

WOJCIECH RYBIŃSKI ¹
KATARZYNA PANKIEWICZ ¹
JAN BOCIANOWSKI ²
MICHAŁ RĘBARZ ¹

¹Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

²Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Analiza wybranych cech na poziomie fenotypowym i molekularnym u dwu- i wielorzędowych linii podwojonych haploidów jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.)

Analysis of some traits on phenotypic and molecular level for two- and multi-rowed doubled haploids of spring barley (*Hordeum vulgare* L.)

W wyniku wcześniejszych prac wykonanych w Pracowni Genetyki Ilościowej IGR PAN w Poznaniu uzyskano linie podwojonych haploidów metodą *H. bulbosum*, z wykorzystaniem traktowań mutagennych ziarniaków mieszańców uzyskanych ze skrzyżowania dwóch odmian jęczmienia jarego: dwurzędowej odmiany Maresi i sześciorzędowej odmiany Klimek. Zmienność na poziomie fenotypowym analizowano na podstawie doświadczenia polowego a na poziomie molekularnym poprzez ocenę podobieństwa genetycznego przy zastosowaniu markerów RAPD. Wykorzystując jedenaście wybranych wcześniej starterów PCR-RAPD uzyskano łącznie 87 produktów amplifikacji, z czego 87,4% wykazywało polimorfizm. Stwierdzono znaczny polimorfizm w grupie linii otrzymanych z mieszańców, których ziarniaki poddawano działaniu mutagenu. Wykazano także, że linie w tej grupie w porównaniu z grupą linii kontrolnych charakteryzują się większym zróżnicowaniem na poziomie fenotypowym, pod względem analizowanych cech. Większe zróżnicowanie linii DH w grupie z mutagenem w porównaniu z grupą kontrolną wykazane na poziomie fenotypowym i w mniejszym stopniu na poziomie molekularnym wskazuje, że zmienności rekombinacyjnej utrwalonych mieszańców DH towarzyszy dodatkowa zmienność mogąca wynikać z efektów mutacyjnych wywołanych działaniem mutagenu.

Słowa kluczowe: jęczmień jary, linie podwojonych haploidów, indukowanie mutacji, podobieństwo genetyczne, RAPD, zmienność fenotypowa

Variability of some quantitative morphological traits and RAPD markers was studied in spring barley doubled haploid (DH) lines obtained earlier in the Department of Quantitative Genetics (Institute of Plant Genetics in Poznań) with use of the *Hordeum bulbosum* method. Twenty lines were derived after mutagenic treatment of seed set on F₁ hybrids between the two-rowed cultivar Maresi and the six-rowed one Klimek. Another twenty lines produced from the same F₁ material without mutagens served as the control. Variation of the morphological traits was estimated basing on field trial data. In the

molecular studies eleven PCR-RAPD primers were applied and 87 amplification products were obtained; 87.4% of them were polymorphic. The DH lines obtained with mutagenic treatment showed higher variability of the quantitative traits than the control ones. The same was true, however less distinct, for variability on the molecular level. It indicates, that apart from the variation coming from recombination, an additional variation has been expressed, which may be attributed to the mutation effects.

Key words: genetic similarity, lines of doubled haploids, mutation induction, phenotypic variation, RAPD, spring barley

WSTĘP

We współczesnej uprawie jęczmienia z jednej strony od hodowców oczekuje się wytwarzania nowych wysokoprodukcyjnych odmian o dobrych cechach technologicznych (Czembor, 1989, 1997), a z drugiej strony obserwowane jest niekorzystne zjawisko genetycznego zawężenia i ujednolicenia odmian (Czembor i Czembor, 2003). Stąd poszerzenie zmienności genetycznej, między innymi poprzez korzystanie z prymitywnych odmian miejscowych i dostępnych materiałów kolekcyjnych, jest w pełni uzasadnione.

Jednym z zasadniczych warunków przeprowadzenia efektywnej selekcji roślin uprawnych jest uzyskanie możliwie szerokiej zmienności genetycznej cech. W wielu wypadkach wąska pula genowa stojąca do dyspozycji hodowcy jest głównym czynnikiem limitującym efektywność wyboru nowych wartościowych materiałów wyjściowych. Oprócz coraz powszechniej stosowanych metod inżynierii genetycznej, zarówno rekombinacje, jak i mutacje pozostaną nadal zasadniczymi czynnikami poszerzającymi istniejącą w określonym gatunku zmienność genetyczną cech. Dotyczy to w szczególności indukowania zmienności mutacyjnej, która w przypadku jęczmienia zaowocowała uzyskaniem licznych, wysokoplennych odmian (Małuszyński i in., 2000). Według Campbell i wsp. (1994) indukowane mutacje i hodowla mutacyjna są wartościowym uzupełnieniem konwencjonalnych metod w hodowli roślin i mogą zostać wykorzystane do tworzenia dodatkowej zmienności genetycznej, którą hodowca może wykorzystać w tworzeniu nowych odmian. Niewątpliwym uzupełnieniem klasycznych metod mutagenyzy jest jej wykorzystanie w systemie uzyskiwania linii podwojonych haploidów u różnych gatunków roślin uprawnych. Gametoklonalna zmienność powstająca w kulturach *in vitro* jest istotnym źródłem uzyskiwania pożądanej zmienności lecz częstotliwość genetycznie stabilnych mutantów jest często niezadawalająca. Stąd traktowania mutageniczne z zastosowaniem promieniowania lub chemomutagenów są coraz częściej wykorzystywane do generowania zmienności w pracach wykorzystujących metody kultur *in vitro* (Szarejko i in., 1991). Cytowani autorzy wskazują także na fakt, że recesywne allele indukowane przez mutagen przed lub podczas haploidalnego stadium będą homozygotami w fazie diploidalnej przy jednoczesnej ekspresji fenotypowej. Otwiera to nowe możliwości szybkiej selekcji bez komplikacji wywołanych stanem heterozygotycznym w warunkach *in vitro* czy polowych. Ponadto dla zwiększenia częstotliwości „mutacji punktowych” mutageny mogą być stosowane w różnych stadiach kultur *in vitro* (Chen, 1983).

