

*Bogdan Wolko, Lidia Irzykowska, Wojciech K. Święcicki
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu*

AFLP i SSR — systemy markerowe przydatne w hodowli roślin

Słowa kluczowe: markery molekularne, polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów, powtórzenia prostych sekwencji, losowo amplifikowany polimorficzny DNA, hodowla roślin, selekcja przy użyciu markera

Wstęp

Wyjątkowo intensywny w ostatnich latach rozwój metod badawczych w genetyce otwiera nowe możliwości charakteryzowania i poznawania struktury genomu roślinnego. Nowe techniki molekularne znajdują zastosowanie w wykrywaniu polimorfizmu DNA i konstruowaniu map genetycznych. Wykorzystanie markerów molekularnych pozwala na wyjaśnienie wielu problemów, które pojawiły się w toku badań opartych na metodach genetyki klasycznej [11]. W wielu gatunkach roślin występuje naturalna zmienność alleli ogromnej liczby loci molekularnych. Przy ich pomocy można charakteryzować genotyp we wszystkich stadiach wzrostu i rozwoju rośliny, na poziomie tkankowym lub komórkowym. Ponadto, niezależność występowania markerów molekularnych od warunków środowiskowych i brak oddziaływań epistatycznych powodują, że liczba możliwych do obserwacji w jednej populacji loci jest teoretycznie nieograniczona.

Opis genotypu za pomocą markerów DNA polega na wytwarzaniu grupy fragmentów z badanej próby DNA. Fragment o właściwej sobie długości i sekwencji nukleotydów, wykrywany metodami molekularnymi, można traktować jako dziedziczny marker, charakteryzujący genotyp. Ważną zaletą markerów molekularnych jest możliwość ujawniania neutralnych miejsc zmienności na poziomie sekwencji DNA. Przez „neutralność” należy rozumieć, że zmienność nie uwidacznia się bezpośrednio w fenotypie, lecz jest jedynie różnicą pojedynczego nukleotydu w genie lub fragmencie DNA. Wybór odpowiedniej metody generowania i wykrywania markerów zależy od celu zastosowania (np. charakterystyka genotypu, mapowanie genów, poszukiwanie markerów sprzężonych z genem kontrolującym cechy użytkowe) oraz możliwości technicznych (analiza sekwencji DNA, synteza starterów, charakterystyka sond DNA).

Potencjalna wartość markerów molekularnych w selekcji materiałów hodowlanych (ang. marker assisted selection — MAS) związana jest z dziedziczeniem ich w kolejnych pokoleniach [44] i zależy od stopnia sprzężenia z selekcionowaną cechą. Bliskie sprzężenie (10 centimorganów) pomiędzy cechą jakościową i markerem genetycznym może być przydatne dla podniesienia wydajności selekcji materiałów hodowlanych [12, 25, 40]. Przy zastosowaniu blisko sprzężonych markerów molekularnych możliwa jest również selekcja cech poligenicznych i ilościowych (ang. quantitative trait loci — QTL), ważnych z rolniczego punktu widzenia [7, 8, 15].

