

Laura Rancāne, Inese Kokina
Daugavpils Universitāte, Latvija

MIEŽU KARTĒJOŠĀS POPULĀCIJAS IZVEIDOŠANA, IZMANTOJOT PUTEKŠŅU MACIŅU KULTŪRAS METODI

Abstract

Creation of barley mapping population by using anthers culture method. Different barley (*Hordeum vulgare L.*) genotypes were used to obtain and observe barley anther culture *in vitro*. Barley, which belongs to *Poaceae* family, is potentially useful material for various researches. Importance of anther culture method is based on barley ability to produce haploid plants. Thus, mutations in genotypes can be preserved for next generations of barley and used for making entire population. When anthers were collected and placed in Petri dishes with growth media *in vitro*, where cell dividing occurred and calli began to grow in process of androgenesis, allowing somatic embryogenesis to take place, which is significant arrangement to obtain fully regenerated, haploid plants for barley F_2 generation. The creation of barley mapping populations were performed by analyzing three two row barley species: 'Goldie', 'Meltan' and 'B 1202'. Analysis of statistic data showed differences between abilities of barley species to create callus. This can affect creation of mapping populations. The creation of double haploid barley populations, using anther technique can be utilized in genetic improvement of livestock and another enchanting programs.

Atslēgas vārdi: mieži, putekšņmaciņu kultūra, kallusi, androģenēze, haploiditāte, kartējošās populācijas

Ievads

Laika gaitā ir tikušas attīstītas neskaitāmas lauksaimniecības augu varietātes, sugas un šķirnes, kas spētu nodrošināt cilvēku un dzīvnieku vajadzību pēc pārtikas, šķiedrām un celtniecības materiāliem. Graudzāļu dzimtas (*Poaceae*) pārstāvji ir nozīmīgs un plaši izplatīts uzturā izmantojamo proteīnu, ogļhidrātu un citu barības vielu avots. (Smith and Frederiksen 2000: 38)

Sakarā ar to ekonomisko un zinātnisko nozīmi, graudzāļu genomi ir tikuši plaši pētīti pēdējos 15 gadus, izmantojot augsti attīstītas tehnoloģijas. Analogoģijas, kas pastāv DNS līmenī, padara iespējamu salīdzinošās ģenētikas izmantošanu, kas atļauj sameklēt starp genomiem noteiktus gēnus ar nezināmām secībām, ar mērķi, ka šī informācija var tikt izmantota lai spētu attīstīt jaunas varietātes vai atklātu gēnus, kas varētu būt saistīti ar globāli svarīgām pazīmēm (piemēram, pārtikas kvalitāte, izturība pret sausumu) (Dillon et al. 2005: 20).

Augu selekcijas un pavairošanas programmas pamatā iekļaujas trīs galvenie komponenti - definēt selekcijas mērķus, izstrādāt materiāla ģenētisko dažādību un identificēt labākos jaunus genotipus. Citas aktivitātes, ieskaitot vecāku materiāla izvēli, metodes, kas nepieciešamas derīgas ģenētiskas varietātes izvēlei, evolūcijas un selekcijas stratēģijas izveidošana, tieši saistās ar galvenajiem trīs komponentiem. Izvēloties selekcionēšanas gaitu, lielāka nozīme jāpievērš lauksaimniecības kultūru plašajam pielietojumu lokam.

Pēdējo 9000 gadu laikā mēs esam dominiscējuši lauksaimniecības kultūru pārtikas, šķiedru un degvielas iegūšanai (Harlan 1992: 143).

Augu selekcijas stratēģija, kas balstās uz krustošanu starp labas kvalitātes vecāku īpatņiem vienas gēnu bankas ietvaros, norit kā izlase attīstības cikla gaitā (Bernardo 1998: 473). Šī stratēģija noved pie ievērojamiem ģenētiskiem ieguvumiem, kvantitatīvās iezīmēs kas noris ar vēlamo alēļu akumulāciju, un tas padziļina atstatumu starp elitāro un neuzlaboto gēnu banku (Rasmusson and Phillips 1997: 307). Izlase attīstības cikla gaitā arī varētu palielināt ģenētisko vārīgumu (National Research Council 1993: 47), tāpēc ka tādējādi tiek zaudēti pret slimībām izturīgie gēni, attīstās augu patogēnu populācijas, samazinās reakcija uz selekciju kā ģenētiskās dažādības noplicināšanās sekas. Attīstoties jaunām augu selekcijas programmām, ģenētisko dažādību iegūšana būtu vitāli nepieciešama.

