

Agnieszka GRĄDZIELEWSKA, Daniela GRUSZECKA, Edyta PACZOS-GRZĘDA

## ZASTOSOWANIE METOD RAPD I ISSR DO OCENY MIESZAŃCÓW PSZENŻYTA Z *AEGILOPS CRASSA* 4x BOISS

### EVALUATION OF HYBRIDS BETWEEN TRITICALE AND *AEGILOPS CRASSA* 4x BOISS APPLYING RAPD AND ISSR METHODS

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13, 20–950 Lublin

**Abstract.** In the study the genetic similarity in triticale (6x) hybrids with *Aegilops crassa* (4x) Boiss was estimated and existence of DNA fragments of the wild species in the triticale (6x) hybrid strains background was confirmed. Seventeen RAPD and fourteen ISSR selected primers were used in analyses. A total number of 152 bands RAPD and 220 ISSR products were obtained, out of which 34% were polymorphic in the both cases. In hybrids fourteen RAPD and twenty ISSR fragments specific for *Aegilops crassa* (4x) Boiss were identified (9% in the both cases). Both methods allowed to confirm the hybrid character of all the strains estimated. Based on the polymorphism of RAPD and ISSR markers, the values of Dice genetic similarity indices between the pairs of genotypes studied were calculated. Mean genetic similarity between the hybrid forms and triticale parental components was the same for both methods used – 0,88. Most different from the others was the maternal species *Aegilops crassa* 4x Boiss. Dendrograms showing relatedness between analyzed populations were constructed based on Dice's similarities.

**Słowa kluczowe:** *Aegilops crassa* 4x Boiss, ISSR, markery molekularne, podobieństwo genetyczne, pszenżyto, RAPD.

**Key words:** *Aegilops crassa* 4x Boiss, genetic similarity, ISSR, molecular markers, RAPD, triticale.

## WSTĘP

Pszenżyto (X *Triticosecale* Wittmack), jako mieszańiec międzyrodzajowy otrzymany w wyniku krzyżowania pszenicy z żytem niosącym wiele genów odporności, jest gatunkiem odpornym na stresy abiotyczne, jak np. przymrozki czy susza (Woś i in. 2002). W ostatnich latach obserwuje się porażanie pszenżyta przez mączniaka prawdziwego i różne gatunki rdzy pochodzące zarówno od pszenicy, jak i od żyta (Strzembicka i in. 1999, Grzesik i Strzembicka 1999, 2003, Zamorski i in. 2001). Dużym zagrożeniem dla uprawy tego gatunku są także: rynchosporioza, plamistość liści i kłosów, choroby podstawy źdźbła, pleśń śniegowa czy sporysz (Tarkowski 1989, Pokacka 1991, Zamorski i Schollenberger 1995, Arseniuk i Oleksiak 2002). Z powodu wzrastającej zachorowalności konieczne stają się działania mające na celu wprowadzenie do pszenżyta nowych genów odporności na patogeny.

Dzikie gatunki z rodzaju *Aegilops* sp. (kozieńce) są wykorzystywane w hodowli odpornościowej pszenicy czy pszenżyta. Mieszańce międzyrodzajowe *Aegilops* × *Secale*

otrzymali Hutchinson i in. (1980) oraz Gupta i Fedak (1985), z kolei Morrison i in. (2002) krzyżowali *Aegilops cylindrica* z *Triticum aestivum* L.

*Aegilops crassa* 4x Boiss jest tetraploidalnym gatunkiem wykorzystywanym w hodowli pszenżyta, wykazującym dużą tolerancję na niekorzystne warunki środowiska, tj. susza czy wysokie stężenie toksycznych jonów glinu w glebie oraz odporność na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego (Slageren 1994). Formy mieszańcowe pszenżyta 6x z *Ae. crassa* 4x Boiss otrzymane przez Strzembicką i Gruszecką (1997) charakteryzuje znaczna odporność na rdzę brunatną oraz tolerancja na wysokie stężenie jonów glinu w glebie (Masłowski i in. 1997).

W praktycznej hodowli roślin istotne znaczenie ma szybkość i jednoznaczna ocena materiałów hodowlanych. Z tego powodu nowoczesna hodowla roślin wykorzystuje różne metody molekularne, m.in. do identyfikacji mieszańców oraz oceny zróżnicowania genetycznego linii i odmian. Markery molekularne wykazują znaczny polimorfizm, pozwalają więc na dokładną analizę genomu, są powtarzalne i nie podlegają modyfikacji pod wpływem warunków środowiska (Broda i Wojciechowska 2004, Tams i in. 2004, 2005).

Celem niniejszej pracy była ocena podobieństwa genetycznego oraz potwierdzenie obecności DNA kozieńca u mieszańców pszenżyta z *Aegilops crassa* (4x) Boiss za pomocą metod RAPD oraz ISSR. Porównano również efektywność obu zastosowanych systemów markerowych. Zarówno RAPD, jak i ISSR opierają się na reakcji PCR zachodzącej z udziałem pojedynczego startera. Metoda RAPD, w której używane są krótkie startery oligonukleotydowe, pozwala na identyfikację polimorfizmu w obrębie całego genomu, (Williams i in. 1990, Masojć i in. 2001). ISSR identyfikuje polimorfizm w obrębie sekwencji położonych pomiędzy powtórzeniami mikrosatelitarnymi (Ziętkiewicz i in. 1994).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiło dziewięć form mieszańcowych pokolenia F<sub>7</sub>-F<sub>9</sub>, które pochodziły z zapyłania *Ae. crassa* 4x Boiss pyłkiem trzech różnych form mieszańcowych pszenżyta oraz komponenty rodzicielskie (tab. 1). Wszystkie badane materiały rozmnażano w izolacji. Formy ojcowskie mieszańców to rody wtórnego, heksaploidalnego ozimego pszenżyta otrzymane w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin AR w Lublinie. Ród L506/79 to półkarłowa forma żyta otrzymana z Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., ZHR O. Laski z przeznaczeniem do krzyżowań, a ród CZR 142/79 to wtórne heksaploidalne pszenżyto, odznaczające się wysokimi wartościami cech plonotwórczych, powstałe w wyniku krzyżowania pierwotnego, oktoploidalnego pszenżyta z odmianą pszenicy Grana i selekcjonowane w kierunku formy heksaploidalnej. Komponent mateczny kozieńca (AE 332), sprowadzony z kolekcji Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben w Niemczech, został zastosowany do krzyżowań i izolacji DNA, po reprodukcji przez samozapylenie. Dla ułatwienia opisu wyników badań, poszczególne rody mieszańcowe pszenżyta i formy rodzicielskie oznaczono l.p. lub literą, według tab. 1.

