

MOLEKULARNI MARKERI. POLIMORFIZAM DUŽINE UMNOŽENIH FRAGMENTA

PRŽULJ, N.¹, PEROVIĆ D.²

IZVOD: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata) molekularni markeri kombinuju osobine RFLP i RAPD, tj. tokom prve faze dolazi do digestije genomske DNK po principu RFLP molekularnih markera, a tokom druge faze do selektivnog umnožavanja restrikcionih fragmenata po principu RAPD molekularnih markera. Prednost AFLP tehnike je brzo stvaranje velikog broja reprodukujućih markera. Reprodukciono mesto i specifičnih PCR prajmera za adaptere. Samo fragmenti koji imaju adapter i dodatne nukleotide, koji su odgovorni za selektivnost fragmenata mogu biti umnoženi. Povećanje broja dodatnih nukleotida dovodi do smanjenja broja umnoženih fragmenata u PCR reakciji. Umnoženi fragmenti razdvajaju se na sekvencionom gelu i determinišu radioaktivnom ili fluoroscentnom metodom. AFLP markeri efikasno determinišu genetičku varijabilnost između i unutar populacija. Nedostatak im je što su to dominantni markeri, odnosno ne omogućavaju identifikaciju alelnog variranja u specifičnom lokusu.

Ključne reči: AFLP, molekularni markeri, restrikcioni enzimi, selektivno umnožavanje, specifični adapter, specifični prajmeri

UVOD: Selektivna amplifikacija restrikcionih fragmenata digestovane genomske DNK predstavlja sistem molekularnih markera koji se naziva polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (Zabeau and Vos, 1993, Vos et al., 1995). Polimorfizam se određuje na osnovu prisustva ili odsustva fragmenata DNK na PAGE gelu. Dobijeni restrikcioni fragmenti na gelu AFLP tehnikom označavaju se kao AFLP fingerprint ili AFLP markeri. Kod jednog fingerprinta obično se istovremeno umnožava 50-100 restrikcionih fragmenata.

Principi primene AFLP markera

Tehnika AFLP molekularnih markera obuhvata četiri osnovne faze: (1) digestija genomske DNK, (2) ligacija, (3) umnožavanje i (4) analiza gela (Vos et al., 1995) (Sl. 1).

Digestija genomske DNK

Tokom digestije DNK restrikcioni fragmenti nastaju pod uticajem dva restrikciona enzima, od kojih jedan prepoznaje ređa restrikciona mesta sa 6-8 baza, a drugi češća sa 4 baze. Enzimi koji ređe seku genomsku DNK - ređe sečenje (*rare-cutting*), a koji se koriste kod AFLP, su *EcoRI*, *AseI*, *HindIII*, *ApaI* i *PstI*, a enzimi koji češće seku - češće sečenje (*frequent-cutting*) su *MseI* i *TagI* (Bleas et al., 1998). Redim sečenjem stvaraju se fragmenti veličine 100-1000 bp, koji su pogodni za PCR umnožavanje i razdvajanje na PAGE gelu. Visoka specifičnost endonukleaza omogućava stvaranje identične populacije fragmenata genomske DNK u različitim eksperimentima, koji su specifični za taj genotip, pod uslovom da nije došlo do promene strukture genomske DNK. Izbor enzima za digestiju zavisi od kompleksnosti genoma i stepena metilacije DNK (Bachem et al., 1996). Upotreba dva

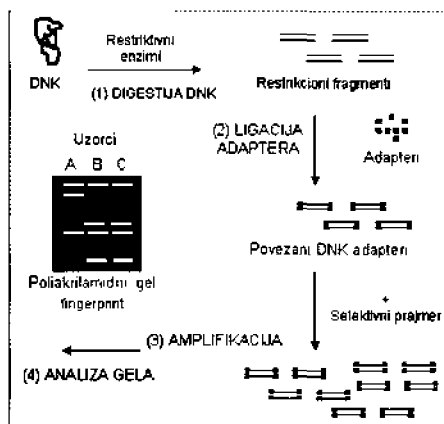
Pregledni rad (Review paper)

¹ Prof. dr NOVO PRŽULJ, naučni savetnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

² Dr DRAGAN PEROVIĆ, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Department of Genebank, AGMOM, Gatersleben, Germany

Sl. 1. Shematski prikaz četiri osnovne faze kod AFLP tehnike molekularnih markeri. a) Digestija genomske DNK restrikcionim enzimima. b) Vezivanje adaptera na restrikcione fragmente. c) PCR umnožavanje (amplifikacija) restrikcionih fragmenata koji su označeni selektivnim prajmerima. d) Vizualizacija amplificiranih fragmenata na PAGE gelu

Sl. 1. A schematic displaying the four basic steps of AFLP. a) Digestion of genomic DNA by restriction enzymes. b) Ligation of the adapters to the restriction fragments. c) Amplification of a subset of the ligated fragments by PCR using primers with selective nucleotides at the 3'-end. D) Evaluation of polymorphism by running the amplified products of various samples on a denaturing polyacrylamide gel



različita enzima omogućava dobijanje različitog broja fragmenata za umnožavanje i formiranje fingerprintinga specifične kompleksnosti. Korišćenjem kombinacija prajmera može se dobiti veliki broj različitih fingerprintova.

