

*Bogdan Wolko, Katarzyna Kruszka
Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu*

Markery molekularne w badaniach zmienności genetycznej roślin

1. Wstęp

Dynamicznie rozwijająca się w ostatnich latach biologia molekularna stworzyła nowe sposoby analizowania zmienności genetycznej. Mogą one mieć duże znaczenie w hodowli roślin przy charakterystyce materiału wyjściowego, ocenie odrębności, wyrównania i trwałości (OWT) wytworzonych odmian oraz przy wykrywaniu markerów sprzężonych z cechami selekcjonowanymi w procesie hodowli. Dotychczasowe systemy oceny zmienności uwzględniały cechy morfologiczne, fizjologiczne i użytkowe, a ich wartość uzależniona była od zakresu zmienności cechy/genu, stałości ekspresji i stopnia penetracji oraz od liczby cech monogenicznych w danym systemie. W praktyce hodowlanej nie zawsze systemy te umożliwiały właściwy wybór form rodzicielskich do krzyżowań i nie zawsze można było w sposób jednoznaczny wyjaśnić wątpliwości z zakresu OWT odmian. Ponadto nawet w przypadku tzw. gatunków modelowych w genetyce (pomidor, kukurydza, groch, jęczmień) liczba wykrytych markerów dla ważnych cech użytkowych nie była zbyt duża, a sprzężenia marker – cecha użytkowa nie zawsze wystarczająco silne. Najnowsze techniki analityczne umożliwiają ocenę zróżnicowania genetycznego w dowolnej populacji roślinnej, jak również porównanie bliżej lub dalej spokrewnionych jednostek systematycznych, z pominięciem badań złożonych zależności istniejących pomiędzy fenotypem, genotypem i środowiskiem. Jednym z takich sposobów jest analiza polimorfizmu białek enzymatycznych oraz DNA.

2. Markery izoenzymatyczne

W ciągu niewielu lat, od kiedy Hunter i Market [14] połączyli technikę rozdziału elektroforetycznego na żelu skrobiowym z wykrywaniem aktywności rozdzielanych białek enzymatycznych za pomocą cytochemicznych metod barwienia, stało się oczywiste, że analiza polimorfizmu białek jest niezwykle użytecznym narzędziem w wielu dziedzinach badań biologicznych. Technika elektroforezy żelowej umożliwiła

wykrycie różnych molekularnych form enzymów mających te same zdolności katalityczne, lecz różniących się swoimi właściwościami fizykochemicznymi. Formy takie nazwano izoenzymami. Izoenzymy są bezpośrednimi produktami działania genów, segregującymi zgodnie z prawami Mendla, i jako takie stały się wygodnymi markerami genetycznymi.

Żel skrobiowy jest najczęściej używanym nośnikiem w elektroforezie izoenzymów ze względu na łatwość przygotowania, nietoksyczność i możliwość rozcięcia na kilka warstw. Zwłaszcza ta ostatnia właściwość jest bardzo cenna w badaniach genetycznych, bo w jednym rozdzielonym żelu pozwala obserwować jednocześnie zmienność nawet kilkunastu izoenzymów w różnych systemach barwienia [33]. Żel poliakrylamidowy jest również często używanym nośnikiem w elektroforezie izoenzymów. Jego zaletą jest jednolita porowatość, łatwa do określenia poprzez stężenie monomeru użytego do polimeryzacji. Inną cechą tego żelu jest jego przezroczystość, co pozwala na wykorzystanie go w badaniach ilościowych przy użyciu densytometru [27]. Niektóre enzymy, np. amylazy, ze względu na ich katalityczne własności mogą być analizowane tylko na żelu poliakrylamidowym [44].

Markery izoenzymatyczne mają kilka cennych zalet, jakich nie miały inne dotychczas stosowane markery (np. morfologiczne). Różne formy izoenzymatyczne występują w różnych tkankach i organach w trakcie całego rozwoju rośliny. Analizy genetyczne pojedynczych osobników można wykonać w bardzo wczesnym stadium rozwojowym, w małych skrawkach tkanek, bez konieczności obserwacji osobników dojrzałych. Wiele systemów enzymatycznych ma stałą liczbę izoenzymów występujących w różnych subkomórkowych strukturach [10, 11]. Badania nad charakterem dziedziczenia izoenzymów dowiodły, że ujawniają one niezmiernie cenną w pracach genetycznych zaletę kodominacyjnego sposobu dziedziczenia [26].

Obserwacja polimorfizmu izoenzymatycznego pozwala również wnioskować o budowie czwartorzędowej badanego enzymu. Wiele enzymów ma prostą strukturę pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Niektóre jednak cząsteczki enzymów składają się z dwu lub więcej łańcuchów polipeptydowych, tworząc struktury czwartorzędowe w postaci dimerów lub tetramerów. Efektem współdziałania alleli kontrolujących takie polimerowe izoenzymy jest ujawnienie się w heterozygotach, oprócz prążków typu rodzicielskiego, także prążków mieszańcowych, stanowiących produkty różnych kombinacji podjednostek białkowych.

