

JOANNA SZTUBA-SOLIŃSKA

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Oddział Bydgoszcz
Al. Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz
e-mail: j.sztuba@ihar.bydgoszcz.pl*

SYSTEMY MARKERÓW MOLEKULARNYCH I ICH ZASTOSOWANIE W HODOWLI ROŚLIN

WPROWADZENIE

Badanie polimorfizmu DNA stało się możliwe dzięki opracowaniu systemów wykorzystujących markery molekularne. Systemy markerów molekularnych stały się głównym narzędziem analiz genetycznych przełamującym bariery, z którymi borykały się konwencjonalne metody hodowli. Stosowanie metod molekularnych umożliwiło analizę przekazu genów między spokrewnionymi odmiana-

mi, stwierdzenie introgresji między odległymi ewolucyjnie osobnikami, a także badanie cech poligenicznych.

Niniejsze opracowanie obejmuje charakterystykę systemów markerów molekularnych oraz możliwości ich zastosowania w analizach genetycznych i w hodowli roślin uprawnych.

DEFINICJA MARKERA

Marker to wyznacznik, dowolna, genetycznie kontrolowana cecha fenotypowa lub też dowolna różnica genetyczna wykorzystywana dla ujawnienia polimorfizmu osobniczego. Pod pojęciem polimorfizmu rozumie się całokształt różnic występujących między poszczególnymi gatunkami, odmianami, osobnikami, a także komórkami organizmu, które potencjalnie mogą być ujawniane za pomocą odpowiednio dobranego systemu markerowego. System markerowy o wysokiej użyteczności powinien nie tylko ujawniać szeroki zakres zmienności analizowanej cechy, ale także nie powinien ulegać wpływowi czynników środowiskowych. Użyteczność systemu analiz uzależniona jest również od wysokiej powtarzalności wyników, łatwości detekcji oraz możliwości szczegółowego poznania mechanizmów warunkujących występowanie danej właściwości organizmu.

Początkowo do analizy zmienności organizmów stosowano markery morfologiczne, czyli cechy fenotypowe, których ekspresja umożliwia ocenę sposobu dziedziczenia. Następnie dołączyły do nich markery cytologiczne bazujące na obserwacji aberracji chromosomowych w genomie danego organizmu, umożliwiające m.in. ocenę poziomu ploidalności oraz analizę transferu genów. Analiza polimorfizmu struktury molekularnej polipeptydów mogących pośrednio odzwierciedlać zmienność materiału genetycznego, przyczyniła się do rozwoju markerów białek strukturalnych oraz białek enzymatycznych. Obecnie, najczęściej stosowanymi technikami analizy różnicowania organizmów są systemy markerów molekularnych ujawniające zmienność sekwencji nukleotydowej DNA.

SYSTEMY MARKERÓW MOLEKULARNYCH

Współcześnie znane są liczne techniki umożliwiające identyfikację polimorfizmu organizacji i struktury materiału genetycznego, zarówno w obrębie sekwencji kodujących, jak i niekodujących. Przełomowymi odkryciami dla ich rozwoju było zaproponowanie sekwencji DNA i modelu jego replikacji (WATSON i CRICK 1953), następnie wyizolowanie po raz pierwszy polimerazy DNA (KORNBERG i współaut. 1955), wyizolowanie i scharakteryzowanie pierwszej sekwencyjnie specyficznej endonukleazy restrykcyjnej (SMITH i WILCOX 1968) oraz opracowanie metody sekwencjonowania DNA (MAXAM i GILBERT 1977). Systemy markerów molekularnych

umożliwiają analizę zróżnicowania organizmów niezależnie od ich fazy rozwojowej i wpływu czynników środowiskowych. Ponadto, metody molekularne gwarantują wysoką powtarzalność wyników i łatwość aplikacji, co decyduje o ich wysokim stopniu użyteczności. Poszczególne techniki analizy zmienności materiału genetycznego różnią się między sobą, co wynika z ich specyfiki, typu i poziomu polimorfizmu, który określają. Ze względu na sposób identyfikacji zmienności genetycznej systemy markerów molekularnych można podzielić na kilka kategorii, których charakterystykę przedstawiono w niniejszej pracy.

CHARAKTERYSTYKA SYSTEMÓW MARKERÓW MOLEKULARNYCH

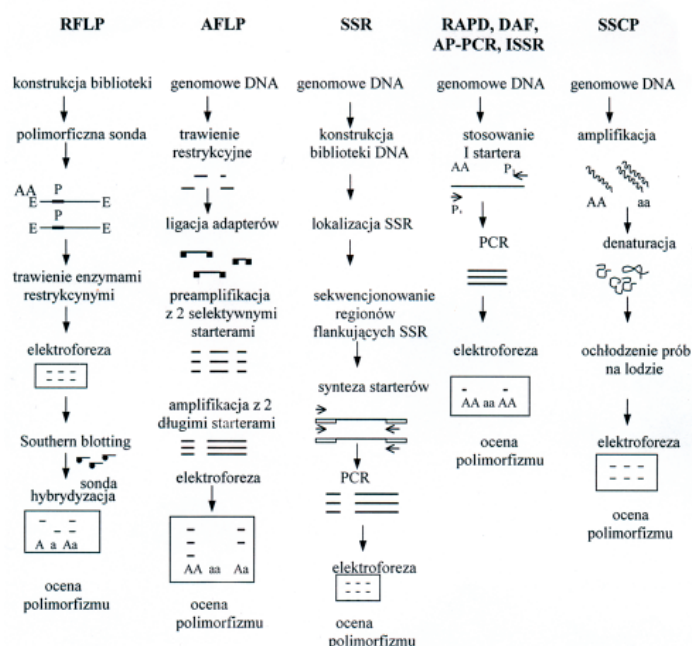
Przebieg analizy polimorfizmu za pomocą omawianych poniżej kategorii systemów markerów molekularnych ilustruje Ryc. 1, a ich właściwości i wymagania zestawione są w Tabeli 1.

MARKERY OPARTE NA HYBRYDYZACJI DNA

RFLP – Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Technika RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism) polega na trawieniu

DNA enzymami restrykcyjnymi, a następnie poddaniu produktów trawienia rozdzielowi na żelu agarozowym (Ryc. 2). Późniejsza modyfikacja metody wprowadziła dodatkowo transfer rozdzielonych fragmentów DNA na membranę, a następnie hybrydyzację DNA ze specyficzną sondą znakowaną radioaktywnie (SOUTHERN 1975) lub fluorescencyjnie (NEUHAUS-URL i NEUHAUS 1993). Jako sondy stosuje się zwykle DNA lub cDNA o wielkości 300–500 pz, zaś wizualizację polimorfizmu sygnałów hybrydazyjnych dokonuje się za



Ryc. 1. Schematy przebiegu analizy polimorfizmu dla wybranych systemów markerów molekularnych.

Tabela 1. Zestawienie właściwości najczęściej stosowanych systemów markerowych.