Nakon digestije nastaju tri tipa restrikcionih fragmenata: (1) fragmenti dobijeni redim sečenjem na obe strane, (2) fragmenti dobijeni češćim sečenjem na obe strane i (3) fragmenti dobijeni redim i češćim sečenjem. Ako se digestija izvrši enzimima *EcoRI* i *MseI* dobiju se fragmenti *EcoRI-EcoRI*, *MseI-MseI* i *EcoRI-MseI*. Oko 90% nastalih fragmenata je tipa redog sečenja na obe strane.

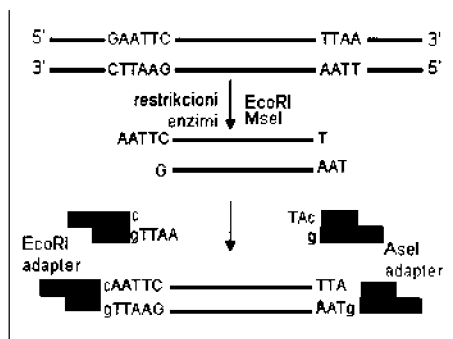
Vezivanje adaptera

Adapteri su dvolančani sintetički oligonukleotidi dužine 10-30 bp, komplementarni

lepljivim krajevima odgovarajućeg restrikcionog mesta, za koji se vežu uz pomoć enzima ligaze (Sl. 2). Sekvenca adaptera i baze restrikcionog mesta za koje se vezao adapter služe za vezivanje prajmera. Ligacijom ne dolazi do restauracije restrikcionih mesta jer su zamenjene baze (c, g) u adapterskoj sekvenci. Ova zamena baza sprečava odvijanje ponovne restrikcije nakon što se već obavila ligacija, što omogućava odvijanje reakcija restrikcije i ligacije u istom rastvoru.

Sl. 2. Digestija genomske DNK restrikcionim enzimima i ligacija adaptera. a) *EcoRI* stvara manji broj, a *MseI* veći broj restrikcionih fragmenata. b) Enzim ligaza vezuje specifične adaptere na krajeve restrikcionih fragmenata

Sl. 2. A schematic outlining of the ligation of adapters to the ends of a restriction fragment. a) Genomic DNA is first restricted by *EcoRI* and *MseI*. b) Double stranded adapters, complementary to the short single-strand extension generated by the restriction enzymes, are ligated to the DNA fragment. The *EcoRI* and *MseI* recognition sites are not restored by ligation because of a base change in the adapter sequence (shown in lower case)



Kompleksnost populacije DNK fragmenata može se redukovati pre umnožavanja upotrebom posebnih biotin adaptera, koji su komplementarni mestu redog sečenja (npr. *EcoRI* adapteri označeni biotinom) (Zabeu and Vos, 1993). Biotin-adapteri razdvajaju fragmente koji imaju najmanje jedno ređe sečeno restrikciono mesto (npr. *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-MseI*) od fragmenata koji imaju dva češće sečena mesta (npr. *MseI-MseI*). Ovaj proces smanjuje broj nejasnih DNK fragmenata u gelu.

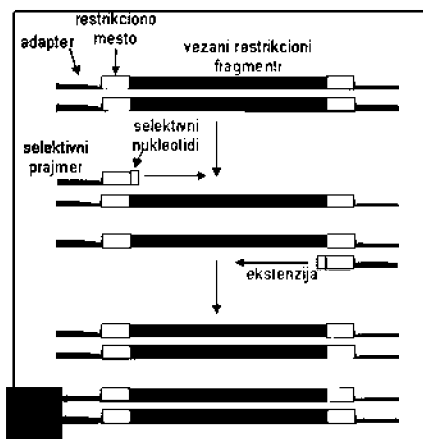
Umnožavanje

Kod kompleksnih genoma obično se primenjuje strategija dvostrukog umnožavanja (Vos et al., 1995; Han et al., 1999; Briard et al., 2000). Prvo umnožavanje naziva se preumnožavanje i kod njega se koriste prajmeri koji nemaju, ili imaju samo jedan selektivni nukleotid. Preumnožavanjem smanjuje se kompleksnost restrikcioniha fragmenata za oko 16 puta, čime poželjni fragmenti postaju dominantni. Preumnožavanje smanjuje "DNK mrlje" u gelu koje nastaju usled pogrešnog umnožavanja. Nakon preumnožavanja PCR produkt se razblažuje i izdvaja matična DNK za drugu reakciju umnožavanja, gde se koriste prajmeri sa potpunom ekstenzijom.

