

Jan Bocianowski, Alina Liersch\*, Iwona Bartkowiak-Broda\*

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

\* Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych w Poznaniu

## Porównanie pięciu miar podobieństwa genetycznego ocenionego na podstawie analiz polimorfizmu DNA samosiewów występujących w uprawach rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)\*

### Comparison of five measures of genetic similarity based on analyses of DNA polymorphism of volunteers occurring in winter oilseed rape crops (*Brassica napus* L.)

Słowa kluczowe: rzepak ozimy (*B. napus*), samosiewy, podobieństwo genetyczne, RAPD

Od kilku lat na plantacjach produkcyjnych rzepaku obserwuje się obecność roślin o budowie morfologicznej odbiegającej od budowy typowej dla roślin rzepaku. Jednocześnie Zakłady Tłuszczowe odnotowują przypadki pogorszenia jakości surowca dostarczanego do przerobu. Niektóre partie nasion zawierają ilości kwasu erukowego i glukozyolanów powyżej dopuszczalnej normy dla materiału konsumpcyjnego obowiązującej w Polsce dla odmian podwójnie ulepszonych (kwas erukowy do 2%, zawartość glukozyolanów alkenowych do 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.b. nasion).

Z tego względu podjęto próbę charakterystyki molekularnej samosiewów występujących na plantacjach rzepaku ozimego w Polsce północnej. Jednocześnie uzyskane dane posłużyły do przeprowadzenia porównania pięciu miar podobieństwa genetycznego (Jaccarda, Kulczyńskiego, Sokala i Michenera, Nei oraz Rogersa) oraz określenia z ich wykorzystaniem podobieństwa genetycznego samosiewów i odmian z plantacji, z których zostały pobrane. Badania obejmowały potomstwo 31 samosiewów pobranych z plantacji rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego w sezonie 2005/2006 w trzech województwach: zachodniopomorskim, pomorskim, warmińsko-mazurskim. Samosiewy podzielono na dwie grupy roślin o morfotypie rzepaku i morfotypie rzepiku. Jako wzorce wybrano odmiany uprawiane na badanych plantacjach rzepaku: Californium, Castille, Lisek i Rasmus oraz odmianę rzepiku (*B. campestris*) Ludowy. Podobieństwo genetyczne roślin oceniono na podstawie 431 markerów molekularnych RAPD. Najmniejszą wartość podobieństwa genetycznego otrzymano dla miary Jaccarda. Stwierdzono istotne dodatnie skorelowanie wszystkich pięciu miar podobieństwa genetycznego. Jednakże za pomocą miary podobieństwa genetycznego Rogersa uzyskano wyniki odmienne od pozostałych porównywanych miar. Dendrogramy utworzone w oparciu o miary Jaccarda, Kulczyńskiego, Sokala i Michenera, Nei dzielą badane genotypy na dwie zasadnicze grupy — pierwszą stanowią rośliny o morfotypie rzepaku i odmiany rzepaku Californium, Castille, Lisek i Rasmus, natomiast grupę drugą — rośliny o morfotypie rzepiku oraz odmiana rzepiku Ludowy.

\* Badania wykonano w ramach projektu badawczego w 6. Programie Ramowym UE „Sustainable introduction of GMOs into European agriculture”, nr kontraktu SSPE-CT-2004-501986 oraz umowy nr 1/POZ z Zakładami Tłuszczowymi „Kruszwica” S.A. – „Badanie prób nasion rzepaku oraz nasion z roślin rzepakopodobnych”.

Key words: oilseed rape (*B. napus*), volunteers, genetic similarity, RAPD

In the last years, the existence of plants with morphology different than morphology typical of oilseed rape plants have been observed on oilseed rape plantations in Poland. Sporadically, the decrease in value of raw material delivered to the oil industry was observed. Some seeds exceeded required by oil mills standards for double low oilseed rape such as erucic acid content up to 2%, alkenyl glucosinolate up to  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  f.f.d.m of seeds. Therefore, the molecular characteristic of the volunteers growing in winter oilseed rape crops in northern regions of Poland has been performed. Also the obtained data have been used to make the comparison of five methods for estimation of genetic similarity among volunteers based on the coefficients calculated according to Jaccard, Kulczyński, Sokal and Michener, Nei, and Rogers. The investigations included progeny of 31 volunteers collected from the winter oilseed rape plantations during the growing season of 2005/2006. The fields were chosen in three voivodeships: Western Pomerania, Pomerania and Warmia-Masuria. Two morphotypes were distinguished on the basis of morphological characters: first — morphotype of oilseed rape species and second — of turnip rape plants. The following double low varieties of oilseed rape (*B. napus*) cultivated on plantations were chosen as the standards: Californium, Castille, Lisek, Rasmus and turnip rape (*B. campestris*) var. Ludowy. The genetic similarity of the volunteers was estimated using 431 RAPD markers. The lowest value of genetic similarity was obtained for the Jaccard's coefficients. The results obtained with the use of Rogers similarity coefficients were different from other compared measures. Dendrograms based on the Jaccard's, Kulczyński, Sokal and Michener, Nei's coefficients placed the genotypes into two groups. As it was expected, the first major group was formed by plants representing oilseed rape-like plants and double low oilseed rape varieties, while the second group consisted of turnip-rape like plants and *B. campestris* cultivar Ludowy.

## Wstęp

---

Markery molekularne pozwalają na analizę genotypów niezależnie od warunków środowiskowych, w różnych stadiach rozwoju rośliny. Wykorzystuje się je w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych (Song i in. 1990, Cerna i in. 1997), do szacowania podobieństwa genetycznego (Benchimol i in. 2000, Koebner i in. 2003, Seyis i in. 2003, Hu i in. 2007), identyfikacji odmian (Mailer i in. 1994, Law i in. 1998, Rafalski i Wiśniewska 2001, Bertrán i in. 2003, Burton i in. 2004), czy w selekcji pod względem cech jakościowych (Mikołajczyk i in. 2004, Snowdon i Friedt 2004, Sonntag i in. 2004) zarówno u rzepaku, jak i innych gatunków roślin.

Do najczęściej stosowanych w badaniach różnicowania genetycznego wielu gatunków roślin uprawnych, w tym także rzepaku, należą markery molekularne typu: RFLP (*restriction fragment length polymorphism* — polimorfizm długości restrykcyjnego fragmentu), AFLP (*amplified fragments length polymorphisms* — polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu), RAPD (*random amplified polymorphic DNA* — losowo amplifikowany polimorficzny DNA), a także SNPs (*single nucleotide polymorphism* — polimorfizm pojedynczego nukleotydu) i SSR (*simple-sequence repeats* — markery mikrosatelitarne).