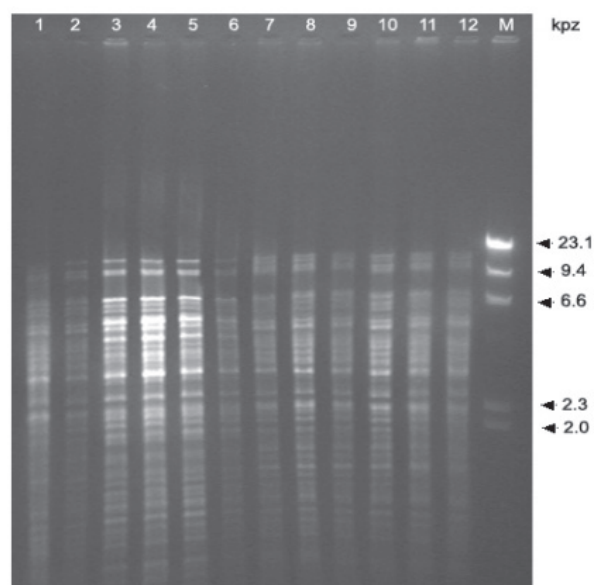
Cecha	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SSCP	CAPS
Ilość DNA (μg)	10	0,02	0,5-1,0	0,05	0,05	0,05
Jakość DNA	wysoka	wysoka	średnia	średnia	średnia	średnia
Poziom polimorfizmu	średni	średni	średni	wysoki	średni	średni
Typ dziedziczenia	kodominacja	dominacja	dominacja	kodominacja	kodominacja	kodominacja
Występowanie w genomie	regiony kodujące	cały genom	cały genom	DNA repetytywny	cały genom	cały genom
Wymagana znajomość sekwencji	nie	nie	tak	tak	tak	tak
Detekcja radioaktywna	tak/nie	nie	tak/nie	nie	tak/nie	nie
Trudności techniczne	średnie	małe	wysokie	wysokie	średnie	średnie
Wiarygodność	wysoka	średnia	średnia	wysoka	wysoka	średnia
Powtarzalność	wysoka	niska	wysoka	wysoka	wysoka	średnia
Koszty analiz	wysokie	niskie	średnie	wysokie	wysokie	wysokie

pomocą autoradiografii. Zaletą tej metody jest możliwość stwierdzenia homo- lub heterozygotyczności analizowanego osobnika na podstawie uzyskanego profilu genetycznego oraz wysoka częstotliwość wykrywanego polimorfizmu. Źródłem zróżnicowania struktury DNA określanego metodą RFLP mogą być delecje, insercje, utrata miejsca restrykcyjnego w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez sondę, bądź też pojawienie się nowego miejsca restrykcyjnego w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez sondę lub poza sekwencją komplementarną dla sondy. RFLP umożliwia analizę specyficznych loci lub alleli, a uzyskane rezultaty cechuje wysoka wiarygodność. Metoda ta wymaga jednak dużej ilości DNA niezbędnego do trawienia restrykcyjnego oraz związana jest z wysokimi kosztami otrzymania sondy.

VNTR – Zmienna liczba tandemowych powtórzeń

Metoda VNTR (ang. variable number of tandem repeats), po raz pierwszy została zastosowana do tworzenia mapy genetycznej człowieka. Opiera się na analizie tandemowo powtarzających się motywów sekwencyjnych długości 11–60 pz zwanych minisatelitarnym DNA. Liczba powtórzeń motywu minisate-

litarnego waha się od 2 do 1000 razy i jest często zróżnicowana wśród genotypów tego samego gatunku, co powodowane jest licznymi zdarzeniami rekombinacyjnymi. Polimor-



Ryc. 2. Analiza RFLP obrazująca zmienność mitochondrialnego DNA między liniami płodnymi (ścieżka 1-2; 7-12) i męskosterylными (ścieżka 3-6) buraka cukrowego trawionych restryktazą *EcoRI*.

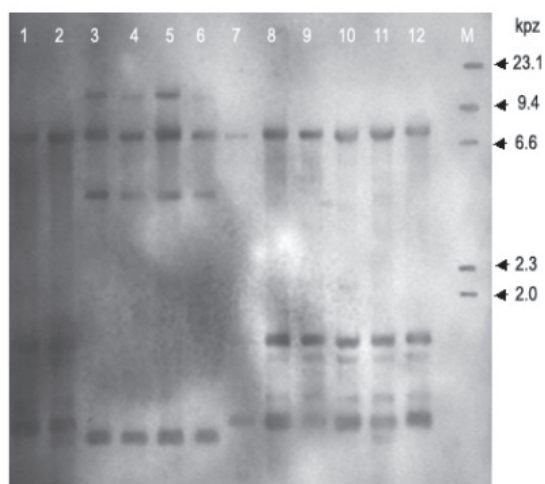
fizm minisatelitarnych loci wykrywany jest poprzez trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi, które rozpoznają sekwencje flankujące minisatelitarne regiony. Dalsze etapy analizy przebiegają jak w przypadku markerów RFLP, z zastosowaniem sond homologicznych do minisatelitarnego DNA. W wyniku analizy uzyskuje się profile molekularne składające się z wielu produktów o wielkości od 4–20 kpz, zwane „fingerprintami” (Ryc. 3)

MARKERY BAZUJĄCE NA REAKCJI PCR Z ZASTOSOWANIEM ARBITRALNEGO STARTERA

RAPD – Losowo amplifikowany polimorficzny DNA

RAPD (ang. random amplified polymorphic DNA) to system markerowy bazujący na reakcji PCR z zastosowaniem startera o przypadkowej sekwencji i długości 9–11 pz (WILLIAMS i współaut. 1990). Każdy taki starter hybrydując do matrycy DNA, zapoczątkowuje amplifikację w wielu rejonach genomu jednocześnie. Produkty amplifikacji rozdziela się na żelu agarozowym, a ich detekcja odbywa się z użyciem bromku etydydny lub srebra (Ryc. 4). Metoda ta jest szybsza, wydajniejsza i mniej pracochłonna niż RFLP. Potrzeba również znacznie mniejszych ilości DNA, ponieważ jest on powielany w kolejnych rundach amplifikacji.

Stosując analizę RAPD należy być świadomym jej ograniczeń. Obecność produktów, które migrują w żelu na ten sam dystans

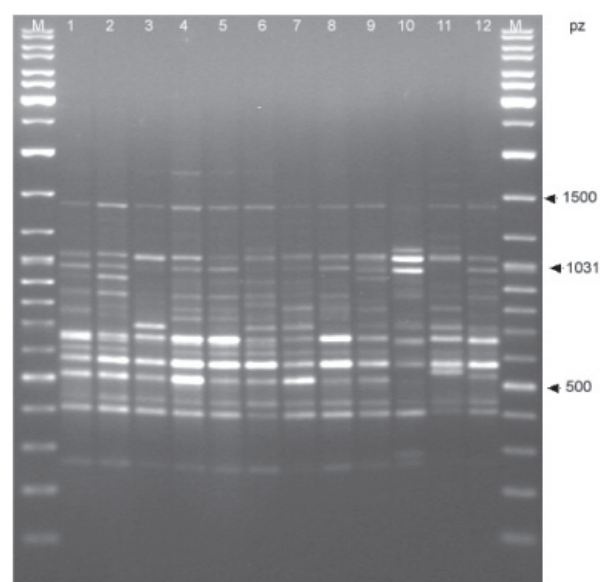


Ryc. 3. Analiza VNTR obrazująca zmienność locus minisatelitarnego w mitochondrialnym DNA linii LO (ścieżka 1–2; 7–12) i MS (ścieżka 3–6) buraka cukrowego trawionych restryktazą *Bam*HI, poddanych hybrydyzacji z sondą komplementarną do TR3 minisatelitarnego mtDNA.

i wydają się być identyczne dla różnych osobników, nie świadczy o ich homologii sekwencyjnej. Pojedyncze produkty składające się na wzór prążkowy, w rzeczywistości mogą składać się z kilku fragmentów wspólnie migrujących w żelu. Aby uniknąć trudności związanych z interpretacją profili uzyskanych dzięki metodzie RAPD, stworzono alternatywne systemy molekularne: DAF (ang. DNA amplification fingerprinting) i AP-PCR (ang. arbitrarily primed polymerase chain reaction). W metodzie DAF losowa amplifikacja DNA odbywa się z zastosowaniem startera o długości 5–8 pz. Powstaje wówczas od 40 do 100 produktów DNA, które rozdziela się na żelu poliakrylamidowym. AP-PCR to modyfikacja metody RAPD, w której stosuje się starter o długości 10–50 pz (WELSH i MCCLELLAND 1990). Pierwsze dwa cykle reakcyjne zachodzą w obniżonej temperaturze wiązania starterów, zaś kolejne w wyższej, warunkującej dużą specyficzność amplifikacji. Obie modyfikacje metody RAPD umożliwiają skuteczniejszą analizę molekularną osobników o bardzo niskim stopniu zróżnicowania genetycznego.