W badaniach nad generowaniem zmienności genetycznej u jęczmienia w systemie DH, z reguły wykorzystuje się metodę kultur pylnikowych. Podstawową niedogodnością tej

metody jest bardzo duża wrażliwość haploidalnych komórek w reakcji na stosowane mutageny (głównie promienie jonizujące), co drastycznie obniżało rozwój mikrospor i kultur pylnikowych oraz efektywność zastosowanej metodyki (Laib i in., 1996). Traktując kłosa jęczmienia przed kulturą *in vitro* promieniami gamma obserwowano drastyczne zmniejszenie się liczby reagujących pylników a następnie wyraźne zmniejszenie liczby uzyskiwanych zielonych roślin, nawet wtedy kiedy dawki promieniowania były bardzo niskie (5–10 Gy), czyli 15–20 razy niższe niż przy naświetlaniu ziarniaków (Laib i in., 1996). Stosując dawkę 10 Gy nie uzyskano w ogóle zielonych roślin. Wskazuje to na dużą wrażliwość pylników na promieniowanie co znacznie ograniczało efektywność zastosowanej metodyki. Powyżsi autorzy wykazali ponadto, że stosując mutagenne traktowanie ziarniaków zamiast kłosów i wykorzystanie roślin M_1 jako donora mutacji w metodzie kultur pylnikowych, umożliwiło nie tylko zwiększenie dawki promieniowania ale także uzyskanie podobnej liczby zielonych roślin jak w kontroli i wyższą częstotliwość mutantów DH. W prezentowanej pracy jako donora mutacji wykorzystano również rośliny pokolenia M_1 , z tym, że zamiast pylników na pożywkę wykładano niedojrzałe zarodki uzyskane metoda *H. bulbosum*.

Metoda *H. bulbosum* otrzymywania linii DH znalazła szerokie zastosowanie w hodowli jęczmienia głównie z uwagi na możliwość znacznego skrócenia cyklu hodowlanego (o 2–3 lata) oraz ze względu na fakt, że pozwala ona uzyskać w krótkim czasie z dowolnej formy homozygotycznej zestaw form całkowicie homozygotycznych, których wyhodowanie metodami tradycyjnymi jest prawie niemożliwe, gdyż nawet po wielopokoleniowym chowie wsobnym utrzymuje się tzw. resztkowa heterozygotyczność (Adamski i in., 1990; Surma, 1997). W praktyce hodowlanej linii DH wyprowadzane są najczęściej z mieszańców pokolenia F_1 (Pickering i Devaux, 1992), jak i mieszańców dalszych pokoleń (Simpson i Snake, 1981; Adamski, 1993).

Celem pracy była ocena zmienności linii na poziomie fenotypowym i molekularnym w grupie linii DH z wykorzystaniem mutagenu w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto podjęto próbę określenia, czy obok utrwalonej zmienności rekombinacyjnej wystąpiła dodatkowa zmienność mogąca wynikać z efektu indukowania mutacji.

MATERIAŁ I METODY

Linie podwojonych haploidów uzyskane w metodzie *H. bulbosum* (z wykorzystaniem przed kulturą *in vitro* ziarniaków mieszańców traktowanych mutagenami) otrzymano ze skrzyżowania dwóch odmian jęczmienia jarego: dwurzędowej odmiany Maresi i sześciorzędowej odmiany Klimek. Linie DH uzyskane bez uprzedniego traktowania ziarniaków mieszańców mutagenem stanowiły kombinację kontrolną. Do realizacji badań wybrano 40 linii, z których 20 było traktowanych mutagenami (w zakresie numeracji od 61–96), a pozostałe 20 stanowiło kombinację kontrolną bez stosowania mutagenu (w zakresie numeracji od 1–60). W obu grupach znajdowała się ta sama liczba linii dwu- i wielorzędowych. Zmienność na poziomie fenotypowym analizowano na podstawie doświadczenia polowego. Ziarniaki obu grup linii DH wysiewano metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach na poletkach o powierzchni 1 m² w rozstawie 15 × 5

cm. Po zbiorze dla 10 roślin z każdego poletka określano wysokość roślin, długość kłosa, liczbę kłosów z rośliny, liczbę i masę ziaren w kłosie, liczbę i masę ziaren z rośliny oraz masę 1000 ziaren. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie określając wartości minimalne, średnie, maksymalne, wariancję i współczynnik zmienności. Przeprowadzono analizę wariancji dla poszczególnych cech. Współzależność poszczególnych cech określono na podstawie współczynników korelacji dla wartości średnich. Ocenę i wyniki testowania porównań średnich dla cech między grupami linii DH bez mutagenu (linie K) i z mutagenem (linie M) oraz między obydwoma grupami w zależności od rzędowości kłosa przedstawiono w formie kontrastu (Caliński i in., 1976; Ceranka i in., 1997). Podobieństwo między analizowanymi liniami DH pod względem badanych cech fenotypowych łącznie wyrażono odległościami Mahalanobisa. Rozkład średnich dla badanych cech linii DH przedstawiono w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych.

Do analiz molekularnych ziarniaki każdej z zebranych linii w doświadczeniu polowym wysiewano w szklarni do doniczek. DNA ekstrahowano z liści 3–4 tygodniowych siewek przez 15 minut w temperaturze 95°C z wyciętych korkoborem krążków liści o powierzchni 2 mm², umieszczając je w buforze TPS. Reakcje RAPD-PCR odnosiły się dla jedenastu 10 nukleotydowych starterów, wybranych wcześniej spośród 300 o losowej sekwencji. Reakcję prowadzono według protokołu: 5 min w 95°C, 45 cykli — 1 min w 94°C, 2 min w 36°C, 2 min w 72°C; 10 min w 72°C (Kuczyńska i in., 2001). Każdą reakcję przeprowadzono oddzielnie dla czterech losowo wybranych siewek DH. Elektroforezę fragmentów wykonywano przez 2,5 godziny pod napięciem 100 V w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5 mg/L (Kuczyńska i in., 2003). Współczynniki podobieństwa genetycznego analizowanych mutantów określono korzystając ze wzoru zaproponowanego przez Nei i Li, (1979). Wyliczone współczynniki umożliwiły hierarchiczne grupowanie obiektów metodą średnich połączeń. Wyniki przedstawiono w formie dendrogramu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przedstawione w tabeli 1 wartości średniego kwadratu wskazują na istotne zróżnicowanie obiektów (linii DH) pod względem badanych cech, które były przyczynkiem do dalszych wnioskowań statystycznych. Z uwagi, że analizowane linie pochodziły z dwóch grup, a mianowicie z grupy kontrolnej K (bez wykorzystania mutagenu) oraz z grupy z użyciem mutagenu (M), charakterystykę statystyczną przeprowadzono dla każdej z analizowanych cech w każdej z obu grup linii DH (tab. 2). Wartości średnich dla każdej z cech badanych linii łącznie z wyjątkiem cechy wysokości roślin były wyższe dla linii M niż K. Różnice te były szczególnie widoczne dla liczby i masy ziaren z rośliny, a w mniejszym stopniu dla liczby i masy ziaren z kłosa oraz masy 1000 ziaren. Interesujące są również wartości skrajne. Pod względem wysokości roślin wartości minimum i maksimum dla linii K i M wynosiły odpowiednio od 51,4 do 101,2 cm i 38,6 do 82,8 cm.