Technika RAPD jest najprostszą, najszybszą i najtańszą techniką identyfikacji polimorfizmu DNA, choć uważa się ją za najmniej powtarzalną. Niemniej w przypadku wygenerowania dużej liczby polimorficznych produktów amplifikacji,

metoda ta może być przydatna do oceny zróżnicowania genetycznego, także w przypadku rzepaku (Seyis i in. 2003; Snowdon i Friedt 2004). Ponadto istnieje szereg różnych metod oceny podobieństwa (GS) / zróżnicowania genetycznego (GD) (GS — *genetic similarity*, GD — *genetic diversity*). W celu określenia genetycznego podobieństwa lub zróżnicowania analizowanych obiektów stosuje się wiele miar. Do najczęściej stosowanych w badaniach różnych gatunków należą: miara GS/GD genetycznego według Jaccarda (Corbellini i in. 2002, Burton i in. 2004) oraz miary Nei lub Nei i Li (Simoniuc i in. 2002, Bertrán i in. 2003, Yu i in. 2005).

Celem pracy było porównanie oszacowanego podobieństwa genetycznego za pomocą pięciu miar: Jaccarda, Kulczyńskiego, Sokala i Michenera, Nei oraz Rogersa. Do tego celu wykorzystano wcześniej zbadany, zróżnicowany materiał roślinny: odmiany rzepaku, rzepiku oraz samosiewy rzepaku charakteryzujące się zróżnicowanymi cechami fenotypowymi (Liersch i in. 2008).

## Material i metodyka

---

Obiektami badań było potomstwo 31 roślin (wybranych spośród wcześniej badanych 122 samosiewów), pobranych wiosną 2006 roku jako samosiewy na plantacjach rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego w województwach: pomorskim — 11 obiektów, zachodniopomorskim — 16 obiektów oraz warmińsko-mazurskim — 4 obiekty. Genotypy do badań wybrano na podstawie obserwacji morfologii roślin, zawartości kwasu erukowego w oleju i glukozyolanów w nasionach oraz ploidalności roślin określonej metodą cytometrii przepływowej (FCM) (tab. 1). Wyniki tych badań pozwoliły na podział roślin na dwie grupy samosiewów: w typie rzepaku i w typie rzepiku.

Wzorzec stanowiły odmiany rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego uprawiane na plantacjach, z których pobrano samosiewy: Californium, Castille, Lisek i Rasmus oraz odmiana rzepiku ozimego Ludowy.

DNA izolowano z liścieni sześciodniowych siewek rzepaku ozimego według zmodyfikowanej metody opisanej przez Doyle'a i Doyle'a (1990). Jakość wyizolowanego DNA oceniano na 0,8% żelu agarozowym w buforze TBE, stosując jako wzorzec DNA faga  $\lambda$  (MBI Fermentas).

DNA amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem 30 starterów RAPD firmy Operon Technologies (Williams i in. 1990). Każdy obiekt badany był w dwóch powtórzeniach. Zastosowano następujące startery: OPA-07, OPA-08, OPA-14, OPC-02, OPC-09, OPC-18, OPD-08, OPF-01, OPF-04, OPF-14, OPG-03, OPG-04, OPG-05, OPL-12, OPN-18, OPN-20, OPP-03, OPP-05, OPP-07, OPP-11, OPP-14, OPW-05, OPW-09, OPY-01, OPY-02, OPY-04, OPY-05, OPY-10, OPY-13, OPY-15.

Tabela 1

Charakterystyka badanych samosiewów rzepaku ozimego  
*Characteristics of investigated winter oilseed rape volunteers*

Samosiew <i>Volunteer</i>	Plantacja pochodzenia samosiewu <i>Plantation of volunteer origin</i>	Typ morfologiczny <i>Morphological type</i>	Względna zawartość jądrowego DNA <i>Relative DNA content of nuclei</i>	Kwas erukowy <i>Erucic acid</i> [%]	Całkowita zawartość glukozynolanów <i>Total glucosinolate content</i> [ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ nasion — seeds]
Z06-2/9	Californium	rzepikopodobna <sup>1</sup>	48,2	41,5	95,4
Z06-3/6	Rasmus	rzepikopodobna	48,3	42,7	107,8
Z06-6/10	Lisek	rzepikopodobna	49,3	38,3	104,5
Z06-8/1	Rasmus	rzepikopodobna	47,3	39,5	101,1
P06-14/3	Carousel	rzepikopodobna	48,1	39,4	111,4
Z06-10/31	Rasmus	typ rzepaku <sup>2</sup>	48,3	37,2	79,5
P06-16/15	Lisek	rzepikopodobna	48,1	33,6	94,0
P06-18/1	Lisek	rzepikopodobna	47,3	34,3	103,2
W06-23/9	Lisek	rzepikopodobna	48,0	0,0	135,4
Z06-3/10	Rasmus	rzepikopodobna	119,1	26,6	58,1
Z06-1/2	Rasmus	typ rzepaku	115,9	10,2	92,2
Z06-4/21	Lisek	typ rzepaku	121,3	0,0	90,3
Z06-4/61	Californium	typ rzepaku	117,2	49,8	102,8
Z06-5/46	Rasmus	typ rzepaku	117,1	0,0	86,5
Z06-6/27	Lisek	typ rzepaku	115,6	28,9	75,7
Z06-8/5	Lisek	typ rzepaku	117,3	0,0	68,9
Z06-9/47	Lirajet	typ rzepaku	112,0	0,0	92,5
Z06-10/21	Rasmus	typ rzepaku	117,4	21,5	11,4
Z06-11/8	Rasmus	typ rzepaku	121,3	11,7	47,5
Z06-12/6	Lisek	typ rzepaku	119,1	28,8	85,2
P06-14/16	Carousel	typ rzepaku	118,2	19,7	82,4
P06-14/38	Castille	typ rzepaku	119,7	0,0	73,1
P06-15/4	Kaszub	typ rzepaku	119,7	0,0	100,2
P06-16/46	Lisek	typ rzepaku	116,3	10,4	65,0
P06-17/25	Rafaela	typ rzepaku	112,6	26,1	89,6
P06-18/30	Lisek	typ rzepaku	117,2	0,1	69,0
P06-19/28	Castille	typ rzepaku	113,9	42,0	108,8
P06-19/60	Rasmus	typ rzepaku	115,8	40,9	73,6
W06-23/14	Lisek	typ rzepaku	118,9	0,0	50,1
W06-26/26	Californium	typ rzepaku	120,8	13,0	66,1
W06-26/31	Californium	typ rzepaku	119,6	0,0	75,4

