

EDYTA PACZOS-GRZĘDA
MARIA CHRZĄSTEK
SYLWIA OKOŃ
AGNIESZKA GRĄDZIELEWSKA
DANUTA MIAZGA

Instytut Genetyki i Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Zastosowanie markerów ISSR do analizy wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego *Avena sterilis* L.

Application of ISSR markers in analysis of intraspecific similarity of *Avena sterilis* L.

W Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie prowadzony jest program obejmujący krzyżowanie owsa zwyczajnego z dzikimi gatunkami z rodzaju *Avena* L. W krzyżowaniach jako formy mateczne wykorzystywane są polskie i amerykańskie odmiany owsa oraz linie hodowlane. Komponentami ojcowskimi są dzikie gatunki heksaploidalne: *A. sterilis* L. i *A. fatua* L. oraz tetraploidalne: *A. murphyi* Ladiz. i *A. maroccana* Gdgr. W celu określenia poziomu zróżnicowania genetycznego form *A. sterilis* wykorzystywanych do krzyżowań przeprowadzono analizę polimorfizmu markerów ISSR. Metoda ISSR jest wysoce efektywna, identyfikuje wysoki polimorfizm i może być z powodzeniem stosowana do oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie *Avena sterilis* L. Podobieństwo genetyczne analizowanych genotypów określone na podstawie polimorfizmu markerów ISSR wahało się od 0,512 pomiędzy AVE 2532 i AVE 2116 do 0,878 pomiędzy CN 26025 i AVE 531, a średnio wynosiło 0,715. Takie wartości współczynników podobieństwa genetycznego świadczą o dużym zróżnicowaniu genotypów *A. sterilis* przeznaczonych do krzyżowań.

Słowa kluczowe: *Avena sterilis* L., ISSR, podobieństwo genetyczne

The Institute of Genetics, Breeding and Plant Biotechnology of University of Life Sciences in Lublin conducted a program of *Avena sativa* L. cultivars crossing with wild species of the genus *Avena* L. Polish and American cultivars and breeding lines were the maternal forms for crossing. The paternal components were wild hexaploid species: *A. sterilis* L., *A. fatua* L. and tetraploids: *A. murphyi* Ladiz., *A. maroccana* Gdgr. Analysis of ISSR markers polymorphism was conducted in order to determine genetic diversity of the *A. sterilis* genotypes used in crossing. The ISSR method is much effective in identification of DNA polymorphism and can be employed with success to evaluate the *A. sterilis* L. genetic diversity. Genetic similarity of the analyzed genotypes, determined based on the ISSR markers polymorphism, ranged from 0.512 (AVE 2532 vs. AVE 2116) to 0.878 (CN 26025 vs. AVE 531), on the average — 0.715. Such values of genetic similarity indices testify to high diversity of the *A. sterilis* genotypes designated for crossing.

Key words: *Avena sterilis* L., genetic similarity, ISSR

WSTĘP

W Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie od kilku lat prowadzony jest program obejmujący krzyżowanie owsa zwyczajnego z dzikimi gatunkami z rodzaju *Avena* L. (Chrząstek i in., 2006). W krzyżowaniach jako formy mateczne wykorzystywane są polskie i amerykańskie odmiany owsa oraz linie hodowlane pochodzące z HR Strzelce oraz Danko w Choryni. Komponentami ojcowskimi są dzikie gatunki heksaploidalne: *A. sterilis* L. i *A. fatua* L. oraz tetraploidalne: *A. murphyi* Ladiz. i *A. maroccana* Gdgr.

