

**KATARZYNA PANKIEWICZ****WOJCIECH RYBIŃSKI**

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

## Ocena zróżnicowania genetycznego i zawartości neurotoksyny $\beta$ -ODAP w wybranych gatunkach z rodzaju *Lathyrus*

### Estimation of genetic variability and of $\beta$ -ODAP neurotoxin content in chosen species of the genus *Lathyrus*

Celem pracy było zbadanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy wybranymi gatunkami z kolekcji rodzaju *Lathyrus* z wykorzystaniem polimorficznych losowo amplifikowanych fragmentów DNA oraz ocena zawartości kwasu  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ - $\beta$ -diaminopropionowego ( $\beta$ -ODAP). Materiał do badań stanowiły rośliny reprezentujące cztery gatunki: *L. sativus*, *L. cicera*, *L. tingitanus* i *L. gorgoni*. Przeprowadzono reakcję RAPD-PCR dla 28 dziesięcionukleotydowych starterów o losowej sekwencji, otrzymując polimorfizm na poziomie 97%. Obliczone współczynniki podobieństwa wg Nei'a pomiędzy gatunkami przyjmowały wartości od 0,21 dla pary *L. tingitanus* - *L. cicera* do 0,53 dla *L. sativus* - *L. cicera*. Najwyższe podobieństwo wewnątrz gatunków obserwowano u roślin z gatunku *L. sativus* (0,84), najmniejsze u *L. tingitanus* (0,38). Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci dendrogramu. Analiza zawartości  $\beta$ -ODAP przeprowadzona została z wykorzystaniem specyficznej reakcji z aldehydem o-ftalowym (OPT) i pomiaru absorbancji przy 425 nm. Najwyższą zawartość neurotoksyny w suchej masie nasion wykryto u *L. tingitanus* i *L. gorgoni* wynosiła ona u obu tych gatunków ponad 1g/kg s.m. Ponad dwadzieścia razy niższą zawartość  $\beta$ -ODAP odnotowano u jednej z form kolekcyjnych należącej do gatunku *L. sativus*.

**Słowa kluczowe:** *Lathyrus*,  $\beta$ -ODAP, podobieństwo genetyczne, RAPD

The aim of the study was to estimate of genetic variability among species chosen from the *Lathyrus* collection with the use of polymorphic random amplified DNA fragments and to analyze  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ - $\beta$ -diaminopropionic acid content ( $\beta$ -ODAP) of seeds. Plants of four species: *L. sativus*, *L. cicera*, *L. tingitanus* and *L. gorgoni* were evaluated. RAPD-PCR reaction for twenty-eight 10- nucleotide primers (with random sequence) showed 97% polymorphism. Coefficients of genetic similarity, calculated according to Nei's method, ranged from 0.21 for a pair *L. tingitanus* - *L. cicera* to 0.53 for *L. sativus* - *L. cicera*. The highest intraspecies similarity was observed for accessions of *L. sativus* (0.84), and the lowest one for accessions of *L. tingitanus* (0.38). Content of  $\beta$ -ODAP neurotoxin was analyzed with the use of specific reaction with o-phthalaldehyde (OPT) and absorbance measured at by 425 nm. The highest content of neurotoxin in dry matter of seeds (1g/kg d.m.) was found in *L. tingitanus* and *L. gorgoni*. Comparatively, the content of neurotoxin recorded for seeds of one of the accessions derived from *L. sativus* was 20- fold lower.

**Key words:** genetic similarity, *Lathyrus*,  $\beta$ -ODAP, RAPD

## WSTĘP

Rodzaj *Lathyrus* należący do rodziny *Fabaceae* obejmuje ponad 180 gatunków, zarówno jednorocznych jak i wieloletnich. W Polsce reprezentowany jest przez około 15 z nich, a do bardziej znanych należą: groszek pachnący (*Lathyrus odoratus* L.), groszek łąkowy (*Lathyrus pratensis* L.) i lędźwian leśny (*Lathyrus sylvestris* L.). Jednak tylko dwa gatunki mają znaczenie użytkowe, jest to lędźwian siewny (*L. sativus* L.) uprawiany dla nasion i paszy oraz wycofany w latach 60. lędźwian afrykański (*L. tingitanus* L.), stosowany głównie jako roślina pastewna. Z innych gatunków ważnych z punktu widzenia upraw na świecie wymienić należy również *L. cicera*, *L. ochrus* i *L. sylvestris*.

