

Acta fytotechnica et zootechnica 1
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 15–18

ANALÝZA DNA POLYMORFIZMU VYBRANÝCH LÍNIÍ KUKURICE SIATEJ (*ZEa MAYS L.*) POMOCOU PCR-ISSR MARKÉROV

DNA POLYMORPHISM ANALYSIS OF TESTED MAIZE LINES (*ZEa MAYS L.*) BY PCR-ISSR MARKERS

Alžbeta BATOVSÁ, Katarína HRUBÍKOVÁ, Milan BEŽO, Slavomíra MASNICOVÁ, Jana ŽIAROVSKÁ

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The aim of the study was to analyse the polymorphism of maize lines (*Zea mays L.*) using sequences of microsatellite DNA and PCR-ISSR markers. Two types of primers have been used. Trinucleotide unanchored primer (ATG)₆ and dinucleotide primer AGT(GT)₆ anchored at 5' end. Both primers have shown to be effective in order to distinguish a common genetic background of tested lines. Cluster analysis grouped lines having similar genetic background. The line T10 of unknown origin has been separated from the others tested lines at the value of genetic distance 0.9 by using primer (ATG)₆. Meanwhile, by using the anchored primer the T10 line has been attached to the lines X4 (Iowa Stiff Stalk Synthetic) and B8 (Iodent Reid × Lancaster Sure Crop × Iowa Stiff Stalk Synthetic) at the value of genetic distance 0.5. Because of higher specificity of anchored primer it may suggest certain similarity of genetic background among those three maize lines. The polymorphism value ranged from 64 % (unanchored primer) to 78 % (anchored primer).

Key words: lines, *Zea mays*, polymorphism, microsatellite DNA, PCR-ISSR

Kukurica siata (*Zea mays ssp. mays*) je kultúrna plodina pôvodne domestikovaná Indiánmi na území dnešného Mexika. Je to rastlina z čeľade lipnicovitých. Genóm kukurice je zdrojom výraznej variability fenotypu, ktorú je možné analyzovať na úrovni izoenzýmou alebo DNA markérov, napríklad mikrosatelitnej DNA.

Molekulárna genetika, špeciálne genetické analýzy polymorfizmu, zaoberajúce sa molekulárnymi markérami, môžu vhodne dopĺňať súčasné metódy využívané v šľachtiteľskom procese kukurice siatej. Hlavným a základným prostriedkom identifikácie a verifikácie rastlinných genotypov sú genetické markéry. Ponúkajú možnosť identifikovať a verifikovať vzorky na základe znakov odvodených z ich genetickej podstaty a tiež poznať potenciálny význam z toho vyplývajúci (Kraic, 2004).

Monitorovanie trendov v kolekciách genetických zdrojov kukurice, vyhľadávanie genetickej diverzity a identifikácia skupín geneticky podobných genotypov sú pri kukurici zvlášť dôležité. Molekulárne markéry umožňujú takéto činnosti realizovať. Spoľahlivé rozlíšenie genotypov kukurice siatej podľa rôznych hľadísk je dôležité najmä vzhľadom na skutočnosť, že údaje o genotypoch vstupujúcich do jednotlivých krížení v mnohých prípadoch chýbajú, alebo sú len veľmi ťažko dostupné. Pri kukurici sú veľmi dobre prepracované metódy analýzy izoenzýmového polymorfizmu. Kukurica je typickým príkladom využitia variability v izoenzýmových profiloch (Kraic, 2004).

V práci bola použitá technika založená na polymerázovej refazovej reakcii, ISSR analýza (Inter-Simple Sequence Repeats – zmníženie úsekov medzi jednoduchými opakovaniami nukleotidov, mikrosatelitmi). Je to efektívny systém hodnotenia genotypov rastlín. Zmníženie úsekov DNA technikou PCR-ISSR umožňuje rozlíšenie aj príbuzensky blízkych genómov, kde iné techniky neposkytujú dostatočný stupeň polymorfizmu (Hou et al., 2005).

