of hybrid plants

The individual interspecific and intergeneric hybrid combinations of F₅-F₇ generations had reasonably uniform

Table 2: Insect pest damage rating scale. Visual symptoms observed on roots (*Delia radicum*) or on leaves (*Brevicoryne brassicae*)

Scale	Visual symptoms	Plant response
1	Lesions profuse on 100% of the roots and leaf surface	Susceptible
2	Lesions present on up to 90% of the roots and leaf surface	Susceptible to moderately susceptible
3	Lesions present on up to 70–75% of the roots and leaf surface	Moderately susceptible
4	Lesions visible on up to 50% of the roots and leaf surface	Moderately susceptible to moderately resistant
5	Lesions visible on up to 25% of the roots and leaf surface, little damage	Moderately resistant
6	Lesions visible on less than 15–20% of the roots and leaf surface	Moderately resistant to resistant
7	Lesions visible on less than 10% of the roots and leaf surface	Resistant
8	Lesions visible on less than 5% of the roots and leaf surface	Resistant to highly resistant
9	No insect damage visible on any analysed part of the plant	Highly resistant

morphological characteristics. Moreover, plants of all tested lines were very consistent in growth habit. Hybrid plants obtained from crosses between *B. napus* × *B. rapa* genotypes were similar to rapeseed. However, in a small number of cases, some morphological features were similar to those of turnip rape, e.g., lighter leaf colour, trichomes on the lower side of the leaf blade, and turnip rape-like inflorescence. No significant new characteristics, absent in either parent, were reported in the hybrids. All other hybrid plants resembled more paternal morphotypes. Consequently, plants obtained from crosses between *B. napus* × *B. carinata*, *B. juncea*, and *S. alba* genotypes had young leaf surfaces with high trichome density.

3.2 Assessment of pest resistance

The results of the ANOVA indicated that the effects of cultivar, hybrid, and year were significant for both tested traits (resistance to *B. brassicae* and *D. radicum*). The year × genotype interactions were highly significant for both observed traits for cultivars and hybrids (Table 3).

The mean values of resistance to insect pests for the analysed hybrids and cultivars in the years studied successively, i.e., 2017, 2018, and 2019, are presented in Table 4. In general, the resistance to both pests varied among years. The highest mean level of resistance to *B. brassicae* was observed for cultivars in 2017 (8.991), whereas the lowest in 2018 was also for cultivars (5.513).

Table 3: Mean squares (m.s.) from two-way analysis of variance for *Brevicoryne brassicae* and *Delia radicum* (hybrid and cultivar resistance) ($N = 90$)

Source of variation	<i>Brevicoryne brassicae</i>			<i>Delia radicum</i>		
	d.f.	m.s.	p-Value	d.f.	m.s.	p-Value
Hybrids						
Block	4	0.73		4	1.27	
Hybrid	30	2.7592	<0.001	30	20.438	<0.001
Year	2	241.1076	<0.001	2	18.884	0.022
Hybrid × year	57	3.3161	<0.001	57	12.488	<0.001
Residual	425	0.5328		427	4.875	
Cultivars						
Block	4	0.91		4	1.32	
Cultivar	52	5.9015	<0.001	52	30.982	<0.001
Year	2	1074.9311	<0.001	2	290.038	<0.001
Cultivar × year	104	7.7494	<0.001	104	23.986	<0.001
Residual	897	0.4831		632	4.339	

d.f. – the number of degrees of freedom.

For *D. radicum*, the highest mean resistance was noticed in 2019 for hybrids (7.153). In contrast, the lowest mean resistance was observed for cultivars in 2017 (4.136).

The obtained data showed that the level of pest resistance varied between cultivars and hybrids. Compared to the analysed cultivars, the mean resistance of hybrid plants was higher in all tested years for *D. radicum*. For *B. brassicae*, the mean resistance of hybrids was higher only in 2018. The difference in resistance to *B. brassicae* among cultivars and hybrids in 2019 was not statistically significant (Table 5).

More detailed results are presented in Tables 5 and 6. The conducted analyses showed significant differences between the tested plants. Moreover, the collected data allowed us to distinguish a group of genotypes with the highest resistance to pests (belonging to group *a*) in tested years for both hybrids and cultivars. Within those plants, we found individuals that belonged to statistically the best group for all three successive years (Table 7). Four hybrids (e.g., *B. napus* cv. *Górczański* × *B. rapa* Pak Choi 08, 007574) and 27 cultivars (e.g., *Inspirati*) maintained the high level of resistance to *B. brassicae* during the tested years. However, only five hybrids (e.g., *B. napus* cv. *Jet Neuf* × *B. carinata* PI 649091) and two rapeseed cultivars (*Galileus* and *Markolo*) maintained the high level of resistance to *D. radicum*. Among the tested plant genotypes, only one hybrid and two cultivars remained resistant for both pests in three years, i.e., *B. napus* cv. *Jet Neuf* × *B. carinata* – PI 649096, *Galileus*, and *Markolo*.

4 Discussion

As stated before, in recent years, the use of insecticides became partly limited – some chemicals have been withdrawn due to their harmful effects on the environment. It causes many problems for farmers, as the range of effective insecticides is getting narrowed. Moreover, the use of chemicals may not always be successful as insects can develop resistance. For both insects, i.e., *D. radicum* and *B. brassicae*, cases of resistance to certain pesticides have been reported [30–32]. Considering this, host plant resistance might be the future of pest management, as it is one of the most economically feasible and ecologically sustainable options [33]. Several strategies to obtain insect-resistant rapeseed have been already presented [34]. This study has successfully followed two of them: finding the source of resistance within *Brassicaceae*

Table 4: Mean resistance to *Brevicoryne brassicae* and resistance to *Delia radicum* (and standard deviations) of all investigated *Brassica napus* cultivars and hybrid lines over three years

	2017		2018		2019	
	Hybrids	Cultivars	Hybrids	Cultivars	Hybrids	Cultivars
Resistance to <i>Brevicoryne brassicae</i>						
Number of observations	309	530	93	265	117	265
Mean	8.803	8.991	6.28	5.513	7.692	7.57
Standard deviation	0.5494	0.0968	1.913	2.326	0.6881	0.6599
t-Statistic		-5.96		3.13		1.65
p-Value		<0.001		0.002		0.1
Resistance to <i>Delia radicum</i>						
Number of observations	310	265	93	265	118	265
Mean	6.697	4.136	6.581	5.804	7.153	5.362
Standard deviation	2.617	2.568	3.076	3.034	1.556	2.537
t-Statistic		11.8		2.12		8.46
p-Value		<0.001		0.035		<0.001

species and selecting the insect-resistant rapeseed cultivars among cultivars that have been already registered.

Previous studies showed that wild species of *Brassicaceae* can be a useful source of resistance to *B. brassicae* and *D. radicum*. For example, *B. fruticulosa* and *B. spinescens* have a very high level of resistance to both pests and may be used as research material to find respective Quantitative Trait Loci (QTLs) or as part of a breeding programme [35,36]. Moreover, Dossall et al. [37] screened many genotypes within *Brassicaceae* and successfully produced *S. alba* × *B. napus* hybrids that inherited resistance to *Delia* spp. from *S. alba*.

However, according to the literature data, much uncertainty still exists about insect feeding preferences and sources of plant resistance to pests [38]. Despite this, there is a considerable amount of literature comparing the life history traits of adults and larvae of pollen beetles among species of *Brassicaceae* [39–41]. For example, *S. alba* may act as a donor of resistance, which can be successfully introgressed into rapeseed. Moreover, *S. alba* genotypes show resistance to a few other pests of rapeseed: root flies *Delia* spp. [37,42], flea beetle *P. cruciferae* [43,44], and bertha armyworm *Mamestra configurata* [45]. However, based on the in-field screening performed in this study, it is not possible to confirm that the obtained *B. napus* × *S. alba* hybrid combinations were able to maintain higher level of resistance to *D. radicum* or *B. brassicae* during the three consecutive years of study. Furthermore, review of the literature supports resistance to pollen beetles also in *Eruca sativa* [40] and in *C. abyssinica* [46].

Breeding programmes depending on resistant materials are presently also being applied against *Ceutorhynchus*

obstrictus (Marshall) (Coleoptera: Curculionidae). Previous experience in other countries has shown that among the tested *Brassicaceae* species, the white mustard *S. alba* was much less susceptible than rapeseed to *C. obstrictus* damage [47].

These studies confirm our assumption that some of the interspecific or intergeneric hybrids can be successfully used as part of future breeding strategies.

Generally, rapeseed cultivars are not considered a very promising source of resistance to pests, as screenings for resistance within existing varieties rarely bring expected results [38,48,49]. Despite this, we managed to find genotypes within *B. napus* (Galileus and Marcolò), which are moderately or highly resistant to both *B. brassicae* and *D. radicum*. Our observations have shown that in the future more assessments should be performed to verify a greater number of cultivars.

Our research has proven the existence of insect-resistant genotypes among rapeseed cultivars and *Brassicaceae* hybrids. A few genotypes were able to maintain the high level of resistance in the three consecutive years of field experiments, which seems to be very useful in future insect resistance breeding. Observed differences in the infestation level allow us to conclude that the plant response might be conditioned by genotype, which may give a chance to identify resistance genes. Future work should focus on laboratory studies, to determine the genetic basis of resistance, as it may depend on three systems: antixenosis, antibiosis, or tolerance [35]. Moreover, research conducted by Hao et al. [50] showed that aphids have preferential behaviour regarding the host plant. Upper epidermis thickness and trichome length had significant impact on aphids'

Table 5: Mean values and standard deviations (s.d.) for hybrid resistance to *Brevicoryne brassicae* and resistance to *Delia radicum* ($N = 90$)

Hybrid	Resistance to <i>Brevicoryne brassicae</i> (9° scale)						Resistance to <i>Delia radicum</i> (9° scale)					
	2017		2018		2019		2017		2018		2019	
	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.
H1	8.8abc	0.42	6.333bcdef	0.58	6.667c	2.31	6.9bcde	2.56	8.333ab	0.58	3.667i	3.79
H2	9a	0.00	6.333bcdef	1.15	7.8ab	0.45	6.5bcdef	3.38	7.333abc	2.89	8abc	1.23
H3	8.8abc	0.42	7abcd	0.00	7.333bc	0.58	7.6abc	1.58	6abc	4.36	7.333abcd	1.16
H4	8.889ab	0.33	3i	1.73	6.667c	1.53	7.3abc	2.41	6abc	3.46	7.667abc	0.58
H5	9a	0.00	5.333cdefgh	1.53	7.4abc	1.34	7.2abcd	2.78	7abc	1.73	6.6cdef	2.07
H6	9a	0.00	3.333hi	2.31	7.8ab	0.45	7.4abc	2.80	3.667cd	3.79	7.4abcd	0.55
H7	8.8abc	0.42	3.667ghi	2.89	7.333bc	0.58	5.8cdef	3.08	4bcd	4.36	7abcde	1.00
H8	8.5bcd	0.71	6bcdef	1.73	8ab	0.00	6.1cdef	2.64	6abc	2.65	8.4a	0.55
H9	8.7abcd	0.48	5defghi	1.00	7.667ab	0.58	6.6bcdef	2.27	4bcd	1.73	6defg	2.00
H10	8.5bcd	0.85	7.333abc	0.58	7.8ab	0.45	6.5bcdef	2.55	9a	0.00	6.8bcdef	1.64
H11	8.7abcd	0.48	7abcd	0.00	8ab	0.00	3.5gh	2.92	9a	0.00	7.8abc	0.84
H12	9a	0.00	4.333fghi	2.52	8ab	0.00	6.6bcdef	3.37	5.667abc	4.04	8.333ab	0.58
H13	8.9ab	0.32	7.333abc	0.58	8ab	0.00	4.9efg	1.85	5.333abcd	3.79	8.2ab	0.45
H14	8.8abc	0.63	7.667ab	0.58	7.25bc	0.96	6.9bcde	2.85	6.667abc	3.22	7.5abcd	1.00
H15	8.6abcd	0.70	4.333fghi	3.06	7.8ab	0.45	7.3abc	1.42	1d	0.00	7.6abc	0.55
H16	9a	0.00	6.667bcde	0.58	7.333bc	0.58	6.8bcde	3.55	5.667abc	4.04	5ghi	1.73
H17	8.9ab	0.32	6.333bcdef	2.08	8.2a	0.45	7.1abcd	2.18	6.667abc	3.22	7.8abc	0.84
H18	8.7abcd	0.95	7abcd	0.00	8ab	0.00	6.3cdef	1.57	5.667abc	4.04	7.4abcd	0.89
H19	8.4cd	0.70	5.333cdefgh	0.58	7.6ab	0.55	2.3h	1.57	6abc	4.36	7.2abcde	1.30
H20	8.9ab	0.32	5.667bcdefg	1.15	7.6ab	0.55	8.4ab	0.84	5.667abc	4.04	7.8abc	0.84
H21	9a	0.00	6bcdef	1.00	8ab	0.00	7.4abc	2.17	6abc	4.36	6.8bcdef	1.30
H22	9a	0.00	7.333abc	1.15	8ab	0.00	7.8abc	2.04	8.333ab	0.58	7.8abc	0.45
H23	7.9e	1.20	4.667efghi	2.08	7.5abc	0.58	4.6fg	1.71	5.667abc	4.04	7.5abcd	0.58
H24	8.3de	1.16	7.667ab	0.58	8ab	0.00	5.2defg	1.32	8.333ab	0.58	5.333fgh	1.53
H25	8.8abc	0.63	6.333bcdef	1.15	8ab	0.00	6.3cdef	2.16	3.667cd	2.89	7.8abc	0.45
H26	9a	0.00	7.667ab	0.58	7.333bc	0.58	7.7abc	2.58	9a	0.00	5.667efg	1.53
H27	9a	0.00	6.667bcde	0.58	7.667ab	0.58	7.5abc	2.59	8.333ab	1.16	4hi	2.65
H28	9a	0.00	9a	0.00	–	–	9a	0.00	9a	0.00	–	–
H29	9a	0.00	9a	0.00	–	–	9a	0.00	9a	0.00	–	–
H30	9a	0.00	9a	0.00	–	–	9a	0.00	9a	0.00	–	–
H31	9a	0.00	6.333bcdef	1.15	7.4abc	0.89	6.1cdef	1.91	9a	0.00	7.4abcd	0.89
LSD _{0.05}	0.45		2.233		0.841		2.01		4.644		1.592	

Values with different letters in columns are significantly different.

preference on initial probing, which leads to a conclusion that physical properties of rapeseed leaves may be important for *B. brassicae* host choice.

The level of plant damage varied over the years of observation. Therefore, it can be concluded that the results of the field trials might have been partly dependent on the weather or other abiotic and biotic stresses [34]. Population dynamics of insects may be affected by parameters such as temperature, humidity, and total rainfall [51,52]. Many factors affect the plant response to insects, which makes it harder to find individuals with true genetically induced resistance to insects.

Currently, insect resistance research is focused on quantitative resistance, as it might provide a more

durable effect than pyramiding single resistance genes [34]. Variability of insect-derived damage observed in our study proves the complexity of plant response to pests. This might indicate that the resistance of tested genotypes relies on multiple genes located in QTLs. This type of resistance is usually harder to track, because of its complexity and dependence on environmental factors [53]. This makes quantitative traits difficult to include in breeding programmes. However, a study by Ekuere et al. [54] proves that it is possible to track QTLs conferring resistance to *Delia* spp. by using linkage analysis. Successful introduction of multigenic resistance to insects in *Brassica* crops would be a great strategy in pest management.

Table 6: Mean values and standard deviations (s.d.) for cultivar resistance to *Brevicoryne brassicae* and resistance to *Delia radicum* (N = 90)

Cultivar	Resistance to <i>Brevicoryne brassicae</i> (9° scale)						Resistance to <i>Delia radicum</i> (9° scale)					
	2017		2018		2019		2017		2018		2019	
	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.
C1	9a	0.00	4.6ghi	2.19	8a	0.00	6.2bcde	1.64	6.6abcdefg	1.67	7abcdef	1.00
C2	9a	0.00	6.8abcd	0.84	7.4abcd	0.89	3.4ijklmno	2.88	5.8abcdeghijk	2.95	7.4abcd	0.89
C3	9a	0.00	6.2abcdefg	1.10	8a	0.00	7b	1.23	3.4hijklmn	3.36	7.6abc	0.55
C4	9a	0.00	6.8abcd	1.10	7.8ab	0.45	4ghijklmn	2.12	5.8abcdeghijk	2.95	7.2abcde	0.84
C5	9a	0.00	5.4cdefg	1.14	7.4abcd	0.55	5.2cdefgh	2.49	4.6defghijklm	3.29	1.2n	0.45
C6	8.9a	0.32	7.2ab	0.45	7.6abc	0.55	5defghi	2.45	5.2cdefghijkl	3.83	3jklmn	1.87
C7	9a	0.00	6.2abcdefg	0.45	7.6abc	0.55	5.6bcdefg	0.55	6abcdeghij	2.92	6.4abcdefg	2.51
C8	9a	0.00	7.6a	0.55	7.6abc	0.55	3.4ijklmno	1.95	8.2abc	0.45	5.4bcdeghij	2.70
C9	9a	0.00	6.6abcde	0.55	7.6abc	0.55	4.8defghij	1.30	8abc	0.71	3.6hijklmn	3.13
C10	9a	0.00	7.6a	0.55	7cde	0.00	2.2opqr	0.84	7abcdef	3.39	1.6n	0.55
C11	9a	0.00	5.2cdefg	0.45	6.6de	1.52	2opqr	2.24	3jklmn	3.08	3.2ijklmn	2.17
C12	9a	0.00	7abc	0.71	7.6abc	0.55	1.2qr	0.45	7abcdef	2.24	7.4abcd	0.55
C13	9a	0.00	7.2ab	0.84	7.8ab	0.45	3klmnop	2.35	7.2abcde	3.49	5.8abcdegh	2.39
C14	8.9a	0.32	5.2cdefg	0.45	7.8ab	0.45	4.6efghijk	2.30	3jklmn	2.35	6.2abcdefg	1.64
C15	9a	0.00	5.2cdefg	1.30	7.4abcd	0.89	1.4pqr	0.55	5.8abcdeghijk	3.11	6.2abcdefg	1.64
C16	8.9a	0.32	7.4ab	0.89	7.6abc	0.55	3.2jklmno	2.17	8.4ab	0.55	5defghijkl	3.00
C17	8.9a	0.32	7abc	1.00	7cde	0.00	2.4nopqr	1.34	5.2cdefghijkl	3.03	3.6hijklmn	3.21
C18	9a	0.00	7abc	1.22	7.8ab	0.45	1r	0.00	8.6ab	0.55	5.6bcdegh	2.79
C19	9a	0.00	4.8fghi	1.10	7.6abc	0.55	4.6efghijk	3.51	6.2abcdeghi	3.03	2.2mn	2.17
C20	9a	0.00	2.4ijkl	1.52	6.8de	1.10	4.4fghijkl	2.88	5.8abcdeghijk	2.78	2.6lmn	1.95
C21	9a	0.00	2.4ijkl	1.52	7.6abc	0.55	4.2fghijklm	1.92	2.8klmn	2.05	5.4bcdeghij	2.88
C22	8.9a	0.32	2jkl	1.22	8a	0.00	3.6hijklmno	2.30	7.6abcd	0.55	6.4abcdefg	0.89
C23	9a	0.00	3.2jkl	2.68	7.8ab	0.45	4.6efghijk	2.07	7.4abcde	1.52	6.6abcdefg	2.61
C24	9a	0.00	2.8jkl	1.10	7.4abcd	0.55	1.4pqr	0.55	7.8abc	0.45	2.8klmn	2.39
C25	9a	0.00	2.8jkl	2.05	8a	0.00	5.4bcdefg	0.55	4fghijklmn	3.00	3.6hijklmn	2.30
C26	9a	0.00	1l	0.00	6.6e	1.52	2.8lmnopq	2.17	1.2n	0.45	4.8efghijkl	1.92
C27	9a	0.00	1.8kl	1.30	6.6e	1.52	3.2jklmno	1.92	2.2lmn	1.79	2.2mn	1.10
C28	9a	0.00	1l	0.00	7.2bcde	0.45	4.4fghijkl	1.95	2mn	1.00	6.2abcdefg	1.64
C29	9a	0.00	2.8jkl	2.05	7.6abc	0.55	2.4nopqr	1.52	8abc	0.00	2.6lmn	1.34
C30	9a	0.00	3.6hij	3.58	7.6abc	0.55	4ghijklmn	2.74	4fghijklmn	3.74	7.2abcde	0.84
C31	9a	0.00	6.4abcdef	0.89	7.6abc	0.55	3klmnop	2.74	6.8abcdefg	2.68	1.2n	0.45
C32	9a	0.00	2.8jkl	1.30	7.2bcde	0.45	3.6hijklmno	1.67	3.8ghijklmn	3.42	6.4abcdefg	1.14
C33	9a	0.00	6.6abcde	1.67	7.8ab	0.45	5.6bcdefg	1.14	2.4lmn	2.61	7abcdef	1.23
C34	9a	0.00	7.8a	0.45	7.6abc	0.55	3.6hijklmno	2.07	8.6ab	0.55	7.6abc	0.89
C35	9a	0.00	7.4ab	0.55	7.4abcd	0.89	2.6mnopqr	2.07	8.4ab	0.55	5.2cdeghijk	0.84
C36	9a	0.00	7.2ab	0.84	7.4abcd	0.55	4.6efghijk	3.29	4.6defghijklm	3.51	5.6bcdeghi	2.07
C37	9a	0.00	7.6a	0.55	7.2bcde	0.45	1.4pqr	0.55	8.6ab	0.55	4.4ghijklm	1.95
C38	9a	0.00	5.8bcdefg	0.45	7.6abc	0.55	7b	1.00	3.2ijklmn	2.95	5.6bcdeghi	3.29
C39	9a	0.00	6.8abcd	0.45	7.4abcd	0.55	3.2jklmno	1.92	8abc	0.71	7.4abcd	0.55
C40	9a	0.00	3.6hij	2.07	7.4abcd	0.89	1.4pqr	0.55	5.2cdefghijkl	2.39	6abcdegh	1.00
C41	9a	0.00	7abc	0.00	7.8ab	0.45	2.2opqr	1.30	7.8abc	1.64	8.2a	0.45
C42	9a	0.00	5.2cdefg	0.45	8a	0.00	4.4fghijkl	1.67	1n	0.00	4.8efghijkl	2.59
C43	9a	0.00	7.4ab	0.55	7.6abc	0.55	4ghijklmn	2.55	7.8abc	0.45	6abcdegh	2.24
C44	9a	0.00	6.4abcdef	1.14	8a	0.00	2.2opqr	1.30	3.8ghijklmn	3.03	6.6abcdefg	2.61
C45	9a	0.00	2.6jkl	2.51	7.8ab	0.45	5.4bcdefg	2.41	5.6bcdeghijk	3.44	6.6abcdefg	1.67
C46	9a	0.00	5efgh	2.00	8a	0.00	3.6hijklmno	2.30	7abcdef	2.83	6.4abcdefg	2.51
C47	9a	0.00	7.2ab	1.10	8a	0.00	4.8defghij	2.59	6.2abcdeghi	2.68	4.8efghijkl	2.28
C48	9a	0.00	6.2abcdefg	1.79	7.8ab	0.45	6.4bcd	0.89	4.4efghijklm	3.29	6abcdegh	1.41
C49	9a	0.00	7.6a	0.55	8a	0.00	5.8bcdef	1.10	8.8a	0.45	5.2cdeghijk	2.68
C50	9a	0.00	6.4abcdef	0.89	7.6abc	0.55	6.8bc	1.30	6.4abcdegh	2.07	7.8ab	0.45
C51	9a	0.00	7.2ab	0.45	8a	0.00	9a	0.00	7.8abc	0.84	7abcdef	1.87
C52	9a	0.00	7.4ab	1.52	7.6abc	0.55	9a	0.00	6.6abcdefg	2.61	7.8ab	0.84
C53	9a	0.00	7.8a	0.84	8a	0.00	9a	0.00	7abcdef	3.39	4.6fghijklm	2.51
LSD _{0.05}	0.085		1.61		0.76		1.65		3		2.4	

Values with different letters in columns are significantly different.

Table 7: List of genotypes with high resistance to pests in three successive years

<i>Brevicoryne brassicae</i>	
Hybrids	H11*, H13, H18, H22
Cultivars	C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9, C12, C13, C16, C18, C31, C33, C34, C35, C36, C39, C41, C43, C44, C47, C48, C49, C50, C51 , C52 , C53
<i>Delia radicum</i>	
Hybrids	H3, H4, H17, H20, H22
Cultivars	C51 , C52

Genotypes resistant to both pests are highlighted in bold font.
*Numbers according to Table 1.

In conclusion, we found several sources of resistance to *D. radicum* and *B. brassicae* among the rapeseed cultivars, i.e., Galileus and Marcolo, and interspecific *Brassicaceae* hybrids, i.e., *B. napus* cv. *Jet Neuf* × *B. carinata* – PI 649096. Some of the genotypes showed high level of resistance over the three successive years of field trials. These genotypes are especially valuable and should be diligently analysed.