Dzikie gatunki owsa charakteryzuje nie tylko bogactwo genów odporności, ale i ogromna zmienność cech morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych i rolniczych. Z uwagi na duże podobieństwo genetyczne do *A. sativa*, gatunek *A. sterilis* uważany jest za przodka form uprawnych (Zhou i in., 1999) oraz jedno z najłatwiej dostępnych źródeł zmienności (Frey, 1986; Chrząstek i in., 2004). Jednocześnie *A. sterilis* stanowi dużą rezerwę różnorodności genetycznej dla owsa zwyczajnego, dlatego wykorzystywany jest w programach hodowlanych jako źródło genów warunkujących odporność na mączniaka (Frey, 1986), rdzę koronową i żdźbłową (Martens i in., 1980), nicienie (Rivoal i Cook, 1993) czy herbicydy (Somody i in., 1984). *A. sterilis* może być również dawcą genów warunkujących wysoką zawartość białka (Takeda i Frey, 1977) i tłuszczu (Thro i Frey, 1985) w ziarnie, a także odpowiedzialnych za wysoki potencjał plonowania (Takeda i Frey, 1977).

Genotypy *Avena sterilis* pochodzące ze światowych kolekcji były zaledwie kilkakrotnie obiektem analiz molekularnych. Goffreda i wsp. (1992) oceniali polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych w 173 próbach *A. sterilis* pochodzących z 9 krajów Afryki i południowo-wschodniej Azji. Phillips i wsp. (1993) określili podobieństwo genetyczne 1005 genotypów *A. sterilis* z kolekcji US NSGC (United States National Small Grain Collection) na podstawie zróżnicowania izoenzymów dla 23 systemów enzymatycznych. Heun i wsp. (1994) za pomocą markerów RAPD i izoenzymów analizowali zróżnicowanie 24 form *A. sterilis* pochodzących z kolekcji US NSGC. Zohu i wsp. (1999) wykorzystując metodę RAPD ocenili podobieństwo genotypów *A. sterilis* o zróżnicowanym pochodzeniu oraz udział *A. sterilis* w ewolucji gatunków uprawnych. Fu i wsp. (2007) podjęli próbę oceny zróżnicowania genetycznego 369 form *A. sterilis* z kolekcji PGRC (Plant Gene Resources of Canada) pochodzących z 26 krajów za pomocą systemu SSR.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) jest metodą opartą na PCR, a amplifikacji podlegają fragmenty DNA pomiędzy powtórzeniami mikrosatelitarnymi położonymi w odległości nie większej niż ok. 2000bp (Ziętkiewicz i in., 1994). Metoda ta, z uwagi na wysokie temperatury przyłączania starterów, jest wysoce powtarzalna. Ponadto markery ISSR, podobnie jak sekwencje mikrosatelitarne, z którymi sąsiadują są równomiernie rozłożone w genomie (Predeep-Reddy i in., 2002). Metodę ISSR wykorzystano kilkakrotnie do analizy gatunków z rodzaju *Avena*. De Souza i wsp. (2005) użyli tej metody do oszacowania zróżnicowania genetycznego mutantów *A. sativa* oraz identyfikacji

regionów genomu związanych z wrażliwością bądź tolerancyjnością na kwasy organiczne będące produktami rozkładu materii organicznej. Tanhuanpaa i wsp. (2006) wykorzystali tę metodę w celu identyfikacji markera dla genu karłowatości Dw6. Paczos-Grzęda i wsp. (2006) przeprowadzili analizę polimorfizmu markerów ISSR u 12 mieszańców F₁ 10 różnych kombinacji *A. sativa* × *A. maroccana* oraz 2 kombinacji *A. sativa* × *A. murphyi* i potwierdzili mieszańcowy charakter badanych form. Natomiast Paczos-Grzęda (2007) oceniła podobieństwo genetyczne wybranych polskich odmian *A. sativa*. ISSR była również jedną z metod wykorzystanych do konstrukcji mapy sprzężeń heksaploidalnego owsa na bazie podwojonych haploidów (Tanhuanpaa i in., 2008).

