

HELENA KUBICKA

RENATA LEWANDOWSKA

Ogród Botaniczny — Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN, Warszawa

Zastosowanie techniki AFLP w połączeniu z BSA do identyfikacji markerów sprzężonych z cechą karłowatości u żyta

The use of the AFLP technique in combination with BSA for identification of markers linked with dwarfness in rye

W pracy zastosowano technikę AFLP w połączeniu z metodą BSA do poszukiwania markerów sprzężonych z recesywnym genem karłowatości *ds1* u żyta. Zidentyfikowano ponad 22 tysiące fragmentów DNA różnicujących linie wsobne o skrajnych fenotypach (8/40K — karłowa i 8/40N — kontrola) oraz pokolenie segregujące DWSK-1 F₂. Wykorzystano 239 par selektywnych starterów dla restryktaz EcoRI/MseI. Następnie analizowano obecność wspólnych fragmentów różnicujących dla badanych form rodzicielskich i potomstwa F₂ oraz form rodzicielskich populacji mapującej DS2 i RXL10, co ograniczyło liczbę użytych par starterów do 68. Kolejna analiza na zawężonej populacji segregującej (DWSK-1 F₂) składającej się z 21 roślin, zredukowała liczbę par starterów do 51. Otrzymano 88 fragmentów polimorficznych sprzężonych z genem karłowatości segregujących w stosunku 3:1 dla $\chi^2 = 0,50$ przy $p = 0,01$, które ponownie przetestowano dla 15 par starterów na populacji mapującej. Dla 13 różnicujących prążków, stwierdzono segregację 3:1 i na tej podstawie uznano je za markery dominujące AFLP związane z badaną cechą karłowatości u żyta. W przyszłości zidentyfikowane markery AFLP zostaną przetestowane na rozszerzonej populacji segregującej, celem przeniesienia ich na istniejącą mapę genetyczną żyta.

Słowa kluczowe: AFLP, BSA, karłowatość, markery molekularne, żyto

The aim of this work was to search for potential molecular markers linked with the recessive dwarfness *ds1* gene in rye, with the aid of the AFLP technique in combination with the Bulk Segregant Analysis (BSA) method. Over 22 thousand DNA fragments were identified — differentiating inbred lines of extreme phenotypes (8/40K — dwarfness and 8/40N — control) as well as the segregating population DWSK-1F₂, using 239 selective primer pairs for restrictases EcoRI/MseI. Next, the presence of common markers for the tested parental forms and F₂ offsprings as well as parental forms of the mapping population DS2 and RXL10 was analyzed, which enabled reduction of the number of used starter pairs to 68. Further analysis of a narrowed segregating population (DWSK-1F₂), consisting of 21 plants, limited the amount of primer pairs to 51.88 markers linked with the dwarfness gene were obtained, which segregated with theratio of 3:1 for $\chi^2 = 0.50$ at $p = 0.01$. They were tested again for 15 starter pairs on the mapping population. For 13 differentiating bands, the segregation of 3:1 was observed and these DNA fragments were classified as dominant AFLP markers linked with the

researched dwarfness gene in rye. In the future the identified AFLP markers will be tested on a wider segregated population with the aim of transferring them to the existing genetic map of rye.

Key words: AFLP, BSA, dwarfness, molecular markers, rye

WSTĘP

Dynamicznie rozwijająca się w ostatnich latach biologia molekularna i genetyka stworzyły możliwości bardzo dokładnego badania i charakteryzowania genomu roślinnego. Molekularne systemy markerowe omijają problemy związane z klasycznymi metodami badań, opartymi na obserwacji fenotypów. Dzięki badaniom na poziomie DNA, możliwa staje się ocena zróżnicowania genetycznego w dowolnej populacji roślinnej, jak i między oddalonymi jednostkami systematycznymi z pominięciem takich czynników jak np. wpływ środowiska, które często zakłócają ekspresję danego genu. Zastosowanie markerów molekularnych eliminuje te trudności poprzez bezpośrednie wykrywanie różnic pomiędzy allelami danego genu (Deniziak i Barciszewski, 1995).