Ģenētiskās dažādības retrospektīvā analīze selekcijas darba gaitā, var nodrošināt informāciju lai izveidotu stratēģiju kas palīdzētu saglabāt interesējošās alēles un introducētu jaunas variācijas. Molekulāro marķieru dati var tikt lietoti lai novērtētu ģenētisko dažādību populācijās ar veikto selekciju. Ģenētiskās variantes nosaka liela mēroga ģeogrāfiskajos apgabalos un dažādās selekciju programmās, lietojot molekulāros marķierus kviešiem (*Triticum aestivum* L.) un miežiem (*Hordeum vulgare* L.) ir ticis novērots, ka laika gaitā ir notikusi plaša genoma variāciju pieaugums (Donini et al. 2000: 914, Christiansen et al. 2001: 1, Maccaferri et al. 2003: 783, Khalestkina et al. 2004: 123) kā arī samazinājumu (Kim and Ward 1997: 472, Russell et al. 2000: 554, Matus and Hayes 2002: 1096, Rousell et al. 2004: 924).

Mutācijas, kas var būt gan dabiskas, gan mākslīgi inducētas, nodrošina alternatīvu avotu ģenētiskām variācijām. Mutanti jau izsenis ir bijuši vērtīgs resurss augu pavairošanā (van Harten 1998: 150) un, kopš neseniem laikiem, arī augu ģenētiskajos pētījumos (Henikoff and Comai 2003: 378, Till et al. 2003: 528, Henikoff et al. 2004: 633). Tomēr, metodes, kas pieļauj apstarošanu vai ķīmisku vielu iedarbību, lai izveidotu nepieciešamo mutējošo populāciju, ietekmēs populācijas noderīgumu un lietderību ģenētiskos pētījumos (Dillon et al. 2005: 23)

Putekšņmaciņu kultūras ietekme haploīdu veidošanā

Pēdējo pāris dekāžu laikā, putekšņmaciņu kultūra, kas ir kallusu indukcija no kultivētiem putekšņmaciņiem, ir attīstījuši un izstrādājuši daudzi pētnieki. (Foroughi-Wehr et al. 1976: 200, Kao 1981: 440, Finnie et al. 1989: 111). Dubultojot hromosomas haploīdiem augiem, ir iespējams iegūt pilnīgi homozigotas līnijas īsā laika posmā, tādējādi izstrādājot metodi selekcijas efektivitātes paātrināšanai un uzlabošanai (Snape 1989: 63). Augu audu kultūrās viens no vissvarīgākajiem faktoriem ir genotipu spēja veikt androģenēzi, kas nepieciešama kallusu

attīstībai no mikrosporām. Tiek secināts, ka optimālā barotne un priekšapstrādes apstākļi katrai augu sugai variē no genotipa uz genotipu. Mēģinājumos uzlabot putekšņmaciņu kultūras reaģētspējas miežu genotipiem, ir tikušas lietotas divas dažādas pieejas. Pirmā pieeja ir - izvēlēties reaģējošus genotipus, un pielietot tos miežu selekcijas programmās. Otrā metode ir - mēģināt identificēt fizioloģiskos un dabas apstākļus, kas varētu ietekmēt putekšņmaciņu reakciju ar kultūru (Finnie et al. 1989: 111).

Augu audu kultūras tehnikas ir īpaši svarīgas gan akadēmisko jautājumu risināšanā, gan arī daudziem augu zinātnes praktiskajiem aspektiem. Pagātnē augu audu kultūras tehnikas ir tikušas pielietotas akadēmiskos totipotences pētījumos, kā arī šūnu diferencēšanas, organoģenēzes un hormonu lomas noteikšanā. Savukārt, no audu kultūrām veidojušies ģenētiski izmainītie augi, ļauj skaidrāk izprast augu molekulāro bioloģiju un gēnu regulāciju. Augu audu kultūras tehnikas ir arī īpaši nozīmīga, salīdzinoši nesēn veidojusies joma, kas tiek pielietota augu zinātnē, tai skaitā arī augu biotehnoloģijā un agrikultūrā. (Mineo 1990: 152)