W celu określenia poziomu zróżnicowania genetycznego form *A. sterilis* wykorzystywanych do krzyżowań mających na celu poszerzenie zmienności uprawnych form owsa przeprowadzono analizę polimorfizmu markerów ISSR 27 wybranych genotypów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 27 genotypów *A. sterilis* (tab. 1) pochodzących z różnych rejonów świata, a sprowadzonych z czterech banków genów: National Small Grain Collection, Aberdeen w USA, Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon w Kanadzie, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben w Niemczech, Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Izolację DNA przeprowadzono metodą Milligana (1992). DNA każdego genotypu izolowano w dwóch powtórzeniach. Jedno powtórzenie stanowiły fragmenty koleoptyle 15–20 siewek. Reakcje amplifikacji przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Ziętkiewicz i wsp. (1994). W metodzie ISSR w skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 µL wchodziły: 1 × bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20) (Fermentas, Litwa); 160 µM każdego dNTP; 5,3 pM startera; 1,3 mM MgCl₂; 0,4 mM spermidyny, 80 ng genomowego DNA; 0,5 U Taq DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 7 min. w 95°C, 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., z końcową inkubacją 7 min. w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano w 2,5 % żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele fotografowano wykorzystując system dokumentacji żeli PolyDoc.

Na podstawie polimorfizmu markerów ISSR określono podobieństwo genetyczne SI (similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li, 1979). Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano mu odpowiednio wartość 1 lub 0. W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) stosując program NTSYS-pc 2.10q. (Rohlf, 2001). W celu dokonania oceny wartości zastosowanego systemu markerowego obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie PIC (polymorphism information content) zgodnie z założeniami Powell i wsp. (1996). Określono również indeks efektywności metody (AEI — Assay Efficiency

Index) (Pejic i in., 1998) $AEI = BP/T$, gdzie BP jest całkowitą liczbą uzyskanych polimorficznych fragmentów, zaś T liczbą zastosowanych starterów.

Tabela 1

**Pochodzenie badanych genotypów *Avena sterilis* L.
Origin of the analysed *Avena sterilis* L. genotypes**

Oznaczenie genotype Genotype description	Bank genów Genebank	Pochodzenie Origin	Rok wprowadzenia do kolekcji Year of introduction into collection
51565	IHAR		—
AVE 1373	IPK	Włochy	—
AVE 1561	IPK	Cypr	1977
AVE 1935	IPK	Ukraina	—
AVE 2068	IPK	Włochy	1981
AVE 2116	IPK		1981
AVE 2122	IPK	Liban	1981
AVE 2532	IPK	Tadżykistan	1983
AVE 2562	IPK	Wielka Brytania	—
AVE 283	IPK	Grecja	1942
AVE 531	IPK	Włochy	1950
AVE 941	IPK		—
Clav 8295	NSGC	Izrael	1966
CN 20304	PGRC		1990
CN 20321	PGRC		1990
CN 20322	PGRC	Syria	1990
CN 20328	PGRC		1990
CN 24397	PGRC	Gruzja	1990
CN 25677	PGRC		1990
CN 25717	PGRC	Portugalia	1990
CN 26025	PGRC		1990
PI 287211	NSGC		1963
PI 378811	NSGC		1973
PI 378859	NSGC		1973
PI 379677	NSGC	Izrael	1973
PI 380064	NSGC		1973
PI 380125	NSGC		1973

NSGC — National Small Grain Collection, Aberdeen, USA

PGRC — Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon, Kanada

IPK — Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Niemcy

IHAR — Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), IHAR w Radzikowie

WYNIKI I DYSKUSJA

W reakcjach przeprowadzonych dla 27 genotypów *A. sterilis* z 10 wyselekcjonowanymi starterami ISSR uzyskano łącznie 148 fragmentów DNA, z których 105 było polimorficznych. Wielkość amplikonów wahała się od 180 do 1800 pz, zaś produkty polimorficzne miały długość od 260 do 1780 pz. Pojedynczy starter inicjował amplifikację od 11 dla SR-27 do 19 produktów dla SR-11, średnio na starter przypadało 14,8 amplifikowanych fragmentów (tab. 2). Liczba prążków polimorficznych wynosiła od 7 dla SR-27 do 15 dla SR-1 i SR-11. Średnio każdy starter uczestniczył w amplifikacji 10,5 polimorficznych odcinków DNA, stąd indeks efektywności metody AEI przyjął właśnie