Charakterystyka materiału genetycznego w oparciu o markery DNA, polega na wytworzeniu grupy fragmentów z badanej próby DNA. Właśnie takie fragmenty DNA o indywidualnej dla siebie długości i sekwencji nukleotydowej wykrywane metodami molekularnymi traktuje się jako dziedziczne markery opisujące dany genotyp (Wolko i in., 1999).

Biorąc pod uwagę sposób identyfikacji zmienności genetycznej, markery kwasów nukleinowych można podzielić na cztery grupy, opierając się na specyficznych właściwościach enzymów: restrykcji, ligazy DNA faga T4, polimerazy DNA lub kilku enzymów jednocześnie (techniki markerowe mieszane).

Markerowe techniki molekularne oraz ich praktyczne zastosowania w hodowli stanowią podstawę dzisiejszych badań genetycznych. Mimo bogactwa istniejących metod molekularnych, dających potencjalne markery, obecnie tylko kilka z nich ma faktyczne zastosowanie praktyczne. Najczęściej wykorzystuje się RFLP, RAPD, AFLP i SSR (Hayes i Shaghai Maroof, 2000).

Wybór określonej techniki jest warunkowany wieloma względami, między innymi, rodzajem badanego genomu i oczekiwaną zmiennością analizowanego materiału genetycznego, bazą techniczną jak i w końcu zasobami finansowymi.

Początkowo technikę AFLP opisaną przez Vos i wsp. (1995), wykorzystywano do badania polomorfizmu gatunków roślin o małym genomie. Przykładem może być rzodkiewnik — 145 MB, jęczmień — 1500 MB, czy też ryż — 1500 MB, gdzie oceniano czystość linii wsobnych (Cho i in., 1998). Jednak w ostatnim latach metoda ta jest z powodzeniem stosowana nawet wówczas, kiedy genom rośliny jest duży, co potwierdzają badania na pszenicy (ponad 20000 MB) prowadzone przez Gupta i wsp. (1999) i Schwarz i wsp. (2000), alstremerii (25 000 MB) przez Han i wsp. (1999), a także na życie przez Bednarka i wsp. (1999, 2000).

Biorąc pod uwagę powyższe czynniki w doświadczeniu zastosowano technikę AFLP w połączeniu z metodą BSA (Bulk Segregant Analysis), która pozwala na szybką

identyfikację molekularnych markerów sprzężonych z badanym *loci*, opracowaną przez Michelmore i wsp. (1991).

Celem pracy było poszukiwanie i zidentyfikowanie potencjalnych, molekularnych markerów AFLP, sprzężonych z recesywnym genem karłowatości *ds1* u żyta ozimego oraz sprawdzenie czy wystąpią one w formach rodzicielskich DS2, RXL10 i w populacji mapującej pochodzącej ze skrzyżowania tych form, jak też ustalenie, które z nich będą segregowały w stosunku 3:1.

W końcowym etapie badań przewiduje się zlokalizowanie badanego genu *ds1* na istniejącą mapę genetyczną żyta przy udziale sprzężonych z nim markerów AFLP.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

