

**ANDRZEJ RAFALSKI****IWONA WIŚNIEWSKA****KRZYSZTOF KLIMONT<sup>1</sup>**

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

<sup>1</sup>Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

## Zmiany profilu fragmentów DNA po traktowaniu nasion grochu siewnego i fasoli promieniowaniem laserowym\*

### The changes of amplified DNA fragments profiles after laser irradiation of pea and bean seeds

Nasiona dwóch odmian fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.), Nida i Prosna oraz dwóch odmian grochu siewnego (*Pisum sativum* L. ssp. *sativum*) Agra i Cyrkon naświetlano trzema dawkami promieniowania laserowego. Analizę DNA otrzymanego z siewek badanych odmian przeprowadzono techniką PCR z zastosowaniem starterów ukierunkowanych na sekwencje styku intron-egzon genów roślinnych. Porównanie profili powielonych fragmentów DNA ujawnia wyraźny polimorfizm DNA między próbkami kontrolnymi a siewkami, wyprowadzonymi z nasion traktowanych promieniowaniem laserowym. Wyniki te wskazują, że traktowanie nasion wzrastającymi dawkami promieniowania laserowego powoduje wyraźne zmiany struktury DNA ujawniające się w okresie rozwoju generatywnego roślin. Część obserwowanych zmian wydaje się mieć charakter trwały, co wskazuje na mutagenne działanie promieniowania laserowego.

**Słowa kluczowe:** fasola, groch, nasiona, PCR, promieniowanie laserowe

The seeds of two varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Nida and Prosna and two varieties of pea (*Pisum sativum* L. ssp. *sativum*) were irradiated with three doses of laser radiation. The semirandom primers targeting semiconservative sequences of intron-exon junction of plant genes were used for PCR analysis of DNA prepared from seedlings of these varieties. The comparison of DNA amplification profiles revealed polymorphism between control and seedlings from the laser treated seeds. The results obtained indicate, that the irradiation of seeds with increased doses of laser radiation generated some changes of DNA structure, which were maintained also during vegetative growth of plants. The durability of some changes on the DNA level suggests mutagenic effects of laser radiation.

**Key words:** bean, laser radiation, PCR, pea, seeds

---

\* Praca finansowana w ramach projektu KBN 5PO6B 037 13

## WSTĘP

W ostatnich latach ukazało się szereg doniesień o korzystnym wpływie promieniowania laserowego na wartość siewną nasion roślin uprawnych, plonowanie roślin uzyskanych z nasion poddanych naświetlaniu lub zmianę elementów struktury plonu (Drozd i in., 1999; Zubal, 1990; Dziamba i Koper, 1992). Uzyskiwane efekty zależały od gatunku rośliny oraz energii dostarczanej poprzez napromieniowanie (Drozd i in., 1996; Szyrmer i in., 1998).

Jakkolwiek mechanizm biostymulacji promieniowaniem nie jest poznany, najbardziej prawdopodobny wydaje się być wpływ działania światła laserowego na stan energetyczny i metabolizm naświetlanych nasion jako bezpośrednie działanie czynnika fizycznego. Efekt działania promieniowania laserowego wydaje się mieć jednak charakter bardziej trwały, gdyż zmiany obserwuje się podczas rozwoju generatywnego roślin wyprowadzonych z nasion traktowanych tym promieniowaniem. Przy wyższych dawkach promieniowania nie jest wykluczone działanie mutagenne lub inne zmiany trzeciorzędowej struktury DNA (Rybiński i in., 1993). Perforacja ściany komórkowej pulsami promieniowania laserowego umożliwia również transformowanie komórek i chloroplastów DNA plazmidowym (Weber i in., 1991).

Badania zmian na poziomie DNA wywołanych działaniem promieniowania laserowego nie były dotychczas prowadzone, stąd uzasadnione wydaje się wykorzystanie technik molekularnych w celu wykrycia ewentualnych różnic genetycznych między siewkami wyprowadzonymi z nasion kontrolnych i siewkami z nasion traktowanych wzrastającymi dawkami promieniowania.

Metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) stwarzają możliwość szybkiej analizy różnic genetycznych. Powszechnie stosowany system RAPD z zastosowaniem starterów o sekwencji przypadkowej ma jednak ograniczoną zdolność rozdzielczą, dlatego za celowe uważa się poszukiwanie metod alternatywnych. Możliwości takie stwarza wzrost informacji o sekwencjach genomu roślinnego. Jedną z metod PCR jest system z zastosowaniem starterów o sekwencji częściowo komplementarnej do semikonserwatywnych sekwencji styku intron-egzon genów roślinnych (Brown, 1986). Uniwersalność i czułość tej metody sprawdzono w badaniach dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy i żyta, tożsamości odmianowej grochu i soi oraz poszukiwaniach markerów tolerancyjności na glin u żyta (Rafalski i in., 2000).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły nasiona dwóch odmian fasoli Nida i Prosna oraz dwóch odmian grochu siewnego Agra i Cyrkon. Nasiona badanych odmian naświetlano promieniami lasera helowo-neonowego konstrukcji Kopera i Drygały (1993) emitującego wiązkę promieni czerwonych o długości fali 632,8 nm. Naświetlanie nasion następowało podczas ich swobodnego spadku w obszarze wiązki promieniowania. W miejscu kontaktu z nasionami gęstość powierzchniowa mocy wynosiła 4 mW/cm<sup>2</sup>. Analiza DNA obejmowała próby kontrolne badanych odmian oraz nasiona naświetlane 2, 4 i 6 dawkami

promieniowania przygotowane do oceny laboratoryjnej i polowej w latach 1998–2000. Nasiona kontrolne i traktowane laserem podawano kiełkowaniu w 2–4 dni po naświetlaniu.

Preparatykę DNA przeprowadzano według metodyki opisanej przez Davisa i wsp. (1986). DNA otrzymywano z liści 20–25 siewek rosnących na pożywce płynnej przez 5–7 dni. Stężenie DNA oznaczano fluorymetrycznie zgodnie z instrukcją fluorymetru TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments).

Amplifikację fragmentów DNA przeprowadzano w układzie zawierającym w objętości 20 µl: 10 ng DNA roślinnego, 1x bufor (MBI Fermentas, Wilno), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1–1,2 µM startera i 1 jednostkę termostabilnej polimerazy (MBI Fermentas). Powielanie prowadzono w termocyklerze UNO II (Biometra, Getynga). Amplifikacja była prowadzona dwustopniowo, w pierwszych siedmiu cyklach temperatura przyłączania startera była o 2°C wyższa od wyliczonej na podstawie sekwencji i długości startera, a w następnych 33 cyklach temperaturę podwyższano o dalsze 4°C. We wszystkich cyklach powielania denaturację przeprowadzano przez 40 sek. w temperaturze 94°C, przyłączanie startera trwało 1 min., a wydłużanie łańcuchów DNA 2 min. w 72°C. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE i wizualizowano przy użyciu bromku etydyny.

Obrazy (fotografie) rozdziałów elektroforetycznych po obróbce komputerowej analizowano przy użyciu programu Fragment NT i przekształcano w układ binarny, gdzie brak fragmentu o określonym ciężarze cząsteczkowym oznaczano jako "0", a obecność fragmentu oznaczano jako "1". Dane binarne stanowiły podstawę do wyliczania współczynnika dystansu genetycznego (Nei i Li, 1979) przy użyciu programu Excel.