Techniky REMAP, ISSR a SSR využívajú variabilitu mikrosatelitnej DNA. Techniky SSR a ISSR využívajú ukotvené alebo neukotvené prajmery, ktoré sú modifikované pridaním 2–4

sekvencií neopakujúcich sa báz na 3' alebo 5' konci. Technikou PCR-ISSR sa zisťuje dĺžkový polymorfizmus medzi mikrosatelitmi, pričom prajmer (-ry) tvoria poradie nukleotidov mikrosatelitu ukotvené na 5' alebo 3' konci (Wiesner et al., 2001). Úlohou modifikácie, tzv. kotvy je zabezpečiť naviazanie prajmera na určité miesto templátu, tak aby každá nová polymerizácia začínala na tej istej pozícii (Zietkiewicz, 1994; Chawla, 2004).

Materiál a metódy

Biologický materiál vo forme osiva bol získaný z firmy Zeainvent a.s. Trnava. V práci bolo použitých 5 línií kukurice siatej (*Zea mays, L.*), ktorých základná charakteristika je uvedená v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Zoznam línií kukurice siatej použitých v práci

Kód línie (1)	Základné populácie (2)
X4	SSS
C7	Idt, LSC
B8	Idt, LSC, SSS
Y9	Idt, SSS
T10	O.P. Lacaune

Vysvetlivky: SSS – Iowa Stiff Stalk Synthetic, Idt – Iodent Reid, LSC – Lancaster Sure Crop

Table 1 List of maize lines studied
(1) line code, (2) basic populations

Genomická DNA bola izolovaná z čerstvých listov kukurice siatej kultivovaných *in vitro* podmienkach na MS médiu. Vzorky na izoláciu DNA boli odoberané na piaty deň kultivácie. Zrná kukurice boli kultivované pri konštantnej teplote a svetelných podmienkach. DNA bola izolovaná podľa upraveného protoko-

Iu Rogers a Bendich (1994). Kvalita a kvantita izolovanej DNA bola stanovená fluorometricky prístrojom Qubit™.

Podmienky PCR-ISSR reakcie boli optimalizované ako z hľadiska jednotlivých komponentov reakcie, tak aj teplotného a časového priebehu. Stabilita nastavených reakčných podmienok bola overená opakovaným založením reakcie. PCR-ISSR reakcie prebiehali v tlmivom roztoku obsahujúcom 20 mmol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,0), 50 mmol.dm⁻³ MgCl₂, dNTP 10 mmol.dm⁻³, 5U Taq polymerázy a 100 μmol.dm⁻³ prajmera. V pokusoch boli použité dva typy prajmerov obsahujúcich sekvencie mikrosatelitnej DNA, trinukleotidový (ATG)₆ a dinukleotidový AGT(GT)₆, ktorý je ukotvený na 5' konci. Prajмеры boli získané z firmy Microsynth™.

Časový a teplotný profil PCR-ISSR bol nasledovný: 3 minúty pri 95 °C pre úvodnú denaturáciu, 32 cyklov, 15 sekúnd pri 95 °C na denaturáciu, 40 sekúnd pri 47 °C pre naviazanie prajmera, 2 minúty pri 72 °C pre polymerizáciu a záverečný krok 7 minút pri 42 °C pre polymerizáciu a následné ochladenie v časovom intervale 5 minút pri teplote 4 °C. PCR-ISSR reakcia prebehla v objeme 15 μl v mikroskúmvavke v termocykléry PTC-150 Minicykler (MJ Research).

Produkty polymerázovej retazovej reakcie boli rozdeľované v 2% agarózovom géle (Amresco 3 : 1, Invitrogen™) s pridaným etídiom bromidom (0,5 μg.ml⁻¹). Elektroforéza prebiehala pri napätí 110 V a pri sile prúdu 72 mA. Pre určenie veľkosti amplifikovaných fragmentov na elektroforeogramoch bol použitý markér 250 bp DNA Ladder (Invitrogen™, Life Technologies).

Elektroforeogramy boli spracované dokumentačným systémom KODAK EDAS 290 a vyhodnotené analytickým systémom obrazu KODAK 1D. Elektroforeogramy boli analyzované pri hodnote prahu citlivosti charakteristickej zachytením všetkých objektívnych prúžkov markéra.