Gatunki z rodzaju *Lathyrus*, zwłaszcza lędźwian siewny, jest bardzo odporny na stres suszy i może być z powodzeniem uprawiany na terenach o średnich rocznych opadach od 380 do 650 mm, a jednocześnie bardzo dobrze znosi silne opady połączone z czasowym zalewaniem (Campbell i in., 1994). Bardzo dobrze rozwinięty system korzeniowy dochodzący nawet do 1,5 m głębokości (Dziamba, 1997) i występująca u strączkowych zdolność do wiązania azotu atmosferycznego umożliwia jego uprawę na glebach niskiej klasy. Lędźwian charakteryzuje też niska podatność na choroby i szkodniki (Dziamba, 1997). Z racji wyżej wymienionych zalet *Lathyrus sativus* uznany został za roślinę modelową dla zrównoważonego rolnictwa (Vaz Patto i in., 2006).

Czynnikiem ograniczającym wprowadzenie lędźwianu do szerszej uprawy jest zawartość związków antyżywnościowych, a w szczególności kwasu  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ - $\beta$ -diaminopropionowego ( $\beta$ -ODAP), który znany jest ze swojego neurotoksycznego działania na ośrodkowy układ nerwowy ludzi i zwierząt (Hanbury i in., 2000). Wiele krajów nisko rozwiniętych, gdzie lędźwian jest spożywany bez wstępnej obróbki termicznej, zakazało jego uprawy (Campbell i in., 1994). Długotrwała dieta zawierająca 30–50% nasion lędźwianu siewnego wywołuje zespół objawów znany pod nazwą neurolatyryzmu (Spencer i in., 1993; Studziński i Grela, 1997) na który składają się takie dolegliwości, jak: sztywność mięśni szkieletowych kończyn dolnych, ogólna słabość mięśniowa oraz porażenia spastyczne mięśni nóg (Spencer i in., 1986). Ostatnia opisana epidemia latyryzmu miała miejsce w 1997 roku w Etiopii i dotknęła blisko 2000 ludzi (Getahun i in., 1999). Jest to choroba endemiczna ograniczająca się do rejonów, które uprawiają lędźwian na większą skalę, a są to: Indie, Bangladesz, Etiopia i Nepal (Hanbury i in., 2000). Prace zmierzające do obniżenia zawartości  $\beta$ -ODAP prowadzone są już od wielu lat zarówno przy wykorzystaniu krzyżowań, jak i indukowanych mutacji (Briggs i in., 1983; Campbell i Briggs, 1987; Roy i in., 1993; Addis i Narayan, 1994; Rybiński, 2003). Uzyskane tymi drogami linie o obniżonej zawartości neurotoksyny nie zawsze były stabilne (Addis i Narayan, 1994; Santha i Mehta, 2001). Zasadne są, zatem dalsze prace zmierzające do całkowitego lub chociaż częściowego pozbawienia lędźwianu kwasu  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ - $\beta$ -diaminopropionowego.

Celem pracy było zbadanie zróżnicowania genetycznego wewnątrz i pomiędzy wybranymi gatunkami z kolekcji rodzaju *Lathyrus* z wykorzystaniem polimorficznych

losowo amplifikowanych fragmentów DNA (RAPD) oraz ocena zawartości w nasionach kwasu  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ - $\beta$ -diaminopropionowego ( $\beta$ -ODAP).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań (tab. 1) stanowiły wyrównane fentypowo rośliny uzyskane po trzech cyklach rozmnożeń szklarniowych, reprezentujące cztery gatunki z rodzaju *Lathyrus*: *L. sativus*, *L. cicera*, *L. tingitanus* i *L. gorgoni* pochodzące z Polski, Grecji i Izraela (tab. 1). Dla każdego gatunku badane były po trzy akcesy a wyjątek stanowił *L. gorgoni*, reprezentowany przez dwa akcesy. Do badań zbierano liście z 5 roślin dla każdego z akcesów tworząc w ten sposób próbę zbiorczą.

