

ZBIGNIEW BRODA
AGNIESZKA DOBRZYCKA
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Akademii Rolniczej w Poznaniu

Badanie samoniezgodności oraz podobieństwa genetycznego zróżnicowanych genotypowo form lucerny (*Medicago sativa* L.)

The study of self-incompatibility and genetic similarity of genetically differentiated forms of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Celem pracy było określenie podobieństwa genetycznego 16 zróżnicowanych populacji lucerny za pomocą markerów molekularnych RAPD — PCR oraz ocena stopnia ich samoniezgodności. Badane obiekty utworzyły cztery grupy podobieństwa genetycznego, które wynosiło od 42% do 75%. Populacje o podobnym stopniu samoniezgodności nie znalazły się w tej samej grupie podobieństwa genetycznego. W celu zbadania samoniezgodności obserwowano wnikanie łagiewek pyłkowych do zalążni przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Na tej podstawie wyróżniono 4 populacje o wysokiej samoniezgodności (populacja Syn 7-3, linia F, mieszaniec F × B₁₀, mutant 'tf') i 5 populacji o niskiej samoniezgodności (populacja Syn 9-3, linia B₁₀, mieszaniec B₁₀ × F, odmiana Ulstar i mutant 'lp').

Słowa kluczowe: lucerna, samoniezgodność, markery RAPD, podobieństwo genetyczne

The study purpose was to analyse genetic similarity between 16 populations of alfalfa using RAPD molecular markers and to describe their self-incompatibility. The examined objects formed four groups of genetical similarity, which ranged from 42% to 75%. The populations with similar level of self-incompatibility were not in the same group of genetical similarity. To study the self-incompatibility effects, penetration of pollen tubes into the ovaries was observed with the use of fluorescence microscope. According to this, four populations with high self-incompatibility (population Syn 7-3, line F, hybrid F × B₁₀, mutant 'tf') and five populations with low self-incompatibility (population Syn 9-3, line B₁₀, hybrid B₁₀ × F, Ulstar and mutant 'lp') were distinguished.

Key words: alfalfa, self-incompatibility, RAPD markers, genetic similarity

WSTĘP

Lucerna jest jedną z bardziej cenionych wieloletnich roślin pastewnych, dostarczającą bardzo dużą ilość suchej i zielonej masy z hektara. Zielona masa z lucerny cechuje się wysoką zawartością składników pokarmowych, w tym białka, które odznacza się ponadto

bardzo korzystnym składem aminokwasowym. Wysoka wartość białka zawartego w lucernie daje powody, aby rozpatrywać ją jako bardzo ważny element przy produkcji pasz. Powierzchnia uprawy lucerny w Polsce ulega, w zależności od roku, dość znacznym wahaniom. Przeszkodą ku szerszemu rozpowszechnieniu upraw lucerny jest brak nasion. Szacuje się, że zaledwie 5% zapotrzebowania na nasiona pokrywa produkcja krajowa, pozostałe 95% pochodzi z importu. Z tego względu poszukiwania genotypów i odmian o dobrym wiązaniu nasion wydają się uzasadnione.

Plon nasion u lucerny zależy w znacznym stopniu od warunków klimatycznych. Bardzo duży wpływ ma zwłaszcza temperatura i czas nasłonecznienia oraz suma opadów w okresie kwitnienia, wiązania i dojrzewania strąków. W niekorzystnych warunkach klimatycznych obserwować można wzrost liczby samozapylen kwiatów, co może spowodować mniejszą liczbę zawiązywanych nasion (Bodzon, 2005). Stopień samozgodności, a za tym frekwencja samozapylen uwarunkowana jest również właściwościami danego genotypu.

W niniejszej pracy zbadano samoniezgodność 16 zróżnicowanych populacji lucerny oraz określono ich podobieństwo genetyczne przy użyciu markerów molekularnych RAPD. Przeprowadzone badania miały na celu również sprawdzenie, czy genotypy o podobnym stopniu samoniezgodności znajdują się w tej samej grupie podobieństwa genetycznego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny stanowiło 16 populacji lucerny siewnej (*Medicago sativa* L. sl.), pochodzące ze zbiorów Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu. Obiektami badań były:

- 2 ekotypy (27, 212);
- 4 odmiany (Radius, Du Puits, Sitel, Vernal);
- 2 populacje syntetyczne (Syn 9-3, Syn 7-3);
- 2 linie wsobne, pokolenie wsobne S5 (B₁₀, F);
- 2 mieszańce pojedyncze (B₁₀ x F, F x B₁₀);
- 3 mutanty: 'lp' - długogroniasty, 'br' - wiechowaty, 'tf' – samokończący;
- odmiana Ulstar – długogroniasta odmiana syntetyczna, wyhodowana przy udziale mutantu 'lp'.

