

## MOLEKÜLER ARAŞTIRMALARA UYGUN POPULASYON GELİŞTİRME

Bülent UZUN M. İlhan ÇAĞIRGAN  
Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya / Türkiye

### Özet

Bu çalışmada moleküler genetik araştırmalarda kullanılan çeşitli populasyon tipleri tanımlanarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla kullanılan dört farklı populasyondan söz edilebilir. Bunlar; yakın izogenik hatlar, F2 populasyonu, double-haploidler ve rekombinant inbred populasyonlardır. Moleküler genetik araştırmalarda kullanılan yakın izogenik hatlar, rekombinant inbredler ve F2 populasyonları homozigot ebeveynlerin melezlenmesiyle elde edilmektedir. Ancak kendilemenin mümkün olmadığı bazı bitki türlerinde çok nadir olmakla birlikte bu populasyonlar heterozigot bireylerin melezlenmesiyle de elde edilebilir. Double-haploid populasyonlar ise, çoğunlukla anter kültürü kullanılarak tek bir polen tanesinden genomun ikiye katlanması sonucunda elde edilmektedir. Her bir populasyon tipinin zayıf veya güçlü tarafları, bunların moleküler genetik çalışmalarda seçilmelerinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, araştırmacı bitki cinsine ve araştırdığı özelliğe ve hatta elindeki mevcut şartlara bağlı olarak uygun bir populasyon belirlemeli, gerekirse birden fazla populasyon kullanarak sonuca gitmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Yakın İzogenik Hat, F2 Populasyonu, Rekombinant İnbred Hat, Double-Haploid Populasyonlar, Moleküler Marker

### Population Development for Molecular Studies

### Abstract

In this study, several types of plant populations used in molecular genetic research were described and evaluated. There are four different types of populations suited for this objective i.e., near isogenic lines, F2 populations, double-haploid populations and recombinant inbred lines. Near isogenic lines, F2 populations and recombinant inbreds have been derived from crosses between homozygous parents. However, several plant species which are intolerant to inbreeding must rely on crosses between heterozygous individuals. Double-haploids are basically obtained by regenerating plants from single pollen grains, and inducing chromosome doubling. Unique strengths and/or weaknesses of the each population type play an important role for performing molecular genetic research. Therefore, researcher should select a suitable population based on plant species, trait interested, and facilities available. It is also regarded that more than one population may be used to get targeted result when necessary.

**Keywords:** Near isogenic lines, F2 population, recombinant inbred lines, double-haploid populations, molecular marker

### 1. Giriş

Yeryüzünde tarımın başlamasıyla birlikte bitkilerde verimliliğin artmasını sağlamak insanoğlunun en önemli görevleri arasında yer almıştır. Bu görevin yerine getirilmesinde en önemli ışık kaynağı genetik bilimi olmuştur. Mendel'in bezelyelerde başlattığı genetik bilimi, günümüzde artık dev bir sektör haline gelmiştir. Agronomik olarak önemli olan genlerin klonlandığı, istenilen bitki genotiplerine aktarıldığı ve bunların yüksek kar marjlarıyla satıldığı bir dönemde bulunmaktayız. Yüksek teknolojinin ve hızla gelişen bilimin tarımda da bu denli yoğun kullanılması, giderek son yıllarda gelişmekte olan ülkelerin önüne bir var olma koşulu

olarak çıkmaktadır. Buna paralel olarak tüketici isteklerinin artması, gelişmekte olan ülkelerin tarım politikalarını ve araştırma süreçlerini gözden geçirmesini zorunlu kılmıştır. Artık birim alandan alınacak en ekonomik yüksek verim çevre, diğer üretim kaynakları, ve girdilerin en iyi, en zararsız ve uzun dönemde verim düşüklüğüne neden olmadan, sürekli üretimi sağlayacak şekilde kullanımı ile olduğu takdirde kabul görmektedir.