Tabela 1. Materiał badań  
Table 1. Plant material

L.p (No.)/ Litera (Letter)	Pochodzenie (Pedigree)/ Numer rodu (Strain number)	Pokolenie Generation
<b><i>Aegilops crassa</i> 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79]</b>		
1	CZR490B/27/95	F8
2	CZR490B/27/95	F8
<b>{<i>Aegilops crassa</i> 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]} × Presto × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]</b>		
3	CZR490P/1	F7
4	CZR490P/6	F7
5	CZR490P/87/95	F7
6	CZR490P/87/95	F7
<b><i>Aegilops crassa</i> 4x × (Panda × Dańkowskie Złote)</b>		
7	CZR470/12	F9
8	CZR470/21	F9
9	CZR470/2/95	F7
Ac	♀ <b><i>Aegilops crassa</i> 4x Boiss.</b>	–
A	♂ <b>[(Lanca × L506/79) × CZR 142/79]</b>	F6
B	♂ <b>[(Lanca × L506/79) × CZR 142/79] × Presto</b>	F7
C	♂ <b>Panda × Dańkowskie Złote</b>	F6

Lanca, Panda – odmiany pszenicy – wheat varieties

Presto – odmiana pszenżyta – triticales variety

Dańkowskie Złote – odmiana żyta – rye variety

Ekstrakcję DNA przeprowadzono wg zmodyfikowanej metody Milligana (1992). Zamrożony materiał homogenizowano w ciekłym azocie i dodawano 200 µl buforu ekstrakcyjnego (0,1 M Tris pH 8,0, 0,05 M EDTA, 0,5 M NaCl, 0,4 µl β-merkaptioetanolu, 2 mg PVP) oraz 100 µl 10% SDS. Mieszaninę inkubowano 20 min w temperaturze 65°C, wirowano (30 min, 4°C, 8000 rpm) i oddzielano supernatant. DNA strącano 1 cz. (400 µl) izopropanolu z dodatkiem octanu sodu (–30°C, 2 h). Osad DNA 2x przemywano 75% roztworem etanolu, suszono i rozpuszczano w 50 µl buforu TE (1 M Tris pH 8,0, 0,5 M EDTA) z dodatkiem 1 µl RNA-zy (10 mg/µl). Stężenie DNA określano spektrofotometrycznie, wykorzystując Gene Quant (Pharmacia). Badane próbki rozcieńczano do końcowego stężenia 20 ng/µl.

Reakcje amplifikacji przeprowadzono według zmodyfikowanych metod Williams i in. (1990) – RAPD oraz Ziętkiewicz i in. (1994) – ISSR. Reakcje prowadzono w objętości 15 µl odpowiednio w obecności 17 i 14 starterów (tab. 2), w dwóch powtórzeniach dla każdego genotypu z jednoczesną kontrolą negatywną.

W metodzie RAPD, w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1x bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 200 µM każdego dNTP, 8 pM startera, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 ng genomowego DNA, 0,5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Litwa). Reakcje przeprowadzono wg profilu: wstępna denaturacja – 94°C, 3 min; następnie 44 cykle: 94°C, 45 s; 37°C, 45 s; 72°C, 45 s oraz końcowa inkubacja – 7 min, 72°C. Mieszanina reakcyjna w metodzie ISSR różniła się w stosunku do RAPD następującymi składnikami: rodzajem buforu (1x bufor do PCR o składzie: 75 mM Tris HCl pH 8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tweed 20) (Fermentas Litwa), ilością dNTP (160 µM każdego dNTP) oraz startera (4,7 pM). W reakcjach ISSR zastosowano następujący profil

termiczny: wstępna denaturacja 95°C, 7 min następnie 38 cykli: denaturacja 95°C, 30 s; przyłączanie starterów: trzy pierwsze cykle 54°C, 45 s, trzy kolejne cykle 53°C, 45 s i 32 cykle 52°C, 45 s; wydłużanie starterów 72°C, 2 min; końcowa inkubacja 72°C, 7 min.

Tabela 2. Startery zastosowane w badaniach  
Table 2. Primers used in analyses

Nazwa startera RAPD	Sekwencja 5'–3'	Nazwa startera ISSR	Sekwencja 5'–3'
A7	GAA ACG GGT G	SR14	(GA) <sub>7</sub> YG
A11	CAA TCG CCG T	SR16	(GA) <sub>8</sub> C
A16	AGC CAG CGA A	SR17	(GA) <sub>8</sub> YC
F05	CCG AAT TCC C	SR22	(CA) <sub>8</sub> G
G2	TGC TGC AGG T	SR23	(CA) <sub>8</sub> GC
U600	GAA GAA CCG C	SR27	(TC) <sub>8</sub> G
G10	CCG ATA TCC C	SR28	(TG) <sub>8</sub> G
T2	GTC CTA CTC G	SR31	(AG) <sub>8</sub> YC
T2B	CTA CAC AGG C	SR32	(AG) <sub>8</sub> YT
T04	GTC CTC AAC G	SR33	(AG) <sub>8</sub> T
V15	CAG TGC CGG T	SR34	(TC) <sub>8</sub> CC
W2	ACC CCG CCA A	SR36	(AC) <sub>8</sub> CG
U225	CGA CTC ACA G	SR37	(AC) <sub>8</sub> C
U250	CGA CAG TCC C	SR38	(CT) <sub>8</sub> G
U532	TTG AGA CAG G		
U535	CCA CCA ACA G		
U572	TTC GAC CAT C		

Produkty reakcji RAPD rozdzielano w 2-procentowym, natomiast ISSR w 2,5-procentowym żelu agarozowym, z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-borate, 2,5 mM EDTA) przez 2 h przy napięciu 120 V. Żele fotografowano, wykorzystując system dokumentacji PolyDoc.

