



## Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin

Piotr T. Bednarek, Katarzyna Chwedorzewska

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej,  
Polska Akademia Nauk, Warszawa

### Molecular markers, their genetic background and some applications in plant genetics

#### Summary

The presented paper gives an insight into the genetic background of molecular diversity at the DNA level. Its potential sources, classified into two main categories depending on whether they lead to DNA sequence alternations (point mutations, insertions, deletions, chromosomal rearrangements, mobile elements etc.) or changes in DNA methylation pattern, are discussed in parallel to their 'molecular markers'. A general overview of the most important sequences responsible for genetic variability (micro-, mini-, midi- and macrosatellites; transposones and retrotransposones) is given. Special attention is paid to different types of molecular marker systems and their most important applications. Molecular techniques are divided into several groups depending on the enzymes they use (endonucleases, T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase or their combinations). Finally, investigation carried out with molecular markers in somaclonal embryogenesis is discussed.

#### Key words:

molecular marker, somaclonal embryogenesis, plant DNA.

#### Adres do korespondencji

Bednarek Piotr,  
Ogród Botaniczny  
– Centrum Zachowania  
Różnorodności  
Biologicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Prawdziwka 2,  
02-973 Warszawa.

### 1. Wstęp

Markery genetyczne, czyli łatwo rozpoznawane znaczniki sprzężonych z nimi cech fenotypowych czysto o znaczeniu użytkowym są znane od dawna. Początkowo były to wyłącznie mar-

kery morfologiczne (1), następnie dołączyły do nich markery białek strukturalnych (białka zapasowe (2)) oraz białek funkcjonalnych (izoenzymy (3)), a od dwudziestu lat również kwasy nukleinowe (4,5). Mimo wielu syntetycznych prac, poświęconych markerom molekularnym i ich zastosowaniu (6-10), wciąż brak w literaturze polskojęzycznej szczegółowych opracowań dotyczących natury zmienności genetycznej, identyfikowanej przez systemy markerowe. Utrudnieniem jest również zagmatwana, bogata w synonimy oraz skróty terminologia i brak opracowań poświęconych klasyfikacji systemów markerowych oraz kryteriom wyboru odpowiednich technik do wciąż rosnącej liczby aplikacji. Mylne zrozumienie tych zagadnień może być przyczyną trudności w identyfikacji zmienności genetycznej oraz prowadzić do podwyższenia kosztów analiz.

## 2. Źródła zmienności na poziomie kwasów nukleinowych

Pod hasłem zmienność rozumie się całokształt różnic występujących między poszczególnymi gatunkami, odmianami, osobnikami, komórkami pojedynczego organizmu czy różnice powodowane czynnikami środowiskowymi, które potencjalnie mogą być identyfikowane za pomocą odpowiednich znaczników, zwanych markerami. W praktyce badawczej stosowana jest przede wszystkim zmienność sekwencji nukleotydowej DNA oraz stosunkowo rzadko zmienność powodowana różnicami w metylacji reszt zasad azotowych (patrz. tab. 1).

Do źródeł zmienności sekwencyjnej należy zaliczyć występujące w komórkach eukariotycznych modyfikacje DNA (11), które przyczyniają się do uwolnienia reszt zasad azotowych poprzez chemiczną, bądź enzymatyczną hydrolizę wiązań N-glikozydowych. Taka sytuacja może mieć miejsce na przykład podczas reparaacji urydyny w składzie DNA (12). Udowodniono, że replikacja modyfikowanego DNA może prowadzić do powstawania szeregu mutacji (13). W pracach wykonanych w układach *in vitro* z polimerazami DNA z różnych źródeł sugeruje się, że naprzeciwko miejsc wolnych od reszt zasadowych wbudowywana jest dodatkowa zasada (14). Również sama metylacja DNA może prowadzić do mutacji punktowych (15). Źródłem zmienności sekwencyjnej mogą być ponadto duże rearanżacje chromosomalne (16) do których zalicza się duplikacje fragmentów genomu (17) oraz insercje obcego DNA. Istotną rolę mogą odgrywać również ruchome elementy (15). Ze względu na występowanie presji selekcyjnej, należy oczekiwać, że większość zmian powinna mieć miejsce w niekodujących obszarach DNA, które w przypadku roślin wyższych mogą stanowić nawet 80% genomu roślinnego (18) i są reprezentowane, między innymi, przez sekwencje powtórzone tandemowo oraz rozproszone sekwencje powtórzone (15).

Seqwencje powtórzone tandemowo są zwykle nieaktywne transkrypcyjnie, a ich większe bloki lokalizowane są w obszarach konstytutywnej heterochromatyny. Do tej grupy zalicza się wysoko repetytywny, satelitarny DNA oraz umiarkowanie powtórzone mini- i mikrosatelitarne sekwencje. Uważa się, że sekwencje te są istot-

Tabela 1

Typy zmienności

Zmienność	Typy sekwencji i występowanie	Opis
<p><b>Sekwencyjna</b></p> <p>Rearanżacje chromosomalne (insercje, duplikacje)</p> <p>Modyfikacje DNA prowadzące do hydrolizy wiązań N-glikozydowych</p>	<p><b>Sekwencje powtórzone tandemowo (VNTR)</b></p> <p><b>Mikrosatelity (SSR, STR)</b></p> <p>(cały genom zależnie od rodzaju sekwencji, retrotranspozony, centromery, telomery)</p>	<p><b>Sekwencje powtórzone tandemowo (VNTR)</b></p> <p>Motyw: 2-6 nukleotydów</p> <p>Liczba kopii: 10-50</p> <p>Łączna długość: 100-400 kbp</p> <p>Nazwa zmienności: SSLP</p> <p>Przykład: (AT)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub></p>
	<p><b>Minisatelity</b></p> <p>(jw.)</p>	<p>Motyw: 10-100 nukleotydów (GC bogaty)</p> <p>Liczba kopii: 70-450</p> <p>Łączna długość: kilkadziesiąt tys. pz</p> <p>Nazwa zmienności: HVR (VNTR)</p>
<p><b>Modyfikacyjna</b></p> <p>Metylacja zasad azotowych przez enzymy komórkowe</p>	<p><b>Midisatelity</b></p> <p>(w całym genomie)</p>	<p>Motyw: &gt; 40 kbp</p> <p>Łączna długość: 250-500 kbp</p>
	<p><b>Środowiskowa</b></p> <p>Zależna od wpływu czynników zewnętrznych</p>	<p><b>Makrosatelity</b></p> <p>(jw.)</p> <p><b>Powtórzone sekwencje rozproszone</b></p> <p><b>Elementy ruchome</b></p> <p><b>Sekwencje kodujące</b></p> <p><b>Inne</b></p> <p>Cały genom (heterochromatyna)</p> <p>Obszary regulacyjne genów</p>

nym źródłem polimorfizmu długości, będącego wynikiem na przykład błędów pracy polimeraz DNA (19).

Charakterystyczną cechą sekwencji powtórzonych tandemowo jest obecność podstawowego motywu o zmiennej liczbie kopii (VNTRs – *Variable Number of Tandem Repeats*) (20), warunkującej ich polimorficzność. Ze względu na długość podstawowego motywu można wyróżnić 4 typy sekwencji powtórzonych, a mianowicie mikro-, mini-, midi- i makrosatelity. Ostatnie dwa czasem określa się wspólną nazwą satelit (21).

Sekwencje mikrosatelitarne (22) (synonimy: SSRs – *Simple Sequence Repeats* (23), STR – *Short Tandem Repeat* (24)) są rozproszone w całym genomie. Uważa się, że częściej występują w obszarach euchromatyny niż heterochromatyny, a ich skupienia wykryto również w centromerach oraz telomerach (25). Są one zbudowane z krótkich 2-6 nukleotydowych motywów o wysoce zmiennej liczbie powtórzeń (od 10 do 50) (26-28). Łączna długość odcinka waha się od 100 do 400 par zasad. Powtórzenia motywu mogą występować tandemowo, bądź są przedzielone krótkimi, kilkunukleotydowymi „wstawkami”. Czasem dwa lub więcej różnych motywów występuje jednocześnie (29), a zmienna liczba powtórzeń tandemowych jest odpowiedzialna za występowanie polimorfizmu długości prostych sekwencji (SSLP – *Simple Sequence Length Polymorphism*) (30). Dwunukleotydowe powtórzenia zidentyfikowano w intronach (lecz nie egzonach) (31), a trójnukleotydowe w regionach zarówno kodujących jak i niekodujących genomu (32). W genomie roślinnym najczęściej występują sekwencje typu  $(AT)_n$  oraz  $(TAT)_n$  (32). Funkcja sekwencji mikrosatelitarnych jest niejasna. Przypuszcza się, że mogą one uczestniczyć w organizacji chromatyny, w rekombinacji lub wpływać na ekspresję genów.

Drugim typem sekwencji powtórzonych pod względem długości podstawowego motywu, są tzw. minisatelity, które pierwotnie wykryto w okolicy genu insuliny (33). Obecnie wiadomo, że sekwencje te występują we wszystkich ramionach chromosomów oraz obszarach telomerów (25,34). Do określenia polimorfizmu warunkowanego sekwencjami minisatelitarnymi używa się nazwy HVR – *Hyper Variable Region*, która czasem jest stosowana wymiennie z VNTR (35). Sekwencje minisatelitarne ułożone są w postaci zmiennej liczby bloków (70-450) (19), których całkowita długość może wahać się od kilkuset do 20 tysięcy par zasad (36). Zwykle motyw podstawowy jest bogatym w pary 'GC' fragmentem o długości od 10 do 100 par zasad (37). Minisatelity charakteryzują się wysokim poziomem zmienności (38). Stwierdzono również różnice w częstości występowania mutacji w obrębie podstawowego motywu. W przypadku bloku genu  $\alpha$ -globuliny, wyizolowanego z genomu człowieka, obserwuje się szczególnie wysoki poziom zmian na 3' końcu sekwencji [5'-GNGGGG(N)ACAG-3'] i praktycznie ich brak na 5' końcu (19). Identyfikowana zmienność jest prawdopodobnie wynikiem błędów *crossing-over* oraz tak zwanych przesunięć (*slippage*) polimerazy podczas replikacji (19).

Do sekwencji tandemowych zalicza się również midi- (39) i makrosatelity (40). Podstawowy motyw sekwencji midisatelitarnych ma długość około 40 par zasad i powtarza się na obszarze 250-500 kpz. Natomiast sekwencje makrosatelitarne to

sekwencje o całkowitej długości porównywalnej do midisatelitarnych, ale zbudowane z dłuższych, tandemowych motywów od kilku do kilkudziesięciu kpz. Sekwencje te są równomiernie rozproszone po całym genomie, a budową przypominają transpozony. Przykładem sekwencji satelitarnych są niektóre sondy RFLP, do jakich zalicza się fragment R173 (41) wykryty u żyta.