taką wartość. Heun i wsp. (1994) stosując 21 starterów RAPD dla 24 genotypów *A. sterilis* uzyskali 177 fragmentów, spośród których 115 było polimorficznych. Wartość AEI była niższa, aniżeli uzyskana w badaniach własnych i wyniosła 5,5. Zhou i wsp. (1999) uzyskali 248 polimorficznych prążków przy zastosowaniu 35 starterów RAPD dla 96 genotypów *A. sterilis*, a indeks AEI osiągnął wartość 7,0. Wydajność metody RFLP w badaniach Goffreda i wsp. (1992) była jeszcze niższa, a indeks AEI przyjął wartość 5,0. Fu i wsp. (2007) wykorzystali do analiz 26 par starterów SSR identyfikujących 125 alleli, a indeks efektywności metody wyniósł zaledwie 4,8. Można więc stwierdzić, że najbardziej efektywną metodą do analizy różnicowania genetycznego *A. sterilis* jest zastosowana w niniejszej pracy ISSR.

Tabela 2

Charakterystyka polimorfizmu identyfikowanego metodą ISSR
Characteristic of the polymorphism identified by the ISSR methods

Starter Primer	Liczba produktów Products number			PIC	Liczba profili Number of profiles	
	całkowita total	polimorficznych polymorphic	specyficznych specific		całkowita total	specyficznych specific
SR 1	17	15	0	0,52	21	16
SR 6	14	9	4	0,98	9	5
SR 11	19	15	2	0,67	22	18
SR 14	16	11	1	0,76	19	14
SR 16	14	10	1	0,75	15	9
SR 17	16	10	3	0,75	16	9
SR 22	13	8	1	0,67	17	16
SR 23	13	9	2	0,83	17	13
SR 27	11	7	0	0,82	17	10
SR 28	15	11	1	0,67	21	16
Suma Total	148	105	15	—	174	126
Średnio/starter Average per primer	14,8	10,5	1,5	0,74	17,4	12,6

Wartość PIC dla poszczególnych starterów ISSR wahała się od 0,52 do 0,99, zaś średnio wyniosła 0,74 (tab. 2). Powell i wsp. (1996) porównując wydajność kilku systemów markerowych u soi (AFLP, RAPD, RFLP oraz SSR) stwierdzili, podobnie jak wielu innych autorów, że współczynnik PIC przyjął najwyższą wartość dla metody SSR (0,60). SSR jest więc postrzegana jako metoda najbardziej efektywna w identyfikacji polimorfizmu. Li i wsp. (2000) stosując zaprojektowane dla owsa startery SSR dla 12 gatunków z rodzaju *Avena* uzyskali średnią wartość PIC 0,57 (0,28–0,79), zaś dla 20 odmian *Avena sativa* 0,51 (0,10–0,85). Analizując startery SSR zaprojektowane dla jęczmienia ci sami autorzy dla gatunków z rodzaju *Avena* oszacowali wartość PIC na 0,55 (0,31–0,77), zaś dla odmian na 0,38 (0,15–0,51). Równie wysoką, jak w badaniach własnych, wartość współczynnika PIC uzyskali Spada i wsp. (2004) u ryżu. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że metoda ISSR jest konkurencyjna w stosunku do SSR.

Osiem wykorzystanych w badaniach starterów inicjowało syntezę 15 produktów specyficznych wyłącznie dla pojedynczych genotypów. Obecność 3 produktów specyficznych stwierdzono u genotypu CN 24397 (GRU), zaś po 2 takie produkty były