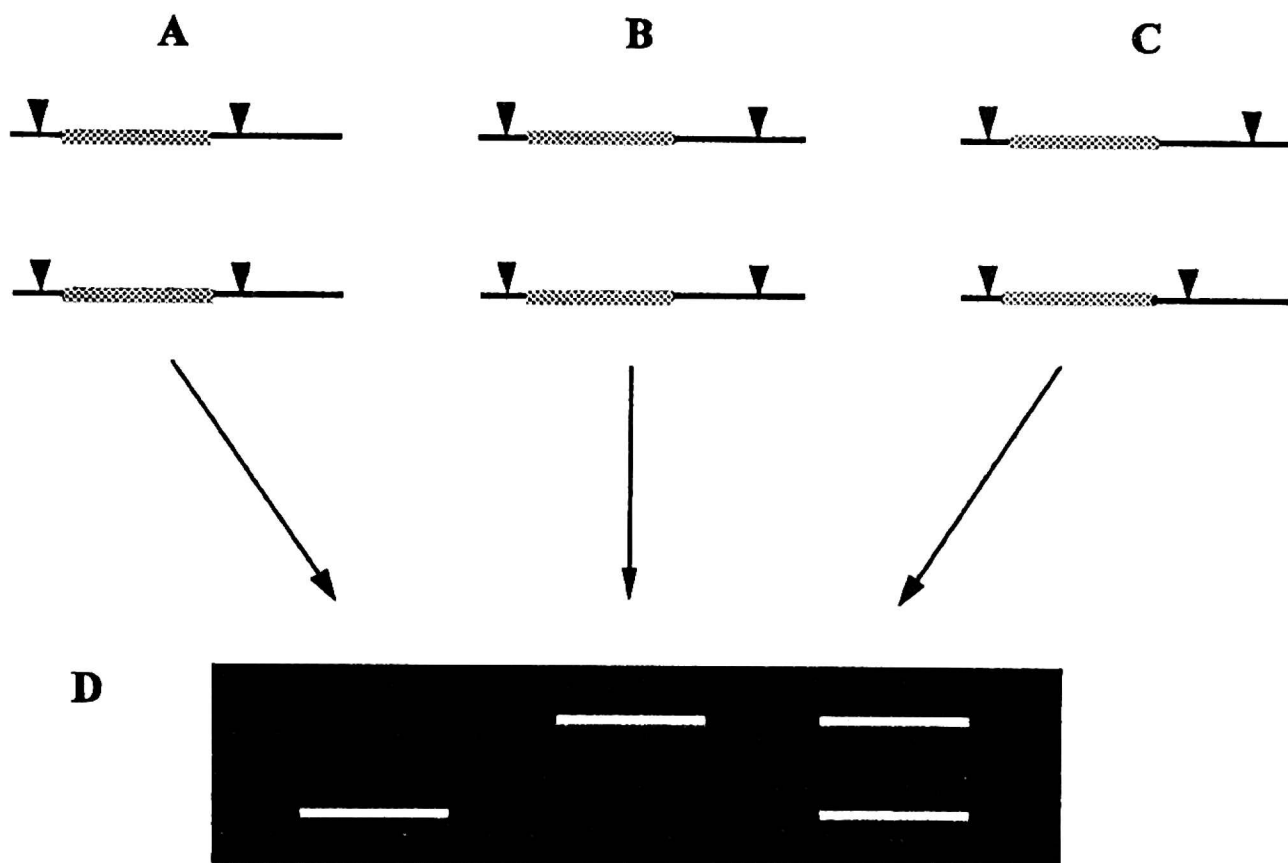
3. Polimorfizm DNA

Wykorzystanie polimorfizmu sekwencji kwasów dezoksynukleinowych do tworzenia nowego typu markerów genetycznych było możliwe dzięki udoskonaleniu technik ekstrakcji i analizy DNA. Mają one zalety podobne do markerów izoenzymatycznych, wykazują jednak znacznie szerszy zakres polimorfizmu.

3.1. Markery powstałe w wyniku trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi

Pierwszą z technik analizy zmienności DNA było badanie polimorfizmu długości restrykcyjnych fragmentów DNA (RFLP — restriction fragments length polymorphism) [4]. Technika ta polega na trawieniu wyizolowanego, genomowego DNA za pomocą jednej lub kilku endonukleaz zwanych enzymami restrykcyjnymi. Każdy z tych enzymów rozcina cząsteczkę DNA w specyficznym dla siebie miejscu. Otrzymane w ten sposób różnej długości fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie, przenoszone na specjalne membrany i hybrydyzowane ze specyficznymi sondami molekularnymi, homologicznymi do sekwencji badanego fragmentu DNA. Identyfikacja hybrydujących fragmentów DNA odbywa się metodą autoradiografii bądź metodami nieradioaktywnymi. Jeśli różnice genetyczne dwu osobników dotyczą długości fragmentu powstałego po enzymatycznym trawieniu badanego DNA, to powstałe różnej długości fragmenty można rozdzielić za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym. Odzwierciedleniem zróżnicowania genetycznego badanych genotypów jest występowanie różnego wzoru identyfikowanych fragmentów restrykcyjnych.

Polimorfizm markerów RFLP może wynikać zarówno z pojedynczych zmian sekwencji nukleotydów, jak i zmian obejmujących większe fragmenty DNA. Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie wynik trawienia enzymem restrykcyjnym



Rysunek 1. Trawienie DNA z roślin diploidalnych (A,B — homozygoty, C — heterozygota) enzymem restrykcyjnym oraz autoradiogram identyfikujący produkty trawienia (D); strzałkami oznaczono miejsca rozcinania nici DNA przez enzym restrykcyjny, szarym kolorem zaznaczono miejsce hybrydyzacji sondy molekularnej z badanym DNA

dwu homozygotycznych genotypów A i B, charakteryzujących się różną długością fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia. Genotyp C jest heterozygotą względem badanego locus, co wyraża się występowaniem odmiennych miejsc restrykcyjnych dla obu alleli.

3.2. Markery powstałe w wyniku działania łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Momentem przełomowym w analizie zmienności genetycznej na poziomie DNA było zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR — polymerase chain reaction) do enzymatycznej syntezy *in vitro* milionów kopii specyficznych fragmentów DNA [21]. Reakcja ta jest stosowana z pełnym powodzeniem od 1990 roku w pracach nad DNA roślinnym [36, 39]. Techniki działające z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy znalazły szerokie zastosowanie w genetyce roślin. Używane były do identyfikacji odmian uprawnych [13], określenia pochodzenia materiałów mieszańcowych [35], badania filogenetycznego pokrewieństwa gatunków [24, 38], znakowania ważnych cech użytkowych [12, 19, 43] oraz mapowania genomu [34]. Uzyskane techniką PCR markery molekularne mogą być użyte w mapowaniu razem z markerami morfologicznymi, izoenzymatycznymi i RFLP [30].

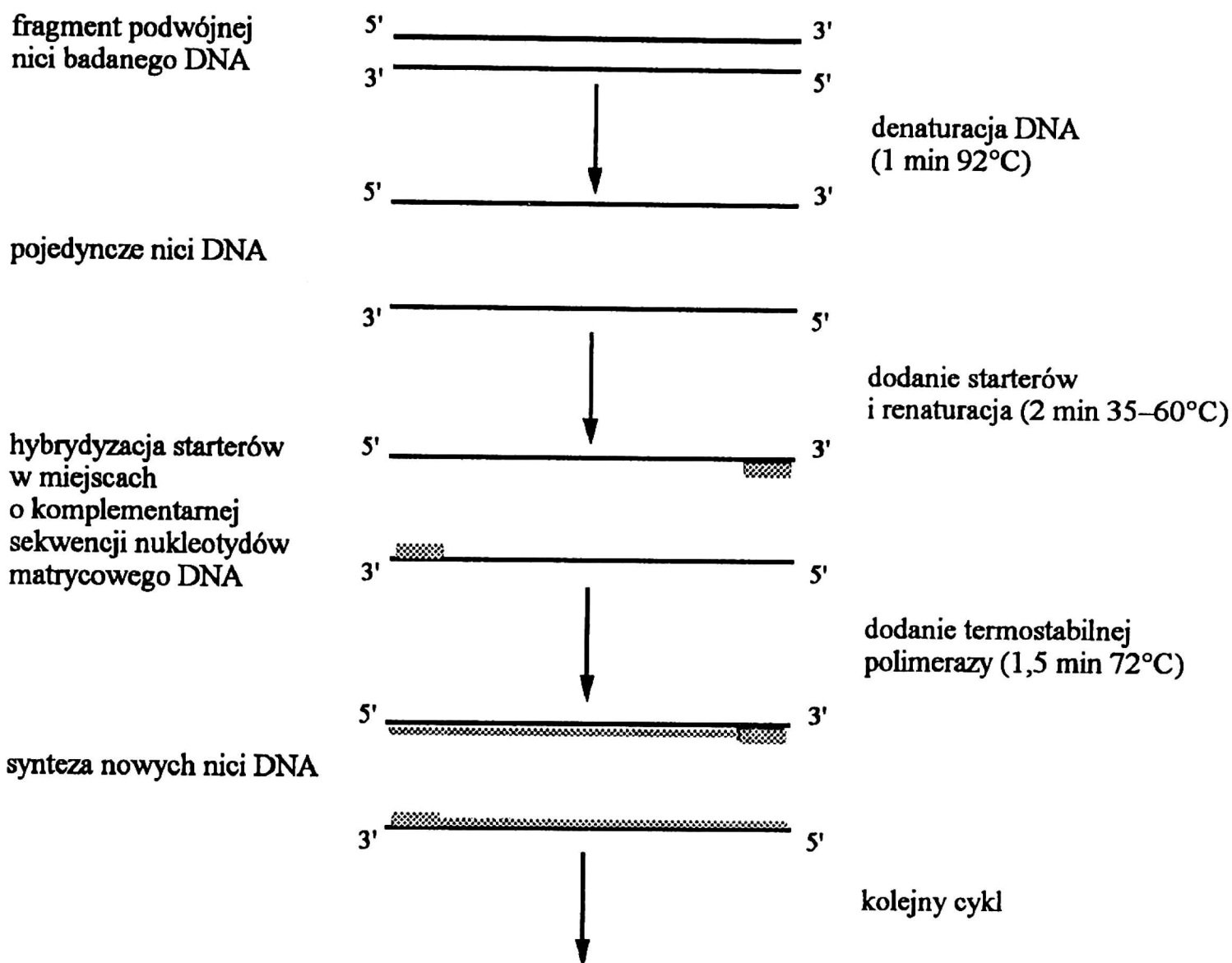
W klasycznym PCR stosuje się przynajmniej dwa różne startery oligonukleotydo- we o określonych sekwencjach, komplementarnych do sekwencji skrajnych, "oskrzydłających" interesujący fragment genomowego DNA. Pierwsze zastosowanie PCR do generowania polimorfizmu opierało się na spostrzeżeniu łatwości wiązania się stosunkowo krótkich oligonukleotydów z wieloma regionami genomu. Taki starter hybryduje z homologicznymi sekwencjami genomowego DNA po jego rozpadzie na pojedyncze nici podczas procesu denaturacji. Nowa nić DNA jest syntetyzowana na matrycy genomowego DNA za pomocą polimerazy DNA (rys. 2). W wyniku amplifikacji powstaje mieszanina fragmentów DNA różniących się wielkością.