Acknowledgments: This research was funded by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development, project number 54.

Conflict of interest: The authors state no conflict of interest.

Data availability statement: All data generated or analysed during this study are included in this published article.

References

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAOSTAT. 2018. Database – crops production. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 12.04, 2020).
- [2] Institute of Agricultural and Food Economics – National Research Institute in Poland. 2018. Market analysis. Available online: <https://www.ierigz.waw.pl> (accessed on 12.04, 2020).
- [3] Woźniak E, Waszkowska E, Zimny T, Sowa S, Twardowski T. The rapeseed potential in Poland and Germany in the context of production, legislation, and intellectual property rights. *Front Plant Sci.* 2019;10(1423):1–11.
- [4] Mrówczyński M. Studium nad doskonaleniem ochrony rzepaku ozimego przed szkodnikami. *Rozprawy Naukowe Inst. Ochr. Roślin* [Research on improving the protection of winter rape against pests]. *Sci Thesis Inst Plant Prot, Poznań.* 2003;10:1–61.
- [5] Deutsch CA, Tewksbury JJ, Tigchelaar M, Battisti DS, Merrill SC, Huey RB, et al. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science.* 2018;361:916–9.
- [6] Mrówczyński M, Korbas M, Praczyk T, Gwiazdowski R, Jajor E, Pruszyński G, et al. Ochrona roślin w integrowanej produkcji rzepaku [Plant protection in integrated oilseed rape production]. *Rośliny Oleiste-Oilseed Crop.* 2009;30(2):245–56.
- [7] Shiberu T, Negeri M. Effects of synthetic insecticides and crude botanicals extracts on cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae) on cabbage. *J Fertil Pestic.* 2016;7(1):1–5.
- [8] Chen S, Han X, Moens M. Biological control of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) with entomopathogenic nematodes. *Appl Entomol Zool.* 2003;38:441–8.
- [9] Santolamazza-Carbone S, Velasco P, Carrea ME. Resistance to the cabbage root fly, *Delia radicum* (Diptera, Anthomyiidae), of turnip varieties (*Brassica rapa* subsp. *rapa*). *Euphytica.* 2017;213–274:1–13.
- [10] Capinera JL. *Handbook of Vegetable Pests.* San Diego: Academic Press; 2001.
- [11] Griffith GCD. Phenology and dispersion of *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae) in canola fields at Morinville, Alberta. *Quaest Entomol.* 1986;22:29–50.
- [12] Painter RH. *Insect resistance in crop plants.* New York: The MacMillan Company; 1951.
- [13] Acquaah G. *Principles of plant genetics and breeding.* Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2012.
- [14] Painter RH. The economic value and biologic significance of insect resistance in plants. *J Econ Entomol.* 1941;14:358–67.
- [15] Shuhang W, Voorrips RE, Steenhuis-Broers G, et al. Antibiosis resistance against larval cabbage root fly, *Delia radicum*, in wild *Brassica*-species. *Euphytica.* 2016;211:139–55.
- [16] Horowitz AR, Ishaaya I. *Insect pest management: field and protected crops.* Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag; 2004.
- [17] Jensen EB, Felkl G, Kristiansen K, Andersen SB. Resistance to the cabbage root fly, *Delia radicum*, within *Brassica fruticulosa*. *Euphytica.* 2002;124:379–86.
- [18] Ellis PR, Pink DAC, Barber NE, Mead A. Identification of high levels of resistance to cabbage root fly, *Delia radicum*, in wild *Brassica* species. *Euphytica.* 1999;110:207–14.
- [19] Broekgaarden C, Snoeren TA, Dicke M, Vosman B. Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. *Plant biotechnol J.* 2011;9:819–25.
- [20] McCaffrey JP, Harmon BL, Brown J, Brown AP, Davis JB. Assessment of *Sinapis alba*, *Brassica napus* and *S. alba* × *B. napus* hybrids for resistance to cabbage seedpod weevil, *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae). *J Agric Sci.* 1999;132:289–95.
- [21] Sjödin C, Glimelius K. Screening for resistance to blackleg *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. within *Brassicaceae*. *J Phytopathol.* 1988;123:322–32.
- [22] Wang R, Ripley VL, Rakow G. Pod shatter resistance evaluation in cultivars and breeding lines of *Brassica napus*, *B. juncea* and *Sinapis alba*. *Plant Breed.* 2007;126:588–95, doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01382.x.
- [23] Niemann J, Bocianowski J, Stuper-Szablewska K, Wojciechowski T. New interspecific *Brassica* hybrids with high

- levels of heterosis for fatty acids composition. *Agriculture*. 2020;10:221.
- [24] Niemann J, Wojciechowski A, Janowicz J. Broadening the variability of quality traits in rapeseed through interspecific hybridization with an application of immature embryo culture. *BioTechnol J Biotechnol Comput Biol Bionanotechnol*. 2012;93(2):109–15.
- [25] Niemann J, Kaczmarek J, Książczyk T, Wojciechowski A, Jędryczka M. Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) – a valuable source of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*). *Eur J Plant Pathol*. 2017;147:181–98.
- [26] Wojciechowski A. Some morphological and phenological traits and fertility of lines of artificial winter oilseed rape originated from male sterile plants (*Brassica napus* var. *oleifera*). *Genet Pol*. 1993;34:317–25.
- [27] Anon. Guidelines on pest risk analysis. No. 3. Pest risk assessment scheme. *Bull OEPP/EPO Bull*. 1997;27:281–305.
- [28] UPOV. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidance on certain physiological characteristics. Document TGP/12. Geneva, Switzerland: 2012.
- [29] Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965;52:591–611.
- [30] Harris CR, Manson GF, Mazurek JH. Development of insecticidal resistance by soil insects in Canada. *J Econ Entomol*. 1962;55:777–80.
- [31] McDonald S, Swales GE. Dieldrin resistance in *Hylemya brassicae* (Diptera: Anthomyiidae) in Alberta. *Can Entomologist*. 1975;107(7):729–34.
- [32] Ahmad M, Akhtar S. Development of insecticide resistance in field populations of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) in Pakistan. *J Econ Entomol*. 2013;106(2):954–8.
- [33] Arora R, Sandhu S, editors. Breeding insect resistant crops for sustainable agriculture. Singapore: Springer; 2017.
- [34] Hervé MR. Breeding for insect resistance in oilseed rape: challenges, current knowledge and perspectives. *Plant Breed*. 2018;137:27–34.
- [35] Singh R, Ellis PR, Pink DAC, Phelps K. An investigation of the resistance to cabbage aphid in brassica species. *Ann Appl Biol*. 1994;125:457–65.
- [36] Shuhang W, Voorrips RE, Steenhuis-Broers G, Vosman B, van Loon JJA. Antibiosis resistance against larval cabbage root fly, *Delia radicum*, in wild Brassica-species. *Euphytica*. 2016;211:139–55.
- [37] Dossall LM, Good A, Keddie BA, Ekuere U, Stringam G. Identification and evaluation of root maggot (*Delia* spp.) (Diptera: Anthomyiidae) resistance within Brassicaceae. *Crop Prot*. 2000;19:247–53.
- [38] Hervé MR, Cortesero AM. Potential for oilseed rape resistance in pollen beetle control. *Arthropod-Plant Interact*. 2016;10(6):463–75.
- [39] Cook SM, Rasmussen HB, Birkett MA, Murray DA, Pye BJ, Watts NP, et al. Behavioural and chemical ecology underlying the success of turnip rape (*Brassica rapa*) trap crops in protecting oilseed rape (*Brassica napus*) from the pollen beetle (*Meligethes aeneus*). *Arthropod Plant Interact*. 2007;1:57–67.
- [40] Veromann E, Metspalu L, Williams IH, Hiesaar K, Mand M, Kaasik R, et al. Relative attractiveness of *Brassica napus*, *Brassica nigra*, *Eruca sativa* and *Raphanus sativus* for pollen beetle (*Meligethes aeneus*) and their potential for use in trap cropping. *Arthropod Plant Interact*. 2012;6:385–94.
- [41] Kaasik R, Kovács G, Toome M, Metspalu L, Veromann E. The relative attractiveness of *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. juncea* and *Sinapis alba* to pollen beetles. *Biocontrol*. 2014;59:19–28.
- [42] Kott LS, Dossall LM. Introgression of root maggot resistance (*Delia* spp.) derived from *Sinapis alba* L. into *Brassica napus* L. *Brassica*. 2004;6:55–62.
- [43] Bodnaryk RP, Lamb RJ. Mechanisms of resistance to the flea beetle, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze), in mustard seedlings, *Sinapis alba* L. *Can J Plant Sci*. 1991;71:13–20.
- [44] Gavloski JE, Ekuere U, Keddie A, Dossall L, Kott L, Good SG. Identification and evaluation of flea beetle (*Phyllotreta cruciferae*) resistance within Brassicaceae. *Can J Plant Sci*. 2000;80:881–7.
- [45] Ulmer B, Gillott C, Erlandson M. Feeding preferences, growth, and development of *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) on Brassicaceae. *Can Entomol*. 2001;133:509–19.
- [46] Ekbom B, Borg A. Pollen beetle (*Meligethes aeneus*) oviposition and feeding preferences on different host plant species. *Entomol Exp Appl*. 1996;78:291–9.
- [47] McCaffrey JP, Harmon BL, Brown J, Davis JB. Resistance of canola-quality cultivars of yellow mustard, *Sinapis alba* L., to the cabbage seedpod weevil, *Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham). *Can J Plant Sci*. 2004;84:397–9.
- [48] Bhattacharya S. Brassica-aphid interaction: challenges and prospects of genetic engineering for integrated aphid management. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2019;108(101442):1–12.
- [49] Amer M, Aslam M, Razaq M, Afzal M. Lack of plant resistance against aphids, as indicated by their seasonal abundance in canola, *Brassica napus* (L.) in Southern Punjab, Pakistan. *Pak J Bot*. 2009;41(3):1043–51.
- [50] Hao ZP, Zhan HX, Wang YL, Hou SM. How cabbage Aphids *Brevicoryne brassicae* (L.) make a choice to feed on *Brassica napus* cultivars. *Insects*. 2019;10:1–11.
- [51] Yadav N, Agrawal N, Yadav R. Influence of weather parameters on the population of different cabbage pests in organic cabbage field. *J Entomol Zool Stud*. 2019;7(3):551–3.
- [52] Gaikwad AD, Bhede BV, Bokan SC, Bhosle BB. Seasonal incidence of major insect pests, natural enemies on cauliflower and their correlation with weather parameters. *J Entomol Zool Stud*. 2018;6(5):952–6.
- [53] Yenchu GC, Cohen MB, Byrne PF. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annu Rev Entomol*. 2000;45(1):393–422.
- [54] Ekuere UU, Dossall LM, Hills M, Keddie AB, Kott L, Good A. Identification, mapping, and economic evaluation of QTLs encoding root maggot resistance in *Brassica*. *Crop Sci*. 2005;45(1):371–8.

10.2. Connection between Nutrient Content and Resistance to Selected Pests Analyzed in *Brassicaceae* Hybrids

Article

Connection between Nutrient Content and Resistance to Selected Pests Analyzed in *Brassicaceae* Hybrids

Justyna Szwarc ^{1,*}, Janetta Niemann ¹, Jan Bocianowski ², Monika Jakubus ³ and Marek Mrówczyński ⁴

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; janetta.niemann@up.poznan.pl

² Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań, Poland; jan.bocianowski@up.poznan.pl

³ Department of Soil Science and Land Protection, Poznań University of Life Sciences, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, Poland; monika.jakubus@up.poznan.pl

⁴ Institute of Plant Protection - National Research Institute, Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań, Poland; m.mrowczynski@iorpib.poznan.pl

* Correspondence: justyna.szwarc@up.poznan.pl

Abstract: Rapeseed (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg) is attacked by a wide range of pests. Breeding of resistant cultivars is one of the best methods of protecting crops against insects, and non-cultivated species of *Brassicaceae* can be used as resistance donors. In this study, we investigated the relationship between nutrient content and resistance to two commonly occurring pests (*Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae*) in 12 *Brassicaceae* hybrid combinations. The experiment was conducted at Poznań University of Life Sciences Experimental Station located in Dłóń. The assessment was carried out for three years (2017, 2018, and 2019) on randomly chosen individuals in two growth stages: vegetative stage and flowering stage. The resistance to *B. brassicae* and *D. radicum* was observed in all three years, however, macronutrient and micronutrient contents as well as total nitrogen, total sulfur, and sulfur sulfate were observed only in 2019. Statistically significant negative association between Ca and resistance to *B. brassicae* and *D. radicum* was discovered. Additionally, positive association between Cu and resistance to *B. brassicae* was observed. The importance of selected mineral elements in plant resistance is widely discussed.

Keywords: rapeseed; *Delia radicum*; *Brevicoryne brassicae*; nutrients; hybrids



Citation: Szwarc, J.; Niemann, J.; Bocianowski, J.; Jakubus, M.; Mrówczyński, M. Connection between Nutrient Content and Resistance to Selected Pests Analyzed in *Brassicaceae* Hybrids. *Agriculture* **2021**, *11*, 94. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020094>

Received: 20 November 2020

Accepted: 20 January 2021

Published: 23 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rapeseed (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg) is a major crop plant and one of the most important oil sources in the world [1,2]. Currently, rapeseed growers face numerous problems that limit plant productivity, quality, and seed yield such as climate changes affecting the growth condition or increased pest infestation [3]. Rapeseed may be attacked by a large number of specialist insects. Cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) (Homoptera: Aphididae) and cabbage root fly (*Delia radicum* L.) (Diptera: Anthomyiidae) are economically important pests in many regions of the world including Poland.

D. radicum is a pest originating from Europe, present across the entire Northern Hemisphere [4]. Larvae of *D. radicum* damage rapeseed plants by chewing mines in the roots, occasionally penetrating the stem and the head of the plant. Larvae feeding results in delayed growth, wilting, and stunting. Heavy infestation may result in reduced seed number or even plant death [5].

B. brassicae is a highly specialized pest, attacking only the *Brassicaceae* family. Insect is present in most temperate regions. Up to 15–20 generations can be completed during the growing season, depending on weather conditions [4,6]. Rapid development rate often results in severe infestation, leading to the death of young seedlings and wilting of adult plants. Other symptoms include yellowing and curling of the leaves, deformation of heads,

and reduced yield, often followed by contamination caused by the presence of honeydew and dead aphids [4,6]. *B. brassicae* is also an important vector of virus diseases [7].

Breeding resistant cultivars is one of the best methods of protecting rapeseed against dangerous insects. It is also considered as the most economical and ecological friendly approach of reducing the number of many pests [8]. One of the limiting factors of this method is an insufficient number of resistance genes within the cultivated species of *Brassicaceae* family. On the other hand, non-cultivated species of *Brassicaceae* can be an interesting source of genetic variability, and serve as a donor of resistance to insects. Interspecific crosses between chosen wild genotypes and rapeseed plants may allow the transfer of useful agronomical traits such as resistance to certain pests or diseases. This is why our research team's work in the Department of Genetics and Plant Breeding (Poznań University of Life Sciences) focuses on obtaining and studying hybrid *Brassicaceae* plants, especially analyzing the presence of resistance to commonly occurring insect pests. Recently, we concentrated our efforts on investigating the relationship between the amount of selected elemental minerals in hybrid plants and their field resistance to insects. Nutrients, both macro- and micronutrients, are essential for plant development. Traditionally, three nutrients (i.e., N, P and K) have been considered to be the most crucial, as most crops have high requirements for them. Apart from the above-mentioned elemental minerals, S, Ca, Mg and Na also play a significant role in plant metabolism. Moreover, micronutrients are responsible for increasing both the quantity and quality of crop yield through their involvement in the metabolism of N, P, K, Ca, Mg, and S as well as crop responses to environmental stress conditions [9,10]. Aside from significant influence on yield amount, some mineral elements play a major role in plant response to herbivores. For example, calcium ions act as a second messenger in signal pathways after herbivore attack. They activate calcium-sensitive proteins and eventually lead to the formation of jasmonates and activation of defense genes [11].

Macro- and micronutrients are responsible for various functions as structural components in macromolecules [12]. First of all, a special role is assigned to macronutrients because they are generally required at the concentration of greater than 0.1% of dry matter. In the case of the *Brassicaceae* family, the significance of sulfur is underlined. Sulfur, besides nitrogen, is involved in synthesizing plant defense compounds such as glucosinolates. These compounds are hydrolyzed as a result of plant cell damage under the influence of the enzyme myrosinase. Together with the enzyme glucosinolases, which breaks them down, they constitute the two-component defense system of plants against pathogens and pests [11,13,14]. Aside from its great effect on glucosinolate content, nitrogen also affects the potential attractiveness of a plant to pests as it plays a major role in determining plant architecture and quality [15]. A similar real meaning may be attached to many compounds that contain S because they have metabolic, structural, and regulatory functions and are ubiquitous [16,17].

As mentioned earlier, besides macronutrients, micronutrients are a necessary requirement by plants, although in smaller amounts—less than 0.01% of dry matter. Regardless, micronutrients play an important role in the growth and development of plants. Some metals (i.e., Cu and Zn) and their compounds show remarkable bactericidal and fungicidal activity [12].

Considering the significant roles of macro- and micronutrients in plant physiology, the potential influence of element concentrations in plant tissues of *Brassicaceae* hybrids on resistance to chosen pests was investigated as a main aim of the study. In detail, research was connected to the plants' response to two different insects: *Delia radicum* (Cabbage root fly) and *Brevicoryne brassicae* (Cabbage aphid).

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Twelve hybrid combinations (F₅–F₇) were used as research material (Table 1). All genotypes were obtained at the Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences (PULS) with the use of *in vitro* technique described by Niemann et al. [18].

Table 1. List of hybrid genotypes used in the study.

No. of Line	Cross Combination
H1	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> —PI 649097
H2	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> —PI 649094
H3	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. carinata</i> cv. Dodola
H4	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> —PI 649099
H5	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007569
H6	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. tournefortii</i>
H7	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>
H8	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574
H9	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> —PI 649096
H10	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. fruticulosa</i> —PI 649097
H11	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>S. alba</i> cv. Bamberka
H12	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574

2.2. Field Conditions

The experiment was conducted at the Poznań University of Life Sciences Experimental Station located in Dłoń (51°41′23.835″ N 17°4′1.414″ E), on a typical heavy soil of III quality class. The experiment was carried out in a randomized complete block design with three replications. For plant analysis, we chose 10 plants per hybrid in each replication in each year of study. Agricultural practices were optimal for local agroecological conditions. Wheat (*Triticum aestivum* L.) was used as a forecrop in three preceding years. The pre-sowing fertilization consisted of ammonium phosphate (200 kg ha⁻¹) and ammonium nitrate (100 kg ha⁻¹). During spring, four more fertilizers were used: Saletrosan 26 (300 kg ha⁻¹), ammonium nitrate (200 kg ha⁻¹), and ADOB Bor, containing boron and nitrogen, which was also used as an autumn treatment. One fungicide—Caryx 240SL (1 L ha⁻¹) was used during plant growth.

2.3. Assessment of Pest Resistance

Resistance to two insects, *Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae*, was assessed during field trials. The assessment of general damage caused by *D. radicum* and *B. brassicae* infestation was performed in 2017, 2018, and 2019. The evaluation of direct damage on roots for *D. radicum*, and the percentage of infested plants by *B. brassicae* was executed according to the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) standards [19] on randomly chosen individuals (Figures 1 and 2). For every genotype, ten plants were assessed in each replication. The severity of insect damage and plant infestation were evaluated at physiological maturity on a one to nine scoring scale, used commonly by the Research Center for Cultivar Testing in Poland, which corresponds to the International Union for the Protection of New Varieties of Plants [20] system of assessment. According to this scale, for *D. radicum*, a score of nine means no visible damage on plants (highly resistant), a score of five means that lesions are visible on up to 25% of the roots and surface of the leaves (moderately resistant), and a score of one means a completely damaged plant (fully susceptible). For *B. brassicae*, a score of nine means no insects present on the plant (highly resistant), a score of five means small and medium sized colonies on the plant (moderately resistant), and a score of one means that the plant is completely covered by aphid colonies (fully susceptible). The average values from ten plants were calculated for each replication, which allowed us to obtain quantitative traits data with the normal distributions.



Figure 1. *B. brassicae* infestation on the leaf of the *Brassicaceae* hybrid.



Figure 2. Damage caused by *D. radicum* on the root of the *Brassicaceae* hybrid.

2.4. Analysis of Plant Materials

Whole plants were collected from the field. For every genotype, ten randomly chosen individuals were assessed. The plant material was collected at two dates corresponding to

the vegetation phases: the BBCH 11–14 rosette phase (vegetative stage) and the flowering phase BBCH 63–65 (flowering stage). Plant material, consisting of fresh leaves and stems, was dried at 60 °C, ground and ashed in a furnace at 450 °C for 6 h. The ash was dissolved in 5 mL of 6 mol·dm⁻³ HCl [21] and diluted to a constant volume with distilled water. The obtained extracts were analyzed to assess macronutrient (K, Ca, Mg and Na) and micronutrient (Cu, Zn, Mn, Fe and Ni) contents using atomic absorption spectroscopy (ASA) in a Varian Spectra AA 220 FS apparatus. For total nitrogen (N_{tot}) and phosphorus content (P_{tot}), plant samples were analyzed separately and two different methods were performed. Total phosphorus content was measured colorimetrically by the ammonium methanadinate method and total nitrogen was analyzed by the Kjeldahl method [21]. Total sulfur (S_{tot}) and sulfur sulfate (S-SO₄) were determined by turbidimetric methods by Butters and Chenery [22] and Bardsley and Lancaster [23], respectively. All the assays identifying the amounts of mineral elements (nutrients) were performed in three replications of the same biological sample. The macronutrient and micronutrient contents as well as total nitrogen, total sulfur, and sulfur sulfate were observed only in 2019 in two growth stages: vegetative stage and flowering stage.

2.5. Statistical Analysis

The normality of the distributions of the studied elements (N_{tot}, P_{tot}, S_{tot}, S-SO₄, K, Ca, Na, Mg, Cu, Zn, Mn, Ni, and Fe) were tested using Shapiro–Wilk’s normality test [24]. Multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed. Next, two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the effects of hybrids and growth stages as well as hybrid × growth stage interaction on the variability of N_{tot}, P_{tot}, S_{tot}, S-SO₄, K, Ca, Na, Mg, Cu, Zn, Mn, Ni, and Fe. The mean values and standard deviations of mineral elements were calculated. The Fisher’s least significant differences (LSDs) were calculated for individual minerals and on this basis, homogeneous groups were determined. The relationships between analyzed nutrients were assessed on the basis of Pearson’s correlation for growth stages independently. Relationships of observed mineral elements were presented in heatmaps. Results were also analyzed using multivariate methods. The canonical variate analysis was applied in order to present multi-trait assessment of similarity of tested hybrids in a lower number of dimensions with the least possible loss of information [25]. This makes it possible to illustrate variation in species in growth stages of all observed mineral elements in the graphic form. The Mahalanobis distance [26] was suggested as a measure of “poly-trait” hybrids similarity [27], whose significance was verified by means of critical value D_{α} , called “the least significant distance” [28]. Mahalanobis distances were calculated for hybrids, independently for growth stages. The associations between observed mineral elements, resistance to *Brevicoryne brassicae*, and resistance to *Delia radicum* were estimated using regression analysis in both growth stages independently in each year of study. The mineral element observations were treated as independent variables and considered in individual models. In all analyses, we used the critical significance levels equal to 0.05, 0.01, and 0.001, resulting from a Bonferroni correction. All the analyses were conducted using the GenStat 18th edition statistical software package.

3. Results

3.1. Macro- and Micronutrient Analysis

The results of the MANOVA performed indicated that all the hybrids ($F_{11;48} = 64.99$; $p < 0.0001$), growth stages ($F_{1;48} = 3112.04$; $p < 0.0001$), and hybrid × growth stage interaction ($F_{11;48} = 45.84$; $p < 0.0001$) were significantly different with regard to all of the 13 quantitative mineral elements. Analysis of variance indicated that the main effects of hybrids as well as hybrid × growth stage interaction were significant for all the nutrients of study (Table 2). The main effects of growth stages were significant for all the nutrients except K (Table 2). The mean values and standard deviations for the observed mineral

elements indicated a high variability among the tested hybrids for which significant differences were found in growth stages of all the analyzed nutrients (Table 3).

Table 2. Mean squares form two-way analysis of variance for analyzed nutrients.