AFLP prajmeri za selektivno umnožavanje sastoje se od tri regiona sekvenci: -5' region komplementaran adapteru, region komplementaran sekvenci restrikcionog mesta i -3' selektivni nukleotidi (Sl. 3).

Sl. 3. Selektivni prajmer je komplementaran adapteru, restrikcionom mestu i bazama restrikcionog fragmenta DNK. Horizontalna strelica pokazuje smer sinteze komplementarnog DNK lanca tokom PCR reakcije

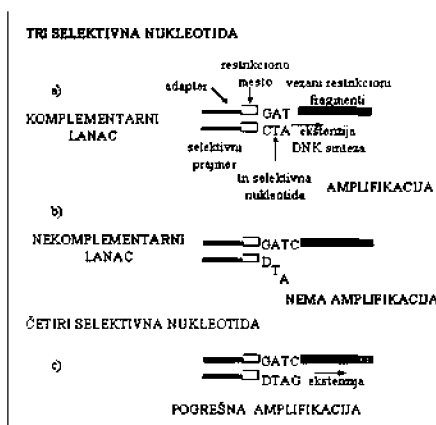
Sl. 3. A schematic depicting the PCR amplification of a ligated restriction fragment. The AFLP primers have three regions, the 5'-end complementary to the oligonucleotide adapter sequence, the restriction site sequence and 3' selective nucleotides. The horizontal arrows indicate the direction of DNA synthesis. With each PCR cycle, the amount of DNA is doubled



U reakciji restrikcije i ligacije selektivno se umnožavaju pomoću AFLP prajmera samo oni fragmenti matične DNK čiji su nukleotidi u produžetku restrikcionog mesta (GAT) komplementarni selektivnim nukleotidima prajmera (CTA) (Sl. 4a). Selektivni nukleotidi na -3' kraju prajmera imaju dve uloge: omogućavaju umnožavanje različitih restrikcioniha fragmenata i obezbeđuju dodatnu mogućnost otkrivanja polimorfizma, osim polimorfizma restrikcionog mesta.

Sl. 4. Selektivnost AFLP prajmera. a) Amplifikiranje fragmenta DNK čiji su nukleotidi komplementarni selektivnim nukleotidima prajmera. b) Nekomplementarnost nukleotida onemogućava ekstenziju prajmera. c) Kod prajmera sa četiri selektivne baze često dolazi do pogrešne amplifikacije

Sl. 4. The schematic illustrating the selectivity of AFLP primers. The first example shows successful extension of a primer with three selective nucleotides matching the template sequence. The arrow indicates the direction of DNA synthesis. In the second example, there is mismatch between the three selective bases and the restriction fragment preventing extension of the primer. The third example illustrates the mismatch amplification that can occur with primers having selective bases. D=G, A or T.



Iako su fragmenti dobijeni samo sa dva ređe sećena mesta (*MseI-MseI*) zastupljeni i do 90%, prvenstveno se amplifiraju fragmenti sećeni sa oba enzima (*EcoRI-MseI*). Za tu amplifikaciju postoje dva razloga: prajmer komplementaran ređem restrikcionom mestu

i njegovom adapteru (npr. *EcoRI* prajmer) ima veću temperaturu hibridizacije sa lancem DNK nego prajmer češćeg sečenja (npr. *MseI* prajmer) i fragmenti sečeni sa oba enzima se amplificiraju korišćenjem dva prajmera što sprečava formiranje invertovanih ponovaka na krajevima.

Analiza gela

U obeležavanju umnoženih fragmenata koristi se radioaktivno označavanje ili fluorescentna boja. Prajmer koji odgovara ređe sečenom mestu fosforilizuje se na -5' kraju (sa γ -³²P ili ³³P) ATP što omogućava autoradiografnu vizuelizaciji alela čije su umnožavanje određivali obeleženi markeri. Elektroforeza se obavlja na poliakrilamidnom gelu a dobijeni fingerprint može biti očitao vizuelno ili skeniran, za dalju kompjutersku obradu, uz korišćenje nekog od softvera.

Vizuelizacija traka može biti izvedena i bojenjem srebro-nitratom, gde se dobije veća osetljivost i rezolucija nego kod radioaktivnog označavanja (Cho et al., 1996; Chalhoub et al., 1997). Prednost bojenja srebrom ogleda su u mogućem izdvajanja fragmenata iz suvog gela i njihovom daljem korišćenju, tj. kloniranju, sekvencioniranju, pripremanju proba ili dobijanju karakterističnih amplificiranih regiona. Bojenjem srebrom dobijaju se visoka rezolucija kod fragmenata većih od 300 bp.