Stosowane są dwa rodzaje starterów:

- specyficzne, wykorzystywane do amplifikacji fragmentów DNA o znanej — choćby częściowo — sekwencji, np. określonych alleli, sekwencji minisatelitarnych lub mikrosatelitarnych,
- dowolne, najczęściej długości od kilku do kilkunastu nukleotydów i przypadkowej sekwencji, zwykle o 50–80% składzie zasad C i G. Są one stosowane w badaniach DNA o nieznannej sekwencji.

Powstałe odcinki DNA mogą być następnie frakcjonowane za pomocą rozdzału elektroforetycznego. Obecność lub brak powielonego produktu określonej wielkości świadczy o polimorfizmie określonego markera [8].

Wiele metod diagnostyki genetycznej rozwiniętych w ostatnich kilku latach wykorzystywało technikę PCR do analizy polimorfizmu DNA. Termin MAAP (multiple arbitrary amplicon profiling) odnosi się do trzech takich metod: RAPD — random



Rysunek 2. Schemat reakcji PCR

amplified polymorphic DNA [39], AP-PCR — arbitrarily-primed PCR [36], DAF — DNA amplification fingerprinting [5]. Wszystkie one polegają na tworzeniu markerów DNA przy użyciu pojedynczych starterów o przypadkowej sekwencji za pomocą PCR. Różnice pomiędzy tymi metodami dotyczą długości stosowanych starterów, warunków reakcji PCR i metod identyfikacji.

Metody MAAP znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach biologii molekularnej, szczególnie w analizie genomów roślin. Źródłem polimorfizmu markerów generowanych tymi metodami są:

- zmiany nukleotydowej sekwencji w obrębie miejsca przyłączenia startera do matrycy DNA, co może prowadzić do eliminacji lub utworzenia nowego miejsca hybrydyzacji startera,
- różnice w długości amplifikowanego segmentu DNA,
- zmiany konformacyjne DNA, powodujące zróżnicowanie efektywności hybrydyzacji startera lub procesu amplifikacji.

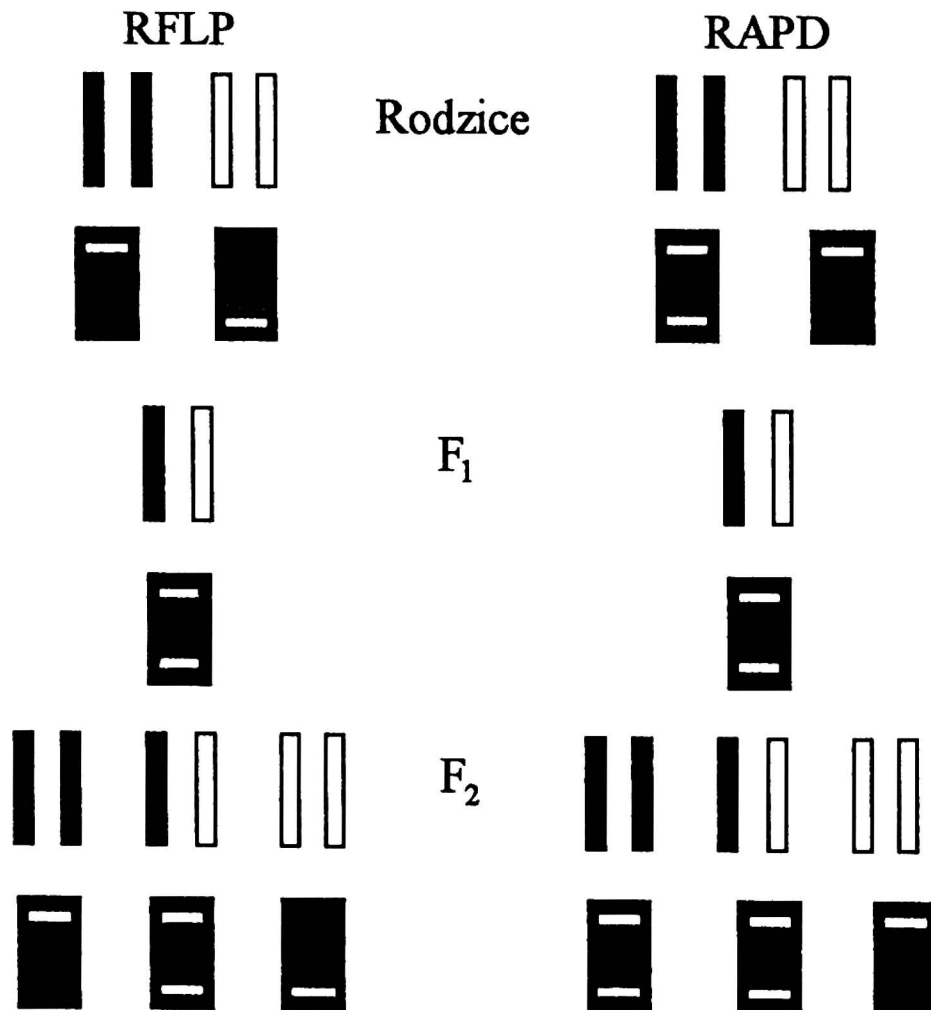
3.3. Porównanie metod RFLP i RAPD

Istotną zaletą markerów RFLP jest kodominacyjny charakter ich dziedziczenia. Oznacza to, że w segregującym materiale można odróżnić osobniki heterozygotyczne w badanym locus od obu typów homozygot (rys. 3). Wyróżnikiem heterozygoty w obrazie elektroforetycznym jest występowanie prążków hybrydacyjnych obojga rodziców.