Tabela 1

Średnie kwadraty z analizy wariancji dla badanych cech linii DH
Mean squares from variance analysis for the investigated traits of DH lines

| Źródło zmienności Source of variation | Liczba stopni swobody Degrees of freedom | Cechy — Traits | | | | | | | |
|--|---|---------------------------------|-------------------------------|--|--|---|---|---|---|
| | | wysokość roślin plant height | długość kłosa spike length | liczba kłosów z rośliny spikes number per plant | liczba ziaren w kłosie grain number per spike | masa ziaren z kłosa grain weight per spike | liczba ziaren z rośliny grain number per plant | masa ziaren z rośliny grain weight per plant | masa 1000 ziaren weight of 1000 grains |
| Blok Block | 2 | 25,72 | 0,1326 | 1,033* | 7,66 | 0,035 | 663,2* | 0,94 | 1,23 |
| Obiekt Objects | 39 | 305,89*** | 3,90*** | 4,10*** | 296,77*** | 0,33*** | 21414,6*** | 5,4106*** | 162,68*** |
| Błąd Error | 78 | 30,83 | 0,28 | 0,25 | 11,11 | 0,023 | 135,6 | 0,24 | 3,86 |

*Istotne na poziomie $\alpha=0,05$; Significant at $\alpha=0,05$ ***Istotne na poziomie $\alpha=0,001$; Significant at $\alpha=0,001$

Tabela 2

Charakterystyka zmienności analizowanych cech w grupach linii DH
Characteristics of traits variation in groups of DH lines

| Grupy Groups | cechy traits | min. min. | średnia mean | maks. max. | wariancja variance | współczynnik zmienności coefficient of variation |
|-------------------------------------|--|--------------|-----------------|---------------|-----------------------|---|
| Kontrola (K) Control (K) | wysokość rośliny plant height (cm) | 51,4 | 68,30 | 101,2 | 131,0 | 16,74 |
| Z mutagenem (M) With mutagen (M) | | 38,6 | 65,15 | 82,8 | 107,6 | 15,92 |
| Kontrola Control | długość kłosa spike length (cm) | 5,3 | 7,957 | 11,4 | 1,706 | 16,41 |
| Z mutagenem With mutagen | | 5,1 | 7,976 | 10,2 | 1,258 | 14,13 |
| Kontrola Control | liczba kłosów z rośliny spikes number per plant | 3,4 | 6,077 | 8,6 | 1,443 | 19,77 |
| Z mutagenem With mutagen | | 3,6 | 6,313 | 9,6 | 1,603 | 10,06 |
| Kontrola Control | liczba ziaren w kłosie grain number per spike | 18,0 | 26,95 | 60,6 | 99,91 | 37,09 |
| Z mutagenem With mutagen | | 17,6 | 28,55 | 57,4 | 109,9 | 38,72 |
| Kontrola Control | masa ziaren kłosa grain weight per spike (g) | 0,76 | 1,132 | 1,50 | 0,0271 | 14,54 |
| Z mutagenem With mutagen | | 0,59 | 1,334 | 3,06 | 0,2063 | 34,05 |
| Kontrola Control | liczba ziaren z rośliny grain number per plant | 68,4 | 106,2 | 150,8 | 467,6 | 20,36 |
| Z mutagenem With mutagen | | 57,3 | 117,4 | 224,2 | 1266,0 | 30,30 |
| Kontrola Control | masa ziaren z rośliny (g) grain weight per plant (g) | 1,54 | 4,215 | 6,38 | 1,50 | 29,06 |
| Z mutagenem With mutagen | | 1,93 | 5,017 | 9,12 | 2,09 | 29,88 |
| Kontrola Control | masa 1000 ziaren weight of 1000 grains (g) | 24,1 | 41,83 | 55,2 | 60,66 | 18,65 |
| Z mutagenem With mutagen | | 29,1 | 43,13 | 61,6 | 50,97 | 16,55 |

Uzyskanie form krótkosłomych w grupie M wskazuje na wpływ mutagenu, co jest zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na wysoką efektywność mutagenów w indukowaniu mutantów o skróconej długości źdźbła (Ehrenberg i in., 1961; Kirishnaswami, 1967; Kumar i in., 1967; Rybiński, 1981; Kapała i Rybiński, 1996). Mutant jęczmienia „Diamant” uzyskany promieniami gamma przyczynił się do „rewolucyjnej” zmiany morfotypu roślin w europejskiej hodowli jęczmienia jarego (Bouma i Ohnoutka, 1991). Ważnymi są również wartości maksimum, wyższe niż w kontroli, dla liczby kłosów z rośliny, masy ziaren z kłosa, liczby i masy ziaren z rośliny oraz masy 1000 ziaren. Wyniki te są o tyle interesujące, że w większości prac nad mutagenezą jęczmienia mutanty pod względem cech struktury plonu z reguły ustępowały swym odmianom wyjściowym (Gaul, 1963; Gottschalk i Wolff, 1983; Rybiński i in., 1993). Najwyższe wartości współczynnika zmienności obserwowano dla liczby i masy ziaren z kłosa oraz z rośliny, przy czym dla masy ziaren z kłosa oraz liczby ziaren z rośliny były one wyższe w grupie linii DH uzyskanych działaniem mutagenu. Wynika to w dużej mierze z wysokich wariancji.

Porównanie między grupami linii DH z uwzględnieniem linii dwu- i wielorzędowych w każdej z grup przedstawiono w formie kontrastu (tab. 3).

Tabela 3

Ocena wartości kontrastu dla cech fenotypowych w porównaniach między grupami linii DH
Contrast estimation for the traits in comparisons between the groups of DH lines

| Porównania Comparisons | Wysokość roślin Plant height (cm) | Długość kłosa Spike length (cm) | Liczba kłosów z rośliny Spikes number per plant | Liczba ziaren z kłosa Grain number per spike | Masa ziaren z kłosa Grain weight per spike (g) | Liczba ziaren z rośliny Grain number per plant | Masa ziaren z rośliny Grain weight per plant (g) | Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains (g) |
|--|---|---|--|---|---|---|---|--|
| Grupa kontrolna K – grupa z mutagenem M Control group K – group with use of mutagen M | 64,0** | -0,4 | -4,7* | -32,0* | -4,03*** | -224,0*** | -16,0*** | -26,0*** |
| Dwurzędowe grupa K – dwurzędowe grupa M Two-rowed lines from group K - two-rowed lines from group M | 90,0*** | -2,2 | -0,9 | -10,0 | 0,26 | 42,0 | 1,7 | 20,0** |
| Wielorzędowe grupa K – wielorzędowe grupa M Multi-rowed lines from group K - Multi-rowed lines from group M | -26,0* | -1,8 | -3,8*** | -21,4** | -4,29*** | -267,0*** | -17,71*** | -46,0*** |