Ciąg dalszy tabeli 1

Wzorzec — <i>Standard</i>					
Californium	<i>B. napus</i>	rzepak <sup>3</sup>	118,4	0,0	14,8
Castille	<i>B. napus</i>	rzepak	116,9	0,0	12,4
Lisek	<i>B. napus</i>	rzepak	115,6	0,0	9,9
Rasmus	<i>B. napus</i>	rzepak	114,3	0,0	9,9
Ludowy	<i>B. campestris</i>	rzepik <sup>4</sup>	49,4	39,5	44,3

1 — roślina rzepikopodobna — *turnip rape – like plant*3 — rzepak — *oilseed rape*2 — typ rzepaku — *oilseed rape – like plant*4 — rzepik — *turnip rape*

Analizę DNA prowadzono z zastosowaniem reakcji PCR w termocyklerze Mastercykler gradient firmy Eppendorf. Produkty amplifikacji analizowano na 1,8% żelach agarozowych za pomocą elektroforezy w buforze TBE. Dane wyjściowe zapisywano w systemie binarnym, gdzie 1 oznaczało występowanie produktu dla danej linii, natomiast 0 — jego brak.

W celu oszacowania podobieństwa genetycznego (GS) badanych obiektów zastosowano pięć następujących miar.

**Miara Jaccarda** (Jaccard 1908):

$$S_{J,AB} = \frac{N_{AB}}{N_A + N_B - N_{AB}},$$

gdzie  $N_A$  oznacza liczbę alleli obecnych w genotypie A,  $N_B$  — liczbę alleli obecnych w genotypie B,  $N_{AB}$  — liczbę alleli obecnych zarówno w genotypie A, jak i genotypie B.

**Miara Kulczyńskiego** (Kulczyński 1927):

$$S_{K,AB} = \frac{N_{AB}(N_A + N_B)}{2N_A N_B}.$$

**Miara Sokala i Michenera** (Sokal i Michener 1958):

$$S_{SM,AB} = \frac{N_{AB} + N_{00}}{N},$$

gdzie  $N_{00}$  oznacza liczbę przypadków nie występowania tych samych alleli równocześnie w genotypie A, jak i genotypie B,  $N$  — liczbę wszystkich markerów.

**Miara Nei** (Nei 1972):

$$S_{N,AB} = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}.$$

**Miara Rogersa** (Rogers 1972):

$$S_{R,AB} = 1 - \frac{|N_{A0} - N_{0B}|}{N},$$

gdzie  $N_{A0}$  oznacza liczbę alleli obecnych w genotypie A i równocześnie nieobecnych w genotypie B,  $N_{0B}$  — liczbę alleli obecnych w genotypie B i równocześnie nieobecnych w genotypie A.

Wartości podobieństwa genetycznego oszacowano pomiędzy wszystkimi parami badanych obiektów za pomocą pięciu proponowanych miar. Dla każdej z miar podobieństwa genetycznego obliczono wartość średnią, minimalną, maksymalną oraz współczynnik zmienności. Określono współczynniki korelacji pomiędzy wartościami podobieństwa genetycznego uzyskanymi przy zastosowaniu poszczególnych miar. Istotność współczynników korelacji testowano na poziomie  $\alpha = 0,001$ .

Uzyskane współczynniki podobieństwa genetycznego posłużyły do hierarchicznego grupowania obiektów metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonych grupowań przedstawiono w formie dendrogramów dla odpowiednich miar.

## Wyniki i dyskusja

Potomstwo roślin o zróżnicowanych cechach fenotypowych przebadano za pomocą 30 starterów RAPD Operon Technologies, z których wszystkie wykazywały polimorfizm między badanymi obiektami. Uzyskano 467 produktów amplifikacji, w tym 431 polimorficznych, co wskazuje, że spośród wygenerowanych fragmentów DNA 92,3% było polimorficznych. Russelle i in. (1997) w badaniach nad jęczmieniem (*Hordeum vulgare* L.) otrzymali 66,3% polimorficznych markerów RAPD. Podobne wyniki uzyskała Liersch (2005) dla rzepaku ozimego (*B. napus* L.).

Pejje i in. (1998) podkreślają, że błędy w szacowaniu dystansu genetycznego metodą RAPD mogą wynikać z zastosowania zbyt małej liczby polimorficznych starterów. Według Halldéna i in. (1994) wraz ze wzrostem liczby starterów lub różnicujących fragmentów DNA użytych do analizy dystansu genetycznego poprawia się dokładność oceny zróżnicowania genetycznego materiału roślinnego, a prawdopodobieństwo błędu w technice RAPD zależy od liczby polimorficznych markerów. Autorzy oszacowali, że dla markerów RAPD przy użyciu do badań 10–12 starterów prawdopodobieństwo błędu wynosi 1/100, a dla 20–22 starterów poniżej 1/1000.

Uzyskanie 431 różnicujących markerów otrzymanych w wyniku zastosowania 30 starterów RAPD wystarczy zatem do rzetelnego oszacowania podobieństwa genetycznego badanych obiektów. Dodatkowo każdy genotyp analizowano w dwóch powtórzeniach, a pod uwagę brano tylko te markery, których obraz był bardzo wyraźny. Porównanie wyników badań uzyskanych metodą RAPD oraz metodą

FCM, fenotypu i składu chemicznego nasion pokazuje, że wygenerowanie tak dużej liczby markerów pozwala na prawidłowy podział badanych obiektów (Bocianowski i in. 2008, Liersch i in. 2008).

Istotnym elementem w prawidłowej ocenie podobieństwa/dystansu genetycznego materiału roślinnego jest zarówno wybór techniki analizy molekularnej, liczby zastosowanych w badaniach markerów, jak i odpowiedniej miary statystycznej do oszacowania zależności pomiędzy badanymi genotypami (Mohammadi i Prasanna 2003). Zmienność genetyczna pomiędzy badanymi obiektami jest zdefiniowana na podstawie częstości polimorfizmu DNA otrzymanego przez zastosowanie różnych typów markerów molekularnych.