Drugą grupą sekwencji powtórzonych są sekwencje rozproszone (ISR – *Interspersed Repetitive Sequence*), do których należą m.in. geny rRNA oraz tzw. elementy ruchome, inaczej transpozony oraz szczególnie częste u roślin retrotranspozony. (W genomie człowieka grupa ta jest reprezentowana przez takie rodziny jak SINE – *Short Interspersed Nucleotide Element*, LINE – *Long Interspersed Nucleotide Element*, MER – *Medium Reiteration Frequency Repeat* czy LOR1 – *Low Reiteration Frequency Sequence* (42). Sekwencje te występują w genomie w umiarkowanej liczbie kopii (43)). Transpozony oraz retrotranspozony występują w zmiennej liczbie kopii, która prawdopodobnie jest skorelowana z wielkością genomu i przedzielają bloki genów. Przykładem retrotranspononu może być rodzina BARE-1, powszechnie występująca w genomie jęczmienia. BARE-1 cechuje wysoka konserwatywność sekwencji oraz aktywność transkrypcyjna (44). Powodowana przez ruchome elementy zmienność jest wynikiem transpozycji, homologicznej rekombinacji między retrotranspononami oraz częstych mutacji metylowanej cytozyny do tyminy (15). Przypuszcza się również, że transpozony oraz retrotranspozony mogą być odpowiedzialne za duplikacje genomowe oraz regulację ekspresji genów (45-47).

Innym, również ważnym źródłem zmienności, różnym od zmienności sekwencyjnej, są wszelkiego rodzaju modyfikacje DNA, a w szczególności enzymatyczna metylacja. Uważa się, że metylacja DNA, nawet jeżeli nie prowadzi do hydrolizy wiązań N-glikozydowych, może być odpowiedzialna za różnice fenotypowe roślin (17) przejawiające się poprzez regulację ekspresji genów (48). Hipotezę tę potwierdza fakt, że poziom metylacji DNA ulega zmianom, zależnie od etapów rozwojowych oraz jest warunkowany rodzajem tkanki (49). Niektórzy autorzy (50) są skłonni przypuszczać, że metylacja jest głównym źródłem zmienności, umożliwiającym różnicowanie poszczególnych tkanek tej samej rośliny. Można również sądzić, że polimorfizm tego typu jest odpowiedzialny za zmienność somaklonalną (17).

Podsumowując, należy wyróżnić dwa typy zmienności, sekwencyjną, wywołującą zmiany w układzie nukleotydów DNA oraz modyfikacyjną (metylacja), która zwykle nie powoduje takich zmian, lecz wpływa na ekspresję genów. Ze względu na presję selekcyjną bardziej konserwatywne, pod względem ewentualnych zmian sekwencji nukleotydowych, będą te obszary genomu, które są odpowiedzialne za istotne funkcje organizmu, a największa część zmienności powinna występować w obszarach „niefunkcyjnych”. Jeśli chodzi o zmienność wynikającą z modyfikacji DNA enzymami komórkowymi, to należy się spodziewać, że będzie ona bardziej specyficzna dla tkanek danego organizmu oraz wrażliwa na stadium rozwojowe organizmu, co potencjalnie stwarza możliwość różnicowania roślin o identycznym pochodzeniu, jak i badań embriogenezy.

### 3. Klasyfikacja markerów molekularnych oraz identyfikowana przez nie zmienność

Ze względu na sposób identyfikacji zmienności genetycznej markery kwasów nukleinowych można podzielić na cztery grupy, wykorzystując wyłącznie specyficzne właściwości enzymów (patrz tab. 2):

- enzymów restrykcyjnych,
- ligazy DNA faga T4,
- polimerazy DNA lub
- kilku enzymów jednocześnie (markery mieszane).

Tabela 2

#### Molekularne techniki diagnostyczne

Typy markerów	Techniki diagnostyczne	Cechy charakterystyczne
Markery wykorzystujące <b>enzymy restrykcyjne</b>	RFLP	Sondy: klonowane fr. DNA low Cot-DNA syntetyczne oligonukleotydy
Markery wykorzystujące <b>Taq polimerazę DNA</b>	<b>Losowe</b> (MAAP) DAF RAPD AP-PCR  <b>Ukierunkowane</b> Warianty AP-PCR Semispecyficzny PCR  <b>Specyficzny PCR</b> STS, STMS, SCAR, AS-PCR, IRAP, REMAP, SNP, sekwencjonowanie	W reakcji PCR uczestniczy 1 starter o długości 5-8 nukleotydów 10 nukleotydów ponad 17 nukleotydów  W reakcji PCR uczestniczy: 1 starter częściowo komplementarny DNA 2 startery. Jeden jest komplementarny DNA  W reakcji PCR uczestniczą 2 komplementarne DNA startery
Markery wykorzystujące <b>DNA ligazę faga T4</b>	ASL	W reakcji ligacji uczestniczą 2 oligonukleotydy
Markery wykorzystujące <b>kilka reakcji enzymatycznych</b>	<b>CAPS</b>  AFLP (SRFA) SAMPL S-SAP cDNA-AFLP	Powielanie DNA/Trawienie  Trawienie DNA/Powielanie

#### 3.1. Markery wykorzystujące właściwości enzymów restrykcyjnych

Systemy markerów tej grupy wykorzystują zdolność enzymów restrykcyjnych typu II do rozpoznawania i trawienia kilkunukleotydowych, ściśle zdefiniowanych sekwencji dwuniciowego DNA. Ze względu na specyfikę reakcji enzymatycznej iden-

tyfikowanym przez te systemy źródłem zmienności są mutacje w obrębie miejsc trawienia (51) oraz potencjalnie modyfikacje zasad azotowych (w przypadku enzymów wrażliwych na metylację) w ich obrębie lub bliskim otoczeniu. Ponadto różnorodność genetyczna może być efektem występowania delecji/insercji lub różnic w liczbie sekwencji powtórzonych, zawartych pomiędzy miejscami trawienia (52).

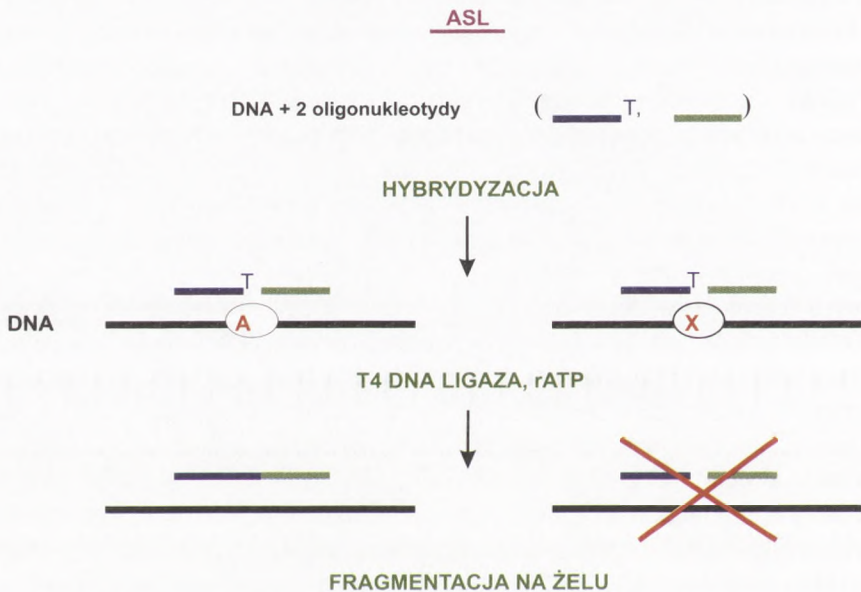
Przykładem techniki wykorzystującej właściwości enzymów restrykcyjnych jest RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (53). Polega ona na generowaniu spektrum fragmentów DNA, powstających pod wpływem działania zwykle dwóch ednonukleaz restrykcji, rozpoznających i specyficznie trawiących 4- oraz 6-nukleotydowe sekwencje DNA. Fragmenty te rozdziela się elektroforetycznie w żelu agarozowym i przenosi na dodatnio naładowane membrany. Identyfikacja zmienności genetycznej (polimorfizmu) odbywa się za pomocą sond, czyli znakowanych, zwykle krótkich odcinków DNA, komplementarnych do homologicznych fragmentów DNA na membranie.

W zależności od typu stosowanej sondy można wyróżnić dwa warianty tej techniki. W pierwszym przypadku sondami są wyizolowane, zwykle klonowane fragmenty DNA o różnej długości (od kilkuset do kilku tysięcy par zasad), pochodzące z organelli komórkowych lub jądra, a w drugim syntetyczne oligonukleotydy. Ze względu na potencjalnie wysoką zdolność do identyfikacji zmienności często taką rolę pełnią sekwencje makro-, minisatelitarne oraz czasem retrotranspozony. Przykładem sondy makrosatelitarnej jest fragment R173 uzyskany z genomu żyta (41), a minisatelitarnej sekwencja wyizolowana z III genu bakteriofaga M13 (54,55). Niektóre warianty RFLP wykorzystują łączną pulę sekwencji powtórzonych (repetytywnych oraz rozproszonych) zwaną „low Cot-DNA”. Takie sondy otrzymuje się trawiąc DNA enzymami restrykcyjnymi, a następnie prowadząc denaturację i szybką renaturację uzyskanych fragmentów. Kinetyka reakcji warunkuje szybszą renaturację sekwencji powtórzonych, które po oddzieleniu od jednoniciowego DNA są wykorzystywane jako sondy wielu loci (43). Wprowadzenie drugiego typu sond, a mianowicie krótkich syntetycznych fragmentów DNA, tak zwanych oligonukleotydów, było możliwe dzięki postępom chemii bioorganicznej z lat osiemdziesiątych (56). Szczególnie duży poziom zmienności genetycznej może być identyfikowany za pomocą oligonukleotydów, komplementarnych do fragmentów mikrosatelitarnych genomu (57).

Zwykle technika RFLP umożliwia identyfikację wielu loci jednocześnie. Markery RFLP cechuje kodominujący charakter dziedziczenia, z tego względu są one przydatne w selekcji materiałów hodowlanych (51), do opracowania map genetycznych (4,58). Mapy te uzupełniane są następnie markerami generowanymi między innymi za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (59). Niewątpliwie zalety technik PCR sprawiają, że coraz rzadziej wykorzystuje się różne warianty technik, stosujących sondy oligonukleotydowe.

