

STEFAN STOJAŁOWSKI
PAWEŁ MILCZARSKI
PIOTR MASOJC

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Przydatność markerów ISSR do identyfikacji linii wsobnych oraz mapowania genomu żyta*

Usefulness of ISSR markers for identification of inbred lines and mapping of rye genome

Celem pracy była ocena przydatności markerów ISSR do identyfikowania linii wsobnych oraz konstruowania map genetycznych żyta. Analizami objęto 16 linii wsobnych oraz liczącą 94 osobniki populację F₂ mieszańca między liniami 544 i Ot0-20. Spośród 57 starterów zawierających sekwencje powtarzalne wybrano 12 generujących wyraźne i powtarzalne produkty amplifikacji. Wybrane startery pozwoliły na ujawnienie 29 polimorficznych fragmentów DNA jednoznacznie różnicujących badane linie wsobne i pozwalających na wstępne oszacowanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy nimi. Utworzony na bazie uzyskanych rezultatów dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy liniami wsobnymi zasadniczo nie wykazuje sprzeczności z danymi rodowodowymi. Spośród ośmiu fragmentów DNA wybranych do oceny w obrębie populacji mapującej sześć wykazywało segregację zgodną z oczekiwaniami dla produktów amplifikowanych w pojedynczym locus. Wyniki analiz segregacji markerów ISSR w populacji mapującej dowodzą, że technika ta może znaleźć zastosowanie przy konstruowaniu map genetycznych żyta, ale jej efektywność będzie raczej niska, porównywalna z techniką RAPD.

Słowa kluczowe: ISSR, markery molekularne, mapowanie genetyczne, żyto

This study was aimed at evaluation of the utility of ISSR markers as a tool for identification of inbred lines and for construction of genetic map of rye. Sixteen rye inbred lines and a mapping population composed of 94 individual F₂ plants from the 544 × Ot0-20 intercross were used for the study. Twelve primers, which generated strong and reproducible amplification products, were selected out of 57 primers tested. The selected primers revealed 29 polymorphic bands which allowed the identification of lines and the estimation of their genetic diversity. A dendrogram developed on the basis of genetic similarities proved to be generally consistent with the pedigree data. Out of eight markers used for the analysis of F₂ intercross population, six showed segregation consistent with 3:1 expectation for a single locus. The presented results of ISSR marker segregation suggest that this PCR-based method should be suitable for construction of rye genetic map. However, its efficiency seems to be comparable with that of RAPD.

* Praca dofinansowana przez Akademię Rolniczą w Szczecinie, temat BW nr 28/2000

Key words: genetic mapping, ISSR, molecular markers, rye

WSTĘP

Markery molekularne, a przede wszystkim markery generowane przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), znajdują w ostatnich latach coraz szersze zastosowanie przy identyfikowaniu materiałów hodowlanych oraz mapowaniu genomów roślin uprawnych. Do najpowszechniej stosowanych metod należy analiza losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD) opracowana przez Williamsa i wsp. (1990). Popularność markerów RAPD wynika ze względnie niskich kosztów analiz oraz możliwości stosowania tej techniki bez znajomości specyficznych sekwencji DNA w genomie analizowanego gatunku. Poważną wadą RAPD są jednak problemy z powtarzalnością wynikające ze stosowania krótkich (przeważnie 10-nukleotydowych) starterów. Ziętkiewicz i wsp. (1994) opracowali system markerowy określany skrótem ISSR (inter simple sequence repeat), którego podstawę stanowi polimorfizm fragmentów DNA występujących pomiędzy prostymi sekwencjami powtórzonymi. Startery ISSR zawierają przeważnie 2–4 nukleotydowy motyw powtarzalny z 1–2 nukleotydową kotwicą selekcyjną na końcu 3' lub 5'. Technika ISSR, posiadając podstawowe zalety RAPD, bazuje jednocześnie na starterach o długości 16–25 nukleotydów, gwarantujących dzięki temu wyraźnie lepszą powtarzalność analiz (Predeep Reddy i in., 2002).