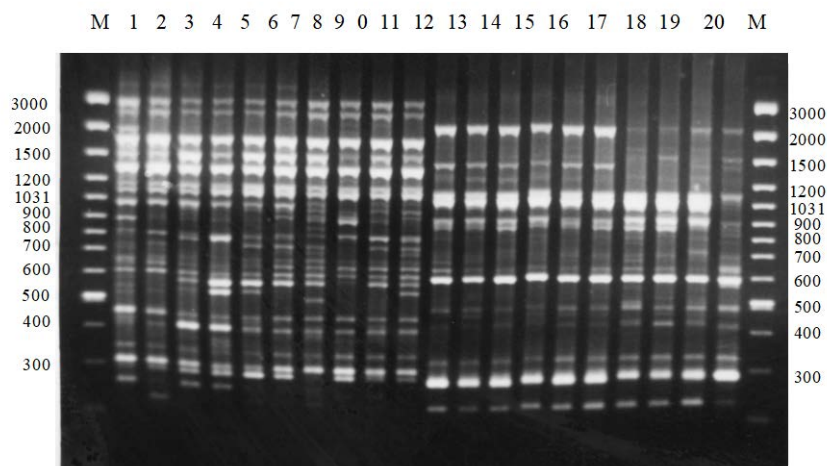
## WYNIKI

Wyniki oceny dystansu genetycznego badanych prób pochodzą z doświadczeń PCR, w których stosowano startery o sekwencjach ukierunkowanych na styki intron-egzon genów roślinnych. W badaniach dystansu genetycznego linii kukurydzy (Rafalski i in., 1998), ocenie tożsamości odmianowej partii nasion grochu siewnego (Rafalski i Wiśniewska, 2001) oraz w badaniach genetycznego zróżnicowania kolekcji odmian fasoli *Phaseolus vulgaris* i *Phaseolus coccineus* (Nowosielski, inf. ustna) stwierdzono znacznie wyższą czułość tej metody w porównaniu z powszechnie stosowanym systemem RAPD (Williams i in., 1990).

W doświadczeniach PCR zmierzających do oceny zmian na poziomie DNA wywołanych działaniem promieniowania zastosowano 8 starterów z grupy ET18, w których sekwencję styku intron-egzon 3'ACTTACCTG\*\*\*\*\*5' uzupełniono 9 zasadami o sekwencji przypadkowej, jeden starter z grupy ET15, w którym tę samą sekwencję uzupełniono 6 zasadami, 2 startery z grupy IT15 o sekwencji 3'\*\*\*\*\*CAGGTAAG5' oraz starter z grupy ET12 o sekwencji 3'TGCAGGT\*\*\*\*\*5'.

Przykłady rozdziałów elektroforetycznych fragmentów DNA powielonych przy użyciu takich starterów przedstawiono na rysunkach 1 i 2. W tabelach 1–4 przedstawiono wyniki wyliczeń dystansu genetycznego (Nei i Li, 1979) uzyskane w doświadczeniach prowadzonych w latach 1998–2000. Wyraźny dystans genetyczny między próbami

kontrolnymi a próbami traktowanymi laserem wskazuje, że działanie to wywołuje zmiany na poziomie DNA. W przypadku grochu odmiany Cyrkon (tab. 1) wzrastające dawki promieniowania powodują wzrost dystansu genetycznego w stosunku do próby kontrolnej.

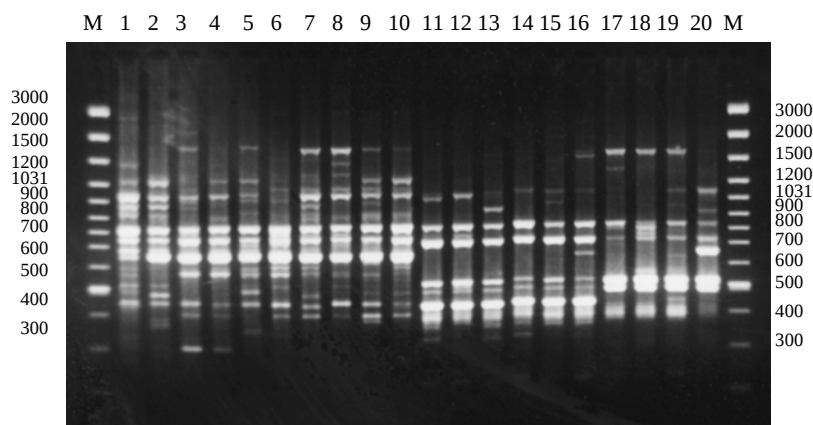


M — markery ciężaru cząsteczkowego. Fasola odm. Prosna: 1 — potomstwo z nasion kontrolnych, 2 — potomstwo z nasion traktowanych laserem, 3 — kontrola, 4 — laser 2 dawki, 5 — laser 4 dawki, 6 — laser 6 dawek. Fasola odm. Nida: 7 — kontrola, 8 — laser 2 dawki, 9 — laser 4 dawki, 10 — laser 6 dawek. Groch odm. Agra: 11 — potomstwo z nasion kontrolnych, 12 — potomstwo z nasion traktowanych laserem, 13 — kontrola, 14 — laser 2 dawki, 15 — laser 4 dawki, 16 — laser 6 dawek. Groch odm. Cyrkon: 17 — kontrola, 18 — laser 2 dawki, 19 — laser 4 dawki, 20 — laser 6 dawek. M — DNA size markers. Bean var. Prosna: 1 — progeny of control plants, 2 — progeny from laser treated seeds, 3 — control, 4 — laser 2 doses, 5 — laser 4 doses, 6 — laser 6 doses. Bean var. Nida: 7 — control, 8 — laser 2 doses, 9 — laser 4 doses, 10 — laser 6 doses. Peas var. Agra: 11 — progeny of control plants, 12 — progeny from laser treated seeds, 13 — control, 14 — laser 2 doses, 15 — laser 4 doses, 16 — laser 6 doses. Peas var. Cyrkon: 17 — control, 18 — laser 2 doses, 19 — laser 4 doses, 20 — laser 6 doses.