Każdy z badanych obiektów reprezentowany był przez 10 roślin, rosnących w warunkach szklarniowych. Do obserwacji wzrostu łagiewek pyłkowych pobierano kwiaty, na których dokonywano zapylenia pyłkiem innej rośliny pochodzącej z tego samego obiektu (zapylenie siostrzane). Zapylenia te powtarzano 6 razy dla każdego z czterech wariantów czasowych (4, 8, 24 i 48 godzin). Kwiaty po zapyłaniu utrwalano w utrwalaczu przygotowanym z alkoholu etylowego, chloroformu i kwasu octowego (6:3:1). Następnie wypreparowano słupki z kwiatów, macerowano je w NaOH, a następnie barwiono błękitem anilinowym i zamykano preparaty gliceryną. Obserwacje prowadzono przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Na obserwowanych preparatach liczono

liczbę łagiewek na znamieniu słupka (czyli liczbę kiełkujących ziaren pyłku), liczbę łagiewek w szyjce słupka, w załączni oraz liczbę łagiewek wnikających do załączków.

Otrzymywanie markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Genomowy DNA z badanych genotypów lucerny izolowano zmodyfikowaną metodą Thompsona i Henry'ego (1995). Dyski liściowe o powierzchni 2 mm² traktowano 200 μl buforu TPS o składzie: 100 mM Tris HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA. Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut.

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5 μl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1 M Tris HCl o pH 8,3; 25 mM MgCl₂; BSA; 2 mM dNTP; starter — 5 pmoli/μl; Taq polimeraza — 5 U/μl, ekstrakt DNA — 25 ng/μl. Taq polimeraza pochodziła z firmy MBI-Fermentas, pozostałe odczynniki pochodziły z firmy SIGMA.

Amplifikację DNA przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 Biometra firmy Polygen. Po wyjęciu prób z termocyklera do każdej z nich dodano 1 μl barwnika (błękit bromofenolowy; sacharoza; woda dejonizowana)

Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym o składzie: 1,5 g agarozy; 100 ml buforu TBE1 × (10,8 g Tris base; 5,5 g kwas borowy; 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0); 1 μl bromku etydyny.

Analiza umożliwiająca określenie podobieństwa pomiędzy badanymi populacjami lucerny w formie dendrogramu została sporządzona przy użyciu programu komputerowego UVIMAP wykorzystującego funkcję Nei i Li (1979).

$$GS = \frac{2nxy}{(nx + ny)},$$

gdzie:

2 *nxy* = liczba prążków w obu genotypach,

nx i *ny* to liczba prążków charakterystycznych dla danego genotypu,

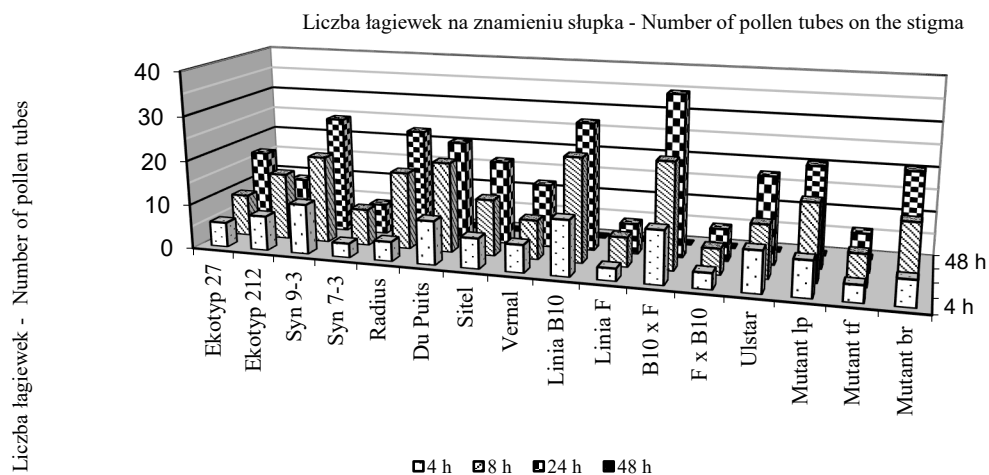
wartość *GS* jest indeksem podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami.