Bu bağlamda moleküler genetik araştırmalar ve genom analizleri modern tarımın gerektirdiği nitelik ve nicelikleri başarabilecek gerekli genetik değişimleri sağlamada önemli bir role sahiptir. 1953'te

DNA çift sarmalının keşfiyle (Watson ve Crick, 1953) büyük adımlar atmaya başlayan moleküler genetik, 1960'ta DNA polimeraz enziminin bulunmasıyla (Kornberg, 1960) yap-boz gibi bir oyun haline gelmeye başlamıştır. 1990'lı yıllarda özellikle PCR'a dayalı moleküler tekniklerin geliştirilmesiyle (Williams ve ark., 1990; Welsh ve McClelland, 1990; Zabeau ve Vos, 1993; Vos ve ark., 1995) bitki ıslahçıları dahil genetik temeller üzerine çalışan birçok bilim adamının dikkati moleküler düzeyde gerçekleştirilen araştırmalara kaymıştır. Moleküler markerlerin bitki ıslahında kullanılması bitki genotiplerinin insanların ihtiyacı yönünde daha kolay değiştirilmesini sağlarken, basit veya kompleks özellikleri idare eden genlerin kromozom üzerindeki yerlerini belirlemede ve bu genlerin fonksiyonlarının açıklanmasında da yardımcı olmaktadır. Ancak bu türden çalışmaların başarılı olmasında ve sonuçlara hızlı bir şekilde ulaşmada, başlangıç materyali olarak iyi bir populasyonun tercih edilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir. İster genetik haritalama isterse DNA'ya dayalı tüm analizler olsun, bu çalışmaların başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisi de uygun populasyonun geliştirilmesidir. Bu çalışmada, moleküler genetik çalışmalarda kullanılan bitkisel populasyon tipleri, oluşturulmaları ve uygun populasyon tipinin seçiminde göz önüne alınan kriterler açıklanacaktır.

## **2. Populasyon Tipleri**

### *2.1. Yakın İzogenik Hatlar*

Yakın izogenik hatların kullanımıyla basit kalıtım gösteren özelliklere bağlı markerler elde edilebilmesi F2 populasyonlarına göre daha kolay başarılabilir (Mahe ve ark., 1995). Yakın izogenik hatlar bitki ıslahı programlarında elit hatların geliştirilmesi için agronomik olarak iyi bir hatta, verici ebeveyninden istenilen gen ya da genlerin aktarılması ile elde edilir (Paterson, 1996). Yakın izogenik hatlar tekrar eden bir çok geri melezleme sonucunda istenilen karakterdeki bireylerin seçimiyle elde edilir.

Yaklaşık yedi veya sekiz geri melezleme sonucunda seçilen bireyler kendilenerik hedef lokus bakımından homozigotluk elde edilir. Sonuçta, tekrarlanan ebeveyn ile yakın izogenik hat arasında tüm genetik lokuslar istenilen gen hariç aynı olur. Bu şekilde elde edilen hatlar ile bunların tekrarlanan ebeveynleri üzerine uygulanan bir moleküler marker çalışmasıyla ortaya çıkarılan herhangi bir polimorfizm, donör ebeveyn ile tekrarlanan ebeveyn arasında seçilen lokus bakımından ortaya çıkan farklılıktan kaynaklanır.

Bu yaklaşım özellikle hastalıklara dayanıklılık gibi basit kalıtım gösteren özelliklerde bağlı markerler elde etmenin etkili bir yoludur. Yakın izogenik hatlar kullanılarak bitkilerde bir çok hastalığa dayanıklılık geni belirlenmiştir ve yine bu hatlar kullanılarak bazı hastalık genleri klonlanmıştır. Diğer taraftan mısırdaki olduğu gibi bitki boyu ve çiçeklenme zamanını kontrol eden kantitatif özellik lokuslarının belirlenmesinde de yakın izogenik hatlar kullanılabilir (Koester ve ark., 1993).