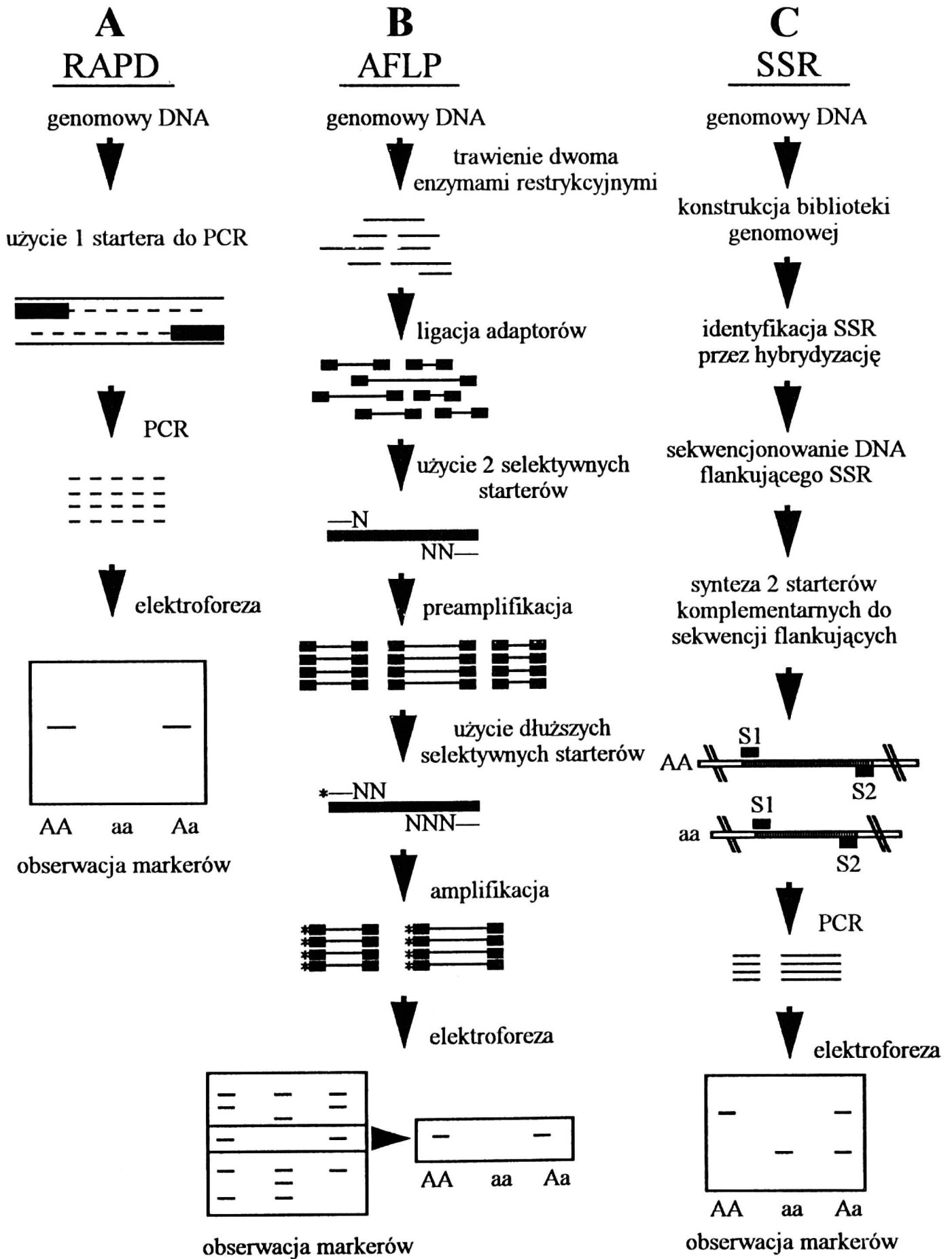
Obecnie znane systemy markerowe są w większości oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction — PCR) [22]. W badaniach zmienności DNA roślinnego od kilku lat stosowana jest technika RAPD (ang. random amplified polymorphic DNA) [45]. Polega ona na wykorzystaniu w łańcuchowej reakcji polimerazy jednego, losowo dobranego startera długości 8–10 nukleotydów. Każdy produkt amplifikacji pochodzi z rejonu genomu, który zawiera sekwencje DNA komplementarne do sekwencji użytego startera. Ze względu na to, że obecnie technika RAPD jest już powszechnie stosowana w badaniach genetycznych i hodowlanych, nie będzie ona w tej pracy szczegółowo omawiana, a jedynie wykorzystana do porównania zalet i wad nowszych systemów markerowych.

Celem naszej publikacji jest omówienie dwu systemów markerowych opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy — AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism) i SSR (ang. simple sequence repeats), wykorzystywanych w ostatnich latach coraz częściej w pracach hodowlanych. Porównanie ich zalet i ograniczeń powinno być pomocne w wyborze odpowiedniego typu markera w badaniach DNA roślinnego. Bardziej skomplikowane techniki molekularne zaskakują zakresem nie znanej dotąd terminologii. Może to stanowić trudność dla użytkowników, których zainteresowania naukowe nie dotyczą bezpośrednio badań molekularnych genomów roślinnych, ale chcieliby informacje z tego zakresu zrozumieć i zastosować w praktyce hodowlanej.

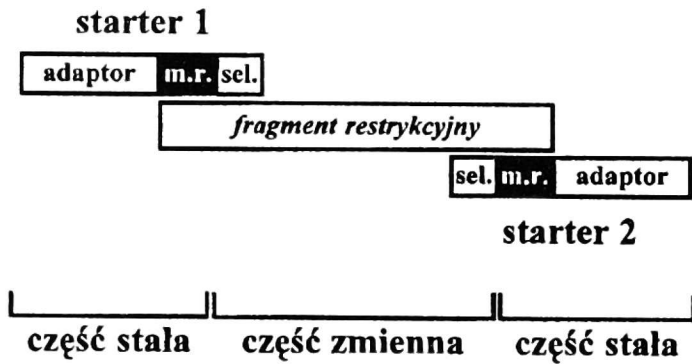
AFLP

System AFLP jest najnowszą metodą generowania markerów DNA, opracowaną przez firmę Keygene i opatentowaną w 1993 roku [42, 48]. Stanowi ona połączenie dwu technik: łańcuchowej reakcji polimerazy — PCR — oraz trawienia enzymami restrykcyjnymi. System AFLP łączy zatem istotną zaletę metody RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism), jaką jest jej powtarzalność, z prostotą amplifikacji DNA techniką PCR.