### 3.2. Markery wykorzystujące właściwości ligazy DNA faga T4

Cechą charakterystyczną markerów ASL – *Allele-Specific Ligation* (60) jest ich zdolność do identyfikacji punktowych mutacji w ściśle zdefiniowanych sekwencjach genu. Markery te służą do różnicowania alleli tego samego locus (patrz rys. 1). W celu identyfikacji zmienności projektuje się parę oligonukleotydów komplementarnych do obszaru DNA, w którym oczekuje się, że może wystąpić mutacja. Jeden z oligonukleotydów zawiera na końcu 3' zasadę komplementarną do sekwencji na przykład zdrowego osobnika. Jeżeli w badanym preparacie wystąpi mutacja uniemożliwiająca komplementację 3' końcowej zasady oligonukleotyda z matrycą, to ligaza DNA faga T4 nie może katalizować reakcji ligacji. W celu rejestracji wyniku wystarczy przeprowadzić rozdział elektroforetyczny próby. W opisanym przypadku brak produktu ligacji, o długości odpowiadającej sumie obu oligonukleotydów, świadczy o wystąpieniu mutacji. Uzyskanie markerów tego typu jest tanie i szybkie, jednakże do tej pory nie znalazły one jeszcze zastosowania w genetyce roślin.



Rys. 1. Ligacja allelospecyficzna.

### 3.3. Markery wykorzystujące właściwości polimerazy DNA

Źródłem polimorfizmu identyfikowanego za pomocą markerów generowanych przez techniki wykorzystujące właściwości polimerazy DNA są zmiany punktowe,



insercje oraz delecje prowadzące do zachwiania komplementacji startera z matrycowym DNA oraz rearanżacje chromosomowe. Uważa się, że w przypadku RAPD istotnym źródłem zmienności mogą być sekwencje repetytywne (61).

W zależności od tego, czy stosowane w PCR startery zaprojektowano z myślą o konkretnych rejonach genomu, można wyróżnić następujące klasy technik generujące markery:

- 1) losowe (MAAP: DAF, RAPD, AP-PCR),
- 2) ukierunkowanego PCR (DAMD, SPARS, ISSR, semispecyficzny PCR),
- 3) specyficznego PCR (STMS, SCAR, SNP, sekwencjonowanie).

### 3.3.1. Techniki markerów losowych (MAAP)

Systemy markerowe typu MAAP – *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling* (62) należą do najchętniej stosowanych w praktyce badawczej i doczekały się szeregu prac przeglądowych (6-10, 25,60), gdzie omówiono zarówno ich podstawowe cechy, zastosowania jak i ograniczenia.

Ogólnie techniki MAAP umożliwiają losowe powielanie obszarów DNA, zawartych pomiędzy starterami komplementarnymi z obiema niciami matrycowego DNA, których końce 3' są zorientowane ku sobie. Powielanie fragmentu DNA następuje w wyniku wielu cykli amplifikacji. Przy projektowaniu starterów nie są potrzebne dane dotyczące sekwencji matrycy. Ich sekwencja powinna być bogata w pary GC, w celu podniesienia temperatury wiązania oligonukleotydu i zapewnienia większej specyficzności kształtowania się dupleksu DNA: starter.

W zależności od długości startera wyróżnia się trzy techniki MAAP: DAF – *DNA Amplified Fingerprinting*, wykorzystujące startery o długości od 5 do 9 zasad (63); RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic DNA*, 9-11 zasad (64) i AP-PCR – *Arbitrary Primed PCR*, ponad 18 zasad (65). Produkty PCR są rozdzielane na żelach akrylamidowych (DAF) bądź agarozowych (RAPD, AP-PCR). Detekcja obrazów odbywa się przy wykorzystaniu znaczników izotopowych (DAF) lub fluorescencyjnych (RAPD, AP-PCR), czasem stosuje się barwienie srebrem (DAF, RAPD). Technika DAF pozwala na rejestrację 40-100 fragmentów DNA, a RAPD i AP-PCR do kilkunastu. Liczba identyfikowanych prążków jest zależna, między innymi, od stężeń komponentów mieszaniny reakcyjnej oraz temperatury wiązania startera, stosowanej podczas kolejnych rund amplifikacji. Przy jej obniżeniu maleje specyficzność kształtowania się dupleksu i mogą się tworzyć mniej lub bardziej komplementarne struktury, które potencjalnie prowadzą do powielania dodatkowych obszarów matrycy. Może to prowadzić do niskiej powtarzalności wyników, utrudnień przy przenoszeniu technologii z jednej pracowni do drugiej czy uzależnienia od sposobu izolacji DNA (66). Należy również pamiętać, że fragmenty DNA o zbliżonej masie cząsteczkowej (mobilności w żelu), nie muszą być tożsame genetycznie, czy też mogą się okazać mieszaniną fragmentów o zbliżonych masach. Z tego względu, w niektórych przypadkach, zale-

ca się dodatkowe testowanie ich identyczności, na przykład technikami hybrydyzacyjnymi. Mimo wymienionych wad techniki te, a w szczególności RAPD i AP-PCR, są często stosowane ze względu na prostotę metodyczną, niewielkie wymagania co do ilości oraz jakości DNA, dostępność dużej liczby zestawów gotowych starterów, szybkość realizacji doświadczenia oraz praktycznie nieograniczony potencjał do generowania fragmentów DNA.

Markery MAAP znalazły zastosowanie w badaniach taksonomicznych (67), przy wzbogacaniu map genetycznych (59), przy identyfikacji odmian uprawnych (68), czy identyfikacji sprzężeń z genami cech użytkowych (69,70). Ich wykorzystanie w połączeniu z takimi technikami jak HD – *Hetero Duplex Formation* (71), DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, SSCP – *Single Stranded Conformation Polymorphism* (72), TGGE – *Thermal Gradient Gel Electrophoresis* (73) czy PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* zwany częściej CAPS – *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* (74), pozwala na identyfikację polimorfizmu sekwencji w obrębie powielanych fragmentów DNA (istotne w przypadku braku polimorfizmu długości fragmentów DNA) oraz uzyskanie pewnej liczby znaczników kodominujących.

### 3.3.2. Techniki ukierunkowanego PCR

Wśród technik ukierunkowanego PCR można wydzielić dwie grupy: ukierunkowany wariant AP-PCR oraz semispecyficzny PCR. Podstawą podziału jest liczba starterów, wykorzystywanych w pojedynczej reakcji PCR oraz ich specyficzności względem matrycy.

W pierwszym przypadku w reakcji PCR uczestniczy tylko jeden starter komplementarny na przykład do rozrzuconych po całym genomie sekwencji powtórzonych, czy też częściowo komplementarny do obszarów konserwatywnych, występujących m.in. na pograniczu egzonów i intronów. W wyniku amplifikacji generowane jest spektrum fragmentów DNA o nieznanym położeniu i zwykle dominującej naturze dziedziczenia.

W zależności od tego czy starter jest komplementarny do sekwencji mini- czy mikrosatelitarnych to wyróżniamy następujące techniki: DAMD – *Directed Amplification of Minisatellite-region DNA* oraz SPAR – *Single Primer Amplified Region* i ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat*.

Technika DAMD (75) umożliwia identyfikację polimorfizmu długości obszarów DNA, zawartych pomiędzy przeciwnie skierowanymi, identycznymi sekwencjami minisatelitarnymi. Sekwencje starterów biorących udział w reakcji łańcuchowej polimerazy DNA odpowiadają motywom minisatelitarnym genomu roślinnego. Technikę tę wykorzystywano do monitorowania introgresji DNA, pochodzącego z dzikiej diploidalnej pszenicy do jej heksaploidnej formy (35).

Podobną do omówionej jest technika SPAR (76) z tą różnicą, że startery są homologiczne do motywów sekwencji mikrosatelitarnych. Specjalny wariant SPAR zwany

ISSR (77), polega na wykorzystaniu starterów z dodatkowymi, kotwiczącymi zasadami na końcach 3' lub 5' starterów. Startery z 3' częściej niż z 5' końcową zasadą generują zwykle wyraźnie widoczne fragmenty DNA, co może być wynikiem zarówno polimorficznej natury mikrosatelitów jak i roli kotwiczącej zasady w elongacji łańcucha DNA. Istotne znaczenie 3' końca startera opisano również w przypadku techniki RAPD (78).

Wśród wymienionych technik największe powodzenie zyskuje ISSR, 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 (61). Ostatnio ISSR zastosowano m.in. do identyfikacji polimorfizmu między liniami wsobnymi ryżu (79), do różnicowania taksonów oraz mapowania pszenicy (61,80) oraz do mapowania japońskiego i europejskiego modrzewia (81).

Drugą grupą technik, bazujących na ukierunkowanych starterach, jest semispecyficzny PCR. Markery tej grupy otrzymuje się podczas powielania DNA dwoma różnymi starterami. Jeden z nich jest częściowo komplementarny do badanego obszaru. Dopuszcza się stosowanie tzw. zdegenerowanych starterów (82), czyli takich, w trakcie chemicznej syntezy których, podczas jednego lub kilku etapów kondensacji, użyto mieszaniny amidofosforynów. Powstały produkt jest mieszaniną kilku starterów, różniących się wybranymi zasadami. Drugi starter ma sekwencję losową lub o różnym stopniu homologii względem wybranego obszaru genomu.

Semispecyficzny PCR znajduje zastosowanie, gdy znana jest wyłącznie sekwencja aminokwasów białka lub dostępne są dane dotyczące analogicznych sekwencji (białkowych bądź DNA) dla spokrewnionych gatunków. Taka sytuacja stwarza możliwość stosowania zdegenerowanych starterów lub oligonukleotydów, które z wyjątkiem kilku zasad na 3' końcach nie są w pełni komplementarne do matrycy (83). Opisano również warianty tej techniki, w której sekwencje obu starterów są homologiczne motywom konserwatywnych rejonów łączenia sekwencji kodujących i niekodujących. Weining i Langridge (84) na przykładzie genu  $\alpha$ -amylazy roślin zbożowych, badali możliwość wykorzystania takich starterów w połączeniu z losowymi oligonukleotydami. Markery generowane na bazie starterów częściowo homologicznych do konserwatywnych obszarów egzonów i intronów, w połączeniu ze starterem specyficznym do  $\alpha$ -amylazy, stosowano m.in. do identyfikacji i mapowania zmienności pomiędzy pszenicą i jęczmieniem, a w połączeniu ze starterami losowymi do różnicowania taksonów jęczmienia. W przypadku jednoczesnego stosowania starterów o różnym stopniu specyficzności, niektóre z generowanych produktów PCR mogą mieć spodziewaną masę cząsteczkową i okazać się markerami kodominującymi.