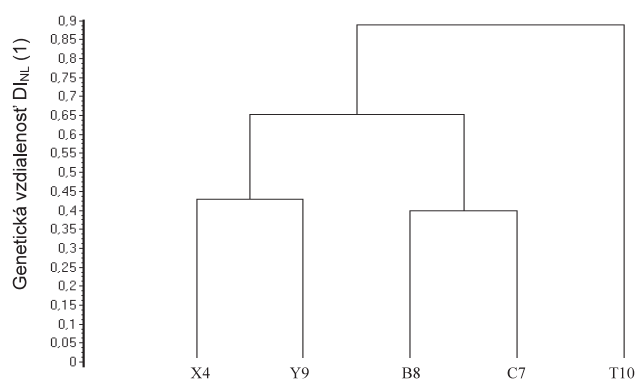
Na základe získaných fragmentov DNA rozdelených podľa veľkosti elektroforézou, bola zostavená matica prítomnosti a pozície DNA fragmentov. Z matice boli vypočítané indexy podobnosti (SI, similarity index) autorov Nei a Li (1979) podľa vzťahu $SI_{NL} = 2 \times \text{počet spoločných prúžkov v dráhach A a B} / (\text{počet prúžkov v dráhe A} + \text{počet prúžkov v dráhe B})$. Index vzdialenosti (Di, distance index) bol určený podľa vzťahu $DI_{NL} = 1 - SI_{NL}$. Vetvové členenia vzájomných závislostí boli zostrojené hierarchickou zhlukovou analýzou metódou UPGMA zoskupením zhlukov na základe genetickej vzdialenosti analyzovaných línii v štatistickom programe SYNTAX.

Výsledky a diskusia

V genómoch vyšších rastlín bolo zaznamenaných a popísaných viac ako 160 rôznych skupín opakujúcich sa sekvencií satelitnej DNA (Macas et al., 2002). Najčastejšie sa vyskytujúce opakujúce sekvencie genómu rastlín sú dinukleotidy (AC)_n a (GA)_n (Gupta and Varshney, 2000). Najčastejšie sa vyskytujúce opakujúce sekvencie trinukleotidmi sú (AAG)_n a (AAT)_n (Gupta et al., 1996).

Použitím prajmera (ATG)₆ v PCR-ISSR reakcii sme získali celkovo 12 dĺžkovo rozdielných úrovni fragmentov DNA a zaznamenali sme celkovo 39 fragmentov DNA. Použitý prajmer obsahuje menej univerzálne sekvencie pre získanie špecifických výsledkov analýzy polymorfizmu medzigénovej DNA vybraných línii testovaného biologického materiálu.

Zhlukovou analýzou bol na úrovni genetickej odlišnosti 0,40 vytvorený prvý zhluk testovaných línii (obrázok 1). Súčasťou zhluku sú línie B8 a C7. Rodokmeň týchto dvoch línii je na



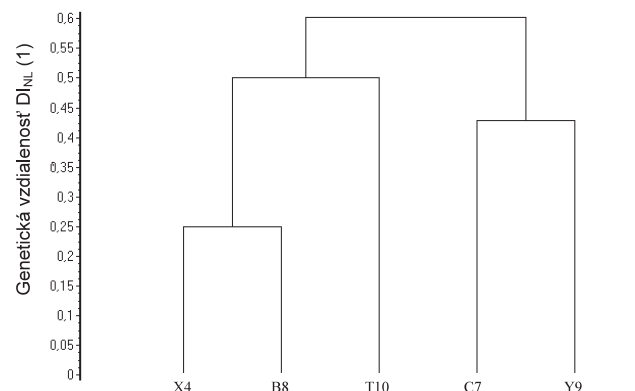
Obrázok 1 Vetvové členenie (dendrogram) analyzovaných populácií kukurice satej (*Zea mays* L.) pomocou prajmera (ATG)₆
Figure 1 Dendrogram of maize (*Zea mays* L.) populations analyzed by primer (ATG)₆ (1) distance index

75 % spoločný. Línia B8 je výsledkom hybridizačného procesu skorého a ušľachtilého kultivaru Ildt (Iodent Reid), skorého zubovitého kultivaru LSC (Lancaster Sure Crop) a SSS (Iowa Stiff Stalk Synthetic). Línia C7 je výsledkom kríženia Ildt x LSC. Na úrovni genetickej odlišnosti 0,43 boli spojené dve línie, ktoré majú čiastočne spoločný rodokmeň, X4 (SSS) a Y9 (Ildt x SSS). Z charakteristiky biologického materiálu je známe, že väčšina Iowa Stiff Stalk Synthetic (SSS) línii má pôvod v Reid Yellow Dent (Ildt) populácii. Samostatne vyčlenenou líniou, pri úrovni odlišnosti 0,89, bola línia neznámeho pôvodu T10 (O.P. Lacaune).