Polimorfizam, frekvencija i distribucija AFLP markera

Osnova polimorfizma AFLP molekularnih markera uglavnom je polimorfizam sekvence na molekularnom nivou. Mutacija u tački u restrikcionom mestu i u susednim bazama koje služe za vezivanje prajmera dovodi do promene fingerprinta. Delecije, insercije i reorganizacije restrikcionog mesta i fragmenata između restrikcionih mesta takođe su osnova polimorfizma AFLP markera.

Broj umnoženih fragmenata zavisi od kompleksnosti genomske DNK, izbora restrikcionih enzima i broja i tipa selektivnih nukleotida kod PCR prajmera. Postoji skoro linearna korelacija između broja umnoženih fragmenata i veličine genoma (Zabeau and Vos, 1993). Sa povećanjem broja selektivnih nukleotida na -3' kraju prajmera smanjuje se kompleksnost DNK fingerprinta. Broj umnoženih fragmenata redukuje se približno četiri puta sa svakom dodatnom selektivnom bazom, podrazumevajući random distribuciju

baza (Zabeau and Vos, 1993). Za male genome veličine 10^6 - 10^7 bp jedan do dva selektivna nukleotida na -3' kraju svakog prajmera može biti dovoljno za otkrivanje polimorfizma. Složeniji genomi veličine 10^8 - 10^9 bp zahtevaju dodatne selektivne nukleotide da bi se dobio poželjni broj umnoženih fragmenata. Kod AFLP fingerprinta poželjno je da na gelu bude prisutno 50-100 traka (Zabeau and Vos, 1993). Iako se kompleksnost reducira sa svakim dodatnim selektivnim nukleotidom, moguće je maksimalno koristiti tri selektivna nukleotida. Kod korišćenja četiri selektivna nukleotida javlja se tzv. nekomplementarna tolerantnost, gde dolazi do pogrešnog umnožavanja fragmenata DNK koji nisu komplementarni selektivnim nukleotidima i uopšte gubitka selektivnosti prajmera (Sl. 4).

Qi et al. (1998) su utvrdili kod ječma ekstremno neujednačenu distribuciju AFLP markera i njihovu veću koncentraciju oko centromere nego u krakovima hromozoma. U centromernom regionu na genetičkoj distanci od 155 cM nalazi se 289 AFLP markera, što odgovara 0,5 cM po markeru. Na udaljenijim delovima hromozoma od centromere, na distanci od 906 cM, otkriveno je 277 AFLP markera, odnosno na svaka 3,3 cM jedan marker. Neki radovi ukazuju da se AFLP markeri nalaze izvan regiona na kojima se nalaze RFLP markeri (Becker et al., 1995; Waugh et al., 1997).

Primena AFLP molekularnih markera

AFLP markeri imaju praktičnu primenu u određivanju genetičkog fingerprinta prokariota i eukariota, pozicionom kloniranje gena, mapiranju genoma, oceni genetičke divergentnosti, analizi genetičkih kolekcija, analizi genetičke distance i selekciji uz pomoć markera.

Vos et al. (1995) su prvenstveno koristili AFLP molekularne markere za mapiranje genoma, tj. konstrukciju detaljnih genetičkih mapa genoma ili delova genoma. Krajem devedesetih godina prošlog veka ova tehnika molekularnih markera vrlo je intenzivno korišćena u određivanju genotipa različitih vrsta. Bradshaw et al. (1998) kod krompira, Zhu et al. (1998) kod pirinča i Xu et al. (1999) i Vuylsteke et al. (1999) kod kukuruza utvrdili su da je upotreba AFLP tehnike najefikasniji način stvaranja velikog broja markera koji se nalaze u blizini poželjnog gena. Mapiranjem paradajza sa AFLP tehnikom otkriveno je dva

puta više molekularnih markera nego sa RFLP kod iste populacije (van Eck et al., 1995). AFLP markeri su uglavnom raspoređeni u regionu RFLP markera, te je ukupna mapa paradajza povećana samo za 5%. Na osnovu tih rezultata van Eck et al. (1995) zaključuju da AFLP mogu zameniti ostale sisteme molekularnih markera, pre svega RFLP molekularne markere. U sličnom proučavanju kod ječma, Becker et al. (1995) su pozicionirali 118 AFLP markera upotrebom 16 prajmerskih kombinacija i povećali originalnu RFLP mapu za 58%. Ovi rezultati pokazuju da su AFLP markeri efikasni za konstrukciju detaljnih genomskih mapa i u nekim slučajevima značajno povećanje dužine postojećih linkage mapa.