### 3.3.3. Specyficzny PCR

Specyficzny PCR, polega na powielaniu za pomocą dwóch starterów ściśle zdefiniowanego obszaru genomu (85). Koniecznym warunkiem jego stosowania jest zna-

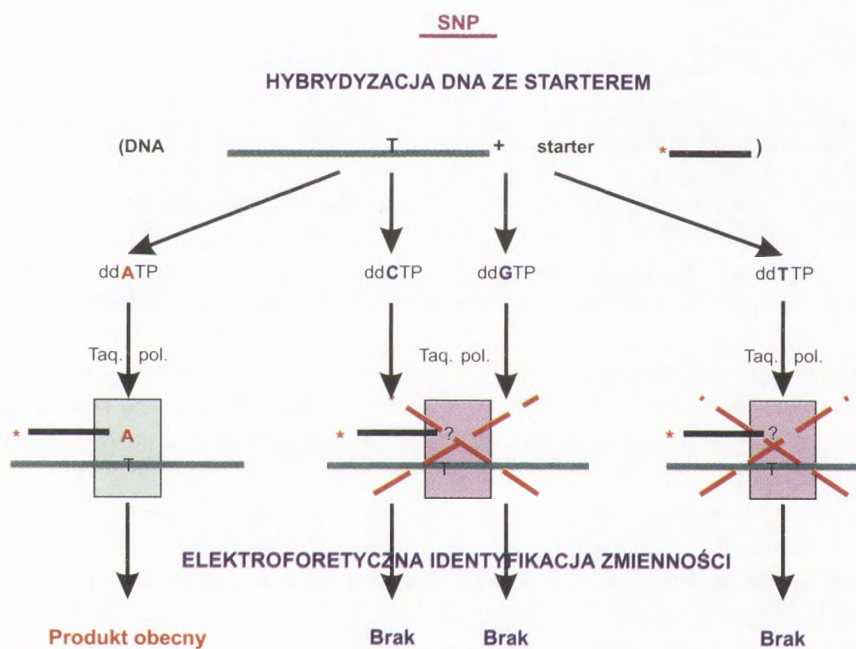
jomość sekwencji DNA (niektóre z nich są dostępne w odpowiednich bazach danych), która ma być amplifikowana oraz zaprojektowanie pary starterów generujących fragment oczekiwanej długości i zwykle o znanej lokalizacji (74).

W zależności od tego, czy do projektowania starterów służy DNA sondy RFLP, pojedynczy prążek uzyskany w wyniku powielania techniką RAPD czy fragment mikrosatelitarny genomu wyróżnia się markery STS – *Sequence Tagged Site* (86), SCAR – *Sequence Characterised Amplified Region* (87), znane również pod nazwami STAR – *Sequence-Tagged Amplified Region*, PCR-RFLP oraz ASAP – *Allele-Specific Associated Primers/Allele-Specific Amplified Polymorphism* (88,89) oraz STMS – *Sequence Tagged Microsatellite Site* (90). Czasem termin STS jest również odnoszony do markerów SCAR (91). Markery STS są wykorzystywane m.in. do zagęszczania map genetycznych (92) oraz do poszukiwania sprzężeń z cechami użytkowymi (93). Analogiczne zastosowania mają markery SCAR, a liczba ich zastosowań stale wzrasta (91).

Ostatnio, zainteresowaniem cieszy się technika STMS, umożliwiająca powielanie obszarów genomu, zawierających sekwencje mikrosatelitarne. Pełna procedura techniki STMS jest pracochłonna, kosztowna i składa się z wielu etapów. Najpierw, sekwencje mikrosatelitarne są identyfikowane za pomocą syntetycznych sond oligonukleotydowych, homologicznych do sekwencji mikrosatelitarnych. Wyszukiwanie odpowiednich fragmentów genomu odbywa się techniką tzw. „dotblottingu”, polegającego na hybrydyzacji sondy z klonami DNA zawartymi w bibliotece badanego genomu. Odpowiednie klony, których inserty potencjalnie zawierają SSR-y są sekwencjonowane, i jeżeli jest to możliwe, projektowane są pary starterów komplementarnych do obszarów ograniczających sekwencje powtórzone. Następnie dobiera się warunki specyficznego PCR i sprawdza, czy otrzymywane produkty mają masę cząsteczkową zgodną z oczekiwaniami. Każdy z wymienionych etapów prowadzi do eliminacji potencjalnych kandydatów na markery mikrosatelitarne, a końcowa wydajność techniki wynosi zwykle ułamek procenta liczby wyjściowo przebadanych klonów biblioteki. Zwykle markery STMS definiują pojedynczy locus, który jednak ze względu na dużą częstość powstawania mutacji może być reprezentowany przez wiele fragmentów DNA jednocześnie (94). Zaletą tej techniki jest możliwość identyfikacji wysoce polimorficznych markerów różnicujących rośliny nawet w obrębie linii wsobnych. Walory analityczne, możliwość prowadzenia reakcji PCR z wykorzystaniem kilku par specyficznych starterów, generujących fragmenty DNA o odpowiednich masach cząsteczkowych, jednocześnie (multipleksowanie) oraz automatyzacji końcowego etapu techniki sprawiają, że wydatki na opracowanie markerów dla istotnych z punktu widzenia rolnictwa gatunków są uzasadnione. STMS znalazła zastosowanie, m.in. w programach hodowlanych, do selekcji materiałów krzyżówkowych (MAS – *Marker-Assisted Selection*) (86), do poszukiwania markerów sprzężonych z cechami użytkowymi, do mapowania (95) oraz w badaniach taksonomicznych (96). Poważnym ograniczeniem w wykorzystaniu techniki, oprócz wysokich kosztów początkowych jest to, że markery sekwencji mikrosatelitarnych tylko w nieznacznym stopniu dają się stosować w innych, nawet blisko spokrewnionych gatunkach.

Specyficzny PCR może być również użyty do analizy polimorfizmu sekwencji konserwatywnych, jakimi są obszary kodujące (25,97). Jego przydatność zademonstrowano w badaniach genu  $\gamma$ -gliadyny (98) oraz  $\alpha$ -amylazy pszenicy (84), makrosatelitów genomu żyta (41) czy retrotranspozonu *BARE-1* (44). Wyróżnia się dwa typy technik opartych na sekwencjach retrotranspozonów: IRAP – *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism* oraz REMAP – *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*. Za pomocą pierwszej techniki wykrywa się polimorfizm między dwoma sąsiadującymi sekwencjami długich powtórzeń końcowych (LTR – *Long Terminal Repeat*), w drugiej między LTR i odpowiednim rejonem mikrosatelitarnym. Ponieważ retrotranspozony, w przeciwieństwie do transpozonów DNA, zwykle nie są wycinane przy przenoszeniu z miejsca na miejsce, lecz kopiowane, to stabilne inserty są dziedziczone zgodnie z prawami Mendla, a odpowiednie markery mają charakter kodominujący.

Mniej znanym wariantem specyficznego PCR jest technika AS-PCR – *Allele Specific PCR* (99) oraz rutynowo stosowane sekwencjonowanie. AS-PCR polega na powielaniu alleli lub wariantów sekwencji DNA dla tego samego locus (9), a sekwencjonowanie na określeniu uszeregowania nukleotydów w DNA za pomocą zasad terminujących. Podstawowa zasada ostatniej techniki jest często wykorzystywana w badaniach nad genomem człowieka (100), czy do identyfikacji chorób, np. u ryżu



\* – znacznik na 5' końcu startera (np. izotopowy)

? – brak przyłączenia terminatora

Rys. 2. Polimorfizm indywidualnych nukleotydów.

(101). Jest to możliwe dzięki zastosowaniu w pojedynczej reakcji PCR tylko jednego z czterech terminatorów pod nieobecność trójfosforanów. W takich warunkach przyłączany jest tylko terminator komplementarny do matrycy, a porównanie obrazów elektroforetycznych produktów amplifikacji pozwala na stwierdzenie, czy mutacja w danym obszarze genomu miała miejsce. Technika ta jest znana pod nazwą SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (102) (patrz rys. 2), a markery przez nią generowane mają podobne właściwości jak markery ASL.

Zaletą markerów tej grupy jest w większości przypadków ich stosunkowo niski koszt, powtarzalność wyników, kodominujący charakter generowanych markerów oraz możliwość automatyzacji badań. Głównym ograniczeniem jest wymagana informacja o badanej sekwencji konieczna do zaprojektowania starterów oraz możliwość identyfikacji tylko niewielkiej liczby fragmentów DNA, nawet przy jednoczesnym zastosowaniu w pojedynczej reakcji PCR wielu par specyficznych starterów. Z tego względu, w ciągu ostatnich 5 lat, podjęto prace mające na celu uniknięcie omówionych ograniczeń. Prace te doprowadziły do powstania technik mieszanych.