Metoda (rys. 1) polega na trawieniu genomowego DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi, dobranymi tak, że dla jednego z nich występuje w genomie wiele miejsc trawienia, a dla drugiego są one bardzo rzadkie. W ten sposób liczba powielanych podczas PCR rodzajów fragmentów jest ograniczona unikalnymi miejscami trawienia jednego z enzymów. Do powstałych po trawieniu fragmentów restrykcyj-



Rysunek 1. Porównanie technik markerów DNA wytwarzanych za pomocą PCR



Rysunek 2. Konstrukcja starterów stosowanych w metodzie AFLP

(m.r. — sekwencja startera komplementarna do miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez endonukleazy; sel. — część selekcyjna)

nych przyłączane są tzw. adaptory, tj. oligonukleotydy (20–30 nukleotydów), zakończone sekwencją miejsca restrykcyjnego. Po przyłączeniu adaptorów powstają trzy typy fragmentów DNA:

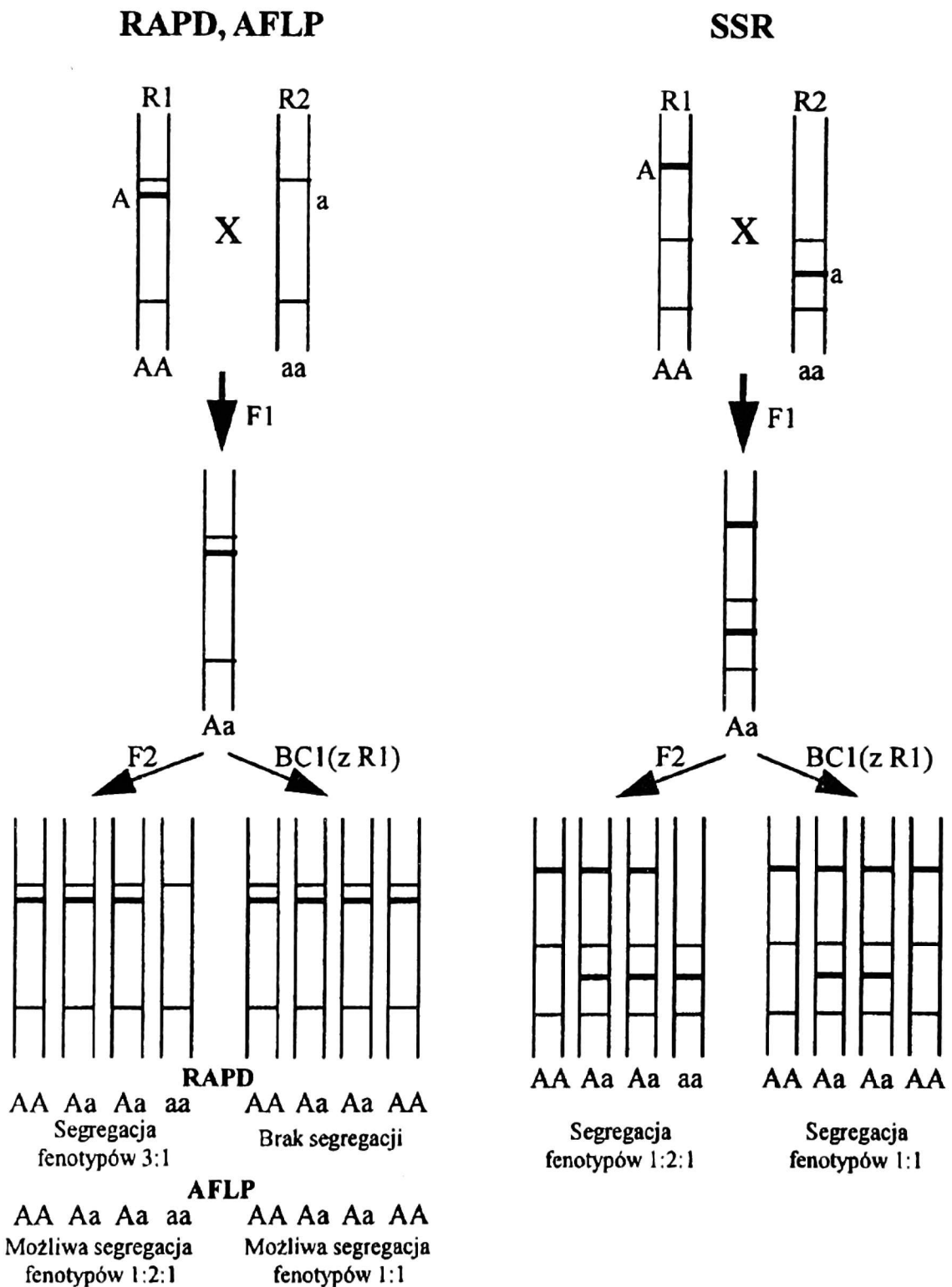
- zawierające na obu końcach unikalne miejsce trawienia,
- zawierające na obu końcach często występujące miejsce trawienia,
- zawierające na jednym końcu częste, a na drugim unikalne miejsce trawienia.