Z uvedeného vyplýva, že variabilita na úrovni mikrosatelitnej DNA zaznamenaná pomocou ISSR markérov sa zdá byť dostatočnou z hľadiska porovnávania spoločného genetického pozadia analyzovaných genotypov.

Jednoduché opakujúce sa poradia nukleotidov sa často uplatňujú pri identifikácii odrôd, ako ukotvené markéry v genetickom mapovaní a v šľachtiteľskom procese. V súčasnosti sú verejne dostupné rozsiahle SSR databázy mnohých druhov rastlín (Feingold et al., 2005).

Ďalším použitým prajmerom pre analýzy polymorfizmu testovaných línii bol ukotvený dinukleotidový prajmer AGT(GT)₆. Technika ISSR využíva ukotvené alebo neukotvené prajмеры,



Obrázok 2 Vetvové členenie (dendrogram) analyzovaných populácií kukurice satej (*Zea mays* L.) pomocou prajmera AGT(GT)₆
Figure 2 Dendrogram of maize (*Zea mays* L.) populations analyzed by primer AGT(GT)₆ (1) distance index

Tabuľka 2 Prehľad veľkosti (bp) jedinečných DNA fragmentov získaných pomocou prajmera (ATG)₆

Testované línie (1)	Jedinečné DNA fragmenty (2) (bp)			
X4 (SSS)	2 714,3	817,6	339,3	–
B8 (Idt, LSC, SSS)	2 000	925,7	–	–
T10 (O.P.Laucane)	1 846,2	1 625	1 487,5	966,2
C7 (Idt, LSC)	1 578,1	1 450	364,3	–
Y9 (Idt, SSS)	2 795,5	–	–	–

bp – páry báz bp – base pairs

Table 2 Preview of size (bp) of unique DNA fragments obtained by (ATG)₆ primer
(1) tested lines, (2) unique DNA fragments

ktoré sú modifikované pridaním 2–4 sekvencií neopakujúcich sa báz na 3' alebo 5' konci. Úlohou modifikácie, tzv. kotvy, je zabezpečiť naviazanie prajmera na určité miesto templátu, tak aby každá nová polymerizácia začínala na tej istej pozícii (Zietkiewicz, 1994; Chawla, 2004).

Aj tento typ prajmera obsahujúceho sekvencie mikrosatelitnej DNA sa ukázal ako vhodný nástroj identifikácie genotypov podobného pôvodu. V porovnaní s použitým prajmerom (ATG)₆ sa v rámci zhlukovej analýzy (obrázok 2) spojili iné línie majúce minimálne 50% spoločný pôvod. Na vytvorenie jednotlivých zhlukov geneticky najmenej vzdialených línií došlo pri nižších úrovniach genetickej odlišnosti. Uvedená informácia spolu so špecifickosťou sekvencií navrhnutého prajmera, dáva predpoklad získania detailnejších výsledkov.

Identifikáciu spoločného genetického pozadia testovaných inbredných línií kukurice siatej bolo možné dosiahnuť aj aplikáciou náhodných prajmerov používaných v metóde PCR-RAPD (Bežo et al., 2007). Mikrosatelitné analýzy sú vhodným nástrojom detekcie genetického polymorfizmu jednotlivých genotypov a ich identifikáciu (Gregáňová et al., 2007).

Pri línií kukurice siatej neznámeho pôvodu, T10, sme nezaznamenali jej úplné odčlenenie od statných línií, ako v predchádzajúcom prípade. Pomocou prajmera AGT(GT)₆ bola pričlenená ku zhluku línií X4 (SSS) a B8 (Idt x LSC x SSS). K pričleneniu došlo na úrovni genetickej vzdialenosti 0,50 (DI_{NL}). Dalo by sa teda konštatovať, že táto línia neznámeho pôvodu zdieľa s uvedenými líniami 50% podobnosť na úrovni použitého markéra mikrosatelitnej DNA. I keď presná identifikácia pôvodu neznámej línie by si vyžadovala ešte ďalšie analýzy, prinajmenšom pomocou ISSR markérov a špecifického prajmera