WYNIKI

Przeprowadzone obserwacje łagiewek pyłkowych wykazały, że ich kiełkowanie na znamieniu następuje już po 4 godzinach od momentu zapylenia. Po 8 godzinach w większości przypadków obserwowano łagiewki w szyjce, a u niektórych obiektów w załączni. Wnikanie łagiewek do załączków następowało przeważnie po 24 godzinach. Liczenie łagiewek na znamieniu po 48 godzinach było dość utrudnione, gdyż po takim czasie fluoryzują one na znamieniu bardzo słabo, podczas gdy w głębszych partiach słupka są dobrze widoczne.

Liczba kiełkujących łagiewek obserwowanych na znamieniu słupka zmieniała się w zależności od czasu, jaki minął od zapylenia. W preparatach przygotowanych ze słupków utrwalanych po 4 godzinach od zapylenia liczba łagiewek była niewielka, wahała się od 2,8 sztuk u linii F do 12,4 sztuk u linii B₁₀ (rys. 1). Po 8 godzinach od zapylenia

największą liczbę łagiewek obserwowano u linii B₁₀ (23,4) oraz u mieszańca B₁₀ × F (23,8). Największą liczbę kiełkujących ziaren pyłku obserwowano po 24 godzinach od zapylenia wahała się ona od 36,2 u mieszańca B₁₀ × F do 6,8 u populacji Syn 7-3 oraz linii F.

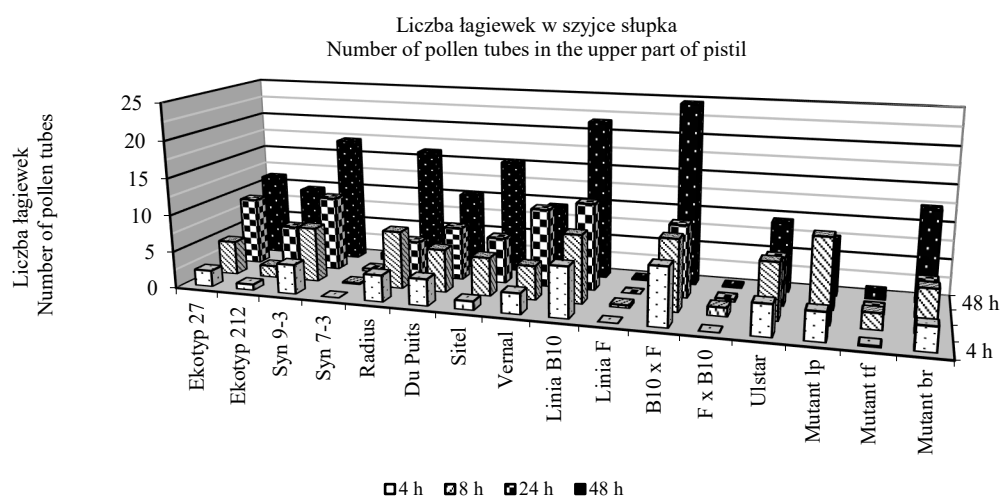


Rys. 1. Liczba łagiewek na znamieniu słupka (liczba kiełkujących ziaren pyłku) obserwowanych w różnych odstępach czasowych od momentu zapylenia

Fig. 1. Number of pollen tubes on the stigma (number of germinating pollen grains) observed after different time periods from the pollination