* Istotne na poziomie $\alpha=0,05$; Significant at $\alpha=0,05$

** Istotne na poziomie $\alpha=0,01$; Significant at $\alpha=0,01$

***Istotne na poziomie $\alpha=0,001$; Significant at $\alpha=0,001$

W porównaniach grupy linii K z liniami M z wyjątkiem cechy długości kłosa uzyskano istotne wartości kontrastu. Oprócz wysokości roślin dla pozostałych cech wartość kontrastu

była ujemna wskazując na wyższe wartości średnich analizowanych cech dla linii M niż linii K. U form dwurzędowych istotne wartości kontrastu stwierdzono tylko dla wysokości roślin i masy 1000 ziaren. Bardziej niż linie dwurzędowe różniły się linie wielorzędowe. Nieistotne różnice obserwowano jedynie dla długości kłosa a wartości kontrastu dla wszystkich cech przyjmowały wartości ujemne. Może to wskazywać na wyższą efektywność działania mutagenu w obrębie linii wielorzędowych niż dwurzędowych.

Ocenę korelacji między cechami fenotypowymi przeprowadzono dla linii dwu- jak i wielorzędowych (tab. 4) wchodzących w skład obydwu grup.

Tabela 4

Wartości współczynnika korelacji dla cech dwurzędowych (górne wartości) i wielorzędowych linii DH (dolne wartości)
Coefficients of correlation among the analyzed traits for two- rowed (upper data) and multi-rowed DH lines

| | Wysokość roślin Plant height | Długość kłosa Spike length | Liczba kłosów z rośliny Spikes number per plant | Liczba ziaren w kłosie Grain number per spike | Masa ziaren z kłosa Grain weight per spike | Liczba ziaren z rośliny Grain number per plant | Masa ziaren rośliny Grain weight per plant |
|--|---------------------------------|-------------------------------|--|--|---|---|---|
| Długość kłosa Spike length | 0,553** | | | | | | |
| Liczba kłosów z rośliny Spikes number per plant | -0,328 | -0,430* | | | | | |
| Liczba ziaren w kłosie Grain number per spike | 0,602* | -0,285 | | | | | |
| Masa ziaren z kłosa Grain weight per spike | 0,174 | 0,637*** | -0,171 | | | | |
| Liczba ziaren z rośliny Grain number per plant | -0,110 | 0,742** | -0,023 | | | | |
| Masa ziaren rośliny Grain weight per plant | 0,766*** | 0,593*** | -0,369 | 0,396* | | | |
| Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains | 0,035 | 0,516 | 0,169 | 0,540 | | | |
| | -0,098 | -0,149 | 0,816*** | 0,153 | -0,031 | | |
| | 0,434 | 0,288 | 0,578* | 0,589* | 0,684* | | |
| | 0,449* | 0,040 | 0,311 | 0,060 | 0,547*** | 0,511** | |
| | 0,339 | 0,242 | 0,565* | 0,374 | 0,859*** | 0,890*** | |
| | 0,697*** | 0,045 | -0,188 | -0,159 | 0,720*** | -0,073 | 0,582** |
| | 0,021 | 0,116 | 0,318 | -0,113 | 0,729** | 0,321 | 0,706* |

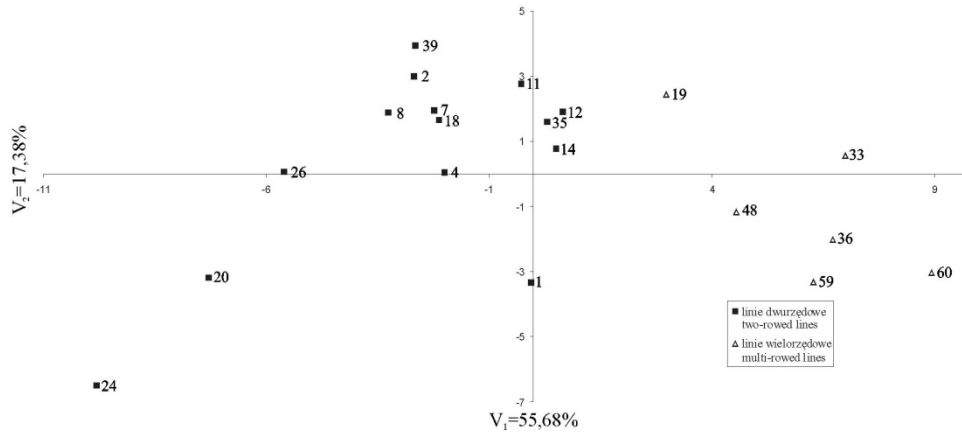
* Istotne na poziomie $\alpha = 0,05$; Significant at $\alpha = 0,05$

** Istotne na poziomie $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0,01$

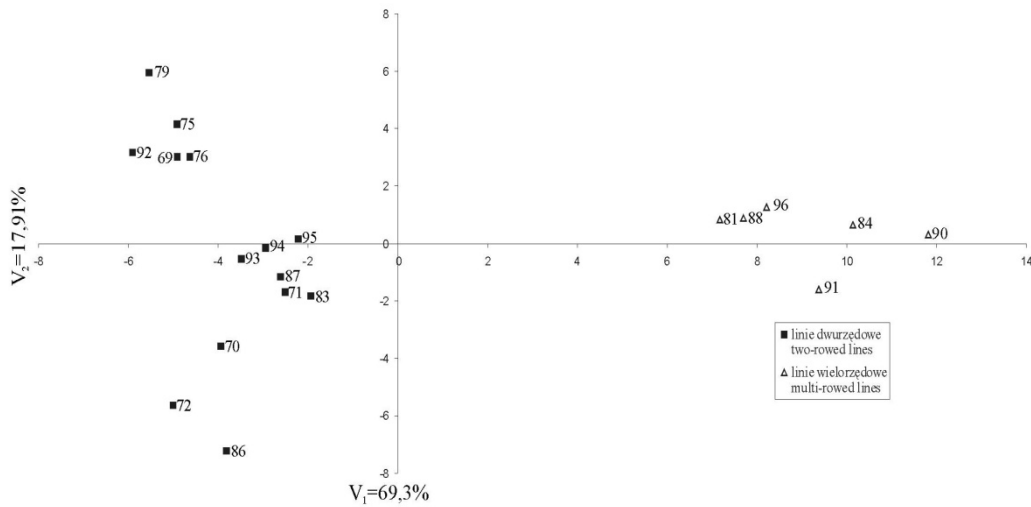
*** Istotne na poziomie $\alpha = 0,001$; Significant at $\alpha = 0,001$

Niezależnie od rzędowości kłosa istotne i dodatnie wartości współczynnika korelacji uzyskano dla liczby ziaren w kłosie i długości kłosa, liczby ziaren w kłosie i liczby ziaren z rośliny, między masą ziaren z kłosa a masą ziaren z rośliny i masą 1000 ziaren, między liczbą a masą ziaren z rośliny oraz masą ziaren z rośliny a masą 1000 ziaren. Ponadto u form wielorzędowych wysokość roślin była istotnie i dodatnio skorelowana z masą ziaren z kłosa i rośliny oraz masą 1000 ziaren. Ujemną korelację zarówno dla linii dwu- jak i wielorzędowych uzyskano dla długości kłosa i liczby kłosów z rośliny. Na uwagę zasługuje istotna korelacja między masą ziaren z kłosa a liczbą ziaren z rośliny u linii wielorzędowych.