Tabuľka 3 Prehľad veľkosti (bp) jedinečných DNA fragmentov získaných pomocou prajmera AGT(GT)₆

Testované línie (1)	Jedinečné DNA fragmenty (2) (bp)			
X4 (SSS)	1640,6	–	–	–
B8 (Idt, LSC, SSS)	562,5	–	–	–
T10 (O.P.Laucane)	2 113,6	1 546,9	1 287,5	806,5
C7 (Idt, LSC)	1 325	–	–	–
Y9 (Idt, SSS)	758,1	–	–	–

bp – páry báz bp – base pairs

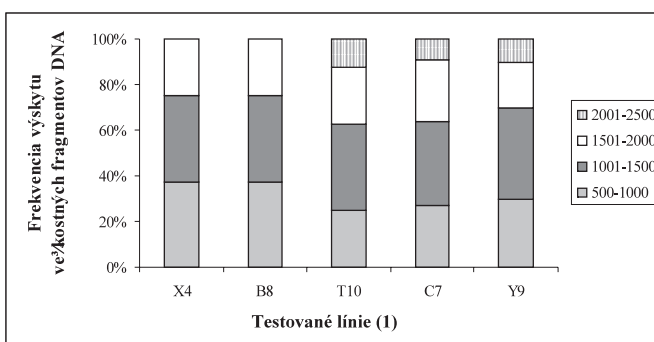
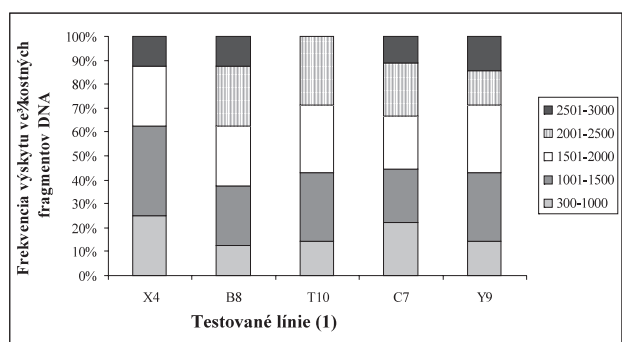
Table 3 Preview of size (bp) of unique DNA fragments obtained by AGT(GT)₆ primer
(1) tested lines, (2) unique DNA fragments

AGT(GT)₆ bolo možné zúžiť okruh potenciálneho rodokmeňa tejto línie.

Línia T10 je zaujímavá aj z hľadiska výskytu jedinečných DNA fragmentov. Ako jediná spomedzi testovaných línií, mala najvyšší počet (4) prítomných jedinečných fragmentov, ktoré boli zaznamenané oboma prajmermi.

Na základe charakteristiky amplifikačnej efektivity prajmerov môžeme konštatovať nasledovné. Pomocou trinukleotidového prajmera (ATG)₆ a na základe indexov genetickej vzdialenosti (DI_{NL}), boli analyzované línie kukurice rozdelené do troch zhlukov. Minimálna hodnota DI_{NL}, pri ktorej sa zhluky vytvárali bola 0,40 a maximálna 0,89. Celkový počet prúžkov, ktoré vznikli pri elektroforetickej separácii DNA bol 39, pričom najvyšší počet jedinečných prúžkov (4 prúžky) sa zaznamenal pri línií neznámeho pôvodu T10 (O. P. Lacaune) (tabuľka 2). Najnižší počet jedinečných fragmentov (1 prúžok) bol pozorovaný pri línií Y9 (Idt x SSS). Celkovo sa zaznamenal 64,1% polymorfizmus.

Aj pomocou ukotveného dinukleotidového prajmera AGT(GT)₆, boli analyzované línie rozdelené do troch zhlukov. Minimálna hodnota indexu genetickej vzdialenosti (DI_{NL}), na ktorej sa vytvoril prvý zhluk genetickej najmenej vzdialených línií, bola v porovnaní s neukotveným prajmerom, nižšia (DI_{NL} = 0,25). Podobne, aj maximálna hodnota DI_{NL}, bola v porovnaní s predchádzajúcim prajmerom, nižšia (DI_{NL} = 0,60). Priemerný počet prúžkov na genotyp je deväť. Celkový počet zaznamenaných jedinečných prúžkov je tiež deväť (tabuľka 4). Najvyšší počet jedinečných prúžkov mala opäť línia T10 (O. P. Lacaune), štyri prúžky. Najnižší počet jedinečných prúžkov majú tri línie kukurice X4 (SSS), B8 (Idt x LSC x SSS), Y9 (Idt x SSS) po jednom prúžku. Použitím prajmera sa zaznamenal 77,8 % polymorfizmus.