Tabela 1

Materiał roślinny Plant material			
Gatunek Species	Odmiana / numer akcesyjny Cultivars/ accession number	Kraj pochodzenia Country of origin	Źródło nasion Source of seeds
<i>Lathyrus sativus</i>	Derek	Polska Poland	Nochowo
	Krab Mutant		AR Lublin
<i>Lathyrus cicera</i>	LAT/206/79	Grecja Greece	
	LAT/207/84		
	LAT/208/79		
<i>Lathyrus tingitanus</i>	LAT/109/74	Nieznany Unknown	IPK Gatersleben, Niemcy Germany
	LAT/110/79	Nieznany Unknown	
	LAT/140/75	Polska Poland	
<i>Lathyrus gorgoni</i>	LAT/101	Grecja Greece	
	LAT/166	Izrael	

Analizę polimorfizmu DNA prowadzono z użyciem markerów RAPD. Potrzebny do badań DNA izolowano z 15 dniowych siewek rosnących w szklarni metodą CTAB (Murray i Thompson, 1980, z modyfikacjami). Liście rozkruszone w ciekłym azocie ucierano z buforem CTAB z dodatkiem 0,4%  $\beta$ -merkaptotanolu i poddawano działaniu RNazy A w temperaturze 20°C przez 30 minut. Następnie, dwukrotnie dodawano mieszaninę chloroform oktanol (24:1) po pierwszym podaniu próbówki ogrzewano w 65°C przez 25 minut, po drugim podaniu wytrząsano i odwirowywano przez 10 minut w 11 tys. rpm. Z fazy wodnej przez 12–16 godzin wytrącano DNA przy użyciu 95% etanolu o temperaturze -20°C. DNA umieszczono następnie na 10 minut w octanie sodu z 76% etanolem. Tak przygotowane DNA rozpuszczono w buforze TE.

Reakcje RAPD-PCR przeprowadzono przy użyciu 28 dziesięcionukleotydomowych starterów według następującego schematu: 94°C przez 3 min, 36°C przez 1 min, 72°C przez 2 min, 40 cykli: 94°C — 50s, 36°C — 60s i 72°C — 120s, a następnie 94°C przez 2 min, 36°C przez 1 min oraz 72°C przez 10 min. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5%

żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5 mg/L przy napięciu 110 V przez 100 minut. Obecność prążka oznaczono symbolem 1, a jego brak symbolem 0. Wyniki analizowane były przy użyciu programu UVIMAP w funkcji Nei i Li (1979):

$$GS_{ij} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

gdzie  $2N_{ij}$  oznacza liczbę prążków występujących w obu genotypach, natomiast  $N_i$  oraz  $N_j$  oznaczają liczbę prążków charakterystycznych dla danego genotypu. Wartość  $GS_{ij}$  oznacza indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie dendrogramu.