ISSR – Polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnych

Technika ISSR (ang. inter simple sequence repeats) umożliwia identyfikację polimorfizmu długości obszarów DNA, zawartych po-



Ryc. 4. Analiza RAPD obrazująca polimorfizm organizacji genomowego DNA tetraploidalnych zapylaczy buraka (ścieżka 1–12) z zastosowaniem startera OPK10.

między przeciwnie skierowanymi, identycznymi sekwencjami mikrosatelitarnymi. W reakcji PCR stosowane są startery o długości 16–18 pz odpowiadające motywom mikrosatelitarnym, które posiadają kilka selektywnych nukleotydów (ZIETKIEWICZ i współaut. 1994). Podczas reakcji powstaje od 10 do 60 produktów, które poddaje się rozdziałowi na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym oraz wizualizacji.

ISSR zyskuje dużą popularność, co wiąże się zarówno z względną prostotą tej techniki, wysoką powtarzalnością wyników, jak i z przypuszczeniem, że markery mikrosatelitarne mogą być sprzężone z obszarami kodującymi.

MARKERY BAZUJĄCE NA REAKCJI PCR Z ZASTOSOWANIEM SPECYFICZNYCH STARTERÓW

SSR – Mikrosatelitarny polimorfizm krótkich tandemowych powtórzeń

SSR (ang. simple sequence repeats) opiera się na analizie sekwencji mikrosatelitarnych DNA, składających się z powtarzalnego motywu długości 1–4 nukleotydów. Liczba powtórzeń waha się w przedziale 10–50 i może być zmienna w obrębie osobników tego samego gatunku. Dla genomu roślinnego najbardziej charakterystycznym powtórzeniem jest dwunukleotyd (AT)_n oraz trójnukleotyd (TAT)_n (MORGANTE i współaut. 2002). Aby dokonać analizy sekwencji za pomocą systemu SSR stosuje się biblioteki genomowe, z których, przy użyciu sondy mikrosatelitarnej, selekcjonuje się klonów zawierające komplementarne loci. Wyselekcjonowane klonów poddaje się sekwencjonowaniu, by na ich bazie zaprojektować startery dla amplifikacji repetytywnego DNA. Przy projektowaniu starterów korzysta się również z baz danych sekwencyjnych znaczników ekspresji EST (ang. expressed sequence tags) lub sekwencji spokrewnionych gatunków. Dokonuje się także wzbogacania istniejących bibliotek genomowych w sekwencje mikrosatelitarne dzięki selektywnej hybrydyzacji fragmentów DNA przy użyciu magnetycznych kulek pokrytych streptawidyną bądź też nylonowych membran (RAKO-CZY-TROJANOWSKA i BOLIBOK 2004).

W zależności od liczby powtórzeń elementu podstawowego na żelu poliakrylamidowym uzyskuje się produkty o różnej długości. Zaletą systemu markerowego SSR jest wysoka częstotliwość identyfikacji polimorficznych sekwencji, wynikająca ze zmiennej

liczby powtórzeń motywu nukleotydowego, a także możliwość oceny homo- lub heterozygotyczności analizowanego osobnika na podstawie profilu genetycznego.

STS – Miejsca znaczone sekwencyjnie

Technika STS (ang. sequence tagged sites) umożliwia analizę mikrosatelitarnych regionów w genomie, które wykazują polimorfizm ze względu na zmienną liczbę tandemowych motywów nukleotydowych. Powtórzone jednostki są otoczone sekwencjami unikatowymi, mogącymi służyć jako startery do generacji polimorficznych produktów. Sekwencje te występują w genomie średnio co 10 kpz, co sprawia iż mogą one służyć jako punkty orientacyjne, względem których można lokalizować i badać określone sekwencje. System markerowy STS stosowany jest głównie do zagęszczania map genetycznych oraz do poszukiwania sprzężeń z cechami użytkowymi.

SCAR – Polimorfizm sekwencyjnie charakteryzowanych regionów DNA

Użyteczność markerów RAPD może być zwiększona, gdy kontynuacją ich analizy jest system markerowy SCAR (ang. sequence characterized amplified region). Technika ta polega na sekwencjonowaniu końcowych odcinków produktu RAPD, na bazie których projektowane są startery długości 22–30 pz stosowane do amplifikacji specyficznego locus. System markerowy SCAR identyfikuje różnice sekwencyjne, które dziedziczą się dominacyjnie, jednakże dodatkowe poddanie produktów PCR trawieniu restrykcyjnemu i rozdziałowi na denaturującym żelu poliakrylamidowym może służyć określeniu homo- lub heterozygotyczności analizowanego osobnika.

SNP – Polimorfizm pojedynczych nukleotydów

System SNP (ang. single nucleotide polymorphism) umożliwia wykrycie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w obrębie badanej sekwencji (BROOKES 1999). Polega na amplifikacji określonego fragmentu genomu w reakcji PCR i sekwencjonowaniu uzyskanego produktu. Następnie dokonuje się porównania obrazów elektroforetycznych produktów amplifikacji, co pozwala na stwierdzenie, czy mutacja w danym obszarze genomu miała miejsce. Zaletą tej techniki jest wysoka wydajność identyfikacji polimorfizmu w obrębie badanej sekwencji, wadą jest wysoki koszt analizy.

MARKERY BAZUJĄCE NA REAKCJI PCR I TRAWIENIU RESTRYKCYJNYM

AFLP – Polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu

AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism) to technika polegająca na trawieniu matrycowego DNA enzymami restrykcyjnymi, a następnie poddaniu uzyskanych fragmentów dwóm rundom amplifikacji: niespecyficznej i specyficznej (Vos i współaut. 1995). Kombinacja dwóch enzymów restrykcyjnych umożliwia uzyskanie tzw. lepkich końców, które są niezbędne do połączenia produktów trawienia z oligonukleotydowymi odcinkami tzw. adaptorami. Po ligacji adaptorów prowadzona jest reakcja preamplifikacji z zastosowaniem starterów komplementarnych do adaptoru i miejsca restrykcyjnego, posiadających na końcu 3' selektywny nukleotyd. Po reakcji amplifikacji niespecyficznej prowadzi się amplifikację specyficzną z użyciem starterów, które na końcu 3' posiadają 2–4 specyficzne nukleotydy. Rozdział produktów PCR następuje na żelu poliakrylamidowym, a detekcja poprzez barwienie srebrem bądź autoradiograficznie. Metodę tą charakteryzuje wysoka rozdzielczość generowanych wzorów prążkowych oraz możliwość szybkiej detekcji polimorfizmu. System ten nie wymaga znajomości badanych sekwencji, możliwe jest jego zautomatyzowanie, a także konwersja w inne typy markerów.