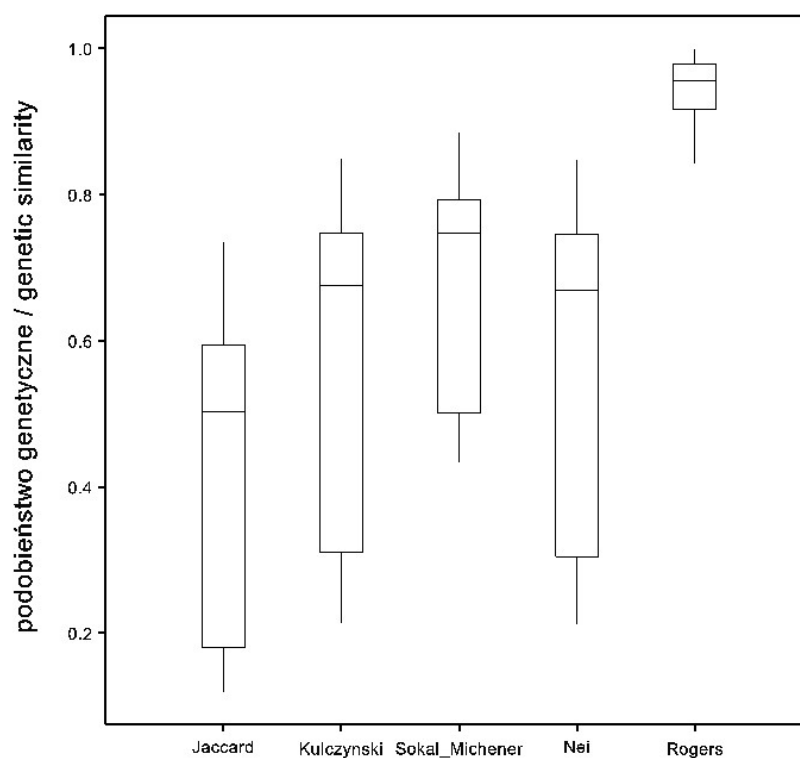
W szacowaniu podobieństwa/dystansu genetycznego na podstawie wyników uzyskanych za pomocą markerów molekularnych można zastosować różne miary. W badaniach roślin uprawnych z rodzaju *Brassica* najczęściej stosowano: miarę Nei i Li (1979) dla gorczycy sarepskiej (*B. juncea*) (Srivastava i in. 2001), kapusty (*B. oleracea*) (Kresovitch i in. 1992), rzepaku (*B. napus*) (Yu i in. 2005); miarę Jaccarda między innymi w badaniach rzepaku (*B. napus*) (Tomassini i in. 2003), kapusty (*B. oleracea*) (Divaret i in. 1999), a w mniejszym stopniu miarę Sokala i Michnera u rzepaku (Mailer i in. 1994, Lombard i in. 2000). Miara Rogersa posłużyła do oszacowania zmienności genetycznej takich roślin uprawnych jak kukurydza (*Zea mays* L.) (Godshalk i in. 1990, Benchimol i in. 2000) i sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Jordan i in. 2003).

W tabeli 2 przedstawiono charakterystyki statystyczne współczynników podobieństwa genetycznego uzyskanych przy zastosowaniu pięciu miar. Najmniejsze wartości współczynników podobieństwa otrzymano dla miary zaproponowanej przez Jaccarda (średnia wynosiła 0,4035). Współczynniki te charakteryzowały się największą zmiennością (50,11%) spośród wszystkich zastosowanych miar. Nieco większe wartości podobieństwa genetycznego uzyskano dla miar Kulczyńskiego oraz Nei. Wyniki uzyskane za pomocą tych metod okazały się podobne pod względem zarówno wartości współczynników podobieństwa (wartości średnie odpowiednio 0,5471 oraz 0,5541), jak i ich zmienności (odpowiednio 39,12 oraz 39,60%). Jeszcze mniejszą zmienność współczynników podobieństwa genetycznego obserwowano, gdy zastosowano miarę Sokala i Michnera (21,88%). Wartości podobieństwa były wyższe niż dla wcześniej opisanych trzech miar — szczególnie wartość minimalna, która stanowiła dwukrotność minimalnej wartości otrzymanej przy zastosowaniu miary Kulczyńskiego lub Nei i czterokrotność, gdy do oceny posłużyła miara Jaccarda. Zdecydowanie różne od pozostałych wyniki uzyskano przy zastosowaniu miary Rogersa (tab. 2, rys. 1). Efekt ten jest związany z faktem, że zasada obliczania GS zaproponowana przez Rogersa różni się najbardziej od pozostałych metod. Wartość minimalna współczynników podobieństwa genetycznego oszacowanego według tej miary była większa od wartości średnich uzyskanych dla pozostałych miar, największa była wartość maksymalna oraz najmniejszy współczynnik zmienności.

Tabela 2

Charakterystyka statystyczna rozpatrywanych miar podobieństwa genetycznego samosiewów rzepaku ozimego — *Statistical characteristics of genetic similarity of volunteers of winter oilseed rape*

Miara podobieństwa genetycznego <i>Genetic similarity measure</i>	Wartość minimalna <i>Minimum value</i>	Wartość średnia <i>Mean value</i>	Wartość maksymalna <i>Maximum value</i>	Współczynnik zmienności [%] <i>Coefficient of variability</i>
Jaccarda	0,1185	0,4035	0,7351	50,11
Kulczyńskiego	0,2133	0,5471	0,8503	39,12
Sokala i Michenera	0,4339	0,6642	0,8863	21,88
Nei	0,2119	0,5441	0,8474	39,60
Rogersa	0,8422	0,9465	1	4,043



Rys. 1. Boxplot współczynników podobieństwa genetycznego samosiewów rzepaku ozimego przy zastosowaniu pięciu miar — *Boxplot of coefficients of genetic similarity of volunteers of winter oilseed rape using five measures of genetic similarity*



W tabeli 3 przedstawiono współczynniki korelacji pomiędzy wartościami podobieństwa genetycznego uzyskanymi przy zastosowaniu pięciu miar. Otrzymane wyniki wskazują na istotną statystycznie korelację wszystkich zastosowanych miar podobieństwa genetycznego (na poziomie  $\alpha = 0,001$ ). Na uwagę zasługuje fakt, że współczynniki podobieństwa genetycznego obliczone metodami Kulczyńskiego oraz Nei wykazują idealną współzależność (współczynnik korelacji wynosił 1). Wcześniejsze badania na danych wygenerowanych (Bocianowski 2006), jak i rzeczywistych (Bocianowski i Stępień 2006) wskazują na brak istotnej współzależności pomiędzy miarą podobieństwa genetycznego Rogersa a pozostałymi miarami. Istotna korelacja uzyskana w niniejszej pracy może być efektem dużej liczby uzyskanych markerów, znacznie przewyższającej liczbę obserwacji genotypowych uwzględnionych we wspomnianych powyżej pracach.