Rozkład badanych linii DH ze względu na wszystkie cechy traktowane łącznie przedstawiono na płaszczyźnie w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych, oddzielnie dla linii K (rys. 1) oraz linii M (rys. 2).



Rys. 1. Rozkład badanych linii dwu- i wielorzędowych z grupy kontrolnej (K) w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych
Fig. 1. Distribution of two- and multi-rowed lines of the control group (K) in the two first canonical variables



Rys. 2. Rozkład badanych linii dwu- i wielorzędowych z grupy z mutagenem (M) w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych
Fig. 2. Distribution of two- and multi-rowed lines of the group with mutagenem (M) in the two first canonical variables

Dwie pierwsze zmienne kanoniczne wyjaśniają 73,06% i 87,2% całkowitej zmienności, odpowiednio dla linii K i M. Na obydwu rysunkach lewą stronę płaszczyzny zajmują linie dwurzędowe, a prawą wielorzędowe. W porównaniu z liniami K, linie M charakteryzują się zdecydowanie bardziej widocznym rozdziałem między liniami dwu- i wielorzędownymi, a także odmiennym graficznym rozkładem linii na płaszczyźnie w obydwu grupach. Wskazuje to na inny charakter zmienności cech w porównaniach między grupami. W grupie dwurzędowych linii K, najbardziej od pozostałych linii różnią się linie 24, 20 i 1, a w grupie M linie: 79, 72 i 86. W odniesieniu do wielorzędowych linii M charakteryzują się one większym skupieniem przestrzennym aniżeli linie K, a najbardziej od pozostałych linii różnią się linie 19 oraz 33. Znaczne zróżnicowanie roślin jęczmienia uzyskanych po działaniu mutagenów w porównaniu z kontrolą, przedstawione w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych, uzyskali Rybiński i Adamska (2004).

Metodę RAPD-PCR opracowaną przez dwie niezależne grupy badaczy (Williams i in., 1990; Welsh i McClelland, 1990) wykorzystano do oceny zmienności genetycznej mutantów na poziomie molekularnym. Jest to najprostsza w wykonaniu technika pozwalająca na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA na obszarze całego genomu, wykorzystując polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA (Barua i in., 1993; Hang i in., 2000, Kuczyńska i in., 2001). Stosując jedenaście starterów uzyskano 87 zamplifikowanych fragmentów DNA z których 87,4% wykazywało polimorfizm. Średnia liczba zamplifikowanych fragmentów wynosiła więc 7,9, natomiast średnio 6,9 fragmentów do użytego startera wykazywało polimorfizm (tab. 5).

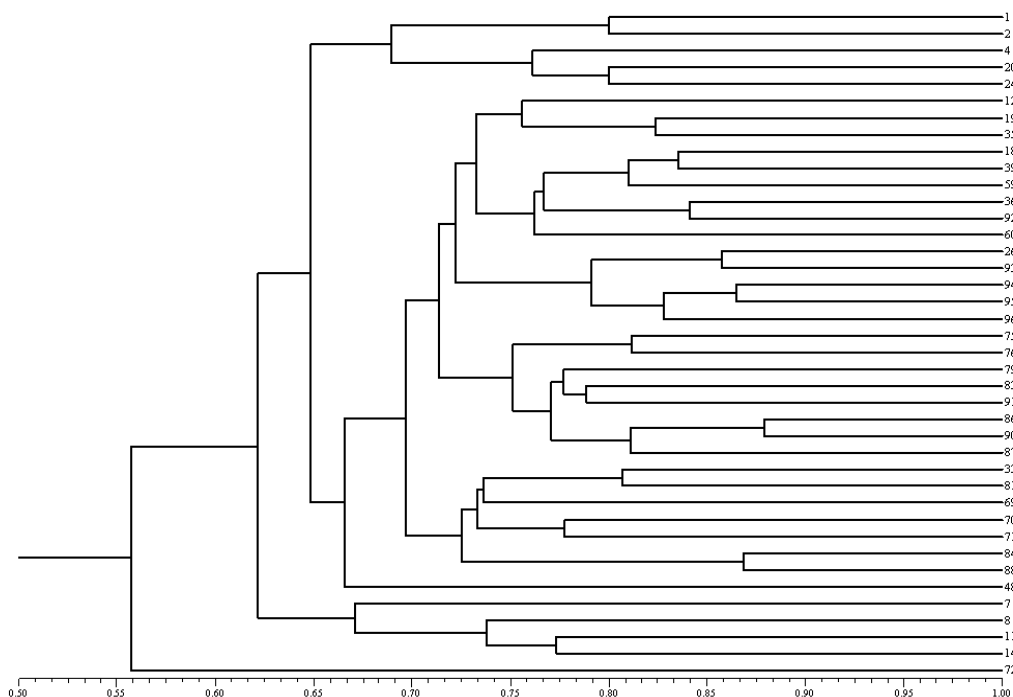
Tabela 5

Wyniki analiz dla wybranych starterów typu RAPD
Results of analysis for the chosen RAPD primers

| Numer startera Primer name | Sekwencja 5' – 3' Sequence 5' – 3' | Ogólna liczba fragmentów DNA Total number of DNA fragments | Liczba polimorficznych fragmentów DNA Number of polymorphic DNA fragments |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| GS 5 | ACGGCGTATG | 7 | 6 |
| GS 6 | GGTCGGAGAT | 11 | 11 |
| GS 7 | CACTCTCCTC | 10 | 9 |
| GS 8 | AAAGCTGCGG | 4 | 4 |
| GS 9 | TCATCCGAGG | 7 | 6 |
| GS 17 | GGTGATCAGG | 9 | 8 |
| GS 22 | GTCGCGGTCA | 8 | 8 |
| GS 32 | GTAGACCCGT | 6 | 5 |
| GS 33 | CCTTGACGCA | 8 | 6 |
| GS 43 | CCCGAAGCGA | 9 | 6 |
| GS 52 | GCGCATCAGA | 8 | 7 |

Otrzymana liczba fragmentów polimorficznych była wyższa aniżeli uzyskana u odmian jęczmienia ozimego (66,8%) przy wykorzystaniu 24 starterów (Kuczyńska i in., 2003), a także wyższa niż u łubinu gdzie przy wykorzystaniu 30 starterów liczba fragmentów polimorficznych wynosiła 39,7% (Przyborowski i Weeden, 2001). Analizując paszowe i browarne odmiany jęczmienia jarego także przy zastosowaniu metody RAPD i 24 starterów uzyskano 149 zamplifikowanych produktów, z których 45% było polimorficzne

(Kuczyńska i in., 2001). Uzyskane wyniki reakcji RAPD-PCR dla każdego z czterech powtórzeń danej linii były identyczne jak i dla każdego z użytych starterów. Hierarchiczne grupowanie linii DH na podstawie podobieństwa genetycznego przedstawiono w formie dendrogramu (rys. 3).