- Linia wsobna, karłowa oznaczona symbolem 8/40K — pokolenia S₁₀ o skróconej słomie, wielokrotnie samozapylana, celem ustalenia cechy. Linia ta — 8/40K charakteryzuje się długością źdźbła dochodzącą do 30 cm i jest wrażliwa na działanie egzogennej gibereliny (rys. 1). Pobrano liście z 10 roślin linii karłowej i wyizolowano DNA.
- Linia wsobna 8/40N — pokolenia S₁₆ o normalnym typie wzrostu, wyselekcjonowana w trakcie samozapylania odmiany żyta uprawnego Garczyńskie o długości słomy ok. 120 cm. Z tej samej wyjściowej rośliny otrzymano analog o fenotypie karłowym (8/40K); od 10 lat linie te są prowadzone niezależnie od siebie, stąd wynika różnica liczby pokoleń obu użytych linii. W przypadku linii kontrolnej do analizy DNA pobrano liście również z 10 roślin.
- DWSK1-F₂ — pokolenie segregujące pod względem recesywnego genu karłowatości *ds1*. Rośliny uzyskano w wyniku krzyżowania linii 8/40N i 8/40K w obu kierunkach, a następnie samozapylając rośliny pokolenia F₁. W pokoleniu F₂ wystąpiła segregacja na rośliny karłowe i o normalnym typie wzrostu w stosunku 3:1. Do analizy DNA pobrano liście z 94 roślin pokolenia F₂. Wstępnie przeprowadzono analizę występowania markerów na 21 roślinach pokolenia DWSK1-F₂.
- Genetyczne mapowanie zostało przeprowadzone przy użyciu 94 roślin populacji F₂ (populacja mapująca) żyta i jej linii rodzicielskich: DS2 i RXL10 (po 10 roślin z każdej linii wsobnej). Materiały te otrzymano od prof. P. Masojcia z AR w Szczecinie.

AFLP w połączeniu z BSA

- Izolację całkowitego DNA wykonano z zielonych liści wg zaleceń producenta zestawu do izolacji firmy QIAGEN. Preparaty po izolacji charakteryzowano spektrofotometrycznie, a integralność badano elektroforetycznie w żelu agarozowym.
- Kolejne etapy techniki AFLP (trawienie DNA, ligacja adaptorów, wstępny PCR, znakowanie P³², selektywny PCR), modyfikowanej do genomu żytniego wykonano zgodnie z metodyką szczegółowo opisaną przez Bednarek i wsp. (1999; 2000). Produkty wstępnego PCR kontrolowano na żelu agarozowym.
- Próby średnie do analizy zestawów segregantów (BSA) złożono z równych objętości rozcieńczonych preparatów po wstępnym PCR dla poszczególnych form rodzicielskich

- oraz potomstwa pokolenia F₂. Każda próba średnia składała się z co najmniej 6–10 roślin określonego fenotypu (dotyczy form rodzicielskich tworzących mieszańca DWSK1–F₂ oraz form rodzicielskich DS2 i RXL10 dla populacji mapującej).
- Produkty selektywnego PCR rozdzielano na żelach akrylamidowych i wizualizowano na kliszach rentgenowskich. Na ostatnim etapie analizy do prób populacji mapującej dołączono wzorzec masy, którym był zestaw do sekwencjonowania SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit firmy EpicentreTechnologies.
 - Analiza autoradiogramów. Analizę obrazów produktów selektywnego PCR przeprowadzono wizualnie. Wyniki zebrano w postaci bazy danych w arkuszu kalkulacyjnym EXCEL.
 - Analiza danych. Zliczano dla każdej z badanych kombinacji selektywnych starterów liczbę identyfikowanych potencjalnych markerów, różnicujących badaną krzyżówkę oraz formy rodzicielskie populacji mapującej (DS2, RXL10). Aby określić stosunek rozszczepień potencjalnych markerów na trzech kolejnych populacjach (populacja segregująca ograniczona — 21 roślin, populacja mapująca — 94 rośliny, populacja segregująca rozszerzona — 94 osobniki) wykonano matrycę zerojedynkową (1,0) dla obecności lub braku różnicującego prążka na autoradiogramach. Następnie zweryfikowano ich segregację za pomocą testu χ^2 .