Wyniki otrzymane metodami RAPD i ISSR pozwoliły na obliczenie dla każdej z nich współczynników informacji o polimorfizmie – PIC (*polymorphism information content*) zgodnie z założeniami Nei (1973). Określono również indeks efektywności metody (AEI – *Assay Efficiency Index*) (Pejic i in. 1998). Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem programu NTSYS-pc<sup>®</sup> 2.10 q (Rohlf 2001). Podobieństwo genetyczne pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów oszacowano zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li 1979). Matryce indeksów podobieństwa posłużyły do wykonania analizy skupień metodą średnich połączeń (UPGMA). Obliczono współczynnik korelacji między matrycami indeksów podobieństwa RAPD i ISSR. Wielkość produktów określano przez porównanie z markerem GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa), stosując program Dnafrag 3.03.

## WYNIKI

W reakcji ISSR uzyskano znacznie większą, w porównaniu z RAPD, liczbę produktów (tab. 3). Łącznie otrzymano 220 fragmentów ISSR i 152 fragmenty RAPD (średnio odpowiednio 15,7 i 8,9/starter). W reakcji RAPD poszczególne startery powielały od 5 do 12 produktów, podczas gdy w reakcjach ISSR otrzymano ich od 10 do 22. Zakres wielkości otrzymanych

produktów był większy w metodzie ISSR (210–2670 pz) niż w RAPD (240–2270 pz). Proporcjonalnie, liczba polimorficznych produktów ISSR w stosunku do RAPD również była większa – otrzymano odpowiednio 75 oraz 52 takie fragmenty, przy czym poszczególne startery ISSR amplifikowały je w liczbie 2–11, a RAPD 1–6 (tab. 3). Współczynnik AEI dla metody RAPD wyniósł 3,7, a dla metody ISSR 4,4. Wartość PIC obliczona dla poszczególnych starterów RAPD i wszystkich analizowanych genotypów przyjmowała zakres od 0,35 do 0,74 (średnio 0,56). Po wykluczeniu z obliczeń dzikiego gatunku *Aegilops crassa* 4x Boiss (dla tego gatunku otrzymano znaczną liczbę produktów specyficznych, co zwiększyło identyfikowany poziom polimorfizmu), wartości PIC dla starterów RAPD były niższe i przyjmowały wartości od 0,3 do 0,7 (średnio 0,5). W przypadku starterów ISSR, wartości PIC przyjmowały zakres 0,44–0,71 (średnio 0,53), a po wykluczeniu z obliczeń *Ae. crassa* 4x Boiss – 0,39–0,62 (średnio 0,49).

Tabela 3. Ocena polimorfizmu identyfikowanego przy udziale starterów RAPD i ISSR  
Table 3. Estimation of polymorphism identified with RAPD and ISSR primers

	RAPD	ISSR
Liczba zastosowanych starterów Number of primers used	17	14
Całkowita liczba produktów Total number of fragments	152	220
Liczba produktów/starter Number of fragments per primer	8,9	15,7
Liczba produktów polimorficznych Number of polymorphic fragments	52	75
Liczba produktów polimorficznych/starter Number of polymorphic fragments per primer	3,7	4,4
Udział produktów polimorficznych [%] Contribution of polymorphic fragments [%]	34,2%	34,1%
Liczba produktów poch. z <i>Ae. crassa</i> Number of fragments from <i>Ae. crassa</i>	14	20
Liczba produktów poch. z <i>Ae. crassa</i> /starter Number of fragments from <i>Ae. crassa</i> per primer	0,8	1,4
Liczba produktów specyficznych dla <i>Ae. crassa</i> Number of fragments specific to <i>Ae. crassa</i>	40	59
Liczba produktów specyficznych dla <i>Ae. crassa</i> /starter Number of fragments specific to <i>Ae. crassa</i> per primer	2,3	4,2
Liczba produktów specyficznych dla mieszańców Number of fragments specific to hybrids	4	11
Liczba produktów specyficznych dla kombinacji krzyżówkowej Number of fragments specific to cross combination <i>Aegilops crassa</i> 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79]	0	0
Liczba produktów specyficznych dla kombinacji krzyżówkowej Number of fragments specific to cross combination {( <i>Aegilops crassa</i> 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]} × Presto) × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]	6	2
Liczba produktów specyficznych dla kombinacji krzyżówkowej Number of fragments specific to cross combination <i>Aegilops crassa</i> 4x × (Panda × Dańkowskie Złote)	0	5

Podobnie identyfikacja produktów potwierdzających obecność materiału genetycznego *Aegilops crassa* 4x Boiss u badanych rodów była bardziej efektywna w przypadku metody ISSR (20 produktów), podczas gdy metodą RAPD uzyskano 14 takich amplikonów (tab. 3, 4). Obie metody pozwoliły na potwierdzenie mieszańcowego charakteru wszystkich ocenianych mieszańców, przy czym u poszczególnych rodów obecność materiału genetycznego *Aegilops crassa* 4x Boiss potwierdzało od 4 do 7 fragmentów RAPD i od 3 do 12 fragmentów ISSR (tab. 4).