U zbóż technikę ISSR stosowano z powodzeniem do identyfikacji oraz oceny zróżnicowania genetycznego odmian i linii pszenicy (Nagoaka i Ogihara 1997), jęczmienia (Fernandez i in. 2002), kukurydzy (Kantety i in., 1995) i ryżu (Blair i in., 1999; Virk i in., 2000), za każdym razem uzyskując rezultaty zbliżone lub lepsze niż przy stosowaniu markerów RAPD. Istnienie sprzężeń pomiędzy markerami ISSR a genami warunkującymi niektóre cechy użytkowe u roślin uprawnych (Ratnaparkhe i in., 1998; Ammiraju i in., 2001; Cekic i in., 2001) otwiera możliwości wykorzystania tej techniki w pracach hodowlanych. U żyta zastosowano ją jak dotąd jedynie do oceny zróżnicowania genetycznego między formami tolerancyjnymi i nietolerancyjnymi na niedobory N i K w pożywkach stosowanych w kulturach *in vitro* (Smolik i Rzepka-Plevneš, 2003).

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności markerów ISSR do identyfikacji oraz oceny zróżnicowania genetycznego między liniami wsobnymi, jak również próba określenia przydatności tego typu markerów do konstruowania map genetycznych żyta.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano 16 linii wsobnych żyta. Większość z nich pochodziła z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie. Liście trzech linii (S436N, G1M i G135M) użytych do badań otrzymano z firmy hodowlanej DANKO sp. z o.o. Przydatność markerów do mapowania testowano na wyprowadzonej w AR Szczecin populacji F₂ mieszańca międzyliniowego 544 × Ot0-20.

DNA z liści zebranych z linii wsobnych zamrożonych w -70°C izolowano uproszczoną metodą Thomson i Henry'ego (1995) z użyciem buforu ekstrakcyjnego (TPS), a z liści 94 pojedynków tworzących populację mapującą — przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini

Kit firmy QIAGEN. Koncentrację DNA w uzyskanych ekstraktach określano przy użyciu fluorymetru VersaFluor firmy Bio-Rad. DNA izolowane metodą Thomson i Henry'ego (1995) używano bezpośrednio do przygotowywania mieszaniny reakcyjnej PCR, ekstrakty otrzymywane po użyciu zestawu firmy QIAGEN rozcieńczano do finalnego stężenia 15 ng/μl.

Różnice w sposobie izolacji DNA (niższa koncentracja DNA uzyskiwana przy uproszczonej metodzie izolacji, słabsze jego doczyszczenie oraz odmienny skład buforu elucyjnego) wymusiły, dla uzyskania porównywalnych rezultatów analiz, dostosowanie składu mieszaniny reakcyjnej PCR do rodzaju użytego ekstraktu (tab. 1).

Tabela 1

Skład mieszaniny reakcyjnej (o obj. 25μl) do analiz PCR
PCR mixture composition (vol. 25μl)

	Linie wsobne Inbred lines	Populacja mapująca Mapping population
Bufor 10 × PCR z dod. (NH ₄) ₂ SO ₄ (MBI Fermentas)		
10 × PCR buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄ (MBI Fermentas)	0,25 μl	2,5 μl
MgCl ₂	2 mM	3 mM
dNTP mix	100 μM	100 μM
BSA	2,5 μg	2,5 μg
Taq-polimeraza (MBI Fermentas)	1,5 U	1,0 U
Taq-polimerase (MBI Fermentas)		
Starter Primer	35 ng	35 ng
Ekstrakt DNA Template DNA	2-4 ng (TPS)	15 ng (Qiagen)

W badaniach wykorzystano ogółem 57 starterów ISSR o długości od 14 do 19 nukleotydów. Każdy ze starterów posiadał jedno- lub dwunukleotydowe zakończenie selekcyjne poprzedzone dwu- (53 startery), trzy- (3 startery) lub czteronukleotydowym (1 starter) motywem powtarzalnym. Po wstępnej selekcji do bardziej szczegółowych analiz wybrano 12 starterów (tab. 2) generujących powtarzalne i łatwe do identyfikacji w żelach agarozowych, polimorficzne produkty amplifikacji.