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza zestawów segregantów (BSA)

Zastosowana w pracy metoda analizy zestawów segregantów (BSA), opisana przez Milchemore i wsp. (1991), umożliwia identyfikację fragmentów DNA, które mogą być sprzężone z genami warunkującymi występowanie ważnych cech użytkowych, a w szczególności cech monogenicznych. Polega ona na łączeniu prób DNA o skrajnych fenotypach w dwa zestawy, które następnie są porównywane za pomocą różnych technik badawczych. Tworzenie prób zbiorczych ma na celu uśrednienie potencjalnej zmienności wywołanej ekspresją badanego genu. Michelmore i wsp. (1991), Ouedraogo i wsp. (2001) uważają, że wszelkie różnice identyfikowane dla prób średnich powinny być związane z badaną cechą.

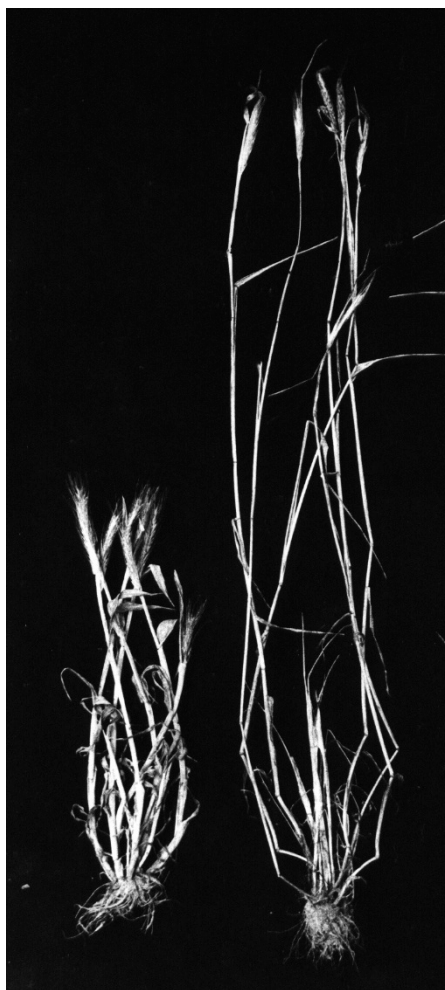
W naszych wcześniejszych badaniach próby średnie zostały złożone po otrzymaniu rozcieńczeń po wstępnym PCR techniki AFLP, celem uniknięcia możliwości utracenia zmienności linii wsobnych (Bednarek i in., 1999).

Próby zbiorcze DNA złożono z form rodzicielskich o znanych skrajnych genotypach: *DS1DS1* i *ds1ds1* oraz potomstwa pokolenia F₂. Z takiej samej liczby roślin złożono próby średnie DNA populacji mapującej i jej form rodzicielskich (DS2 i RXL10).

Analiza linii wsobnych (karłowej o genotypie *ds1ds1* i normalnej — o genotypie *DS1DS1*) i potomstwa pokolenia F₂

Łącznie przebadano 239 par selektywnych starterów enzymów restrykcyjnych *EcoRI*/*MseI*. Wszystkie badane pary selektywnych starterów generowały niepowtarzalne wzory produktów PCR. Ogółem zidentyfikowano ponad 20 tys. fragmentów DNA, różnicujących poszczególne próby zbiorcze. Para starterów EAGG/MCGG (11) generowała najmniejszą liczbę fragmentów, zaś para EATG/MCAT (165) największą liczbę

fragmentów. Podstawowym celem przeprowadzonych badań była identyfikacja tych fragmentów DNA, które potencjalnie mogą być sprzężone z badanym genem karłowatości.