Markery RAPD mają dominujący charakter dziedziczenia. Oznacza to, że nie można rozróżnić osobników, w których amplifikowany fragment DNA występuje w obu allelach czy tylko w jednym allelu badanego locus. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji jest taki sam dla homozygoty dominującej i heterozygoty.

Sondy molekularne stosowane w metodzie RFLP z reguły zawierają sekwencje homologiczne do pojedynczych kopii badanego DNA, co umożliwia uzyskanie informacji o jednym locus. Natomiast każdy starter użyty w metodzie RAPD zapoczątkowuje reakcję amplifikacji w wielu miejscach genomu.

Badanie polimorfizmu metodą RAPD nie wymaga wstępnej informacji o sekwencji analizowanego DNA. Metoda ta jest również mniej pracochłonna, zdecydowanie szybsza i wydajniejsza niż RFLP. Szersze porównanie właściwości obu metod zebrało w tabeli 1.



Rysunek 3. Kodominacyjny charakter dziedziczenia markerów RFLP i dominujący charakter dziedziczenia markerów RAPD

Tabela 1. Porównanie właściwości metod RFLP i RAPD [25, 40]

Wyszczególnienie	RFLP	RAPD
Podstawa oznaczenia	trawienie restrykcyjne blotting wg Southerna hybrydyzacja	amplifikacja z użyciem losowo dobranych starterów
Typ polimorfizmu	mutacje punktowe, insercje, delecje	mutacje punktowe, insercje, delecje
Poziom polimorfizmu	średni	wysoki
Dystrybucja	w obrębie całego genomu	w obrębie całego genomu
Czy wykrywa allele genu?	tak	nie
Liczba wykrywanych loci	1–3	1–10
Częstość genomowego występowania	wysoka	bardzo wysoka
Rodzaj dziedziczenia	kodominacja	dominacja
Część genomu dostępna badaniom	regiony kodujące	cały genom
Typ sondy	gatunkowo-specyficzny genomowy DNA o małej licz- bie kopii lub klony cDNA	oligonukleotydy (najczęściej ośmio-dziesięciomery)
Wymagana jakość DNA	relatywnie czysty	surowy ekstrakt
Wymagana ilość DNA	2–10 µg	10–25 ng
Wymagana znajomość sekwencji genomu	nie	nie
Trudności techniczne	umiarkowane	niewielkie
Wiarygodność	wysoka	umiarkowana
Koszt analizy	wysoki	niski

3.4. Konwersja dominujących loci RAPD na markery o kodominującym charakterze dziedziczenia

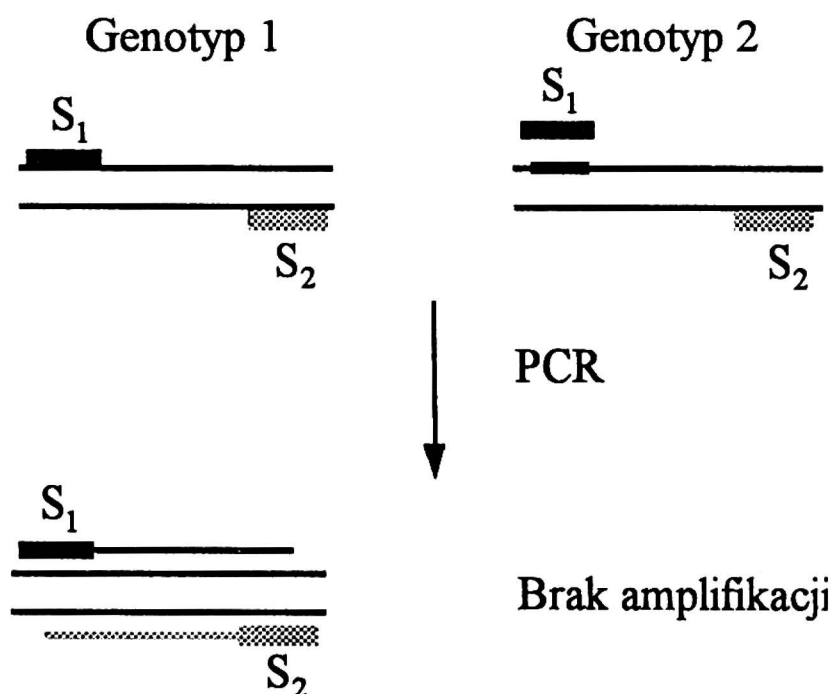
W celu rozróżnienia genotypów homozygotycznych od heterozygotycznych w analizie segregujących markerów RAPD można stosować krzyżowanie wsobne i wsteczne badanej populacji. Procedura taka wydłuża jednak czas przygotowania materiału do analiz. Mało skuteczne wydają się też techniki densytometrycznego pomiaru na żelu intensywności prążków czy stosowanie klonowanych produktów amplifikacji uzyskanych przy użyciu starterów RAPD jako sond molekularnych w metodzie RFLP.

W metodzie o nazwie SCARs (sequence-characterized amplified regions) [23] markery genetyczne otrzymuje się poprzez specyficzną amplifikację DNA z pojedynczych prążków RAPD przy użyciu pary długich starterów zawierających oryginalne sekwencje starterów RAPD oraz kilkanaście kolejnych nukleotydów komplementarnych do sekwencji każdego z końców amplifikowanego fragmentu DNA zawartego w badanym prążku RAPD. Technika ta niekiedy określana jest nazwą STARs (sequence-tagged amplified regions) lub STS (sequence tagged sites). Markery SCARs wykazują dominacyjny lub kodominacyjny charakter dziedziczenia, gdy amplifikowane fragmenty DNA wykazują polimorfizm wielkości.

Jednym ze skutecznych sposobów rozróżnienia homozygotycznych markerów RAPD od heterozygotycznych jest metoda DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). W metodzie tej wykorzystywane jest zjawisko odmiennej podatności na termiczną i chemiczną denaturację alleli tworzących locus heterozygotyczny. Efektem tego jest zróżnicowana migracja w żelu zawierającym wzrastający gradient związku denaturującego.

Zjawisko odmiennej konformacji denaturowanych i gwałtownie ochładzanych amplifikowanych fragmentów DNA, nieznacznie różniących się sekwencją, wykorzystano w metodzie SSCP (single-strand conformational polymorphism). Różne allele SSCP są identyfikowane elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym zwykle w niskiej temperaturze. Zdolność rozróżniania alleli zależy od warunków rozdziału elektroforetycznego.