Source of Variation	Hybrid	Growth Stage	Hybrid × Growth Stage	Residual
d.f.	11	1	11	48
Ptot	0.007 ***	0.122 ***	0.004 ***	0.001
S-SO ₄	2.257 ***	24.743 ***	1.314 ***	0.073
Ntot	37.148 ***	435.563 ***	31.765 ***	0.8435
Stot	1.567 ***	158.554 ***	0.498 ***	0.1296
K	17.082 ***	0.381	29.106 ***	0.383
Ca	30.857 ***	587.549 ***	21.277 ***	0.128
Na	0.002 ***	0.004 ***	0.003 ***	0.001
Mg	0.120 ***	3.472 ***	0.082 ***	0.001
Cu	0.405 ***	4.661 ***	0.605 ***	0.014
Zn	2744.726 ***	9092.936 ***	2807.555 ***	4.711
Mn	1473.782 ***	12,554.258 ***	463.411 ***	5.329
Ni	0.886 ***	8.487 ***	0.514 ***	0.069
Fe	78,015.46 ***	643,093.3 ***	75,226.66 ***	26.87

*** $p < 0.001$.

The correlation analysis within nutritional elements indicated statistically significant correlation coefficients for Zn and Fe, Mn and Fe, S-SO₄ and Cu, Ntot and Mn, K and Na, Ca and Mg, Ca and Cu, Ca and Fe, and Na and Mg in both growth stages (Table 4, Figures 3 and 4). Additionally, in the vegetative stage, we observed significant correlation between Ptot and Stot, Ptot and Zn, Stot and S-SO₄, Stot and Zn, Stot and Fe, K and Mn, Ca and Zn, Ca and Ni, Na and Ni, Mg and Ni, Cu and Zn, Cu and Fe as well as Zn and Mn (Table 2, Figure 3). In the flowering stage, the pairs Ptot-K, Ptot-Mn, S-SO₄-K, S-SO₄-Ca, S-SO₄-Mg, S-SO₄-Mn, Ntot-Ca, Ntot-Fe, Stot-K, K-Ca, K-Mg, K-Zn, Ca-Na, Ca-Mn, Na-Fe, Mg-Cu, Mg-Mn, Mg-Fe, Cu-Mn and Cu-Ni were significantly correlated (Table 4, Figure 4).

Individual nutrients are of different importance and have a different share in the joint multivariate variation. A study on the multivariate variation for hybrids also includes the identification of the most important mineral elements in the multivariate variation of hybrids. Analysis of canonical variables is a statistical tool making it possible to solve the problem of multivariate relationships [29–32]. Figures 5 and 6 show the variability of the 13 nutrients of 12 studied rapeseed hybrids in the growth stages of the first two canonical variables in the first and second growth stage, respectively. In the graph, the coordinates of the point for particular hybrids are the values for the first and second canonical variables, respectively. The first two canonical variables accounted for 95.93% and 78.11% of the total multivariate variability between the individual hybrids in the vegetative stage and flowering stage, respectively (Table 5, Figures 5 and 6). The most significant, negative, linear relationship between the first canonical variables was found for Zn and Fe in the vegetative stage (Table 5); the second canonical variable in the vegetative stage was significantly positively correlated with Ni and negatively correlated with Ca, Mg, and Mn (Table 5). In the flowering stage, the most significant, positive, linear relationship between the first canonical variables was found for Ntot, Ca, Mg, Mn, and Fe (Table 5). The second canonical variable in the flowering stage was significantly positively correlated with S-SO₄, K, Ca, and Mg (Table 5). The greatest variation of all 13 nutrients jointly (measured Mahalanobis distances) was found for hybrids H3 and H9 (in vegetative stage) and H4 and H6 (in flowering stage), the Mahalanobis distance between them amounted to 232.13 and 86.35, respectively (Table 6). The greatest similarity was found for hybrids H8 and H11 (13.69) in the vegetative stage as well as between H1 and H5 (8.45) in the flowering stage (Table 6). The correlation coefficient between Mahalanobis distances in both terms was equal to -0.1606 and was not significant ($p = 0.1977$).

Table 3. Mean values and standard deviations (s.d.) for observed nutrients (N = 90).

Nutrient	Ptot		S-SO ₄				Ntot				Stot				K					
	I		II		I		II		I		II		I		II		I		II	
	Hybrid	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean
H1	0.772	0.011	0.827	0.008	1.943	0.198	3.493	0.359	44.1	0.254	38.96	2.290	2.633	0.239	5.918	0.081	15.58	0.975	17.43	0.074
H2	0.789	0.028	0.890	0.012	2.449	0.125	2.226	0.514	45.08	0.676	42.7	0.790	2.917	0.441	6.039	0.224	21.87	0.748	14.09	0.572
H3	0.783	0.032	0.871	0.041	2.395	0.231	2.989	0.268	43.95	0.370	41.24	0.769	2.609	0.053	6.037	0.298	21.36	0.612	18.15	0.099
H4	0.777	0.024	0.872	0.048	2.973	0.188	2.822	0.042	41.81	0.498	39.42	0.232	2.891	0.149	5.764	0.705	17.14	0.492	14.33	0.092
H5	0.764	0.002	0.837	0.022	2.266	0.274	2.977	0.129	40.11	0.422	40.88	0.199	2.28	0.336	6.077	0.300	18.66	1.117	19.26	0.307
H6	0.773	0.016	0.847	0.018	1.951	0.603	3.244	0.160	40.87	0.896	32.88	0.073	2.4	0.265	6.439	0.235	19.76	0.588	21.35	0.375
H7	0.704	0.015	0.792	0.018	2.105	0.209	3.352	0.285	48.71	1.027	37.88	0.089	3.15	0.079	5.607	0.097	17.41	0.420	20.81	0.133
H8	0.725	0.021	0.929	0.017	2.531	0.543	4.843	0.298	44.88	0.540	43.61	0.295	3.577	0.239	6.28	0.552	22.33	0.446	18.71	0.718
H9	0.774	0.010	0.830	0.037	2.053	0.074	2.678	0.101	44.75	2.167	30.35	0.106	3.703	0.076	6.326	0.669	22.74	0.210	17.78	0.034
H10	0.758	0.050	0.880	0.069	3.003	0.110	5.885	0.265	41.92	1.390	33.69	0.481	4.113	0.100	6.428	0.935	19.29	1.646	20.83	0.296
H11	0.719	0.004	0.803	0.009	2.747	0.091	3.967	0.152	42.35	1.821	37.91	0.109	4.19	0.108	6.423	0.290	18.17	0.486	21.88	0.563
H12	0.727	0.046	0.717	0.023	2.23	0.156	4.241	0.102	41.96	0.362	41.95	0.165	4.363	0.140	7.103	0.109	17.25	0.608	25.19	0.472
LSD _{0.05}	0.044		0.054		0.479		0.433		1.775		1.281		0.367		0.772		1.328		0.643	
Nutrient	Ca		Na				Mg				Cu				Zn					
	I		II		I		II		I		II		I		II		I		II	
	Hybrid	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean
H1	4.4	0.020	10.11	0.266	0.179	0.002	0.187	0.006	0.506	0.012	1.059	0.053	4.207	0.090	4.703	0.172	75.92	4.783	23.82	0.862
H2	5.93	0.216	10.46	0.423	0.250	0.011	0.183	0.001	0.726	0.031	0.9	0.033	4.233	0.061	4.003	0.057	62.89	6.362	21.79	0.932
H3	6.52	0.106	12.71	0.361	0.209	0.008	0.216	0.010	0.738	0.020	1.243	0.006	4.373	0.070	4.86	0.020	165.8	4.323	17.51	0.868
H4	6.8	0.146	11.75	0.147	0.236	0.012	0.255	0.019	0.764	0.041	1.211	0.042	3.507	0.031	4.04	0.115	42.64	0.839	32.09	1.330
H5	10.72	0.450	11.86	0.352	0.239	0.008	0.212	0.003	0.957	0.058	1.125	0.053	3.593	0.147	4.757	0.078	25.26	3.092	23.24	1.161
H6	6.33	0.203	9.12	0.128	0.262	0.030	0.229	0.009	0.726	0.008	0.871	0.025	4.59	0.281	4.653	0.012	21.8	0.559	17.75	0.661
H7	7.75	0.087	18.19	0.530	0.258	0.013	0.211	0.004	0.948	0.003	1.405	0.017	3.867	0.058	4.737	0.023	21.93	0.344	19.25	0.849
H8	8	0.431	16.03	0.690	0.260	0.009	0.234	0.030	0.678	0.012	1.33	0.044	3.46	0.072	5.143	0.021	22.1	1.623	20.31	2.150
H9	7.41	0.001	6.75	0.276	0.228	0.036	0.192	0.007	0.646	0.022	0.952	0.040	4.227	0.227	3.767	0.111	26.54	2.076	16.54	0.113
H10	7.6	0.123	17.52	0.254	0.201	0.001	0.218	0.003	0.654	0.028	1.472	0.007	3.4	0.080	4.633	0.256	18.27	0.211	22.6	1.074
H11	8.73	0.300	12.63	0.860	0.232	0.017	0.165	0.003	0.751	0.013	1.014	0.044	3.95	0.070	4.03	0.010	20.55	0.017	19.2	0.421
H12	7.37	0.205	19	0.481	0.187	0.005	0.265	0.013	0.774	0.032	1.555	0.041	4.113	0.101	4.3	0.100	18.9	0.850	18.77	0.106
LSD _{0.05}	0.396		0.7553		0.027		0.020		0.047		0.063		0.218		0.183		4.876		1.728	

Table 3. Cont.

Nutrient	Mn		Ni				Fe					
	I		II		I		II		I		II	
	Hybrid	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean
H1	24.59	0.516	58.39	1.917	3.8	0.300	2.39	0.135	332.7	4.770	84.5	1.061
H2	66.98	1.497	71.38	1.610	2.833	0.058	1.75	0.128	278.9	2.962	61	3.555
H3	63.91	2.506	80.7	0.232	3	0.529	3.407	0.546	960.6	15.677	85.8	1.486
H4	35.5	4.358	55.44	3.878	3.067	0.351	1.74	0.386	215.3	4.051	119.6	4.845
H5	30.67	1.723	65.33	1.541	2.033	0.208	2.057	0.029	173.4	9.900	80.7	1.061
H6	25.95	3.765	53.17	1.478	2.4	0.100	2.08	0.115	211.7	2.235	45.4	0.567
H7	56.17	4.792	92.07	1.390	2.167	0.252	2.14	0.036	179.9	0.740	89.4	2.597
H8	42.95	0.197	96.3	2.239	3.2	0.100	2.357	0.418	179.4	0.952	83.7	1.765
H9	46.55	2.470	33.33	1.558	3.133	0.306	2.303	0.218	144.8	10.980	48.1	1.465
H10	47.96	1.422	88.05	2.410	2.433	0.208	1.827	0.292	147.7	2.743	98.7	0.756
H11	25.75	0.230	54.59	1.480	3.1	0.200	1.99	0.070	156.5	0.367	72.6	0.113
H12	15.63	2.680	50.78	1.153	2.8	0.100	1.687	0.197	243	7.238	86.2	3.540
LSD _{0.05}	4.439		3.25		0.438		0.448		11.7		3.953	

Table 4. The correlation coefficients matrix for nutrients analyzed in the vegetative stage (above diagonal) and flowering stage (below diagonal) (N = 90).

Nutrient	Ptot	S-SO ₄	Ntot	Stot	K	Ca	Na	Mg	Cu	Zn	Mn	Ni	Fe
Ptot	1	0.02	-0.25	-0.46**	0.17	-0.32	-0.12	-0.3	0.24	0.40*	0.2	0.21	0.3
S-SO ₄	0.09	1	-0.22	0.37*	-0.01	0.18	0.01	0	0.06	-0.05	0.13	0.01	-0.07
Ntot	0.04	-0.05	1	0.06	0.14	-0.27	0.18	0	0.06	0.14	0.51***	0.12	0.08
Stot	-0.32	0.3	-0.08	1	0.04	0.18	-0.25	-0.15	-0.26	-0.42*	-0.17	0.14	-0.34*
K	-0.53***	0.53***	-0.15	0.52**	1	0.1	0.36*	-0.08	0.1	0.16	0.57***	-0.02	0.17
Ca	-0.22	0.65***	0.37*	0.18	0.55***	1	0.28	0.69***	0.31**	-0.44**	-0.12	-0.53***	0.31**
Na	0.02	0.19	0.19	0.29	0.23	0.44**	1	0.43**	-0.01	-0.28	0.29	-0.41*	-0.27
Mg	-0.14	0.63***	0.29	0.15	0.46**	0.91***	0.57***	1	-0.22	-0.21	0.09	-0.72***	-0.1
Cu	0.29	0.41**	0.31	-0.02	0.22	0.41**	0.24	0.39*	1	0.40*	0.02	0.12	0.41*
Zn	0.19	-0.05	0.24	-0.27	-0.52**	0	0.26	0.08	-0.09	1	0.46**	0.32	0.96***
Mn	0.41*	0.44**	0.42*	-0.22	-0.03	0.62***	0.09	0.50**	0.71***	0.03	1	-0.13	0.40*
Ni	0.21	-0.16	0.07	-0.06	-0.09	-0.16	-0.11	-0.06	0.39*	-0.32	0.2	1	0.2
Fe	0.1	0.33	0.39*	-0.21	-0.11	0.58***	0.42**	0.68***	0.21	0.71***	0.40*	-0.06	1

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; green—correlation coefficients significant in both vegetative and flowering stages with the same sign; red—correlation coefficients significant in both vegetative and flowering stages with the opposite sign.

Table 5. Correlation coefficients between the first two canonical variables and nutrients in both terms (N = 90).

Nutrient	Vegetative Stage		Flowering Stage	
	First Canonical Variable	Second Canonical Variable	First Canonical Variable	Second Canonical Variable
Ptot	−0.3721	0.2918	0.2488	−0.2435
S-SO ₄	0.067	−0.3284	0.1973	0.7333 **
Ntot	−0.1418	−0.2435	0.6071 *	−0.0484
Stot	0.4106	0.1114	−0.4367	0.4807
K	−0.1285	−0.0412	−0.2577	0.8729 ***
Ca	0.3175	−0.6427 *	0.6113 *	0.7067 *
Na	0.2642	−0.4646	0.4248	0.1661
Mg	0.0271	−0.8156 **	0.6718 *	0.6005 *
Cu	−0.3758	0.5651	0.3847	0.5392
Zn	−0.9693 ***	0.1223	0.5569	−0.5692
Mn	−0.448	−0.4653	0.6824 *	0.4192
Ni	−0.1824	0.6783 *	0.0558	0.1199
Fe	−0.9912 **	0.0967	0.8769 ***	0.0079
Percentage variation	91.56%	4.37%	57.32%	20.79%

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.**Table 6.** The Mahalanobis distances between the studied hybrids in vegetative stage (above diagonal) and flowering stage (below diagonal) (N = 90).

Hybrid	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
H1	0	33.13	173.38	37.9	61.39	49.54	57.3	58.35	66.71	65.05	61.69	46
H2	28.37	0	181.88	24.48	44.88	45.17	31.63	44.59	55.27	50.09	52.16	43.64
H3	28.22	37.42	0	195.66	208.44	215.72	200.46	219.72	232.13	227.49	223.93	206.38
H4	46.06	49.29	45.79	0	28.93	34.68	26.07	31.64	46.06	35.54	36.56	32.1
H5	8.45	29.46	25.08	47.36	0	38.97	27.91	28.78	44.35	32.72	29.85	35.9
H6	42.63	54.68	61.9	86.35	43.74	0	46.13	21.59	22.85	28.45	20.74	19.21
H7	38.99	45.99	17.49	50.39	34.73	68.96	0	36.7	50	37.85	41.9	41.95
H8	32.6	39.78	16.13	51.15	28.48	63	17.05	0	19.21	14.56	13.69	27.49
H9	43.2	50.36	64.55	79.56	47.5	25.5	72.46	68.37	0	20.43	20.43	34.58
H10	35.84	48.17	28.36	53.36	33.72	60.5	21.3	24.01	63.09	0	17.19	33.23
H11	29.65	44.47	47.94	71.58	29.34	23.12	52.85	47.68	32.93	43.25	0	23.02
H12	36.7	56.64	41.49	57.93	34.64	54.85	41.83	40.9	57.9	33.69	39.15	0

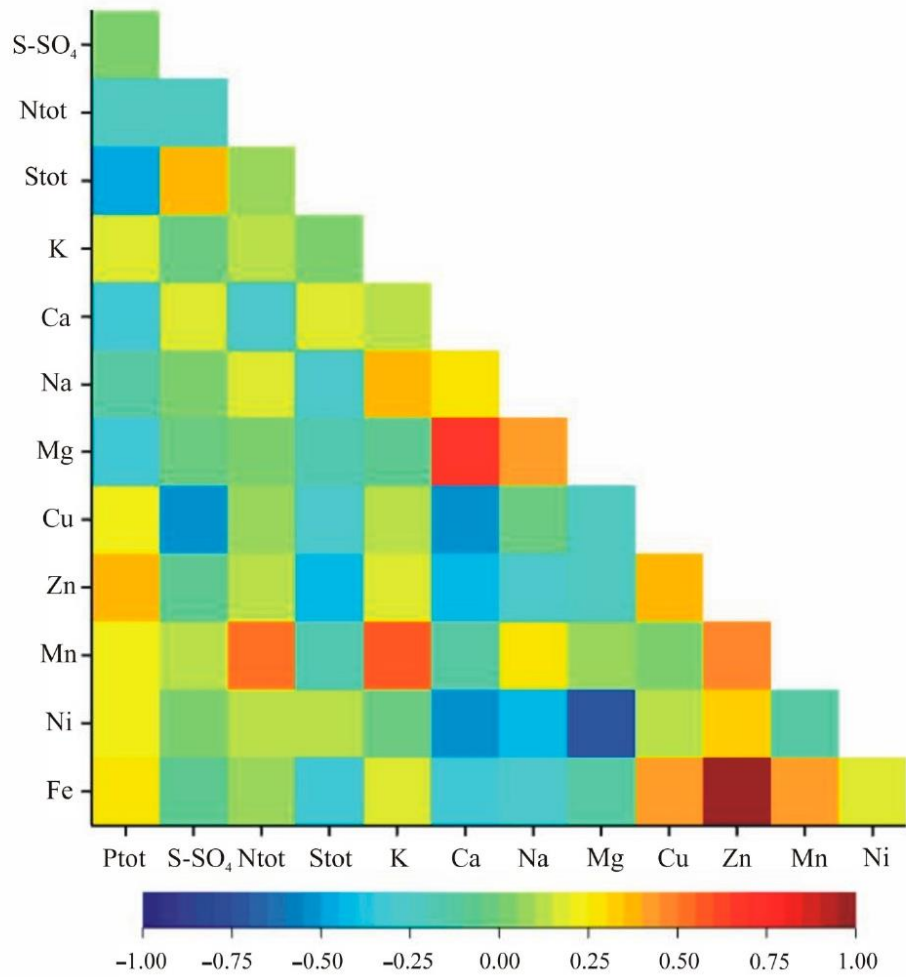


Figure 3. Heatmap for linear Pearson' correlation coefficients between observed nutrients in the vegetative stage ($r_{cr} = 0.36$).

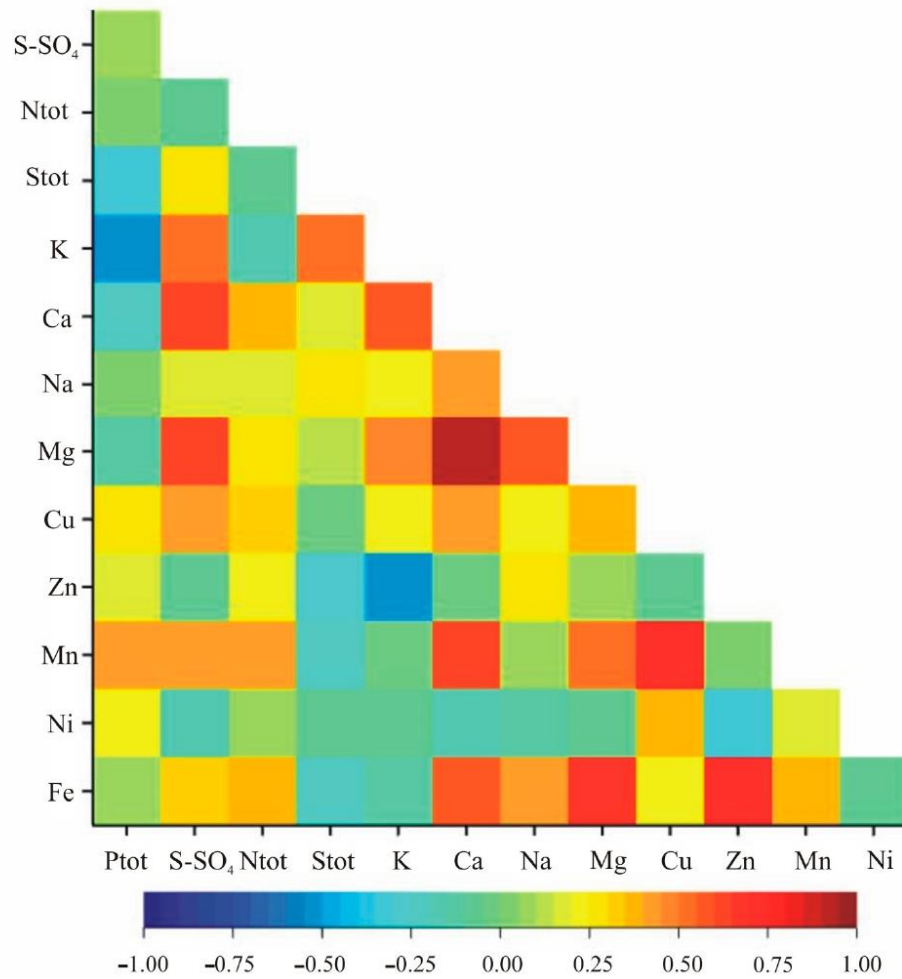


Figure 4. Heatmap for linear Pearson' correlation coefficients between observed nutrients in the flowering stage ($r_{cr} = 0.36$).

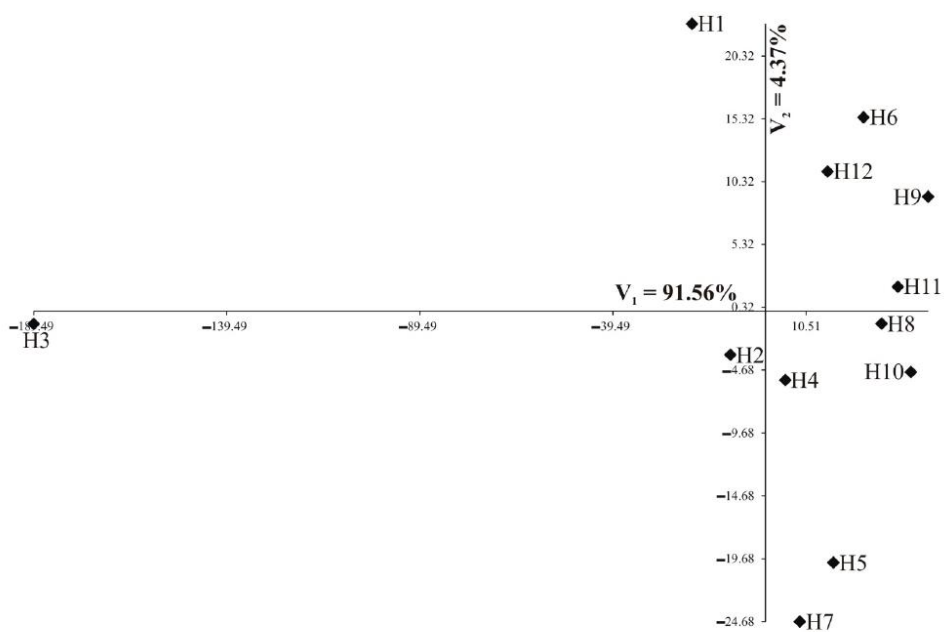


Figure 5. Distribution of 12 hybrids in the space of the first two canonical variables in the vegetative stage (N = 90).

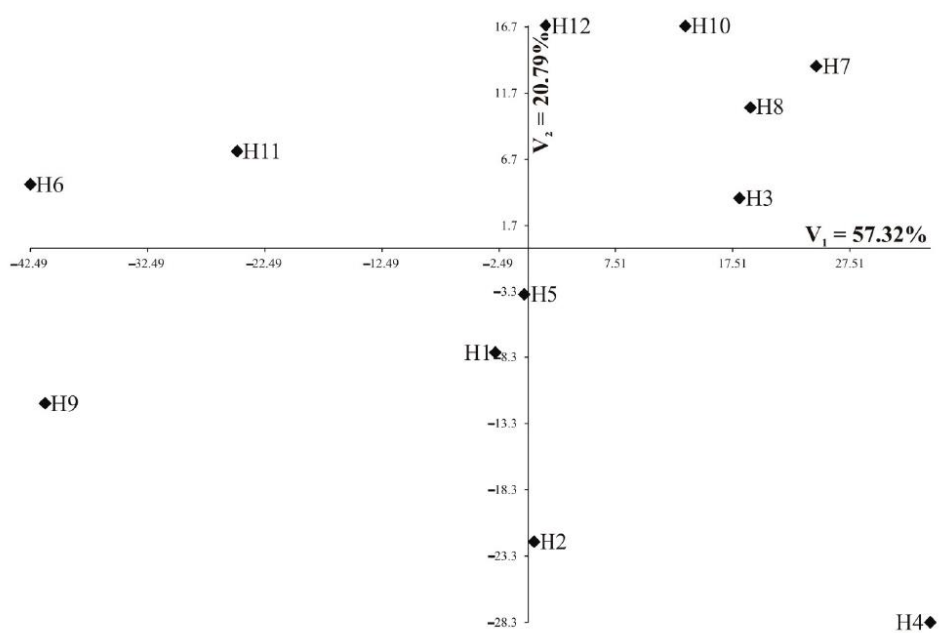


Figure 6. Distribution of 12 hybrids in the space of the first two canonical variables in the vegetative stage (N = 90).