Rys. 1. Typ wzrostu: roślina karłowa (po lewej) i kontrola
Fig. 1. Type of growth: dwarf plant (on the left) and control

Zidentyfikowano 2587 (11%) różnicujących próby średnie (pochodzące z roślin o skrajnych fenotypach: 8/40K — karłowaty i 8/40N — normalny typ wzrostu oraz potomstwa pokolenia F₂) fragmentów DNA o masie cząsteczkowej od 100 do 1000 par zasad. Wśród nich zdecydowaną większość stanowiły prążki o identycznej intensywności w próbie rodzicielskiej i w potomstwie. Pozostałe fragmenty różniły się intensywnością u potomstwa i form rodzicielskich. Uzyskany polimorfizm w przypadku badanych linii wsobnych żyta, które zostały wyselekcjonowane z jednej rośliny wyjściowej, wydaje się być uzasadniony ze względu na wysoki stopień pokrewieństwa. Podobny poziom

polimorfizmu wynoszący 13% otrzymali Jeuken i wsp. (2001), badając linie sałaty wprowadzone z gatunku uprawnego *L. sativa*.

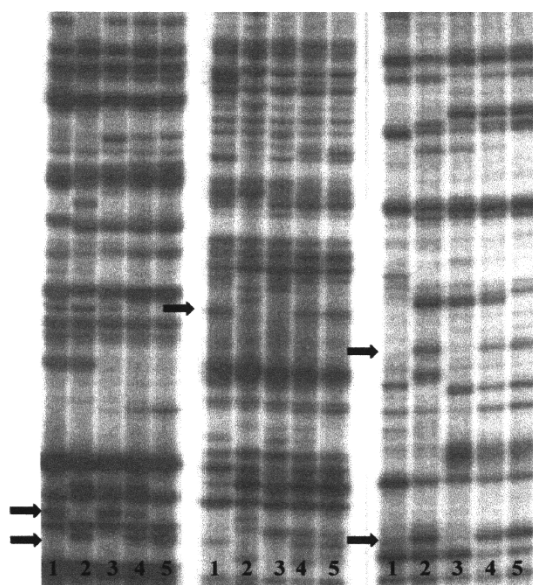
Zastosowana w pracy technika AFLP w połączeniu z BSA, umożliwiła identyfikację znacznego polimorfizmu fragmentów DNA w badanych populacjach i ich formach rodzicielskich. Na tym etapie badań wybrano tylko te różnicujące fragmenty DNA, które miały identyczną intensywność dla prób zbiorczych form rodzicielskich i potomstwa F₂ oraz pary starterów w których zidentyfikowano co najmniej 5 polimorficznych prążków. To pozwoliło na zmniejszenie liczby kombinacji starterów w kolejnych badaniach do 68.

Analiza linii wsobnych i pokolenia F₂ oraz linii rodzicielskich populacji mapującej (DS2 i RXL10)

Do badań, oprócz analizy skrajnych fenotypów i potomstwa F₂, włączono DNA form rodzicielskich populacji mapującej DS2 i RXL10 (rys. 2) w celu sprawdzenia czy fragmenty DNA różnicujące badane skrajne fenotypy będą również występowały u linii rodzicielskich populacji mapującej żyta i czy będą je różnicować. Oczekiwano, że identyfikacja fragmentów DNA różnicujących próby zbiorcze form rodzicielskich obu populacji (segregującej i mapującej) i pokolenia F₂, pozwoli na kolejne zawężenie analiz i wytypowanie markerów sprzężonych z genem *ds1*.

Z wytypowanych 68 par starterów przeanalizowano polimorficzne fragmenty powielane przez 65 kombinacji oligonukleotydów. Ogółem zidentyfikowano 489 prążków różnicujących próby średnie DNA linii: 8/40K i 8/40N oraz populację segregującą. Z tego 142 fragmenty DNA występowały we wszystkich próbach jednocześnie. Średnio w jednym układzie identyfikowano po ok. 2 prążki różnicujące próby zbiorcze badanych linii i populacji. W większości przypadków występowały polimorficzne fragmenty, pochodzące od roślin o fenotypie karłowym — 87, natomiast 55 pochodziło od roślin o genotypie dominującym. Otrzymano więc podobne proporcje polimorficznych fragmentów jak we wcześniejszych badaniach, gdzie obserwowano większą liczbę różnicujących sygnałów pochodzących od roślin o genotypie *ds1ds1*, czyli karłowych (Kubicka i in., 2001).