Warunki amplifikacji są tak dobrane, że preferencyjnie powielany jest trzeci typ fragmentów. Miejscem przyłączania odpowiednich starterów są adaptory.

Sekwencje starterów (rys. 2) obejmują miejsce restrykcyjne, identyczne jak w odpowiednim adaptorze, sekwencję stałą, komplementarną do sekwencji adaptoru, oraz sekwencję selekcyjną na końcu 3' (1–3 nukleotydy). Krótkie sekwencje selekcyjne, rozszerzające sekwencję startera w stosunku do adaptoru, pozwalają na ograniczenie liczby rodzajów powielanych fragmentów DNA. Stosowane startery różnią się sekwencjami selekcyjnymi. Jeśli stosowane są startery znakowane radioaktywnie, to amplifikowane produkty uwidaczniane są poprzez ekspozycję na kliszy rentgenowskiej. W ostatnim czasie zaadaptowano do tego celu techniki fluorescencyjne i metodę barwienia srebrem.

W celu uzyskania większej powtarzalności łańcuchową reakcję polimerazy prowadzi się w dwóch etapach. W pierwszym etapie, nazywanym preamplifikacją, genomowy DNA jest powielany za pomocą 2 starterów AFLP, zawierających 1 selektywny nukleotyd. W drugim etapie, określanym selektywną amplifikacją, jako matrycę stosuje się produkty preamplifikacji, a startery zawierają 3 selektywne nukleotydy. Liczba rodzajów powielanych fragmentów zależy od ilości selektywnych nukleotydów startera.

Niekiedy na podstawie intensywności widocznych na żelu prążków AFLP możliwe jest rozróżnienie genotypów heterozygotycznych od homozygotycznych (rys. 3) [36]. Atrakcyjność tego systemu polega na możliwości obserwowania wielu markerów przy minimalnej liczbie testowanych starterów i wysokiej powtarzalności. Technika AFLP jest trudna i stosunkowo droga w praktyce laboratoryjnej, jednak pozwala na wykrywanie szerokiego zakresu polimorfizmu, przydatnego w mapowaniu i znakowaniu cech użytkowych.



Rysunek 3. Dziedziczenie markerów DNA w populacjach pokoleń F₂ i BC₁
 Markery SSR posiadają kodominacyjny charakter dziedziczenia i w związku z tym łatwo można rozróżnić genotypy heterozygotyczne w pokoleniu F₂ i BC₁. W systemach RAPD i często AFLP o dominacyjnym charakterze dziedziczenia wykrycie genotypów heterozygotycznych, poza rzadkimi przypadkami, jest niemożliwe. W przypadku AFLP heterozygotyczność jest niekiedy możliwa do wykrycia poprzez określenie intensywności prążka.

Genomy roślinne zawierają wiele powtórzeń krótkich (mniej niż 6 par zasad) sekwencji nukleotydowych (ang. simple sequence repeat — SSR), nazywanych też mikrosatelitami. Te proste motywy sekwencyjne są wielokrotnie powtarzane tandemowo, tworząc locus mikrosatelitarny. Setki tego typu loci jest rozrzuconych w obrębie całego genomu [20, 38]. Z reguły, elementem powtórzonym są dwunukleotydy, np. $(AG)_n$, $(AC)_n$, $(AT)_n$, trójnukleotydy np. $(TCT)_n$, $(TTG)_n$, lub czteronukleotydy, np. $(TATG)_n$ itp., gdzie n określa liczbę powtórzeń elementu podstawowego w locus mikrosatelitarnym. Dodatkową cechą stwierdzoną dla SSR jest ich polialleliczność, spowodowana zmiennością liczby powtórzeń elementu podstawowego w różnych allelach tego samego locus [13]. Z dotychczasowych badań wynika, że u roślin najczęściej występuje dwunukleotyd $(AT)_n$.