3.2. Resistance to Pests

The resistance to *B. brassicae* and *D. radicum* of the hybrids was widely described by Niemann et al. [33]. In our previous research, we assessed the resistance to *B. brassicae* and *D. radicum* within 53 rapeseed cultivars and 31 interspecific hybrids including twelve genotypes investigated in this study. Generally, the resistance to insects of studied hybrid plants varied between genotypes and years. For *B. brassicae*, mean resistance values for hybrids in 2017, 2018, and 2019 were 8.766, 6.250, and 7.610, respectively. The highest level of resistance (9.000) was observed in 2017 for three genotypes: *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata*-PI 649094, *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata*-PI 649096, and *B. napus* cv. Jet Neuf × *S. alba* cv. Bamberka, while the lowest level of resistance (3000) was reported in 2018 for *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08.007574. For *D. radicum*, mean resistance values for hybrids in 2017, 2018, and 2019 were 6.542, 6.611, and 6.864, respectively. The highest level of resistance (8.400) was noticed in 2017 for *B. napus* cv. Lisek × *B. fruticulosa*-PI649099 and in 2019 for *B. napus* cv. Lisek × *B. tournefortii*. Meanwhile, the lowest level of resistance (2.300) was observed in 2017 for one hybrid—*B. napus* cv. Lisek × *B. fruticulosa*-PI649097.

3.3. Associations between Pest Resistance and Nutrient Content

The associations between analyzed nutrients, resistance to *B. brassicae*, and resistance to *D. radicum* are presented in the Tables 7 and 8, respectively. We observed a statistically significant negative (−0.2101) association between Ca in the vegetative stage and resistance to *B. brassicae* in 2019 ($p = 0.033$). Percentage of variation of resistance to *B. brassicae* was accounted by a Ca variation equal to 31.8% (Table 7). Additionally, a positive (0.817) association between Cu in the vegetative stage and resistance to *B. brassicae* was observed in 2019 ($p = 0.036$). Percentage of variation of resistance to *B. brassicae* accounted by Cu variation was equal to 30.6% (Table 7). The resistance to *D. radicum* in 2019 was statistically significantly negatively (−0.6) associated with Ca in the vegetative stage and $p = 0.014$. Percentage of variation of resistance to *D. radicum* accounted by Ca variation was equal to 41.5% (Table 8).

Table 7. The associations between the analyzed nutrients and resistance to *Brevicoryne brassicae* (N = 90).

Nutrient	Growth Stage	2017			2018			2019		
		Estimate	p Values	Percentage of Variation Accounted	Estimate	p Values	Percentage of Variation Accounted	Estimate	p Values	Percentage of Variation Accounted
Ptot	vegetative stage	-0.76	0.726		-0.7	0.959		9	0.107	16.2
	flowering stage	0.2	0.865		-12.23	0.069	22.3	-2.15	0.503	
S-SO ₄	vegetative stage	0.225	0.161	10.5	-0.32	0.759		-0.076	0.87	
	flowering stage	-0.0422	0.482		-0.228	0.541		-0.073	0.663	
Ntot	vegetative stage	0.0173	0.51		0.045	0.784		-0.0086	0.906	
	flowering stage	0.0099	0.502		-0.1571	0.064	23.2	-0.0487	0.219	6.2
Stot	vegetative stage	0.0949	0.25	4.3	0.227	0.666		0.085	0.717	
	flowering stage	0.002	0.992		-0.089	0.928		0.37	0.39	
K	vegetative stage	0.0431	0.081	20.1	-0.09	0.582		0.0289	0.694	
	flowering stage	-0.0137	0.482		0.094	0.438		-0.0019	0.972	
Ca	vegetative stage	0.0522	0.172	9.6	0.115	0.642		-0.2101	0.033	31.8
	flowering stage	0.0009	0.955		-0.0039	0.969		-0.0274	0.533	
Na	vegetative stage	2.11	0.324	0.7	-6.7	0.62		-7.63	0.185	8.5
	flowering stage	-0.87	0.678		-10.6	0.409		0.62	0.915	
Mg	vegetative stage	0.5	0.31	1.3	3.34	0.271	3.1	-1.74	0.191	8.1
	flowering stage	0	1		0.01	0.997		-0.254	0.735	
Cu	vegetative stage	-0.102	0.515		0.694	0.473		0.817	0.036	30.6
	flowering stage	-0.216	0.116	15.1	-1.246	0.148	11.7	-0.519	0.178	9.1
Zn	vegetative stage	0.0001	0.94		-0.0015	0.87		0.0048	0.215	6.4
	flowering stage	-0.0037	0.804		-0.0685	0.451		-0.0283	0.484	
Mn	vegetative stage	0.0052	0.146	11.9	0.0111	0.633		0.0065	0.526	
	flowering stage	0	1		-0.017	0.588		-0.0094	0.279	2.8
Ni	vegetative stage	-0.011	0.929		-1.083	0.139	12.6	0.16	0.64	
	flowering stage	-0.009	0.949		-0.269	0.745		0.106	0.773	
Fe	vegetative stage	0.00003	0.926		-0.0001	0.937		0.00094	0.201	7.4
	flowering stage	-0.00001	0.997		-0.0075	0.686		-0.0055	0.501	
Total percent of variation accounted by all 13 nutrients				67.81			45.77			89.07

Table 8. The associations between analyzed nutrients and resistance to *Delia radicum* (N = 90).

Nutrient	Growth Stage	2017			2018			2019		
		Estimate	p Values	Percentage of Variation Accounted	Estimate	p Values	Percentage of Variation Accounted	Estimate	p Values	Percentage of Variation Accounted
Ptot	vegetative stage	-1.3	0.937		13	0.341		5.6	0.715	
	flowering stage	6.11	0.505		7.8	0.292	2.1	2.77	0.74	
S-SO ₄	vegetative stage	1.84	0.144	12.1	-0.94	0.382		-0.5	0.677	
	flowering stage	-0.298	0.529		-0.534	0.151	11.4	0.122	0.777	
Ntot	vegetative stage	0.016	0.94		0.069	0.687		0.189	0.302	1.6
	flowering stage	0.01	0.935		-0.0964	0.304	1.6	-0.078	0.454	
Stot	vegetative stage	0.323	0.628		-0.806	0.119	14.8	0.184	0.76	
	flowering stage	-0.12	0.922		-1.554	0.106	16.4	0.28	0.808	
K	vegetative stage	0.347	0.072	21.6	0.209	0.206	7	0.098	0.602	
	flowering stage	-0.093	0.548		-0.151	0.22	6.1	-0.016	0.907	
Ca	vegetative stage	0.471	0.111	15.7	0.28	0.264	3.5	-0.6	0.014	41.5
	flowering stage	0.015	0.903		-0.176	0.065	23.1	0.024	0.831	
Na	vegetative stage	30.2	0.053	25.7	14.7	0.283	2.5	-3.1	0.841	
	flowering stage	12.5	0.446		-18.3	0.157	10.8	20.7	0.144	12.1
Mg	vegetative stage	6.17	0.095	17.9	2.18	0.499		-4.84	0.155	11
	flowering stage	0.33	0.879		-2.42	0.147	11.8	1.11	0.565	
Cu	vegetative stage	-1.06	0.384		-0.021	0.983		1.06	0.331	0.4
	flowering stage	-1.17	0.295	2.0	0.052	0.956		0.12	0.909	
Zn	vegetative stage	-0.0045	0.694		0.0029	0.756		0.0053	0.603	
	flowering stage	0.013	0.913		-0.0377	0.693		-0.042	0.693	
Mn	vegetative stage	0.0374	0.187	8.4	0.0266	0.258	3.8	0.0152	0.567	
	flowering stage	0.0041	0.871		-0.0041	0.844		0.0027	0.906	
Ni	vegetative stage	-1.12	0.237	5.0	-0.528	0.508		0.731	0.4	
	flowering stage	-0.39	0.713		0.99	0.234	5.2	0.46	0.626	
Fe	vegetative stage	-0.0004	0.847		0.0001	0.963		0.0013	0.511	
	flowering stage	0.0033	0.89		-0.0196	0.297	1.9	-0.0001	0.996	
Total percent of variation accounted by all 13 nutrients				89.17			91.73			85.73

4. Discussion

The pathogens and insects are responsible for the reduced crop yield, so presently, a variety of fungicides and pesticides are applied in agriculture. Taking into account the current requirements of sustainable agriculture with less consumption of agrochemicals, more attention is paid to the natural defense mechanisms of plants against pests and pathogens. It can be assumed that plants with the proper concentration of nutrients in plant tissues will resist pests more, and the research carried out confirmed such a statement indirectly.

B. napus plants are rich in sulfur as it is necessary for plant development. Sulfur is used to synthesize glucosinolate and phytoalexins, which play an important role in plant defense systems [34]. Marazzi and Stadler [35] found a correlation between sulfur plant nutrition and *D. radicum* development by testing *B. napus* plants with three different levels of sulfur supply: no sulfur added, normal dose of sulfur, and double dose of sulfur. The conducted experiment showed that larval survival to pupation, adult emergence, and adult fresh weight was significantly greater when *B. napus* plants received normal or double the normal dose of sulfur. In contrast, our research showed no connection between sulfur content in plants and resistance to *D. radicum*. As stated before, *B. brassicae* is a highly specialized pest. The insect adapts so well that it takes advantage of the plants' own defense system by using glucosinolates produced by the host as protection against predatory species [36]. As glucosinolates do not harm the insect, it would be expected that an increased amount of sulfur and nitrogen in the plant, which are compounds of this toxic chemical, will not impact the number of *B. brassicae* individuals that damage the plants. This assumption corresponds well with our results.

Based on our study, no relation was discovered between nitrogen content and resistance to *D. radicum* and *B. brassicae*. Furthermore, in 2011, Mochiah et al. [37] studied how insect population in *Brassica oleracea* is affected by the use of different soil fertilizers (i.e., NPK and poultry manure). Conducted field trials showed that both organic and synthetic nutrients could increase the population of some pests on cabbage, but the same effect was not observed for *B. brassicae*. However, experiments performed by Mutiga et al. [38] showed clearly that increasing the quantity of nitrogen applied in the soil led to an increase in *B. brassicae* infestation on collard (*Brassica oleracea* var. *acephala*). This phenomena might be explained by enhanced amino acid synthesis caused by increased N level, as it changes the nutritional quality of floem sap; though it is crucial to emphasize that it is the balance and composition of different amino acids that plays the major role [14,38]. Furthermore, a study from Chesnais et al. [39] proved that an increase in N level may indeed positively impact *B. brassicae* size and fecundity, though using excessive nitrogen treatments may limit aphid fertility.

The group of macronutrients also includes calcium, although it is not as required by *Brassica* plants as sulfur or nitrogen. However, the role it plays in plant cells is significant. Calcium is an essential second messenger in many pathways, especially in plant response to pathogen attacks [40,41]. Lecourieux et al. [40] made an exhaustive review of various calcium compounds and their functions in plant organisms and pointed to the importance of calmodulin and calmodulin-binding proteins in plant defense against fungal pathogenic. Based on this, one can risk a theory that the compounds with the participation of calcium including the aforementioned calmodulin can also determine the resistance of plants to pests. The obtained findings from our own research confirm this in some way, as we discovered a significant association between the resistance to *D. radicum* and Ca, and between the resistance to *B. brassicae* and Ca in the last year of our study.

In this study, a positive relationship was shown between the amount of copper in plant cells and resistance to *B. brassicae* (in the third year of the study) This result should be considered interesting and intriguing, more so because copper is attributed with a strong fungicidal and bactericidal effect [12]. Considering the fact that when Cu is present in a low concentration, it acts as a cofactor for metallo-proteins and enzymes, whereas at higher concentrations, it performs as an antimicrobial agent against pathogens. In this aspect, it

would have to be considered whether the Cu level in the plants was sufficiently adequate to induce a pest resistance effect.

Pest management of oilseed rape in Europe relies mostly on chemical treatments. Unfortunately, pesticides are often used as a preventive measure in many cases without precise recognition of insects in the field [42]. Such a demeanor leads to the over-use of broad spectrum chemicals and results in pesticide resistance and pest resurgence [38]. Moreover, uncaredful application, especially during the flowering period, may have harmful effects on beneficial insects such as bees [43]. Therefore, it is particularly relevant to develop a consistent, environmentally friendly approach to limit the pests' population. Considering all the presented results, it cannot be confirmed that adjusted plant nutrition is a sufficient replacement for using pesticides, though it should be considered as part of a non-chemical strategy against dangerous pests, along with biological control and breeding resistant cultivars.

5. Conclusions

Despite the fact that the presented outcomes showed correlation between elemental accumulation expressed by the concentration of nutrients and plant resistance to pests only for Ca and Cu, research in this direction should be continued, as they fit into the philosophy of sustainable agriculture. The role of adjusted plant nutrition in plant resistance should be further analyzed.

Author Contributions: Conceptualization, J.N., J.S., and J.B.; Methodology, J.S. and J.N.; Software, J.B.; Validation, J.S., J.N., and J.B.; Formal analysis, J.N., M.J., and M.M.; Investigation, J.S., J.N., M.J., and M.M.; Data curation, J.S., J.N., and J.B.; Writing—original draft preparation, J.S.; Writing—review and editing, J.N., J.B., and M.J.; Visualization, J.B.; Supervision, J.S., J.N., and J.B.; Project administration, J.N.; Funding acquisition, J.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development, project number 54.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. The Food and Agriculture Organization (FAO): FAOSTAT. Production/Yield Quantities of Rapeseed in World. 2020. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed on 23 October 2020).
2. United States Department of Agriculture. Oilseeds: World Markets and Trade. 2020. Available online: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> (accessed on 23 October 2020).
3. Corlouer, E.; Gauffreteau, A.; Bouchet, A.S.; Bissuel-Bélaygue, C.; Nesi, N.; Laperche, A. Envirotypes Based on Seed Yield Limiting Factors Allow to Tackle G×E Interactions. *Agronomy* **2019**, *9*, 798. [CrossRef]
4. Capinera, J.L. *Handbook of Vegetable Pests*; Academic Press Elsevier: London, UK, 2020.
5. Mason, P.G.; Huber, J.T. *Biological Control Programmes in Canada, 1981–2000*; CABI: Wallingford, UK, 2002.
6. Hines, R.L.; Hutchison, W.D. *Cabbage Aphids. VegEdge, Vegetable IPM Resource for the Midwest*; University of Minnesota: Minneapolis, MN, USA, 2013; Available online: <https://www.vegedge.umn.edu/pest-profiles/pests/cabbage-aphids> (accessed on 23 October 2020).
7. Garbe, V.; Gladders, P.; Lane, A. Report of the Concerted Action. In Proceedings of the Research for the Adaption of Oilseed Crops to the New Requirements of the Common Agricultural Policy: Crop Competitivity, Seed Quality, Environment, Integrated Control in Oilseed Crops IOBC/wprs Bulletin, Einsiedeln, Switzerland, 2–4 November 2000; Volume 23, pp. 173–178.
8. Arora, R.; Sandhu, S. (Eds.) *Breeding Insect Resistant Crops for Sustainable Agriculture*; Springer: Singapore, 2017.
9. Jakubus, M.; Bakinowska, E. Varied macronutrient uptake by plants as an effect of different fertilisation schemes evaluated by PCA. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* **2020**, *70*, 56–68. [CrossRef]
10. Jakubus, M.; Graczyk, M. Microelement variability in plants as an effect of sewage sludge compost application assessed by different statistical methods. *Agronomy* **2020**, *10*, 642. [CrossRef]
11. Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobely, M.; Bak, S. Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 10242–10297. [CrossRef] [PubMed]

12. Rai, M.; Ingle, A.P.; Pandit, R.; Paralikar, P.; Shende, S.; Gupta, I.; Biswas, J.K.; Silverio da Silva, S. Copper and copper nanoparticles: Role in management of insect-pests and pathogenic microbes. *Nanotechnol. Rev.* **2018**, *7*, 303–315. [[CrossRef](#)]
13. Jakubus, M. *Sulphur in Environment*; Poznań University of Agriculture: Wojska Polskiego, Poznań, 2006; Volume 48. (In Polish)
14. Cole, R.A. The relative importance of glucosinolates and amino acids to the development of two aphid pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated brassica species. *Entomol. Exp. Appl.* **1997**, *85*, 121–133. [[CrossRef](#)]
15. Rusch, A.; Valantin-Morison, M.; Sarthou, J.P.; Roger-Estrade, J. Integrating Crop and Landscape Management into New Crop Protection Strategies to Enhance Biological Control of Oilseed Rape Insect Pests. In *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pest*; Williams, I.H., Ed.; Springer Science+Business Media B.V.: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 415–448.
16. Jakubus, M.; Graczyk, M. Quantitative changes in sulphur fractions during co-composting of pine bark with green plant material. *Pol. J. Environ. Stud.* **2019**, *28*, 1–12. [[CrossRef](#)]
17. Kopriva, S.; Calderwood, A.; Weckopp, S.C.; Koprivova, A. Plant sulphur and big data. *Plant Sci.* **2015**, *241*, 1. [[CrossRef](#)]
18. Niemann, J.; Wojciechowski, A.; Janowicz, J. Broadening the variability of quality traits in rapeseed through interspecific hybridization with an application of immature embryo culture. *Biotechnol. J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* **2012**, *93*, 109–115. [[CrossRef](#)]
19. Anon. *Guidelines on Pest Risk Analysis. No. 3. Pest Risk Assessment, Scheme*; Bulletin OEPP/EPPO Bulletin: Paris, France, 1997; Volume 27, pp. 281–305.
20. UPOV: International Union for the Protection of New Varieties of Plants. *Guidance on Certain Physiological Characteristics*; Document TGP/12; UPOV: Geneva, Switzerland, 2012.
21. Ostrowska, A.; Gawlinski, S.; Szczubialka, Z. *Metody Analizy i Oceny Wlasciwosci Gleb i Roslin: Katalog*; Dział Wydawnictw IOŚ: Warszawa, Poland, 1991; p. 334.
22. Butters, B.; Chenery, E.M. A rapid method for the determination of total sulphur in soils and plants. *Analyst* **1959**, *84*, 239–245. [[CrossRef](#)]
23. Bardsley, C.E.; Lancaster, J.D. Determination of reserve sulfur and soluble sulfates in soils 1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1960**, *24*, 265–268. [[CrossRef](#)]
24. Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **1965**, *52*, 591–611. [[CrossRef](#)]
25. Rencher, A.C. Interpretation of canonical discriminant functions, canonical variates, and principal components. *Am. Stat.* **1992**, *46*, 217–225.
26. Mahalanobis, P.C. On the generalized distance in statistics. *Proc. Natl. Acad. Sci. India A* **1936**, *12*, 49–55.
27. Seidler-Lożykowska, K.; Bocianowski, J. Evaluation of variability of morphological nutrients of selected caraway (*Carum carvi* L.) genotypes. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *35*, 140–145. [[CrossRef](#)]
28. Camussi, A.; Ottaviano, E.; Caliński, T.; Kaczmarek, Z. Genetic distances based on quantitative nutrients. *Genetics* **1985**, *111*, 945–962. [[CrossRef](#)]
29. Seidler-Lożykowska, K.; Bocianowski, J.; Król, D. The evaluation of the variability of morphological and chemical nutrients of the selected lemon balm (*Melissa officinalis* L.) genotypes. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *49*, 515–520. [[CrossRef](#)]
30. Lahuta, L.B.; Ciak, M.; Rybiński, W.; Bocianowski, J.; Börner, A. Diversity of the composition and content of soluble carbohydrates in seeds of the genus *Vicia* (Leguminosae). *Genet. Resour. Crop Evol.* **2018**, *65*, 541–554. [[CrossRef](#)]
31. Wronska-Pilarek, D.; Szkudlarz, P.; Bocianowski, J. Systematic importance of morphological features of pollen grains of species from *Erica* (Ericaceae) genus. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204557.
32. Bocianowski, J.; Majchrzak, L. Analysis of effects of cover crop and tillage method combinations on the phenotypic nutrients of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using multivariate methods. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2019**, *17*, 15267–15276. [[CrossRef](#)]
33. Niemann, J.; Szwarc, J.; Bocianowski, J.; Weigt, D.; Mrówczyński, M. In-field screening for host plant resistance to *Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae* within selected rapeseed cultivars and new interspecific hybrids. *Open Life Sci.* **2020**, *15*, 711–720. [[CrossRef](#)]
34. Ahuja, I.; Rohloff, J.; Bones, A.M. Defence mechanisms of Brassicaceae: Implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2010**, *30*, 311–348. [[CrossRef](#)]
35. Marazzi, C.; Städler, E. Influence of sulphur plant nutrition on oviposition and larval performance of the cabbage root fly. *Agric. For. Entomol.* **2005**, *7*, 277–282. [[CrossRef](#)]
36. Kuśnierczyk, A.; Winge, P.E.R.; Jørstad, T.S.; Troczynska, J.; Rossiter, J.T.; Bones, A.M. Towards global understanding of plant defence against aphids—timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant Cell Environ.* **2008**, *31*, 1097–1115. [[CrossRef](#)]
37. Mochiah, M.B.; Baidoo, P.K.; Owusu-Akyaw, M. Influence of different nutrient applications on insect populations and damage to cabbage. *J. Appl. Biosci.* **2011**, *38*, 2564–2572.
38. Mutiga, S.K.; Gohole, L.S.; Auma, E.O. Effects of integrating companion cropping and nitrogen application on the performance and infestation of collards by *Brevicoryne brassicae*. *Entomol. Exp. Appl.* **2010**, *134*, 234–244. [[CrossRef](#)]
39. Chesnais, Q.; Couty, A.; Catterou, M.; Ameline, A. Cascading effects of N input on tritrophic (plant–aphid–parasitoid) interactions. *Ecol. Evol.* **2016**, *6*, 7882–7891. [[CrossRef](#)]
40. Lecourieux, D.; Ranjeva, R.; Pugin, A. Calcium in plant defence—signaling pathways. *N. Phytol.* **2006**, *171*, 249–269. [[CrossRef](#)]
41. Ma, Y.; Gerald, A.; Berkowitz, S. Biotic Stress Signalling: Ca²⁺ Mediated Pathogen Defence Programmes. In *Plant Stress Physiology*, 2nd ed.; Shabala, S., Ed.; CAB International: Wallingford, UK, 2017.

42. Williams, I.H. Advances in Insect Pest Management of Oilseed Rape in Europe. In *Insect Pest Management: Field and Protected Crops*, 1st ed.; Horowitz, A.R., Ishaaya, L., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2004; pp. 181–208.
43. Mänd, M.; Williams, I.H.; Viik, E.; Karise, R. Oilseed Rape, Bees and Integrated Pest Management. In *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pest*; Williams, I.H., Ed.; Springer Science+Business Media B.V.: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 357–380.

10.3. Genetic Relationship of *Brassicaceae* Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers



Article

Genetic Relationship of Brassicaceae Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers

Justyna Szwarc^{1,*}, Janetta Niemann¹, Joanna Kaczmarek², Jan Bocianowski³ and Dorota Weigt¹

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland

² Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland

³ Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań, Poland

* Correspondence: justyna.szwarc@up.poznan.pl

Abstract: *Brassica napus* is an important oil source. Its narrow gene pool can be widened by interspecific hybridization with the Brassicaceae species. One of the agronomically important traits, that can be transferred through the hybridization, is the resistance to blackleg, a dangerous disease mainly caused by *Leptosphaeria maculans*. Hybrid individuals can be analyzed with various molecular markers, including Simple Sequence Repeats (SSR). We investigated the genetic similarity of 32 Brassicaceae hybrids and 19 parental components using SSR markers to reveal their genetic relationship. Furthermore, we compared the field resistance to blackleg of the interspecific progenies. The tested set of 15 SSR markers proved to be useful in revealing the genetic distances in the Brassicaceae hybrids and species. However, genetic similarity of the studied hybrids could not be correlated with the level of field resistance to *L. maculans*. Moreover, our studies confirmed the usefulness of the Brassicaceae hybrids in terms of blackleg management.

Keywords: Brassicaceae; interspecific hybrids; SSR markers; *Leptosphaeria maculans*; genetic similarity



Citation: Szwarc, J.; Niemann, J.; Kaczmarek, J.; Bocianowski, J.; Weigt, D. Genetic Relationship of Brassicaceae Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 4290–4302. <https://doi.org/10.3390/cimb44090295>

Academic Editor: Julius Liobikas

Received: 1 August 2022

Accepted: 15 September 2022

Published: 17 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Brassicaceae is a family of high agro-economic importance comprising fodder, oilseed plants, vegetables, ornamental species, as well as plants of medical and scientific importance. Furthermore, ecological, morphological, and genetic diversity of this family makes it a perfect model for relationship and evolution studies [1]. The genus *Brassica* contains three diploid species, i.e., *B. rapa* (AA genome), *B. nigra* (BB genome), and *B. oleracea* (CC genome), and allotetraploid species obtained as a result of natural interspecific crosses, namely *B. napus* (AACC), *B. juncea* (AABB), and *B. carinata* (BBCC). Another representative of the Brassicaceae family is *Sinapis alba*, a yellow mustard plant closely related to *Brassica*, well known for possessing many potentially useful traits [2].