Reakcje PCR prowadzone były według następującego profilu:

wstępna denaturacja: 94°C przez 4'00"

35 × (94°C przez 30'; X°C przez 30"; 72°C przez 1'30")

końcowa inkubacja 72°C przez 5',

gdzie X = temperatura o 2°C niższa od temperatury topnienia dla danej sekwencji startera (tab. 2).

Produkty amplifikacji rozdzielano w zawierających bromek etydydny 1,8% żelach agarozowych i wizualizowano w świetle UV.

Współczynniki podobieństwa genetycznego (S_D) między badanymi liniami obliczono według formuły Dice:

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

gdzie:

N_{AB} — liczba prążków wspólnych dla obu porównywanych linii,

N_A — liczba wszystkich prążków dla odmiany A,

N_B — liczba wszystkich prążków dla odmiany B.

Tabela 2

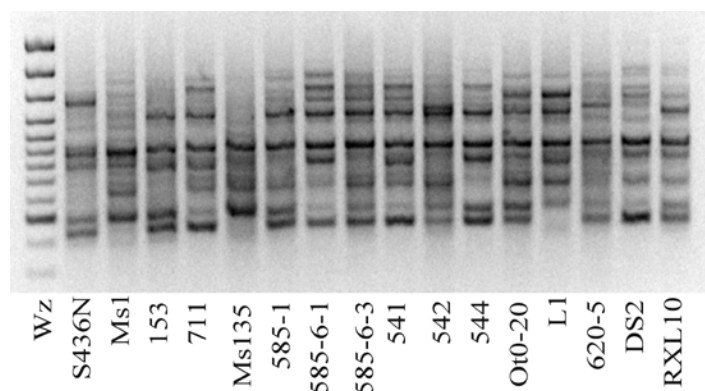
Charakterystyka starterów ISSR użytych w pracy
Characterization of ISSR primers used in the study

Starter Primer	Sekwencja (5'-3') Sequence (5'-3')	Temperatura topnienia (°C) Melting temperature (°C)
is2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAA	56
is3	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	58
is4	GAGAGAGAGAGAGAGAGAT	56
is9	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52
is11	ACACACACACACACT	50
is14	CTCTCTCTCTCTCTA	50
is16	CTCTCTCTCTCTCTT	50
is17	TCTCTCTCTCTCTCA	50
is18	TCTCTCTCTCTCTCC	52
is19	TCTCTCTCTCTCTCG	52
is25	AGAGAGAGAGAGAGAG(CT)C	55
is32	ACACACACACACAC(CT)G	55
is44	TCTCTCTCTCTCTC(GA)C	55

Na podstawie wyliczonych współczynników sporządzono metodą UPGMA dendrogram. Obliczenia współczynnika podobieństwa i wykreślenie dendrogramu przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Molecular Analyst v. 2,0 firmy BioRad. Analizy oparto wyłącznie o markery polimorficzne, w związku z czym ich rezultaty obrazują względne relacje między badanymi liniami, a nie ich faktyczne zróżnicowanie genetyczne. Zgodność segregacji testowanych markerów z wartościami oczekiwanymi dla populacji mapującej pokolenia F_2 określano przy użyciu standardowego testu χ -kwadrat.