Tabela 3

Współczynniki korelacji pomiędzy miarami podobieństwa genetycznego samosiewów rzepaku ozimego — *Correlation coefficients measures between genetic similarity of volunteers winter oilseed rape crops*

Miara podobieństwa genetycznego <i>Genetic similarity measure</i>	Jaccarda	Kulczyńskiego	Sokala i Michenera	Nei
Kulczyńskiego	0,998*			
Sokala i Michenera	0,985*	0,989*		
Nei	0,998*	1*	0,99*	
Rogersa	0,661*	0,655*	0,664*	0,699*

\* istotne na poziomie  $\alpha = 0,001$  — *significant at the level  $\alpha = 0,001$*

W literaturze częściej spotyka się analizę matematyczną na podstawie kilku typów markerów molekularnych z zastosowaniem jednej wybranej miary podobieństwa genetycznego. Peije i in. (1998) stosując markery RFLP, RAPD, SSR i AFLP u kukurydzy uzyskali wysoką korelację podobieństwa genetycznego; wartość GS obliczona za pomocą miary Nei i Li (1979) dla danych otrzymanych na podstawie badań markerami AFLP była wysoce istotnie skorelowana z wartością GS wykazaną za pomocą markerów RFLP ( $r = 0,70$ ), SSR ( $r = 0,67$ ) oraz odpowiednio dla markerów RFLP i SSR ( $r = 0,59$ ). Tak wysokiego współczynnika korelacji wartości GS nie uzyskano porównując wartości otrzymane na podstawie badań markerami RAPD a pozostałymi typami markerów — RFLP ( $r = 0,51$ ), SSR ( $r = 0,57$ ) oraz AFLP ( $r = 0,52$ ). Garcia i in. (2004) badając tropikalne linie kukurydzy, stwierdzili wysoką, istotną korelację pomiędzy wartościami dystansu genetycznego (GD) obliczonymi na podstawie markerów AFLP i RFLP ( $r = 0,87$ ), AFLP i SSR ( $r = 0,78$ ) oraz markerów SSR i RFLP ( $r = 0,71$ ). Podobnie jak

w badaniach Peije i in. (1998) współczynnik korelacji dla wartości dystansu genetycznego obliczonego na podstawie markerów RAPD w porównaniu z pozostałymi typami markerów nie przekraczał 0,50. Podobne rezultaty otrzymali Lübberstedt i in. (2000) dla europejskich linii hodowlanych kukurydzy. Gauthier i in. (2002) porównywali dwie miary dystansu genetycznego (GD) Rogersa oraz Nei i Li. Badania molekularne metodą RFLP obejmowały kolekcję 488 linii kukurydzy europejskiej (*Zea mays* L.). Uzyskali oni wysoce istotną zależność dla obu miar dystansu genetycznego — współczynnik korelacji wyniósł 0,75 (istotny na poziomie 0,001). Istotną korelację wartości podobieństwa genetycznego dla miar Sokala i Michenera oraz Jaccarda (oszacowanych na podstawie markerów RAPD) otrzymali Duarte i in. (1999) w badaniach nad fasolą (*Phaseolus vulgaris* L.).

W tabeli 4 przedstawiono po sześć skrajnych wartości współczynników podobieństwa genetycznego uzyskanych pięcioma zastosowanymi metodami. W przypadku wartości największych zaobserwować można zbieżność dla wszystkich miar poza miarą Rogersa. Największym podobieństwem na poziomie genetycznym dla wszystkich miar oprócz Rogersa charakteryzowały się odmiana rzepaku Californium i roślina rzepaku o numerze Z06-4/21. GS określone metodą Rogersa nie jest zgodne z wartościami uzyskanymi pozostałymi miarami, ponieważ największe współczynniki podobieństwa wykazały w dwóch przypadkach pary rzepak – rzepik, co wskazuje na nieprawidłową klasyfikację za pomocą tej miary. Dla najmniejszych wartości współczynniki GS Sokala i Michenera różniły się od wartości otrzymanych dla miar Jaccarda, Kulczyńskiego i Nei.