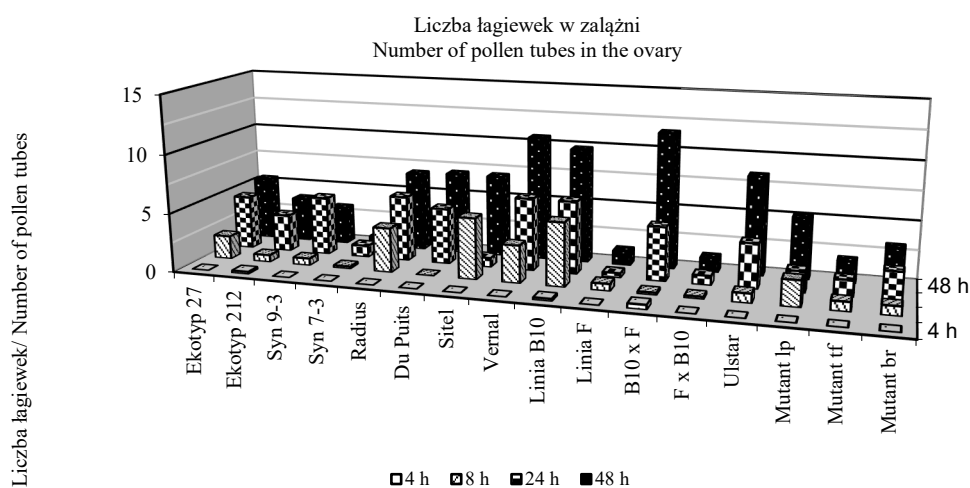
Liczba łagiewek w szyjce słupka była najniższa w preparatach sporządzonych po 4 godzinach od zapylenia — w populacji Syn 7-3, linii F i mieszańca F × B₁₀ nie zaobserwowano ich w ogóle, najwięcej pojawiło się u mieszańca B₁₀ × F — 7,8 (rys. 2). Po 8 godzinach ich liczba była wyższa — od 0,2 u populacji Syn 7-3 do 11,2 u mutantu 'lp'. Po 24 godzinach najmniejszą liczbę łagiewek obserwowano u linii F — 0,2, największą u linii B₁₀ — 11,8. Największą liczbę łagiewek w szyjce słupka obserwowano po 48 godzinach; wahała się ona od 0,2 u linii F i mieszańca F × B₁₀ do 24,6 u mieszańca B₁₀ × F.

Liczba łagiewek w zalążni obserwowana w preparatach przygotowanych ze słupków utrwalanych po 4 godzinach od zapylenia była niska — u większości obiektów nie zaobserwowano ich w ogóle, oprócz linii B₁₀ (0,2) oraz mieszańca B₁₀ × F (0,4) (rys. 3). Po 8 godzinach od zapylenia u odmiany Du Puits nie zaobserwowano łagiewek w zalążni, natomiast największa ich liczba była u linii B₁₀ — 5,4. Po 24 godzinach liczba łagiewek wnikających do zalążni wynosiła od 0,4 u linii F do 11,8 u linii B₁₀. Najwięcej łagiewek w zalążni obserwowano po 48 godzinach od zapylenia. Liczba ta wahała się od 0,8 u populacji Syn 7-3 do 11,6 u mieszańca B₁₀ × F.



Rys. 2. Liczba łagiewek w szyjce słupka obserwowanych w różnych odstępach czasowych od momentu zapylenia

Fig. 2. Number of pollen tubes in the upper part of pistil after different time periods from the pollination

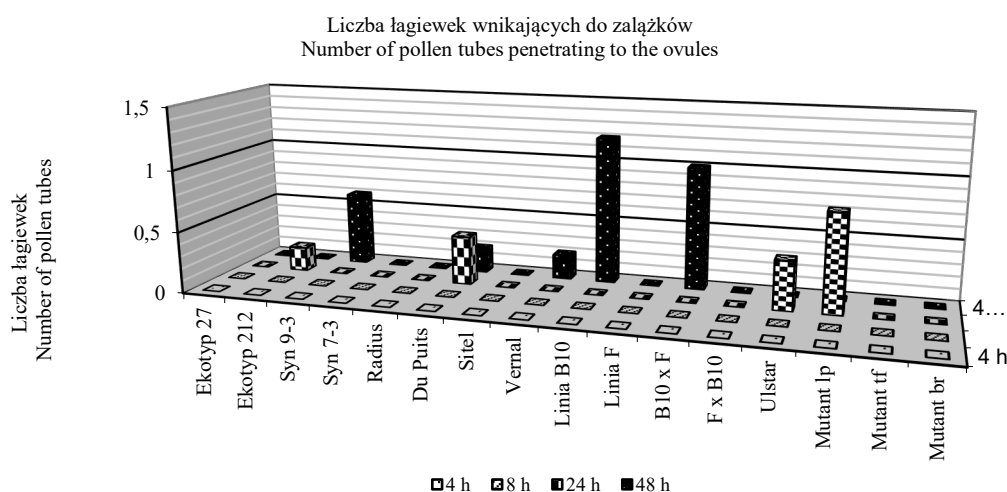


Rys. 3. Liczba łagiewek w zalążni obserwowanych w różnych odstępach czasowych od momentu zapylenia