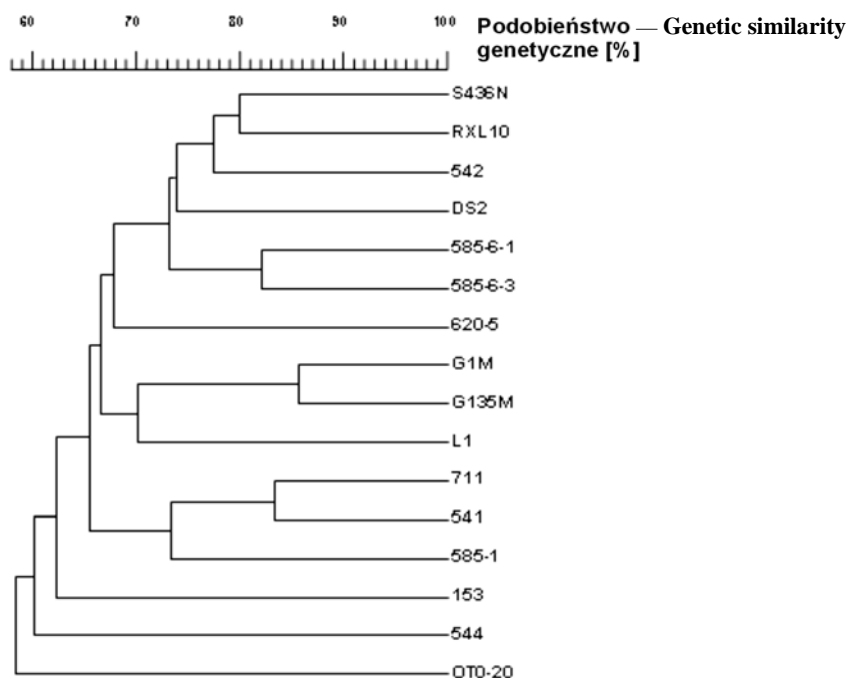
WYNIKI

Startery uznane w trakcie wstępnych analiz za najprzydatniejsze do oceny zróżnicowania genetycznego linii żyta bazują wyłącznie na dwunukleotydowych motywach powtarzalnych (tab. 2). Każdy z tych starterów pozwalał na powielenie od 5 do 16 fragmentów DNA o długościach od 200 do 2000 par zasad. Wśród nich polimorfizm wykazywało od 1 do 6 produktów amplifikacji (rys. 1). W sumie, po zastosowaniu 11 starterów ISSR, uzyskano 29 polimorficznych prążków pozwalających na jednoznaczną identyfikację każdej z analizowanych linii wsobnych oraz umożliwiających obliczenie wartości podobieństwa genetycznego między nimi (tab. 3). Uzyskane wartości podobieństwa były dość zróżnicowane i mieściły się w granicach 0,49-0,86. Stały się one podstawą do wykreślenia dendrogramu, łączącego prawie wszystkie analizowane linie w trzy grupy skupień (rys. 2). Pierwszą grupę tworzą linie o odrębnym pochodzeniu: S426N, RXL10, DS2 oraz spokrewnione ze sobą linie 542, 585-6-1, 585-6-3 i 620-5.



Rys. 1. Polimorfizm fragmentów ISSR uzyskany wśród linii wsobnych żyta, przy zastosowaniu startera is3

Fig. 1. ISSR patterns detected among the inbred lines of rye by means of the is3 primer



Rys. 2. Dendrogram obrazujący podobieństwo genetyczne między liniami wsobnymi żyta otrzymany przy użyciu metody UPGMA

Fig. 2. Dendrogram illustrating genetic similarity between the inbred lines of rye built using the UPGMA method

Tabela 3

Macierz podobieństwa genetycznego linii wsobnych żyta
Matrix of genetic similarity between inbred lines of rye

RXL10	0,80														
542	0,77	0,77													
DS2	0,77	0,71	0,74												
585-6-1	0,63	0,75	0,73	0,67											
585-6-3	0,76	0,76	0,79	0,78	0,82										
620-5	0,73	0,60	0,65	0,71	0,63	0,76									
G1M	0,75	0,63	0,79	0,72	0,59	0,77	0,63								
G135M	0,67	0,61	0,71	0,70	0,57	0,75	0,61	0,86							
L1	0,67	0,67	0,65	0,60	0,58	0,74	0,61	0,68	0,72						
711	0,63	0,63	0,67	0,50	0,59	0,72	0,50	0,65	0,69	0,68					
541	0,65	0,71	0,74	0,63	0,78	0,78	0,59	0,61	0,65	0,70	0,83				
585-1	0,65	0,71	0,69	0,63	0,67	0,74	0,65	0,67	0,59	0,60	0,67	0,80			
153	0,63	0,63	0,67	0,61	0,65	0,67	0,44	0,65	0,69	0,63	0,65	0,67	0,55		
544	0,64	0,64	0,62	0,44	0,73	0,69	0,57	0,53	0,52	0,53	0,67	0,63	0,62	0,60	
Ot0-20	0,60	0,73	0,58	0,65	0,56	0,65	0,47	0,56	0,49	0,61	0,56	0,59	0,71	0,50	0,50
	S436N	RXL10	542	DS2	585-6-1	585-6-3	620-5	G1M	G135M	L1	711	541	585-1	153	544