Poszukiwanie określonego locus SSR wymaga najpierw konstrukcji biblioteki genomowej krótkich insertów DNA (tj. krótkich fragmentów genomowego DNA w plazmidach). Następnym etapem pracy jest przeszukiwanie biblioteki przy zastosowaniu odpowiednich sond mikrosatelitarnych w celu identyfikacji insertów zawierających loci SSR. Znalezione inserty są następnie sekwencjonowane. Na podstawie uzyskanej informacji o sekwencji unikalnych fragmentów DNA oskrzydających locus SSR konstruowane są komplementarne do nich startery. Następnie startery stosowane są do powielania DNA loci mikrosatelitarnych za pomocą PCR (rys. 1). Ponieważ występujący polimorfizm markerów SSR wynika z różnej liczby powtórzeń elementu podstawowego w allelach locus mikrosatelitarnego, markery SSR posiadają ważną w badaniach genetycznych zaletę dziedziczenia kodominacyjnego (rys. 3).

Najbardziej kompleksowe wyniki badań mikrosatelitów roślinnych przedstawiono w pracach Wanga i in. [43] oraz Morgante i Olivieri [20]. Wymienieni autorzy definiują istotne cechy mikrosatelitów roślinnych na podstawie analiz zarówno gatunków jednoliściennych (jęczmień, ryż, kukurydza), jak i dwuliściennych (groch, rzodkiewnik, tytoń, pomidor). Istotnymi z praktycznego punktu widzenia cechami markerów SSR są: znaczna częstość występowania oraz bardzo wysoki polimorfizm, proporcjonalny do długości jednostki elementarnej i liczby powtórzeń. Właściwości te pozwalają na znalezienie różnic nawet pomiędzy osobnikami blisko spokrewnionymi. W związku z tym markery SSR znalazły szerokie zastosowanie w mapowaniu, identyfikacji odmian, określaniu heterozygotyczności, charakterystyce materiałów kolekcyjnych i jako markery cech o znaczeniu rolniczym (tab. 1) [27].

Pomimo tak wszechstronnych możliwości praktycznego wykorzystania markerów SSR ograniczenia w ich stosowaniu związane są z kosztami i trudnościami ich poszukiwania. Modyfikacją tej techniki jest system związany z wykorzystaniem do PCR pojedynczego startera o sekwencji składającej się z kilku

Tabela 1. Sekwencje mikrosatelitarne występujące w uprawnych gatunkach roślin

Gatunek	Element powtarzalny	Metoda identyfikacji	Literatura
Jednoliścienne			
jęczmień	AT, TCT, CT, TG, CTT, TGC, ATTT, GA, CA	przeгляд bibliotek genomowych	[2]
kukurydza	CT, AG, AC, GA	przeгляд bibliotek genomowych, baza danych sekwencyjnych	[33] [37]
pszenica	AC, AG, TCT, TTG, GT	przeгляд bibliotek genomowych	[17][29]
ryż	GA, GT, CGG, TTG, ATT, TCT, CAG, TGG, GATA, ATC, CTTT, CGG, GAG, GA, CTT, CTG, ACG, TGG, AT	baza danych sekwencyjnych przeгляд bibliotek genomowych	[24] [1]
Dwuliścienne			
burak cukrowy	CA, CT, ATT, GTG, AT	przeгляд bibliotek genomowych	[19]
fasola	GATA, GACA, CAC, CA	hybrydyzacja Southerna	[9]
pomidor	GA, GT, ATT, TGT, AGTG, AT, CAA, TAA	przeгляд bibliotek genomowych, baza danych sekwencyjnych	[4] [35]
rzepak	GA, CA, GATA, GACA, GGAT, CA, CT, GTG	przeгляд bibliotek genomowych	[14]
soja	AT, ATT, AAT, TAA	przeгляд bibliotek genomowych	[30]

powtórzonych elementów z dodatkowymi 2–4 losowo dobranymi nukleotydami na końcach 3' lub 5'. Tak otrzymane markery mają zwykle dominacyjny charakter dziedziczenia i były dotychczas wykorzystane w badaniach niektórych gatunków roślin [5, 46, 49].