Na osnovu genetičkih mapa za mnoge biljne vrste, utvrđeno je da se većina AFLP restrikcionihi fragmenata nalazi na specifičnim mestima u genomu. Konstrukcijom linkage mapa AFLP lokusa, ili zajedničkih AFLP/RFLP linkage mapa, urađeno je mapiranje sa AFLP molekularnim markerima sirka (Boivin et al., 1999; Menz et al., 2002), pšenice (Lotti et al., 2000; Chalmers et al., 2001), soje (Schupp et al., 1997), ječma (Becker et al., 1995; Qi et al., 1998), suncokreta (Langar et al., 2003), kukuruza (Chen et al., 2004), krompira (van der Voort et al., 1997) i mnogih drugih ratarskih i povrtarskih biljnih vrste, voćaka i drveća.

AFLP markeri su efikasni za određivanje genetičke divergentnosti između sorti pšenice (Barret and Kidwell, 1998; Soleimani et al., 2002), inbred linija kukuruza (Marsan et al., 1998; Vuylsteke et al., 2000), populacija divljeg ječma (Turpeinen et al., 2003), kao i genetičkih odnosa sorti i njihovih srodnika kod roda *Solanum* (Mace et al., 1999), *Lactuca* ssp. (Hill et al., 1996), gajene papaje (van Droogenbroeck et al., 2002), *Setaria italica* (Le Thierry d'Ennequin et al., 2000) i drugih vrsta.

Waugh et al. (1997) su na osnovu veličine AFLP markera odredili homologiju između populacija ječma, a Groh et al. (2001) izvršili komparativno mapiranje dve heksaploidne populacije ovsa. U populacionoj genetici AFLP tehnika koriste se za proučavanje divergentnosti i genetičkog variranja (Van et al., 1999).

Indirektna selekcija preko molekularnih markera može predstavljati prednost u oplemenjivanju, posebno kod osobina kod kojih

su fenotipski testovi nepouzdati i skupi. Pre primene indirektna selekcije mora se razjasniti genetička osnova osobina koja je predmet oplemenjivanja i moraju se identifikovati markeri koji su blisko vezani sa genom/genima za tu osobinu. Posebno je važno odrediti lokuse kvantitativnih osobina. AFLP markeri su efikasni u mapiranju QTL agronomskih osobina (Hori et al., 2003), kao i QTL pod čijom se kontrolom nalazi otpornost prema određenim bolestima (Qi et al., 2000; Dahleen et al., 2003; Singh et al., 2003). Kada su identifikovani vezani markeri, oni mogu poslužiti za skrining velikog broja biljaka. Pogodan vezani marker mora omogućiti predviđanje fenotipa kod različite germplazme.

Heun et al. (1997) su na osnovu filogenetske analize frekvencije alela u AFLP lokusima zaključili da je *Triticum monococcum* subsp. *boeoticum* najverovatniji predek gajenih pir jednozrnac sorti pšenice. Slična istraživanja o poreklu ječma uradili su Badr et al. (2000), a kod pasulja Beebe et al. (2001). Proučavanjem filogenetskih odnosa između *Oryza* vrsta (Aggarwal et al., 1999) i taksonomije roda *Solanum* (Kardolus et al., 1998) potvrđeno je da se AFLP molekularni markeri efikasna i pouzdana tehnika za evoluciona proučavanja.

Na osnovu efikasnosti i pouzdanosti u diferencijaciji genoma, ova metoda se može koristiti za testiranja genetičke distance (Lefebvre et al., 2001) i uniformnosti i stabilnosti genotipova prilikom registracije sorti (Law et al., 1998). Analiza fingerprinta DNK dobijenog AFLP molekularnim markerima daje pozdanu informaciju o divergentnosti genetičkih kolekcija i banki gena (Hongtrakul et al., 1997), mada van Treuren et al. (2004) predlažu modifikaciju ove metode, kako bi bila jeftinija i omogućila određivanje fingerprinata desetina hiljada genotipova.