Yakın izogenik hatların kullanımıyla markerlerin ortaya çıkarılması, sadece tek lokus bakımından farklı bireylerin elde edilmesini sağladığından F2 populasyonlarına göre çok daha etkin bir yoldur. Ancak izogenik hatların oluşturulmasında tekrar eden bir çok geri melezleme yapılması ve bu hatların oluşturulması için toplam yedi veya sekiz yıl gibi bir sürece ihtiyaç duyulması nedeniyle, bu populasyonlar kullanılarak markerlerin ortaya çıkarılması çok hızlı olsa dahi, genetik materyalin oluşturulmasında harcanan zaman, yakın izogenik hatların kullanımının dezavantajıdır. Bu nedenle F2 populasyonlarının sadece iki yıl gibi bir sürede elde edilebilmesi ve yakın izogenik hatlar gibi çok fazla melez yapmaya gerek kalmaması nedeniyle, arzu edilen polimorfizmler F2 populasyonları kullanılarak ortaya çıkarılabilecek türden ise, bu tür populasyonların kullanılması zaman ve işgücünden tasarruf sağlayacağından daha uygun olabilir.

### *2.2. F2 Populasyonları*

Moleküler genetik araştırmalarda

kullanılan diğer bir populasyon tipi F2 açılan populasyonlarıdır. F2 populasyonları iki homozigot ebeveynin melezlenmesiyle oluşan F1 generasyonunun kendilenmesiyle elde edilir. F2 populasyonlarının hızlı bir şekilde yani sadece iki generasyonda oluşturulması ve bir lokustaki iki allelin mümkün olan üç kombinasyonunu da (AA, Aa, aa) içermesi, bu populasyonların iki temel avantajı olarak görülmektedir. Dolayısıyla, lokuslar arasındaki kompleks ilişkilerin test edilmesi ve gen dozaj etkilerinin tahminlenebilmesi mümkün olabilmektedir. Bitkilerde gen dozajının çalışılabileceği en ideal populasyon tipi 1:2:1 şeklinde üç farklı genotip için açılım veren F2 populasyonudur (Kochert, 1994). Diğer populasyon tipleri üç farklı genotipi vermediklerinden gen dozaj etkisinin çalışılmasına uygun değildir. Çünkü kendileme nedeniyle diğer populasyonlarda heterozigotluk kaybolur ve süper dominantlıkla ilgili hiçbir etki görülmez. Sonuçta ortak etki veya dominant-resesif allel ilişkileri birbirinden ayırt edilemez (Onus, 1996).

F2 populasyonu kendilenmiş hatlarda oluşturulan açılan populasyonlardır. Dolayısıyla, F2 generasyonundaki açılan populasyonları sabitlemek mümkün değildir. O nedenle çoğu bitkide kalıcı bir kaynak değildir. Aseksüel üreyen ya da çok yıllık bitkilerde bu tür kısıtlayıcı durumlar üretilebilirlik nedeniyle ortadan kalmaktadır.

F2 populasyonlarının moleküler marker çalışmalarında geniş oranda kullanılmasını sağlayan "bulk segregant analiz" yöntemidir (Michelmore ve ark., 1991). F2 populasyonu kullanılarak istenilen kromozom segmentinde bulunan gene bağlı moleküler markerleri belirlemede DNA örneklerini havuzlamayı öngören bulk segregant analizi hızlı ve teknik olarak basit bir yöntemdir. Bulk segregant analizi için gerekli olan tek şey ilgili gen ya da özellik bakımından açılan bir F2 populasyonunun varlığıdır. Bunun için istenilen gene sahip olan ve olmayan iki ebeveynin melezlenmesiyle F1 generasyonu elde edilir ve F1'ler kendilenerek F2 populasyonuna ulaşılır. F2 populasyonu iki yılda ya da kontrollü şartlara sahip laboratuvarlarda bir

yılda elde edilebilir. F2 populasyonunda istenilen genin kodladığı özelliğe sahip olan ve olmayan bireyler mevcuttur. Bu genin meydana getirdiği özellik fenotipe direkt yansiyorsa ve kolaylıkla seçilebiliyorsa, istenilen özelliğe sahip bireyler bir arada; olmayanlar ise farklı diğer grubu oluşturacak şekilde ayrılır ve bu grupları oluşturan bireylerden elde edilen DNA örnekleri havuzlanarak, iki ayrı DNA bulk örneği elde edilir. Her bir havuz ilgili gen veya özellik bakımından özdeştir, ancak diğer tüm genler bakımından rastgele dağılırlar. Jel elektroforezi sonucunda zıtlık gösteren bant ilgili geni içeren bölge olarak belirlenir. Sonuçta arzu edilen gen için bir moleküler marker geliştirilmiş olur.