Innym przykładem metody pozwalającej różnicować allele loci polimorficznych jest AS-PCR (allele-specific PCR) [42]. Polega ona na amplifikacji specyficznych alleli lub wariantów sekwencji DNA dla tego samego locus. W podstawowej wersji metody specyficzność osiąga się poprzez użycie pary starterów PCR, których sekwencja pokrywa się częściowo z sekwencją różniącą analizowane allele (rys. 4).

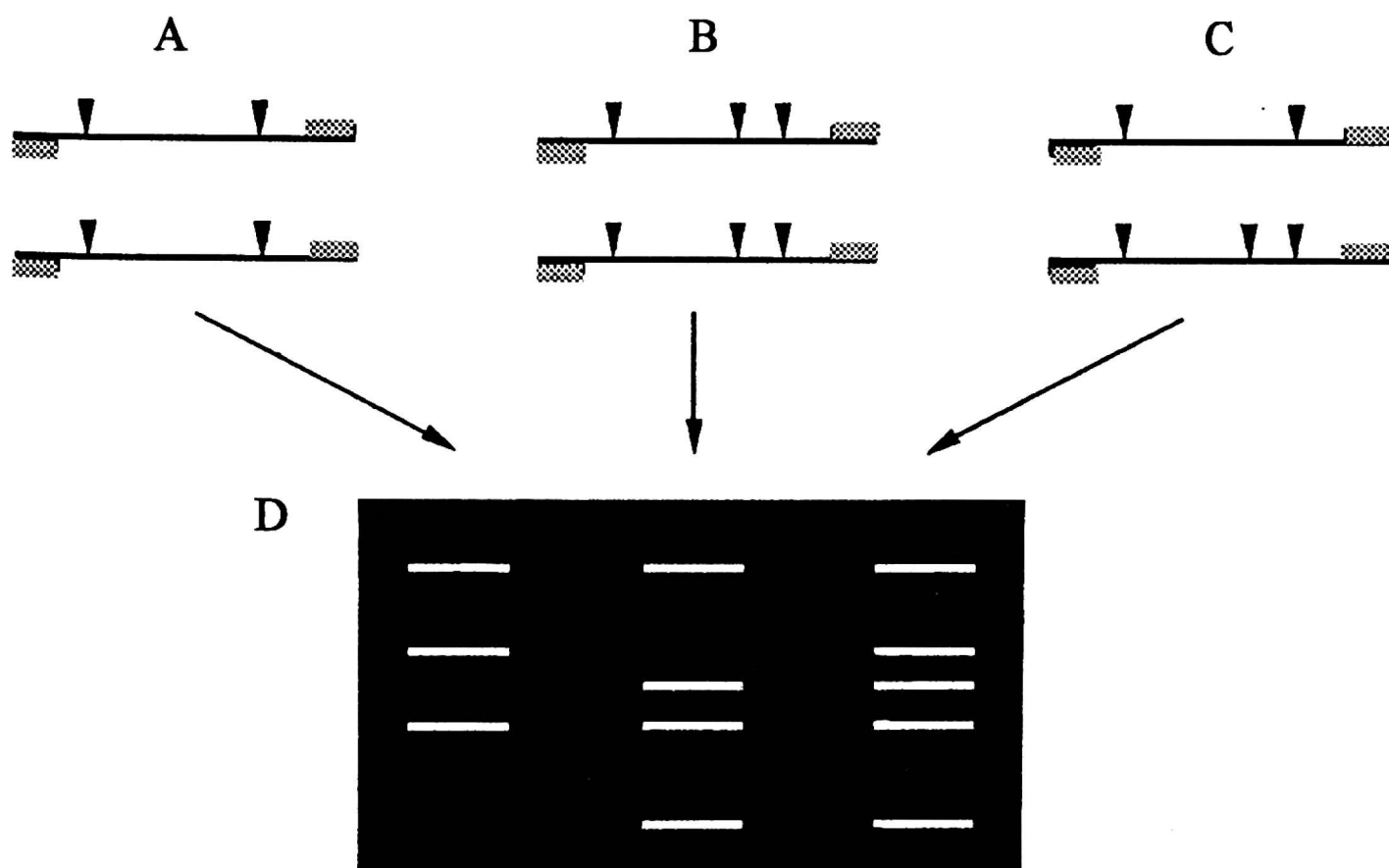


Rysunek 4. Identyfikacja alleli za pomocą specyficznych starterów w metodzie AS-PCR; S₁, S₂ – para starterów; sekwencja jednego z nich jest komplementarna przynajmniej częściowo z sekwencją matrycowego DNA, różniącą analizowane allele

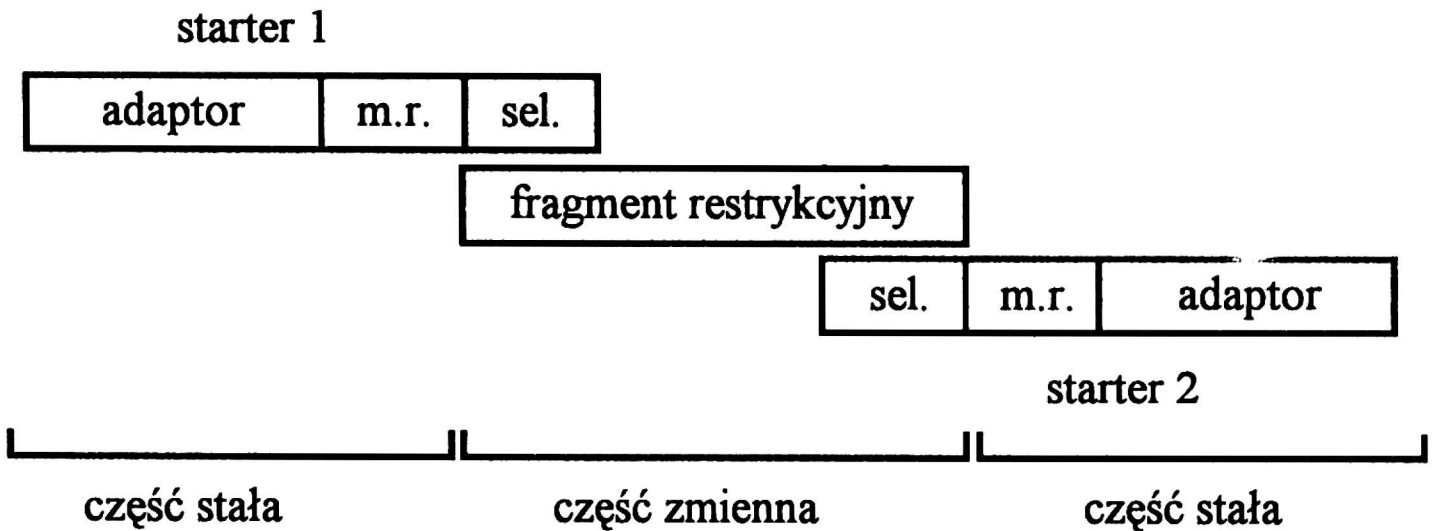
3.5. Markery powstałe w wyniku połączenia technik trawienia enzymami restrykcyjnymi i PCR

Polimorfizm markerów generowanych techniką PCR może być dodatkowo wzbogacony poprzez trawienie enzymami restrykcyjnymi przed lub po amplifikacji. Metoda określana terminem CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) [2] polega na amplifikacji metodą RAPD fragmentów DNA, które są następnie poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Schemat generacji markerów tą metodą przedstawiono na rysunku 5. Elektroforetyczna analiza produktów trawienia może pozwolić na identyfikację różnic między allelami, gdy występowanie miejsca restrykcyjnego tylko w jednym allelu heterozygoty prowadzi do powstania większej liczby prążków na żelu (rys. 5).