AFLP u odnosu na druge markere

AFLP sistem molekularnih markera ima prednosti u odnosu na druge tehnike određivanja fingerprinta DNK, uključujući polimorfizam dužine restrikcionihi fragmenata (RFLP) i random amplifikiranu DNK (RAPD) (Bleas et al., 1998). AFLP markeri se posebno porede sa ove dve tehnike jer sa njima imaju zajedničke postupke u određivanju alela; restrikcione enzime sa RFLP a PCR amplifikaciju sa RAPD tehnikom. Osnovna razlika

između AFLP i tradicionalne RFLP tehnike je ta što se u AFLP analizi koristi tehnika PCR amplifikacije za otkrivanje polimorfizma. Međutim, i kod modifikovane RFLP tehnike, koja se označava kao PCR-RFLP, koristi se PCR amplifikacija nakon digestije sa restrikcionim enzimima (Williams et al., 1991). Kod AFLP tehnike vizuelizacija fragmenata DNK vrši se na denaturisanom poliakril amidnom gelu, gde se markeri ponašaju dominantno, dok se vizuelizacija RFLP fragmenata vrši na agaroznom ili poliakril amidnom gelu nakon hibridizacije, gde se fragmenti ponašaju ko-dominantno. Kod RFLP markera samo restrikciona mesta predstavljaju izvor novog polimorfizma, dok kod AFLP pored restrikcionih mesta selektivni nukleotidi uslovljavaju polimorfizam. AFLP ima veću mogućnost otkrivanja tačkastih mutacija nego RFLP, dok se insercije i delecije otkrivaju sa istom frekvencijom (Becker et al., 1995). U jednom eksperimentu sa RFLP može se otkriti hibridizacijom nekoliko lokusa, a kod AFLP i do 100-200 (Meksem et al., 1995). AFLP sistem molekularnih markera je pogodniji jer ne zahteva sekvencu matične DNK i njeno predhodno poznavanje.

AFLP molekularni markeri, kao i RAPD, koriste PCR reakciju, ali se razlikuju u prajmerima koje koriste tokom amplifikacije. Kod AFLP prajmeri su specifični adapteru i restrikcionom mestu, a kod RAPD izbor prajmera; dužine i nukleotidnog sastava, je slobodan. Kod proizvoljnih RAPD prajmera nije potrebno poznavanje komplementarne sekvence matične DNK, te se vrši random umnožavanje segmenata DNK. Da bi se omogućilo vezivanje RAPD prajmera na više lokusa genomske DNK proces vezivanja prajmera za matičnu DNK tokom PCR reakcije (annealing) odvija se na nižoj temperaturi (Persing et al., 1993). U suštini, RAPD je jednostavnija i praktičnija tehnika molekularnih markera u odnosu na AFLP (Becker et al., 1995). Međutim, u odnosu na AFLP, RAPD tehnika je osjetljivija na uslove reakcije, koncentraciju i čistoću matične DNK i izbor temperature tokom PCR reakcije, što ograničava njenu primenu (Bleas et al., 1998). Umnožavanje AFLP alela tokom PCR reakcije efikasnije je u odnosu na RAPD (Folkertsma et al., 1996).

Prednosti AFLP markera:

Osnovna prednost AFLP tehnike je visok nivo polimorfizma koji obezbeđuju ovi

markeri. Praktično, može se dobiti veliki broj markera kombinovanjem restrikcionih enzima i vrste i broja selektivnih nukleotida. Na osnovu ovih markera moguće je razlikovati individue u populaciji, zbog čega su markeri pogodni za dokazivanje očinstva (Krauss, 1999) i registraciju sorti (Law et al., 1998). Nakajima et al. (1998) su utvrdili da AFLP markeri daju četiri puta više informacija po reakciji nego RAPD markeri. Kod proučavanja divergentnosti soje (*Glycine max* i *G. soja*) Maughan et al. (1996) su našli da AFLP markeri otkrivaju više polimorfnihih lokusa po prajmeru nego RFLP, SSR ili RAPD markeri. Mala količina (0,05-0,5 µg) genomske DNK neophodne za PCR reakciju i otkrivanje polimorfizama takođe predstavlja prednost u odnosu na ostale tehnike molekularnih markera.

Suprotno od RFLP i SSR markera, AFLP markeri ne zahtevaju poznavanje sekvence DNK i omogućavaju brzu i efikasnu primenu PCR tehnike, što ih čini pogodnim za proučavanje velikih populacija (Rafalski et al., 1996; Krauss and Peakall, 1998). Ova metoda se može primenjivati na suvom materijalu (Russell et al., 1999), što omogućava analizu DNK *ex situ* porekla (Harris and Robinson, 1994).

AFLP markeri omogućavaju istovremenu analizu, tokom jednog eksperimenta, različitih genetičkih lokusa, što predstavlja osnovnu prednost ovih markera (Rafalski et al., 1996). Pošto su AFLP markeri raspoređeni po genomu oni imaju visok multipli odnos (multiplex ratio), odnosno pretpostavlja se da je svaka traka vodi poreklo iz različitog dela genoma. Suprotno tome, SSR markeri imaju veliki broj alela po lokusu i njihov multipli odnos je 1 (Harris, 1999). Visok multipli odnos se smatra poželjnim, pošto on ukazuje na skrining celog genoma, a ne jednog njegovog segmenta. AFLP markeri su reprodukcibilni, što omogućava poređenje rezultata unutar i između laboratorija.