Tabela 4. Markery identyfikujące chromatynę *Aegilops crassa* 4x *Boiss* u mieszańców pszenżyta  
 Table 4. Markers identifying *Aegilops crassa* 4x *Boiss* chromatin in triticale hybrids

L.p (No.)	RAPD	ISSR
1	A11 <sup>998*</sup> , A16 <sup>1809</sup> G2 <sup>650</sup> G10 <sup>404</sup> U225 <sup>441</sup> U250 <sup>996</sup> W2 <sup>505</sup>	SR16 <sup>625</sup> SR17 <sup>753</sup> SR22 <sup>653</sup> SR22 <sup>539</sup> SR23 <sup>507</sup> SR31 <sup>783</sup> SR32 <sup>557</sup> SR33 <sup>1299</sup> SR33 <sup>634</sup> SR36 <sup>621</sup> SR37 <sup>1206</sup> SR37 <sup>798</sup>
2	A11 <sup>998</sup> A16 <sup>1809</sup> G2 <sup>790</sup> U250 <sup>996</sup>	SR16 <sup>625</sup> SR16 <sup>375</sup> SR17 <sup>753</sup> SR31 <sup>783</sup> SR31 <sup>347</sup> SR32 <sup>1633</sup> SR32 <sup>782</sup> SR32 <sup>557</sup> SR37 <sup>1206</sup>
3	A11 <sup>998</sup> A16 <sup>1809</sup> A16 <sup>627</sup> G10 <sup>446</sup> G10 <sup>404</sup> U250 <sup>996</sup> U535 <sup>985</sup>	SR22 <sup>653</sup> SR32 <sup>557</sup> SR37 <sup>1206</sup>
4	A16 <sup>1809</sup> A16 <sup>627</sup> U250 <sup>996</sup> U535 <sup>985</sup>	SR22 <sup>653</sup> SR32 <sup>557</sup> SR37 <sup>1206</sup>
5	A16 <sup>1809</sup> A16 <sup>627</sup> U250 <sup>996</sup> U535 <sup>985</sup>	SR22 <sup>653</sup> SR32 <sup>557</sup> SR37 <sup>1206</sup>
6	A16 <sup>1809</sup> A16 <sup>627</sup> U250 <sup>996</sup> U535 <sup>985</sup>	SR22 <sup>653</sup> SR32 <sup>557</sup> SR37 <sup>1206</sup>
7	A11 <sup>998</sup> A16 <sup>501</sup> G2 <sup>889</sup> G2 <sup>790</sup> G10 <sup>996</sup> U225 <sup>441</sup> W2 <sup>505</sup>	SR14 <sup>820</sup> SR16 <sup>917</sup> SR16 <sup>672</sup> SR16 <sup>625</sup> SR17 <sup>753</sup> SR23 <sup>507</sup> SR33 <sup>634</sup> SR37 <sup>1324</sup>
8	A11 <sup>998</sup> A16 <sup>501</sup> G2 <sup>889</sup> G2 <sup>790</sup> G10 <sup>996</sup> G10 <sup>446</sup> W2 <sup>505</sup>	SR16 <sup>917</sup> S SR23 <sup>507</sup> R16 <sup>672</sup> SR16 <sup>625</sup> SR17 <sup>753</sup> SR33 <sup>634</sup> SR37 <sup>1324</sup>
9	A11 <sup>998</sup> A16 <sup>501</sup> G10 <sup>615</sup> W2 <sup>505</sup>	SR16 <sup>672</sup> SR16 <sup>625</sup> SR17 <sup>753</sup> SR23 <sup>507</sup> SR31 <sup>347</sup> SR33 <sup>634</sup> SR37 <sup>1324</sup>

\* wielkości fragmentów – fragments sizes

Obie techniki umożliwiły identyfikację fragmentów specyficznych dla kilku form mieszańcowych (występujących tylko u jednego z badanych rodów, a nieobecnych w DNA form rodzicielskich i innych rodów), przy czym metoda ISSR ujawniła 11 takich amplikonów u czterech form (l.p. 1, 2, 7, 9), a metoda RAPD cztery fragmenty u trzech rodów (l.p. 1, 2 i 9) – tab. 3. Za pomocą techniki ISSR otrzymano również znacznie większą liczbę fragmentów specyficznych dla *Ae. crassa* 4x *Boiss* (59 w porównaniu z 40 otrzymanymi z udziałem RAPD) – tab. 3.

Uzyskano fragmenty specyficzne dla dwóch z trzech badanych kombinacji krzyżówkowych (występujących w DNA wszystkich rodów z danej kombinacji, a nieobecnych u rodów innych kombinacji). Dla form mieszańcowych (*Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]) × Presto) × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79] uzyskano 6 specyficznych fragmentów RAPD i 2 ISSR. Metodą ISSR zidentyfikowano ponadto aż 5 fragmentów specyficznych dla mieszańców *Aegilops crassa* 4x × (Panda × Dańkowskie Złote) – tab. 3.