Dubulthaploīdu tehnika nodrošina augu selekcionāriem tīras līnijas vienas paaudzes laikā, kas var ievērojami samazināt laiku jaunu šķirņu selekcionēšanā. Ir divas galvenās tehnikas haploīdu veidošanā graudaugiem - putekšņmaciņu/mikrosporū kultūra un hromosomu eliminācija, kas noris, pielietojot plašu hibridizāciju. Pirmā metode parasti tiek uzskatīta par vienkāršāku, efektīvāku un rentablāku nekā otrā. (Ljevnaic 2007: 5).

Galvenā putekšņmaciņu kultūras metodes iezīme ir spontānās hromosomu dubultošanās norise, kas rezultātā veicina homozigotu dubulthaploīdu veidošanos. Šie spontānie dubulthaploīdi ir fertili un citoloģiski stabili, izņemot nelielu procentu, kam ir novērojamas hromosomālas nenormālības (Ahmed et al. 1999: 143).

Ir zināms, ka putekšņmaciņu kultūras atbildes reakcija ir augsti genotipu specifiska (Orlov et al. 1993: 340, Moieni and Sarafi 1995: 248, Kondic and Šesek 1999: 62) un tipiski tā rada vairākus indivīdus no tikai dažām izvēlētajām varietātēm. Līdz ar to, viens no ieteikumiem lietojot putekšņmaciņu kultūras metodes ir tas, ka tās būtu lietojamas tikai tādās selekcijas kombinācijās, kurās vismaz viens no vecākiem ir augsti reaģētspējīgs (Zhou and Konzak 1992: 959, Tuvešson et al. 2000: 458).

Somatiskajai embriogēnei piemīt dažas priekšrocības, salīdzinot ar citām *in vitro* augu pavairošanas sistēmām, piemēram, tās augsto sekmīgo rezultātu koeficientu, iespējas materiālu saglabāt augstuma kamerās, uz embriogēni spējīgu kallusu potenciālu proporcionālu pieaugumu šķidrās suspensiju kultūrās, iespēju izmantot bioreaktorus un somatiski veidojušos

dīgļu tehnoloģijas, kā arī fakts, ka embriogēnēzes ceļā veidojušās kultūras veido mērķaudus, nepieciešamus gēnu pārnesšanai (Merkle and Dean 2000: 300).

Kallusi, kas nav radušies embriogēnētiskā ceļā, parasti nespēj veidot somatiskos embrijus. Tas varētu būt saistīts ar to attīstības stadijas un kallusa gēnu ekspresijas modeļa. Daudzās augu sugās ir tikušas novērotas atšķirības starp embriogēnēzes un citā veidā radušajiem kallusiem morfoloģiskā, fizioloģiskā, metabolisma un gēnu ekspresijas gaitā (Frey et al. 1992: 65)

Līdzīgi, daudzās sugām ir novērots, ka individuālais genotips dotajai sugai ievērojami atšķiras embriju veidošanas spējā. 15. Tādas genotipiskas atšķirības embriju veidošanā var atspoguļoties pašreizējā atšķirībā aktivēt atslēgas elementus embriogēnēzes gaitas nodrošināšanai (Merkele et al. 1995: 200)