Fig. 3. Number of pollen tubes in the ovary after different time periods from the pollination

W preparatach przygotowanych ze słupków utrwalanych po 4 i 8 godzinach od zapylenia w ogóle nie obserwowano wnikania łagiewek do zalążków (rys. 4). Pojedyncze wnikające łagiewki zaobserwowano po 24 (ekotyp 212, odmiana Du Puits, odmiana Ulstar

oraz mutant 'lp') oraz 48 godzinach (populacja Syn 7-3, odmiana Du Puits, linia B₁₀ oraz mieszańce B₁₀ × F).



Rys. 4. Liczba łagiewek wnikających do zalążków obserwowanych w różnych odstępach czasowych od momentu zapylecia

Fig. 4. Number of pollen tubes penetrating to the ovules after different time periods from the pollination

Spośród badanych obiektów cztery wykazały duży stopień samoniezdności: populacja syntetyczna Syn 7-3, linia F, mieszaniec F × B₁₀, mutant 'tf'. W przypadku tych obiektów obserwowano nieliczne (od 2 do 8) ziarna pyłku kiełkujące na znamieniu słupka (rys. 1). W zalążni obserwowano pojedyncze łagiewki (najwięcej 0,8), które z reguły nie wnikały do zalążków (rys. 4).

Niższym niż inne obiekty stopniem samoniezdności charakteryzowały się populacja syntetyczna Syn 9-3, linia B₁₀, mieszaniec B₁₀ × F, odmiana Ulstar i mutant 'lp'. W przypadku tych obiektów łagiewki kiełkujące na znamieniu były bardzo liczne — średnio od 10 do 30 (rys. 1). Dużą ilość łagiewek obserwowano również w szyjce słupka oraz w zalążni, miały one postać szerokiej wiązki. Po 24 lub 48 godzinach dało się zaobserwować wnikanie pojedynczych łagiewek do zalążków (rys. 4). W przypadku, gdy obserwowano wnikanie łagiewek do zalążków, kierowały się one przeważnie do środkowych zalążków.

Spośród 85 testowanych starterów oligonukleotydowych, 10 generowało wysoki polimorfizm (90 prążków polimorficznych), który pozwolił na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi genotypami lucerny. Startery oraz ich sekwencje nukleotydowe ujawniające polimorfizm zamieszczono w tabeli 1.

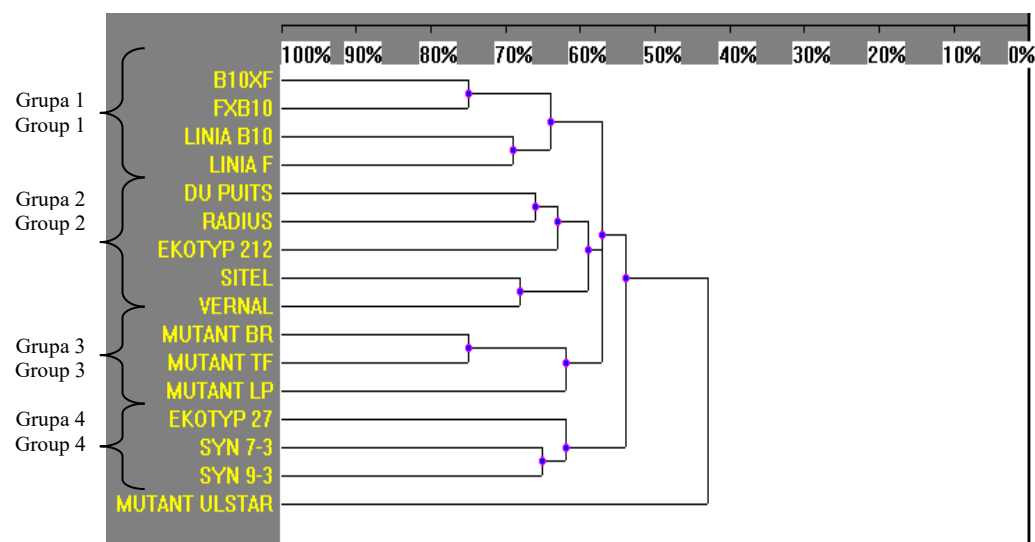
Analiza dendrogramu (rys. 5) wykreślonego na podstawie indeksu podobieństwa pozwoliła na określenie dystansu genetycznego pomiędzy badanymi genotypami lucerny. Utworzyły one cztery grupy podobieństwa genetycznego.