CAPS – Polimorfizm trawionych amplifikowanych sekwencji

Technika CAPS (ang. cleaved amplified polymorphic sequence) łączy reakcję PCR z trawieniem restrykcyjnym, alternatywnie określana jest jako PCR-RFLP. Startery konstruowane są na podstawie znanych sekwencji DNA, cDNA lub klonowanych produktów RAPD i wybierane są tak, aby powieły produkty zawierające introny, co zwiększa możliwość znalezienia polimorfizmu. Podstawowe produkty PCR są poddawane trawieniu zestawem endonukleaz restrykcyjnych, a następnie rozdzielane na żelu agarozowym w celu wykrycia polimorfizmu. System CAPS służy do identyfikacji zmienności w sekwencji DNA i znajduje zastosowanie, gdy amplifikowane fragmenty DNA, nie dają się różnicować pod względem długości. Zmienność ta jest możliwa do wykrycia dzięki specyficznemu rozpoznawaniu i trawieniu ściśle zdefiniowanych sekwencji przez enzymy restrykcyjne.

SAMPL – Polimorfizm selektywnie amplifikowanych mikrosatelitarnych loci

SAMP (ang. selectively amplified microsatellite polymorphic loci) to modyfikacja metody AFLP skupiająca się na analizie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych (MORGANTE i VOGEL 1994). Genomowe DNA poddawane jest trawieniu restrykcyjnemu, tak by utworzyć lepki koniec, do którego przyłączony zostanie adaptor. Miejsce to stanowić będzie sekwencje komplementarną dla startera AFLP, zaś drugi starter projektowany jest tak, by hybrydował do sekwencji mikrosatelitarnej. Amplifikowany fragment zawiera się więc pomiędzy miejscem restrykcyjnym a sekwencją mikrosatelitarną. Ponieważ metoda ta umożliwia amplifikację repetytywnego DNA, bez konieczności znajomości sekwencji flankujących, generuje obrazy o bardzo wysokim polimorfizmie oraz pozwala na wykrycie alleli kodominujących.

MARKERY OPARTE NA POLIMORFIZMIE POJEDYNCZYCH NUKLEOTYDÓW

SSCP – Polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA

SSCP (ang. single strand conformation polymorphism) polega na detekcji polimorfizmu z zastosowaniem elektroforezy zdenaturowanego jednoniciowego DNA, którego konformacja ulega zmianie pod wpływem punktowych substytucji, delecji lub insercji. Jej zastosowanie umożliwia identyfikację heterozygotyczności organizmów, a także określenie różnic strukturalnych DNA obejmujących kilka par zasad, wpływających na zmianę ruchliwości produktu w żelu poliakrylamidowym. Metoda ta głównie stosowana w detekcji chorób genetycznych człowieka, została zaadoptowana do analizy polimorfizmu i detekcji mutacji w obrębie genomów roślin hodowlanych.

Pyrosequencing

Jest to technika umożliwiająca analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów poprzez sekwencjonowanie określonego locus. W trakcie amplifikacji sekwencji DNA prowadzonej w obecności specyficznego startera, a także polimerazy DNA, sulfurylasy ATP, lucyferazy i apyrazy oraz substratów, następuje wprowadzanie poszczególnych dNTP do nici DNA, co powoduje uwolnienie ekwimolarnej ilości pirofosforanu. Sulfurylaza ATP ilościowo przekształca PPi w ATP w obecności ade-

nozyno-5'-fosfosiarczanu. Powstały ATP generuje konwersję lucyferyny do oksylucyferyny, co powoduje emisję światła o natężeniu proporcjonalnym do ilości produkowanego ATP. Światło to jest rejestrowane przez kamerę CCD i uwidaczniane w postaci piku na pyrogramie. W ostatnim etapie apyraza, degradowuje nadmiar dNTP i ATP, wówczas dodawany jest kolejny dNTP i cykl się powtarza. W czasie kolejnych cykli syntezy matrycowe DNA

jest uzupełniane brakującymi nukleotydami, natomiast pyrogram jest uzupełniany przez kolejne piki generowane sygnałem świetlnym. Metoda ta ma przewagę nad tradycyjnym sekwencjonowaniem, gdyż umożliwia jednoczesną analizę wielu prób DNA, a jej nowopowstające modyfikacje pozwalają na obniżenie kosztów związanych z badaniami (AGHAJAN 2003).

ZASTOSOWANIE MARKERÓW MOLEKULARNYCH W HODOWLI ROŚLIN

Systemy markerów molekularnych stały się niezbędnym narzędziem diagnostycznym nowoczesnej hodowli roślin uprawnych. Umożliwiły pokonanie barier, których nastroczała konwencjonalna metoda hodowli, co przyczyniło się do ich szerokiego zakresu wykorzystania w analizach (Tabela 2). Stosowane są w kolejnych etapach tworzenia nowych, wydajnych odmian roślin uprawnych, których prawidłowy przebieg zapewnia powodzenie prac hodowlanych.

Pierwszym z podejmowanych kroków w hodowli roślin jest dobór roślin rodzicielskich spośród dostępnej puli genowej istniejących odmian. Aby właściwie ocenić zasoby genowe pod kątem produktywności, parametrów jakości oraz tolerancji na abiotyczne i biotyczne czynniki stresogenne, stosowano dotychczas czasochłonne techniki opierające się na wielokrotnych krzyżowaniach i selekcji fenotypowej, bądź też analizach profili izoenzymatycznych (KARP i współaut. 1998). Systemy markerów molekularnych okazały się być korzystniejszą alternatywą, gdyż umożliwiły szybszą i dokładniejszą analizę zróżnicowania dostępnej puli genowej, identyfikację ważnych użytkowo cech, a także ocenę stabilności genetycznej uzyskanego potomstwa. Jest to szczególnie ważne przy dobieraniu komponentów odmian mieszańcowych. W tym względzie coraz szersze zastosowanie do analizy genomów roślinnych znajdują systemy markerów mikrosatelitarnych SSR (HACKAUF i WEHLING 2002), ISSR (DOMENIUK i współaut. 2002) oraz SAMPL (BOLIBOK i współaut. 2003).

Gdy materiał biologiczny, którym dysponujemy, wykazuje zawężone zróżnicowanie genetyczne, możliwe jest zastosowanie w pracach hodowlanych dzikich gatunków spokrewnionych z daną linią w celu wprowadzenia pożądanych cech do nowotworzonej odmiany (KELLER i współaut. 1999).

Systemy markerów molekularnych dają możliwość kontroli włączania nowego materiału genetycznego do tworzonej odmiany w drodze introgresji. Geny takie niejednokrotnie warunkują ważne użytkowo cechy, takie jak: odporność na choroby polowe, wysoką jakość plonów, tak więc analiza ich obecności w genomie wspiera selekcję hodowlaną (BERZONSKY i FRANCKI 1999). Często powstająca odmiana mieszańcowa, oprócz pożądanych cech użytkowych, wykazuje także cechy dzikiego gatunku rodzicielskiego, które zostały niezamierzenie wprowadzone do genomu roślinnego. Podczas dalszych prac hodowlanych, analizy molekularne umożliwiają weryfikację obecności pożądanych alleli z jednoczesną eliminacją genotypów posiadających niechciane sekwencje DNA.