**Rys. 1. Wyniki powielania DNA z siewek badanych odmian grochu i fasoli przy użyciu startera ET3/18 (5'ACCTACCTGGCCAGCTGC3'). Fragment pogrubiony jest komplementarny do sekwencji styku intron-egzon**

**Fig. 1. Amplification of DNA of the studied varieties of bean and peas with the use of primer ET3/18 (5'ACCTACCTGGCCAGCTGC3'). The bases that match the intron-exon sequence are shown in bold type**

Podobna tendencja występuje w przypadku fasoli odmiany Nida (tab. 4), gdzie wzrost dystansu genetycznego prób traktowanych wzrastającymi dawkami promieniowania jest mniej wyraźny. W pozostałych odmianach (groch Agra i fasola Prosna) wzrastające dawki promieniowania laserowego nie wywołują wyraźnego wzrostu dystansu genetycznego badanych prób w stosunku do DNA otrzymanego z siewek kontrolnych (tab. 2 i 3). Tendencję potwierdza również zmniejszanie się dystansu genetycznego między próbami traktowanymi wzrastającymi dawkami promieniowania szczególnie widoczne przy ocenie spektrum powielonych fragmentów DNA prób naświetlanych 4 i 6 dawkami.



M — markery ciężaru cząsteczkowego. Fasola odm. Prosna: 1 — potomstwo z nasion kontrolnych, 2 — potomstwo z nasion traktowanych laserem, 3 — kontrola, 4 — laser 2 dawki, 5 — laser 4 dawki, 6 — laser 6 dawek. Fasola odm. Nida: 7 — kontrola, 8 — laser 2 dawki, 9 — laser 4 dawki, 10 — laser 6 dawek. Groch odm. Agra: 11 — potomstwo z nasion kontrolnych, 12 — potomstwo z nasion traktowanych laserem, 13 — kontrola, 14 — laser 2 dawki, 15 — laser 4 dawki, 16 — laser 6 dawek. Groch odm. Cyrkon: 17 — kontrola, 18 — laser 2 dawki, 19 — laser 4 dawki, 20 — laser 6 dawek. M — DNA size markers. Bean var. Prosna: 1 — progeny of control plants, 2 — progeny from laser treated seeds, 3 — control, 4 — laser 2 doses, 5 — laser 4 doses, 6 — laser 6 doses. Bean var. Nida: 7 — control, 8 — laser 2 doses, 9 — laser 4 doses, 10 — laser 6 doses. Peas var. Agra: 11 — progeny of control plants, 12 — progeny from laser treated seeds, 13 — control, 14 — laser 2 doses, 15 — laser 4 doses, 16 — laser 6 doses. Peas var. Cyrkon: 17 — control, 18 — laser 2 doses, 19 — laser 4 doses, 20 — laser 6 doses.

**Rys. 2. Wyniki powielania DNA z siewek badanych odmian grochu i fasoli przy użyciu startera ET34/15 (5'ACCTACCTGGCCGAG<sup>3</sup>). Fragment pogrubiony jest komplementarny do sekwencji styku intron-egzon**

**Fig. 2. Amplification of DNA of the studied varieties of bean and peas with the use of primer ET34/15 (5'ACCTACCTGGCCGAG<sup>3</sup>). The bases that match the intron-exon sequence are shown in bold type**

Tabela 1

**Indeksy dystansu genetycznego siewek grochu odm. Cyrkon otrzymanych z nasion traktowanych laserem. Dane uzyskane z analizy 255 fragmentów DNA**  
**The indices of dissimilarity of pea seedlings var. Cyrkon grown from laser treated seeds. The data are based on analysis of 255 DNA fragments**

|                                | Kontrola<br>Control | Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses | Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses | Laser 6 dawek<br>Laser 6 doses |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Kontrola<br>Control            | 0                   | 0,20                           | 0,23                           | 0,35                           |
| Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses |                     |                                | 0,16                           | 0,24                           |
| Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses |                     |                                |                                | 0,20                           |