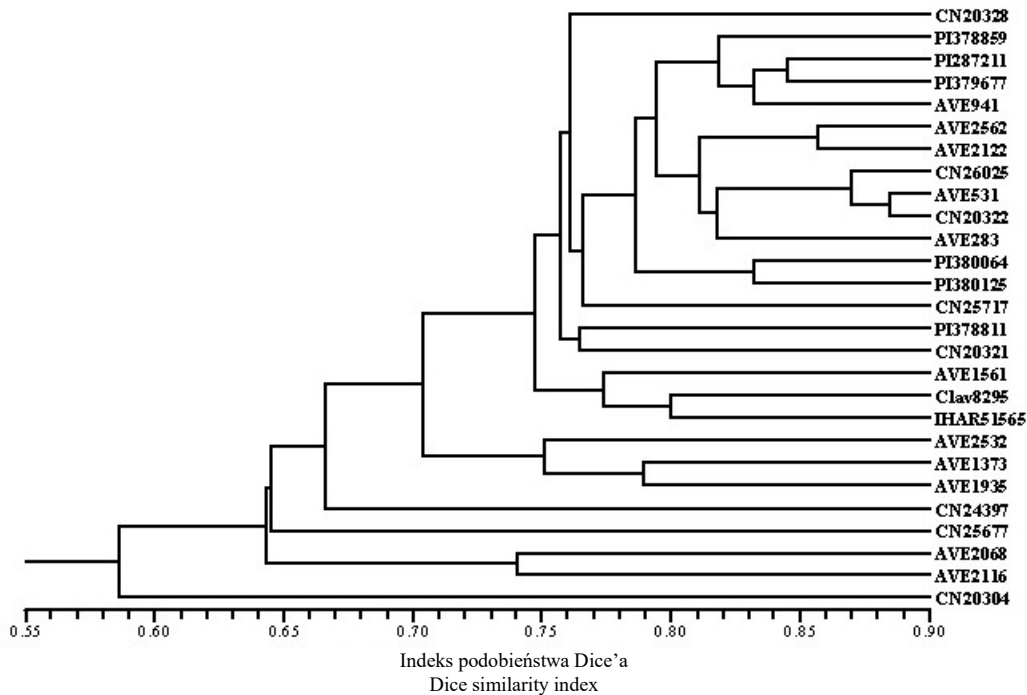
amplifikowane u PI 378811 (ISR), AVE 1561 (CYP) oraz CN 20304 (SYR). Wymienione genotypy posiadają więc unikalne sekwencje DNA nieobecne u pozostałych form. Wskazuje to na ich odmienność od reszty badanych genotypów.

Graham i wsp. (1996) wyniki oceny genetycznego pokrewieństwa 8 odmian truskawki uzyskane za pomocą metody RAPD przedstawili w postaci matrycy prążków. Matryca ta została utworzona z profili fragmentów DNA amplifikowanych w obecności poszczególnych starterów dla każdego z genotypów. Profile zebrane razem stworzyły swoisty fingerprint każdej z badanych odmian i umożliwiły właściwą i wiarygodną identyfikację. W niniejszej pracy polimorfizm markerów ISSR badanych genotypów *A. sterilis* również zapisano w postaci profili, a następnie złożono w matrycę prążków. Pojedynczy starter inicjował amplifikację produktów, które tworzyły od 9 (SR-6) do 22 (SR-11) odmiennych profili, w tym od 5 do 18 specyficznych wyłącznie dla jednego genotypu (tab. 2). Zidentyfikowano w sumie 174 profile, z których 126 było specyficznych. Średnio na każdy genotyp przypadało 4,7 profili specyficznych. Najwięcej, bo aż 9 profili specyficznych stwierdzono dla CN 25677 (PRT) oraz CN 20304 (SYR). Siedem takich profili pojawiło się u CN 24397 (GRU) oraz AVE 1561 (CYP). Genotypy te można więc uznać za najbardziej odmienne od pozostałych. Najmniej profili specyficznych, jedynie po 2, stwierdzono u genotypów: PI 378811 (ISR), AVE 531 (ITA) oraz Clav 8295 (ISR). Na tej podstawie można wnioskować, że wymienione genotypy są bardzo podobne do reszty analizowanych form.

Heun i wsp. (1994) stwierdzili, że odróżnienie wszystkich badanych form *A. sterilis* było możliwe na podstawie specyficznych profili markerów RAPD otrzymanych dla 21 starterów oraz izoenzymów uzyskanych dla 29 systemów enzymatycznych. W prezentowanych badaniach analiza profili wykazała, że pojedynczy starter ISSR nie umożliwia identyfikacji wszystkich badanych genotypów. Jednakże zastosowanie tylko jednej z 18 (na 45 możliwych) kombinacji par starterów pozwala na identyfikację każdego z badanych genotypów.