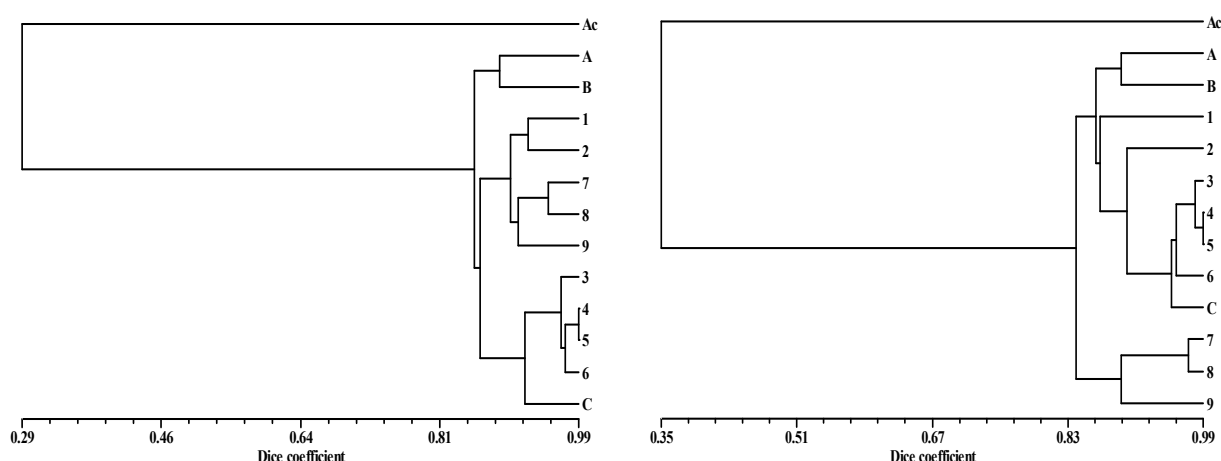
Podobieństwo genetyczne pomiędzy badanymi formami mieszańcowymi i pszenżytnimi komponentami rodzicielskimi było jednakowe w przypadku obu zastosowanych metod (0,83–0,99 – RAPD i 0,82–0,99 – ISSR) – tab. 5. Obie techniki potwierdziły, że najmniejszym podobieństwem do wszystkich pozostałych form charakteryzował się mateczny gatunek *Aegilops crassa* 4x *Boiss* (0,24–0,33 – RAPD; 0,31–0,38 – ISSR), który lokalizował się na obrzeżach otrzymanych dendrogramów. Obie metody wykazały największe podobieństwo genetyczne rodów o l.p. 4 i 5 należących do kombinacji krzyżówkowej (*Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]) × Presto) × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]), które wynosiło odpowiednio 0,989 (RAPD) i 0,994 (ISSR). Metoda ISSR wykazała najmniejsze podobieństwo rodów 5. i 8. należących do dwóch różnych kombinacji krzyżówkowych, natomiast RAPD formy ojcowskiej kombinacji krzyżówkowej *Aegilops crassa* 4x × (Panda × Dańkowskie Złote) i rodu 9. należącego do tej kombinacji (tab. 5).

Tabela 5. Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a uzyskane w oparciu o polimorfizm markerów RAPD i ISSR

Table 5. Dice genetic similarities values obtained based on RAPD and ISSR markers polymorphism

	RAPD	ISSR
Zakres wartości indeksów podobieństwa Range of genetic similarity coefficients values	0,24–0,99	0,31–0,99
Średnia wartość indeksów podobieństwa Mean values of genetic similarity coefficients	0,79	0,79
Zakres wartości indeksów podobieństwa pomiędzy formami pszenżyta Range of genetic similarity coefficients values between triticale forms	0,83–0,99	0,82–0,99
Średnia wartość indeksów podobieństwa pomiędzy formami pszenżyta Mean values of genetic similarity coefficients between triticale forms	0,88	0,88
Zakres wartości indeksów podobieństwa pomiędzy <i>Ae. crassa</i> a rodami pszenżyta Range of genetic similarity coefficients values between <i>Ae. crassa</i> and triticale strains	0,24–0,33	0,31–0,38
Średnia wartość indeksów podobieństwa pomiędzy <i>Ae. crassa</i> a rodami pszenżyta Mean values of genetic similarity coefficients between <i>Ae. crassa</i> and triticale strains	0,29	0,35

Na obu dendrogramach (rys. 1) mieszańce i pszenżytnie komponenty rodzicielskie tworzą wyraźną główną grupę skupień, w której można wyróżnić trzy podgrupy.



A – forma ojcowska kombinacji krzyżówkowej – paternal form of cross combination *Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79]; 1, 2 – mieszańce – hybrids  
 B – forma ojcowska kombinacji krzyżówkowej – paternal form of cross combination ({*Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]} × Presto) × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]; 3, 4, 5, 6 – mieszańce – hybrids  
 C – forma ojcowska kombinacji krzyżówkowej – paternal form of cross combination *Aegilops crassa* 4x × (Panda × Dańkowskie Złote); 7, 8, 9 – mieszańce – hybrids  
 Ac – forma mateczna – maternal form – *Aegilops crassa* 4x Boiss.

Rys. 1. Dendrogramy podobieństwa genetycznego mieszańców pszenżyta z *Aegilops crassa* (4x) Boiss, otrzymane z zastosowaniem metody UPGMA na podstawie markerów RAPD (z lewej) i ISSR (z prawej)

Fig. 1. Dendrograms of genetic similarity of *Triticale* hybrids based on the RAPD (left) and ISSR (right) markers

W większości przypadków mieszańce stanowiące potomstwo danego krzyżowania skupiają się w jednej podgrupie. Jedynie na dendrogramie otrzymanym metodą ISSR forma 2. nie utworzyła wspólnej podgrupy z formą 1. pochodzącą z tego samego krzyżowania, lecz dość odległe skupiła się z mieszańcami kombinacji krzyżówkowej ({*Aegilops crassa* 4x ×

[(Lanca × L506/79) × CZR142/79]} × Presto) × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]. Ponadto, na dendrogramie otrzymanym metodą RAPD, mieszańce *Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79] utworzyły grupę z mieszańcami *Aegilops crassa* 4x × (Panda × Dańkowskie Złote). Z kolei na dendrogramie otrzymanym metodą ISSR mieszańce *Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79] utworzyły podgrupę z mieszańcami (*Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]} × Presto) × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79] – rys. 1.

Pomiędzy macierzami podobieństwa genetycznego Dice'a, uzyskanymi na podstawie badań polimorfizmu markerów RAPD i ISSR, stwierdzono wysoką dodatnią korelację równą 0,99.

## DYSKUSJA

Spadek zróżnicowania genetycznego odmian uprawnych zbóż skłania do poszukiwania zmienności w gatunkach pokrewnych. Zmienność genetyczną odmian można poszerzać poprzez wprowadzenie pożądanych genów z gatunków dzikich za pomocą krzyżowania. Do oszacowania podobieństwa genetycznego gatunków, odmian czy materiałów hodowlanych stosuje się różne systemy markerów molekularnych identyfikujących polimorfizm DNA, m.in. RAPD czy ISSR (Sztuba-Solińska 2005).