Zmiany profilu powielonych fragmentów DNA mogą mieć charakter trwały lub przejściowy. W celu sprawdzenia, czy różnice w spektrum powielonych fragmentów DNA są trwałe, w latach 1999 i 2000 analizą objęto również DNA siewek uzyskanych z

potomstwa roślin traktowanych laserem (6 dawek) i potomstwa roślin kontrolnych fasoli odm. Prosna i grochu odm. Agra. W obu przypadkach stwierdzono różnice w spektrum DNA. Indeksy dystansu genetycznego wyliczone na podstawie analizy 235 fragmentów NA (Prosna) i 190 fragmentów (Agra) wynosiły odpowiednio 0,17 i 0,16 i były niższe od indeksów dystansu między kontrolą a próbami badanymi, z których DNA uzyskiwano bezpośrednio po traktowaniu laserem.

Tabela 2

**Indeksy dystansu genetycznego siewek grochu odm. Agra otrzymanych z nasion traktowanych laserem. Dane uzyskane z analizy 251 fragmentów DNA**

**The indices of dissimilarity of pea seedlings var. Agra grown from laser treated seeds. The data are based on analysis of 251 DNA fragments**

|                                | Kontrola<br>Control | Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses | Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses | Laser 6 dawek<br>Laser 6 doses |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Kontrola<br>Control            | 0                   | 0,17                           | 0,22                           | 0,20                           |
| Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses |                     |                                | 0,15                           | 0,17                           |
| Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses |                     |                                |                                | 0,14                           |

Tabela 3

**Indeksy dystansu genetycznego siewek fasoli odm. Prosna otrzymanych z nasion traktowanych laserem. Dane uzyskane z analizy 322 fragmentów DNA**

**The indices of dissimilarity of bean seedlings var. Prosna grown from laser treated seeds. The data are based on analysis of 322 DNA fragments**

|                                | Kontrola<br>Control | Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses | Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses | Laser 6 dawek<br>Laser 6 doses |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Kontrola<br>Control            | 0                   | 0,21                           | 0,17                           | 0,23                           |
| Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses |                     |                                | 0,21                           | 0,22                           |
| Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses |                     |                                |                                | 0,13                           |

Tabela 4

**Indeksy dystansu genetycznego siewek fasoli odm. Nida otrzymanych z nasion traktowanych laserem. Dane uzyskane z analizy 333 fragmentów DNA**

**The indices of dissimilarity of bean seedlings var. Nida grown from laser treated seeds. The data are based on analysis of 333 DNA fragments**

|                                | Kontrola<br>Control | Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses | Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses | Laser 6 dawek<br>Laser 6 doses |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Kontrola<br>Control            | 0                   | 0,18                           | 0,20                           | 0,25                           |
| Laser 2 dawki<br>Laser 2 doses |                     |                                | 0,22                           | 0,20                           |
| Laser 4 dawki<br>Laser 4 doses |                     |                                |                                | 0,17                           |

## DYSKUSJA

Jakkolwiek badane odmiany grochu i odmiany fasoli znacznie różnią się cechami genetyczno-hodowlanymi zmiany na poziomie DNA przy najniższej dawce promieniowania laserowego były podobne. Dystans genetyczny prób naświetlanych w stosunku do kontroli był zbliżony i wynosił od 0,17 do 0,21. Wyższe dawki promieniowania powodowały zwiększenie dystansu genetycznego w stosunku do kontroli lub też jego ustabilizowanie na poziomie około 0,2. Wyniki te wskazują, że efekt działania promieniowania przynajmniej częściowo uwarunkowany jest genetycznie. Podobne różnice genotypowe reakcji na wzrastające dawki promieniowania obserwowano w badaniach wartości siewnej nasion i plonowania 10 odmian pszenicy jarej (Drozd i in., 1999). Stwierdzono również, że wzrost poziomu wolnych rodników w napromieniowanych nasionach pszenicy jarej zależał od genotypu (Drozd i in., 1997). Zmiany w zarodkach nasion wywołane działaniem promieniowania w istotnym stopniu wpływały na jakość nasion (Szyrmer i Klimont, 1999) oraz na rozwój generatywny roślin, w tym plon nasion roślin badanych odmian (Klimont, 2001). Wpływ działania promieniowania laserowego interpretowany jest zwykle jako efekt czynnika fizycznego powodujący zmianę ekspresji genów. Zmiany takie nie powinny wpływać na podstawową strukturę DNA, a tym samym na spektrum fragmentów powielonych techniką PCR. Działanie promieniowania laserowego porównywane jest również z działaniem mutagenów chemicznych, gdzie przy odpowiednich dawkach również obserwuje się wpływ stymulujący (Rybiński i in., 1993). Wykrycie znacznych różnic, wyliczonych jako dystans genetyczny między próbami kontrolnymi a próbami z nasion poddanych napromienianiu jest jednak dość zaskakujące, tym bardziej, że DNA otrzymywano nie z nasion, lecz z części zielonych siewek wyprowadzonych z otrzymanych nasion.