Brassica napus (rapeseed) is one of the most important oil crops, accounting for over 12% of worldwide oil production (USDA). Due to a relatively short history of cultivation and use of conventional breeding methods, rapeseed displays limited genetic diversity [3,4]; therefore, it seems crucial to expand the *B. napus* gene pool. One of the most effective approaches to solve this problem is interspecific hybridization [5]. Crossing the rapeseed with different species may help to enrich the *B. napus* germplasm and to enable the transfer of genome fragments carrying desirable traits, which could further improve the cultivar's characteristics. The sexual incompatibility and differences in the genome sizes of parental components may result in hybridization failure [6]. Barriers of interspecific hybridization can be overcome by implementing in vitro techniques, including ovary, ovule, and embryo rescue [7]. The Department of Genetics and Plant Breeding of Poznań University of Life

Sciences has great experience in creating interspecific Brassicaceae hybrids, which are profoundly analyzed in terms of chromosomal constitution, morphology, as well as insect and pathogen resistance. Recently developed hybrids showed a significant variability of blackleg resistance in field conditions. Blackleg, mainly caused by *L. maculans*, is a fungal disease which can cause significant yield losses [8]. The reliance on commercial cultivars with a single resistance source increases the selective pressure on pathogens and accelerates its evolution. Management of blackleg disease includes proper agronomic practices (such as crop rotation and tillage), the use of fungicides, weed control, the use of certified seeds and the use of resistant cultivars [9]. The breeding of resistant cultivars is environmentally friendly and is a reliable method of controlling blackleg disease [10]. It relies on the existence of naturally resistant genotypes, which can be used as a donor of certain genes conferring blackleg resistance.

Various molecular marker systems such as RFLP, SSR, and RAPD can be used to determine the genetic distance of the Brassicaceae species [11]. Simple Sequence Repeats (SSR) or microsatellites are defined as tandem repeats of short nucleotide motifs, usually consisting of 1–6 base pairs [12]. They occur frequently in eucaryotic organisms, and the variation in repeat numbers results in a high degree of polymorphism. The random distribution of SSR loci in plant genomes allows for genetic differentiation within and between species [13]. Moreover, it defines the high utility of SSR markers for cruciferous plants, as the microsatellite loci among members of the Brassicaceae family show high variation in length, which subsequently permits the differentiation of species [14,15]. The SSR markers had been previously used in numerous Brassicaceae studies, including unraveling the genetic variation and species diversity [14,16,17], species and cultivar differentiation [13,18], and estimation of genetic distances [19].

We are aiming to gain insight into the genetic relationship between hybrids with different parental components, which are diverse in terms of resistance to blackleg. Therefore, the objectives of this research are to determine the genetic similarity of hybrid and parental genotypes from the Brassicaceae family and to evaluate the usefulness of the chosen SSR markers for genetic diversity analysis.

2. Materials and Methods

A total of 32 various Brassicaceae hybrids of F₉ and F₁₀ generation and 19 parental genotypes were used as research material (Table 1). Interspecific hybrids of the F₁ generation were developed at the Department of Genetics and Plant Breeding (Poznań University of Life Sciences), with the use of *in vitro* cultures. Next, selected combinations were self-pollinated multiple times in order to obtain stable hybrid lines.

Table 1. List of Brassicaceae genotypes used in this study and groups for the analysis of molecular variance (AMOVA).

No of Genotype	Combination/Species	Group
1	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> PI 649091	1
2	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. carinata</i> Dodola	1
3	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> —PI 649094	1
4	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> —PI 649096	1
5	<i>B. carinata</i> 1	1
6	<i>B. carinata</i> 2	1
7	<i>B. carinata</i> 3	1
8	<i>B. carinata</i> 4	1
9	<i>B. carinata</i> cv. Dodola	1
10	<i>B. carinata</i> PI 596534	1
11	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	2
12	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> 08 007574	2
13	<i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> (COBORU)	2
14	<i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> PI430485 98CI	2

Table 1. Cont.

No of Genotype	Combination/Species	Group
15	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	2
16	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007569	2
17	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	2
18	<i>B. fruticulosa</i> PI 649097	3
19	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. fruticulosa</i> —PI649097	3
20	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> —PI649097	3
21	<i>B. napus</i> cv. Anderson	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
22	<i>B. napus</i> cv. Monolit	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
23	<i>B. napus</i> cv. Skrzyszowicki	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
24	<i>B. napus</i> cv. Lisek	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
25	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	4
26	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007569	5
27	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	5
28	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007574	5
29	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007569	5
30	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	5
31	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-1	5
32	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-2	5
33	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-3	5
34	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang ⁹ × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	5
35	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	5
36	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	5
37	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	5
38	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08, 007569	5
39	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08, 007574	5
40	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (COBORU)	5
41	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	4
42	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	6
43	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> —PI649099	3
44	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	6
45	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. tournefortii</i>	7
46	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	4
47	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	6
48	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	5
49	<i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	4
50	<i>S. alba</i> cv. Bamberka	6
51	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang ⁹ × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 2	5

2.1. Molecular Analysis

15 SSR markers were selected to characterize the genetic background of the research material. The markers were chosen according to the literature data [20]. This set of microsatellites was developed from *B. rapa* using the ISSR-suppression-PCR method. Preliminary screening was performed in order to assess their usefulness in the present study. Genomic DNA was extracted from young seedling leaves of the studied individuals using the Genomic Mini AX Plant kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed in a total volume of 12.5 µL (6.25 µL OptiQaq Master Mix (EURx, Gdańsk, Poland), 2 × 0.5 µL primers, 4.25 µL H₂O, and 1 µL DNA template) under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min, thirty-five cycles of amplification (denaturing at 94 °C for 45 s, annealing at primer specific temperature for 45 s, extension at 72 °C for 1.5 min), followed by a final extension step at 72 °C for 7 min. Primer sequences and annealing temperatures are presented in Table 2.

Table 2. Primer sequences and annealing temperatures of SSR markers used in the study.

SSR Marker	Primer Sequences	Annealing Temperature
mstg001	F: CAT GAG TTT TCA TAA ATA AAA R: TAT GCA ACT TGT CTT TGA TAT	41 °C
mstg004	F: CAT ATA TAG CAT GAG TGG TGC R: CTT AAA GGG CAC TCT TTC ATG	47 °C
mstg008	F: TCT CTT TGA AAT CTC AAC CCA R: AGA TGG CAT GTT AAA CTG AAC	47 °C
mstg012	F: TGA TAC ATA GAC TTG GTG GTG R: CGG CAT TAT CTT GAA CAC GTT	48 °C
mstg013	F: AGA TTT GGC TTA CAC GAC GAC R: ATA TAC CAG GTA CCG TCA CTC	50 °C
mstg016	F: CGT TAC ATT CGG GTA TCA CTA R: TCA TCG AAA GCC TTG TAA CTG	48 °C
mstg025	F: AGA GGC AGT TAC GTT CAC GTC R: CAT CGC ACT CGT GTC TCT TTC	52 °C
mstg027	F: CTC TTT TGG TCA GCT TCC TCA R: TTG TTA GTT AGA TCC TCG TAG	48 °C
mstg028	F: GCC AAG AAG ACG AAG ATT CTC R: AGG TTC TCG ATT TAG GAA CCG	49 °C
mstg033	F: ATG TAA GCA TCT TTG ATC TGC R: CTT GAT CTT CCT GAT GTA CTC	46 °C
mstg034	F: CGA CTG GTA ATA TTC TGA TAC R: CAT GAA AGA CTC TCA AAT CCC	46 °C
mstg038	F: GAA TGG TGG TTC TTG TGT GTC R: CAA AGC GAA GCT CTT GAA TTG	49 °C
mstg039	F: TAC TCG CTC TTG TTG AAG CTG R: GAC AAT CTT GGA GTC ATC TCG	50 °C
mstg042	F: GAT ATT CGA TCC GCT TCG ACA R: CGA ATA TCT CAT CCA CTT TGT	49 °C
mstg052	F: AGT AAC ATG TTT TCT TTT GTG R: CAT CAG ATG CTC AAG GAA CTT	46 °C
mstg055	F: ACA CGC GCC TAT GCA GAA TAC R: CTT AGC GAT TAC GGT GAA GCC	52 °C

Electrophoresis was performed on agarose gel stained with Midori Green Advance (Nippon Genetics, Düren, Deutschland), 5 µL per 100 mL of TBE buffer. All image data obtained from the electrophoresis gels were examined in the same way: for each marker, the presence or absence of a band of particular size was scored as '1' or '0', respectively. Next, a binary data matrix was created which was further analyzed with Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

2.2. Statistical Analysis

The polymorphic information content (PIC) was calculated for each marker using the formula:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^k p_{ij}^2,$$

where p_{ij} denotes frequency of the j th allele for i -th marker among a total of k alleles [21,22].

Genetic similarity (GS) was estimated for each pair of genotypes on the basis of Nei and Li [23]:

$$GS = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B},$$

where N_{AB} denotes the number of bands in genotypes **A** and **B**, N_A and N_B denote the number of bands in **A** and **B**, respectively. The similarity matrix was used to construct a dendrogram using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) to determine genetic relationships among the genotypes studied. The principal component analysis (PCA) was calculated on the basis of the similarity matrix. All the analyses were conducted using the GenStat 18.2 edition (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK) statistical software package. The analysis of molecular variance (AMOVA) was made using GenAlEx 6.5 [24]. AMOVA estimated and partitioned the total molecular variance between and within the groups of genotypes and tested the partitioned variance components [25]. The population genetic structure coefficient (F_{ST}) was calculated using the formula:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T},$$

where H_T denotes the probability that two alleles drawn at random from the entire group differ in state and H_S denotes the probability that two alleles drawn at random from a subgroup differ in state. Groups for AMOVA, presented in Table 1, were created by organizing the genotypes on the basis of their parental components, e.g., *B. napus* × *S. alba* hybrids were grouped together with *S. alba*. Four *B. napus* cultivars were added to each group.

2.3. Resistance to Blackleg

All hybrid combinations have been studied in terms of resistance to phoma leaf spotting/blackleg in field conditions. The assessment was carried out in testing fields at the Poznań University of Life Sciences experimental station Dłoń, located in Wielkopolska Voivodeship. The soil and weather conditions were typical for this region of Poland, and no fungicides or pesticides were used on the testing field. The agricultural practices were optimal for the local ecological conditions. The experiment was set up in a completely randomized block design with five replications; the size of a single plot was 10 m² with a 0.30 m row distance and a sowing density of 60 seeds per square meter. The assessment was performed in two terms, i.e., in November, BBCH 19 (term I), and July, BBCH 70-89 (term II). Phoma leaf spotting (term I) was evaluated according to the scale from 0 to 4, where 0 was no visible disease symptoms and 4 was numerous (over 10) leaf spots per plant [26]. The blackleg symptoms (term II) were assessed according to a scale from 0 to 9, where 0 was no visible symptoms and 9 was a plant totally damaged by the disease [26]. Obtained scale values were subsequently transformed into percentage values. For every genotype, 10 randomly chosen individuals were examined, and for each genotype, the average values from 10 replications were calculated.

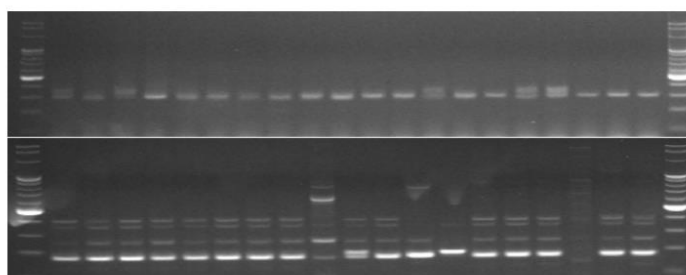
3. Results

3.1. Genetic Similarity Assessment

The set of 15 primer pairs allowed for the detection of 2 monomorphic and 98 polymorphic alleles (Table 3, Figure 1). The average number of polymorphic alleles per marker was 6.533, ranging from 2 to 15. Monomorphic alleles were observed only for two markers: mstg028 and mstg042. The SSR markers used in this study generated highly informative loci with the PIC values ranging from 0.594 for mstg016 to 0.989 for mstg039, with the mean 0.848 (Table 3).

Table 3. Quantity of detected alleles and PIC values for SSR markers.

SSR Marker	Quantity of Polymorphic Alleles	Quantity of Monomorphic Alleles	Percentage of Polymorphic Alleles (%)	PIC (Polymorphism Information Content)
mstg004	2	0	100	0.962
mstg008	8	0	100	0.969
mstg012	7	0	100	0.771
mstg016	8	0	100	0.594
mstg025	4	0	100	0.838
mstg028	7	1	87.5	0.769
mstg033	3	0	100	0.988
mstg038	9	0	100	0.841
mstg039	15	0	100	0.989
mstg042	2	1	66.7	0.913
mstg052	7	0	100	0.893
mstg055	9	0	100	0.776
mstg001	4	0	100	0.908
mstg034	5	0	100	0.686
mstg027	8	0	100	0.822
Mean	6.533	0.133	96.947	0.848

**Figure 1.** Example of electrophorograms with visible PCR products. Results for genotypes 21–40, marker mstg004 (above) and mstg008 (below).

The data were computed to estimate genetic similarity between the studied rapeseed genotypes based on Nei and Li's coefficients. The highest genetic similarity (equal to 0.97) was found between genotypes *B. napus* cv. Zhongshuang9 × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08 006169 (34) and *B. napus* cv. Zhongshuang9 × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08 006169 (51), whereas the lowest genetic similarity (0.22) was found for *B. carinata* (7) and *B. fruticulosa* PI 649097 (18). The mean value of genetic similarity was 0.63. The SSR marker data were used to group cultivars by the UPGMA method. The relationships between genotypes are presented in the form of a dendrogram (Figure 2), in which nine clusters were clearly distinguished. Cluster I comprised only one individual, genotype 13 (*B. rapa* ssp. *chinensis* (COBORU)), which had less than a 0.5 similarity with other genotypes; Cluster II comprised only one individual, genotype 18 (*B. fruticulosa* PI 649097); Cluster III comprised only one individual, genotype 43 (*B. napus* cv. Lisek × *B. fruticulosa*—PI649099); Cluster IV comprised genotypes 42, 44, 47, and 50 (*B. napus* cv. Jet Neuf × *S. alba* cv. Bamberka, *B. napus* cv. Lisek × *S. alba* cv. Bamberka, *B. napus* cv. Californium × *S. alba* cv. Bamberka, and *S. alba* cv. Bamberka); Cluster V, 14, 38, 39, 40, and 48 (*B. rapa* ssp. *chinensis* PI430485 98CI, *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08, 007569, *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08, 007574, *B. rapa* ssp. *pekinensis* (COBORU), and *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08 006169); Cluster VI comprised only one individual, genotype 49 (*B. oleracea* var. *alboglabra*); Cluster VII comprised genotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 (*B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata* PI 649091, *B. napus* cv. Lisek × *B. carinata* Dodola, *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata*—PI 649094, *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata*—PI 649096, *B.*

carinata 1, *B. carinata* 2, *B. carinata* 3, *B. carinata* 4, *B. carinata* cv. Dodola, and *B. carinata* PI 596534); Cluster VIII comprised two genotypes, 19 and 20 (*B. napus* cv. Californium × *B. fruticulosa*—PI649097 and *B. napus* cv. Lisek × *B. fruticulosa*—PI649097), while the ninth cluster contained the remaining 26 genotypes (Figure 2).

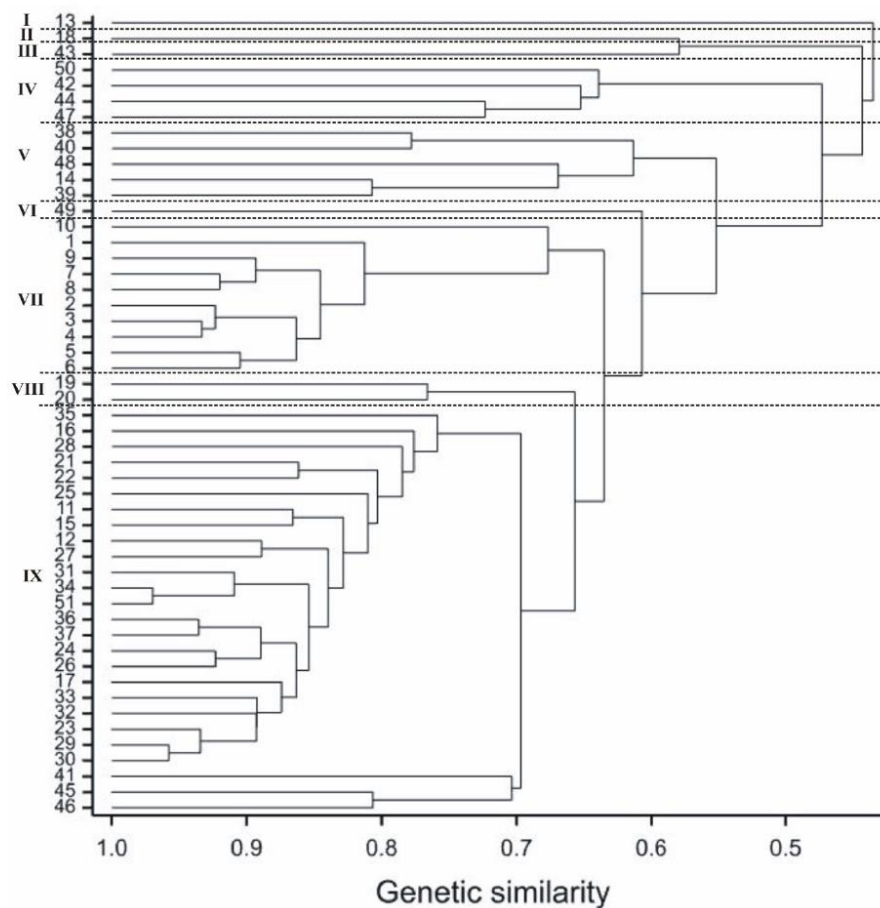


Figure 2. Dendrogram obtained from SSR data showing the genetic relationship of studied genotypes (numbers according to Table 1). Genotypes were grouped hierarchically using the UPGMA method. The scale at the bottom of the dendrogram indicates the level of similarity between individual plants.

The significant differentiation ($F_{ST} = 0.059$; $p = 0.011$) between the genotypes among the groups presented in Table 1 was further supported by the AMOVA results. The intra- and inter-genotype variabilities were found to be significant, with 6% of the genetic variance contributed by the differentiation between the groups, whereas 94% was partitioned within the groups. The largest variability was observed in the first group (mean squares within the group was equal to 9.582), while the smallest was in group number 7 (4.160) (Table 4).

Table 4. Values of differentiation F_{ST} (below diagonal) and probability based on non-parametric permutational testing procedures with 999 permutations (above diagonal) between groups of genotypes.

Group	1	2	3	4	5	6	7
1	0.000	0.045	0.002	0.016	0.005	0.002	0.055
2	0.041 *	0.000	0.153	0.072	0.421	0.398	0.433
3	0.154 **	0.028	0.000	0.001	0.012	0.052	0.181
4	0.077 *	0.052	0.191 ***	0.000	0.083	0.009	0.060
5	0.066 **	0.000	0.092 *	0.050	0.000	0.289	0.393
6	0.135 **	0.000	0.103	0.160 *	0.017	0.000	0.384
7	0.077	0.000	0.046	0.099	0.000	0.000	0.000
Mean squares within group	9.582	8.132	4.281	8.797	8.853	4.250	4.160

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Statistical significant differences were observed between the following pairs of groups of genotypes: 1–2, 1–3, 1–4, 1–5, 1–6, 3–4, 3–5, and 4–6 (Table 4).

The PCA for 51 genotypes based on the distance matrix was presented in Figure 3. The first two PCs explained a total of 31.54% SSR marker variation (16.69% and 14.85%, respectively).

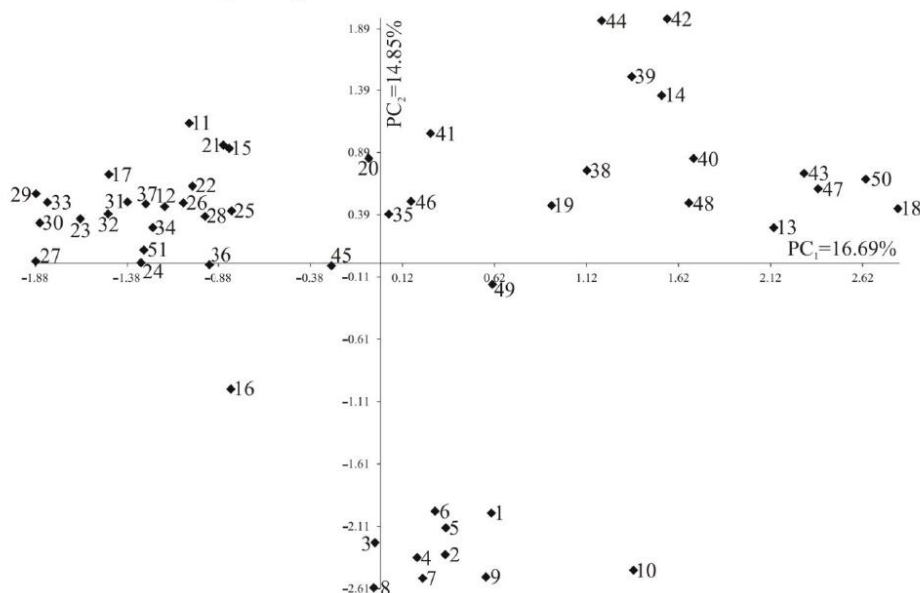


Figure 3. Principal component analysis of 51 genotypes based on 100 detected PCR products, numbers 1–51 according to Table 1.

3.2. Field Resistance to Blackleg

The performed analysis allowed to distinguish the genotypes with the highest resistance level to blackleg (Table 5). Sixteen hybrid combinations belonged to the statistically best group (group f) in both terms, which indicates their ability to maintain stable and low susceptibility to pathogen infestation. These include hybrids with *B. carinata*, *B. fruticulosa*, and *S. alba* as a parental component. The lowest level of blackleg resistance was observed for *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* ssp. *chinensis* in both terms (23.33% and 25% infesta-

tion), although those genotypes are still considered as moderately resistant. Examples of lesions observed on hybrid combinations are presented in Figure 4.

Table 5. Results of blackleg field resistance assessment for hybrid plants. The level of infestation is expressed as a percentage.

No of Genotype	Combination	Infestation Level—Term I	Infestation Level—Term II
1	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> PI 649091	0 f *	3 ef
2	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. carinata</i> Dodola	0 f	3 ef
3	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> —PI 649094	0 f	4 ef
4	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. carinata</i> —PI 649096	0 f	3 ef
11	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	23.33 a	25 a
12	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> 08 007574	15 b	22 ab
15	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	8 bcde	8 def
16	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007569	8 bcde	9 cdef
17	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> Pak Choi 08, 007574	7 cdef	8 def
19	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. fruticulosa</i> —PI649097	0 f	4 ef
20	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> —PI649097	0 f	5 ef
25	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	9.33 bcde	2.08 f
26	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007569	8 bcde	8 def
27	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	5 def	6 ef
28	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007574	12.33 bc	15 bcd
29	<i>B. napus</i> cv. Górczański × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08.007569	11 bcd	6 ef
30	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574	5 def	15 bcd
31	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-1	4 def	16 bc
32	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-2	5.25 def	13.33 cd
33	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 007574-3	6 cdef	14 cd
34	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169	3.33 ef	9 cdef
35	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 1	4 def	6 ef
36	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 2	6 cdef	6 ef
37	<i>B. napus</i> MS8 line × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 3	6 cdef	6 ef
41	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	10 bcde	10 cde
42	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	0 f	3 ef
43	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. fruticulosa</i> —PI649099	0 f	5 ef
44	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	4 def	4 ef
45	<i>B. napus</i> cv. Lisek × <i>B. tournefortii</i>	8 bcde	6 ef
46	<i>B. napus</i> cv. Jet Neuf × <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	10.33 bcde	10 cde
47	<i>B. napus</i> cv. Californium × <i>S. alba</i> cv. Bamberka	0 f	3 ef
51	<i>B. napus</i> cv. Zhongshuang9 × <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 08 006169 2	6 cdef	15 bcd

* Values with different letters in columns are significantly different.



Figure 4. Examples of leaf damage on hybrid genotypes caused by *L. maculans*.

4. Discussion

The assessment of diversity between species is important for the management of germplasm resources and for the curation of genetic databases. As the phenotypic assessments partially rely on environmental conditions, they do not allow for a clear discrimination of related species. Thus, in this study, genotypic analysis using SSR markers was performed for the unbiased determination of genetic diversity.