Dobór linii rodzicielskich wykorzystywanych w pracach hodowlanych opiera się na dokładnej ocenie oraz selekcji, tak by stopień ich pokrewieństwa odpowiadał zamierzonemu celowi hodowlanemu. Podobieństwo genetyczne wykorzystywanych genotypów może być szacowane za pomocą analiz morfologicznych, rodowodowych, a także genetycznych bazujących na systemach markerów molekularnych. Wiarygodność niektórych metod bywa dyskusyjna, zwłaszcza jeżeli rozpatruje się wyniki analiz izoenzymatycznych lub morfologicznych. Techniki molekularne okazują się być najbardziej efektywne w ocenie dystansu genetycznego występującego między liniami rodzicielskimi, a jednocześnie umożliwiają prognozę efektywności tworzenia nowych odmian mieszańcowych wykazujących ważne użytkowo cechy. Stosowane były z powodzeniem do oceny wartości kombinacyjnej genotypów rodzicielskich prowadząc do wytworzenia linii mieszańcowych kukurydzy o korzystnych cechach gospodarnych (STUBER i współaut. 1992). Dotychczas najczęściej stosowaną me-

Tabela 2. Zastosowanie systemów markerów molekularnych w hodowli roślin uprawnych.

System markerów genetycznych	Zastosowanie systemu markerowego w hodowli roślin
RFLP	– mapowanie genomów roślin uprawnych m.in. żyta, ryżu, pszenicy, jęczmienia i kukurydzy (MALYSHEV i współaut. 2003) – lokalizacja loci cech ilościowych (QTL) trzciny cukrowej i sorgo (JORDAN i KHUSH 2004) – detekcja introgresji w krzyżowaniu wstecznym roślin (JENA i współaut. 1990) – analiza pokrewieństwa genetycznego między dzikimi gatunkami ryżu a odmianami uprawnymi (BAUTISTA i współaut. 2001)
VNTR	– ocena zróżnicowania genetycznego (KEANE i współaut. 1999) – analiza ewolucyjna sekwencji minisatelitarnych (KING i FERRIS 2002) – identyfikacja sekwencji zaangażowanych w występowanie zjawiska cytoplazmatycznej męskiej sterility (NISHIZAWA i współaut. 2000).
RAPD	– detekcja zróżnicowania genetycznego między genotypami soi (CAETANO-ANOLLES i współaut. 1991) – ocena zróżnicowania genetycznego linii rodzicielskich mieszańców rzepaku ozimego (LIERSCH i współaut. 2004) – lokalizacja sekwencji sprzężonych z genem warunkującym odporność na rdzę brunatną pszenicy (CHEN i współaut. 2004) – identyfikacja sekwencji specyficznych dla danej płci roślin dwupiennych (URASKI i współaut. 2002).
ISSR	– identyfikacja polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych rzodkiewnika i spokrewnionych przedstawicieli rodzaju <i>Brassica</i> (BORNET i BRANCHARD 2004) – lokalizacja sekwencji warunkujących użyteczne cechy ilościowe kukurydzy (DOMENIUK i współaut. 2002) – mapowanie genomu pszenicy (KOJIMA i współaut. 1998) – ocena zróżnicowania genetycznego rzodkiewnika (BARTH i współaut. 2002).
SSR	– analiza filogenetyczna i identyfikacja osobnicza ziemniaka (ASHKENAZI i współaut. 2001) – ocena zróżnicowania kodujących sekwencji genomu żyta (HACKAUF i WEHLING. 2002) – mapowanie genów odporności na rdzę brunatną pszenicy (STĘPIEŃ i współaut. 2004) – ocena loci cech ilościowych odpowiadających za odporność na parch pszenicy (ZHOU i współaut. 2003) – mapowanie genomów (ZIETKIEWICZ i współaut. 1994)
STS	– mapowanie genomu pszenicy (KHLESTKINA i współaut. 2002) – mapowanie loci QTL odpowiedzialnych za specyficzne cechy morfologiczne grochu (IRZYKOWSKA i współaut. 2002) – mapowanie genów odporności na rdzę brunatną pszenicy (STĘPIEŃ i współaut. 2004) – selekcja mutantów ryżu (KIM i współaut. 2004)
SCAR	– analiza sekwencji warunkujących cytoplazmatyczną męską sterility ryżu (YANG i współaut. 2002) – identyfikacja genu <i>Sex1</i> determinującego płęć papai (DEPUTY i współ. 2002) – mapowanie mutacji warunkujących partenokarpiczne owoce (BERALDI i współaut. 2004)

SNP	– identyfikacja mutacji punktowych w obrębie genu odporności na rdzę liściową pszenicy (TYRKA i współaut. 2004) – badanie ekspresji genów u roślin poliploidalnych (MOCHIDA i współaut. 2003)
AFLP	– analiza zmian genetycznych indukowanych naturalnym procesem starzenia się nasion żyta (CHWEDORZEWSKA i współaut. 2002) – identyfikacja locus przywracającego płodność dzikich gatunków buraka (TOUZET i współaut. 2004) – lokalizacja genu odporności na mączniaka właściwego (SINGRUN i współaut. 2004) – identyfikacja zmienności sekwencyjnej (Vos i współaut. 1995)
CAPS	– mapowanie genu odporności na rdzę liściową pszenicy jarej (CHEŁKOWSKI i współaut. 2003) – mapowanie genu odporności na rdzę <i>Brassica juncea</i> (VARSHNEY i współaut. 2004). – mapowanie mutacji <i>pat</i> warunkującej powstawanie partenokarpicznych owoców pomidora (BERALDI i współaut. 2004) – ocena zróżnicowania genetycznego rzodkiewnika (BARTH i współaut. 2002).
SAMPL	– ocena zróżnicowania genetycznego żyta ozimego (BOLIBOK i RAKOCZY-TROJANOWSKA 2003) i pszenicy uprawnej (ROY i współaut. 2002) – ocena pokrewieństwa genetycznego odmian uprawnych batata (TSENG i współaut. 2002) – identyfikacja polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych (MORGANTE i VOGEL 1994)
SSCP	– analiza polimorfizmu i detekcji mutacji w obrębie genomów mutantów ryżu (SATO i NISHIO 2003) – lokalizacja mutacji w obrębie genu <i>gf-2.8</i> warunkującego odporność na zasolenie mutantów pszenicy (WANG i współaut. 2001)
Pyrosequencing	– detekcja mutacji punktowych w obrębie genomu (PACEY-MILLER i HENRY 2003) – ocena mutacji punktowych roślin poliploidalnych m.in.: tetraploidalnego ziemniaka (RICKERT i współaut. 2002) i heksaploidalnej pszenicy (MOCHIDA i współaut. 2003)

tołą oceny zróżnicowania genetycznego był system markerowy RFLP oparty na hybrydyzacji trawionego DNA z polimorficzną sondą. Jako, że system ten wymaga dużego nakładu czasu i kosztów związanych ze znalezieniem polimorficznej sondy i odpowiedniego doboru enzymu restrykcyjnego, obecnie częściej stosuje się metody opierające się na reakcji PCR. Przeprowadzając analizy molekularne dla niektórych gatunków roślin uprawnych wykazano, iż prosta detekcja pokrewieństwa genetycznego między liniami bywa niewystarczająca w przypadku tworzenia odmian mieszańcowych. Zidentyfikowano bowiem geny kontrolujące proces rozszczenia użytecznych cech mieszańców oraz sprzężenia genów obniżające żywotność potomstwa mieszańcowego (FU 1999). Występowanie takich czynników genetycznych w badanych genotypach może zakłócić przebieg tworzenia mieszańców, w związku z tym, prowa-

dzone są analizy, mające na celu ich identyfikację i eliminację, a także tworzenie linii o zwiększonej wartości kombinacyjnej (SILLS i NIENHUIS 1998).