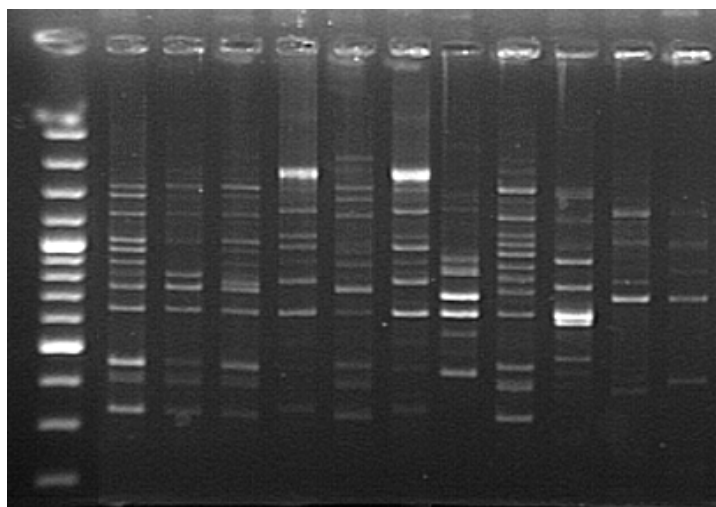
Zawartość neurotoksyny  $\beta$ -ODAP określano według metody opracowanej przez Rao (1978), a zmodyfikowanej przez Briggs i wsp. (1983). Pół grama zmielonych nasion będących mieszanką z pięciu roślin danej akcesji poddano homogenizacji i ekstrakcji w 60% etanolu przez 30 min i przefiltrowano. Ekstrakt podzielono na dwie próby, z których jedną hydrolizowano przez 30 minut z użyciem 3N KOH w celu przekształcenia ODAP w DAP (kwas diaminopropionowy). Do obu prób w celu wywołania reakcji barwnej dodano odczynnik OPT (aldehyd o-ftalowy, 95% etanol, merkaptioetanol, bufor boranowopotasowy) i ogrzewano w łaźni przez 2 godziny w temperaturze 40°C. Wartość absorpcji mierzono na Spekolu 11 przy długości fali 425 nm, pomiar powtarzano trzykrotnie dla próby ślepej oraz próby badanej. Krzywą wzorcową uzyskano z kolejnych rozcieńczeń kwasu diaminopropionowego.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Badania dotyczące zróżnicowania genetycznego pomiędzy czterema gatunkami z rodzaju *Lathyrus* prowadzono z wykorzystaniem reakcji RAPD — PCR. W wyniku użycia 28 starterów uzyskano 257 prążków, z których 251 (97,6%) było polimorficznych. Średnia liczba produktów amplifikacji uzyskanych przy użyciu każdego startera wynosiła 13, a średnia liczba prążków polimorficznych 12,7. Podobny wynik uzyskał Chtourou-Ghorbel i wsp. w 2002 (95,3%) a dużo niższy polimorfizm (50%) wykazał Croft (1999). Tak wysoki stopień polimorfizmu uzyskany w naszych badaniach był efektem kierunkowego doboru starterów. Na rysunku 1 przedstawiono przykładowy obraz rozdziału zamplifikowanych fragmentów DNA dla startera TCCCCGCCTAC.

Prążki gatunkowo specyficzne obserwowano u wszystkich gatunków jednak z różną częstością, tylko jeden taki marker wyróżniono u *L. cicera* i *L. tingitanus*, trzy u *L. sativus*, natomiast u *L. gorgoni* było ich aż piętnaście, co stanowi ponad 5,8%. Wysokie podobieństwo genetyczne *L. sativus* i *L. gorgoni* pokryło się z najwyższą liczbą wspólnych specyficznych dla tych gatunków markerów: 7 co stanowi 2,7%. Wysokie podobieństwo *L. sativus* i *L. gorgoni* przedstawił w swoich badaniach Croft i wsp. (1999).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Rys. 1 Wyniki rozdziału fragmentów RAPD u badanych gatunków z rodzaju *Lathyrus* dla startera TCCCGCCTAC (M- marker wielkości, 1-3 - *L. sativus*, 4-6 - *L. cicera*, 7-9 - *L. tingitanus*, 10-11 - *L. gorgoni*)  
 Fig. 1. Results of RAPD analysis for cosen species of genus *Lathyrus* using primer TCCCGCCTAC (M-DNA ladder, 1-3 - *L. sativus*, 4-6 - *L. cicera*, 7-9 - *L. tingitanus*, 10-11 - *L. gorgoni*)

Najwyższe współczynniki podobieństwa wewnątrz gatunku obserwowane były dla roślin *L. sativus* (od 0,80 do 0,84), najniższe (0,39–0,58) u *L. tingitanus*. Obliczone współczynniki podobieństwa pomiędzy gatunkami przyjmowały wartości od 0,17 dla pary *L. tingitanus* - *L. gorgoni* do 0,65 dla *L. sativus* - *L. cicera*. Wysokie podobieństwo pomiędzy *L. sativus* i *L. cicera* opisał Chtourou-Ghorbel i wsp. (2002) a także Belaïd i wsp. (2006). W tabeli 2 przedstawiono zakresy współczynników podobieństwa genetycznego wewnątrz i pomiędzy badanymi gatunkami *Lathyrus*. Dendrogram obrazujący podobieństwo genetyczne badanych gatunków przedstawiono na rysunku 2.