Marķieru izmantošana kartējošās populācijas veidošanā

Mutāciju, kas izraisītas ar fizikāliem vai ķīmiskiem faktoriem, nenoteiktās iedabas rezultāts būs tas, ka katrs indivīds populācijā saturēs unikālu gēnu mutācijas skaitu variāciju. Tas nodrošinās pārlicinošu materiālu genoma analīzes veikšanai, izmantojot jaunās molekulārās tehnoloģijas. Ir vispārzināms fakts tas, ka DNS pētījumu galīgais mērķis ir noskaidrot gēna DNS secību. Tomēr, esošās genotipu pētīšanas tehnoloģijas ir kļuvušas par ievērojamu veidu kā izvairīties no DNS secību noteikšanas soļa, vai vismaz ievērojami samazināt sekvenēšanai nepieciešamo paraugu skaitu. DNS polimorfisma analīzes dabiskās un mutējošās populācijās ir daudz efektīvākas, izmantojot kapilāru elektroforēzi. (Szantai et al. 2005: 43, Davies et al. 2006: 431), kam ir uzlabotas efektivitātes, precizitātes un caurlaidīguma spējas (Tang et al. 2004: 63), salīdzinot ar gēla elektroforēzi (Vouk et al. 2000: 1188, Cordeiro et al. 2006: 146). Augstās genotipa pētīšanas tehnoloģijas, kas balstītas uz viena nukleotīda polimorfismu (VNP) vai neliela izmēra DNS ievietošanu/ izņemšanu, varētu kļūt efektīvi alternatīvie rīki tradicionālajiem marķieriem, to plašās pieejamības genomā un atvieglotās mērīšanas dēļ. VNP ir tikuši identificēti un kartēti lai nodrošinātu bagātu avotu ģenētiskajai informācijai, ar tai piemītošo potenciālu un atļautu plašāku izpratni daudzu organismu ģenētiskajā sarežģītībā. VNP lielā skaitā atrodas jebkurā genomā, tie pakļaujas augstām aprites analīzēm un tiem piemīt spēja atklāt paslēptus polimorfismus, vietās, kur citas metodes izrādās neefektīvas (Bhatramakki and Rafalski 2001: 183). Augiem neskaitāmi pētījumi ir ļāvuši saistīt VNP ar fenotipiskām iezīmēm kam piemīt agronomisks nozīmīgums, kā piemēram, betaīnaldehīda dehidrogenāzes gēna saistība ar smaržu rīsiem (Bradbury et al. 2005: 365). Vēl viena ievērojama VNP marķieru priekšrocība ir tā, ka tie atļauj viegli un nepārprotami identificēt alēles vai haplotipus. Lai gan ir tikušas izstrādātas daudzas tehniskas metodes, lai noteiktu haplotipus (Gut 2001: 480), vairākums no tām pārsvarā ir piemērotas diploīdiem

genomiem kur vienas vai abu bāžu iztrūkums norādītu homozigotāti vai heterozigotāti. (Rossi et al. 2003: 410, Aitken et al. 2004). Ģenētiskās kartes tiek plaši pielietotas augu selekcijā, lai identificētu genoma reģionus kas atbild par interesējošo pazīmi. Šāda informācija palīdz saprast vēlamās iezīmes ģenētiskos pamatus, kā arī nodrošina DNS marķierus izejmateriāla pavairošanai (Wu et al. 1992: 497).

Rezultāti

Selekcijas darbā tika izmantotas miežu šķirnes `Goldie`, `Meltan`, `B 1202`. Šķirnei `Goldie`, tika kultivēti kopumā 127 putekšņmaciņi, No visām Petri platēm tika iegūti 37 kallusi, vidēji vienā Petri platē veidojās 5,29 kallusi. Tika novērota 58,10 % varbūtība, ka Petri platē veidosies kalusi. Reģenerēto stādu kopējais skaits ir 32, ar apmēram 4,57 stādiņiem barotnē. Zaļo augu īpatsvars ir 17, vidēji 2,42 zaļie stādi vienā Petri platē. Pastāv 17,7 % varbūtība, ka barotnē veidosies dēsti, no kurus varēs izmantot zaļu augu iegūšanai.

Miežu šķirnei `Meltan` barotnēs tika izvietoti kopēji 121 putekšņmaciņu. No visām Petri platēm tika iegūti 28 kallusi, vidēji vienā Petri platē veidojās 4,00 kallusi. Tika novērota 33,29 % varbūtība, ka Petri platē veidosies kalusi. Reģenerēto stādu kopējais skaits ir 20, ar apmēram 2,86 stādiņiem barotnē. Zaļo augu īpatsvars ir 8, vidēji 1,14 zaļie stādi vienā Petri platē. Pastāv 13,8 % varbūtība, ka barotnē veidosies dēsti, no kurus varēs izmantot zaļu augu iegūšanai.