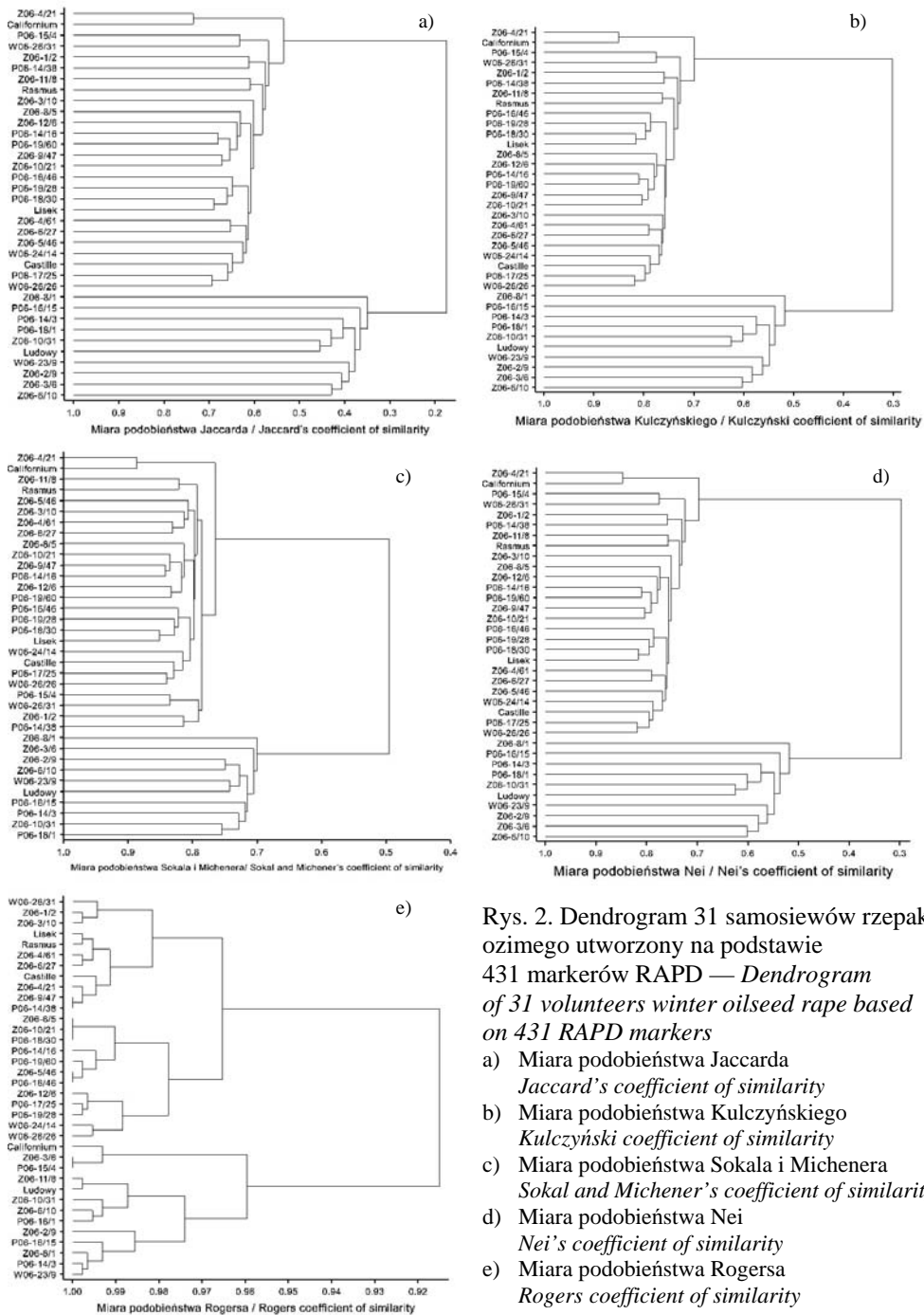
Pogrupowanie obiektów na podstawie uzyskanych współczynników podobieństwa genetycznego według miar Kulczyńskiego (rys. 2b) i Nei (rys. 2d) było niemalże identyczne. Na uwagę zasługuje fakt, iż na podstawie współczynników podobieństwa genetycznego oszacowanych miarami Jaccarda (rys. 2a), Kulczyńskiego (rys. 2b), Sokala i Michenera (rys. 2c) oraz Nei (rys. 2d) badane obiekty zostały pogrupowane podobnie — na dwie grupy skupień. Jedno z tych skupień tworzy 9 roślin rzepikopodobnych i odmiana rzepiku Ludowy, a drugie 22 rośliny w typie fenotypowym rzepaku i odmiany rzepaku podwójnie ulepszanego — Californium, Castille, Lisek oraz Rasmus. Pogrupowanie obiektów na podstawie zastosowanych czterech miar podobieństwa genetycznego (Kulczyńskiego, Jaccarda, Nei oraz Sokal i Michenera) było zgodne z grupowaniem roślin na podstawie cech fenotypowych i względnej zawartości jądrowego DNA. Duarte i in. (1999) otrzymali dendrogramy dla odmian fasoli o tej samej strukturze stosując grupowanie metodą UPGMA na podstawie współczynników Jaccarda oraz Nei.

Pogrupowanie obiektów na podstawie współczynników obliczonych z zastosowaniem miary Rogersa (rys. 2e) było błędne, ponieważ do grupy roślin w typie rzepiku przyporządkowano także rośliny w typie rzepaku (P06-15/4, Z06-11/8) oraz odmianę podwójnie ulepszoną rzepaku Californium, co było niezgodne z klasyfikacją na podstawie cech fenotypowych. Lombard i in. (2000) zastosowali

Tabela 4

Najmniejsze i największe wartości podobieństwa genetycznego uzyskane za pomocą pięciu miar podobieństwa genetycznego  
*Minimum and maximum genetic similarity value calculated using five measures of genetic similarity*

Miara Jaccarda <i>Jaccard measure</i>	Miara Kulczyńskiego <i>Kulczyński measure</i>	Miara Sokala i Michenera <i>Sokal i Michener measure</i>	Miara Nei <i>Nei measure</i>	Miara Rogersa <i>Rogers measure</i>
Najmniejsze podobieństwa genetyczne — <i>Minimum genetic similarity value</i>				
Z06-6/10	Z06-6/10	Z06-6/10	Z06-6/10	Z06-6/10
Z06-1/2	Z06-1/2	Z06-5/46	Z06-1/2	Z06-2/9
0,1185	0,2133	0,4339	0,2119	0,8422
Z06-3/10	Z06-3/10	Z06-3/6	Z06-3/10	Z06-2/9
0,125	0,2247	0,4362	0,2222	0,8469
Z06-6/10	Z06-23/9	Z06-18/30	Z06-6/10	Z06-26/26
0,1345	0,2379	0,4362	0,2372	0,8515
Z06-11/8	Z06-6/27	Z06-3/6	Z06-11/8	Z06-2/9
0,1347	0,24	0,4408	0,2374	0,8538
Z06-5/46	Z06-23/9	Z06-6/10	Z06-5/46	Z06-2/9
0,1348	0,2412	0,4432	0,2375	0,8561
Z06-4/21	Californium	Z06-3/6	Z06-4/21	Z06-16/15
0,1348	Z06-2/9	0,4432	0,2376	0,8561
Największe podobieństwa genetyczne — <i>Maximum genetic similarity value</i>				
P06-17/25	Castille	P06-19/60	P06-17/25	Z06-10/21
0,6773	W06-26/26	P06-14/16	Z06-5/46	Z06-8/5
P06-14/16	P06-10/60	Z06-9/47	P06-14/16	Z06-9/47
0,6806	P06-14/16	0,8422	P06-19/60	P06-14/38
P06-18/30	P06-19/28	P06-14/16	P06-19/28	Z06-3/6
0,6852	P06-18/30	P06-9/47	P06-18/30	P06-15/4
P06-18/30	Lisek	P06-18/30	Lisek	Z06-5/46
0,6893	P06-18/30	0,8422	P06-18/30	P06-16/46
P06-17/25	W06-26/26	P06-18/30	W06-26/26	Z06-8/5
0,6933	P06-17/25	Lisek	P06-17/25	P06-18/30
P06-4/21	Californium	Californium	Californium	Z06-10/21
0,7351	Z06-4/21	Z06-4/21	Z06-4/21	Z06-18/30
	0,8503	0,8863	0,8474	Z06-10/21



Rys. 2. Dendrogram 31 samosiewów rzepaku ozimego utworzony na podstawie 431 markerów RAPD — *Dendrogram of 31 volunteers winter oilseed rape based on 431 RAPD markers*

- Miara podobieństwa Jaccarda  
*Jaccard's coefficient of similarity*
- Miara podobieństwa Kulczyńskiego  
*Kulczyński coefficient of similarity*
- Miara podobieństwa Sokala i Michenera  
*Sokal and Michener's coefficient of similarity*
- Miara podobieństwa Nei  
*Nei's coefficient of similarity*
- Miara podobieństwa Rogersa  
*Rogers coefficient of similarity*

współczynniki podobieństwa genetycznego (GS) Jaccarda (J), Sokala i Michenera (SM) i zmodyfikowanego współczynnika Sokala i Michenera (MSM) w celu porównania 83 jarych i ozimych odmian rzepaku, których zróżnicowanie zbadano metodą AFLP. Wszystkie testowane współczynniki podobieństwa wykazały istotną korelację ( $r = 0,96$  dla J i MSM;  $0,97$  dla SM i MSM oraz  $0,98$  dla J i SM na poziomie istotności  $0,001$ ). Dystans genetyczny obliczony za pomocą trzech współczynników podobieństwa pozwolił na bardzo podobne oszacowanie wzajemnych zależności pomiędzy badanymi odmianami.