Bitkilerde kalitatif ve kantitatif kartakterlere bağlı markerler belirlemede F2 populasyonları ve bulk segregant analiz yönteminin kombine edilerek kullanıldığı bir çok araştırma bulunmaktadır. Arpada pas hastalığına (Poulsen ve ark., 1995), üçgülde üçgül kanseri hastalığına (Page ve ark., 1997), fasulyede pas hastalığına (Miklas ve ark., 1993) dayanıklılık sağlayan genlere, antep fıstığında eşey genlerine (Hormoza ve ark., 1994), susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine (Uzun ve ark., yayımlanmamış) bağlı markerler belirlemede F2 populasyonları ve bulk segregant analiz yöntemleri bir arada kullanılmıştır. Ancak kantitatif özellikler çalışılıyorsa F2 progenilerinin test edilmesi ve kalıtsal varyasyon göstermeyen bireylerin elemine edilmesi gerekmektedir (Wang ve Paterson, 1994).

### 2.3. Double-Haploid Populasyonlar

%100 homozigot bireylerin elde edilmesine imkan veren ve moleküler genetik araştırmalarda yoğun olarak kullanılan diğer bir populasyon double-haploid'lerdir. Normal kromozom sayısının yarısını taşıyan eşey hücreleri yani gametler haploid olarak tanımlanırlar. Haploid embriyoların oluşabilmesi için haploid kromozom sayısını içeren gamet hücrelerinin döllenme olmaksızın gelişmesi ya da zigot oluşumunu izleyen hücre bölünmeleri sırasında ebeveynlerden birine ait kromozomların elemine olması

gereklidir. Bazı durumlarda, dişi gametofitin yumurta hücresi dışında başka bir hücresinden, örneğin sinerjitlerden de embriyo gelişebilmektedir.

*In vivo*'da bir çok şekilde haploidi meydana gelebilmektedir (Emiroğlu, 1982; Ercan ve Boyacı, 1997). Ancak haploidinin doğal olarak ortaya çıkış frekansının çok düşük olması nedeniyle, *in vivo*'da kendiliğinden meydana gelen haploidinin moleküler genetik araştırmalarda kullanılması ekstrem şartlar dışında mümkün değildir. Haploid bitkilerin *in vitro*'da oluşturulması gerekmektedir.

Moleküler genetik araştırmalarda kullanılmak üzere haploid bitki elde etmek için genellikle anter kültürü kullanılmaktadır. Bir anter içerisinde binlerce mikrosporun bulunması ve uygun bir *in vitro* sistem geliştirildiğinde bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilmesi, anter kültürünün tercih edilmesinin sebepleri arasındadır. (Paterson, 1996). Haploid bitkilere kolkisin uygulanarak % 100 homozigot double-haploid, diğer bir deyimle dihaploid bitkiler elde edilmektedir. Double-haploidler tam olarak homozigottur ve kendine döllenerek genetik olarak aynı yapıya sahip çok sayıda progeni elde edilebilir. Böylece, moleküler çalışmalar başlatılmadan fenotiplerin tekerrürlü denenerek, önceden test edilme imkanı sağlar. Ayrıca, kolaylıkla aynı genetik yapıda double-haploidlerin elde edilmesi nedeniyle, tohumların bir seti başka laboratuvarlara gönderilerek karşılaştırmalı analiz yapma imkanı sağlayabilir.