Miežu šķirnes `B 1202` barotnēs tika izvietoti kopēji 126 putekšņmaciņu. No visām Petri platēm tika iegūti 33 kallusi, vidēji vienā Petri platē veidojās 4,71 kallusi. Tika novērota 45,71 % varbūtības pastāvēšana, ka Petri platē veidosies kallusi. Reģenerēto stādu kopējais skaits ir 19, ar apmēram 2,71 stādiņiem barotnē. Zaļo augu īpatsvars ir 11, vidēji 1,57 zaļie stādi vienā Petri platē.

Diskusija

Miežu dēstu dubulthaploīdu veidošana no putekšņmaciņu kultūras ir piemērota metode kartējošās populācijas izveidošanai.

Kartējošās populācijas izveidošanai piemērotāka ir miežu šķirne `Goldie`, jo tai novērotas augstākas kallusģenēzes spējas, nekā šķirnēm `Meltan` un `B1202`. Miežu kartējošās populācijas izveidošana optimizēta un piemērota selekcijas darbam.

Bibliogrāfija

1. Ahmed, K. Z., Allam, H. Z., Moussa, A. M. (1999) Spontaneous versus colchicine-treated dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*. A, 47, Nr. 2: 137—146.

2. Aitken K, Jackson P, Piperidis G, McIntyre L. QTL identified for yield components in a cross between a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar Q165A and a *S. officinarum* clone IJ76 - 514.
http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/4/1/1752_aitkenk.htm [2011. 04. 05]
3. Bernardo, R. (1998) A model for marker-assisted selection among single crosses with multiple genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*. Nr. 97: 473–478.
4. Bhatramakki D, Rafalski A. (2001) Discovery and application of single nucleotide polymorphism markers in plants. In: Henry RJ, ed *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. Wallingford: CAB International. Pp. 179–191.
5. Bradbury L. M. T., Fitzgerald T. L., Henry R. J., Jin Q. S., Waters D. L. E. (2005) The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnology Journal*. Nr. 3: 363–370.
6. Christiansen, M. J., Andersen S. B., and Ortiz R. (2001) Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century. *Molecular Breeding*. Nr. 9: 1–11.
7. Donini P., Law J. R., Koebner R. M. D., Reeves J. C., and Cooke R. J. (2000) Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. Nr. 100: 912–917.
8. Cordeiro G, Elliott F, Henry R. (2006) An Optimised Ecotilling protocol for polyploids or pooled samples using a capillary electrophoresis system. *Analytical Biochemistry*. Nr. 355: 145–147.
9. Davies H., Dicks E., Stephens P., Cox C., Teague J., Greenman C., et al. (2006) High throughput DNA sequence variant detection by conformation sensitive capillary electrophoresis and automated peak comparison. *Genomics*. Nr. 87: 427–432.
10. Dillon S. L, Lawrence P. K, Henry R. J. (2005) The new use of Sorghum bicolor derived SSR markers to evaluate genetic diversity in seventeen Australian Sorghum species. *Plant Genetic Resources*. Nr. 3: 19–28.
11. Finnie S. J., Powell W. and Dyer A. F. (1989) The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*. Nr. 103: 110-118.
12. Foroughi-Wehr B., Mix G., Gaul H., Wilson H. M. (1976) Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung - Journal of Plant Breeding*. Nr. 77: 198-204.
13. Frey L., Saranga Y. and Bjanik J. (1992) Somatic embryogenesis in carnation. *Hortscience*. Nr. 27: 63-65.
14. Gut I. G. (2001) Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation*. Nr. 17: 475–492.
15. Harlan J. R. (1992) *Crops and man*. Madison (Wisconsin): American Society of Agronomy-Crop Science Society.
16. van Harten A. M. (1998) *Mutation breeding theory and applications*. Cambridge: Cambridge University Press.
17. Henikoff S., Comai L. (2003) Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Biology*. Nr. 54: 375–401.
18. Henikoff S., Till B. J., Comai L. (2004) TILLING: traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiology*. Nr. 135: 630–636.
19. Kao K.N. (1981) Plant formation from barley anther cultures with Ficoll media. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*. Nr. 103: 437-443.
20. Khalestkina E. K., Roder M. S., Efrenova T. T., Borner A., and Shumny V. K. (2004) The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellites markers. *Plant Breeding*. Nr. 123: 122–127.