Molecular DNA markers are important tools for genetic similarity studies. SSR markers are especially valuable, as they enable multi-allelic detection and can be applied using various laboratory systems [27]. The markers selected for this study derived only from *B. rapa* (AA, $2n = 20$) and were developed using the ISSR-suppression-PCR method by Tamura et al., [20]; however, the applicability of these markers for a wider group of *Brassica* species has been suggested by the aforementioned authors. The Brassicaceae family consists of approximately 3000 species [28] with diverse genomic composition, e.g., the U triangle (A, B, and C genome), *S. alba* (S genome), and *B. fruticulosa* (F genome), although conserved regions of gene content and gene order are present among the family [29]. This attribute, combined with the before mentioned unique features of the microsatellite loci that are widely spread among the Brassicaceae, allows to detect sequences originating from one species in the genomes of its relatives. We managed to confirm that the selected SSR markers can be used for genetic similarity studies in the Brassicaceae family, as the markers enabled the detection of allelic variation.

Polymorphism Information Content (PIC) is an indicator that allows to evaluate the discriminatory ability of molecular markers and to study the genetic diversity [30]. The PIC value can vary from 0 to 1, and markers with a PIC value exceeding 0.7 are considered highly informative [31]. Therefore, it can be concluded that twelve out of fifteen tested markers are particularly effective in detecting the polymorphism in the studied population.

The UPGMA allowed for the distinction of nine groups, based on genetic similarity. Generally, the applied method permitted the assessment of the genetic distance of the studied hybrids and their parents, but not all of the results are in line with the predictions. For example, *B. rapa* ssp. *chinensis* (COBORU) shows weak connection to their progeny or other genotypes form the same species. Furthermore, the distinctiveness of this genotype was confirmed with the PCA method. The weaker-than-expected association between species can be explained by a different origin (geographical distribution) or outbreeding [32].

The PCA analysis was conducted to confirm the complicated structure of the studied individuals, and the results confirmed a close relationship for *B. rapa* and *B. carinata* and their hybrid progeny. The rest of the genotypes were generally more scattered around the diagram. However, attention should be drawn to the short distance revealed for two pairs of genotypes: *B. napus* cv. Lisek \times *B. fruticulosa* PI649099 and *B. napus* cv. Californium \times *S. alba* cv. Bamberka, and *B. napus* MS8 line \times *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08 006169 and *B. napus* cv. Jet Neuf \times *B. oleracea* var. *alboglabra*. These hybrids' male parental components present entirely different genomic structures, however their genetic similarity can be explained by the unequal inheritance of the *B. napus* genome during hybridization. It should also be emphasized that the markers used in this study derived from *B. rapa*, which possess A genome, which might have an impact on the obtained PCR products.

The genetic similarity of the studied genotypes varied from 0.22 to 0.97. The extensive range of the similarity coefficient values show that the Brassicaceae germplasm collection reflects a diverse and varied population. These results are in line with the findings of Kumari et al. [33], as well as other researchers [34], who studied the genetic diversity in nine genotypes of *Brassica* and their wild relatives.

The level of field resistance to blackleg varied between the studied genotypes. We managed to select sixteen combinations with the lowest pathogen infestation, which might be especially valuable in future studies focusing on finding a durable resistance to *L. maculans* and incorporating their germplasm into the *B. napus* gene pool. All individuals that had *B. carinata*, *B. fruticulosa*, and *S. alba* as one of the interspecific cross components showed the lowest infestation level. This indicates that particular attention should be paid to these

parental species, as they may hold valuable resistance genes that could help to control the disease. This is especially important considering the previously reported resistance breakdowns [35]. The aforementioned species have been previously characterized as potentially significant resistance gene sources [36–38], which is in line with our findings.

Hybrid individuals with the lowest blackleg infestation could be found in five out of nine groups distinguished with UPGMA and were spread evenly on the PCA diagram. This indicates that the genetic similarity of the studied hybrid genotypes is not correlated with their level of field resistance. On the other hand, it might be simply explained by the fact that applied molecular markers are not linked to the regions of the genome containing the resistance genes.

In conclusion, the tested SSR markers proved to be useful in revealing the genetic distances in Brassicaceae hybrids and species. The ability to properly characterize and organize the genetic resources is key to the effective conservation of accessions. More precise and quick determination of the relationship of genotypes and the amount of variation within or among accessions in a collection can be accomplished by using molecular diagnostic techniques. Other than successfully maintaining the collections, genetic markers are invaluable for crop improvement and plant breeding programs. Moreover, our studies confirmed the usefulness of the Brassicaceae hybrids in terms of blackleg management and the importance of searching new sources of *L. maculans* resistance outside the *B. napus* gene pool.

Author Contributions: Conceptualization, J.N. and J.S.; methodology, J.S., J.N., J.K., J.B., and D.W.; software, J.B.; validation, J.S., J.N., and J.K.; formal analysis, J.N., J.S., D.W., and J.K.; investigation, J.N. and J.K.; resources, J.N.; data curation, J.S., J.N., and J.B.; writing—original draft preparation, J.S. and J.N.; writing—review and editing, J.S., J.N., and J.B.; visualization, J.S. and J.B.; supervision, J.N., J.S., and J.K.; project administration, J.N.; funding acquisition, J.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development, project number 27.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hasanuzzaman, M. *The Plant Family Brassicaceae*; Springer Nature Singapore Pte Ltd.: Singapore, 2020; ISBN 978-981-15-6344-7.
- Kumari, P.; Bisht, D.S.; Bhat, S.R. Stable, fertile somatic hybrids between *Sinapis alba* and *Brassica juncea* show resistance to *Alternaria brassicae* and heat stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2018**, *133*, 77–86. [\[CrossRef\]](#)
- Prakash, S.; Xiao Ming, W.; Bhat, S.R. History, evolution, and domestication of *Brassica* crops. *Plant Breed. Rev.* **2012**, *35*, 19–84.
- Fu, Y.-B.; Gugel, R.K. Genetic diversity of Canadian elite summer rape (*Brassica napus* L.) cultivars from the pre- to post-canola quality era. *Can. J. Plant Sci.* **2010**, *90*, 23–33. [\[CrossRef\]](#)
- Hu, D.; Jing, J.; Snowden, R.J.; Mason, A.S.; Shen, J.; Meng, J.; Zou, J. Exploring the gene pool of *Brassica napus* by genomics-based approaches. *Plant Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 1693–1712. [\[CrossRef\]](#)
- Kamiński, P.; Marasek-Ciolakowska, A.; Podwyszyńska, M.; Starzycki, M.; Starzycka-Korbas, E.; Nowak, K. Development and Characteristics of Interspecific Hybrids between *Brassica oleracea* L. and *B. napus* L. *Agronomy* **2020**, *10*, 1339. [\[CrossRef\]](#)
- Sharma, B.B.; Kalia, P.; Singh, D.; Sharma, T.R. Introgression of Black Rot Resistance from *Brassica carinata* to Cauliflower (*Brassica oleracea botrytis* Group) through Embryo Rescue. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1255. [\[CrossRef\]](#)
- Hwang, S.-F.; Strelkov, S.E.; Peng, G.; Ahmed, H.; Zhou, Q.; Turnbull, G. Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Severity and Yield Loss in Canola in Alberta, Canada. *Plants* **2016**, *5*, 31. [\[CrossRef\]](#)
- Kutcher, H.; Fernando, D.; Turkington, T.; McLaren, D. Best Management Practices for Blackleg Disease of Canola. *Prairie Soils Crops* **2011**, *4*, 122–134.
- Fernando, W.G.D.; Chen, Y.; Ghanbarnia, K. Breeding for Blackleg Resistance: The Biology and Epidemiology. In *Advances in Botanical Research; Rapeseed Breeding*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2007; Volume 45, pp. 271–311.

11. Hasan, M.; Seyis, F.; Badani, A.; Pons-Kühnemann, J.; Friedt, W.; Lühs, W.; Snowdon, R. Analysis of Genetic Diversity in the *Brassica napus* L. Gene Pool Using SSR Markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2006**, *53*, 793–802. [[CrossRef](#)]
12. Gupta, P.K.; Balyan, H.S.; Sharma, P.C.; Ramesh, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr. Sci.* **1996**, *70*, 45–54.
13. Yu, Q.; Wang, Q.; Wu, G.; Ma, Y.; He, X.; Wang, X.; Xie, P.; Hu, L.; Liu, J. Genetic differentiation and delimitation of *Pugionium dolabratum* and *Pugionium cornutum* (*Brassicaceae*). *Plant Syst. Evol.* **2013**, *299*, 1355–1365. [[CrossRef](#)]
14. Thakur, A.K.; Singh, K.H.; Singh, L.; Nanjundan, J.; Khan, Y.J.; Singh, D. SSR marker variations in *Brassica* species provide insight into the origin and evolution of *Brassica* amphidiploids. *Hereditas* **2017**, *155*, 6. [[CrossRef](#)]
15. Matuszczak, M. Markery molekularne w badaniach rzepaku (*Brassica napus* L.). I. Przegląd stosowanych technik. *Rośliny Oleiste-Oilseed Crops* **2013**, *34*, 129–150.
16. Abbas, S.J.; Farhatullah; Marwat, K.B.; Khan, I.A.; Munir, I. Molecular analysis of genetic diversity in *Brassica* species. *Pak. J. Bot. Pak.* **2009**, *41*, 167–176.
17. Wang, J.; Kaur, S.; Cogan, N.O.I.; Dobrowolski, M.P.; Salisbury, P.A.; Burton, W.A.; Baillie, R.; Hand, M.; Hopkins, C.; Forster, J.W.; et al. Assessment of genetic diversity in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars using SSR markers. *Crop Pasture Sci.* **2009**, *60*, 1193–1201. [[CrossRef](#)]
18. Zhai, L.; Xu, L.; Wang, Y.; Cheng, H.; Chen, Y.; Gong, Y.; Liu, L. Novel and useful genic-SSR markers from de novo transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol. Breed.* **2014**, *33*, 611–624. [[CrossRef](#)]
19. Plieske, J.; Struss, D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *102*, 689–694. [[CrossRef](#)]
20. Tamura, K.; Nishioka, M.; Hayashi, M.; Zhang, Z.; Lian, C.; Hougetsu, T.; Harada, K. Development of Microsatellite Markers by ISSR-suppression-PCR Method in *Brassica rapa*. *Breed. Sci.* **2005**, *55*, 247–252. [[CrossRef](#)]
21. Anderson, J.A.; Churchill, G.A.; Autrique, J.E.; Tanksley, S.D.; Sorrells, M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **1993**, *36*, 181–186. [[CrossRef](#)]
22. Wolko, Ł.; Bocianowski, J.; Antkowiak, W.; Słomski, R. Genetic diversity and population structure of wild pear (*Pyrus pyraeaster* (L.) Sturds.) in Poland. *Open Life Sci.* **2014**, *10*, 19–29. [[CrossRef](#)]
23. Nei, M.; Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5269–5273. [[CrossRef](#)]
24. Peakall, R.; Smouse, P.E. genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **2006**, *6*, 288–295. [[CrossRef](#)]
25. Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **1992**, *131*, 479–491. [[CrossRef](#)]
26. Brachaczek, A.; Kaczmarek, J.; Jedryczka, M. Warm and Wet Autumns Favour Yield Losses of Oilseed Rape Caused by Phoma Stem Canker. *Agronomy* **2021**, *11*, 1171. [[CrossRef](#)]
27. Shirasawa, K.; Oyama, M.; Hirakawa, H.; Sato, S.; Tabata, S.; Fujioka, T.; Kimizuka-Takagi, C.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Kato, M.; et al. An EST-SSR Linkage Map of *Raphanus sativus* and Comparative Genomics of the *Brassicaceae*. *DNA Res.* **2011**, *18*, 221–232. [[CrossRef](#)]
28. Flannery, M.; Mitchell, F.; Coyne, S.; Kavanagh, T.; Burke, J.; Salamin, N.; Dowding, P.; Hodkinson, T. Plastid genome characterisation in *Brassica* and *Brassicaceae* using a new set of nine SSRs. *Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **2006**, *113*, 1221–1231. [[CrossRef](#)]
29. Suwabe, K.; Iketani, H.; Nunome, T.; Ohshima, A.; Hirai, M.; Fukuoka, H. Characteristics of Microsatellites in *Brassica rapa* Genome and their Potential Utilization for Comparative Genomics in Cruciferae. *Breed. Sci.* **2004**, *54*, 85–90. [[CrossRef](#)]
30. Serrote, C.M.L.; Reiniger, L.R.S.; Silva, K.B.; dos Santos Rabaioli, S.M.; Stefanel, C.M. Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene* **2020**, *726*, 144175. [[CrossRef](#)]
31. Berg, P.; Singer, M. *Dealing with Genes: The Language of Heredity*; University Science Books: Mill Valley, CA, USA, 1992; ISBN 978-0-935702-69-9.
32. Das, S.; Rajagopal, J.; Bhatia, S.; Srivastava, P.S.; Lakshmikumaran, M. Assessment of genetic variation within *Brassica campestris* cultivars using amplified fragment length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA markers. *J. Biosci.* **1999**, *24*, 433–440. [[CrossRef](#)]
33. Kumari, P.; Rathore, R.K.S.; Yadav, R.; Singh, K.P.; Kumar, R. Utility of SSR and ISSR markers for assessment of genetic diversity in *Brassicaceae* and their related genera. *Progress. Agric.* **2009**, *9*, 71–78.
34. Westman, A.L.; Kresovich, S. Simple sequence repeat (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. *Euphytica* **1999**, *109*, 85–92. [[CrossRef](#)]
35. Van de Wouw, A.P.; Marcroft, S.J.; Ware, A.; Lindbeck, K.; Khangura, R.; Howlett, B.J. Breakdown of resistance to the fungal disease, blackleg, is averted in commercial canola (*Brassica napus*) crops in Australia. *Field Crops Res.* **2014**, *166*, 144–151. [[CrossRef](#)]
36. Rimmer, S.R.; van den Berg, C.G.J. Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.* **1992**, *14*, 56–66. [[CrossRef](#)]

37. Marcroft, S.J.; Wratten, N.; Purwantara, A.; Salisbury, P.A.; Potter, T.D.; Barbetti, M.J.; Khangura, R.; Howlett, B.J. Reaction of a range of *Brassica* species under Australian conditions to the fungus, *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg. *Aust. J. Exp. Agric.* **2002**, *42*, 587–594. [[CrossRef](#)]
38. Niemann, J.; Kaczmarek, J.; Wojciechowski, A.; Jędryczka, M. Resistance to stem canker (*Leptosphaeria spp.*) in interspecific *Brassica* hybrids. *Prog. Plant Prot.* **2016**, *56*, 245–250.

10.4. Improving the Selection Efficiency of Breeding Material within Interspecific *Brassicaceae* Hybrids with Genomic Prediction and Phenotyping

Article

Improving the Selection Efficiency of Breeding Material within Interspecific *Brassicaceae* Hybrids with Genomic Prediction and Phenotyping

Justyna Szwarc ¹, Janetta Niemann ^{1,*}, Jan Bocianowski ², Joanna Kaczmarek ³, Mehmet Zafer Doğu ¹ and Alicja Nowicka ¹

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; justyna.szwarc@up.poznan.pl (J.S.)

² Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań, Poland; jan.bocianowski@up.poznan.pl

³ Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland; jka@igr.poznan.pl

* Correspondence: janetta.niemann@up.poznan.pl; Tel.: +48-61-848-7758

Abstract: Various molecular markers can be applied to accelerate the breeding process of *Brassicaceae* plants. The aim of the present study was to assess the usefulness of available markers connected to blackleg resistance and to screen for markers linked to genes influencing major morphological characteristics, suitable for the further selection of *Brassicaceae* hybrids. Combining the field and molecular results allowed for the selection of useful SSR markers, including mstg004 and mstg027 markers connected to the color of the flowers and marker mstg038 associated with stem color. The field trials were also conducted to investigate the level of blackleg resistance, which permitted the selection of rapeseed hybrids with *B. fruticulosa*, *B. carinata*, and *S. alba* exhibiting the lowest infestation. Furthermore, the functionality of some of the resistance-linked markers was confirmed. The importance of interspecific hybridization and the use of marker-assisted selection are discussed, and the high utility of presented markers in further studies is highlighted.

Keywords: marker-assisted selection; interspecific hybrids; blackleg resistance; field evaluation; SSR markers



check for updates

Citation: Szwarc, J.; Niemann, J.; Bocianowski, J.; Kaczmarek, J.; Doğu, M.Z.; Nowicka, A. Improving the Selection Efficiency of Breeding Material within Interspecific *Brassicaceae* Hybrids with Genomic Prediction and Phenotyping. *Agriculture* **2023**, *13*, 962. <https://doi.org/10.3390/agriculture13050962>

Academic Editor: Jaime Prohens

Received: 20 March 2023

Revised: 10 April 2023

Accepted: 24 April 2023

Published: 26 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The *Brassicaceae* family includes more than 3700 species, including annuals, biennials, and herbaceous perennials [1]. Some of the most recognizable members of this large family include *Brassica napus* (one of the most important sources of edible oil), *Brassica carinata* (protein and biodiesel crop), *Brassica oleracea*, and *Brassica rapa* (vegetables). Furthermore, some *Brassicaceae* species, such as *Brassica juncea* and *B. oleracea* ssp., show considerable medical potential [2]. This demonstrates the great economic importance of the family. Interspecific hybridization is a commonly occurring event in *Brassicaceae*. For example, rapeseed is an amphidiploid plant (AACC) resulting from a spontaneous hybridization of *Brassica rapa* (AA) and *Brassica oleracea* (CC) more than 7000 years ago [3]. *B. napus* shows significant potential for interspecific hybridization with members of the same family. Moreover, it can cross spontaneously with *B. rapa*, as proven in field and greenhouse studies [4]. Induced hybridization, often supported by in vitro techniques [5], can be effectively used as a tool to transfer desirable traits from wild and related species to crop plants, including the introgression of resistance to *Sclerotinia* stem rot [6]. Resistance to *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg, has been identified and transferred to rapeseed from many *Brassica* accessions, such as *B. rapa* subsp. *sylvestris* [7] and *B. juncea* [8].

Molecular markers are a powerful tool for tracking important genes, and can be successfully applied to *Brassicaceae* breeding programs [9]. Available marker systems

include the restriction fragment length polymorphism (RFLP), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), simple sequence repeats (SSRs), inter-simple sequence repeats (ISSRs), sequence-tagged sites (STSs), sequence-characterized amplified region (SCAR), and amplified fragment length polymorphism (AFLP).

The regions connected to morphological traits, as well as biotic and abiotic stresses, can be identified via the genetic marker techniques; for example, the winter survival QTL detected with AFLP and RFLP markers [10], the yellow seed color gene flanked by RAPD markers [11], and the quantitative resistance to *L. maculans* identified with RAPD and RFLP markers [12]. Currently, the selection of *L. maculans*-resistant genotypes relies mainly on susceptibility screening using differential fungal isolates with known *Avr* genes [13]. However, this approach has considerable limitations, such as masking the presence of some genes by others. The application of verified markers connected to the desirable genes can undoubtedly accelerate and facilitate the selection of valuable genotypes, without the reliance on environment-dependent and time-consuming phenotyping assessments.

The molecular markers in *Brassicaceae* can also be implemented to track the genomic origins and phylogenetic relationship of various species [14], or to characterize the genetic diversity of related species [15]. Such studies are crucial for the crop's improvement, as they help to identify the genetic variability in cultivars and breeding components, which may further lead to the introgression of agronomically important traits into the species' germplasm [16].

The plant material used in the present study was previously identified as a promising source of resistance to economically significant pests and diseases [17–19]. This research focused on assessing the usefulness of available markers connected to blackleg resistance in a diversified group of hybrid individuals, as well as screening for markers linked to genes influencing major morphological characteristics, suitable for the further selection of breeding material.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

A total of 49 individuals were used as research material: 31 interspecific *Brassicaceae* hybrids of F₀ generation along with 18 parental *Brassicaceae* species. Interspecific hybrids were obtained at the Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences. Various cultivars of *B. napus* (Jet Neuf, Górczański, Lisek, Californium, Zhongshuang9, MS8) were crossed with *Brassicaceae* species (*B. rapa* ssp. *pekinensis*, *B. rapa* ssp. *chinensis*, *B. rapa* Pak Choi, *S. alba*, *B. tournefortii*, *B. oleracea*, *B. fruticulosa*) in controlled conditions, followed by embryo rescue to assist the successful development of interspecific hybrids. Next, all developed lines were self-pollinated to obtain F₀ generation. The complete list of plant material used in this study is available in Supplementary Material File S1.

2.2. Methods

2.2.1. Phenotype and Resistance to *L. maculans* Assessment

Field assessment of various morphological traits and resistance to *L. maculans* in interspecific hybrids was performed in 2021, in the Poznań University of Life Sciences experimental station located in Dłoń, Greater Poland Voivodeship, Poland. No fungicides or pesticides were used on the plots, and the soil and weather conditions in the testing year were typical for this area of Poland. The farming practices were adjusted for the local environment. The trial was conducted in a completely randomized block design with five replications, with single plot size of 10 m², 0.30 m distance and, a sowing density of 60 seeds/m².

During the flowering phase (BBCH 60–69), the following characteristics were evaluated: the percentage of yellow flowers, the percentage of white flowers, the percentage of pale yellow flowers, the percentage of green stems, the percentage of purple stems, leaf color, and the occurrence of protogyny. After harvesting, the length of siliques and the number of seeds in pods were determined. All field and post-harvest assessments were

carried out on 10 randomly chosen hybrid individuals, with the exception of flower color assessment, which was conducted on at least 50 individuals per single plot.

In order to identify the resistance to *L. maculans*, 2 screenings for blackleg symptoms were performed, in BBCH 19 phase (November, term I) and BBCH 70–89 phase (July, term II). All plants were assessed following a 0–9 scale, according to the previous study [17]. Values obtained after field testing were subsequently transformed into percentage values. The average values from 10 replications for each genotype were calculated after the investigation of 10 randomly selected individuals from each hybrid line.

2.2.2. SSR Marker Analysis

A total of 15 SSR markers were selected according to the available literature data [20], and thoroughly tested in terms of their usefulness in assessing the genetic diversity of *Brassicaceae* hybrids [17]. Polymerase Chain Reaction (PCR) was set up in a total volume of 12.5 μ L (6.25 μ L OptiTaQ Master Mix (EURx), 2×0.5 μ L primers, 4.25 μ L H₂O, and 1 μ L DNA template). The reaction consisted of initial denaturation at 94 °C, 5 min, followed by 35 amplification cycles (denaturing at 94 °C, 45 s; annealing at a temperature adjusted for each pair of primers for 45 s; extension at 72 °C, 90 s) and final extension at 72 °C, 7 min. The sequences of the primers, as well as their annealing temperatures, are available in Supplementary Material File S1.

Analyses were followed by separation of PCR products in 1.5% agarose gel. Midori Green Advance DNA Stain was used to allow the nucleic acid detection. Visualization of electrophorograms was performed using Transilluminator High Performance UV, and photographed with a Gel Doc system. All of the obtained image data were examined in the same manner: the presence/absence of a band of particular size for each marker was rated as “1” or “0”, accordingly. This approach allowed for the binary data matrix to be created, which was scanned using Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

2.2.3. Statistical Analysis

The Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the distribution of the nine observed traits. The main line effect for each trait was evaluated using ANOVA (one-way analysis of variance). Based on correlation coefficients, relationships between the morphological traits were determined. Euclidean distances and cluster analysis, using the nearest neighbor method, were used to group the lines.

For each pair of the investigated lines, genetic similarity was assessed [21]. Based on these coefficients, the lines were grouped hierarchically using the UPGMA method [22] and presented in the form of a dendrogram. An evaluation of the similarity of the tested lines, using multiple markers, was presented using principal component analysis (PCA).

The effect of molecular markers on the observed traits was assessed by regression analysis [23]:

$$y_i = \mu + a \cdot m_i + e_i,$$

where y —mean value of trait, μ —the general mean, a —the regression coefficient for the main effect of the marker m_i , m_i —the marker genotypes, and e_i —error of observations. The markers were assessed as independent variables and examined in independent models. Model parameters were tested at the 0.05 level, resulting from a Bonferroni correction [24]. The accuracy of the model fit was assessed by the coefficient of determination, R^2 . All of the analyses were performed using the GenStat 18.2 edition software and GenAIEx 6.5 software.

2.2.4. Markers Linked to Blackleg Resistance

In order to analyze the presence/absence of regions linked to *L. maculans* resistance, DNA samples were tested with the use of SSR, SCAR, CAPS, RFLP, InDel, and HRM markers connected to qualitative or quantitative blackleg resistance (Table 1). In addition to the set of hybrid individuals, 18 parental components were also examined. PCR reaction conditions were adjusted to certain markers and annealing temperatures. Analyses were

performed in thermocyclers, followed by separation of PCR products. The electrophoresis and visualization protocol remained the same, as in the case of SSR markers analysis.

Table 1. Markers used for the detection of blackleg resistance genes.