W pierwszej grupie podobieństwa znalazły się linia B₁₀, linia F oraz dwa mieszańce: F × B₁₀ i B₁₀ × F. Podobieństwo genetyczne pomiędzy tymi obiektami wahało się od 65% do 75%. Grupę drugą utworzyły odmiany Du Puits, Radius, Sitel, Vernal oraz ekotyp 212, pomiędzy którymi podobieństwo wahało się od 58% do 68%. Grupę trzecią utworzyły mutanty *br*, *tf* oraz *lp*, wykazujące podobieństwo w granicach 62%–75%. W grupie czwartej znalazły się dwie populacje syntetyczne — Syn 9-3 i Syn 7-3 oraz ekotyp 27. Najmniejsze podobieństwo genetyczne do wszystkich badanych obiektów wykazywała odmiana Ulstar wyhodowana przy udziale mutanta '*lp*' — wynosiło ono 42% (rys. 5).

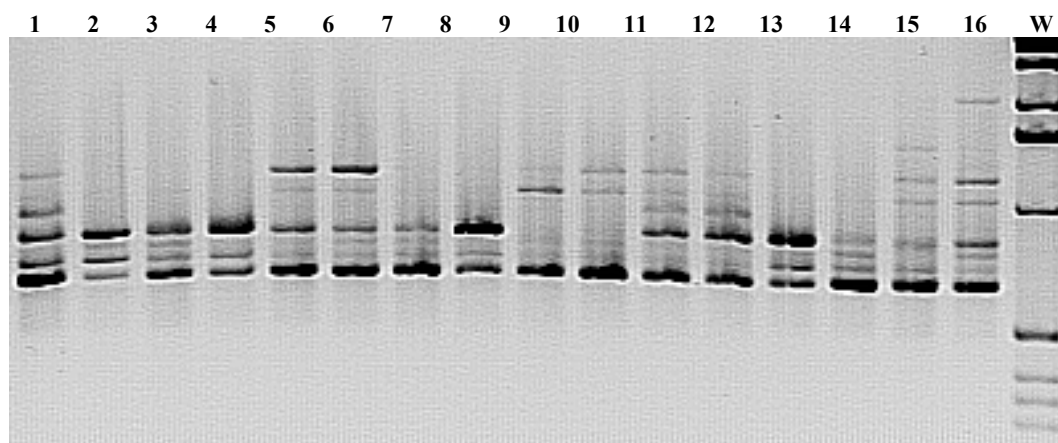
Tabela 1

Startery i ich sekwencje nukleotydowe ujawniające polimorfizm
Sequences of primers detecting polymorphism

NUMER STARTERA PRIMER NO.	SEKWENCJA NUKLEOTYDOWA 5'-3' SEQUENCES 5'-3' OF PRIMERS
OPA 01	CAGGCCCTTC
OPA 03	AGTCAGCCAC
OPA 04	AATCGGGCTG
OPA 07	GAAACGGGTG
OPB 07	GGTGACGCAG
OPC 08	TGGACCGGTG
OPC 18	TGAGTGGGTG
OPE 14	TGCGGCTGAG
OPI 02	GGAGGAGAGG
OPJ 20	AAGCGGCCTC



Rys. 5. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi obiektami
Fig. 5. Dendrogram of similarity between the examined objects