Wybór systemu markerowego

Użyteczność różnych typów markerów DNA do osiągnięcia wyznaczonego celu badawczego zależy od struktury badanej populacji, genomowej zmienności gatunku, możliwości technicznych i finansowych oraz czasu potrzebnego na wykonanie analiz. Każdy z systemów markerowych ma zalety i wady, a zatem niezbędna jest krytyczna ocena jego potencjalnej przydatności przed zastosowaniem (tab. 2). Na przykład, w

Tabela 2. Porównanie właściwości systemów markerowych RAPD, AFLP i SSR

	RAPD	AFLP	SSR
Podstawa oznaczenia	amplifikacja z użyciem 10- sowo dobranych starterów	trawienie endonukleazami i PCR z użyciem specyficznych starterów	PCR z użyciem prostych sekwencji powtórzonych
Typ polimorfizmu	mutacje punktowe, insercje, delecje	mutacje punktowe, insercje, delecje	zmiany długości sekwencji powtórzonych
Typ sondy	oligonukleotydy — ośmio- dziesięciomery o losowej sekwencji	oligonukleotydy komplementarne do adaptora i miejsca restrykcyj- nego z dodatkowymi 1–5 nukleoty- dami selekcyjnymi	oligonukleotydy komplementarne do sekwencji flankujących albo do sekwencji powtórzonych, z do- datkowymi 1–4 nukleotydami selekcyjnymi na końcu 3' lub 5'
Poziom polimorfizmu	średni	średni	wysoki
Czy wykrywa allele genu?	nie	nie	tak
Liczba wykrywanych poli- morficznych loci na 1 żelu	0–4	0–30	0–2
Częstość genomowego występowania markerów	wysoka	wysoka	średnia
Rodzaj dziedziczenia	dominacja	dominacja/niekiedy kodominacja	kodominacja
Część genomu dostępna badaniom	cały genom	cały genom	DNA repetytywny
Czy potrzebna jest radio- aktywna detekcja?	nie	tak/nie	nie
Czy wymagana jest informacja o sekwencji?	nie	nie	tak
Wymagana jakość DNA	surowy ekstrakt	relatywnie czysty	czysty
Wymagana ilość DNA	10–50 ng	30–100 ng	50–100 ng
Przydatność do charakterystyki zmienności	specyficzne dla populacji i materiałów krzyżówkowych	specyficzne dla populacji i materiałów krzyżówkowych	specyficzne dla gatunku
Trudności techniczne	niewielkie	średnie	duże
Powtarzalność	niska	wysoka	wysoka
Koszt analizy	niski	średni	wysoki

samopylnym gatunku markery RAPD są bardziej przydatne do wykrywania polimorfizmu niż system SSR ze względu na prostotę techniczną, wydajność i niski koszt.

Omawiane systemy markerowe różnią się również skutecznością wykrywania polimorfizmu w badaniach populacji, gatunków i rodzajów roślin. Na przykład markery SSR mogą być zastosowane do charakterystyki różnych populacji w obrębie tego samego gatunku, lecz startery przydatne do wykrywania polimorfizmu DNA pochodzącego z jednego gatunku są zwykle nieużyteczne do badań DNA z innych gatunków. W systemie AFLP można obserwować zmienność wielu markerów przy minimalnej liczbie testowanych starterów. Wyższa czystość rozdziału związana z elektroforezą na sekwencyjnym żelu poliakryloamidowym (możliwość rozdzielenia fragmentów DNA minimalnie różniących się długością) w porównaniu z systemem RAPD, w którym rozdział prowadzony jest na żelu agarozowym, wpływa na zwiększenie rozdzielczości i powtarzalności wyników [10]. Wymienione zalety decydują o atrakcyjności AFLP jako markerów genetycznych. Jednak koszt i wymagane doświadczenie techniczne mogą być przeszkodą w praktycznym wykorzystaniu tych markerów podczas masowej selekcji materiału roślinnego.

Pomimo że polimorfizm markerów RAPD i AFLP jest wykrywany w stosunkowo krótkim czasie, to jednak tego typu markery nie są przydatne do porównywania populacji, ponieważ każdy z nich jest zdefiniowany głównie poprzez długość namazanego fragmentu DNA (tzn. informacja o jego sekwencji jest ograniczona). W konsekwencji, uzyskiwanie w porównywanych populacjach lub gatunkach produktu amplifikacji tej samej wielkości niekoniecznie oznacza, że w każdym przypadku posiada on taką samą sekwencję nukleotydową. W porównaniu z innymi rodzajami markerów DNA (np. RFLP), wszystkie systemy markerowe oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy wymagają niewielkiej ilości DNA do analizy i charakteryzują się wysoką wydajnością uzyskiwania polimorficznych markerów we wczesnym stadium selekcji materiałów roślinnych. Jednak zalety te mogą tracić znaczenie w badaniach gatunków o niskim poziomie polimorfizmu. W takich przypadkach najlepszym obecnie stosowanym systemem jest SSR, chociaż koszt i czas potrzebny na wytwarzanie tego typu markerów jest znaczny.