Marker	Reference
Xbrms075	[25]
ScJ14	[26]
Fad8	[26]
CB10449	[26]
B5-1520	[27]
B5Rlm6_1	[27]
pRP1513	[28]
Bol023847	[29]
Bol021435	[29]
Bol040029	[29]
Bol040038	[29]
Bol040045	[29]
Bol040099	[29]
BLRC InDel	[29]
Xol12-e03	[30]
Xna12-a02a	[30]
Ind10-12 InDel	[31]

3. Results

3.1. Morphological Traits

The conducted analyses showed great variation in terms of morphological characteristics between studied genotypes (Supplementary Material File S2). The ANOVA indicated that the main effect of the line was significant for all the traits of the study. During the flowering phase, seven phenotype traits were evaluated directly on the testing field.

A total of 23 out of 31 hybrid lines developed only yellow flowers. For 5 genotypes, pale yellow flowers were observed in addition to yellow flowers: genotypes number 8, 9, 10, 15, and 31 (25%, 25%, 5%, 2%, and 5% of pale yellow flowers, respectively). Moreover, for 4 lines, white flowers were identified in addition to yellow flowers: genotypes number 11, 20, 27, 31 (5%, 2%, 5%, and 5% of white flowers, respectively). Green stems were observed for 28 genotypes, and their percentage, in addition to purple stems, varied between 25–100%. Purple stems were detected in 7 hybrid lines: genotypes number 1, 10, 20, 21, 25, 4, and 5; however, only the latter three genotypes expressed 100% of the purple-colored stems. The vast majority of studied plants had green-colored leaves, as green leaves with purple tips were detected for only 3 genotypes: 4, 6, and 9. The individual cases of protogyny were identified in 4 genotypes: 11, 15, 17, and 28.

After harvesting, two more phenotype characteristics were evaluated. The length of siliques in all genotypes ranged from 49 mm to 97 mm. The lowest mean length of siliques was recorded for genotype 14 (64.9 mm), and the highest mean was reported for genotype 17 (82.2 mm). The number of seeds in siliques varied between 5 and 34, with the lowest mean observed for genotype 14 (13.3) and the highest mean detected for genotype 15 (25).

Correlation analysis indicated that the four pairs of observed traits were significantly correlated (Figure 1). Positive correlations were observed for the occurrence of protogyny and the length of siliques (0.50), as well as the length of siliques and the number of seeds in the silique (0.51). Negative significant relationships were observed between the percentage of yellow flowers and the percentage of pale yellow flowers (−0.97), as well as the percentage of green stems with the percentage of purple stems (−1.00) (Figure 1).

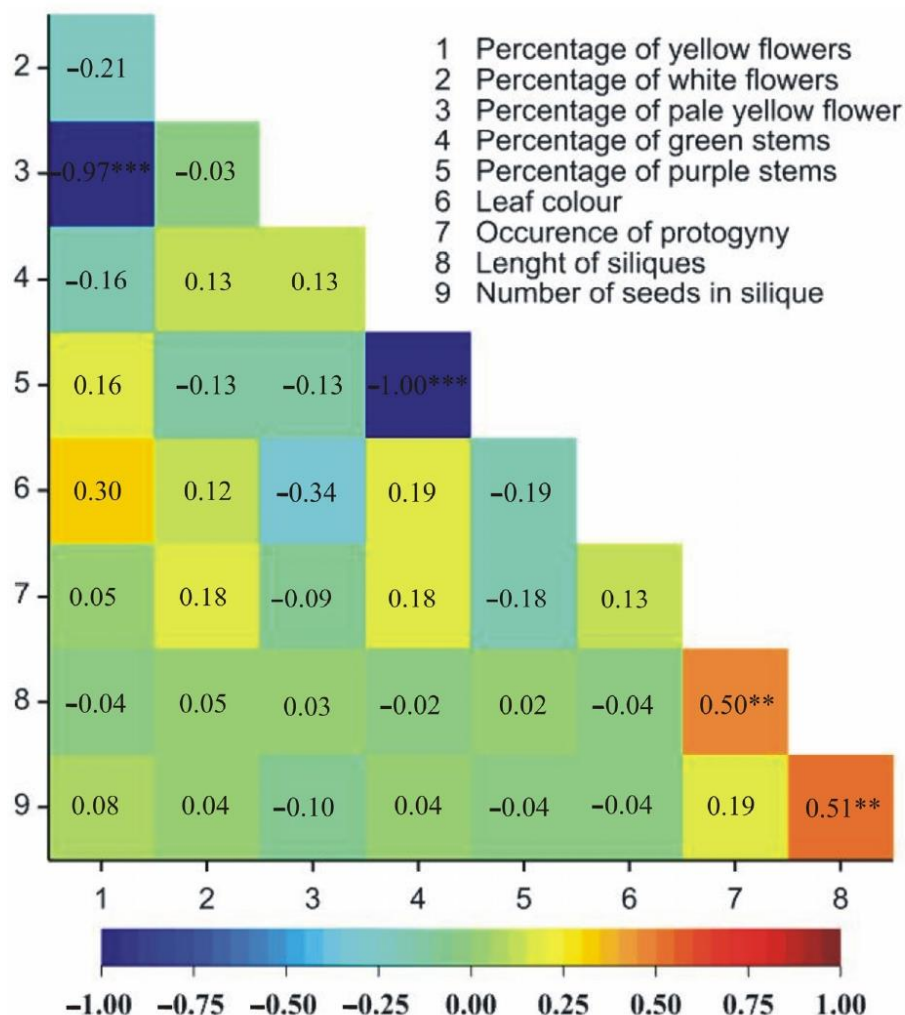


Figure 1. Heatmap for correlation coefficients between observed traits of *Brassicaceae* hybrids (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

All hybrid lines tested were divided into three groups (Figure 2). The first (I) group comprised two lines, the second (II) group comprised four lines, and group III included all the other lines and was divided into three subgroups: IIIA, IIIB, and IIIC (Figure 2).

3.2. Field Resistance to *L. maculans*

The results of the field assessment have been previously discussed in detail [17]. Briefly, the studied interspecific hybrids expressed great variation in the resistance level; the genotypes with *B. fruticulosa*, *B. carinata*, and *S. alba* as parental components were selected as being especially valuable, as their infestation level remained low in both terms of assessment. The results of the field inspection are summarized in Figure 3.

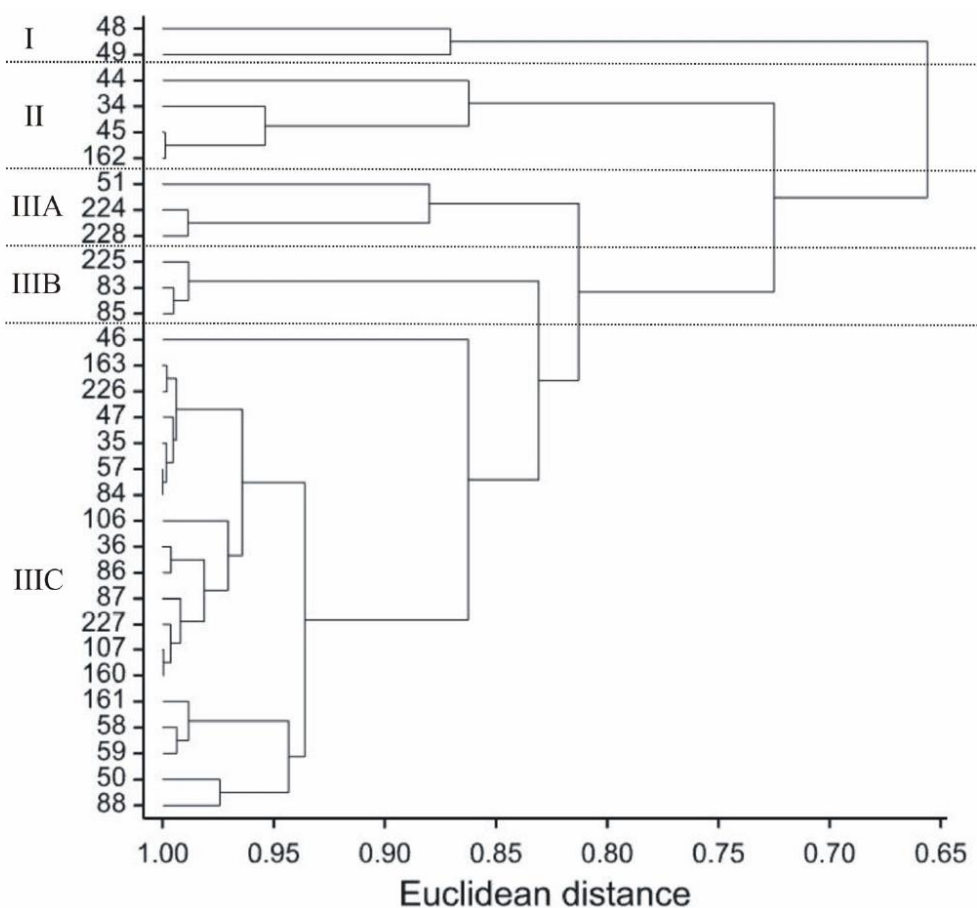


Figure 2. Dendrogram of the nearest neighbor cluster grouping of *Brassicaceae* hybrids on the basis of Euclidean distances for nine traits.

3.3. Genetic Similarity

A total of 100 alleles (2 monomorphic and 98 polymorphic alleles) detected by 15 SSR markers were used to analyze the relationships among 31 interspecific hybrid lines. The number of polymorphic alleles per marker varied from 2 to 15, with an average of 6.533. The highest genetic similarity (0.958) was detected between lines *B. napus* cv. Górczański × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08.007569 and *B. napus* cv. Californium × *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08 007574 (Supplementary Material File S3). The lowest genetic similarity was recorded for *B. napus* cv. Jet Neuf × *S. alba* cv. Bamberka and *B. napus* cv. Lisek × *B. carinata* Dodola as well as the former with *B. napus* cv. Jet Neuf × *B. carinata*—PI 649096 (0.311). (Supplementary Material File S3). Four main groups were formed as a result of the genotypic investigation (Figure 4).

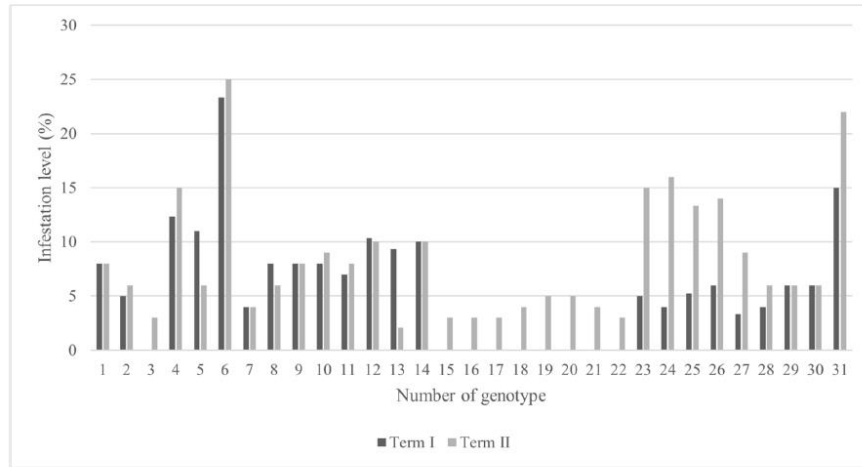


Figure 3. The *L. maculans* infestation level of *Brassicaceae* hybrids. Numbers according to Supplementary Material File S1.

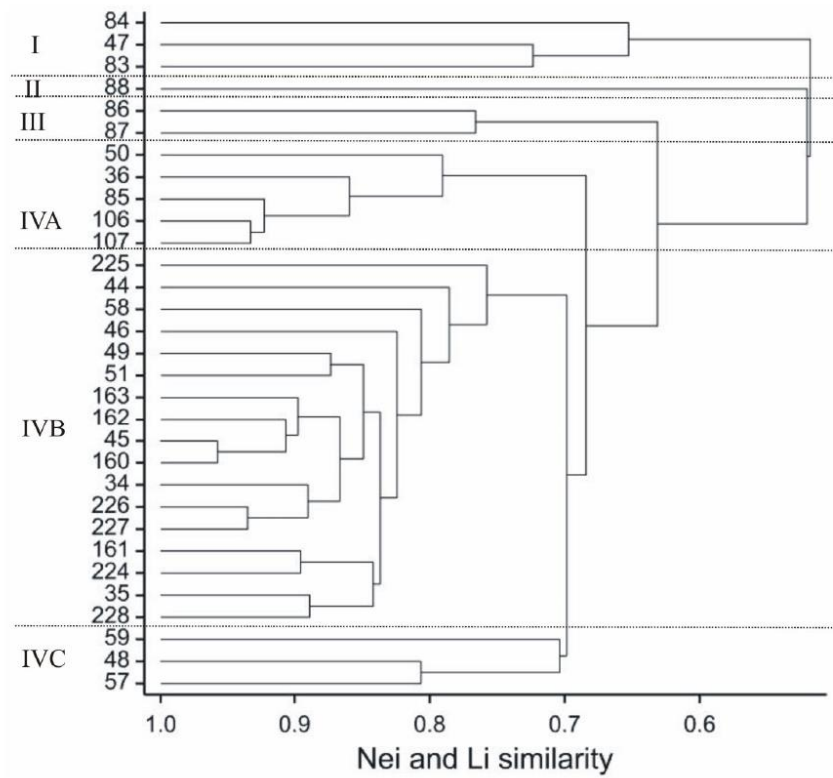


Figure 4. Genetic similarity dendrogram for *Brassicaceae* hybrids, based on 15 SSR markers.

The first (I) group comprised three lines; the second (II) group comprised only one line—*B. napus* cv. Lisek \times *B. fruticulosa*—PI649099. Group III included two lines, and group IV included all remaining lines and was divided into three subgroups: IVA (five lines), IVC (three lines), and IVB, which included all the other lines (Figure 4).

Relationship determination between genotypes, on the basis of applied SSR markers, was defined using PCA (Figure 5). The values for the first 2 principal components were statistically significant and explained 33.70% of the whole variation (Figure 5).

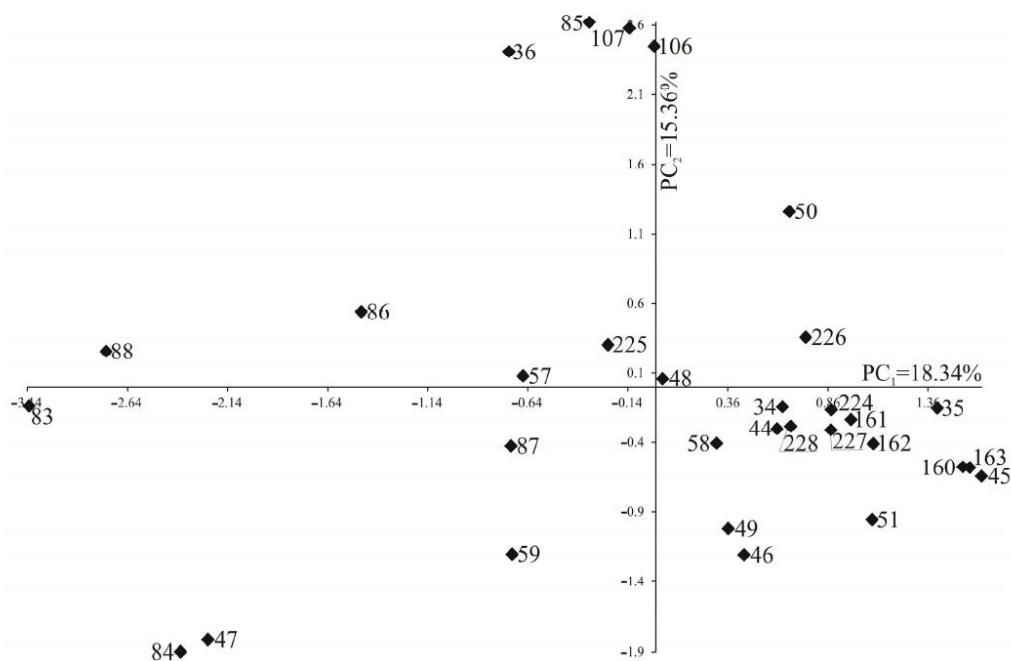


Figure 5. Genotypes' distribution in the space of two first principal components, based on SSR markers. PC₁—first principal component; PC₂—second principal component.

3.4. Association Analysis for Phenotypic Traits

Twenty-two alleles were linked with at least one of nine studied traits (Table 2). The greatest number of detected alleles was associated with the number of seeds in silique (11). The fewest markers were linked with the percentage of green stems and the percentage of purple stems (1). The occurrence of protogyny was determined by two alleles; the percentage of yellow flowers, the percentage of white flowers, the percentage of pale yellow flowers and leaf color were determined by three alleles. However, the length of siliques was associated with four markers: mstg012, mstg038, mstg039, mstg055. The R^2 varied from 9.9% (markers mstg012, mstg038, mstg055 for the length of siliques) to 44.5% (mstg004 and mstg027 for the percentage of pale yellow flowers) with an average of 21.13%. The association values sign indicates that the marker correlates with a decreasing or increasing effect of a studied trait.

Table 2. Effects of regression coefficients (coefficients of determinations R^2) of SSR markers associated with observed traits.

Marker	Percentage of Yellow Flowers	Percentage of White Flowers	Percentage of Pale Yellow Flowers	Percentage of Green Stems	Percentage of Purple Stems	Leaf Color	Occurrence of Protogyny	Length of Siliques	Number of Seeds in Silique
mstg004 (300 bp)	23.2 (40.3%)		−23.77 (44.5%)						
mstg004 (350 bp)									2.97 (10.6%)
mstg008 (200 bp)						−0.933 (28.7%)			
mstg012 (600 bp)								−9.31 (9.9%)	−7.59 (15.0%)
mstg016 (250 bp)		1.788 (24.7%)							
mstg016 (190 bp)									2.88 (11.4%)
mstg025 (300 bp)							0.9 (19.8%)		
mstg038 (280 bp)									−4.63 (21.3%)
mstg038 (250 bp)				−54.2 (37.8%)	54.2 (37.8%)				
mstg038 (1200 bp)								−9.31 (9.9%)	−7.59 (15.0%)
mstg038 (1300 bp)						0.333 (23.6%)			−2.52 (10.0%)
mstg039 (310 bp)							−0.387 (20.6%)		
mstg039 (810 bp)								4.16 (15.2%)	
mstg052 (130 bp)									−4.86 (17.7%)
mstg052 (150 bp)									−4.86 (17.7%)
mstg055 (250 bp)						−0.25 (14.1%)			
mstg055 (190 bp)								−9.31 (9.9%)	−7.59 (15.0%)
mstg055 (750 bp)								−9.31 (9.9%)	−7.59 (15.0%)
mstg001 (250 bp)									−4.86 (17.7%)
mstg027 (700 bp)	−6.2 (19.4%)	1.545 (21.7%)	4.65 (10.0%)						
mstg027 (500 bp)	−23.2 (40.3%)		23.77 (44.5%)						
mstg027 (900 bp)		4.6 (27.0%)							

Marker mstg027 was associated with three traits: the percentage of yellow flowers (-6.2 , $R^2 = 19.4\%$), the percentage of white flowers (1.545 , $R^2 = 21.7\%$), and the percentage of pale yellow flowers (4.65 , $R^2 = 10.0\%$). Eight alleles (from markers mstg004, mstg012, mstg038, mstg055, and mstg027) were associated with two traits.

3.5. Markers Linked to Blackleg Resistance

For five of the analyzed markers (Xbrms075, Fad8, B5-1520, B5Rlm6_1, and Bol021435), the desired PCR products could not be obtained. Therefore, attempts were made to optimize the reaction by adjusting the primer attachment temperature and changing the denaturation and elongation time during amplification. Despite this, no specific bands were observed during electrophoretic separation. However, the use of 12 of the 17 primer pairs analyzed provided the expected PCR reaction products, making it possible to determine the presence or absence of genome fragments associated with resistance to *L. maculans*.

Markers ScJ14 and CB10449 enabled the identification of quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to blackleg. For the ScJ14 marker, a 700 bp product was observed in 39 genotypes (Figure 6), while for the CB10449 marker, specific bands of an approximate size of 280 bp appeared in 38 tested individuals (Figure 6).

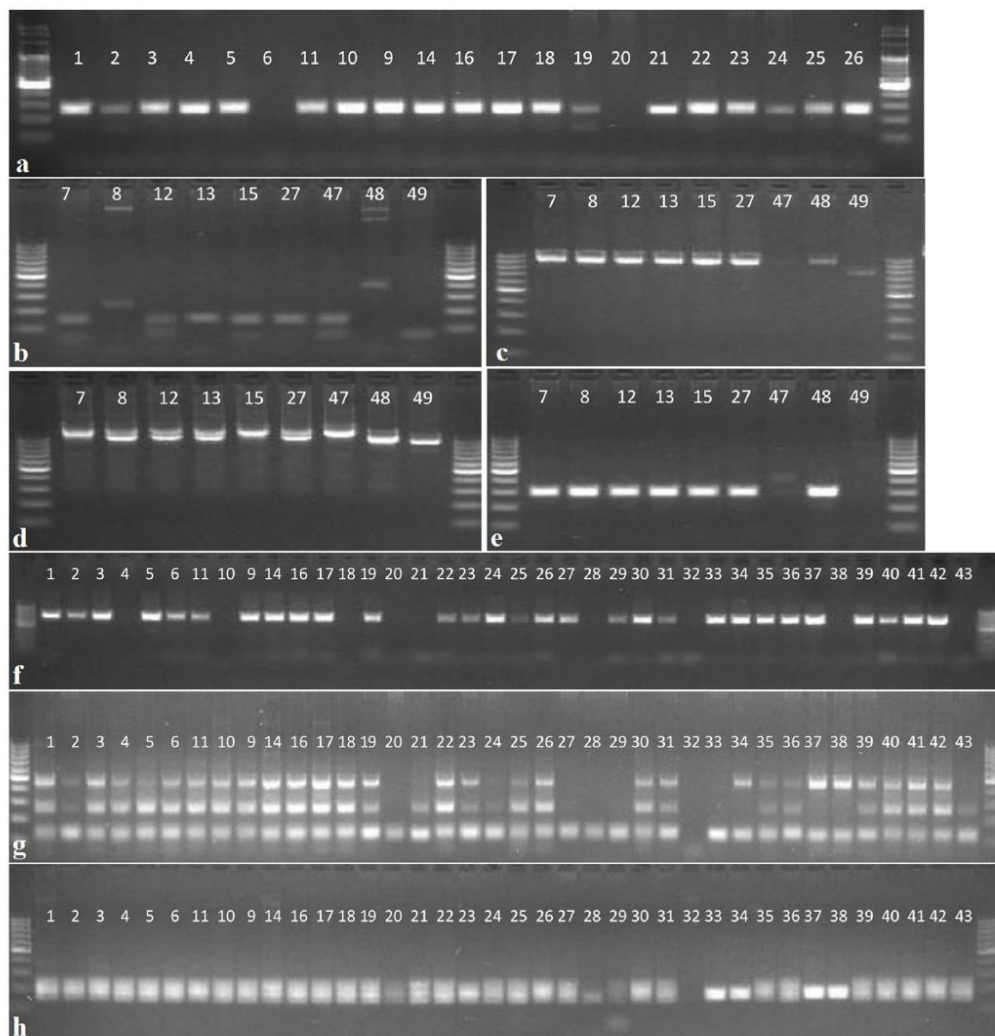


Figure 6. Examples of electropherograms for selected markers: (a) CB10449, (b) pRP1513, (c) Bol040045, (d) Bol040029, (e) BLRC InDel, (f) ScJ14, (g) Xol12-e03, and (h) Xna12-a02a. Numbers of genotypes according to Supplementary Material File S1.

For the pRP1513 marker, a PCR reaction product of 83 bp, or 2 products of 83 bp and 150 bp, indicate the presence of a resistance gene, located in the B genome. Such a result was obtained for 18 genotypes. The presence of a single band located at 150 bp, on the other

hand, indicates the absence of the resistance gene, which was confirmed in 2 individuals (Figure 6)

Markers Bol023847, Bol040029, Bol040038, Bol040045, Bol040099, and BLRC InDel are associated with a region of the A genome containing, among others, the *Rlm1* gene. Specific products for marker Bol023847 were obtained for 32 genotypes (789 bp); for marker Bol040038 there were 20 genotypes (899 bp); for marker Bol040099 there were 27 genotypes (1145 bp); and for marker Bol040045 there were 27 genotypes (960 bp). Additionally, for the latter marker, a polymorphism was observed in the band pattern—for one genotype (No. 49) a reaction product of 750 bp was obtained instead of the expected one. The marker, Bol040029, allowed us to distinguish between resistant (1213 bp) and susceptible (about 1300 bp) genotypes (6 and 7 individuals, respectively) (Figure 6). A double band pattern (resistant/susceptible) was observed for 14 genotypes. The use of primers designed for the BLRC InDel marker also allows detection of the resistance gene (305 bp) or its absence (433 bp). In this way, 26 resistant genotypes were identified (Figure 6).