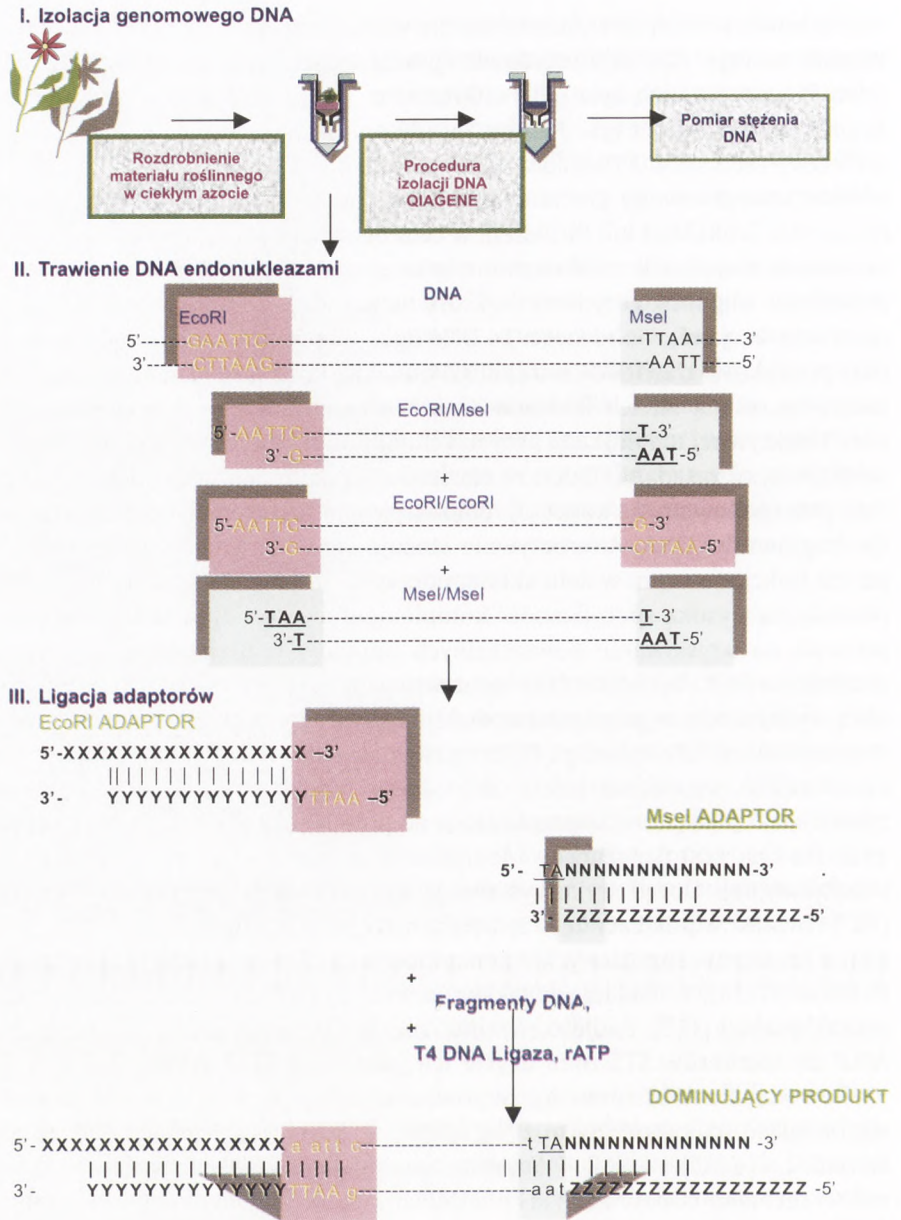
### 3.4. Markery mieszane

Techniki generujące tzw. markery mieszane wykorzystują właściwości zarówno enzymów restrykcyjnych jak i Taq polimerazy DNA uczestniczącej w reakcji PCR. Przy czym kolejność zastosowania reakcji enzymatycznych może być różna. Opisano zarówno techniki wykorzystujące najpierw PCR, a potem endonukleazy (CAPS), jak i na odwrót (AFLP, SAMPL, S-SAP). Ze względu na specyfikę reakcji enzymatycznych markery mieszane wykrywają zmienność sekwencyjną, a w niektórych przypadkach również metylacyjną (44) i są zaliczane najczęściej do markerów dominujących. Ich zaletą jest zwykle niski koszt uzyskania, niewielkie wymagania aparaturowe oraz powtarzalność wyników. Dodatkowo, w przeciwieństwie do specyficznego PCR, nie potrzebna jest znajomość sekwencji badanego genomu, a liczba identyfikowanych fragmentów DNA, w przypadku różnych wariantów techniki AFLP, może przekraczać nawet 180 (103).

Najbardziej znanym typem markerów, wykorzystującym najpierw PCR, a następnie trawienie otrzymanych produktów są CAPS-y (74). Zwykle są stosowane w połączeniu z techniką RAPD, w odniesieniu do potencjalnie różnicujących prążków przed lub po ich konwersji do markerów SCAR. CAPS-y służą do identyfikacji zmienności w sekwencji DNA i znajdują zastosowanie, gdy amplifikowane fragmenty DNA nie dają się zróżnicować pod względem długości. Zmienność ta jest możliwa do wykrycia dzięki specyficznemu rozpoznawaniu i trawieniu ściśle zdefiniowanych sekwencji przez enzymy restrykcyjne. Z tego względu znajomość sekwencji DNA potencjalnego markera jest pomocna przy doborze restryktaz. Markery CAPS zastosowano ostatnio do różnicowania *Cucumis melo* L. odpornych i wrażliwych na *Fusarium* (88), a ich wykorzystanie należy rozważać w przypadku cech monogenicznych.

Techniki, w których wykorzystuje się właściwości enzymów restrykcyjnych, a następnie reakcję PCR w zdecydowanej większości opracowano w ciągu ostatnich 5 lat. Pierwszą z nich była AFLP (104), inaczej SRFA – *Selective Restriction Fragment Amplification* (9) (patrz rys. 3), a jej zasady omówiono również w literaturze polskojęzycznej (103,105). Procedura AFLP składa się z następujących etapów: izolacji wielkocząsteczkowego genomowego DNA; trawienia go dwoma enzymami restrykcji (zwykle *EcoRI/MseI* lub *PstI/MseI*), w celu otrzymania fragmentów DNA, których zakończenia mają ściśle zdefiniowane sekwencje; ligacji adaptorów – syntetycznych dupleksów oligonukleotydowych, które na zasadzie komplementacji z homologicznymi sekwencjami, w obecności T4 DNA ligazy, są przyłączane do odpowiednich końców produktów trawienia; wstępnego powielania za pomocą starterów (z jedną selektywną zasadą na ich końcach 3') komplementarnych do sekwencji adaptorów oraz selektywnej amplifikacji przy użyciu oligonukleotydów z dwoma dodatkowymi selektywnymi zasadami. Jeden ze starterów (komplementarny do adaptoru *EcoRI* lub *PstI*) jest znakowany na końcu 5' radioaktywnym fosforem, co umożliwia identyfikację fragmentów DNA. Alternatywnie stosuje się wybarwienie fragmentów srebrem po ich frakcjonowaniu w żelu akrylamidowym. Stosowane startery mają długość zapewniającą wysoką specyficzność komplementacji do odpowiednich adaptorów, co pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych obrazów rozdzielów elektroforetycznych produktów PCR. Technika AFLP opatentowana w 1994 r., charakteryzująca się wysoką wydajnością w generowaniu dużej liczby fragmentów DNA, już w wyniku pojedynczej reakcji selektywnego PCR, możliwością identyfikacji bardzo dużej liczby polimorfizmów, wysoką wartością tak zwanego indeksu markerowego (106) oraz relatywnie niskim kosztem, w przeliczeniu na pojedynczy marker. Cechy te sprawiły, że znalazła ona zastosowanie w identyfikacji zarówno zmienności sekwencyjnej jak i metylacyjnej. Dotąd wykorzystano ją m.in. do wzbogacania map genetycznych (107) również w połączeniu ze strategią markerów komigrujących (108), do poszukiwania markerów sprzężonych z genami cech użytkowych (109,110) włączając cechy ilościowe (111), w badaniach taksonomicznych (103,112) oraz analizy zmienności somaklonalnej (113). Podjęto również, niezbyt owocne, próby konwersji markerów AFLP do markerów STS oraz użycie ich jako sond RFLP (114).

Powodzenie AFLP sprawiło, że powstało szereg jej wariantów do których zalicza się bazujące na genomowym DNA SAMPL – *Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci* (115) i S-SAP – *Sequence Specific Amplicon Polymorphisms* (116) oraz na mRNA technikę cDNA-AFLP (117). SAMPL na etapie selektywnego PCR zamiast startera komplementarnego do adaptoru *MseI* wykorzystuje starter komplementarny do dowolnej sekwencji mikrosatelitarnej. W wyniku PCR, przy zastosowaniu takiej samej liczby selektywnych nukleotydów na końcu 3' startera, powstaje mniej niż w przypadku AFLP fragmentów DNA, a poszczególne prążki występują w postaci bloków o relatywnie niższej masie cząsteczkowej. Poszczególne bloki prążków przypominają obrazy charakterystyczne dla STMS. Wykorzystanie starterów mikrosatelitarnych sprawia, że część markerów SAMPL może być kodominująca. Technikę wy-



Rys. 3. Schemat doświadczenia AFLP.

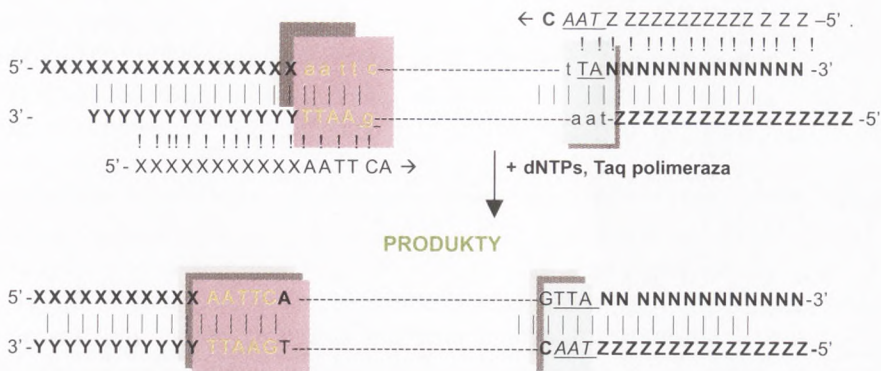
Rys. 3. cd.



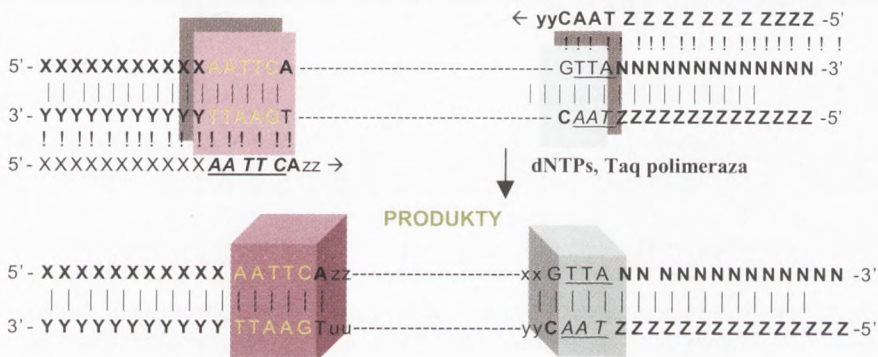
#### IV. Oznaczenie 5' końca selektywnego EcoRI startera

5'-XXXXXXXXXXXXX AATTCAzz-3'  
 $\gamma$ -P<sup>32</sup>-ATP  
 T4 kinaza polinukleotydowa

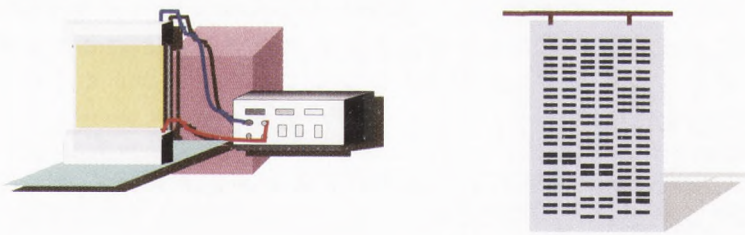
#### V. Wstępny PCR



#### VI. Podstawowy PCR



#### VII. Elektroforeza, rejestracja wyników



korzystano do badania zmienności w obrębie populacji mapującej *Lactuca* spp. oraz do wzbogacania skonstruowanej w oparciu na niej mapy genetycznej (115). W Ogrodzie Botanicznym Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN (OB.-CZRB PAN) w Warszawie testowano możliwość jej wykorzystania w badaniach żyta. W technice S-SAP do specyficznej amplifikacji wykorzystuje się starter komplementarny do jednego z adaptorów (bez dodatkowych selektywnych nukleotydów) oraz oligonukleotyd komplementarny do konserwatywnego obszaru sekwencji retrotranspozonu. Takie podejście umożliwiło identyfikację większej niż w AFLP liczby markerów kodominujących oraz bardziej równomierny ich rozkład na chromosomach (116).