W literaturze tematu niewiele jest uwagi poświęconej porównaniom teoretycznym miar podobieństwa genetycznego. Lamboy (1994) porównywał miary Nei i Jaccarda. Wskazał on na miarę Nei jako metodę dającą mniejsze obciążenie dla analiz organizmów blisko związanych. Szersze porównanie (i dla większej liczby miar) przedstawił w swojej rozprawie doktorskiej Warrens (2008).

Cztery zastosowane w pracy miary podobieństwa genetycznego (poza miarą Rogersa) pozwoliły uzyskać bardzo podobne wyniki. W przypadku prezentowanych badań, przy tak dużej liczbie użytych markerów, wskazanie miary najlepszej nie jest możliwe. Jednakże inni autorzy sugerują stosowanie współczynnika Nei do mierzenia podobieństwa na podstawie markerów RAPD (Lamboy 1994). Mohammadi i Prasanna (2003) wskazują na miarę dystansu genetycznego Rogersa jako przydatną w oszacowaniu GD na podstawie kodominujących markerów molekularnych typu SSR i RFLP, gdzie produkt amplifikacji można utożsamiać z allelami, a zatem miara ta opiera się na frekwencji alleli. Potwierdzają to badania Gauthier i in. (2002) nad europejską populacją kukurydzy metodą RFLP, w której zastosowano dwie miary: GD Rogersa — wykorzystującą frekwencję alleli oraz miarę GD Nei i Li — opierającą się na systemie binarnym gdzie 1 oznacza obecność allelu, a 0 jego brak. Także Lombard i in. (2002) w analizie stabilności i jednorodności trzech odmian rzepaku wykazał przydatność miary Rogersa do oceny homogeniczności w obrębie odmiany przy założeniu, że testowany materiał jest homozygotyczny, a każdy marker traktowany jest jako dwualleliczny locus. Podobne rezultaty otrzymali Lee i in. (1989), Dudley i in. (1991) dla homozygotycznych linii hodowlanych kukurydzy oraz Jordan i in. (2003) dla linii sorgo, analizowanych kodominującymi markerami typu RFLP. Błędne szacowanie za pomocą miary Rogersa w prezentowanych badaniach może wynikać zarówno z zastosowania w badaniach markerów dominujących typu RAPD, jak również bardzo zróżnicowanego pod względem genetycznym materiału roślinnego, pochodzącego z dwóch pokrewnych gatunków *B. napus* i *B. campestris*. Niezwykle cenne byłoby wykonanie podobnej analizy na podstawie kilku typów markerów zarówno dominujących, jak i kodominujących. W klasycznym ujęciu, w mierze Rogersa dystans genetyczny oblicza się na podstawie frekwencji alleli. Natomiast dla innych miar, między innymi: Nei, Nei i Li, Jaccarda, Sokala i Michenera, wartości podobieństwa / odległości genetycznej oblicza się na podstawie danych

zapisanych w systemie binarnym (obecność prążka — allelu / brak prążka – allelu). Do obliczenia odległości genetycznej na podstawie takiego zapisu danych Mohammadi i Prasanna (2003) proponują zastosowanie zmodyfikowanej wersji miary Rogersa według wzoru:

$$GD_{MR} = [(N_{A0} + N_{0B})/2N]^{0.5}$$

gdzie  $N_{A0}$  oznacza liczbę alleli obecnych w genotypie A i równocześnie nieobecnych w genotypie B,  $N_{0B}$  — liczbę alleli obecnych w genotypie B i równocześnie nieobecnych w genotypie A.

---

## Podsumowanie

- Ocena podobieństwa genetycznego na podstawie dużej liczby polimorficznych produktów amplifikacji uzyskanych metodą RAPD wykazała wysoki stopień zgodności z charakterystyką fenotypową badanych roślin.
- Analiza molekularna za pomocą metody RAPD pozwoliła na podzielenie potomstwa samosiewów pochodzących z trzech województw Polski północnej na dwie zasadnicze grupy: rzepiku i rzepaku. Cztery testowane miary — Jaccarda, Kulczyńskiego, Sokala i Michenera oraz Nei pogrupowały bardzo podobnie badane obiekty.
- Stosując miarę Rogersa do oceny podobieństwa genetycznego uzyskano odmienne wartości podobieństwa genetycznego od wartości uzyskanych dla pozostałych miar. Grupowanie hierarchiczne badanych obiektów różniło się od grupowania obiektów za pomocą pozostałych miar i stwierdzono brak zgodności z podziałem badanych roślin na podstawie cech fenotypowych, co wskazuje na nieprzydatność tej metody do oceny podobieństwa genetycznego u rzepaku.
- Uzyskane wyniki badań potwierdzają wnioski innych autorów, że zastosowana miara Rogersa nie nadaje się do obliczeń dystansu genetycznego w oparciu o dominujące markery molekularne, gdzie stwierdza się obecność alleli, a nie ich frekwencję.

---

## Literatura

- Benchimol L.L., de Souza Jr C.L., Garcia A.A.F., Kono P.M.S., Mangolin C.A., Barbosa A.M.M., Coelho A.S.G., de Souza A.P. 2000. Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. *Plant Breeding*, 119: 491-496.