Na podstawie polimorfizmu markerów ISSR określono podobieństwo genetyczne (SI) pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów zgodnie z formułą Dice'a. Podobieństwo genetyczne analizowanych genotypów wahało się od 0,512 pomiędzy AVE 2532 i AVE 2116 do 0,878 pomiędzy CN 26025 i AVE 531, a średnio wynosiło 0,715. Przyjmuje się, że im mniejsze podobieństwo genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi, tym większe możliwości uzyskania mieszańców o bardziej korzystnych właściwościach (Cox i Murphy, 1990). Wartości współczynników podobieństwa genetycznego świadczą o dużym zróżnicowaniu genotypów *A. sterilis* przeznaczonych do krzyżowań i pozwalają przypuszczać, że prowadzone krzyżowania znacznie poszerzą pulę genetyczną wykorzystywaną w hodowli nowych odmian owsa zwyczajnego.

W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA. Na dendrogramie (rys. 1.) wyodrębniono jedną główną grupę skupień obejmującą 12 obiektów oraz 4 mniejsze. Grupa główna obejmuje 3 podgrupy, z których dwie skupiają wyłącznie genotypy z Izraela, charakteryzujące się najmniejszym zróżnicowaniem genetycznym. Kilka genotypów nie tworzy skupienia z żadną z wymienionych grup.



Rys. 1. Dendrogram genotypów *A. sterilis* L. uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery ISSR
 Fig. 1. UPGMA dendrogram of the *A. sterilis* L. genotypes based on the ISSR markers

Na obrzeżach dendrogramu znajduje się genotyp CN 20303 pochodzący z Syrii, sprawdzony z banku genów w Saskatoon. Charakteryzuje się on najmniejszym spośród badanych form podobieństwem genetycznym do wszystkich pozostałych genotypów. Fu i wsp. (2007) zaobserwowali, że największym zróżnicowaniem genetycznym charakteryzowały się genotypy skolekcjonowane w Grecji, Liberii i Włoszech, podczas gdy formy z Egiptu, Gruzji, Etiopii, Gibraltaru i Kenii były najbardziej odmienne od form pochodzących z innych krajów. Autorzy nie zaobserwowali wspólnej klasteryzacji obiektów pochodzących z tych samych rejonów geograficznych. Goffreda i wsp. (1992) wykazali, że genotypy *A. sterilis* pochodzące z regionu Iran-Irak odbiegają od pozostałych form i charakteryzują się stosunkowo dużym zróżnicowaniem. Autorzy stwierdzili również, że genotypy z innych krajów, między innymi z Syrii i Izraela, grupowały się razem i cechowało je największe wzajemne podobieństwo. W badaniach własnych także zaobserwowano, że genotypy z Izraela charakteryzują się wysokim podobieństwem genetycznym.

WNIOSKI

1. Wartości współczynników podobieństwa genetycznego określone na podstawie polimorfizmu markerów ISSR, świadczą o dużym zróżnicowaniu genotypów *Avena sterilis* L. przeznaczonych do krzyżowań. Na podstawie uzyskanych wyników za

genotypy najbardziej odmienne od pozostałych można uznać: CN 25677 (PRT), CN 20304 (SYR) i CN 24397 (GRU).

2. Metoda ISSR jest wysoce efektywna, identyfikuje wysoki polimorfizm i może być z powodzeniem stosowana do oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie *Avena sterilis* L.