Technika cDNA-AFLP różni się od AFLP tym, że zamiast wyjściowego DNA izoluje się mRNA służący do otrzymania cDNA, który następnie stosowany jest jako matryca do analizy AFLP. Technikę cechują wysoka czułość, co umożliwia identyfikację nawet pojedynczej kopii fragmentu DNA pochodzącego od specyficznego produktu transkrypcji. Należy oczekiwać, że znajdzie ona zastosowanie m.in. w badaniach nad identyfikacją nowych genów, w embriogenezie oraz diagnostyce. Biorąc pod uwagę łatwość generowania powtarzalnych wyników oraz potencjalne zastosowania, wydaje się, że cDNA-AFLP będzie obiecującym uzupełnieniem bądź nawet alternatywą takich technik, jak DD-PCR – *Differential Display* (118), SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression* (119) czy subtrakcyjna hybrydyzacja (120).

Ponieważ technika AFLP oraz jej pochodne bazujące na genomowym DNA wykorzystują mniej lub bardziej wrażliwe na metylację enzymy restrykcyjne (*EcoRI* i *PstI*), otrzymywane wyniki mogą zależeć od różnic we wzorach metylacji (44). Zmienność metylacyjna uwidacznia się w różnym rozkładzie markerów generowanych za pomocą układów *EcoRI/MseI* i *PstI/MseI* na chromosomach (121,122). Układy z *EcoRI*, będąc mniej wrażliwe na metylację DNA prowadzą do grupowania markerów w centromerach, a dokładniej w otaczającej je wysoce modyfikowanej heterochromatynie (123,124). Możliwe jest również, że na takie grupowanie markerów ma wpływ duża liczba sekwencji mikrosatelitarnych, występujących w centromerach (125). Markery wykorzystujące restryktazę *PstI* są bardziej równomiernie rozlokowane wzdłuż oraz pomiędzy chromosomami (analogicznie do markerów RFLP, gdyż zwykle są stosowane enzymy wrażliwe na metylację) i występują w obszarach chromosomów o niskim poziomie metylacji sekwencji CpG oraz CpXpG, uczestniczących w regulacji ekspresji genów (122). Biorąc pod uwagę potencjalnie dużą zmienność metylacji tych sekwencji u roślin należy oczekiwać, że pewna część zmienności może nigdy nie być wykryta (44).

Prezentowany materiał wskazuje na potencjał technik, a w szczególności AFLP, wykorzystujących markery mieszane. Ważną ich cechą jest duża wydajność generowania polimorficznych markerów, stosunkowo niski koszt badań oraz możliwość identyfikacji markerów kodominujących. Jednocześnie, różnice we wrażliwości enzymów restrykcyjnych na metylację DNA pozwalają na równomierne wzbogacanie map genetycznych oraz badanie szeregu procesów, warunkowanych zmiennością modyfikacyjną. Należy się również spodziewać, że odpowiedni dobór enzymów re-

strykcyjnych, które mogłyby zastąpić *MseI*, rozpoznających tę samą sekwencję DNA i trawiących ją w identyczny sposób, lecz różniących się pod względem wrażliwości na metylację, może otworzyć nowe perspektywy w badaniach nad ekspresją genów oraz przyczyni się do wyjaśnienia natury zjawisk leżących u podstaw zmienności somaklonalnej.

Omawiając systemy markerowe trzeba zaznaczyć, że są one często wykorzystywane w połączeniu z metodą BSA – *Bulk Segregant Analysis* (126). W technice tej zakłada się, że jeżeli analizy są prowadzone z wykorzystaniem prób zbiorczych DNA, złożonych z roślin należących do populacji segregującej pod względem danej cechy o skrajnie różnych fenotypach, to porównanie wzorów molekularnych umożliwi identyfikację markerów z nią sprzężonych. Metoda BSA jest wykorzystywana w przypadku cech jedno- jak i wielogenowych (127). Taka uniwersalność metody sprawia, że jest ona chętnie wykorzystywana w badaniach poświęconych poszukiwaniu markerów sprzężonych z genami cech użytkowych.

#### 4. Kryteria wyboru systemu markerowego

Przy wyborze systemu markerowego do danego zadania badawczego należy zastanowić się jak dużej zmienności, między badanymi materiałami, można oczekiwać i czy będzie to zmienność sekwencyjna, metylacyjna czy może mieszana? Jeżeli nie można wykluczyć żadnego wariantu, to czy jedna z nich dominuje? Na tej podstawie szacuje się, które systemy markerowe mogą być brane pod uwagę. Kolejny etap polega na uwzględnieniu zaplecza badawczego oraz środków, jakie można przeznaczyć na dany cel.

Ponieważ wiele zagadnień badawczych może być rozwiązanych w oparciu na zmienności sekwencyjnej, zatem przy wyborze techniki bierze się pod uwagę potencjalne jej źródła oraz jej poziom. Kolejny etap polega na wyborze markerów dominujących czy kodominujących. Praktyka wskazuje, że do celów taksonomicznych, do identyfikacji genotypów, poszukiwania sprzężeń czy wzbogacania map genetycznych można stosować techniki RAPD, AP-PCR czy AFLP. W przypadku programów hodowlanych warto również rozważyć możliwość stosowania specyficznego PCR, a szczególnie techniki STMS.

Jeżeli zmienność jest powodowana metylacją to zastosować można technikę RFLP, bądź jeden z wariantów AFLP. Wybór powinien być uzależniony od poziomu oczekiwanej zmienności. Jeżeli oczekuje się, że zmienność jest powodowana zarówno różnicami w sekwencji DNA, jak i odmiennymi wzorami metylacji, to celowe jest zastosowanie techniki AFLP. Również, gdy oczekiwany jest niski poziom polimorfizmu, należy się skłonić do tej techniki. Bardziej wyczerpujące porównanie różnego typu markerów oraz ich zastosowań można znaleźć w pracach (37,106,128).

## 5. Markery molekularne w badaniach zmienności somaklonalnej

W ciągu ostatnich dziesięciu lat można obserwować wzrost zainteresowania markerami molekularnymi, włączając prace z zakresu hodowli tkankowych (129). Zainteresowanie badaczy wynika, m.in. z potrzeby identyfikacji i eliminacji ewentualnych zmian genetycznych indukowanych *de novo* w okresie pomiędzy otrzymaniem kultury tkankowej i produkcją zregenerowanych roślin (17). Molekularne podstawy zmienności somaklonalnej badali m.in. Kaeppler i Phillips (130). Stwierdzono, że za jej występowanie mogą odpowiadać procesy powielenia powtarzających się sekwencji DNA w kulturach, wzrost oraz dziedziczenie wzorów metylacji roślin wyprawdzonych z mikrospor (131) oraz zmniejszenie ilości materiału genetycznego w zregenerowanych roślinach. Na podstawie uzyskanych wyników badań Munthali i wsp. (17) wykazali, że potencjalną przyczyną zmienności somaklonalnej mogą być również różnice w sekwencjach nukleotydowych, co może sugerować wystąpienie mutacji. Ponieważ u podstaw zmienności somaklonalnej leżą wszelkiego rodzaju zmiany w obrębie genomu, należy się spodziewać, że do identyfikacji oraz badania jej natury można zastosować wszystkie typy markerów molekularnych, które pozwalają na wykrywanie zmienności na poziomie DNA, RNA, bądź ewentualnie markerów białkowych.

Początkowo, do analizy zmienności somaklonalnej stosowano markery izoenzymatyczne lub RFLP (132). Umożliwiły one wykrycie mutacji w regenerowanych roślinach (133), w tym również w obrębie genomu mitochondriów (134). Poczynając jednak od pracy Williamsa i wsp. (64) wzrasta zainteresowanie markerami RAPD, które, jak się wydaje, są bardziej użyteczne, ze względu na łatwość i szybkość generowania fragmentów DNA, przydatnych do porównywania materiałów roślinnych.

Jednak prace z wykorzystaniem markerów RAPD nie dawały pozytywnych wyników. Stosując zarówno markery RFLP jak i RAPD nie zaobserwowano zmienności somaklonalnej pomiędzy diploidami *Hordeum* (131), i wśród zregenerowanych roślin *Lolium* oraz *Festuca* (135). Również Isabel i wsp. (136), testując stabilność genetyczną ograniczonej populacji zarodków somatycznych oraz embriogennych linii komórkowych [*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.] nie zarejestrowali zmienności genetycznej. Autorzy sugerują, że może to być spowodowane analizą nie reprezentatywnej liczby zarodków lub zbyt małej puli markerów RAPD wykorzystanych w badaniach. Taką hipotezę, jak się zdaje, potwierdzają wyniki badań uzyskane przez Munthali i wsp. (17). Analizując próbki DNA ze 120 zregenerowanych roślin buraka za pomocą 5,607 prążków RAPD autorzy zidentyfikowali tylko 3 różnicujące prążki. Równie niską zmienność obserwowano stosując markery izoenzymatyczne oraz RFLP. Isabel i wsp. (136), uważają, że do analizy stabilności genetycznej zarodków wyprowadzonych na drodze embriogenezy somatycznej, należy użyć co najmniej 200-300 markerów RAPD.

Mimo szeregu trudności w wykryciu zmienności somaklonalnej za pomocą markerów RAPD pewne sukcesy odnotowano dla zregenerowanych z protoplastów ro-

ślin *Lolium* (137). Brown i wsp. (138) obserwowali różnice pomiędzy liniami kultur zawieszin komórkowych pszenicy oraz pomiędzy zregenerowanymi z nich roślinami. Podobne wyniki otrzymano w przypadku zarodków somatycznych, pochodzących od jednej lub wielu linii u brzoskwini [*Prunus persica* (L.) Batsch] i u *Carya illinoensis* (113,139). W badaniach prowadzonych na *Carya illinoensis*, ujawniono występowanie zmienności somaklonalnej, która prawdopodobnie powstała podczas prowadzenia hodowli tkankowej (139). Podobne wyniki otrzymali Wallner i wsp. (57), którzy zajmowali się możliwością wykorzystania techniki RAPD oraz RFLP z sondą oligonukleotydową ukierunkowaną na sekwencje mikrosatelitarne genomu do analizy stabilności genetycznej i długookresowym monitorowaniem mikrorozmnazanych *in vitro*, ważnych dla medycyny roślin z grupy *Achillea millefolium* oraz innych taksonów *Achillea*. Autorzy stosując obie techniki identyfikowali nieznaczny poziom zmienności pomiędzy przedstawicielami grupy *Achillea millefolium*, a tylko jeden z dziesięciu przetestowanych starterów RAPD umożliwił różnicowanie wszystkich klonów pochodzących od indywidualnych roślin matecznych, otrzymanych w wyniku mikrorozmnazania. W przeprowadzonej analizie prób pobranych z pojedynczych klonów, w różnych odstępach czasowych, na przestrzeni roku, wykazano praktycznie całkowity brak różnic w przypadku roślin rozmnażanych wegetatywnie. Jednocześnie nieznaczna zmienność wykryto stosując sondy oligonukleotydowe. Większą przydatność sond oligonukleotydowych w porównaniu z techniką RAPD wykazali również Mosges i Friedt (140), którzy porównali zmienność markerów RAPD do identyfikowanej za pomocą izoenzymów. Nieoczekiwanie duży poziom zmienności opisano (141) dla dwóch embriogennych kultur mango odpornych na *Colletotrichum gloeosporioides*. Autorzy za pomocą 15 starterów RAPD zarejestrowali aż 63 różnicujące je prążki co, jak się wydaje, jest wręcz zaskakujące, biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych prac z zastosowaniem techniki RAPD.