Inna metoda, nazwana SRFA (selective restriction fragment amplification), polega na amplifikacji techniką PCR fragmentów DNA otrzymanych po trawieniu co najmniej jednym enzymem restrykcyjnym. Interesującą nowością tej metody jest konstrukcja miejsca rozpoznawanego przez specyficzne startery oraz samego startera. Do fragmentu restrykcyjnego dołączone są krótkie 10–30-nukleotydowe sekwencje DNA nazywane adaptorami, które razem z sekwencjami rozpoznawanymi przez endonukleazy stanowią część stałą, do której przyłączają się startery. Sekwencja



Rysunek 5. Sposób rozróżnienia genotypów homozygotycznych (A,B) od heterozygotycznych (C) za pomocą metody CAPS; strzałkami oznaczono miejsca trawienia matrycowego DNA enzymami restrykcyjnymi. Wynik elektroforetycznej analizy powstałych fragmentów DNA przedstawiono na diagramie (D)



Rysunek 6. Konstrukcja starterów w metodzie SRFA [18]; oznaczenia: m.r. – sekwencja startera komplementarna do miejsca restrykcyjnego, rozpoznawanego przez endonukleazy; sel. – część selekcyjna

nukleotydowa starterów odpowiada sekwencji części stałej (adaptor plus miejsce restrykcyjne) i jest uzupełniona o część selekcyjną. Część selekcyjna jest elementem różnicującym startery i składa się z jednego do czterech nukleotydów, które rozpoznają końce fragmentów restrykcyjnych zgodnie z formułą 4^{2n} , gdzie n jest liczbą zasad selekcyjnych. Metoda SRFA uwzględnia nie tylko różnice w trawieniu DNA enzymami restrykcyjnymi (jak w metodzie RFLP), ale także różnice w sekwencji przyległych do miejsca trawienia zasad, które są rozpoznawane przez startery selekcyjne. Schemat tworzonego w tej metodzie układu starter – amplifikowany fragment restrykcyjny przedstawiono na rysunku 6.

3.6. Markery DNA związane z analizą powtarzalnych sekwencji nukleotydowych

Stwierdzenie, że genom organizmów eukariotycznych zawiera powtarzające się wielokrotnie identyczne sekwencje zasad, dało podstawę do zastosowania analizy zmienności takiego rodzaju DNA i tworzenia nowego typu markerów genetycznych [22]. Loci tych markerów, określane skrótem VNTR (variable number tandem repeats) zawierają powtarzalne sekwencje długości 11–60 par zasad, które nazwano minisatelitami [16]. Szeregowo ułożone minisatelity "oskrzydłone" są stałymi sekwencjami, na które działają enzymy restrykcyjne. Długość fragmentów restrykcyjnych produkowanych przez tego typu loci genetyczne jest proporcjonalna do ilości powtórzeń jednostki podstawowej. Repetytywne DNA zawarte w VNTR loci może być również namnażane za pomocą metody PCR.

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudził szczególny typ repetytywnego DNA, gdzie motywem powtarzalnym jest odcinek zawierający 4, 3, 2, a nawet 1 nukleotyd. Taki region określany jest jako mikrosatelitarny DNA [17], SSR (short

sequence repeats) [15], STR (short tandem repeats) [7] lub STMS (sequence tagged microsatellite sites) [3]. Amplifikację tego typu DNA prowadzi się metodą PCR, stosując startery o sekwencji komplementarnej do sekwencji skrajnych regionu SSR. Zmienność długości produktów PCR jest funkcją liczby jednostek SSR. Markery mikrosatelitarne mają kodominacyjny charakter dziedziczenia. Szeroki zakres polimorfizmu markerów SSR zaobserwowano u człowieka [7, 17], niektórych gatunków zwierząt [29] i roślin [1, 20]. Ten typ markerów DNA może być używany do badań genetycznych razem z markerami RFLP, RAPD i markerami morfologicznymi.

4. Metoda YAC

Do mapowania genomu stosuje się różne typy wektorów. W ostatnich latach konstruuje się wektory drożdży, zwane sztucznymi chromosomami – YAC (yeast artificial chromosome). Służą one do klonowania bardzo dużych fragmentów DNA (do 5 milionów par zasad). Dzięki temu mogą być wykorzystane do ustalenia map fizycznych dużych chromosomów wyższych *Eukariota*. YAC składają się z tych samych elementów, które zapewniają replikację naturalnych chromosomów i ich segregację w czasie mitozy, a więc sekwencje ars oraz sekwencje centromerowe i telomerowe, zawierają też geny markerowe i polilinkery.

Metoda YAC polega na częściowym trawieniu wyizolowanego DNA enzymami restrykcyjnymi, eliminacji frakcji zawierającej małe fragmenty DNA, przyłączeniu dużych fragmentów do ramion wektora YAC i wprowadzeniu ich do drożdży drogą transformacji. Ponieważ wektor taki ma sekwencje centromerowe i telomerowe zawarte w wektorze, więc zapewniają one replikację sztucznego chromosomu. Metodę YAC zastosowano do mapowania genomu soi [21], pomidora [31] i pszenicy [6].

5. Porównanie cech użytkowych markerów molekularnych

Historia stosowania markerów genetycznych sięga doświadczeń Mendla. Siedem morfologicznych cech grochu, jakie obserwowano w tych doświadczeniach, pozostają do dzisiaj użytecznymi markerami. Zanim nowy typ markera genetycznego zostanie szeroko zastosowany, musi przynajmniej w pewnych warunkach wykazywać praktyczne zalety, jakich nie posiadają markery dotychczas stosowane, np. morfologiczne. Do takich cech należą: znaczny polimorfizm, łatwość użycia, częstość występowania i dobra powtarzalność. Porównanie niektórych cech użytkowych różnych typów markerów zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie użyteczności różnych typów markerów

Typ markera	Poziom polimorfizmu	Częstość występowania	Powtarzalność	Stopień trudności	Suma
Morfologiczny	5	1	6	8	20
Izoenzymatyczny	6	4	8	7	25
RFLP	6	8	9	3	26
RAPD	9	8	6	6	29

Poszczególne kombinacje marker/cecha scharakteryzowano wartościami liczbowymi od 1 do 10 (liczba 10 oznacza wartość idealną).