Rys. 3. Hierarchiczne grupowanie linii DH na podstawie podobieństwa genetycznego
Fig. 3. Hierarchical grouping of the DH lines on the basis of genetic similarity

Współczynniki podobieństwa genetycznego dla poszczególnych linii określono według Nei'a. Wyliczone współczynniki porównano z dystansem fenotypowym (wyniki doświadczenia polowego) wyrażonym odległościami Mahalanobisa. Porównań dokonano oddzielnie dla linii dwurzędowych (tab. 6) i wielorzędowych (tab. 7) w formie najdłuższych i najkrótszych odległości między parami linii. Dla form dwurzędowych spośród piętnastu porównywanych par o największym zróżnicowaniu cech (najdłuższe odległości) aż jedenaście z nich dotyczyło linii, z których jedna pochodziła z grupy K (nr 1–60) a druga z M (nr 61–96). W odniesieniu do linii wielorzędowych o najdłuższych odległościach, z wyjątkiem pary linii 19–60, wszystkie pozostałe pary dotyczyły linii K i M. Wyniki te wskazują na wystąpienie większych różnic w zmienności cech między liniami K i M niż w obrębie linii K lub M. Może to wynikać z działania zastosowanego mutagenu. Wyniki oceny dystansu fenotypowego nie korespondowały jednoznacznie z wyliczonym współczynnikiem podobieństwa genetycznego.

Tabela 6

Ocena podobieństwa między dwurzędowymi liniami DH pod względem analizowanych cech określona na podstawie odległości Mahalanobisa oraz współczynnika podobieństwa genetycznego
 Estimation of similarity between two-rowed DH lines for the analyzed traits calculated on the basis of Mahalanobis distance and coefficient of genetic similarity

| Porównywane linie* Compared lines | Najdłuższe odległości Longest distances | Współczynnik podobieństwa genetycznego Coefficient of genetic similarity | Porównywane linie Compared lines | Najkrótsze odległości Shortest distances | Współczynnik podobieństwa genetycznego Coefficient of genetic similarity |
|--------------------------------------|--|---|-------------------------------------|---|---|
| 1-72 | 25,19 | 0,58 | 7-8 | 2,45 | 0,66 |
| 24-86 | 24,53 | 0,61 | 14-35 | 2,57 | 0,61 |
| 24-72 | 24,20 | 0,57 | 75-76 | 2,67 | 0,81 |
| 1-24 | 23,27 | 0,67 | 2-8 | 2,79 | 0,59 |
| 1-26 | 22,67 | 0,70 | 35-93 | 2,85 | 0,74 |
| 1-87 | 22,18 | 0,62 | 70-71 | 3,01 | 0,78 |
| 1-11 | 21,70 | 0,64 | 71-94 | 3,04 | 0,68 |
| 1-94 | 21,52 | 0,70 | 11-87 | 3,11 | 0,55 |
| 1-69 | 21,46 | 0,64 | 14-93 | 3,16 | 0,64 |
| 1-12 | 21,41 | 0,68 | 7-18 | 3,32 | 0,62 |
| 24-94 | 21,37 | 0,68 | 87-94 | 3,37 | 0,68 |
| 1-93 | 21,31 | 0,63 | 2-7 | 3,49 | 0,50 |
| 1-86 | 21,29 | 0,66 | 11-93 | 3,50 | 0,69 |
| 24-71 | 21,18 | 0,70 | 7-11 | 3,69 | 0,73 |
| 1-39 | 21,06 | 0,67 | 71-87 | 3,71 | 0,63 |

*Linie o numerach 1 – 60 – grupa linii kontrolnych K (bez mutagenu); Lines with number 1-60 – control group K
 Linie o numerach 61 – 96 grupa linii z mutagenem (M); Lines with number 61-96 – Group of lines with use of mutagen (M)

Współczynnik korelacji dla linii o najdłuższych odległościach: $r = -0,662$; Coefficient of correlation for lines with longest distances: $r = -0,662$

Współczynnik korelacji dla linii o najkrótszych odległościach: $r = -0,170$; Coefficient of correlation for lines with shortest distances: $r = -0,170$

Mimo uzyskania ujemnej korelacji między nimi wskazującej, że w miarę wzrostu dystansu fenotypowego zmniejszało się podobieństwo genetyczne między porównywanymi liniami, wartości współczynnika korelacji nie były istotne. Mimo słabej korelacji wyróżnić można linie, które na obu poziomach zmienności charakteryzowały się niskim stopniem podobieństwa między sobą jak np. linie 1 i 72 oraz 24 i 72 spośród linii dwurzędowych i linie 48 i 96 w obrębie linii wielorzędowych. Nie można jednak wykluczyć, że szerszy wybór analizowanych cech u linii ocenianych na poziomie fenotypowym i trafniejszy dobór starterów (lub raczej wybór innej metody niż RAPD) mógłby wpłynąć na wzrost wspomnianego wcześniej współczynnika korelacji. W badaniach Kuczyńskiej i wsp. (2004) nad jęczmieniem, również z wykorzystaniem metody RAPD, wykazano niską, lecz statystycznie istotną korelację między dystansem fenotypowym (odległości Mahalanobisa) a dystansem genetycznym.

Przeprowadzona analiza statystyczna linii z grupy kontrolnej K oraz linii M wskazuje na większe zróżnicowanie w grupie linii M. Stosując chemomutageny N-nitroso-N-metylomocznik (MNU), oraz azydek sodu (NaN_3) jak i wzajemne kombinacje obu mutagenów, donorem mutacji w kulturach pylnikowych jęczmienia były rośliny pokolenia M_1 uzyskane po działaniu mutagenem na ziarniaki (Szarejko i in., 1991).