W skład drugiej grupy wchodzi wyprowadzone w ramach jednego programu hodowlanego linie G1M i G135M oraz odrębna pochodzeniowo linia L1. Trzecia grupa skupień obejmuje trzy, mające częściowo wspólny rodowód, linie oznaczone symbolami 711, 541 i 585-1. Linie z trzeciej grupy skupień są też spokrewnione w mniejszym lub większym stopniu z liniami 542, 585-1 i 585-3 należącymi do grupy pierwszej oraz z dwiema pozostałymi liniami występującymi w dendrogramie: 153 i 544. Największą odrębność od pozostałych analizowanych obiektów wykazuje wyprowadzona z odmiany Otello linia Ot0-20.

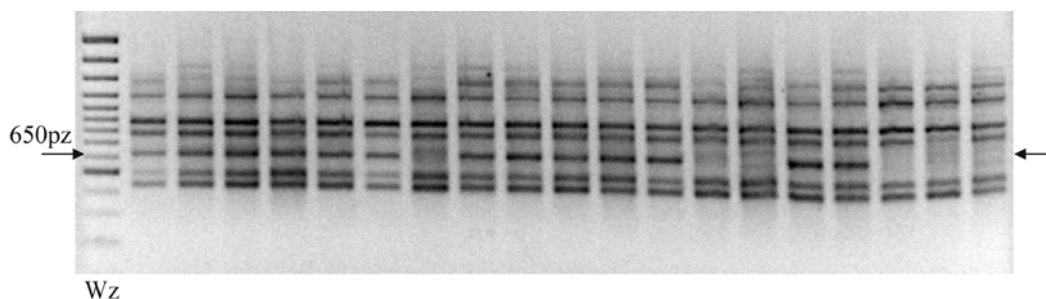
Osiem wyraźnych prążków różnicujących linie 544 i Ot0-20 zostało wybranych do przeprowadzenia oceny segregacji markerów ISSR w populacji mapującej (tab. 4).

Tabela 4

Segregacja wybranych fragmentów DNA w populacji mapującej (544 × Ot0-20) F₂
Segregation of some DNA fragments in the mapping population (544 × Ot0-20) F₂

Marker	Pochodzenie amplifikowanego fragmentu Source of PCR product	Obserwowane rozszczepienia Observed segregation	χ^2	Prawdopodobieństwo Probability
is2/1200pz	Ot0-20	66 : 21	0,03	0,75–0,9
is3/650pz	Ot0-20	67 : 17	1,02	0,25–0,5
is11/750pz	Ot0-20	67 : 27	0,70	0,25–0,5
is11/800pz	544	81 : 13	6,25	0,01–0,05
is14/650pz	Ot0-20	70 : 24	0,01	0,9–0,95
is18/640pz	Ot0-20	73 : 20	0,61	0,25–0,5
is19/900pz	544	74 : 17	1,94	0,1–0,25
is44/600pz	544	32 : 2	6,63	0,01–0,05

Zastosowanie przy analizach segregacji ekstraktów DNA o większej koncentracji i czystości zasadniczo nie wpłynęło na profil uzyskiwanych produktów amplifikacji (rys. 3), chociaż uzyskiwane obrazy elektroforetyczne były nieco wyraźniejsze i przez to łatwiejsze do interpretacji.