**Obrázok 3** Porovnanie frekvencie výskytu jednotlivých veľkostných fragmentov DNA nasynetizovaných pomocou trinukleotidového nešpecifického prajmera (a) a dinukleotidového ukotveného prajmera (b)**Figure 3** Comparison of frequency of occurrence of individual DNA fragments amplified by trinucleotide unspecific primer (a) and dinucleotide anchored primer (b)
(1) tested lines

Tabuľka 4 Porovnanie amplifikačnej efektivity použitých prajmerov

Prajmer (1)	Celkový počet DNA fragmentov (2)	Priemerný počet fragmentov/ genotyp (3)	Počet jedinečných fragmentov (4)	Polymorfizmus v % (5)	Minimálna hodnota DI_{NL} (6)	Maximálna hodnota DI_{NL} (7)
(ATG) ₆	39	7,8	13	64,1	0,40	0,89
AGT(GT) ₆	45	9	8	77,8	0,25	0,60

DI_{NL} – index vzdialenosti podľa autorov Nei a Li.

DI_{NL} – distance index based on Nei, Li.

Table 4 Comparison of amplification effectivity of used primers

(1) primer, (2) total number of DNA fragments, (3) average number of fragments per genotype, (4) number of unique fragments, (5) percentage of polymorphism, (6) minimal value of DI_{NL} , (7) maximal value of DI_{NL} .

Na základe celkovej amplifikačnej efektivity prajmerov (ATG)₆ a AGT(GT)₆ (tabuľka 4) použitých pri analýze polymorfizmu línií kukurice sietej, je možné konštatovať, že použité prajmery obsahujúce sekvencie mikrosatelitnej DNA, poskytujú dostatočný nástroj rozlíšenia genotypov berúc do úvahy ich genetické pozadie.

Záver

Bola sledovaná genetická rozdielnosť medzi testovanými líniami kukurice sietej (*Zea mays* L.). Päť línií pochádzalo z troch základných populácií: Iodent Reid (Idt), Iowa Stiff Stalk Synthetic (SSS), Lancaster Sure Crop (LSC). Dve z nich sú charakteristické línie pre populácie Idt a SSS a ďalšie tri línie sú krížence medzi Idt × Lsc, Idt × Lsc × SSS a Idt × SSS. Cieľom tohto výskumu bolo určiť genetický polymorfizmus pomocou dvoch PCR-ISSR prajmerov a na základe výsledkov porovnať ich genetickú príbuznosť. Línie boli rozdelené do troch skupín pomocou zhlukovej analýzy UPGMA, použitím dvoch rôznych PCR-ISSR prajmerov. Každá skupina odráža zatriedenie línií do zdrojovej populácie, alebo podobnosť ku danej populácii. Index podobnosti podľa Nei a Li poukázal na vysokú podobnosť medzi jedincami tej istej línie Iowa Stiff Stalk Synthetic (SSS) a Iodent Reid (Idt), Lancaster Sure Crop (LSC), Iowa Stiff Stalk Synthetic (SSS). Nízky index podobnosti bol pozorovaný pri línií neznámeho pôvodu O.P. Laucane, ktorá bola samostatne vyčlenená. Analýza pomocou PCR-ISSR markérov potvrdila podobnosť testovaných línií na základe ich genetického pozadia a zároveň poukázala na genetický polymorfizmus línií.