Tabela 7

Ocena podobieństwa między wielorzędowymi liniami DH pod względem analizowanych cech określona na podstawie odległości Mahalanobisa oraz współczynnika podobieństwa genetycznego
Estimation of similarity between multi-rowed DH lines for the analyzed traits calculated on the basis of Mahalanobis distance and coefficient of genetic similarity

| Porównywane linie Compared lines | Najdłuższe odległości Longest distances | Współczynnik podobieństwa genetycznego Coefficient of genetic similarity | Porównywane linie Compared lines | Najkrótsze odległości Shortest distances | Współczynnik podobieństwa genetycznego Coefficient of genetic similarity |
|-------------------------------------|--|---|-------------------------------------|---|---|
| 60-96 | 18,85 | 0,73 | 81-88 | 2,24 | 0,74 |
| 59-96 | 17,60 | 0,70 | 59-60 | 3,33 | 0,79 |
| 60-84 | 15,41 | 0,68 | 81-84 | 4,58 | 0,74 |
| 60-90 | 15,39 | 0,68 | 36-91 | 4,68 | 0,76 |
| 59-90 | 15,00 | 0,68 | 84-88 | 4,71 | 0,87 |
| 60-81 | 14,76 | 0,76 | 84-90 | 5,34 | 0,72 |
| 48-96 | 14,66 | 0,56 | 19-81 | 6,13 | 0,65 |
| 60-88 | 14,55 | 0,68 | 48-91 | 6,39 | 0,65 |
| 59-84 | 14,50 | 0,80 | 90-91 | 6,59 | 0,84 |
| 19-60 | 14,46 | 0,70 | 19-88 | 6,78 | 0,61 |
| 33-90 | 14,38 | 0,69 | 84-96 | 6,91 | 0,74 |
| 59-88 | 13,25 | 0,78 | 48-88 | 6,97 | 0,65 |
| 59-81 | 13,24 | 0,70 | 36-48 | 7,13 | 0,65 |
| 33-96 | 12,94 | 0,71 | 33-36 | 7,20 | 0,73 |
| 19-90 | 12,92 | 0,72 | 33-59 | 7,24 | 0,72 |

Linie o numerach 1 – 60 - grupa roślin kontrolnych (K), Lines with number 1-60 – control group (K)

Linie o numerach 61 – 96 - grupa roślin z mutagenem (M); Lines with number 61-96 – group of lines with use of mutagen (M)

Współczynnik korelacji dla linii o najdłuższych odległościach: $r = -0,219$; Coefficient of correlation for lines with longest distances: $r = -0,219$

Współczynnik korelacji dla linii o najkrótszych odległościach: $r = -0,433$; Coefficient of correlation for lines with shortest distances: $r = -0,433$

Podobnie jak cytowani wyżej autorzy, wysoką częstotliwość uzyskiwania mutantów DH z wykorzystaniem kultury pylnikowej obserwował Umba Di-Umba i wsp. (1991), gdzie donorem mutacji były rośliny pokolenia M_1 . W uzyskanym materiale pojawiały się mutanty karłowe, półkarłowe oraz o pojedynczym źdźble. W badaniach Laib i wsp. (1996), gdzie donorem mutacji w kulturze pylnikowej jęczmienia były również rośliny pokolenia M_1 , częstotliwość uzyskiwanych mutantów wynosiła 25%, a wśród homozygotycznych mutantów występowały siewki typu *viridis*, mutanty *eceriferum*, formy karłowe i półkarłowe. W przytoczonych wyżej pracach materiał wyjściowy do indukowania mutacji stanowiły odmiany jęczmienia jarego. W prezentowanej przez nas pracy materiałem wyjściowym były mieszańce, a zastosowana metoda *H. bulbosum* umożliwiła szybką homozygotację i utrwalenie zmienności rekombinacyjnej. Na podstawie uzyskanych wyników wskazujących na zwiększenie zmienności w liniach DH uzyskanych po działaniu mutagenu (linie M) można wnioskować, że zmienności rekombinacyjnej towarzyszyła dodatkowa zmienność mogąca wynikać z indukowania mutacji. Uzyskane w ten sposób linie DH, prezentujące obydwa rodzaje zmienności, mogą być wartościowym, w pełni homozygotycznym materiałem wyjściowym w pracach hodowlanych nad jęczmieniami jarym.

WNIOSKI

1. Przedstawione wartości średniego kwadratu wskazują na statystycznie istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów (linii DH). Wartości średnich dla poszczególnych cech z wyjątkiem wysokości roślin były wyższe dla linii z grupy z mutagenem, a zakres wartości skrajnych (minimum-maksimum) dla niektórych cech był szerszy aniżeli u linii w grupie kontrolnej. Uzyskanie form krótkosłomych w grupie linii z mutagenem wskazuje na efektywne działanie mutagenu w systemie uzyskiwania linii DH, w tym wypadku w kierunku skrócenia długości źdźbła.
2. Graficzny obraz przestrzenny położenia linii DH na płaszczyźnie w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych wskazuje na odmienne położenie linii w zależności nie tylko od rzędowości kłosa, ale także w zależności od tego czy obiekty pochodziły z grupy kontrolnej czy z grupy z zastosowaniem mutagenu. Obserwowane różnice wynikać mogą ze zmian wartości badanych cech wywołanych aktywnością mutagenu w systemie DH.
3. Wykorzystanie techniki RAPD z użyciem jedenastu starterów pozwoliło uzyskać 87 zamplifikowanych fragmentów DNA, z których 87,4 % wykazywało polimorfizm przy średnio 7,9 fragmentach w przeliczeniu na starter i 6,9 fragmentach wykazujących polimorfizm w stosunku do użytego startera.
4. Mimo uzyskania ujemnej zależności między dystansem fenotypowym, wyrażonym odległościami Mahalanobisa, a wartością współczynnika podobieństwa genetycznego, uzyskana korelacja była nieistotna. W porównaniach wielu par linii zmienność na poziomie fenotypowym nie korespondowała ze zmiennością analizowaną na poziomie molekularnym. Nie można jednak wykluczyć, że szerszy zakres analizowanych cech jak i trafniejszy dobór starterów a głównie wybór innej metody niż RAPD pozwoliłby uzyskać wyższy i istotny współczynnik korelacji między obydwoma analizowanymi poziomami zmienności.
5. Większe zróżnicowanie linii DH uzyskanych z wykorzystaniem mutagenu w porównaniu z liniami kontrolnymi, wykazane na poziomie fenotypowym i w mniejszym stopniu na poziomie molekularnym wskazuje, że zmienności rekombinacyjnej utrwalonych mieszańców DH towarzyszy dodatkowa zmienność mogąca wynikać z efektów mutacyjnych wywołanych działaniem mutagenu.