Ważnym etapem prac hodowlanych jest ocena uzyskanego potomstwa, mająca na celu wybór najlepszej linii pod kątem analizowanych cech. Systemy markerów molekularnych umożliwiają lokalizację sekwencji sprzężonych z genami warunkującymi ważne użytkowo cechy, dzięki czemu możliwe jest pominięcie kosztownej i długotrwałej oceny fenotypowej linii hodowlanych. W związku z tym znajdują one zastosowanie w selekcji materiału hodowlanego MAS (ang. marker assisted selection). W selekcji standardowo stosuje się linie donorową prezentującą w formie homozygotycznej ważny użytkowo gen lub geny, zaś drugim komponentem jest odmiana, której wartość hodowlana ma być udoskonalona poprzez wprowadzenie

określonego genu z linii donorowej. Systemy markerów genetycznych, takie jak RFLP, SCAR, CAPS, znajdują zastosowanie w identyfikacji obu komponentów poprzez odróżnienie homozygotycznych genotypów od heterozygotycznych. Możliwe jest także stosowanie w tym celu systemów markerowych o dominującym typie dziedziczenia, takich jak AFLP lub RAPD, jednakże należy poddać je konwersji w systemy SCAR lub CAPS (BRADEEN i SIMON 1998). Strategia wprowadzania ważnego użytkowo genu do udoskonalanej odmiany opiera się na konwencjonalnym krzyżowaniu wstecznym, a uzyskane pokolenie ocenia się pod kątem heterozygotyczności badanego genu i stosuje w kolejnym krzyżowaniu. Proces eliminacji „niechcianych genów” pochodzących od linii donorowej można przyspieszyć dzięki zastosowaniu systemów markerowych w kolejnych rundach krzyżowania wstecznego, jednakże muszą one różnicować komponenty rodzicielskie. Wykazano, iż dobór prowadzony w kierunku cechy warunkowanej pojedynczym genem z wykorzystaniem systemów markerów molekularnych, okazuje się być wysoce efektywny u różnych gatunków roślin uprawnych (RHARRABTI i współaut. 2000).

Systemy markerowych DNA znajdują również zastosowanie w badaniu genów kontrolujących poligeniczne cechy ilościowe. Analiza molekularna loci cech ilościowych (QTL) pozwala na oszacowanie ilości genów kontrolujących daną właściwość odmiany uprawnej, poziom wpływu każdego z tych loci na jej ekspresję, a także ich lokalizację w genomie (IRZYKOWSKA i WOLKO 2004). Selekcja genów warunkujących cechy ilościowe jest utrudniona, co wynika z dużej liczby alleli zaangażowanych w powstanie danej właściwości. Należy więc ograniczyć się do odnalezienia loci o dużym wpływie na rozpatrywaną cechę lub też genów sprzężonych z cechą w tak dużym stopniu, że stają się one podstawą dalszej diagnostyki. Systemy markerów molekularnych znalazły zastosowanie w tworzeniu odpowiednio nasyconych map sprzężeń, które umożliwiają efektywną lokalizację QTL, a także analizę sprzężeń pomiędzy genami cechy ilościowej, a genami cechy jakościowej, ustalanie rodzaju zależności pomiędzy fenotypami tych cech, określenie rodzaju segregacji alleli oraz szacowanie częstotliwości rekombinacji pomiędzy badanymi loci. Dzięki temu, u wielu gatunków roślin uprawnych, analiza molekularna sekwencji oraz ich sprzężeń z cechami ilościowymi,

umożliwiła wykrycie genów lub regionów kodujących ważne ekonomicznie cechy produkcyjne. Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych możliwa jest selekcja linii donorowych wykazujących najkorzystniejszą kombinację pożądaných alleli, bądź też jednej linii posiadającej skumulowane ważne użytkowo geny. Następnie wykorzystuje się je w pracach hodowlanych mających na celu uzyskania genotypu o optymalnej kombinacji genów warunkujących określoną cechę ilościową (ROMAGOSA i współaut. 1999). Selekcja materiału hodowlanego opierająca się na technikach DNA może również przyspieszyć proces odtwarzania linii rodzicielskich w procesie krzyżowania wstecznego oraz identyfikację roślin o wysokim stopniu pokrewieństwa dla odtwarzania genotypów macierzystych.

Systemy markerów molekularnych wykorzystywane są również w połączeniu z techniką BSA (ang. bulk segregant analysis) (BEDNAREK i współaut. 2002). Metoda ta zakłada możliwość identyfikacji sekwencji warunkujących określoną cechę użytkową, poprzez porównanie wzorów molekularnych roślin segregujących pod względem danej właściwości o skrajnie różnych fenotypach. Mapowanie genomów roślin należących do dużej populacji jest procedurą kosztowną i czasochłonną. Grupowanie osobników pod względem wysokiego i niskiego poziomu ekspresji fenotypowej danej właściwości, a następnie przeprowadzanie analiz molekularnych tylko na dwóch próbach zbiorczych DNA, umożliwia przyspieszenie badań mających na celu lokalizację sekwencji warunkujących cechy jedno-, jak i wielogenowe. Podczas gdy mapowanie loci cech ilościowych (QTL) jest najbardziej precyzyjną metodą lokalizacji genów warunkujących określone właściwości, analiza BSA jest wartościową alternatywą, dzięki której można uniknąć pracochłonnej analizy każdego osobnika z danej populacji. Technika ta nie tylko umożliwia identyfikację alleli warunkujących cechy użytkowe, ale również pozwala na ocenę frekwencji ich występowania w obrębie populacji (QUARRIE i współaut. 1999). Najczęściej wykorzystywanymi systemami markerowymi w technice BSA są RFLP i SSR, ze względu na ich kodominacyjny charakter umożliwiający identyfikację najbardziej wartościowych rekombinantów wykorzystywanych w hodowli (HACKAUF i WEHLING 2002).

W momencie uzyskania ulepszonych odmian roślin uprawnych, niezbędne staje się

opracowanie narzędzi umożliwiających ich precyzyjną identyfikację. Identyfikacja roślin uprawnych dokonywana jest przez międzynarodowe organizacje UPOV (ang. The International Union for The Protection of New Varieties of Plants) oraz ISTA (ang. International Seed Testing Association) przeprowadzające analizy biochemiczne białek zapasowych nasion oraz badania izoenzymatyczne, a opracowywane wykazy odmian hodowlanych

są publikowane w specjalnych katalogach. Obecnie prowadzone analizy potwierdzają przewagę systemów markerów molekularnych, takich jak SSR, SNP i AFLP, nad dotąd stosowanymi badaniami białek. Dowiedziono, że markery molekularne stanowią wiarygodne, dostępne i wydajne narzędzie oceny czystości odmian (LAW i współaut. 1998). Techniki te podlegają ciągłemu rozwojowi, a ich zakres zastosowania staje się coraz szerszy.

PODSUMOWANIE

Systemy markerowe rozwijane przez ostatnie dziesięciolecie, wpłynęły w znaczący sposób na postęp osiągnięty w hodowli i genetyce roślin. Obecny stan wiedzy na temat organizacji i struktury genomów roślinnych umożliwił przyspieszenie prac związanych z mapowaniem genomów roślinnych, analizą loci cech ilościowych i jakościowych, zaś analiza sekwencji sprzężonych z ważnymi ekonomicznie cechami stała się niezbędnym elementem prac hodowlanych. Prowadzone są intensywne badania nad doskonaleniem metod mapowania loci cech ilościowych (QTL) z wykorzystaniem złożonych analiz komputerowych, które umożliwią uszczegóławianie obecnie istniejących map genowych roślin. Molekularne technologie markerowe stały się integralną częścią programów hodowlanych, znajdując zastosowanie w transferze i modyfikacji genów między oddalonymi gatunkami roślin. Mimo wszechstronnego zastosowania metod molekularnych w genetyce roślin, na-

ukowcy napotykają pewne bariery utrudniające pracę w oparciu o te techniki. Duża odległość dzieląca polimorficzne sekwencje i geny warunkujące użyteczne cechy, zwiększa prawdopodobieństwo zachodzenia między nimi crossing-over. System markerowy umożliwiający monitorowanie segregacji danego genu podczas krzyżowania, może okazać się wówczas nieskuteczny w dalszej selekcji osobników. Podejmując badania opierające się na technikach molekularnych należy brać pod uwagę nie tylko ich ogromne zalety, ale także być świadomym ich ograniczeń, które mogą wpływać na uzyskane wyniki badań. Wybór systemu markerowego należy uzależnić od celu badawczego, wymaganego poziomu polimorfizmu, skali analiz, a także takich czynników jak wyposażenie laboratorium oraz fundusze przeznaczone na badania. Uwzględnienie wyżej wymienionych czynników może pomóc w realizacji projektu naukowego.