W analizie najbardziej znaczące były fragmenty DNA różnicujące równocześnie skrajne fenotypy i potomstwo oraz linie rodzicielskie populacji mapującej DS2 i RXL10, dlatego podano ich rozkład w zależności od zastosowanej pary starterów (tab. 1). Z danych tych wynika, że nieco więcej markerów było zlokalizowanych w obszarach bogatych w GC na 3' końcu poszczególnych starterów.



Rys. 2. Profile DNA linii: karlowej o genotypie *ds1ds1* (5) i kontrolnej o genotypie *Ds1Ds1* (3) ich potomstwa F_2 (4) oraz form rodzicielskich populacji mapującej: DS2 (1) i RXL10 (2). Strzałki wskazują prążki wspólne

Fig. 2. DNA profiles: for the dwarf line with genotype *ds1ds1* (5) and control with genotype *Ds1Ds1* (3), their offspring F_2 (4) and parental forms of the mapping population : DS2 (1) and RXL10 (2). Arrows point at common bands

Tabela 1

Porównanie występowania fragmentów różnicujących formy rodzicielskie populacji segregującej pod względem recesywnego genu karłowatości u potomstwa F_2 i form rodzicielskich populacji mapującej
Comparison of appearance of fragments differentiating parental forms of the segregating population as well as offsprings F_2 and parental forms of the mapping population in respect of the recessive *ds1* dwarfness gene

	CAA	CAT	CTA	CTT	CCA	CCT	CGA	CGT	CAC	CAG	CTC	CTG	CCC	CCG	CGC	CGG	
AGG										4							4
AGC	3		4	2		3		3	4			6			1	1	27
ACG	2		1			1										1	5
ACC							5			2		1	3		3		14
ATG														5			5
AAG					3				2	2						2	9
ATC			3				1	2		1		1		1			9
AAC		1			2								1				4
AGT			4		1					1				1			7
AGA																	0
ACT	3					1		1		2				3			10
ACA				1			3					3	3		2	1	13
ATT														3			3
ATA			1								2	1			1		5
AAT		5					6	1	1	5		2				1	21
AAA							1	1						3	2		7

Analiza wyników podanych w tabeli 1 potwierdziła nasze wcześniejsze badania nad cms Pampa u żyta (Bednarek i in., 1999, 2000), gdzie większość potencjalnie różnicujących badane fenotypy fragmentów DNA jest generowanych przez pary starterów bogatych w zasady GC. Nasze wyniki sugerują, iż wstępne poszukiwania markerów AFLP sprzężonych z badaną cechą, prowadzone za pomocą analizy zestawów segregantów mogą być ograniczone do starterów bogatych w zasady GC. Ze względu na to, że wyniki otrzymaliśmy tylko dla dwóch cech (gen karłowatości oraz markery męskiej sterility i przywracania płodności pyłku u żyta) nie mamy podstaw, by móc je uogólnić dla innych cech, a tym bardziej gatunków roślin. Niemniej w literaturze znajdujemy doniesienia dotyczące podobnego zjawiska u soi. Han i wsp. (1999) zaobserwowali zależność pomiędzy zawartością zasad GC w rozszerzeniu selektywnym starterów użytych do analizy genomu soi a ilością otrzymanych fragmentów. Zależność tę tłumaczą wysoką zawartością zasad AT w genomie soi i dlatego ilość prążków generalnie rosła dla starterów bogatych w zasady GC.

Analiza na ograniczonej populacji pokolenia segregującego pod względem recesywnego genu *ds1*

Liczba identyfikowanych fragmentów DNA różnicujących zarówno formy rodzicielskie populacji mapującej DS2 × RXL10, jak i próby zbiorcze badanej populacji segregującej nadal pozostała znaczna. Dlatego zawężono pulę różnicujących fragmentów DNA poprzez badanie ich segregacji na ograniczonej populacji roślin pokolenia segregującego (DWSK1-F₂).