Koszt otrzymania jednego markera zależy od czasu koniecznego do wyizolowania potrzebnej ilości DNA o odpowiedniej jakości, stosowania klonowania lub sekwencjonowania oraz typu poszukiwanej informacji genetycznej. Wymagania te powinny zostać uwzględnione przy wyborze odpowiedniego systemu markerowego w projektach hodowlanych związanych z selekcją materiałów roślinnych, identyfikacją odmian lub mapowaniem genów.

Zastosowanie nowych sytemów markerowych

Dotychczas szeroko stosowane markery RAPD wykorzystano do analizy zmienności genetycznej i chemotaksonomii [6, 23], konstrukcji map genetycznych i lokalizacji loci odpowiedzialnych za dziedziczenie cech monogenicznych, np. odporności na choroby [26], oraz do analizy cech ilościowych [7]. Mimo że w teoretycznych szacowaniach przydatność markerów genetycznych do selekcji materiałów hodowlanych jest bezsporna, jak dotąd niewiele jest doniesień na temat praktycznego zastosowania MAS w hodowli gatunków uprawnych.

Zmienność markerów SSR analizowano przede wszystkim w genomach gatunków o dużym znaczeniu gospodarczym. W tabeli 2 wymieniono gatunki roślin, w których analizowano częstość występowania mikrosatelitów, podano ich częściową charakterystykę (elementy jednostek powtórzonych) oraz wskazano metody identyfikacji tych sekwencji. Zmienność markerów SSR wykorzystano do mapowania genomów (jęczmień [2, 31]; ryż [47]; soja [21]; rzodkiewnik [3]), charakterystyki genotypów i identyfikacji odmian (rzepak [5]; soja [30]; ziemniak [35]) oraz ustalenia pokrewieństwa pomiędzy gatunkami (fasola [9]).

Markery wykrywane stosunkowo nową metodą AFLP nie były jeszcze szeroko stosowane w badaniach genetycznych. Wykazano jednak przydatność tego systemu w mapowaniu genów (ziemniak [18]; soja [16]), poszukiwaniu markerów dla ważnych cech użytkowych (pomidor [39]) i cech ilościowych (jęczmień [28]), badaniach filogenetycznych (soczewica [34]), charakterystyce zasobów kolekcyjnych (fasola [41]) i identyfikacji odmian hodowlanych (jęczmień [32]). Oferowane obecnie przez firmy chemiczne kompletne zestawy odczynników do wytwarzania markerów AFLP z pewnością ułatwią ich stosowanie w badaniach genetycznych i hodowli.

Literatura

- [1] Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A., Fujimura T. 1996. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1071–1077.
- [2] Becker J., Heun M. 1995. Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley. *Genome* 38: 991–998.
- [3] Bell C.J., Ecker J.H. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137–144.
- [4] Broun P., Tanksley S.D. 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences i the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* 250: 39–49.
- [5] Charters Y.M., Robertson A., Wilkinson M.J., Ramsay G. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5' — anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* 92: 442–447.
- [6] Dos Santos J.B., Nienhuis P., Skroch J., Tivang J., Slocum M.K. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87: 909–915.