Biorąc pod uwagę niejednoznaczność techniki RAPD oraz konieczność stosowania zwykle dużej liczby starterów w celu wykrycia różnic spowodowanych zmiennością somaklonalną wydaje się, że dobrą alternatywą do jej badania może się okazać technika AFLP (104). Jej zaletą jest możliwość identyfikacji dużej liczby markerów molekularnych w stosunkowo krótkim czasie oraz wysoka powtarzalność. Dotąd została opublikowana tylko jedna praca dotycząca omawianego zagadnienia (113) z zastosowaniem AFLP. Autorzy pracy badali zmienność w obrębie zarodków somatycznych oraz przeprowadzili porównanie w obrębie oraz pomiędzy liniami embriogennych kultur *Carya illinoensis* (Wangenh.). Stosując tylko 3 pary selektywnych starterów zarejestrowano 373 fragmenty DNA, przy czym 368 było polimorficznych. Zastosowanie markerów AFLP pozwoliło na jednoznaczne różnicowanie linii i wykazano, że zarodki należące do poszczególnych linii zwykle grupowały się w tych samych skupieniach odpowiednich dendrogramów. Autorom pracy udało się także rozróżnić zarodki pochodzące z tej samej linii. Biorąc pod uwagę fakt, że *EcoRI* wykorzystana przez autorów pracy do generowania fragmentów jest wrażliwa na metylację, identyfikowane pomiędzy zarodkami różnice mogą być jej wynikiem. Przy-

puszczenie to, jak się zdaje, jest potwierdzeniem analizy porównawczej wykonanej za pomocą techniki AFLP na DNA liści, korzeni oraz ziaren pszenicy (50). Autorzy pracy, stosując wrażliwą na metylację endonukleazę *Sse8371* identyfikowali szereg specyficznych dla omawianych tkanek różnic i zasugerowali, że wynikają one raczej ze zmienności wzorów metylacji niż zmian strukturalnych chromosomów. Z opublikowanych danych wynika, że technika AFLP może się okazać przydatna w badaniach nad zmiennością genetyczną, jak i zmiennością wynikającą z różnic we wzorach metylacji DNA na poziomie tkanek tego samego organizmu, jego klonów czy też do badania ekspresji genów.

## 6. Podsumowanie

Omówiony podział systemów markerowych, chociaż oparty na logicznych zasadach jest dość płynny i spotykana jest również odmienna prezentacja danych. W literaturze fachowej występują, zarówno rozbieżności w nazewnictwie, jak i szeroko stosowane są synonimy większości technik, czy identyfikowanej przez nie zmienności. Można spotkać się z niecisłym stosowaniem nazw markerów (np. STS, SCAR) czy nazywaniem technik od źródła identyfikowanej przez nie zmienności. Powszeczne i uzasadnione jest wymienne stosowanie nazwy techniki i nazwy markerów (np. technika/marker AFLP). Tak złożona sytuacja jest bez wątpienia wynikiem bardzo szybkiego rozwoju technik analitycznych biologii molekularnej, jaki miał miejsce w ciągu ostatnich dwudziestu lat. Zgodnie z naszą wiedzą, prezentowany materiał jest pierwszą polskojęzyczną pracą, w której podjęta została próba zarówno usystematyzowania wiedzy dotyczącej źródeł zmienności na poziomie DNA, klasyfikacji oraz omówienia zasad analitycznych technik molekularnych, jak i rozwikłania zagadnień terminologicznych.

## Literatura

1. Wagner H., Weber W. E., Wricke G., (1992), *Plant Breed.*, 108, 89-96.
2. Zillman R. R., Bushuk W., (1979), *Canadian J. of Plant Sci.*, 59, 281-286.
3. Westphal L., Wricke G., (1989), *Plant Breed.*, 102, 51-57.
4. Tanksley S. D., Young N. D., Peterson A. H., Bonierbale M. W., (1989), *BioTechnology*, 7, 257-264.
5. Devos K. M., Gale M. D., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 567-572.
6. Grzebelus D., (1994), *Hod. Rośl. Nasien.*, 3, 7-11.
7. Michalik B., (1994), *Hod. Rośl. Nasien.*, 4-5, 4-10.
8. Deniziak M., Barciszewski J., (1995), *Postępy Biologii Komórki*, 22(6), 1-12.
9. Wolko B., Kruszka K., (1997a), *Postępy Nauk Rolniczych*, 3, 3-20.
10. Wolko B., Bartkowiak-Broda I., (1997), *Materiały: I krajowej konferencji „Hodowla Roślin”, (19-20 listopad), Poznań*, 389-402.
11. Lindhal T., Nyberg B., (1972), *Biochemistry*, 11(19), 3610-3618.
12. Leob L. A., Preston B. D., (1986), *Ann. Rev. Genet.*, 20(1), 201-230.
13. Hevroni D., Livneh Z., (1988), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85(14), 5046-5050.

14. Kunkel T. A., Shaaper R. M., Leob L. A., (1983), *Biochemistry*, 22(10), 2378-2384.
15. Asins M. J., Monforte A. J., Mestre P. F., Carbonell E. A., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 503-510.
16. Bitonti M. B., Cozza R., Wang G., Ruffini-Castiglione M., Mazzucca S., Castiglione S., Sala S., Innocenti A. M., (1996), *Physiol. Plant.*, 97, 21-27.
17. Munthali M. T., Newbury H. J., Ford-Lloyd B. V., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 474-478.
18. Flavell R. B., Rimpau J., Smith D. B., (1977), *Chromosome*, 63, 311-319.
19. Jarman A. P., Nicholls R. D., Weatherall D. J., Clegg J. B., Higgs D. R., (1986), *The EMBO J.*, 5(8), 1857-1863.
20. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R., (1987a), *Science*, 235, 1616-1622.
21. Tyrka M., (1994), *Hod. Rośl. Nasien.*, 4-5, 4-10.
22. Litt M., Luty J. A., (1989), *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 397-401.
23. Jacob H. J., Lindpointer K., Lincoln S. E., Kusumi K., Bunker R. K., Yi-Pei M., Ganten D., Dzau V. J., Lander E. S., (1991), *Cell*, 67, 213-224.
24. Edwards A., Civitello A., Hammond H. A., Caskey C. T., (1991), *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 746-756.
25. Karp A., Edwards K. J., (1995), in: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*, Report of an IPGRI Workshop, (9-11 October), Eds. Ayad W. G., Hodgkin T., Jaradat A., Rao V. R., Rome, Italy, 11-22.
26. Sharon D., Adato A., Mhameed S., Lavi U., Hillil J., Gomolka M., Epplen C., Epplen J. T., (1995), *Hort-Science*, 30(1), 109-112.
27. Weber J. L., (1990), *Genomics*, 7, 517-524.
28. Crouch H. K., Crouch J. H., Jarret R. L., Cregan P. B., Ortiz R., (1998), *Crop. Sci.*, 38, 211-217.
29. Sakowicz T., (1997), *Postępy Biologii Komórki*, 9, 81-92.
30. Tautz D., (1989), *Nucl. Acids Res.*, 17(16), 6463-6471.
31. Moran C., (1993-1994), *J. Hered.*, 84, 274.
32. Morgante M., Olivieri A. M., (1993), *Plant J.*, 3(1), 175-182.
33. Bell G. I., Selby M. J., Rutter W. J., (1982), *Nature*, 368, 455.
34. Royale N. J., Clarkson R. E., Wong Z., Jeffreys A. J., (1988), *Genomics*, 3, 352.
35. Somers D. J., Zhou Z., Bebeli P. J., Gustafson J. P., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 93, 982-989.
36. Weir B. S., (1992), *Genetics*, 130, 873.
37. Karp A., Kresovich S., Bhat K. V., Ayad W. G., Hodgkin T., (1997), *IPGRI Technical Bulletin*, 2, 20.
38. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985), *Nature*, 314, 67-73.
39. Nakamura Y., Julier C., Wollff R., O'Connell P., Leppert M., White R., (1987b), *Nucl. Acids Res.*, 15, 2537-2547.
40. Giacale J., Friesed J., Francke U., (1992), *Nature Genet.*, 1, 137.
41. Guidet F., Rogowsky P., Taylor C., Song W., Langridge P., (1990), *Genome*, 34, 81-87.
42. Napierała M., (1997), w: *Genom człowieka*, pod red. Czarny J., Jasińska A., Kozłowski P., Napierała M., Sobczak K., Woźniak M., PWN, Warszawa.
43. Sun M., Chen H., Leung F. C., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 464-472.
44. Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 98, 704-711.
45. Liebermann D., Hoffman-Liebermann B., Troutt A. B., Kedes L., Cohen S. N., (1986), *Mol. Cell Biol.*, 6, 218.
46. White S. E., Habera L. F., Wessler S. R., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1192-1196.
47. Bureau T. E., Ronald P. C., Wassler S. R., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8524-8529.
48. Chang S., Magill C. W., Magill J. M., Fong F., Newton R. J., (1992), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 10(4), 362-366.
49. Brown P. T. H., (1989), *Genome*, 31, 717-729.
50. Donini P., Elias M. L., Bougourd S. M., Koebner R. M. D., (1997), *Genome*, 40(4), 521-526.
51. Helentjaris T., King G., Slocum M., Siedestrang C., Wegman S., (1985), *Plant Mol. Biol.*, 5, 109-118.
52. Evola S. V., Burr F. A., Burr B., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 765-771.
53. Botstein D., White R. L., Skolik M., Davis R. W., (1980), *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314-331.
54. Messing J., Gronnborn B., Muller-Hill B., Hofschneider P. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3642-3646.