21. Kim H. S. and Ward R. W. (1997) Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) based on RFLPs and coefficients of parentage. *Theoretical and Applied Genetics*. Nr. 94: 472–479.
22. Kondia A., Šesek S. (1999) Androgenous and regeneration abilities of homozygous and heterozygous wheat genotypes. *Genetika*. A, 31, Nr. 1: 59–64.
23. Ljevnaija B. (2007) Androgeneza različitih genotipova pšenice (*Triticum aestivum* L.) i citološke karakteristike regeneranta. *Magistarska teza*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
24. Maccaferri M., Sanguineti M. C., Donini P. and Tuberosa R. (2003) Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*. Nr. 107: 783–797.
25. Matus I. A., and Hayes P. M. (2002) Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* Nr. 45: 1095–1106.
26. Merkele S. A., Parrott W. and Flin B.S. (1995) Morphogenic Aspect of Somatic Embryogenesis. In: *Torpedoed in vitro Embryogenesis in Plant*. Dordrecht Bosta London: Kluwer Academic Publishers. Pp. 155-203.
27. Merkle S. A. and Dean J. F. D. (2000). Forest biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. Nr. 11: 298-302.
28. Mineo L. (1990) *Plant Tissue Culture Techniques*. Easton (Pennsylvania): Department of Biology.
29. Moieni A., Sarrafi A. (1995) Genetic analysis for haploid-regeneration responses of hexaploid wheat anther culture. *Plant Breeding*. Nr. 114: 247—249.
30. National Research Council. (1993) *Agricultural crop issues and policies*. Washington, DC: National Academy Press.
31. Orlov P. A., Marvrishcheva E. B., Palilova A. N. (1993) Estimation of the response to anther culturing in 60 genotypes of different wheat species. *Plant Breeding*. Nr. 111: 339—342.
32. Rasmusson, D. C. and Phillips R. L. (1997) Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. *Crop Science*. Nr. 37: 303–310.
33. Rossi M., Araujo P. G, Paulet F., Garsmeur O., Dias V. M., Chen H., et al. (2003) Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics*. Nr. 269: 406–419.
34. Rousell V., Koenig J., Beckert M. and Balfourier F. (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trend and breeding programmes. *Theoretical and Applied Genetics*. Nr. 108: 920–930.
35. Russell J. R., Ellis R. P., Thomas W. T. B., Waugh R., Provan J., Booth A., Lawrence P., Young G. and Powell W. (2000) A retrospective analysis of spring barley germplasm development from ‘foundation genotypes’ to currently successful cultivars. *Molecular Breeding*. Nr. 6: 553–568.
36. Smith C. W., Frederiksen R. A. (2000) Sorghum: origin, history, technology, and production Nr. 824. New York, NY: John Wiley and Sons.
37. Snape J. W. (1989) Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In: Mujeeb-Kazi A., Sitch L. A. eds *Second International Symposium on Genetic Manipulation in Crops*. Mexico: International Maize and Wheat Improvement Center, International Rice Research Institute. Pp. 57- 68.
38. Szantai E., Ronai Z., Szilagyí A., Sasvari-Szekely M., Guttman A. (2005) Haplotyping by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*. Nr. 1079: 41–49.
39. Tang T., Huang J. Z., Zhong Y., Shi S. H. (2004) High-throughput S-SAP by fluorescent multiplex PCR and capillary electrophoresis in plants. *Journal of Biotechnology*. Nr. 114: 59–68.

40. Till B. J, Reynolds S. H, Greene E. A, Codomo C. A, Enns L. C, Johnson J. E, et al. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research*. Nr. 13: 524–530.
41. Tuveesson S., Ljungberg A., Johansson N., Kalsson K. E., Suijs L. W., Josset J. P.(2000) Large-scale production of wheat and triticales double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding*. Nr. 119: 455—459.
42. Vouk K., Gazvoda B., Komel R. (2000) Fluorescent multiplex PCR and capillary electrophoresis for analysis of PKD1 and PKD2 associated microsatellite markers. *BioTechniques*. Nr. 29: 1187–1190.
43. Wu K., Burnquist W., Sorrels M., Tew T. L., Moore P., Tanksley S. (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics*. Nr. 83: 294–300.
44. Zhou H., Konzak C. F. (1992) Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. *Genome*. Nr. 35: 957—961.