Nedostaci AFLP markera:

AFLP je relativno skupa tehnika molekularnih markera. Međutim, visoka cena AFLP molekularnih markera kompenzirana je kvalitetom dobijenih informacija, te će se mnogi istraživači pre odlučiti za skuplje AFLP, nego jeftinije RAPD molekularne markere. Cenu AFLP markera povećava upotreba specifičnih proba (biotinylated) u preselekcijom umnožavanju (Vos et al., 1995), kao i

vrednost prajmera, adaptera i sistema vizualizacije- ³³P ili fluorescentni markeri (Huang and Sun, 1999).

Izbor najpogodnijih restrikcioni enzima i prajmera može predstavljati teškoću i uticati na nivo i kvalitet otkrivenog polimorfizma. Npr., Ridout and Donini (1999) su kod ječma dobili veći polimorfizam upotrebom restrikcioni enzima *Pst*I/*Mse*I nego enzima *Eco*RI/*Mse*I. Testiranjem prajmera različite dužine u analizi sorti hmelja (*Humulus lupulus* L.) Hartl and Seefelder (1998) su kod kombinacije [adapter]+2 prajmera dobili previše traka za uspešno registrovanje polimorfizma na poliakril amidnom gelu, kod kombinacije [adapter]+4 prajmera mali broj traka, dok je [adapter]+3 prajmera dao veliki broj definisanih traka. Od 60 analiziranih prajmerskih kombinacija samo je osam dalo zadovoljavajući fingerprint (Hartl and Seefelder, 1998). Izbor broja prajmera zavisi od taksonomskog nivoa testiranih genoma. Generalno, kod proučavanja na nivou vrste [adapter]+2 prajmera daje previše traka, [adapter]+4 prajmera nedovoljno polimorfizma, a [adapter]+3 prajmera daje ponekad fingerprint koji je teško analizirati (Lerceteau and Szmidt, 1999). Ako ne postoje preliminarni rezultati prajmerskih kombinacija kod skrininga nekog genoma, slučajni izbor kombinacija prajmera može dati nezadovoljavajuće rezultate.

Iako se AFLP markeri definišu kao reproducibilni (Jones et al., 1997), nekada se kod ponovljenih ekstrakcija i PCR umnožavanja ne dobijaju inicijalni polimorfni bendovi. Krauss and Peakall (1998) smatraju da su različiti

rezultati kod ponovljenih analiza posledica parcijalne digestije genomske DNK, lošeg umnožavanja ovih fragmenata tokom PCR reakcije ili DNK kontaminacije. Donini et al. (1997) su utvrdili da ontogeneza tkiva može uticati na AFLP fingerprint, zbog metilacije restrikcioni mesta koja je specifična za pojedine organe.

AFLP su dominantni markeri, gde se polimorfizam registruje kao prisutne-odsutne trake. Dominantni markeri nisu efikasni kao ko-dominantni (Lewis and Snow, 1992) i u odnosu na ko-dominantne zahtevaju analizu 2-10 puta većeg broja individua po jednom lokusu (Lynch and Milligan, 1994). Krauss and Peakall (1998) navode da se ovaj nedostatak AFLP molekularnih markera može ublažiti njihovim visokim polimorfizmom. Pojava ko-dominantnih markera u AFLP tehnici posledica je prisustva SSR markera u umnoženim AFLP fragmentima (Maughan et al., 1996).

Rieseberg (1996), Kardolus et al. (1998) i Mace et al. (1999) navode da je homologija možda najveći problem AFLP analize. Iako *a priori* ne postoji razlog za prihvatanje, često se pretpostavlja da su komigrirajuće trake homologne. Pored toga, u traci određene veličine mogu biti fragmenti iz različitih regiona genoma, gde ne postoji način procene homologije nedostajućih traka (Rieseberg, 1996).

Detaljnije informacije o problematici očitavanja i tumačenje traka na gelu, kao i različitim metodama analize podataka, mogu se naći u brojnim radovima (Sharma et al., 1996; Travis et al., 1996; Russel et al., 1999).

LITERATURA

- AGGARWAL, R.K., BRAR, D.S., NANDI, S., HUANG, N., KHUSH, G.S. (1999): Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1320-1328.
- BACHEM, C.W.B., VAN DER HOEVEN, R.S., DE BRUJIN, S.M., VREUGDENHIL, D., ZABEAU, M., VISSER R.G.F. (1996): Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9: 745-753.
- BADR, A., MÜLLER, K., SCHÄFER-PREGL, R., EL RABEY, H., EFFGEN, S., IBRAHIM, H.H., POZZI, C., ROHDE, W., SALAMINI, F. (2000): On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 17: 499-510.
- BARRET, B.A., KIDWELL, K.K. (1998): AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from Pacific Northwest. *Crop Science* 38: 1261-1271.
- BEEBE, S., RENGIFO, J., GAIT N,E., DUQUE, M.C., TOHME, J. (2001): Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Science* 41: 854-862.
- BECKER, J., VOS, P., KUIPER, M., SALAMINI, F., HEUN, M. (1995): Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics* 249: 65-73.