MOLECULAR MARKERS SYSTEMS AND THEIR APPLICATION IN PLANT BREEDING

Summary

The development of molecular techniques has led to significant improvement in our knowledge of plant genetics and understanding of the molecular mechanisms operating within plant genomes. Considerable emphasis has been laid on the use of molecular markers in studying DNA sequence variation among species, monitoring genetic variation and in genotype identification. Molecular (genetic) marker is defined as a sequence on a chromosome with specific location e.g. restriction enzyme cutting site, coding regions of DNA or segment of DNA with no known coding function but with determinable inheritance pattern. Improvements in marker systems and in the techniques used to identify DNA sequences linked to useful traits, have both enabled

tremendous advances in the area of plant breeding. The first developed marker system, RFLP, has laid the groundwork for modern genetic analysis and its numerous improvements led to development of separate systems such as RAPD and AFLP. The increasing knowledge of genotypes, acquired through genome sequencing projects, enabled designing of marker systems based on highly specific motifs such as minisatellite and microsatellite DNA repeats. Other molecular marker-based systems like sequence-tagged sites (STS), sequence characterized amplified regions (SCAR) and single nucleotide polymorphism (SNP) have been routinely used to assist selection for desirable characters, comparative mapping, sequencing of plant genomes and breeding programs.

LITERATURA

- AGHAJAN M., 2003. *Pyrosequencing in a Microchannel*. NNUN REU Program at Stanford Nanofabrication Facility, 74-75.
- ASHKENAZI V., CHANI E., LAVI U., LEVY D., HILLEL J., VEILLEUX R. E., 2001. *Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses*. Genome 44, 50-62.
- BARTH S., MELCHINGER A. R., LUBBERSTEDT T., 2002. *Genetic diversity in Arabidopsis thaliana L. Heynh. Investigated by cleaved amplification polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers*. Mol. Ecol. 11, 495-505.
- BAUTISTA N. S., SOLIS R., KAMIJIMA O., ISHII T., 2001. *RAPD, RFLP and SLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice*. Genes Genet. Syst. 76, 71-79.
- BEDNAREK P. T., KUBICKA H., KUBICKA M., 2002. *Morphological, cytological and BSA-based testing on limited segregation population AFLPs*. Cell. Mol. Biol. Lett. 7, 635-48.
- BERALDI D., PICARELLA M. E., SORESSI G. P., MAZZUCATO A., 2004. *Fine mapping of the partenocarpic fruit (pat) mutation in tomato*. Theor. Appl. Genet. 108, 209-216.
- Berzonsky W. A., Francki G. M., 1999. *Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing IRS in wheat: A review*. Euphytica 108, 1-19.
- BOLIBOK H., RAKOCZY-TROJANOWSKA M., 2003. *Evaluating the efficiency of SAMPL marker system in assessing genetic diversity in winter rye (Secale cereale L.)*. 7th Internat. Congress of Plant Mol. Biol. Barcelona.
- BORNET B., BRANCHARD M., 2004. *Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and Arabidopsis thaliana*. Hereditas 140, 245-248.
- BRADEEN J. M., SIMON P. W., 1998. *Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form*. Theor. Appl. Genet. 97, 960-967.
- BROOKES, A. J., 1999. *The essence of SNPs*. Gene 234, 177-186.
- CAETANO-ANOLLES G., BASAM B. J., GRESSHOFF P. M., 1991. *DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers*. Bio/Technology 9, 553-557.
- CHEŁKOWSKI, J., GOLKA, L., STĘPIEŃ, Ł., 2003. *Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher*. J. Appl. Genet. 44, 323-338.
- CHEN X. H., NIU Y. C., HU B. Z., 2004. *Identification of RAPD markers linked to the resistance gene Yr5 against wheat stripe rust with denaturing PAGE-silver staining*. Yi. Chuan. Xue. Bao. 31, 270-274.
- CHWEDORZEWSKA K. J., BEDNAREK P. T., PUCHALSKI J., KRAJEWSKI P., 2002. *AFLP-profiling of long-term stored and regenerated rye Genebank samples*. Cell. Mol. Biol. Lett. 7, 457-463.
- DEPUTY J. C., MING R., MA H., LIU Z., FITCH M. M., WANG M., MANSHARDT R., STILES J. I. 2002. *Molecular markers for sex determination in papaya (Carica papaya L.)*. Theor. Appl. Genet. 106, 107-111.
- DOMENIUK V. P., BELOUSOV A. A., SIVOLAP I. U. M., 2002. *DNA-marking of quantitative traits in corn*. Tsitol. Genet. 36, 9-15.
- FU Y. B., 1999. *Patterns of the purging of deleterious genes with synergistic interactions in different breeding schemes*. Theor. Appl. Genet. 98, 337-346.
- HACKAUF B., WEHLING P., 2002. *Identyfication of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome*. Plant Breed. 12, 17-25.
- IRZYKOWSKA L., WOLKO B., 2004. *Interval mapping of QTLs controlling yield-related traits and seed protein content in Pisum sativum*. J. Appl. Genet. 45, 297-306.
- IRZYKOWSKA L., WOLKO R., ŚWIECICKI W. K., 2002. *Interval mapping of QTLs controlling some morphological traits in pea*. Cell. Mol. Biol. Lett. 7, 665-670.
- JENA K. K., KHUSH G. S., 1990. *Introgression of genes from Oryza officinalis Wall. ex Watt to cultivated rice. O. sativa L.*. Theor. Appl. Genet. 80, 737-745.
- JORDAN D. R., CASU R. E., BESSE P., CARROLL B. C., BERDING N., MCINTYRE C. L., 2004. *Markers associated with stalk number and suckering in sugarcane colocate with tillering and rhizomatousness QTLs in sorghum*. Genome 47, 988-993.
- KARP, A., ISAAC, P. G., INGRAM, D. S., 1998. *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. London: Chapman and Hall.
- KEANE B., PELIKAN S., TOTH G. P., SMITH M. K., ROGSTAD S., 1999. *Genetic diversity of Typha latifolia (Typhaceae) and the impact of pollutants examined with tandem-repetitive DNA probes*. Am. J. Bot. 86, 1226-1238.
- KELLER M., KELLER B., SCHACHERMAYR G., WINZELER M., SCHMID J. E., STAMP P., MESSMER M. M., 1999. *Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat x spelt population*. Theor. Appl. Genet. 98, 903-912.
- KHLESTKINA E. K., PESTSOVA E. G., SALINA E., RÖDER M. S., ARBUZOVA V. S., KOVAL S. F., BORNER A., 2002. *Genetic mapping and tagging of wheat genomes using RAPD, STS, SSR markers*. Cell. Mol. Biol. Lett. 7, 795-802.
- KIM D. S., LEE I. S., JANG C. S., KANG S. Y., SONG H. S., LEE Y. I., SEO Y. W., 2004. *Development of AFLP-derived STS markers for the selection of 5-methyltryptophan-resistant rice mutants*. Plant Cell Rep. 23, 71-80.
- KING R. A., FERRIS C., 2002. *A variable minisatellite sequence in the chloroplast genome of Sorbus L. (Rosaceae: Maloideae)*. Genome 45, 570-600.
- KOJIMA T., NAGAOKA T., NODA K., OGIHARA Y., 1998. *Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of markers*. Theor. Appl. Genet., 96, 37-45.
- KORNBERG A., LIEBERMAN I., SIMMS E. S., 1955. *Enzymatic synthesis of purine nucleotides*. J. Biol. Chem. 215, 417-427.
- LAW J. R., DONINI P., KOEBNER R. M. D., REEVES J. C., COOKE R. J., 1998. *DNA profiling and plant variety registration. III: the statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms*. Euphytica 102, 335-342.
- LIERSCH A., BARTKOWIAK-BRODA I., OGRODOWCZYK M., KRÓTKA K., 2004. *Związek pomiędzy heterozją i dystansem genetycznym oceniony na podstawie polimorfizmu markerów RAPD u rzepaku ozimego (Brassica napus L.)*. Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu 2004, 261-268.
- MALYSHEV S. V., KORZUN V. N., ZABENKOVA K. I., VOILOKOV A. V., BERNER A., KARTEL' N. A., 2003. *Comparative molecular-genetic mapping of genomes of rye (Secale cereale L.) and other cereals*. Tsitol. Genet. 37, 9-20.