Obserwowane różnice w spektrum powielonych fragmentów DNA, jakkolwiek są trudne do wyjaśnienia, wydają się być dość dobrze udokumentowane. Stosowane startery reakcji PCR nie ujawniają polimorfizmu między formami identycznymi lub blisko spokrewnionymi. Porównanie spektrum DNA dwóch pokrewnych rodów soi (*Glycine max*, L.) przy użyciu 12 starterów wykazało obecność tylko dwóch pasm polimorficznych spośród 146 powielonych fragmentów DNA. Podobnie porównanie dwóch rodów wiechliny łąkowej (*Poa pratensis*, L.), u których zjawisko apomiksji powoduje stabilizację układu genetycznego wykazało, że ich dystans genetyczny wyliczony z doświadczeń PCR (ponad 400 fragmentów DNA) wynosi tylko 0,04 (Rafalski i in., 2001).

Obserwowany polimorfizm DNA wynikać może z rearanżacji trzeciorzędowej (superhelikalnej) struktury DNA, która zmienia możliwość przyłączania starterów reakcji PCR. Podobne zmiany profilu powielonych fragmentów DNA obserwuje się po trawieniu DNA matrycowego enzymami restrykcyjnymi. Trawienie takie powodowało zanikanie niektórych fragmentów jak również pojawianie się fragmentów, które bez trawienia DNA matrycowego nie były powielane. Pojawianie się nowych fragmentów autorzy tłumaczą zmianami DNA matrycowego, które umożliwiają przyłączenie starterów w regionach uprzednio niedostępnych (Caetano-Annoles i in., 1993). Podobnie interpretuje się zmiany

profilu fragmentów DNA powielonych metodą RAPD wywołane czynnikami środowiskowymi u soi (Schatters i in., 1995).

Powyższa interpretacja nie obejmuje zmian o charakterze trwałym, na które wskazuje dystans genetyczny obserwowany w potomstwie badanych odmian. Na mutagenne działanie promieniowania laserowego wskazuje wzrost poziomu wolnych rodników w nasionach poddanych napromienianiu (Drozd i in., 1997). Obserwacje cytologiczne, przeprowadzone na dwóch odmianach pszenicy jarej ujawniły znaczne zaburzenia podziałów mitotycznych w zarodkach nasion traktowanych promieniami lasera (Szajsner, 1999). U jednej z odmian zaobserwowano istotny wzrost indeksu mitotycznego. Nieprawidłowości podziału mitotycznego ujawniające się w największym stopniu w anafazie polegały na asynchroniczności i wielobiegowości rozchodzenia się chromosomów, utracie fragmentów chromosomów oraz powstawanie mostków chromosomowych. Zmiany te określane są mianem mutagenyzy fotoindukcyjnej (Injuszyn, 1977) i stanowią, obok wpływu na stan energetyczny i procesy fizjologiczne komórek roślinnych, jeden z istotnych efektów promieniowania. Na mutagenne działanie tego promieniowania wskazują również wyniki innych prac między innymi Rybińskiego i wsp. (1993).

#### WNIOSKI

1. U wszystkich badanych odmian grochu siewnego i fasoli, analiza DNA siewek uzyskanych z nasion poddanych działaniu promieniowania laserowego wykazała ich wyraźny dystans genetyczny w stosunku do siewek z nasion kontrolnych.
2. Przy wzrastających dawkach promieniowania obserwowane zmiany dystansu genetycznego w stosunku do prób kontrolnych zależały od badanego genotypu.
3. Zmiany na poziomie DNA wywołane najwyższymi dawkami promieniowania mają charakter trwały, co wskazuje na mutagenne działanie promieniowania laserowego.