Wydajność metod RAPD i ISSR w detekcji polimorfizmu była wielokrotnie testowana u wielu gatunków roślin: pszenicy (Nagaoka i Ogihara 1997), żyta (Matos i in. 2001), ryżu (Qian i in. 2001) czy jęczmienia (Fernández i in. 2002). Techniki te stosowano również do oceny podobieństwa genetycznego odmian pszenżyta (Masojć 2000, Milczarski i in. 2001, Stojałowski i Góral 2002, Twardowska i in. 2002), oceny polimorfizmu gatunków z rodzaju *Aegilops* (Goryunova i in. 2004) oraz identyfikacji chromatyny gatunków z rodzaju *Aegilops* u mieszańców pszenicy (Galaev i in. 2004) czy pszenżyta (Tyrka i in. 2001, Grądzielewska i in. w druku). Systemem wydajniejszym w detekcji polimorfizmu okazywał się zwykle ISSR.

W badaniach własnych obie zastosowane w pracy metody pozwoliły na otrzymanie po 34% produktów polimorficznych, po 9% fragmentów potwierdzających obecność materiału genetycznego *Aegilops crassa* 4x Boiss oraz po około 26% fragmentów specyficznych dla tego gatunku kozieńca. Startery ISSR powieliły jednak więcej fragmentów każdego rodzaju, mimo że w badaniach zastosowano ich mniej niż starterów RAPD. Qian i in. (2001) oraz Tanyolac (2003) również podają, że mimo zastosowania większej liczby starterów RAPD, metoda ta pozwoliła na uzyskanie znacznie mniejszej liczby produktów polimorficznych niż ISSR. Otrzymany w niniejszej pracy indeks efektywności metody dla ISSR wyniósł 4,4 w porównaniu z 3,7 dla metody RAPD. Oceniając odmiany pszenżyta, Masojć (2000) otrzymał wartość tego indeksu dla techniki RAPD na poziomie 1,9, a Milczarski i in. (2001) – 1,8. Z kolei u mieszańców pszenżyta z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig Grądzielewska i in. (w druku) otrzymali wyższą wartość tego indeksu – 2,9, podobnie jak Matos i in. (2001) u odmian żyta. Dla metody ISSR wartości tego indeksu były, tak jak w badaniach własnych, wyższe niż dla RAPD i wynosiły: 2,1 dla odmian pszenżyta (Stojałowski i Góral 2002) i 4,6 dla żyta (Bolibok i in. 2005).

Wartość PIC dla obu zastosowanych metod była bardzo zbliżona. W przypadku metody RAPD wynosiła średnio 0,56, a dla ISSR – 0,53. Średnia wartość tego indeksu, obliczona



natomiast z wyłączeniem dzikiego gatunku *Ae. crassa* 4x Boiss, była dla obu technik identyczna i wynosiła 0,5. Bardzo zbliżone do uzyskanych w badaniach własnych średnie wartości PIC uzyskiwano wielokrotnie u różnych gatunków dla metody SSR, która powszechnie uznawana jest za najbardziej efektywną w ocenie podobieństwa genetycznego. Tams i in. (2004) otrzymali średnią wartość PIC równą 0,54 u pszenżyta, Li i in. (2000) – 0,57 u gatunków z rodzaju *Avena*, a Shang i in. (2006) nieznacznie wyższą (0,60) u żyta. Oszacowana w niniejszej pracy wartość PIC zawierała się w przedziale 0,30–0,70 dla RAPD i 0,39–0,62 dla ISSR. Podobne wartości (0,30–0,78) otrzymali Sarla i in. (2005), analizując podobieństwo genetyczne odmian ryżu z udziałem metody ISSR.

Wyniki uzyskane w badaniach własnych wskazują, że metody RAPD i ISSR identyfikują u ocenianych mieszańcowych form pszenżyta podobny poziom polimorfizmu (mierzony udziałem procentowym produktów polimorficznych oraz indeksem PIC), porównywalny z uzyskiwanym przez innych autorów metodą SSR. Jednakże z uwagi na większą wartość współczynnika AEI metodą efektywniejszą jest ISSR w porównaniu z RAPD. Technika ta była również skuteczniejsza w identyfikacji charakteru mieszańcowego badanych form oraz amplifikacji produktów specyficznych zarówno dla rodów, jak i *Ae. crassa* 4x Boiss.

Obie zastosowane w pracy metody jednakowo odzwierciedlały podobieństwo genetyczne pomiędzy badanymi formami mieszańcowymi i pszenżytnymi komponentami rodzicielskimi. Najbardziej odległy genetycznie od pozostałych form był mateczny gatunek *Aegilops crassa* 4x Boiss, który na dendrogramach tworzył z nimi luźne skupienie. Podobne wyniki otrzymali Grądzielewska i in. (w druku), oceniając za pomocą markerów RAPD mieszańce pszenżyta z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. Spośród ocenianych w niniejszej pracy form, najbardziej podobne do siebie okazały się rody 4. i 5. należące do drugiej z badanych kombinacji, nie wytypowano natomiast form najbardziej zróżnicowanych.

Z danych o pochodzeniu można wnioskować, że udział chromatyny *Ae. crassa* 4x Boiss w formach 1., 2. i 7., 8., 9. powinien być znacznie większy niż w mieszańcach o l.p. 3, 4, 5, 6. Jakkolwiek metodą ISSR faktycznie stwierdzono większy udział DNA kozieńca u rodów kombinacji *Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79] i *Aegilops crassa* 4x × (Panda × Dańkowskie Złote), jednak nie był on tak znaczny jak sugeruje formuła krzyżowania. Stan ten może wynikać z rearanżacji chromosomowych jakie zachodziły u mieszańców (pokolenie F7–F9), u których prawdopodobnie nastąpiła już znaczna eliminacja chromatyny formy dzikiej z DNA pszenżyta, co często się zdarza u roślin uprawnych. Pewien wpływ na uzyskane wyniki mógł mieć fakt, że zastosowane w pracy metody mogły w znacznej mierze nie powielać sekwencji DNA kozieńca u mieszańców pszenżyta, choć wydaje się to mało prawdopodobne, szczególnie w przypadku metody RAPD, gdzie amplifikacji ulegają przypadkowe sekwencje genomu. W pracy udowodniono jednak, że mieszańce l.p. 3, 4, 5, 6 (o mniejszym udziale chromatyny kozieńca) są odmienne od tych, które mają większy udział DNA formy dzikiej (1, 2, 7, 8, 9). Na obu dendrogramach rody 3., 4., 5., 6. grupują się razem i nie tworzą bliskiego skupienia z formami o większym udziale kozieńca czyli 1, 2 oraz 7, 8, 9.