Kolejność ścieżek odpowiada następującym genotypom: Paths in order respond to the following genotypes:
 1. Ekotyp 27, 2. Ekotyp 212, 3. Du Puits, 4. Radius, 5. Sitel, 6. Vernal, 7. Syn 7-3, 8. Syn 9-3, 9. Linia B₁₀, 10. Linia F, 11. Mieszaniec F × B₁₀, 12. Mieszaniec B₁₀ × F, 13. Mutant 'br', 14. Mutant 'lf', 15. Mutant 'lp', 16. Odmiana Ulstar, W – wzorzec – standard IKB DNA ladder

Rys. 6. Elektroforogram polimorfizmu produktów amplifikacji DNA wykonany techniką RAPD — PCR z zastosowaniem startera OPC 08 o sekwencji: 5' TGGACCGGTG 3'

Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments obtained by RAPD amplification with the primer OPC 08 with sequence 5' TGGACCGGTG 3'

DYSKUSJA

Lucerna jest to jedna z najcenniejszych roślin pastewnych, która przy odpowiednim użytkowaniu przez 3–4 lata daje 15–25% więcej paszy o większej zawartości białka niż koniczyny. Z tego względu może być wykorzystywana do bezpośredniego skarmiania, wysuszenia lub zakiszenia, lub też przy produkcji pasz. Niestety, niski plon nasion otrzymywany w naszych warunkach klimatycznych stoi na przeszkodzie szerokiej uprawie tego gatunku. U lucerny wpływ warunków pogodowych na ilość zawiązywanych nasion jest bardzo silny. Średnia ilość nasion w strąku oraz masa tysiąca nasion może wahać się w zależności od ilości opadów w danym roku — jednak o ile liczba nasion w strąku spada przy większej ilości opadów, to na masę tysiąca nasion wpływa to dodatnio (Iannucci i in., 2002). Niskie temperatury i duża liczba dni deszczowych w okresie kwitnienia powodują nierównomierne i wydłużone kwitnienie roślin, a także ograniczają aktywność owadów zapylających. Może to powodować wzrost liczby samozapyleń. Rośliny wyrosłe z nasion pochodzących z samozapylecia charakteryzują się obniżonym wigorem i zmniejszoną produktywnością nasienną, co może prowadzić do systematycznego spadku plonu nasion w dalszych pokoleniach (Bodzon, 2005). Z tego względu wydaje się, iż dla potrzeb hodowli korzystniejsze byłyby genotypy o wysokim stopniu samoniezgodności, które po panmiktycznym przekrzyżowaniu wykazywałyby wigor mieszańcowy w wiązaniu nasion tak ważnym w reprodukcji lucerny.

Do analizy samoniezgodności badanych genotypów lucerny wykorzystano metodę obserwacji wzrostu łagiewek pyłkowych *in vivo* przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Metoda ta była od dawna wykorzystywana do obserwacji łagiewek pyłkowych u innych gatunków roślin (Kho i Bayer, 1968; Romanna, 1973; Gates i Ockendon, 1975). W przypadku lucerny problem metodyczny stanowi fakt, iż znamię, szyjka i załącznia są w różnym stopniu podatne na macerowanie. Ważne jest więc odpowiednie dobranie stężenia środka macerującego jak i czasu oraz temperatury maceracji. Prace mające na celu dostosowanie dla lucerny metodyki analizy kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych w warunkach *in vivo* przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego przeprowadzili w roku 1979 Wojciechowski i Dyba. Wśród badanych odmian lucerny zaobserwowali oni wnikanie pojedynczych łagiewek do załączków po 24 godzinach. W wyniku obserwacji przeprowadzonych w niniejszej pracy stwierdzono, że łagiewki pojawiały się w szyjce słupka po ok. 8 godzinach, natomiast ich wnikanie do załączków obserwowano w nielicznych przypadkach po 24 oraz 48 godzinach.

Pomimo wysokiej wrażliwości lucerny na warunki pogodowe w okresie kwitnienia, wpływ genotypu na zdolność do wiązania nasion jest również bardzo istotny (Julier i in., 1995). Z tego względu przeprowadzono charakterystykę podobieństwa genetycznego badanych populacji przy pomocy markerów RAPD. Metoda ta wykorzystuje kilku- lub kilkunastonukleotydowe startery do amplifikacji losowo rozproszonych po genomie odcinków DNA. Technika ta jest wykorzystywana między innymi do: określenia pochodzenia materiałów mieszańcowych, identyfikacji odmian hodowlanych (Hu i Quiros, 1991), oceny dystansu genetycznego (Marilla i Scoles, 1996), badania polimorfizmu wewnątrzgatunkowego i międzygatunkowego u wielu gatunków (Brown i in., 1993), identyfikacji markerów sprzężonych z genami warunkującymi korzystne cechy ilościowe (Waugh i Powell, 1992).