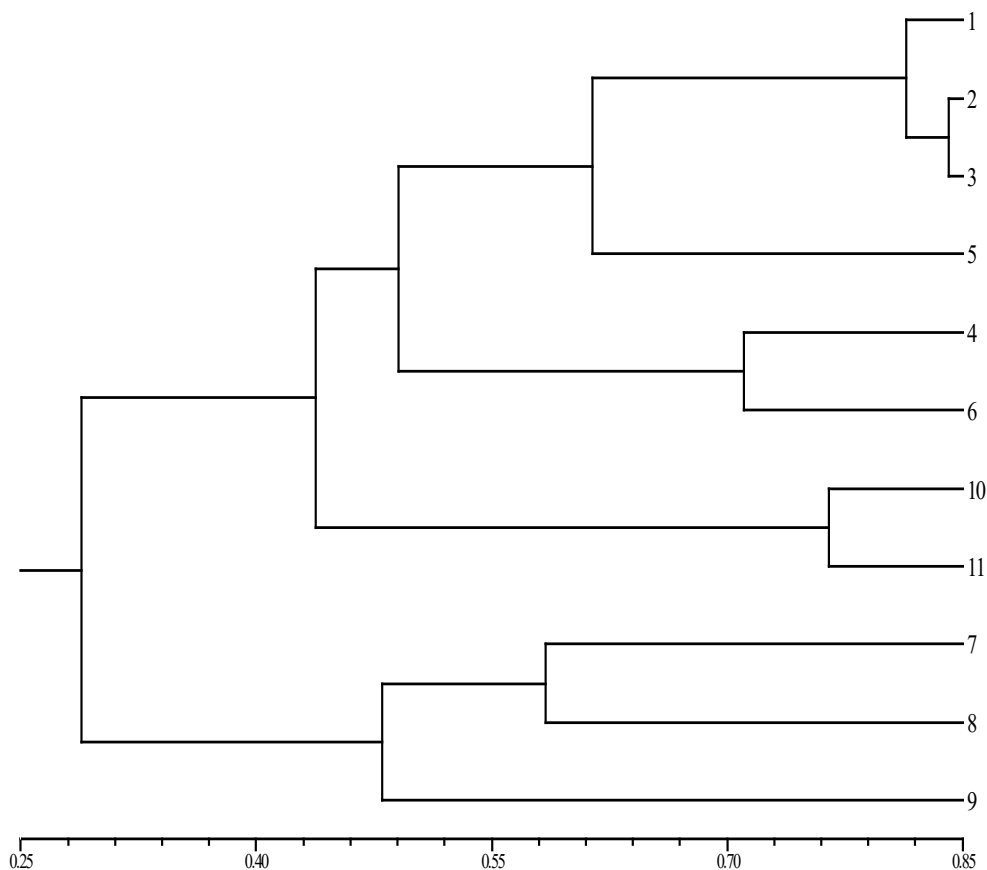
Tabela 2

Zakresy współczynników podobieństwa genetycznego wewnątrz i między badanymi gatunkami rodzaju *Lathyrus*

Ranges of coefficients of genetic similarity for intra- and interspecies comparisons in genus <i>Lathyrus</i>				
	<i>L. sativus</i>	<i>L. cicera</i>	<i>L. tingitanus</i>	<i>L. gorgoni</i>
<i>L. sativus</i>	0,80-0,84			
<i>L. cicera</i>	0,40-0,65	0,45-0,71		
<i>L. tingitanus</i>	0,22-0,38	0,21-0,44	0,39-0,58	
<i>L. gorgoni</i>	0,39-0,45	0,41-0,53	0,17-0,45	0,76

Badania dotyczące zróżnicowania genetycznego pomiędzy czterema gatunkami *Lathyrus* prowadzono z wykorzystaniem techniki RAPD. Metoda ta wymaga przeprowadzania reakcji PCR, co równocześnie pozwala na użycie śladowych ilości DNA. Z powodu zastosowania losowych dziesięcionukleotydowych sekwencji w starterach było możliwe zbadanie praktycznie całego genomu. Technika RAPD zaliczana jest również do tanich i szybkich metod identyfikacji polimorfizmu genetycznego i znalazła szerokie