The SSR markers, Xol12-e03 and Xna12-a02a, are located near the *Rlm1* gene, so the use of primers flanking these regions can enable the identification of the resistance gene. For Xol12-e03, for resistant varieties the predicted PCR reaction product is 214 bp, while for susceptible varieties it is 128 bp and 177 bp. For 39 genotypes, 128 bp and 214 bp size bands were observed, for 8 individuals a 128 bp band was observed, and for only 1 combination an amplification product of 177 bp in size was detected (Figure 6). For the Xna12-a02a marker, the *Rlm1* gene can be identified by the presence of PCR products of size 193 bp (or 191 bp and 162 bp), and their nonappearance (or the presence of 158 bp and 172 bp products) indicates the absence of the gene. The obtained results do not allow the precise distinction of the bands on the electrophorograms, nevertheless they are within the expected size range (Figure 6).

The *LepR3* gene was identified using the Ind10-12 marker—a 506 bp PCR reaction product indicating its presence was observed in 32 combinations—while the absence of the gene (794 bp) was confirmed in 4 genotypes.

4. Discussion

The plant morphological traits may be an indicator of quantitative/qualitative characteristics. For example, the increased plant height may lead to the increase in seed yield, oil yield, and protein yield, as well as the number of siliques on the main stem and the siliques' length. Furthermore, the silique length has been reported to be positively and significantly correlated with oil yield, protein yield, and seed yield [32]. The morphological characteristics might also be useful in revealing the genetic distances [33]. Therefore, it seems important to control and observe the morphology of *Brassicaceae* plants, as it might help to partially predict the yield outcome.

The performed correlation analysis between traits confirmed that the four pairs of observed traits were significantly correlated, from which three pairs were predictable (the length of siliques and the number of seeds; the percentage of yellow flowers and the percentage of pale yellow flowers; and the percentage of green stems and the percentage of purple stems). However, the strong positive correlation between the occurrence of protogyny and the length of siliques is unexpected. The protogyny is a mechanism of stigma maturation before the pollen release [34] and is associated with self-compatibility, as it is an effective outcrossing mechanism in many plants [35]. The connection between this mechanism and silique morphology has not been reported before.

The studied SSR marker set was developed from *B. rapa* using the ISSR-suppression-PCR method by Tamura et al. [20]. However, the aforementioned authors have proposed that these markers may be applicable to a larger group of *Brassica* species, which was further confirmed in our recent research [17]. As the genetic relationship of the hybrids was thoroughly analyzed before, it will not be discussed in this paper. Here, we mainly focused on correlating the molecular markers with phenotype attributes, in order to further inspect the MAS utility for the selection and characterization of *Brassicaceae* hybrids.

Out of 100 alleles detected via the use of microsatellites, 22 were recognized to be associated with morphological traits. Both *mstg004* and *mstg027* markers explained over 40% of white and yellow flower occurrence. A few genes controlling flower color have been discovered, although the complete mechanisms of the different colors' formation are not fully recognized. The white flower trait in *B. rapa* is controlled by two separate loci and is recessive to yellow flowers [36]. On the other hand, in *B. carinata*, the single gene has incomplete dominance over the yellow flower trait [37]. It could be assumed that the aforementioned markers are linked to one or more of the flower-color-controlling genes. Still, it is impossible to specify beyond doubt which gene/region was detected using the microsatellites.

Another marker, *mstg038*, is linked to the color of the stems. The purple color of the stems is a result of anthocyanin pigmentation, and is controlled by one major and four minor QTL in *B. rapa* (A genome) [38] and by a single *BoDFR* gene in *B. carinata* (C genome) [39]. The studied marker might be in a close position to one of the regions.

Morphological traits might be controlled by monogenic or polygenic mechanisms with complex inheritance patterns, and are partially dependent on environmental conditions [40–42]. The SSR markers used in this study might become a valuable tool for tracking the phenotype traits and might eventually help to further unveil the genetic background of the morphological attributes of *Brassicaceae*.

The conducted field assessment confirmed the presence of functional blackleg resistance in the studied interspecific hybrids. All of the studied genotypes showed moderate to high resistance, which denotes their high utility for breeding programs. The interspecific hybridization within the U triangle as well as between the six *Brassica* crops and their cenospecies has been previously recognized as an excellent technique with which to enrich the primary gene pool of various species [43]. For instance, the resyntheticization of *B. napus*, by crossing two progenitor species (*B. rapa* and *B. oleracea*), resulted in individuals with high resistance to *Verticillium longisporum* [44]. As an additional example, the cross between *B. carinata* and *B. oleracea*, supported by embryo rescue, allowed for the attainment of powdery-mildew-resistant hybrids [5]. Furthermore, many species, such as *B. mauro-rum* [45], *Sinapis alba* [46], and *Sinapis arvensis* [47], are recognized as the source of resistance to causal agents of major diseases. Our studies fully confirm these previous findings and indicate the importance of developing interspecific hybrids instead of relying solely on the narrowing gene pool of rapeseed.

The markers linked to blackleg resistance were applied to the hybrid genotypes with confirmed field resistance. This approach allowed us to test and validate the molecular markers on verified individuals. We aimed to correlate the field resistance with the molecular analysis; however, the uncertainty of some of the obtained results discouraged the authors from drawing such far-reaching conclusions. Instead, the results of marker-related analyses are considered as primary tests, simply to validate the markers' usefulness for the interspecific hybrids.

Markers *ScJ14* and *CB10449* are associated with the QTL region of race-nonspecific resistance to blackleg. The occurrence of PCR products on the electrophorograms may indicate the presence of a region containing quantitative resistance genes in some genotypes, but additional studies with reference genotypes would be necessary to fully confirm this assumption. Unfortunately, QTL regions are still poorly identified and none have been cloned to date, making correct identification much more difficult [26].

The *pRP1513* marker allowed the identification of a region associated with resistance to *L. maculans* for some individuals, but the electrophorograms show additional multiple bands whose pattern is not related to the presence of marker-specific bands. This is most likely due to insufficient specificity of the primers, which joined at more than one site of the genome.

As mentioned earlier, the markers *Bol023847*, *Bol040029*, *Bol040038*, *Bol040045*, and *Bol040099* are associated with the region of the A genome, containing many blackleg resistance genes. In the study by Ferdous et al. [29], the use of four of the aforementioned

markers (Bol023847, Bol040038, Bol040045, and Bol040099) failed to reveal polymorphisms in the amplified DNA region. However, during the course of the present analyses, a reaction product of a different size than expected was observed for the marker Bol040045. A band size of approximately 750bp occurred in *Sinapis alba*, but did not appear in any of the hybrid plants resulting from crosses with this species. The change in product size may be due to differences in the sequence of the amplified part of the genome. As this is a region rich in genes for resistance to *L. maculans*, it is assumed that the bands' polymorphism is related to the plant's response to this pathogen.

In the case of the marker Bol040029, its suitability for detecting polymorphisms between resistant and susceptible genotypes to blackleg was confirmed. Another tested marker, BLRC InDel, was designed on its basis. According to Ferdous et al. [29], it allows the detection of plants containing the resistance gene, which was partially confirmed, as resistant genotypes were detected, but expected products did not appear in all of the analyzed samples.

The markers Xol12-e03 and Xna12-a02a are located in the vicinity of the *Rlm1* gene, making their detection possible [30]. However, the analyses performed cannot unambiguously confirm their effectiveness. Although the sizes of the PCR reaction products are as expected, they form band patterns that do not match the literature data. Such a discrepancy may be due to the fact that the primers were previously tested on a population of doubled haploids of selected oilseed rape cultivars. It is likely that their usefulness for studying the highly diverse plant material, based on many species and hybrids, is insufficient.

The Ind10-12 marker was used to identify the *LepR3* gene. In the vast majority of genotypes, this marker was able to distinguish between resistant and susceptible individuals, but non-specific bands of approximately 450bp were observed. As in the case of the previous marker, this phenomenon may be related to the use of very different test material in the present study, as in the work of Larkan et al. [31], the marker was tested on BC1 and BC3 generations, resulting from the crossing of two oilseed rape varieties.

The results obtained for most markers allow us to partially confirm their effectiveness in identifying genotypes containing selected resistance genes or QTL. Some uncertainty regarding the actual presence of resistance-linked regions may arise from the fact that the markers were previously applied to more homogenous plant material (e.g., DH lines). Here, we made an attempt to verify their utility for a more diversified group of genotypes. Some of the results were in line with expectations; however, we have also encountered unexpected band patterns, which can be explained by the multi-genome origin of the studied material. However, the research should be further extended and combined with plant tests using *L. maculans* isolates with known avirulence genes. This approach could also help to verify whether results obtained by using the markers are reliable for interspecific hybrid studies.

Unfortunately, due to the complex structure of the *Brassica* genome, the development of functional molecular markers remains a challenge for researchers [48]. The high sequence similarity of homologous genes between the A and C genomes often prevents location determination and correct identification. The discrimination of susceptible and resistant alleles may be even more complicated, as the known resistance genes have been identified as the alleles at the same locus. One of the possible solutions to the problem is the Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP), which allows for the detection of deletions and insertions, as well as SNPs [49]. This high-throughput system has been tested to identify the *Rlm2*, *LepR3*, *Rlm9*, *Rlm4*, and *Rlm7* genes in the *B. napus* genome.

In conclusion, the interspecific hybridization of *Brassicaceae* species is a verified and promising approach for broadening the gene pool of rapeseed. To ensure that the hybrid individuals are genetically distinct and carry significant genes, the developed genotypes should be constantly verified in terms of morphological and agronomically important traits, which can be achieved by the use of molecular markers. Our studies allowed for the selection of several high-utility SSR markers linked to the flower, stem, and leaf color, which could be implemented in further studies. As mentioned, resistance-linked markers such as BLRC InDel and Ind10-12 were verified as a useful tool for rapid gene detection,

however the uncertainties regarding nonspecific PCR products must be resolved to ensure the complete and reliable distinction of breeding material.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agriculture13050962/s1>, Supplementary Material Files S1–S3.

Author Contributions: Conceptualization, J.N. and J.S.; methodology, J.S., J.N., J.B. and J.K.; software, J.B.; validation, J.S. and J.N.; formal analysis, J.B.; investigation, J.S., J.K., M.Z.D. and A.N.; resources, J.N., J.S. and J.B.; data curation, J.N., J.S. and J.B.; writing—original draft preparation, J.S., J.N. and J.B.; writing—review and editing, J.S. and J.N.; visualization, J.B.; supervision, J.N.; project administration, J.N.; funding acquisition, J.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development, project number 27.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The additional data presented in this study are available in Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Raza, A.; Hafeez, M.B.; Zahra, N.; Shaikat, K.; Umbreen, S.; Tabassum, J.; Charagh, S.; Khan, R.S.A.; Hasanuzzaman, M. The Plant Family *Brassicaceae*: Introduction, Biology, and Importance. In *The Plant Family Brassicaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses*; Hasanuzzaman, M., Ed.; Springer: Singapore, 2020; pp. 1–43, ISBN 9789811563454.
- Wang, L.L.; Giovannucci, E.L.; Hunter, D.; Neuberg, D.; Su, L.; Christiani, D.C. Dietary Intake of Cruciferous Vegetables, Glutathione S-Transferase (GST) Polymorphisms and Lung Cancer Risk in a Caucasian Population. *Cancer Causes Control* **2004**, *15*, 977–985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chalhoub, B.; Denoeud, F.; Liu, S.; Parkin, I.A.P.; Tang, H.; Wang, X.; Chiquet, J.; Belcram, H.; Tong, C.; Samans, B.; et al. Early Allopolyploid Evolution in the Post-Neolithic *Brassica napus* Oilseed Genome. *Science* **2014**, *345*, 950–953. [[CrossRef](#)]
- Sohn, S.-I.; Thamilarasan, S.K.; Pandian, S.; Oh, Y.-J.; Ryu, T.-H.; Lee, G.-S.; Shin, E.-K. Interspecific Hybridization of Transgenic *Brassica napus* and *Brassica rapa*—An Overview. *Genes* **2022**, *13*, 1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tonguc, M.; Griffiths, P.D. Transfer of Powdery Mildew Resistance from *Brassica carinata* to *Brassica oleracea* through Embryo Rescue. *Plant Breed.* **2004**, *123*, 587–589. [[CrossRef](#)]
- You, M.P.; Uloth, M.B.; Li, X.X.; Banga, S.S.; Banga, S.K.; Barbetti, M.J. Valuable New Resistances Ensure Improved Management of Sclerotinia Stem Rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in Horticultural and Oilseed *Brassica* Species. *J. Phytopathol.* **2016**, *164*, 291–299. [[CrossRef](#)]
- Yu, F.; Gugel, R.K.; Kutcher, H.R.; Peng, G.; Rimmer, S.R. Identification and Mapping of a Novel Blackleg Resistance Locus LepR4 in the Progenies from *Brassica napus* × *B. Rapa* Subsp. *sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.* **2013**, *126*, 307–315. [[CrossRef](#)]
- Roy, N.N. Interspecific Transfer of *Brassica juncea*-Type High Blackleg Resistance to *Brassica napus*. *Euphytica* **1984**, *33*, 295–303. [[CrossRef](#)]
- Snowdon, R.J.; Friedt, W. Molecular Markers in *Brassica* Oilseed Breeding: Current Status and Future Possibilities. *Plant Breed.* **2004**, *123*, 1–8. [[CrossRef](#)]
- Kole, C.; Thormann, C.E.; Karlsson, B.H.; Palta, J.P.; Gaffney, P.; Yandell, B.; Osborn, T.C. Comparative Mapping of Loci Controlling Winter Survival and Related Traits in Oilseed *Brassica rapa* and *B. napus*. *Mol. Breed.* **2002**, *9*, 201–210. [[CrossRef](#)]
- Somers, D.J.; Rakow, G.; Prabhu, V.K.; Friesen, K.R. Identification of a Major Gene and RAPD Markers for Yellow Seed Coat Colour in *Brassica napus*. *Genome* **2001**, *44*, 1077–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pilet, M.L.; Duplan, G.; Archipiano, M.; Barret, P.; Baron, C.; Horvais, R.; Tanguy, X.; Lucas, M.O.; Renard, M.; Delourme, R. Stability of QTL for Field Resistance to Blackleg across Two Genetic Backgrounds in Oilseed Rape. *Crop Sci.* **2001**, *41*, 197–205. [[CrossRef](#)]
- Zhang, X.; Fernando, W.G.D.; Zhang, X.; Fernando, W.G.D. Insights into Fighting against Blackleg Disease of *Brassica napus* in Canada. *Crop Pasture Sci.* **2017**, *69*, 40–47. [[CrossRef](#)]
- Allender, C.J.; King, G.J. Origins of the Amphiploid Species *Brassica napus* L. Investigated by Chloroplast and Nuclear Molecular Markers. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 54. [[CrossRef](#)]
- Abbas, S.; Farhatullah, D.; Marwat, K.; Khan, I.; Munir, I. Molecular Analysis of Genetic Diversity in *Brassica* Species. *Pak. J. Bot.* **2009**, *41*, 167–176.
- Thompson, J.A.; Nelson, R.L.; Vodkin, L.O. Identification of Diverse Soybean Germplasm Using RAPD Markers. *Crop Sci.* **1998**, *38*, 1348–1355. [[CrossRef](#)]

17. Szwarc, J.; Niemann, J.; Kaczmarek, J.; Bocianowski, J.; Weigt, D. Genetic Relationship of *Brassicaceae* Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 4290–4302. [[CrossRef](#)]
18. Szwarc, J.; Niemann, J.; Bocianowski, J.; Jakubus, M.; Mrówczyński, M. Connection between Nutrient Content and Resistance to Selected Pests Analyzed in *Brassicaceae* Hybrids. *Agriculture* **2021**, *11*, 94. [[CrossRef](#)]
19. Niemann, J.; Szwarc, J.; Bocianowski, J.; Weigt, D.; Mrówczyński, M. In-Field Screening for Host Plant Resistance to *Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae* within Selected Rapeseed Cultivars and New Interspecific Hybrids. *Open Life Sci.* **2020**, *15*, 711–720. [[CrossRef](#)]
20. Tamura, K.; Nishioka, M.; Hayashi, M.; Zhang, Z.; Lian, C.; Hougetsu, T.; Harada, K. Development of Microsatellite Markers by ISSR-Suppression-PCR Method in *Brassica rapa*. *Breed. Sci.* **2005**, *55*, 247–252. [[CrossRef](#)]
21. Nei, M.; Li, W.H. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5269–5273. [[CrossRef](#)]
22. Starzycka-Korbas, E.; Weber, Z.; Matuszczak, M.; Bocianowski, J.; Budzianowski, G.; Stefanowicz, M.; Starzycki, M. The Diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary Isolates from Western Poland. *J. Plant Pathol.* **2021**, *103*, 185–195. [[CrossRef](#)]
23. Bocianowski, J.; Kozak, M.; Liersch, A.; Bartkowiak-Broda, I. A Heuristic Method of Searching for Interesting Markers in Terms of Quantitative Traits. *Euphytica* **2011**, *181*, 89–100. [[CrossRef](#)]
24. Bocianowski, J.; Seidler-Łożykowska, K. The Relationship between RAPD Markers and Quantitative Traits of Caraway (*Carum carvi* L.). *Ind. Crops Prod.* **2012**, *36*, 135–139. [[CrossRef](#)]
25. Raman, R.; Taylor, B.; Marcroft, S.; Stiller, J.; Eckermann, P.; Coombes, N.; Rehman, A.; Lindbeck, K.; Luckett, D.; Wratten, N.; et al. Molecular Mapping of Qualitative and Quantitative Loci for Resistance to *Leptosphaeria Maculans* Causing Blackleg Disease in Canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2012**, *125*, 405–418. [[CrossRef](#)]
26. Huang, Y.J.; Jestin, C.; Welham, S.J.; King, G.J.; Manzanares-Dauleux, M.J.; Fitt, B.D.L.; Delourme, R. Identification of Environmentally Stable QTL for Resistance against *Leptosphaeria maculans* in Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Theor. Appl. Genet.* **2016**, *129*, 169–180. [[CrossRef](#)]
27. Rashid, M.H.; Zou, Z.; Fernando, W.G.D. Development of Molecular Markers Linked to the *Leptosphaeria maculans* Resistance Gene *Rlm6* and Inheritance of SCAR and CAPS Markers in *Brassica napus* × *Brassica juncea* Interspecific Hybrids. *Plant Breed.* **2018**, *137*, 402–411. [[CrossRef](#)]
28. Plieske, J.; Struss, D. STS Markers Linked to Phoma Resistance Genes of the *Brassica* B-Genome Revealed Sequence Homology between *Brassica nigra* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *102*, 483–488. [[CrossRef](#)]
29. Ferdous, M.J.; Hossain, M.R.; Park, J.-I.; Robin, A.H.K.; Jesse, D.M.I.; Jung, H.-J.; Kim, H.-T.; Nou, I.-S. Inheritance Pattern and Molecular Markers for Resistance to Blackleg Disease in Cabbage. *Plants* **2019**, *8*, 583. [[CrossRef](#)]
30. Raman, R.; Taylor, B.; Lindbeck, K.; Coombes, N.; Barbulescu, D.; Salisbury, P.; Raman, H.; Raman, R.; Taylor, B.; Lindbeck, K.; et al. Molecular Mapping and Validation of *Rlm1* Gene for Resistance to *Leptosphaeria Maculans* in Canola (*Brassica napus* L.). *Crop Pasture Sci.* **2012**, *63*, 1007–1017. [[CrossRef](#)]
31. Larkan, N.J.; Lydiate, D.J.; Parkin, I.A.P.; Nelson, M.N.; Epp, D.J.; Cowling, W.A.; Rimmer, S.R.; Borhan, M.H. The *Brassica napus* Blackleg Resistance Gene *LepR3* Encodes a Receptor-like Protein Triggered by the *Leptosphaeria maculans* Effector AVR_{LM1}. *New Phytol.* **2013**, *197*, 595–605. [[CrossRef](#)]
32. Aytacı, Z.; Kinacı, G. Genetic Variability and Association Studies of Some Quantitative Characters in Winter Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 61849. [[CrossRef](#)]
33. Yu, C.Y.; Hu, S.W.; Zhao, H.X.; Guo, A.G.; Sun, G.L. Genetic Distances Revealed by Morphological Characters, Isozymes, Proteins and RAPD Markers and Their Relationships with Hybrid Performance in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2005**, *110*, 511–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Al-Shehbaz, I.A. Protogyny in the *Cruciferae*. *Syst. Bot.* **1977**, *2*, 327–333. [[CrossRef](#)]
35. Friedman, J.; Barrett, S.C.H. The Consequences of Monoecy and Protogyny for Mating in Wind-Pollinated *Carex*. *New Phytol.* **2009**, *181*, 489–497. [[CrossRef](#)]
36. Zhang, N.; Chen, L.; Ma, S.; Wang, R.; He, Q.; Tian, M.; Zhang, L. Fine Mapping and Candidate Gene Analysis of the White Flower Gene *Brwf* in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L.). *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6080. [[CrossRef](#)]
37. Zhang, X.; Li, R.; Chen, L.; Niu, S.; Chen, L.; Gao, J.; Wen, J.; Yi, B.; Ma, C.; Tu, J.; et al. Fine-Mapping and Candidate Gene Analysis of the *Brassica juncea* White-Flowered Mutant *Bjpc2* Using the Whole-Genome Resequencing. *Mol. Genet. Genom.* **2018**, *293*, 359–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Li, G.-H.; Chen, H.-C.; Liu, J.-L.; Luo, W.-L.; Xie, D.-S.; Luo, S.-B.; Wu, T.-Q.; Akram, W.; Zhong, Y.-J. A High-Density Genetic Map Developed by Specific-Locus Amplified Fragment (SLAF) Sequencing and Identification of a Locus Controlling Anthocyanin Pigmentation in Stalk of *Zicaitai* (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* var. *purpurea*). *BMC Genom.* **2019**, *20*, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tang, Q.; Tian, M.; An, G.; Zhang, W.; Chen, J.; Yan, C. Rapid Identification of the Purple Stem (*Ps*) Gene of Chinese Kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) in a Segregation Distortion Population by Bulk Segregant Analysis and RNA Sequencing. *Mol. Breed.* **2017**, *37*, 153. [[CrossRef](#)]
40. Khalid, M.; Farhatullah, D.; Khan, N.U.; Din, R.; Khan, M.; Akmal, M.; Ali, N. Linkage of Morphological Markers in *Brassica*. *Pak. J. Bot.* **2010**, *42*, 2995–3000.
41. Song, K.; Slocum, M.K.; Osborn, T.C. Molecular Marker Analysis of Genes Controlling Morphological Variation in *Brassica Rapa* (Syn. *Campestris*). *Theor. Appl. Genet.* **1995**, *90*, 1–10. [[CrossRef](#)]

42. El-Soda, M.; Boer, M.P.; Bagheri, H.; Hanhart, C.J.; Koornneef, M.; Aarts, M.G.M. Genotype–Environment Interactions Affecting Preflowering Physiological and Morphological Traits of *Brassica rapa* Grown in Two Watering Regimes. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 697–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kathe, E.; Quezada-Martinez, D.; Kathe, E.I.; Vasquez-Teuber, P.; Mason, A.S. Interspecific Hybridization for *Brassica* Crop Improvement. *Crop Breed. Genet. Genom.* **2019**, *1*, 190007. [[CrossRef](#)]
44. Rygulla, W.; Snowdon, R.J.; Eynck, C.; Koopmann, B.; von Tiedemann, A.; Lühs, W.; Friedt, W. Broadening the Genetic Basis of *Verticillium longisporum* Resistance in *Brassica napus* by Interspecific Hybridization. *Phytopathology* **2007**, *97*, 1391–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chrungu, B.; Verma, N.; Mohanty, A.; Pradhan, A.; Shivanna, K.R. Production and Characterization of Interspecific Hybrids between *Brassica maurorum* and Crop Brassicas. *Theor. Appl. Genet.* **1999**, *98*, 608–613. [[CrossRef](#)]
46. Siemens, J. Interspecific Hybridisation between Wild Relatives and *Brassica napus* to Introduce New Resistance Traits into the Oilseed Rape Gene Pool. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **2002**, *38*, 155–157. [[CrossRef](#)]
47. Snowdon, R.J.; Winter, H.; Diestel, A.; Sacristán, M.D. Development and Characterisation of *Brassica napus*-*Sinapis arvensis* Addition Lines Exhibiting Resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *101*, 1008–1014. [[CrossRef](#)]
48. Mayerhofer, R.; Wilde, K.; Mayerhofer, M.; Lydiate, D.; Bansal, V.K.; Good, A.G.; Parkin, I.A.P. Complexities of Chromosome Landing in a Highly Duplicated Genome: Toward Map-Based Cloning of a Gene Controlling Blackleg Resistance in *Brassica napus*. *Genetics* **2005**, *171*, 1977–1988. [[CrossRef](#)]
49. Van de Wouw, A.P.; Zhang, Y.; Mohd Saad, N.S.; Yang, H.; Sheedy, E.; Elliott, C.E.; Batley, J. Molecular Markers for Identifying Resistance Genes in *Brassica napus*. *Agronomy* **2022**, *12*, 985. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.