LITERATURA

- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Kowalczyk K., Miazga D., Kruk K. 2006. Mieszzańce międzygatunkowe owsa. W: Mieszzańce oddalone roślin uprawnych. Sodkiewicz W., Sodkiewicz T., Surma M. (red.). IGR PAN Poznań: 49 — 62.
- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Miazga D. 2004. Charakterystyka cytologiczna i molekularna niektórych gatunków z rodzaju *Avena* W: Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. Red. P. Krajewski, Z. Zwierzykowski, P. Kachlicki. IGR PAN Poznań: 67 — 74.
- Cox T. S., Murphy J. P. 1990. The effect of parental divergence on F₂ heterosis in winter wheat crosses. *Theor. Appl. Genet.* 79: 241 — 250.
- De Souza V. Q., Pereira A. Da S., Kopp M. M., Coimbra J. L. M., De Carvalho F. I. F., Da Luz V. K., De Oliveira A. C. 2005. Genetic dissimilarity in oat (*Avena sativa* L.) tolerant and sensitive mutants to organic acids. *Bragantia* 64: 569 — 575.
- Frey K. J. 1986. Genetic resources and their use in oat breeding. In: Proc. of the 2nd Int. Oat Conf. 1985. Lawes D. A., Thomas H. (red.). Aberystwyth, UK: 9 — 15.
- Fu Y.-B., Chong J., Fetch T., Wang M.-L. 2007. Microsatellite variation in *Avena sterilis* oat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1029 — 1038.
- Goffreda J. C., Barnquist W. B., Beer S. C., Tanksley S. D., Sorrels M. E. 1992. Application of molecular markers to assess genetic relationships among accessions of wild oat, *Avena sterilis*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 146 — 151.
- Graham J., McNicol R. J., McNicol J. W. 1996. A comparison of methods for estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 402 — 406.
- Heun M., Murphy J. P., Phillips T. D. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.* 87: 689 — 696.
- 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.* 93: 869 — 876.
- Martens J. W., McKenzie R. I. H., Harder D. E. 1980. Resistance to *Puccinia graminis avenae* and *P. coronata avenae* in the wild and cultivated *Avena* populations of Iran, Iraq, and Turkey. *Can. J. Genet. Cytol.* 22: 641 — 649.
- Milligan B. G. 1992. Plant DNA isolation. In: Molecular analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK: 59 — 88.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269 — 5273.
- Paczos-Grzęda E., Chrząstek M., Miazga D., Wacko S. 2006. Analiza molekularna mieszańców *Avena sativa* L. × *A. maroccana* Gdgr oraz *A. sativa* L. × *A. murphyi* Ladiz. W: Mieszzańce oddalone roślin uprawnych. Sodkiewicz W., Sodkiewicz T., Surma M. (red.), IGR PAN Poznań: 135 — 141.
- Paczos-Grzęda E. 2007. Wykorzystanie metod ISSR i RAPD oraz analizy rodowodów do oceny podobieństwa międzyodmianowego *Avena sativa* L. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 517: 547 — 558.
- Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplik 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.
- Phillips T. D., Murphy J. P., Goodman M. M. 1993. Isozyme variation in germplasm accessions of the wild oat *Avena sterilis* L. *Theor. Appl. Genet.* 86 (1): 54 — 64.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225 — 238.

- Predeep-Reddy M., Salara N., Siddiq E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9 — 17.
- Rivoal R., Cook R. 1993. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. In: K. Evans and J. M. Webster (ed.). CAB International, Wallingford, UK: 259 — 303.
- Rohlf F.J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Somody C. N., Nalewaja J. D., Miller S. D. 1984. Wild oat (*Avena fatua*) and *Avena sterilis* morphological characteristic and response to herbicides. *Weed. Sci.* 32: 353 — 359.
- Spada A., Mantegazza R., Biloni M., Caporali E., Sala F. 2004. Italian rice varieties: historical data, molecular markers and pedigrees to reveal their genetic relationships. *Plant Breeding* 123: 105 — 111.
- Takeda, K., Frey, K. J. 1977. Growth rate inheritance and association with other traits in backcross populations of *Avena sterilis* × *A. sativa*. *Euphytica* 26: 309 — 317.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Laurila J., Schulman A. H., Manninen O., Kiviharju E. 2006. Generation of SNP markers for short straw in oat (*Avena sativa* L.). *Genome* 49: 282 — 287.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Schulman A. H., Kiviharju E. 2008. The first doubled haploid linkage map for cultivated oat. *Genome* 51 (8): 560 — 569.
- Thro A. M., Frey K. J. 1985. Inheritance of groat — oil content and high-oil selection in oats (*Avena sativa* L.). *Euphytica* 34: 251 — 263.
- Zhou X., Jellen E.N., Murphy J.P. 1999. Progenitor germplasm of domesticated hexaploid oat. *Crop Sci.* 39: 1208 — 1214.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176 — 183.