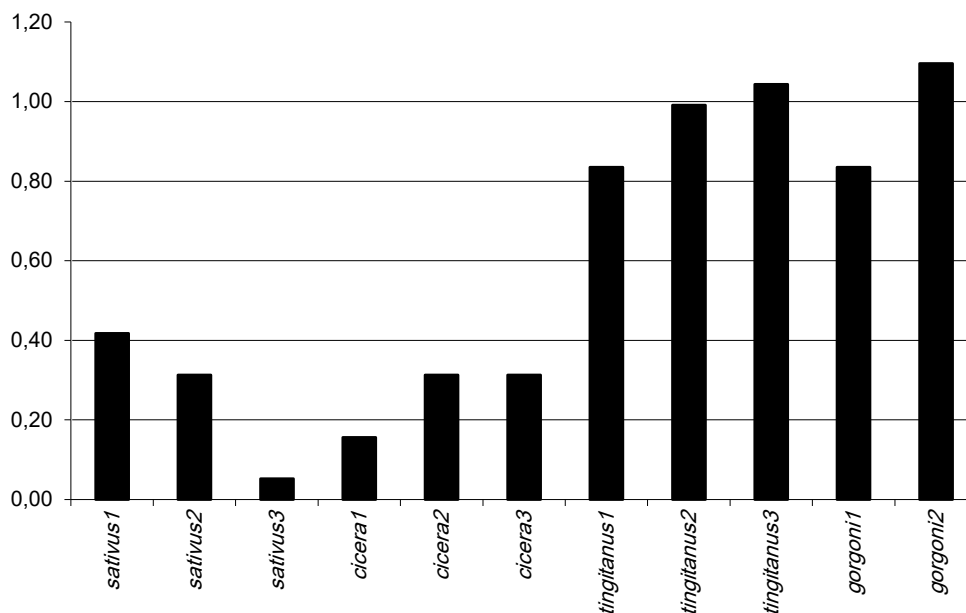
zastosowanie zarówno przy badaniu sprzężenia markerów z cechami użytkowymi, takimi jak odporność na patogeny, w badaniach ewolucyjnych, uzupełnianiu map genetycznych, a w szczególności do oceny podobieństwa i dystansu genetycznego. W prezentowanej pracy wykorzystano markery RAPD do badania podobieństwa genetycznego zarówno wewnątrz gatunków, jak i między nimi.



**Rys. 2** Hierarchiczne grupowanie gatunków z rodzaju *Lathyrus* na podstawie podobieństwa genetycznego  
**Fig. 2.** Hierarchical grouping of species from genus *Lathyrus* on the basis of genetic similarity (1-3 - *L. sativus*, 4-6 - *L. cicera*, 7-9 - *L. tingitanus*, 10-11 - *L. gorgoni*)

Pod względem zawartości  $\beta$ -ODAP wyróżnić można dwie grupy akcesów. Do pierwszej z nich zaliczyć można *L. sativus* i *L. cicera* o niskiej średniej zawartości  $\beta$ -ODAP wynoszącej 0,26 g/kg s.m., natomiast do drugiej *L. tingitanus* i *L. gorgoni* o średnich wartościach wynoszących 0,96 i 0,97 g/kg s.m. Zakres zmienności zawartości  $\beta$ -ODAP między akcesami w obrębie *L. sativus* i *L. cicera* wynosił kolejno: od 0,05 do

0,42 g/kg s.m. i od 0,16 do 0,31 g/kg s.m., a dla *L. tingitanus* i *L. gorgoni* od 0,83 do 1,04 g/kg s.m. i od 0,83 do 1,10 g/kg s.m. Zawartość w nasionach neurotoksyny  $\beta$ -ODAP w odniesieniu do każdego obiektu kolekcyjnego przedstawiono szczegółowo na rysunku 3.



Rys 3. Zawartość  $\beta$ -ODAP (g/kg s.m.) w nasionach badanych gatunków z rodzaju *Lathyrus*  
Fig. 3. Content of  $\beta$ -ODAP (g/kg d.m.) in seeds of analyzed species of *Lathyrus* genus