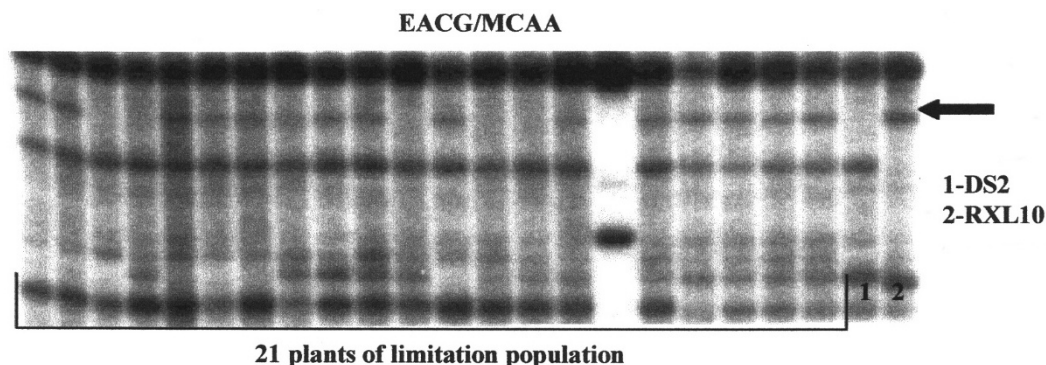
Próby DNA przygotowano zgodnie z opisaną metodą i poddano kolejnym etapom AFLP. Analiza wzorów molekularnych wykazała, że z wybranych wcześniej 142 fragmentów DNA różnicujących skrajne fenotypy i potomstwo F₂ oraz linie rodzicielskie populacji mapującej DS2, RXL10 u 88 potwierdzono segregację w stosunku 3:1 (rys. 3). Te fragmenty DNA były generowane przez 51 par selektywnych starterów. Istotność różnic dla wytypowanych wzorów prążków różnicujących sprawdzono testem χ^2 przy poziomie istotności $p = 0,01$.

Wcześniejsze badania wykazały, że różnicujące fragmenty DNA występują zarówno w badanej populacji segregującej zawężonej jak również u linii rodzicielskich populacji mapującej.

Aby ustalić czy prążki te są faktycznymi markerami celowym było przeprowadzenie odpowiednich analiz na populacji mapującej. Do badań włączono DNA populacji mapującej złożonej z 94 osobników, a także formy rodzicielskie tej populacji. Analiza polegała na sprawdzeniu obecności zidentyfikowanych różnicujących fragmentów DNA w populacji mapującej i na zweryfikowaniu rozszczepienia w stosunku mendlowskim. Dla 15 par starterów, które generowały wcześniej wytypowane polimorficzne fragmenty DNA, wykonano rozdziały elektroforetyczne dla w/w populacji. Dla 13 różnicujących prążków stwierdzono segregację 3:1 i na tej podstawie uznano je za markery dominujące AFLP związane z cechą karłowatości u żyta.

Technika AFLP wykorzystywana jest nie tylko do poszukiwania markerów molekularnych DNA, co udowodniono w niniejszej pracy, ale również do badań nad zagęszcza-

niem map genetycznych u wielu gatunków roślin, między innymi: u ryżu (Cho i in., 1998), oraz u soi (Hayes i Shaghai Maroof, 2000).



Rys. 3. Segregacja na zawężonej populacji segregującej
Fig. 3. Segregation in the limited segregated population

W przyszłości zidentyfikowane markery AFLP zostaną poddane analizie za pomocą programu MAPMAKER, celem przeniesienia ich na istniejącą mapę genetyczną żyta i zlokalizowanie badanego genu *ds1* na odpowiednim chromosomie.