Przy testowaniu lucerny markerami RAPD ich zmienność wewnątrz populacji jest zwykle bardzo wysoka. Prawdopodobnie wynika to z obcopylności tego gatunku oraz tego, iż lucerna jest w większości tetraploidalna (Crochemore i in., 1996). Markery RAPD generują niską liczbę prążków polimorficznych, co może wpływać na dokładność otrzymanych wyników. Yu i Pauls (1993a) studiowali zależności genetyczne między odmianami lucerny z użyciem 10 starterów; startery te generowały średnio po 5 produktów. Podobną średnią ilość produktów otrzymano przeprowadzając badania do tej pracy; ich liczba wynosiła od 3 do 8 produktów, co przedstawiono na rysunku 6.

Markery molekularne RAPD pozwoliły na wyodrębnienie czterech grup podobieństwa genetycznego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badane populacje o podobnym stopniu samoniezgodności nie stanowią tej samej grupy podobieństwa genetycznego, lecz wchodzi w skład innych grup wyznaczonych przy pomocy markerów RAPD. Prawdopodobnie wynika to z niezależnej segregacji i rekombinacji alleli samoniezgodności.

WNIOSKI

1. Na podstawie obserwacji łagiewek pyłkowych wyróżniono 4 populacje o wysokiej samoniezgodności (populacja Syn 7-3, linia F, mieszańiec F × B10, mutant 'tf') i 5 populacji o niskiej samoniezgodności (populacja Syn 9-3, linia B10, mieszańiec B10 × F, odmiana Ulstar i mutant 'lp').
2. Zastosowanie markerów RAPD-PCR pozwoliło na ocenę podobieństwa genetycznego badanych populacji lucerny. Badane obiekty utworzyły cztery grupy podobieństwa genetycznego, które wahało się od 42% do 75%.
3. Populacje o podobnym stopniu samoniezgodności nie znalazły się w tych samych grupach podobieństwa genetycznego.

LITERATURA

- Bodzon Z. 2005. Rośliny motylkowate drobnonasienne w uprawie na nasiona. W: Trawy i rośliny motylkowate drobnonasienne. Pr. zbior., Wydaw. Biznes-Press sp. z o.o., IHAR, Redakcja "Agro Serwis", Warszawa: 81 — 93.
- Brown P. T. H., Lange F. D., Kranz E., Lorz H. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Mol. Gen. Genet.* 235: 157 — 165.
- Crochemore M. L., Huyghe C., Kerlan M. C., Durand F., Julier B. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie* 16: 421 — 432.
- Gates P., Ockendon D. 1975. Seed set and pollen tube growth as a measure of self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Incompatibility Newsletter* 6: 57 — 58.
- Hu J., Quiros C. F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505 — 511.
- Iannucci A., Di Fonzo N., Martinicello P. 2002. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed yield and quality under different forage management systems and irrigation treatments in a Mediterranean environment. *Field Crops Research* 78: 65 — 74.
- Julier B., Porcheron A., Ecalle C., Guy P. 1995. Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 15: 295 — 304.
- Kho Y., Bayer I. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17: 298 — 303.
- Marilla E. F., Scoles G. J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome* 39: 646 — 654.
- Romanna M. 1973. Euparal as a mounting medium for preserving fluorescence of aniline blue in plant material. *Stain Technology* 48: 103 — 105.
- Słomski R. 2001. Przykłady analiz DNA. Pr. zbior.: 158 — 160.
- Thompson D., Henry R. 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19: 394 — 400.
- Waugh R., Powell W. 1992 Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotech.* 10: 186 — 191.
- Weder Jurgen K. P. 2002. Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 35: 504 — 511.
- Wojciechowski A., Dyba S. 1979. Zastosowanie mikroskopu fluorescencyjnego do analizy kiełkowania łagiewek pyłkowych u lucerny (*Medicago media* Pers.). *Hod. Rośl. Nasien.* 2:
- Yu K., Pauls K. P. 1993 a. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86: 788 — 794.