- MAXAM A. M., GILBERT W., 1977. *A new method for sequencing DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560.
- MOCHIDA K., YAMAZAKI Y., OGIHARA Y., 2003. *Discrimination of homoeologous expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags*. Mol. Genet. Genomics 270, 371–377.
- MORGANTE M., HANAFEY M., POWELL W., 2002. *Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes*. Nat. Genet. 30, 194–200.
- MORGANTE M., VOGEL J., 1994. *Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms*. U.S. Patent Appl 08/326456.
- NEUHAUS-URL G., NEUHAUS G., 1993. *The use of the nonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity*. Transgenic Res. 2, 115–120.
- NISHIZAWA S., KUBO T., MIKAMI T., 2000. *Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets*. Curr. Genet. 37, 34–38.
- PACEY-MILLER T., HENRY R. J., 2003. *Single-nucleotide polymorphism detection in plant using a single-stranded pyrosequencing protocol with a universal biotinylated primer*. Anal. Biochem. 317, 166–170.
- QUARRIE S. A., LAZIĆ-JANČIĆ V., KOVAČEVIĆ D., STEED A., PEKIĆ S., 1999. *Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize*. J. Exp. Bot. 50, 1299–1306.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA M., BOLIBOK H., 2004. *Characteristic and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants*. Cell. Mol. Biol. Lett. 9, 221–238.
- RICKERT A. M., PREMSTALLER A., GEBHARDT C., OEFNER P. J., 2002. *Genotyping of SNPs in a polyploid genome by pyrosequencing*. Biotechniques 32, 592–593, 596–598.
- RHARRABI Y., ELHANI S., MARTOS NUÑEZ V. Y GARCÍA DEL MORAL L. F., 2000. *Relationship between some quality traits and yield of durum wheat under southern Spain conditions*. [W:] *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges*. ROYO C., NACHIT M. M., DI FONZO N., ARAUS J. L. (red.). Options Méditerranéennes 40, 529–531.
- ROMAGOSA I., HAN F., ULLRICH S. E., HAYES P. M., WESENBERG D. M., 1999. *Verification of yield QTL through realized molecular marker-assisted selection responses in a barley cross*. Mol. Breed. 5, 143–152.
- ROY J. K., BALYAN H. S., PRASAD M., GUPTA P. K., 2002. *Use of SAMPL for a study of DNA polymorphism, genetic diversity and possible gene tagging in bread wheat*. Theor. Appl. Genet. 104, 465–472.
- SATO Y., NISHIO T., 2003. *Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP*. Theor. Appl. Genet. 3, 560–567.
- SILLS, G., NIENHUIS J., 1998. *Changes in DNA-marker frequencies associated with response to contrasting selection methods in Arabidopsis*. Theor. Appl. Genet. 97, 275–282.
- SINGRUN CH., HSAM S. L., ZELLER F. J., WENZEL G., MOHLER V., 2004. *Localization of a novel recessive powdery mildew resistance gene from common wheat line RD30 in the terminal region of chromosome 7AL*. Theor. Appl. Genet. 109, 210–214.
- SMITH H. O., WILCOX K. W., 1970. *A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. 1. Purification and general properties*. J. Mol. Biol. 51, 379–391.
- SOUTHERN E. M., 1975. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol. 98, 503–517.
- STĘPIEŃ Ł., BŁASZCZYK L., CHEŁKOWSKI J., 2004. *Marker DNA dla identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną u pszenicy uprawnej*. Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, 309–318.
- STUBER C. W., LINCOLN S. E., WOLFF D. W., HELENTJARIS T., LANDER E. S., 1992. *Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid form elite maize inbred lines using molecular markers*. Genetics 132, 823–839.
- TOUZET P., HUEBER N., BURKHOLZ A., BARNES S., CUGUEN J., 2004. *Genetic analysis of male fertility restoration in wild cytoplasmic male sterility G of beet*. Theor. Appl. Genet. 109, 240–247.
- TSENG Y. T., LO H. F., HWANG S. Y., 2002. *Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross breeding cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphisms*. Bot. Bull. Acad. Sin. 43, 99–105.
- TYRKA M., BŁASZCZYK L., CHEŁKOWSKI J., LIND V., KRAMER I., WEILEPP M., WISNIEWSKA H., ORDON F., 2004. *Development of the single nucleotide polymorphism marker of the wheat Lr1 leaf rust resistance gene*. Cell. Mol. Biol. Lett. 9, 879–889.
- URASAKI N., TOKUMOTO M., TARORA K., BAN Y., KAYANO T., TANAKA H., OKU H., CHINEN I., TERAUCHU R., 2002. *A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (Carica papaya L.)*. Theor. Appl. Genet. 104, 281–285.
- VARSHNEY A., MOHAPATRA T., SHARMA R. P., 2004. *Development and validation of CAPS and AFLP markers for white rust resistance gene in Brassica juncea*. Theor. Appl. Genet. 109, 153–159.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acid Res., 23, 4407–4414.
- WANG C. T., HUANG Z. J., HE C. F., BI C. L., SHEN Y. Z., 2001. *Detection of the wheat salt-tolerant-mutant using PCR-SSCP combining with direct sequencing*. Yi Chuan. Xue Bao. 28, 852–855.
- WATSON J. D., CRICK F. H. C., 1953. *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature 171, 737–738.
- WELSH J., MCCLELLAND M., 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucl. Acids Res. 8, 7213–7218.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V., 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucl. Acids Res. 18, 6531–6535.
- YANG J. B., WANG X. F., ZHAO C. S., XIANG T. H., LI L., 2002. *Cloning and sequencing of fragments associated with cytoplasm male sterility of rice*. Yi Chuan Xue Bao. 29, 808–813.
- ZHOU W.-C., KOLB F. L., BAI G.-H., DOMIER L. L., BOZE L. K., SMITH N. J., 2003. *Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat*. Plant Breed. 122, 40–46.
- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D., 1994. *Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification*. Genomics 20, 176–183.