Súhrn

Cieľom práce bola analýza polymorfizmu línií kukurice (*Zea mays* L.) použitím sekvencií mikrosatelitnej DNA a PCR-ISSR markérov. Boli použité dva typy prajmerov, trinukleotidový neukotvený prajmer (ATG)₆ a dinukleotidový prajmer AGT(GT)₆ ukotvený na 5' konci. Obidva prajmery sú efektívnym nástrojom na rozlíšenie testovaných línií na základe ich genetického pozadia. Zhluková analýza vytvorila jednotlivé zhluky línií podľa ich genetickej podobnosti. Použitím nešpecifického prajmera (ATG)₆ bola línia neznámeho pôvodu T10 vyčlenená od ostatných vzoriek pri hodnote $GI_{NL} = 0,9$. Zatiaľ čo, pri použití špecifického ukotveného prajmera, bola pričlenená k líniám X4 (Iowa Stiff Stalk Synthetic) a B8 (Iodent Reid × Lancaster Sure Crop × Iowa Stiff Stalk Synthetic) pri hodnote $GI_{NL} = 0,5$, čo by mohlo naznačovať určitú mieru podobnosti genetického pozadia medzi uvedenými tromi líniami. Hodnoty polymorfizmu sa pohybovali od 64 % (neukotvený prajmer) po 78 % (ukotvený prajmer).

Kľúčové slová: línie, *Zea mays*, polymorfizmus, mikrosatelitná DNA, PCR-ISSR

Práca bola podporovaná projektmi VEGA 1/3452/06 Vývoj retrotranspozónových a mikrosatelitových markérov identifikácie odrôd a F1 jačmeňa sieteho vo vzťahu k odolnosti voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. *hordei*) (50%) a VEGA 1/0112/08 Vývoj molekulových markérov odvodených od tandemovo a rozptýlene sa opakujúcich poradí nukleotidov v genóme ľanu sieteho (50%).

Literatúra

- BEŽO, M. – MASNICOVÁ, S. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. ml. 2007. Genetic polymorphism analysis of selected maize lines by PCR- RAPD markers for prediction of combinative potential of inbred lines for hybridization with high level of heterose. In: Poľnohospodárstvo, roč. 53, 2007, č. 4, s. 161–168.
- FEINGOLD, S. – LLOYD, J. – NORERO, N. – BONIERBALE, M. – LORENZEN, J. 2005. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). In: Theor Appl Genet, vol. 111, 2005, p. 456–466.
- GREGÁNOVÁ, Ž. – VIVODÍK, M. – GÁLOVÁ, Z. 2007. Mikrosatelitné analýzy genetickej diverzity genotypov jačmeňa. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník zo 14. vedeckej konferencie. Piešťany : SCPV – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany. 2007, s. 128–129. ISBN 978-80-88872-65-8.
- GUPTA, P. K. – BALYAN, H. S. – SHARMA, P. C. – RAMESH, B. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. In: Curr Scie, vol. 70, 1996, no. 1, p. 45–54.
- GUPTA, P. K. – VARSHNEY, R. K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. In: Euphytica, vol. 113, 2000, p. 163–185.
- HOU, Y. C. – YAN, Z. H. – WEI, Y. M. – ZHENG, Y. L. 2005. Genetic diversity in barley from west China. In: Barley Genetics Newsletter, vol. 35, 2005, p. 135–144.
- HRAŠKA, Š. – BARTOŠ, P. – MARŠÁLEK, L. 1989. Špeciálna genetika poľnohospodárskych rastlín. 1. vyd. Bratislava : Príroda, 1989, 211 s. ISBN 80-07-00022-4.
- CHAWLA, H. S. 2004. Introduction to plant biotechnology. USA : Science Publishers, Inc., 2004, 538p. ISBN 1-57808-228-5.
- KRAIC, J. 2004. Genetické markéry rastlín. 1. vyd. Nitra : SPU, 2004. 67 s. ISBN 80-8069-381-1.
- MACAS, J. – MÉSZÁROS, T. – NOUZOVÁ, M. 2002. PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. In: Bioinformatics, vol. 18, 2002, no. 1, p. 28–35.
- NEI, M. – LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. In: Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 76, 1979, p. 5269–5273.
- WIESNER, I. – WIESNEROVÁ, D. – TEJKLOVÁ, E. 2001. Effect of anchor and core sequence in microsatellite primers on flax fingerprinting patterns. In: Journal of Agriculture Science, vol. 127, 2001, p. 37–44.
- ZIETKIEWICZ, E. – RAFALSKI, A. – LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. In: Genomics, vol. 20, 1994, p. 176–183.

Kontaktná adresa:

doc. Ing. Katarína Hrubíková, PhD., Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. 037/641 42 45, e-mail: katarina.hrubikova@uniag.sk