5.1. Poziom polimorfizmu

Jednym z istotnych atrybutów markerów RAPD jest ich wysoki poziom polimorfizmu. Ta cecha jest szczególnie istotna dla gatunków takich, jak pomidor czy ogórek, które charakteryzują się bardzo niskim poziomem zmienności genetycznej w materiałach hodowlanych. Identyfikacja odmian, testowanie kombinacji krzyżówkowych i poszukiwanie markerów dla cech użytkowych w tych gatunkach jest trudne, a niekiedy niemożliwe przy zastosowaniu markerów morfologicznych, izoenzymatycznych lub RFLP.

Poziom zmienności genetycznej, możliwej do wykrycia przy użyciu izoenzymów i markerów DNA, w niektórych gatunkach roślin przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Zakres zmienności genetycznej w ośmiu gatunkach roślin wykryty przy użyciu różnego typu markerów molekularnych [32]

Gatunek (20 osobników)	Izoenzymy*	RFLP**	RAPD***
<i>Brassica oleracea</i>	2,5	2,0	4,5
<i>Capsicum annuum</i>	1,02	0,01	0,9
<i>Cicer arietinum</i>	1,04	0,4	0,9
<i>Cucumis sativus</i>	1,04	niski	1,2
<i>Lens culinaris</i>	1,3	0,9	2,1
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1,01	niski	0,7
<i>Pisum sativum</i>	1,6	1,9	3,0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,2	1,7	2,2

* Alleli/locus na podstawie analizy 50 loci.

** Liczba polimorficznych markerów dla jednej sondy DNA, przypadających na pięć enzymów restrykcyjnych.

*** Liczba polimorficznych markerów dla jednego startera.

5.2. Częstość występowania

Jednym z mankamentów stosowania markerów morfologicznych i izoenzymatycznych jest mała częstość ich występowania w obrębie genomu. Ponad 100 genów kontrolujących morfologiczne mutacje znanych jest dla takich gatunków, jak groch czy pomidor, ale większość gatunków uprawnych posiada mniej niż 50 opisanych mutacji genów morfologicznych. Podobnie w przypadku izoenzymów, maksymalna liczba zidentyfikowanych polimorficznych loci dla gatunku wynosi około 80 [37], ale dla większości gatunków nie przekracza ona 30. W przeciwieństwie do tego liczba markerów RAPD i RFLP jest zasadniczo nieograniczona i wszystkie części genomu jądrowego są dla nich dostępne.

5.3. Powtarzalność

Powtarzalność zwykle nie jest problemem w przypadku markerów izoenzymatycznych i RFLP, jeśli przestrzega się podstawowych warunków metody. Morfologiczne markery wykazują jednak często zmienną ekspresję i penetrację, zależną od genotypu i warunków środowiska zewnętrznego, co niekiedy znacznie utrudnia obserwacje i jest powodem istotnych odchyłeń od spodziewanej segregacji monogenicznej. Powtarzalność jest również istotnym problemem przy stosowaniu markerów RAPD. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), w wyniku której powstają markery RAPD, wymaga stałych warunków przebiegu reakcji, optymalizacji stężenia jonów Mg^{+2} i dobrej jakości badanego DNA. To powoduje, że pod względem powtarzalności metoda RAPD oceniana jest na podobnym poziomie jak obserwacje markerów morfologicznych.

5.4. Stopień trudności technicznych i koszt analiz

Biorąc pod uwagę stopień trudności technicznych, RFLP jest najbardziej skomplikowaną techniką, a obserwacja zmienności morfologicznej najprostszą. RAPD i izoenzymy są technikami zbliżonymi skalą trudności, przy czym analiza izoenzymów wymaga większej praktyki biochemicznej, a w technice RAPD konieczna jest precyzja i dokładność wykonania analizy.

Koszty analiz zależą w dużym stopniu od zastosowanych procedur, ale ogólnie można przyjąć, że markery morfologiczne są najtańsze w stosowaniu. Koszty rosną stopniowo dla izoenzymów, RAPD i RFLP.

5.5 Przykłady zastosowania markerów RAPD do mapowania genomu roślin

Pomimo zastrzeżenia odnośnie powtarzalności, porównanie zalet i wad różnego typu markerów wskazuje na dużą użyteczność techniki RAPD w badaniach genetycznych roślin. Jej zalety, omówione powyżej, w powiązaniu ze stosunkowo niskim

Tabela 4. Grupy sprzężeń utworzone przy użyciu markerów molekularnych dla niektórych gatunków roślin uprawnych

Gatunek/kombinacja krzyżówkowa	Liczba segregujących markerów		Liczba grup sprzężeń (LOD=3,0)	Liczba chromosomów <i>n</i> *
	izoenzymy	RAPD		
Fasola Redcloud × Durango	5	61	13	11
Bobik <i>V. faba</i> #6 × <i>V. faba</i> #35	5	30	10	6
Papryka <i>C. annuum</i> × <i>C. frutescens</i>	7	110	27	12
Łubin wąskolistny B540 × Emir	14	104	17	20
Nostrzyk <i>M. alba</i> × <i>M. polonica</i>	1	>200	8	8

* haploidalna liczba chromosomów

kosztem analiz (tab. 2), pozwalają na szerokie praktyczne jej zastosowanie zwłaszcza w takich dziedzinach, jak tworzenie map genów i poszukiwanie genetycznych markerów sprzężonych z cechami użytkowymi, trudnymi, kosztownymi lub czasochłonnymi przy fenotypowej obserwacji.

Przykłady zastosowania markerów RAPD dla tworzenia grup sprzężeń w populacjach krzyżówkowych niektórych gatunków przedstawiono w tabeli 4 [32]. Analizowano populacje fasoli (*Phaseolus vulgaris*), bobiku (*Vicia faba*), papryki (*Capsicum annuum* × *C. frutescens*), łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) i nostrzyka (*Melilotus albus* × *M. polonica*). W liniach rodzicielskich każdej kombinacji krzyżówkowej wstępnie analizowano polimorfizm allozymów i RAPD. Poza kombinacją krzyżówkową fasoli, segregację polimorficznych markerów badano w populacjach F₂. W przypadku krzyżówki fasoli analizowano segregację markerów w liniach wsobnych z rekombinantów pokolenia F₂ w celu uniknięcia problemów związanych z mapowaniem markerów o dominacyjnym charakterze dziedziczenia w fazie odpychania (trans). Analizowane populacje składały się z 30–70 roślin.

We wszystkich kombinacjach krzyżówkowych liczba polimorficznych loci izoenzymatycznych nie była duża. W przypadku koniczyny tylko jeden locus był polimorficzny, co sugeruje znaczne podobieństwo genetyczne rodziców. W przypadku markerów RAPD stosunkowo niski poziom polimorfizmu u fasoli spowodowany był przede wszystkim mniejszą liczbą analizowanych markerów.

Badania te, w przypadku bobiku i łubinu, pozwoliły na utworzenie pierwszych grup sprzężeń tych gatunków [30, 41]. U papryki znaleziono marker dla genu odporności na wirusa mozaiki pomidora. U koniczyny liczba uzyskanych grup sprzę-

zeń odpowiada liczbie n chromosomów tego gatunku i pozwoliła na zmapowanie kilku markerów morfologicznych. Wydaje się, że rezultaty tych badań potwierdzają inne doniesienia literaturowe o uniwersalności i przydatności markerów RAPD do analizy genetycznej.