W badaniach pod uwagę wzięto zawartość neurotoksyny  $\beta$ -ODAP jako kluczowego związku antyżywnościowego w rodzaju *Lathyrus*. Analizy z ostatnich lat wskazują, iż zawartość kwasu  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ - $\beta$ -diaminopropionowego może bardzo się różnić zarówno pomiędzy gatunkami *Lathyrus*, jak i wewnątrz nich, a sam wpływ środowiska nie jest tak istotny jak genotyp (Hanbury i in., 1999). Badania Hussain i wsp. (1997) dowiodły, że stres suszy lub wysokiego zasolenia gleby może wpływać na wzrost zawartości  $\beta$ -ODAP. Według Hanbury (2000) nasiona *L. sativus* zawierają większą ilość  $\beta$ -ODAP niż *L. cicera*. W naszych badaniach średnia zawartość neurotoksyn była zbliżona w obydwu tych gatunkach, a zbyt mała liczba akcesów nie pozwala na potwierdzenie powyższego wniosku. Wyższa zawartość  $\beta$ -ODAP w nasionach *L. tingitanus* i *L. gorgoni* w porównaniu z *L. sativus* i *L. cicera* może mieć związek między innymi ze znacznie niższą popularnością tych gatunków w uprawie i mniej intensywnymi pracami prowadzonymi nad genetycznym udoskonaleniem tych gatunków. Obecnie w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są intensywne prace nad uzyskaniem form lędźwianu siewnego wolnych od neurotoksyn lub przynajmniej o ich śladowej zawartościach w nasionach. Zagadnienie to jest o tyle złożone, że wszystkie przeanalizowane dotąd obiekty w światowych zasobach genowych

charakteryzowały się obecnością  $\beta$ -ODAP, aczkolwiek przy zróżnicowanym, często wysokim poziomie zawartości. Analizując obiekty kolekcyjne lędzianu siewnego Campbell (1997), wykazał, iż zawartość  $\beta$ -ODAP wynosiła od 0,22 do 7,2 g/kg s.m., a 18 linii charakteryzowało się zawartością poniżej 1 g/kg s.m., natomiast 24 linie powyżej 4 g/kg s.m. Stąd uzyskanie rekombinantów pozbawionych neurotoksyn, czy o ich śladowej zawartości w nasionach jest bardzo utrudnione i tylko nieliczne prace wskazują na taką możliwość (Jeswani i in., 1970; Campbell, 1987; Mehra i in., 1995). Inni autorzy sugerują wykorzystanie zmienności somoklonalnej (Roy i in., 1993; Santha i Mechta, 2001). Bardziej efektywne wydaje się wykorzystanie w tym celu metody indukowanych mutacji (Waghmare i Mehra, 2000; Rybiński i Grela, 2007), a w dalszej perspektywie metod inżynierii genetycznej (Vaz Patto i in., 2006).

#### WNIOSKI

1. Na podstawie uzyskanych współczynników podobieństwa genetycznego można wnioskować, iż poziom zróżnicowania genetycznego badanych gatunków był niejednakowy.
2. Najmniejsze podobieństwo genetyczne wewnątrz gatunków obserwowano u *L. tingitanus*, a największe u *L. sativus*, natomiast między gatunkami najmniejsze podobieństwo genetyczne stwierdzono między *L. tingitanus* i *L. sativus*.
3. Niską zawartością  $\beta$ -ODAP charakteryzowały się materiały kolekcyjne *L. sativus* i *L. Cicera*, a wyraźnie wyższą *L. tingitanus* i *L. gorgoni*.

#### LITERATURA

- Addis G., Narayan R. J. K. 1994. Developmental variation of the neurotoxin,  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ , $\beta$ -diaminopropionic acid (ODAP), in *Lathyrus sativus*. Ann. Botany 74: 209 — 215.
- Belaïd, Y., Chtourou-Ghorbel N., Marrakchi M., Trifi-Farah N. 2006. Genetic diversity within and between populations of *Lathyrus* genus (*Fabaceae*) revealed by ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 1413 — 1418.
- Briggs C. J., Parreno N., Campbell C. G. 1983. Photochemical assessment of *Lathyrus* species for the neurotoxin agent,  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ , $\beta$ -diaminopropionic acid. Planta Med. 47:188 — 190.
- Campbell C. J., Briggs C. J. 1987. Registration of low neurotoxin content *Lathyrus* germplasm LS8246. Crop Science 27: 821.
- Campbell C. G., Mehra R. B., Agrawal S. K., Chen Y. Z., Abd El Moneim A., Khawaja H. I. T., Yadov C. R., Tay J. U., Araya W. A. 1994. Current status and future research strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus*). Euphytica 73: 167–175.
- Campbell C. G. 1997. Grass pea (*Lathyrus sativus* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 18. Institute of Plant genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy: 1 — 92.
- Chtourou-Ghorbel N., Lauga B., Ben Brahim N., Combes D., Marrakchi M. 2002. Genetic variation analysis in the genus *Lathyrus* using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution, Vol. 49 (4): 365 — 372.
- Croft A. M., Pang E. C. K., Taylor P. W. J. 1999. Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species. Euphytica 107: 167 — 176.
- Dziamba S. 1997. Agrotechnika i hodowla lędzianu siewnego. Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Lędzian siewny – agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi”. Radom, 9-10 czerwca 1997: 27 — 33.