LITERATURA

- Adamski T. 1993. Wykorzystanie linii podwojonych haploidów w analizie statystyczno-genetycznej cech ilościowych. Instytut Genetyki Roślin, Poznań 1993. Seria: Rozprawy i Monografie 2: 1 — 61.
- Adamski T., Jeżowski S., Majewska T., Surma M. 1990. Efektywność metody bulbosowej w zależności od genotypu *Hordeum vulgare* i *Hordeum bulbosum*. Hodowla Roślin 4-5: 1 — 5.
- Barua U. M., Chalmers K. J., Hackett C. A., Thomas W. T. B., Powell W., Waugh R. 1993. Identification of RAPD markers linked to the *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. Heredity 71: 177 — 184.
- Bouma J., Ohnoutka Z. 1991. Importance and application of the mutant "Diamant" in spring barley breeding. In: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. Proc. of a symposium, Vienna, 18-22 June 1990. International Atomic Energy Agency, Vienna 1991, Vol.1: 127 — 133.

- Caliński T., Dyczkowska A., Kaczmarek Z. 1976. Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 5: 77 — 113.
- Campbell C. G., Mehra R. B., Agrawal S. K., Chen Y. Z., El Moneim B., Khawaja H. I. T., Yadov C. R., Tay J. U., Araya W. A. 1994. Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica* 37, 167 — 175.
- Ceranka B., Chudzik H., Czajka S., Kaczmarek Z. 1997. Wielozmienna analiza wariancji dla doświadczeń wieloczynnikowych. Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 6: 51 — 60.
- Chen Y. 1983. Anther and pollen culture of rice in China, Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crops Improvement, Science Press, Beijing and Manila: 11 — 26.
- Czembor H. J. 1989. Stan i perspektywy hodowli w Polsce. *Biul. IHAR* 171/172: 5 — 14.
- Czembor H. J. 1997. Hodowla jęczmienia w Polsce i Europie. *Agrotechnika i Wykorzystanie Jęczmienia, Seminarium Naukowe, Puławy, 23-24 października 1997*: 41 — 48.
- Czembor J. H., Czembor H. J., Jestin L. 2003. Określenie odporności na mączniaka w liniach wyselekcjonowanych z odmian miejscowych jęczmienia pochodzących z Nepalu. II Ogólnopolska Konferencja „Zasoby Genowe Roślin w Ochronie Różnorodności Biologicznej”, Skierniewice, 22–23 październik, Streszczenia: 128.
- Czembor H. J., Czembor J. H. 2003. Linie odmian miejscowych jęczmienia z Afryki Północnej jako źródło odporności na rdzę karłową. Ogólnopolska Konferencja „Zasoby Genowe Roślin w Ochronie Różnorodności Biologicznej”, Skierniewice, 22-23 październik, Streszczenia: 131.
- Ehrenberg L., Gustafsson A., Lundqvist U. 1961. Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas* 47: 243 — 282.
- Gaul H. 1963. Mutationen in der Pflanzenzüchtung. *Z. Pflanzenzüchtung* 50: 194 — 307.
- Gottschlak W., Wolff G. 1983. Induced Mutations in Plant Breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 7. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983: 1 — 238.
- Hang A., Burton C. S., Hoffman D. L., Jones B. L. 2000. Random amplified polymorphic primer-generated embryo DNA polymorphism among 16 North American malting barley cultivars. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58 (4): 147 — 151.
- Kapała A., Rybiński W. 1996. Zmienność ilości i jakości białka oraz zdolności plonowania u krótkosłomych mutantów jęczmienia jarego. *Biul. IHAR* 200:191 — 195.
- Kirishnaswami R. 1967. Radiation induced dwarf mutants in barley. *Curr. Sci.* 36 (12): 327 — 328.
- Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.* 42(1): 43 — 48.
- Kuczyńska A., Bocianowski J., Masojć P., Surma M., Adamski T. 2003. Zastosowanie markerów RAPD do określenia podobieństwa genetycznego odmian jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.). *Biul. IHAR* 226/227 (1): 81 — 85.
- Kuczyńska A., Bocianowski J., Surma M., Kaczmarek Z., Adamski T. 2004. Relationship between phenotypic and genetic distances in a set of barley breeding lines. In: 9th International Barley Genetics Symposium, Proceedings, J. Spunar; J. Janikowa (eds.) Brno, Czech Republic, 20–26 June 2004: 88 — 92.
- Kumar S., Bansal H.C., Singh D., Swaminathan M.S. 1967. Pathways of height reduction in induced dwarf mutation in barley. *Z. Pflanzenzüchtung* 57: 317 — 324.
- Laib Y., Szarejko I., Polok K., Małuszyński M. 1996. Barley anther culture for doubled haploid mutant production. *Mutation Breeding Newsletter* 42: 13 — 15.
- Małuszyński M., Nichterlein K., Van Zanten L., Ahloovaila S. 2000. Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA database. *Mutation Breeding* 12: 1 — 84.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USA* 76: 5269 — 5273.
- Pickering R.A., Devaux P. 1992. Haploid production: Approaches and use in plant breeding. In: *Barley Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology* (P.R. Shewry ed.). C.A.B. Int. Wallingford, UK: 519 — 547.
- Przyborowski J. A., Weeden N. F. 2001. RAPD-based assessment of genetic similarity and distance between *Lupinus* in section *Albus*. *J. Appl. Genet.* 42(4): 55 — 61.
- Rybiński W. 1981. Short-straw forms of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) obtained as a result of MNUA-induced mutations. *Genetica Polonica* 22 (3): 271 — 287.

- Rybiński W., Adamska E. 2004. Analiza zmienności genetycznej cech ilościowych u mutantów nagoziarnistych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.). Biul. IHAR 231: 297 — 305.
- Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagens in barley (*Hordeum vulgare* L.). Genetica Polonica 34 (3): 337 — 343.
- Simpson E., Snake J. W. 1981. The use of doubled haploids in a winter barley programmer. Barley Genetics IV (Proc. 4th Int. Barley Genet. Symp.). Edinburgh University Press, Edinburgh UK: 716 — 720.
- Surma M. 1997. Wykorzystanie zjawiska eliminacji chromosomów w hodowli jęczmienia. Akademia Rolnicza w Poznaniu. Seminaria Wydziału Rolniczego, Zeszyt 3: 157 — 174.
- Szarejko I., Małuszyński M., Polok K., Kilian A. 1991. Doubled haploids in the mutation breeding of selected crops. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. Proceedings of a Symposium, Vienna, 18-22 June 1990: 355 — 378.
- Umba Di-Umba, Małuszyński M., Szarejko I., Zbieszczyk J. 1991. High frequency of DH-mutants from M₁ after mutagenic treatment with MNH and sodium aside. Mutation Breeding Newsletter 38: 8 — 9.
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213 — 7218.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531 — 6535.