Double-haploidler hızlı şekilde homozigot bireylerin elde edilmesini sağladığından, özellikle kantitatif özellik lokuslarının çalışılması için iyi bir populasyon kaynağıdır (Cloutier ve ark., 1995). Double-haploidi ile homozigot bitkilerin elde edilmesi özellikle yabancı dölenen bitkilerde önem kazanmaktadır. Bu tip bitkilerde yabancı döllenme sonucu heterozigotluk artmaktadır. Kendine döllenmenin mümkün olduğu yabancı dölenen bitkilerde kendileme ile homozigotluk elde edilebilir ancak bu tür bir yol hem zaman alıcı olabilir hem de kendileme sonucu bitkilerde kendileme depresyonu oluşabilir. Double-haploidi

tekniki kullanılarak kendileme yapılmadan homozigot bitkiler elde edilebilir. Diğer taraftan poliploid bitkilerin moleküler olarak karakterizasyonunda haploid bitkilerin elde edilmesi büyük kolaylık sağlar. Poliploid bitkilerin kalıtımının incelenmesinde arzu edilen karakterlerin kombine edilmesi, diploid düzeyde tetraploid ya da heksaploid düzeye göre çok daha kolaydır.

Haploidi tekniği, bitkilerde meydana gelen resesif mutasyonların ortaya çıkartılmasında ve moleküler düzeyde anlaşılmasında da büyük kolaylık sağlar. AA genotipi Aa şeklinde mutasyona uğramışsa, haploid bitkide bu genler birer birer dağılacığından, mutasyona uğrayan bitkiler kolaylıkla ayırt edilir ve bu bitkilerde mutasyonların doğası moleküler düzeyde araştırılabilir.

Normalde altı veya sekiz kendileme sonucunda yeterli bir homozigotluğa ulaşılrken, anter veya mikrospor kültürü kullanılarak sadece tek bir generasyonda % 100 homozigotluğa ulaşılmaktadır. Ancak, haploid eldesi her bitki türünde gerçekleştirilememektedir. Dolayısıyla, başka bir populasyon tipinin kullanılması gerekmektedir. Genellikle bu populasyon, diğer bir homozigotluk kaynağı olarak rekombinant inbred hatlardır.

#### 2.4. Rekombinant Inbred Populasyonlar

Rekombinant inbred populasyonlar farklı F2 bireylerinin seçilmesi ve bir çok kez kendilenmesiyle elde edilir. Seçilen her bir F2 bireyi homozigotluk elde etmek üzere sürekli olarak kendilenir. Böylece homozigot rekombinant inbredler 5-7 generasyonda elde edilir. Ancak, seçilen her bir F2 bireyinin bu kadar çok generasyon kendilenmesi çok büyük işgücü gerektirir. Çünkü eldeki populasyon her generasyon büyük miktarda büyür. Bunun için rekombinant inbred populasyonların elde edilmesinde "tek tohum aktarım yöntemi" uygulanır. Bu yöntemde her bir F2 bireyinden tek tohum alınır ve kendilenir. Bir sonraki generasyonda yine her bitkiden tek tohum alınarak generasyonlar ilerletilir ve kendileme sonucunda homozigotluk elde edilir. Bu durumda rekombinant inbredlerin orijinal ebeveynlerinden farklı linkage

kombinasyonlarına sahip olması beklenir. Her bir rekombinant inbred hattaki farklı linkage blokları, linkage analizleri için iyi bir temel oluştururlar. Bununla birlikte, bir set rekombinant inbred hat oluşturmada bir çok generasyona ihtiyaç duyulması ve oldukça zaman alması, rekombinant inbred hatların dezavantajı olarak kabul edilir. Ayrıca, zorunlu yabancı döllenmiş bitkilerde kendilemenin mümkün olmaması nedeniyle rekombinant inbred hatları elde etmek oldukça güç olmaktadır (Kochert, 1994).

Rekombinant inbred hatların tohumları hem homozigot hem de bol miktarda olmaktadır. Bundan, tohumların bir kısmı ilave markerler elde edilmesi veya aynı araştırmanın tekrar edilmesi için başka laboratuvarlara gönderilebilir. Diğer taraftan, rekombinant inbred hatlar farklı lokasyonlarda ve yıllarda tekerrürlü denemelere alınabilir. Böylece kantitatif özellik lokusların analizi için ideal şartların oluşması sağlanabilir.