- Getahun, H., Mekonnen, A., Tekle Haimanot, R., Lambein, F., 1999. Epidemic of neurolathyrism in Ethiopia. *Lancet* 354: 306 — 307.
- Hanbury C. D., Siddique K. H. M., Galwey N. W., Cocks P. S. 1999. Genotype environment interaction for seed yield and ODAP concentration of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. in Mediterranean-type environments. *Euphytica* 110: 45 — 60.
- Hanbury C. D., White C. L., Mullan B. P., Siddique K. H. M. 2000. A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87: 1 — 27.
- Hussain M., Chowdhury B., Haque R., Lambein F. 1997. Effect of water stress, salinity, interaction of cations, stage of maturity of seeds and storage devices on the ODAP content of *Lathyrus sativus*. In: Tekle Haimanot, R., Lambein, F., *Lathyrus and Lathyrism, a Decade of Progress*. University of Ghent, Belgium: 107 — 112.
- Jeswani L. M., Lal B. M., Prakesh S. 1970. Studies on the development of low neurotoxin lines in *Lathyrus sativus* (Khesari). *Curr. Sci.* 22: 518.
- Mehra R.B., Raju D. B., Himabindu K. 1995. Evaluation and utilization of *Lathyrus sativus* collection in India. In: *Lathyrus Genetic Resources in Asia*. Proceedings of a Regional Workshop, 27-29 December 1995. Indira Gandhi Agricultural University, Raipur, India: 37 — 43.
- Murray M. G., Thompson W.F. 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321 — 4325.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USA* 76: 5269 — 5273.
- Rao S. L. N. 1978. A sensitive and specific colorimetric method for determination of  $\alpha,\beta$ -diaminopropionic acid and *Lathyrus sativus* neurotoxin. *Anal. Biochem.* 86: 386 — 395.
- Roy P. K., All K., Gupta A., Barat G. K., Mehta S. L. 1993.  $\beta$ -N -oxalyl-L - $\alpha,\beta$ -diaminopropionic acid in somaclones derived from internode explants of *Lathyrus sativus*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2: 9 — 13.
- Rybiński W. 2003. Mutagenesis as a tool for improvement of traits in grasspea (*Lathyrus sativus*). *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 3: 27 — 32.
- Rybiński W., Grela E.R. 2007. Zróżnicowanie genetyczne cech i składu chemicznego nasion lędźwianu siewnego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 517: 613 — 627.
- Santha I.M., Mehta S.L. 2001. Development of low ODAP somaclones of *Lathyrus sativus*. *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 2: 42.
- Spencer P.S., Ludolph A., Dwivedi M.P., Roy D.N., Hugon J., Schaumburg H.H. 1986. Lathyrism: evidence for role of the neuroexcitatory amino acid BOAA. *Lancet* 2: 1066 — 1067.
- Spencer P.S., Ludolph A.C., Kisby G.E., 1993. Neurologic diseases associated with use of plant components with toxic potential, *Environ. Res.* 62: 106 — 113.
- Studziński T., Grela E.R. 1997. Składniki przeciwżywniowe nasion lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) i mechanizmy ich szkodliwego działania. Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Lędźwian siewny – agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi”. Radom, 9-10 czerwca 1997: 72 — 79.
- Vaz Patta M. C., Skiba B., Pang E. C. K., Ochatt S. J., Lambein F., Rubiales D. 2006. *Lathyrus* improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica* 147: 133 — 147.
- Waghmare V. N., Mehra R. B. 2000. Induced mutation in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 1: 21 — 24.