- [7] Edwards M.D., Page N.J. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor. Appl. Genet.* 88: 376–382.
- [8] Edwards M.D., Stuber C.W., Wendel J.F. 1987. Molecular — marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116: 113–125.
- [9] Hamman A., Zink D., Nagl W. 1995. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. *Genome* 38: 507–515.
- [10] Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., Van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381–390.
- [11] Jones N., Ougham H., Thomas H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.* 137: 165–177.
- [12] Kennard W.C., Poetter K., Dijkhuizen A., Meglic V., Staub J., Havey M. 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 89: 42–48.
- [13] Koreth J., O’Leary J.J., McGee J.O. 1996. Microsatellites and PCR genome analysis. *J.Path.* 178: 239–248.
- [14] Kresovich S., Szewc-McFadden A.K., Bliet S.M., McFerson J.R. 1995. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated library of *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* 91: 206–211.
- [15] Lande R., Thompson R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124: 743–756.
- [16] Lin J., Kuo J. 1995. AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17: 66–70.
- [17] Ma Z.Q., Roder M., Sorrells M.E. 1996. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39: 123–130.
- [18] Meksem K., Leister D., Peleman J., Zabeau M., Salamini F., Gebhardt C. 1995. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 249: 74–81.
- [19] Morchen M., Cugen J., Michaelis G., Hanni C., Saumitou-Laprade P. 1996. Abundance and length polymorphism of microsatellites repeats in *Beta vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 92: 326–333.
- [20] Morgante M., Olivieri A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175–182.
- [21] Morgante M., Rafalski A., Biddle P., Tingey S., Olivieri A.M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* 37: 763–769.
- [22] Mullis K., Faloona S., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263–273.
- [23] Novy R.G., Kobak C., Goffreda J., Vorsa N. 1994. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry [*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh]. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1004–1010.

- [24] Panaud O., Chen X., McCouch S. 1995. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* 38: 1170–1176.
- [25] Paran I., Kesseli R., Michelmore R. 1991. Identification of RFLP and RAPD markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce using near-isogenic lines. *Genome* 34: 1021–1027.
- [26] 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.
- [27] Powell W., Machray G., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Pl. Science* 1: 215–222.
- [28] Powell W., Thomas W.T.B., Baird E., Lawrence P., Booth A., Harrower B., McNicol J. W., Waugh R. 1997. Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Heredity* 79: 48–59.
- [29] Roder M.S., Plaschke J., König S.U., Börner A., Sorrells M.E., Tanksley S.D., Ganai M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327–333.
- [30] Rongwen J., Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Lavi U., Cregan P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90: 43–48.
- [31] Saghai Maroof M.A., Biyashev R.B., Yang G.P., Zhang Q., Allard R.W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 5466–5470.
- [32] Schut J.W., Qi X., Stam P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1161–1168.
- [33] Senior M.L., Heun N. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884–889.
- [34] Sharma S.K., Knox M.R., Ellis T.H.N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 751–758.
- [35] Smulders M.J.M., Bredemeijer G., Rus-Kortekaas W., Arens P., Vosman B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 97: 264–272.
- [36] Staub J.E. 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *Hort Science* 31(5): 729–740.
- [37] Taramino G., Tigney S. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39: 277–287.
- [38] Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA. *Nucl. Acids. Res.* 17: 6463–6471.
- [39] Thomas C.M., Vos P., Zabeau M., Jones D.A., Norcott K. A., Chadwick B.P., Jones J.D.G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato CF-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8(5): 785–794.
- [40] Timmerman G.M., Frew T.J., Weeden N.F., Miller A.L., Goulden D.S. 1994. Linkage analysis of er-1, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* D.C.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 1050–1055.

- [41] Tohme J., Gonzalez D.O., Beebe S., Duque M.C. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.* 36: 1375–1384.
- [42] 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 Acids Reserch* 23(21): 4407–4414.
- [43] Wang Z., Weber J.L., Zhong G., Tanksley S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1–6.
- [44] Weeden N.F., Timmerman M., Hermmat M., Kneen B.E., Lodhi M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. W: J. Nienhuis (ed.). Proc. Symp. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, Nov. 1992, Minneapolis, Minn.: 12–17.
- [45] Williams J.G.K., Kubelik A.R., Rafalski A., Tingey S.V. 1991. Genetic Analysis with RAPD Markers. W: More gene manipulations in fungi. Academic Press Inc.: 60–64.
- [46] Wu K.S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P.A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22: 3257–3258.
- [47] Wu K.S., Tanksley S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225–235.
- [48] Zabeau M., Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprints. European Patent Application. Publ. 0534858A1.
- [49] Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain-reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

AFLP and SSR – the marker systems useful in plant breeding

Key words: molecular markers, amplified fragments length polymorphism, simple sequence repeats, random amplified polymorphic DNA, plant breeding, marker assisted selection

Summary

A number of PCR-based methods can be used to detect the polymorphisms in plants. In this article three molecular techniques were compared: RAPD, AFLP and SSR. The marker generating procedures of two systems, AFLP and SSR, were described in details. Advantages and disadvantages each of them and their usefulness in plant breeding projects were discussed. Finally, hitherto applications of AFLP and SSR marker polymorphism analyses for genetical investigations of plants were reviewed.

Adres do korespondencji:
doc. dr hab. Bogdan Wolko
Instytut Genetyki Roślin PAN
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań
e-mail: bwol@igr.poznan.pl