#### LITERATURA

- Brown J.W. 1986. A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucleic Acids Res.* 14: 9549 — 9559.
- Caetano-Annoles G., Bassam B.J., Gresshoff P. M. 1993. Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested: identification of markers tightly linked to supernodulation locus in soybean. *Mol. Gen. Genet.* 241: 57 — 64.
- Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F. 1986. *Basic methods in molecular biology*, Elsevier Sci. Publ., New York: 42 — 43.
- Drozd D., Szajsner H., Bielawska A. 1996. Wpływ przedsiewnej biostymulacji laserowej na wartość użytkową pszenicy jarej ze zbiorów w latach 1992–1995. *Biul. IHAR* 200: 287 — 290.
- Drozd D., Szajsner H., Jezierski A. 1997. Zastosowanie elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do oceny wpływu promieniowania laserowego na ziarniaki pszenicy jarej. *Biul. IHAR* 204: 181 — 186.
- Drozd D., Szajsner H., Laszkiewicz E. 1999. Wykorzystanie biostymulacji laserowej w uprawie pszenicy jarej. *Biul. IHAR* 211: 85 — 90.
- Dziamba J., Koper R. 1992. The influence of laser irradiation of seeds on crop of spring wheat seeds. *Fragm. Agron.* 1 (33): 88 — 93.
- Injuszyn W. 1977. Technika laserowa w służbie rolnictwa. *Nowe Rolnictwo* 21/22: 21 — 26.
- Klimont K. 2001. Wpływ światła lasera na plon roślin i wartość siewną nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) i grochu siewnego (*Pisum sativum* L. ssp. *sativum*). *Biul. IHAR* 217: 263 — 277.

- Koper R., Dygała Z. 1993. Urządzenie do obróbki przedsiewnej nasion promieniem laserowym. Patent. UP.R.P. Nr 182 598.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5269 — 5273.
- Rafalski A., Gidzińska M., Wiśniewska I. 1998. Systemy PCR w badaniach pokrewieństwa genetycznego linii kukurydzy. Biul. IHAR 208: 131 — 140.
- Rafalski A., Wiśniewska I., Gawęł M. 2000. Semirandom approach to genetic fingerprinting and screening for markers. 3<sup>rd</sup> Int. Crop. Sci. Congress, 17–2 Aug. Hamburg: 221.
- Rafalski A., Wiśniewska I. 2001. Ocena tożsamości odmian grochu siewnego techniką PCR. Biul. IHAR 217: 279 — 286.
- Rafalski A., Wiśniewska I., Klimont K. 2001. Zmiany profilu DNA po traktowaniu nasion jęczmienia promieniowaniem laserowym. Biul. IHAR 218/219: 431 — 437.
- Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagenes in barley. Genetica Polonica 34/4: 337 — 343.
- Shatters R. G., Jr., Schweder M. E., West M. H., Abdelghany A., Smith R. L. 1995. Environmental induced polymorphism detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. Seed Science Res. 5: 106 — 116.
- Szajsner H. 1999. Reakcja genotypów pszenicy jarej na stresowe oddziaływanie promieniowania laserowego. I. Badania cytologiczne. Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu 367: 45 — 65.
- Szyrmer J., Klimont K. 1999. Wpływ lasera na jakość nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.). Biul. IHAR 210: 165 — 168.
- Szyrmer J., Kolańska K., Klimont K., Drzewiecki J., Małuszyńska E., Pokojńska H., Czuba M., Stefanowska J., Łucka L. 1998. Wartość siewna nasion-wybrane kierunki badań. Zeszyty Naukowe A.R. im. H. Kołłątaja w Krakowie 330. Sesja Naukowa z. 54: 191 — 206.
- Weber G., Monajembashi S., Greulich K. O., Wolfrum J. 1991. Genetic changes induced in higher plants by a UV laser microbeam. Israel J. Bot. 40: 115 — 122.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R. K., Livak J. L., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531 — 6535.
- Zubal P. 1990. Effect of laser treatment of seeds on yields of cereals and legumes. Vedecke Prace, 23: 141 — 156.