6. Podsumowanie

Zarówno genetycy, jak i hodowcy roślin coraz częściej sięgają po techniki umożliwiające szybką identyfikację polimorfizmu na poziomie molekularnym. Owocne stosowanie markerów molekularnych jest uzależnione od rozwoju tanich i szybkich technologii, które pozwolą na automatyzację oznaczeń genetycznych [25]. Technologie markerowe są szczególnie przydatne do tworzenia map genetycznych i fizycznych o wysokiej gęstości ściśle sprzężonych regionów. Informacje w nich zawarte stanowią punkt wyjścia do mapowania nowych genów zgodnie z procedurą *chromosome walking*, jak i poszukiwania dużych klonów DNA zawierających ciekawe geny (*chromosome landing*) [28].

W ostatnich latach wiele osiągnięto w kwestii zrozumienia struktury i organizacji genomów roślinnych poprzez odkrycie i wykorzystanie molekularnych form polimorfizmów. Dalszy postęp w tej dziedzinie związany jest z opracowaniem odpowiedniej technologii służącej wykorzystaniu tej zmienności w jak najszerszym spektrum organizmów. Metody wykorzystujące reakcję PCR umożliwiają wydajne generowanie markerów genetycznych, które w przyszłości będą odgrywały coraz większą rolę w programach obejmujących profilowanie DNA, genetykę populacyjną, mapowanie genetyczne, systematykę molekularną oraz selekcję hodowlaną. O tak szerokim zastosowaniu decydować będzie ich prostota i obniżenie kosztów analiz, co pozwoli na ich stosowanie w niewielkich, stosunkowo skromnie wyposażonych laboratoriach.

Literatura

- [1] Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Cregan P.B. 1992. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics* 132: 1131–1139.
- [2] Akopianz N., Bukanov N.O., Ulf Wesstblom T., Berg D.E. 1992. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucl. Acids Res.* 20: 6221–6225.
- [3] Beckmann J.S., Soller M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 35–43.
- [4] Bodstein D., White R., Scolnick M., Davies R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.
- [5] Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9: 553–557.

- [6] Cheung W.Y., Chao S., Gale M.D. 1991. Long-range physical mapping of the α -amylase-1 (α -Amy-1) loci on homoeologous group 6 chromosomes of wheat. *J. Mol. Gen. Genet.* 229: 373–379.
- [7] Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746–756.
- [8] Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252: 1643–1651.
- [9] Funke R., Kolchinsky A., Gersshoff P.M. 1993. Physical mapping of a region in soybean (*Glycine max*) genome containing duplicated sequences. *Plant Mol. Biol.* 22: 437–446.
- [10] Gottlieb L.D. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373–380.
- [11] Gottlieb L.D., Weeden N.F. 1981. Correlation between subcellular location and phosphoglucose isomerase variability. *Evolution* 35: 1019–1022.
- [12] Haley S.D., Miklas P.N., Stavley J.R., Byrum J., Kelly J.D. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 86: 505–512.
- [13] Hu J., Quiros C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505–511.
- [14] Hunter R.L., Market C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 341–348.
- [15] Jacob H.J., Lindpaintner K., Lincoln S.E., Kusumi K., Bunker R.K., Yi-Pei M., Ganten D., Dzau V.J., Lander E.S. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67: 213–224.
- [16] Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67–73.
- [17] Litt M., Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397–401.
- [18] Marczewski W. 1995. Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin. *Postępy Biochemii* 41(4): 237–243.
- [19] Martin G.B., Williams J.G.K., Tanksley S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2336–2340.
- [20] Morgante M., Olivieri A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175–182.
- [21] Mullis K.B., Falcoona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed reaction. *Meth. Enzymol.* 225: 335–350.
- [22] Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. 1987. Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616–1622.
- [23] Paran I., Michelmore R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985–993.
- [24] Quiros C.F., Hu J., This P., Chevre A.M., Delsney M. 1991. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 82: 627–632.
- [25] Rafalski A.J., Tigney S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275–280.
- [26] Scandalios J.G. 1975. Genes, isozymes, and evolution. W: C.L. Markert [red.] *Isozymes*, vol. 4. Academic Press, New York NY, 1–7.
- [27] Shields C.R., Orton T.J., Stuber C.W. 1983. An Outline of General Resource Needs and Procedures for the Electrophoretic Separation of Active Enzymes from Plant Tissues. W: S.D. Tanksley and T.J. Orton [red.] *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, s: 443–468.
- [28] Tanksley S.D., Ganai M.W., Martin G.B. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11: 63–68.

- [29] Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17: 6463–6471.
- [30] Thorres A.M., Weeden N.F., Martin A. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 937–945.
- [31] Van Daelen R.A.J.J., Gerbens F., Van Ruissen F., Aarts J., Hontelez J., Zabel P. 1993. Long-range physical maps for two loci (Aps-1 and GP79) flanking the root-knot nematode resistance gene (Mi) near the centromere of tomato chromosome 6. *Plant Mol. Biol.* 23: 185–192.
- [32] Weeden N.F., Wu W.Y., Gu W.K., Cagnoni T.L., Lu J., Timmerman G.M., Wolko B., Zhu Z. 1994. Application of DNA amplification technology to vegetable breeding. Proc. of the 7th SABRAO and WSAA International Congress, Taiwan, 437–445.
- [33] Weeden N.F., Wendel J.F. 1989. Genetics of plant isozymes. W: D.E. Soltis and P.S. Soltis [red.] *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland OR, 46–72.
- [34] Weining S., Langridge P. 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82: 209–216.
- [35] Welsh J., Honeycutt R.J., McClelland M., Sorbal B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82: 473–476.
- [36] Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213–7218.
- [37] Wendel J.F., Weeden N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. W: D.E. Soltis and P.S. Soltis [red.] *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland, s. 5–45.
- [38] Wilke S.E., Isaac P.G., Slater R.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497–504.
- [39] 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.
- [40] Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Methods in Enzymology* 218: 704–740.
- [41] Wolko B., Weeden N.F. 1993. Linkage map of isozyme and RAPD markers for *L. angustifolius* L. *Advances in Lupin Research*. Proceedings of the VIIIth International Lupin Conference Evora, Portugal, 42–49.
- [42] Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Wallace R.B. 1989. Allele specific enzymatic amplification of beta globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2757–2760.
- [43] Yu K., Pauls K.P. 1993. Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Mol. Biol.* 22: 269–277.
- [44] Zimniak-Przybylska Z., Blixt S., Przybylska J. 1985. Isozyme variation in the genus *Pisum*. IV Further electrophoretic analysis of amylase from cotyledons of ungerminated seeds. *Genet. Pol.* 26: 303–306.

Molecular markers in plant genetic variability research

Summary

The development of new research methods on the molecular level observed in recent years has opened unique possibilities of characterization and investigation of genome structure. It is necessary to know merits and limitations of these methods before their introducing into basic genetic research as well as in applied breeding. The most important methods of protein and DNA molecules variability testing were

discussed and their properties were compared in this article. Their application in different genetic investigations confirmed the usefulness of these methods for characterization of collection and plant breeding materials, for analysis of genome structure, as well as for taxonomy and phylogeny of plant species.