Podobieństwo formy C do mieszańców 3–6, dla których formą ojcowską było pszenżyto oznaczone literą B, może również być związane z rearanżacjami chromosomowymi, a szczególnie ze zjawiskiem pasażowania chromosomów (Tarkowski i Stefanowska 1972).

Chromatyna *Aegilops crassa* 4x Boiss mogła spowodować znaczne zmiany w DNA mieszańców pszenżyta, które po długim czasie rozmnażania utraciły podobieństwo do swojej pszenżytniej formy ojcowskiej.

Bardzo wysoka, istotna korelacja matryc podobieństwa otrzymanych z zastosowaniem metod RAPD i ISSR wskazuje, że każda z nich może być stosowana niezależnie do oceny mieszańców pszenżyta z kozieńcami. Według Tanyolaca (2003), systemy RAPD i ISSR są bardzo efektywne w wykrywaniu zmienności genetycznej. Fernandez i in. (2002) stwierdzili ponadto, że zależności genetyczne ustalone z zastosowaniem tych metod odpowiadają informacjom o pochodzeniu ocenianych materiałów. Skonstruowane w niniejszej pracy dendrogramy różniły się od siebie w niewielkim stopniu. Uzyskane wyniki potwierdziły pokrewieństwo form w obrębie danej kombinacji krzyżówkowej. W obu przypadkach wyodrębniono trzy podgrupy tworzone przez formy o takim samym pochodzeniu. Stwierdzono jednak różnice w topologii dendrogramów dotyczące podobieństwa pomiędzy kombinacjami – na dendrogramie otrzymanym metodą RAPD bardziej podobne do siebie były kombinacje *Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79] i *Aegilops crassa* 4x × (Panda × Dańkowskie Złote), a na dendrogramie uzyskanym metodą ISSR – kombinacje *Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR 142/79] i (*Aegilops crassa* 4x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]) × Presto × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]. Podsumowując, metoda ISSR lepiej zobrazowała podobieństwo pomiędzy kombinacjami krzyżówkowymi, choć w tym przypadku wspólnego subklastru nie utworzyły rody o l.p. 1 i 2, których pochodzenie było takie samo. Formy te utworzyły natomiast podgrupę na dendrogramie otrzymanym metodą RAPD, która jednak nie odzwierciedliła prawidłowo pokrewieństwa pomiędzy kombinacjami. W literaturze można spotkać się z doniesieniami o różnym grupowaniu się ocenianych form w zależności od zastosowanego systemu markerowego. Z tego powodu ocena podobieństwa powinna opierać się na kilku systemach markerowych jednocześnie (Myśków i in. 2004).

## WNIOSKI

1. Zastosowane w pracy metody RAPD i ISSR prawidłowo odzwierciedliły podobieństwo genetyczne ocenianych form pszenżyta i pozwoliły na potwierdzenie ich mieszańcowego charakteru, jednak bardziej efektywna okazała się technika ISSR.

2. Uzyskane wyniki potwierdziły pokrewieństwo rodów w obrębie danej kombinacji krzyżówkowej. Rody należące do trzech badanych kombinacji tworzyły na dendrogramach odrębne grupy skupień.

3. Wysoka dodatnia korelacja pomiędzy matrycami podobieństwa genetycznego wskazała, że oba systemy markerowe w podobny sposób odzwierciedliły podobieństwo genetyczne badanych form, choć wyniki uzyskane metodą ISSR w większym stopniu były zgodne z formułą krzyżowania, aniżeli RAPD.

## PIŚMIENNICTWO

**Arseniuk E., Oleksiak T.** 2002. Production and breeding of cereals in Poland. Proc. 5<sup>th</sup> Int. Trit. Symp., *Biul. IHAR*, Radzików, Poland, 30 June – 5 July 2002, I, II, 11–20.

- Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M., Hromada A., Pietrzykowski R.** 2005. Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. *Euphytica* 146, 109–116.
- Broda Z., Wojciechowska A.** 2004. Przyszłość hodowli roślin w diagnostyce molekularnej. *Hod. Rośl. Nasienn.* 2, 2–4.
- Fernandez M.E., Figueiras A.M., Benito C.** 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 104, 845–851.
- Galaev A.V., Babayants L.T., Sivolap Y.M.** 2004. Detection of the Intogression of Genome Elements of the *Aegilops cylindrica* Host into the *Triticum aestivum* L. Genome by ISSR and SSR Analysis. *Russ. J. Genet.* 40 (12), 1371–1377.
- Goryunova S.V., Kochieva E.Z., Chikida N.N., Pukhalskiy V.A.** 2004. Phylogenetic Relationships and Intraspecific Variation of D-Genome *Aegilops* L. as Revealed by RAPD Analysis. *Russ. J. Genet.* 40 (5), 515–523.
- Grądzielewska A., Gruszecka D., Leśniowska-Nowak J.** (w druku). Ocena podobieństwa genetycznego mieszańców pszenżyta z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. *Acta Agrophysica*.
- Grzesik H., Strzembicka A.** 1999. Studies on inheritance of the resistance to leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) of winter triticale varieties at the seedling and adult plant stages. *Plant Breed. Seed Sci.* 43 (1), 85–89.
- Grzesik H., Strzembicka A.** 2003. Odporność wybranych odmian pszenżyta ozimego na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). *Biul. IHAR* 230, 171–175.
- Gupta P.K., Fedak G.** 1985. Variation in induction of homoelogenous chromosome pairing in 6x *Aegilops crassa* by genomes of six different species of *Secale*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27, 531–537.
- Hutchinson J., Chapman V., Miler T.E.** 1980. Chromosome pairing at meiosis in hybrids between *Aegilops* and *Secale* species: a study by in situ hybridization used cloned DNA. *Heredity* 45, 245–254.
- Li C.D., Rossnagel B.G., Scoles G.J.** 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1259–1268.
- Masłowski J., Gruszecka D., Tarkowski C.** 1997. Tolerancyjność mieszańców pszenżyta z kozieńcami na toksyczne jony glinu. *Zesz. Nauk. AR Szczecin* 175 (65), 255–258.
- Masojć P.** 2000. Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu markerów RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin.*, Ser. Agric. 206 (82), 179–184.
- Masojć P., Myśków B., Milczarski P.** 2001. Extending a RFLP-based genetic map of rye using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 102, 1273–1279.
- Matos M., Pinto-Carnide O., Benito C.** 2001. Phylogenetic relationship among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134, 229–236.
- Milczarski P., Banek-Tabor A., Masojć P.** 2001. Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta. *Biul. IHAR* 218/219, 261–267.
- Milligan B.G.** 1992. *Plant DNA isolation W: Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*, red. Hoelzel A.R., USA, Oxford University Press, 65–66.
- Morrison L.A., Riera-Lizarazu O., Crémieux O., Mallory-Smith C.A.** 2002. Jointed Goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host) x Wheat (*Triticum aestivum* L.) Hybrids. *Crop Sci.* 42, 1863–1872.
- Myśków B., Milczarski P., Twardowska M., Masojć P.** 2004. Wykorzystanie markerów SSR, ISSR i RAPD do fingerprintingu oraz oceny zróżnicowania genetycznego linii wsobnych żyta. *Polski Kongres Genetyki*, 6–9 września, Gdańsk.
- Nagaoka T., Ogihara Y.** 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94, 597–6.
- Nei M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3321–3323.
- Nei M., Li W.H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 5269–5273.
- Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplicck 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, 248–255.

- Pokacka Z.** 1991. Choroby liści pszenżyta. Ochr. Rośl. 5–6, 11–13.
- Qian W., Ge S., Hong D.Y.** 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 102, 440–449.
- Rohlf F.J.** 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Sarla N., Neeraja C.N., Siddiq E.A.** 2005. Use of anchored (AG)<sub>n</sub> and (GA)<sub>n</sub> primers to assess genetic diversity of Indian landraces and varieties of rice. Curr. Sci. 89(8), 1371–1381.
- Shang H.Y., Wei Y.M., Wang X.R., Zheng Y.L.** 2006. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. Genet. Mol. Biol. 29 (4), 685–691.
- Slageren van M.W.** 1994. Wild wheat: a monography of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agricultural University Papers 94–7, 2–5, 188–199.
- Stojałowski S., Góral H.** 2002. Wykorzystanie markerów RAPD i ISSR do rozróżniania linii cms pszenżyta ozimego z cytoplazmą *T. timopheevi*. Folia Univ. Agric. Stetin., Ser. Agric. 228 (91), 161–166.
- Strzembicka A., Gruszecka D.** 1997. Characteristics of X *Triticosecale* Wittmack with *Aegilops* sp. hybrids with respect to their reaction to leaf rust. J. Appl. Genet. 38B, 129–134.
- Strzembicka A., Grzesik H., Węgrzyn S., Gajda Z.** 1999. Charakterystyka rodów pszenżyta ozimego pod względem odporności na rdzę brunatną i rdzę żdźbłową. Biul. IHAR 211, 191–197.
- Sztuba-Solińska J.** 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54, 227–229.
- Tams S.H., Bauer E., Oettler G., Melchinger A.E.** 2004. Genetic diversity in European winter triticales determined with SSR markers and coancestry coefficient. Theor. Appl. Genet. 108, 1385–1391.
- Tams S.H., Melchinger A.E., Bauer E.** 2005. Genetic similarity among European winter triticales elite germplasm assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. Plant Breed. 124, 154–160.
- Tanyolac B.** 2003. Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) populations from west Turkey. Genet. Res. Crop Evol. 50, 611–614.
- Tarkowski C., Stefanowska G.** 1972. Chromosome morphology in the genome of rye *Secale cereale* L. and in triticales 6x and 8x. Genet. Pol. 13/1, 83–89.
- Tarkowski Cz.** 1989. Wstęp. Biologia pszenżyta. Red. Cz. Tarkowski, Warszawa, PWN, 10–18.
- Twardowska M., Banek-Tabor A., Masojć P.** 2002. Identyfikacja odmian pszenżyta ozimego przy użyciu techniki RAPD. Folia Univ. Agric. Stetin., Ser. Agric. 228 (91), 175–178.
- Tyrka M., Stefanowska G., Brzeziński W.** 2001. Transfer genów z *Aegilops ventricosa* do *Triticum aestivum*. Biotechnologia 2 (53), 57–62.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Lidwiak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Act. Res. 18, 6531–6535.
- Woś H., Metzger R.J., Łukaszewski A.J., Cygankiewicz A.** 2002. The effect of the D-genome chromosome substitutions and of translocations of chromosome 1D on some quality and agronomic parameters of winter triticales. Proc. 5<sup>th</sup> Int. Triticales Symp., Vol II, Radzików, Poland, 30 June – 5 July 2002, Biul. IHAR Radzików, 59–69.
- Zamorski C., Nowiński B., Wakuliński W., Schollenberger M.** 2001. Reakcje genotypów pszenicy i pszenżyta na porażenie przez *Puccinia striiformis* Westland. Ochr. Rośl. 41, 2, 947–950.
- Zamorski C., Schollenberger M.** 1995. Występowanie chorób pszenżyta w Polsce. Biul. IHAR 195/196, 197–208.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.** 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics 20, 176–183.