55. Vassart G., Georges M., Monsieur R., Brocas H., Laquarre A. S., Christophe D., (1987), *Science*, 235, 683-684.
56. Itakura K., Rossi J. J., Wallace R. B., (1984), *Ann. Rev. Biochem.*, 53(1), 323-356.
57. Wallner E., Weising K., Rompf R., Kahl G., Kopp B., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 647-652.
58. Devos K. M., Atkinson M. D., Chinoy C. N., Francis H. A., Harcourt R. L., Koebner R. M. D., Liu C. J., Masojć P., Xie D. X., Gale M. D., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 673-680.
59. Myśków B., Milczarski P., Masojć P., (1997), *Materiały I krajowej konferencji „Hodowla Roślin”, (19-20 listopad), Poznań*, 453-456.
60. Rafalski J. A., Tingey S. V., (1993), *Reviews*, 9(8), 275-280.
61. Kojima T., Nagaoka T., Noda K., Ogihara Y., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 96, 37-45.
62. Caetano-Anolles G., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 25, 1011-1026.
63. Caetano-Anolles G., Bassam B., Gresshoff P. M., (1991), *Bio/Technology*, 9, 553-557.
64. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18(22), 6531-6535.
65. Welsh J., McClelland M., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18, 7213-7218.
66. Lowe A. J., Hanotte O., Guarino L., (1996), *Plant Genetics Res. Newsl.*, 107, 50-54.
67. Bednarek P. T., Niedzielski M., Puchalski J., (1997), *Materiały I krajowej konferencji „Hodowla Roślin”, (19-20 listopad), Poznań*, 433-438.
68. Wolko B., Kruszcza K., (1997b), *Materiały I krajowej konferencji „Hodowla Roślin”, (19-20 listopad), Poznań*, 427-432.
69. Borner A., Korzun V., Polley A., Malyshev S., Melz G., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 97, 99-102.
70. Masojć P., Łapiński M., Myśków B., Stojałowski S., Milczarski P., (1999b), *Biuletyn IHAR*, 211, 273-280.
71. White M. B., Carvalho M., Derse D., O'Brien S. J., Dean M., (1992), *Genomics*, 12, 301-306.
72. Hayashi K., (1992), *Genetic Analysis: Techniques and Applications*, 9, 73-79.
73. Reisner D. G., Steger U., Wiese M., Wulfert M., Heibey M., Henco K., (1992), *Electrophoresis*, 13, 632-636.
74. Tragoonrun S., Kanazin V., Hayes P. M., Blake T. K., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 1002-1008.
75. Heath D. D., Iwama G. K., Devlin R. H., (1993), *Nucl. Acids Res.*, 21, 5782-5785.
76. Gupta M., Chyi Y. S., Romero Severson J. R., Owen J. L., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 362-366.
77. Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., (1994), *Genomics*, 20, 176-183.
78. Chen X., Wu R., (1997), *Gene*, 185, 195-199.
79. Kanety R. V., Zeng X., Bennetzen J. L., Brent E. Z., (1995), *Mol. Breed.*, 1, 365-373.
80. Nagaoka T., Ogihara Y., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 94, 597-602.
81. Arcade A., Anselin F., Faivre Rampant P., Lesage M. C., Paques L. E., Prat D., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 299-307.
82. McPherson M. J., Johnes K. M., Gurr S. J., (1991), *PCR with highly degenerate primers*, in: *PCR. A practical approach*, Eds. Mc Pherson M. J., Quirke P., Taylor G. R., The Practical Approach Series. Ser. Editors: D. Rickwood, Hames B. D. IRL Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 173-186.
83. Thomas M. R., Scott N., (1994), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12(1), 58-64.
84. Weining S., Langridge P., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 209-216.
85. Cole C. G., Goodfellow P. N., Bobrow M., Bentley D. R., (1991), *Genomics*, 10, 816-826.
86. Ribaut J.-M., Hu X., Hoisington D., Gonzalez-de Leon D., (1997), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 15(2), 154-162.
87. Paran I., Michelmore R. W., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993.
88. Zheng X. Y., Wolff D. W., Baudracco-Arnas S., Pirat M., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 453-463.
89. Weeden N. F., Wu W. Y., Gu W. K., Cargnoni T. L., Lu J., Timmerman G. M., Wolko B., Zhu Z., (1994), *Proc. of the 7th SABRAO and WSAA International Congress, Taiwan*, 437-445.
90. Beckmann J. S., Soller M., (1983), *Theor. Appl. Genet.*, 67, 35-43.
91. Naik S., Gill K. S., Prakasa Rao V. S., Gupta V. S., Tamhankar S. A., Pujar S., Gill B. S., Ranjekar P. K., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 97, 535-540.
92. Mano Y., Sayed-Tabatabaei B. E., Graner A., Blake T., Takaiwa F., Oka S., Komatsuda T., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 98, 937-946.



93. Larson S. R., Kadyrzhanova D., McDonald C., Sorrells M., Blake T. K., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 93, 618-625.
94. Saghai-Marooof M. A., Biyashev R. M., Yang G. P., Zhang Q., Allard R., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5466-5470.
95. Peng J. H., Fahima T., Roder M. S., Li Y. C., Dahan A., Grama A., Ronin Y. I., Korol A. B., Nevo E., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 98, 862-872.
96. Thomas M. R., Scott N. S., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 985-990.
97. Quijada A., Liston A., Delgado P., Vazquez-Lobo A., Alvarez-Buylla E. R., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 96, 539-544.
98. D'Ovidio R., Tanzarella O. A., Proceddu E., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 15, 169-171.
99. Wu D. Y., Ugozzoli L., Pal B. K., Wallace R. B., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2757-2760.
100. Lai E., Riley J., Purvis I., Roses A. A., (1999), *Genomics*, 54(1), 31-38.
101. Tomita-Mitchell A., Muniappan B. P., Herrero-Jimenez P., Zarbl H., Thilly W. G., (1998), *Gene*, 223(1-2), 381-391.
102. Brookes A. J., (1999), *Gene*, 234(2), 177-186.
103. Bednarek P. T., Chwedorzewska K., Króliczak J., Puchalski J., Zawada M., (1999a), *Biuletyn IHAR*, 211, 219-228.
104. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Plot J., Peleman J., Kupier M., Zabeau M., (1995), *Nucl. Acids Res.*, 23, 4407-4414.
105. Marczewski W., (1997), *Biotechnologia*, 2(37), 121-126.
106. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A., (1996), *Mol. Breed.*, 2, 225-238.
107. Wang Y. H., Thomas C. E., Dean R. A., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 791-798.
108. Rouppe van der Voort J.R., Wolters P., Folkertsma R., Hutten R., van Zandvoort P., Vinke H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., Bakker J., (1997a), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 874-880.
109. Bednarek P. T., Kubicka H., Zawada M., Brukwiński W., (1999b), *Biuletyn IHAR*, 211, 229-238.
110. Rouppe van der Voort J. N., van Zandvoort P., Eck H. J., Folkertsma F. T., Hutten R. C. B., Draaistra J., Gommers F. J., Jacobsen E., Helder J., Bakker J., (1997b), *Mol. Gen. Genet.*, 255, 438-447.
111. Spielmeyer W., Green A.G., Bittisnich D., Mendham N., Lagudah E. S., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 97, 633-641.
112. Caicedo A. L., Gaitan E., Duque M. C., Toro Chica O., Debouck D. G., Tohme J., (1999), *Crop. Science*, 39(5), 1497-1507.
113. Vendrame W. A., Kochert G., Wetzstein H. Y., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 853-857.
114. Shan X., Blake T. K., Talbert L. E., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 98, 1072-1078.
115. Witsenboer H., Vogel J., Michelmore R. W., (1997), *Genome*, 923-936.
116. Waugh R., McLean K., Flawell A. J., Kumar A., Thomas B. B. T., Powell W., (1997), *Mol. Gen. Genet.*, 253, 687-694.
117. Bachem C. W. B., Oomen R. J. F. J., Visser R. G. F., (1998), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16, 157-173.
118. Liang P., Pardee A. B., (1992), *Science*, 257, 967-971.
119. Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W., (1995), *Science*, 270, 484-487.
120. Ermolaeva O. D., Sverdlov E. D., (1996), *Genet. Analysis*, 13, 49-58.
121. Castiglioni P., Ajmone-Marsan P., van Wijk R., Motto M., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 425-431.
122. Young W. P., Schupp J. M., Keim P., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 785-790.
123. van Eck H. J., van der Voort J. R., Draaistra J., van Zandvoort E., van Enchevort R., (1995), *Mol. Breed.*, 1, 397-410.
124. Castiglioni P., Pozzi C., Huen M., Terzi V., Muller K. J., Rohde W., Salamini F., (1998), *Genetics*, 149, 2039-2056.
125. Bert P. F., Charmet G., Sourdille P., Hayward M. D., Balfourier F., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 445-452.
126. Michelmore R., W., Paran I., Kessel R. V., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 9828-9832.
127. Bednarek P. T., Kubicka H., Zawada M., Brukwiński W., (2000), *Biuletyn IHAR*, 216 (w druku).

128. Russell J. R., Fuller J. D., Macaulay M., Hatz B. G., Jahoor A., Powell W., Waugh R., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 714-722.
129. Cloutier S., Landry B. S., (1994), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30, 32-39.
130. Kaeppler S. M., Phillips R. L., (1993), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 29, 125-130.
131. Devaux P., Kilian A., Kleinhofs A., (1993), *Mol. Gen. Genet.*, 241, 674-679.
132. Sabir A. A., Newbury H. J., Todd G., Catty J., Ford-Lloyd B. V., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 113-117.
133. Nelke M., Nowak J., Wright J. M., McLean N. L., (1993), *Plant Cell Rep.*, 13, 72-78.
134. Deverno L. L., Charest P. J., Bonen L., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 88, 727-732.
135. Valles M. P., Wang Z. Y., Montavon P., Potrykus I., Spangenberg G., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 101-106.
136. Isabel N., Tremblay L., Michaud M., Tremblay F. M., Bosquet J., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 81-87.
137. Wang Z.Y., Nagel J., Potrykus I., Spangenberg G., (1993), *Plant Sci.*, 94, 179-193.
138. Brown P. T. H., Lange F. D., Krauz E., Lorz H., (1993), *Mol. Gen. Genet.*, 237, 311-317.
139. Hashmi G., Huettel R., Meyer R., Krusberg L., Hammerschlag F., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 624-627.
140. Mosges G., Friedt W., (1994), *Plant Breed.*, 113, 114-124.
141. Jayasankar S., Litz R. E., Schnell R. J., Hernandez A-C., (1998), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 34, 112-116.