Rys. 3. Segregacja markera is3/650pz w populacji F₂ mieszańca między liniami 544 i Ot0-20
Fig. 3. Segregation of the is3/650bp marker in F₂ population of the cross between 544 and Ot0-20 lines

Uzyskane liczebności dla sześciu spośród analizowanych produktów amplifikacji: is2/1200pz, is3/650pz, is11/750pz, is14/650pz, is18/640pz i is19/900pz wskazywały na dziedziczenie jednogenowe. Markery te spełniają, więc podstawowe kryterium przydat-

ności do tworzenia mapy genetycznej żyta. Segregacje pozostałych dwóch analizowanych fragmentów DNA odchyłały się od wartości oczekiwanych przy amplifikacji fragmentu w pojedynczym locus. Uzyskane rozszczepienia wskazują, że prążki markerowe mogą mieć charakter heterogeniczny i tym samym nie znajdują zastosowania przy konstruowaniu mapy genomu żyta.

DYSKUSJA

Wybrane w trakcie wstępnej oceny startery pozwalające na jednoznaczną identyfikację badanych linii wsobnych żyta, charakteryzują się obecnością pięciu dwunukleotydydowych motywów powtarzalnych: (AG), (GA), (CT), (TC), (AC). W genomach roślinnych sekwencje powtarzalne z motywem trzy- lub czteronukleotydydowym są znacznie rzadsze niż dwunukleotydydowe, a startery z motywami (AT), (TA), (GC) i (CG) generują zazwyczaj niski polimorfizm, co prawdopodobnie jest związane z tendencją do tworzenia połączeń komplementarnych pomiędzy starterami i w obrębie samego startera oraz związanego z tym powstawania struktury tzw. „spinki do włosów” (Cekic i in., 2001). Dlatego też największy polimorfizm w trakcie dotąd prowadzonych prac uzyskiwano przy zastosowaniu starterów z powtórzeniami typu: (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) i (CA) (Pradeep Reddy i in., 2002). Ograniczona liczba sekwencji powtarzalnych, jakie mogą być podstawą do projektowania starterów dających użyteczny polimorfizm jest również jedną z podstawowych wad techniki ISSR limitujących jej stosowanie przy badaniu genomów roślin (Cekic i in., 2001).

Markery ISSR znajdują najczęściej zastosowanie przy identyfikacji genotypów, ocenie zróżnicowania genetycznego i analizach filogenetycznych (Pradeep Reddy i in., 2002). Fernandez i wsp. (2002) stwierdzili, że skonstruowany na bazie markerów ISSR dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne między odmianami jęczmienia lepiej odzwierciedla ich pochodzenie niż wtedy, gdy do jego konstruowania używano techniki RAPD. U ryżu (Virik i in., 2000) obie te techniki dawały zbliżone rezultaty, odzwierciedlające z pewnymi możliwymi do zaakceptowania odstępstwami, pochodzenie badanych genotypów.

Dendrogram utworzony na bazie przeprowadzonych w niniejszej pracy analiz względnie dobrze odzwierciedla związki rodowodowe pomiędzy badanymi liniami żyta. Zaobserwowane odstępstwa mogą wynikać z faktu, że nie zawsze rodowód w pełni odzwierciedla podobieństwo genetyczne między liniami. Precyzja oceny dystansu genetycznego mogłaby też zostać wydatnie poprawiona poprzez zwiększenie liczby loci będących podstawą do wykreślenia dendrogramu. Według Myśków i wsp. (2001) przy stosunkowo niewielkiej liczbie markerów używanych do oceny dystansu genetycznego pomiędzy liniami wsobnymi wskazane jest, aby były one względnie równomiernie rozproszone po genomie żyta. Lokalizacja loci ISSR użytych w trakcie opisywanych badań nie jest jednak dotąd poznana.