- Bertrán F.J., Ribaut J.M., Beck D., Gonzales de León D. 2003. Genetic diversity, specific combining ability, and heterosis in tropical maize under stress and nonstress environments. *Crop Science*, 43: 797-806.
- Bocianowski J. 2006. Przegląd statystycznych sposobów estymacji zróżnicowania genetycznego. *Postępy Nauk Rolniczych*, 3: 69-79.
- Bocianowski J., Liersch A., Bartkowiak-Broda I., Popławska W. 2008. Charakterystyka samosiewów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) za pomocą markerów RAPD. *Biuletyn IHAR* (w druku).
- Bocianowski J., Stępień Ł. 2006. Porównanie pięciu miar zróżnicowania genetycznego polskich odmian pszenicy ocenianych na podstawie danych z analiz markerów mikrosatelitarnych. *Biuletyn IHAR*, 242: 27-32.
- Burton W.A., Ripley V.L., Potts D.A., Salisbury P.A. 2004. Assessment of genetic diversity in selected breeding lines and cultivars of canola quality *Brassica juncea* and their implications for canola breeding. *Euphytica*, 136: 181-192.
- Cerna F.J., Cianzo S.R., Rafalski A., Tingey S., Dyer D. 1997. Relationship between seed yield heterosis and molecular marker heterozygosity in soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 460-467.
- Corbellini M., Perenzin M., Accerbi M., Vaccino P., Borghi B. 2002. Genetic diversity in bread wheat, as revealed by coefficient of parentage and molecular markers, and its relationship to hybrid performance. *Euphytica*, 123: 273-285.
- Divaret I., Margalé E., Thomas G. 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1029-1035.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Duarte J.M., dos Santos J.B., Melo L.C. 1999. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 22, 3: 427-432.
- Dudley J.W., Saghai Maroof M.A., Rufener G.K. 1991. Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. *Crop Science*, 31: 718-723.
- Garcia A.A.F., Benchimol L.L., Barbosa A.M.M., Geraldi I.O., Souza Jr. C.L., de Souza A.P. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetic and Mol. Biology*, 27, 4: 579-588.
- Gauthier P., Gouesnard B., Dallard J., Redaelli R., Rebourg C., Charcosset A., Boyat A. 2002. RFLP diversity and relationships among traditional European maize populations. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 91-99.
- Godshalk E.B., Lee M., Lamkey K.R. 1990. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 273-280.
- Halldén C., Nilsson N-O., Rading I.M., Säll T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 123-128.
- Hu S., Yu Ch., Zhao H., Sun G., Zhao S., Vyvadilova M., Kucera V. 2007. Genetic diversity of *Brassica napus* L. Germplasm from China and Europe assessed by some agronomically important characters. *Euphytica*, 154: 9-16.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44: 223-270.
- Jordan D.R., Tao Y., Godwin I.D., Hanzell R.G., Cooper M., McIntyre C.L. 2003. Prediction of hybrid performance in grain sorghum using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 559-567.
- Koebner R.M.D., Donini P., Reeves J.C., Cooke R.J., Law J.R. 2003. Temporal flux in the morphological and molecular diversity of UK barley. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 550-558.

- Kresovich S., Williams J.G.K., McFerson J.R., Routman E.J., Schaal B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 190-196.
- Kulczyński S. 1927. Die Pflanzenassoziationen der Pieninen. *Bulletin International de L'Académie Polonaise des Sciences et des Letters, Classe des Sciences Mathematiques et Naturelles, Serie B, Supplément II*, 2: 57-203.
- Lambooy W.F. 1994. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR Methods and Applications*, 4: 31-37.
- Law J.R., Donini P., Koebner R.M.D., Reeves J.C., Cooke R.J. 1998. DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica*, 102: 335-342.
- Lee M., Godshalk E.B., Lamkey K.R., Woodman W.W. 1989. Association of Restriction Fragment Length Polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Science*, 29: 1067-1071.
- Liersch A. 2005. Wpływ zmienności genetycznej na efekt heterozji u rzepaku ozimego (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). Praca doktorska wykonana w ZGiHRO IHAR w Poznaniu.
- Liersch A., Popławska W., Ogródowczyk M., Bartkowiak-Broda I., Bocianowski J. 2008. Charakterystyka fenotypowa samosiewów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) występujących w północnych rejonach Polski. *Biuletyn IHAR* (w druku).
- Lombard V., Baril C.P., Dubreuil P., Blouet F., Zhang D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP. *Crop Sci.*, 40: 1417-1425.
- Lombard V., Tireau B., Blouet F., Zhang D., Baril C.P. 2002. Usefulness of AFLP markers to estimate varietal homogeneity of rapeseed inbred line varieties in the context of plant registration and protection. *Euphytica*, 125: 121-127.
- Lübberstedt T., Melchinger A.E., Dušle Ch., Vuylsteke M., Kuiper M. 2000. Relationships among early European maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. *Crop Sci.*, 40: 783-791.
- Mailer R.J., Scarth R., Fristensky B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 697-704.
- Mikołajczyk K., Spasibionek S., Bartkowiak-Broda I. 2004. Analysis of the low-linolenic mutant genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) with the use of DNA markers. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXV (1): 243-249.
- Mohammadi S.A., Prasanna B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.*, 43: 1235-1248.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- Nei M., Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5256-5273.
- Peije I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplick V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1248-1255.
- Rafalski A., Wiśniewska I. 2001. Ocena tożsamości odmian grochu siewnego techniką PCR. *Biuletyn IHAR*, 217: 279-286.
- Rogers J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics, University of Texas Publication*, 7213: 145-153.



- Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz B.G., Jahoor A., Powell W., Waugh R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 714-722.
- Seyis F., Snowdon R.J., Lühs W., Friedt W. 2003. Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breeding*, 122: 473-478.
- Simoniuc D., Uptmoor R., Friedt W., Ordon F. 2002. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding*, 121: 429-435.
- Snowdon R.J., Friedt W. 2004. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 123: 1-8.
- Sokal R.R., Michener C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38: 1409-1438.
- Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. 1990. *Brassica* taxonomy based on restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationship in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). *Theor. Appl. Genet.*, 79: 497-506.
- Sonntag K., Rudloff E., Wang Y. 2004. Development of *Brassica napus* with improved seed oil quality. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXV (1): 27-40.
- Srivastava A., Gupta V., Pental D., Pradhan A.K. 2001. AFLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 193-199.
- Tommasini L., Batley J., Arnold G.M., Cooke R.J., Donini P., Lee D., Law J.R., Lowe C., Moule C., Trick M., Edwards K.J. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 1091-1101.
- Warrens M.J. 2008. Similarity coefficients for binary data. Properties of coefficients, coefficient matrices, multi-way metrics and multivariate coefficients. PhD. Thesis, Rotterdam.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Yu C.Y., Hu S.W., Zhao H.X., Guo A.G., Sun G.L. 2005. Genetic distance revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 110: 511-518.