WNIOSKI

1. Badania na ograniczonej liczbie roślin, pochodzących z populacji segregującej pod względem genu karłowatości, za pomocą fragmentów DNA różnicujących zarówno linie 8/40K i 8/40N, jak i linie rodzicielskie populacji mapującej (DS2, RXL10), umożliwiła wykrycie segregacji polimorficznych fragmentów DNA zgodnie z prawami Mendla. Test χ^2 pozwolił na zawężenie puli analizowanych fragmentów DNA do 88; identyfikowane fragmenty DNA były powielone przez 51 par selektywnych starterów.
2. Na podstawie obliczeń stosunku rozszczepień dla różnicujących fragmentów DNA, przeprowadzonych na populacji mapującej wytypowano 13 dominujących markerów AFLP sprzężonych z genem karłowatości żyta *ds1*.
3. Wykonane badania na liniach addycyjnych, mające na celu określenie lokalizacji zidentyfikowanych markerów AFLP na chromosomie żytnim, nie przyniosły oczekiwanych rezultatów i nie pozwoliły na przypisanie otrzymanych markerów konkretnemu chromosomowi.

LITERATURA

Bednarek P. T., Kubicka H., Zawada M., Brukwiński W. 1999. Zastosowanie markerów AFLP do badania zmienności genetycznej w obrębie form rodzicielskich mieszańca heterozyjnego żyta otrzymanego na bazie cytoplazmy PAMPA. Biul. IHAR 211: 229 — 237.

- Bednarek P. T., Kubicka H., Zawada M., Brukwiński W. 2000. Analiza zestawów pseudosegregantów pokolenia F₁ mieszańca heterozyjnego żyta (*cms* PAMPA) wykonana techniką AFLP. Biul. IHAR 216: 101 — 109.
- Cho Y. G., McCough S. R., Kuiper M., Kang M. R., Pot J., Groenen J. T. M., Eun M. Y. 1998. Integrated map of AFLP, SSLP and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet., 97: 370 — 380.
- Deniziak M., Barciszewski J. 1995. Diagnostyka molekularna roślin. Post. Biol. Kom. Supl., 6: 1 — 12.
- Gupta P. K., Varshney R. K., Sharma P. C., Ramesh B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breeding 118: 369 — 390.
- Han T. H., van Eck H. J., De Jen M. J., Jacobsen E. 1999. Optimalization of AFLP fingerprinting of organisms with a large — sized genome: a study of *Alstroemeria* ssp. Theor. Appl. Genet. 98: 465 — 471.
- Hayes A. J., Shaghai Maroof M. A. 2000. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. Theor. Appl. Genet. 100: 1279 — 1283.
- Jeuken M., Wijk R van, Peleman J, Lindhout P. 2001. An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* × *L. sativa* F₂ populations. Theor. Appl. Genet., 103: 638 — 647.
- Kubicka H., Bednarek P. T., Lewandowska R. 2001. Searching potential molecular AFLP markers of the recessive gene (*ds1*) of dwarfness in winter rye (*Secale cereale* L.). Obieg pierwiastków w przyrodzie. Monografia t. 1: 387 — 392.
- Michelmore R. W., Paran I., Kesseli R. V. 1991. Identification of markers linked to disease — resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9828 — 9832.
- Ouedraogo J. T., Maheshwari V., Berner D. K., St-Pierre C. A., Belzile F., Timko M. P. 2001. Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. Theor. Appl. Genet., 102: 1029 — 1036.
- Schwarz G., Herz M., Huang X. Q., Michałek W., Jahoor A., Wenzel G., Mohler V. 2000. Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. Theor. Appl. Genet., 100: 545 — 551.
- Wolko B., Irzykowska I., Świącicki W.K. 1999. AFLP i SSR — systemy markerowe przydatne w hodowli roślin. Post. Nauk. Rol. 2: 59 — 71.
- Vos O., Hogers R., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kupier M., Zabeau M. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 23: 4407 — 4414.