Markery ISSR nie były dotąd stosowane do tworzenia nowych map genetycznych. Kilkakrotnie były one jednak z powodzeniem używane do rozbudowy map skonstruowanych na bazie markerów RFLP lub SSR (Pradeep Reddy i in., 2002). W populacji

mapującej diploidalnych pszenic zgodność segregacji markerów ISSR z modelem jednogenowym była duża (44 spośród 49 polimorficznych fragmentów) — znacząco większa niż dla markerów RAPD ocenianych na tym samym materiale (Kojima i in., 1998). Ocena segregacji markerów ISSR w badanej populacji mapującej żyta zakończona została wskazaniem sześciu markerów spełniających podstawowe kryteria wymagane przy użyciu ich do konstruowania mapy genetycznej (powtarzalność i zgodność dziedziczenia z modelem jednogenowym). Liczba wytypowanych markerów (6) jest względnie niska w porównaniu do całkowitej liczby zastosowanych w trakcie badań starterów (57). Poziom ten jest jednak zbliżony do polimorfizmu generowanego u żyta przez markery RAPD (Masojć i in., 2001). Można przy tym przypuszczać, że efektywność mapowania przy użyciu markerów ISSR okaże się wyższa, jeśli przy elektroforezie produktów amplifikacji agarozą zostanie zastąpiona żelami poliakrylamidowymi. Moreno i wsp. (1998) wykazali, że wysoka rozdzielczość elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w warunkach zdenaturowanych pozwala na uwidocznienie znacznie większej liczby produktów amplifikacji niż przy zastosowaniu 2% agarozy.

Niedostateczny poziom polimorfizmu generowanego przez markery ISSR może ograniczać przydatność tej techniki do konstruowania map genetycznych oraz określania dystansu genetycznego między badanymi obiektami. Z drugiej jednak strony technika ta jest prosta i względnie tania, a przy tym gwarantuje wysoką powtarzalność uzyskiwanych rezultatów, co czyni ją bardzo przydatnym narzędziem przy rozróżnianiu linii wsobnych żyta.

WNIOSKI

1. Markery ISSR stanowią użyteczne narzędzie do identyfikacji linii wsobnych żyta.
2. Rezultaty oceny podobieństwa genetycznego między badanymi genotypami są w dużej części zgodne z danymi rodowodowymi. Przydatność techniki ISSR do oceny zróżnicowania genetycznego może być jednak w pewnym stopniu ograniczona trudnościami w uzyskiwaniu większej liczby fragmentów polimorficznych.
3. Przy tworzeniu map genetycznych żyta przydatność techniki ISSR połączonej z elektroforezą w żelach agarozowych wydaje się być zbliżona do techniki RAPD, a podstawowym jej ograniczeniem jest przeciętny poziom uzyskiwanego polimorfizmu.

LITERATURA

- Ammiraju J. S. S., Dholakia B. B., Dantra D. K., Sigh H., Lagu M. D., Tamhankar S. A., Dhaliwal H. S., Rao V. S., Gupta V. S., Ranjekar P. K. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102: 726 — 732.
- Blair M. W., Panaud O., McCouch S. R. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 780 — 792.
- Cekic C., Battey N. H., Wilkinson M. J. 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet.* 103: 540 — 546.

- 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.
- Kantety R. V., Zeng X. P., Bennetzen J. L., Zehr B. E. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365 — 373.
- Kojima T., Nagaoka T., Noda K., Ogihara Y. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 37 — 45.
- 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.
- Moreno S., Martin J. P., Ortiz J. M. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117 — 125.
- Myśków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szołkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42: 1 — 4.
- 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 — 602.
- Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9 — 17.
- Ratnaparkhe M. B., Tekeoglu M., Muehlbauer F. J. 1998. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515 — 519.
- Smolik M., Rzepka-Plevneš D. 2002. Wykorzystanie polimorfizmu DNA w regionach sekwencji mikrosatelitarnych do identyfikacji genotypów żyta o różnej tolerancji na niedobory pokarmowe w podłożu. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 488 „Nowoczesne metody i techniki w hodowli roślin”: 145 — 151.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394 — 400.
- Virk P. S., Zhu J., Newbury H. J., Bryan G. J., Jackson M. T., Ford-Lloyd B. V. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275 — 284.
- 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. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 — 6535.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176 — 183.