### 3. Sonuç

Her bir populasyon tipinin kendi içindeki zayıflıkları veya güçlü tarafları moleküler genetik araştırmalarda kullanılmak üzere değerlendirilmektedir. Bunun için özelliğin kalitatif ya da kantitatif kalıtım göstermesi ya da çalışılan bitki türünün kendine veya yabancı döllenmesi hangi tür populasyonun kullanılması konusunda temel tercih sebebidir. Zorunlu olarak yabancı dölenen bitkilerde kendilemenin zor olması, bu genoslarda yakın izogenik hatlar ve F2 populasyonlarının kullanımını ön plana çıkarırken, kendine dölenen bitkilerde her dört populasyonda kullanılabilir. Ancak, her bir populasyonun elde edilmesindeki kolaylıklar veya zorluklar bu tür bitkilerde populasyonların tercih edilmesinde önemli kriterdir. Öte yandan, basit kalıtım gösteren özellikleri analizlemede yakın izogenik hatlar ve F2 populasyonları başarılı olurken, kantitatif özelliklerin analizinde yetersiz kalmaktadırlar. Burada da homozigotluk kaynağı olarak double-haploidler ve rekombinant inbred populasyonlar önem

kazanmaktadır. Bu nedenlerle araştırmacı, bitki cinsine ve araştırdığı özelliğe ve hatta elindeki mevcut şartlara bağlı olarak uygun bir populasyon belirlemeli, gerekirse birden fazla populasyon kullanarak sonuca gitmelidir.

### Kaynaklar

- Cloutier, S., Cappadocia, M. and Landry, B.S. 1995. Study of microspore-culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative mapping of a F2 population and two microspore-derived populations. *Theor Appl Genet*, 91: 841-847.
- Emiroğlu, Ü. 1982. Haploidi ve bitki ıslahında önemi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No 450, Bornova, İzmir.
- Ercan, N. Ve Boyacı F. 1997. Haploidi ve bitki ıslahında önemi. *Akd. Univ. Zir. Fak. Derg.*, 10: 381-390.
- Hormoza, J.I., Dollo, L. and Polito, V.S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet*, 89: 9-13.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. In: DNA-Based Markers in Plants. Eds: Ronald L. Philips and Andra K. Vasil, pp. 9-37, Netherlands.
- Koester, R.P., Sisco, P.H. and Stuber, C.W. 1993. Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenic lines of maize. *Crop Sci.*, 33: 1209-1216.
- Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*, 138: 1503-1508.
- Mahe, A., Bannerot, H. and Grisvard, J. 1995. Construction of near-isogenic lines to investigate the efficiency of different resistance genes to anthracnose. *Theor Appl Genet*, 90: 859-864.
- Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 9828-9832.
- Miklas, P.N., Stavely, J.R. and Kelly, J.D. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor Appl Genet*, 85: 745-749.
- Onus, A.N. 1996. Bitki ıslahında DNA markerlerinin kullanımı. *Akd. Univ. Zir. Fak. Derg.*, 9: 322-333.
- Page, D., Delclos, B., Aubert, G., Bonavent, J.F. and Mousset-Declas, C. 1997. Sclerotinia rot resistance in red clover: Identification of RAPD markers using bulked segregant analysis. *Plant Breeding*, 116: 73-78.
- Paterson, A.H. 1996. Making genetic maps. In: Genome Mapping in Plants. Ed: Andrew H. Paterson, pp. 23-39, Texas, USA.
- Poulsen, D.M.E., Henry, R.J., Johnston, R.P., Irwin, J.A.G. and Rees, R.G. 1995. The use of bulk

- segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor Appl Genet*, 91: 270-273.
- Wang, G.L. and Paterson, A.H. 1994. Assesment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor Appl Genet*, 88: 355-361.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171: 737-738.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Zabeau, M. and Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, Application number, 92402629.7, publication number 0 534 858 A1.