- BLEARS, M.J., S.A. DE GRANDIS, H. LEE and J.T. TREVORS. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its application. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 21: 99-114.
- BOIVIN, K., DEU, M., RAMI, J.F., TROUCHE, G., HAMON, P. (1999): Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*: 98: 320-328.
- BRADSHAW, J.E., HACKETT, C.A., MEYER, R.C., MILBOURNE, D., MCNICHOL, J.W., PHILIPS, M.S., WAUGH, R. (1998): Identification of AFLP and SSR marker associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 202-210.
- BRIARD, M., LE CLERC, V., GRZEBELUS, D., SENALIK, D., SIMON, P.W. (2000): Modified Protocols for Rapid Carrot Genomic DNA Extraction and AFLP™ Analysis using Silver Stain or Radioisotopes. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 235-241.
- CHALHOUB, B.A., THIBAUT, S., LAUCOU, V., HOEFFE, H., COUSIN, R. (1997): Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques* 22: 216-218.
- CHALMERS, K.J., CAMPBELL, A.W., KRETSCHMER, J., KARAKOUSIS, A., HENSCHKE, P.H., PIERENS, S., HARKER, N., PALLOTTA, M., CORNISH, G.B., SHARIFLOU, M.R., RAMPLING, L.R., MCCLAUCHLAN, A., DAGGARD G., SHARP, P.J., HOLTON, T.A., SUTHERLAND M.W., APPELS, R., LANGRIDGE, P. (2001): Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1089-1119.
- CHEN, C.X., WANG, Z.L., YANG, D.E., YE, C.J., ZHAO, Y.B., JIN, D.M., WENG, M.L., WANG, B. (2004): Molecular tagging and genetic mapping of the disease resistance gene *RppQto* southern corn rust. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 945 -950.
- CHO, Y.G., BLAIR, M.W., PANAUD, O., MCCOUCH, S.R. (1996): Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome* 39: 373-378.
- DAHLEEN, L.S., AGRAMA, H.A., HORSLEY, R.D., STEFFENSON, B.J., SCHWARZ, P.B., MESFIN, A., FRANCKOWIAK, J.D. (2003): Identification of QTLs associated with Fusarium head blight resistance in Zhedar barely. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 95-104.
- DONINI, P., ELIAS, M.L., BOUGOURD, S.M., KOEBNER, R.M.D. (1997): AFLP fingerprinting reveals pattern differences template DNA extracted from different plant organs. *Genome* 40: 521-526.
- FOLKERTSMA, R.T., VAN DER VOORT, J. N. A. M. R., DE GROOT, K.E., VAN ZANDVOORT, P.M., SCHOTS, A., GOMMERS, F.J., HELDER, J., BAKKER, J. (1996): Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 47-54.
- GROH, S., ZACHARIAS, A., KIANIAN, S.F., PENNER, G.A., CHONG, J., RINES, H.W., PHILLIPS, R.L. (2001): Comparative AFLP mapping in two hexaploid oat populations. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 876-884.
- HAN, T.H., VAN ECK, H.J., DE JEN M. J., JACOBSEN, E. (1999): Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* ssp. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 461-471.
- HARRIS, S.A. (1999): Molecular approaches to assessing plant diversity. *In*: E.E. Benson (ed.). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor and Francis, London, pp. 11-24.
- HARRIS, S.A., ROBINSON, J. (1994): Preservation of Tropical Plant Material for Molecular Analysis. *In*: Adams (ed.) *Conservation of Plant Genes. II. Monographs. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. No. 48*. St. Louis, Missouri Botanical Garden, pp. 83-92.
- HARTL, L., SEEFELDER, S. (1998): Diversity of selected crop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 112-116.
- HEUN, M., SCH FERPREGL, R., KLAWAN, D., CASTAGNA, R., ACCERBI, M., BORGHI, B., SALAMINI, F. (1997): Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278: 1312-1214.
- HILL, M., WITSENBOER, H., ZABEAU, M., VOS, P., KESSELI, R., MICHELMORE, R. (1996): PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1202-1210.
- HONGTRAKUL, V., HUESTIS, G.M., KNAPP, S.J. (1997): Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity

- among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 400-407.
- HORI, K., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, A., SATO, K., TAKEDA, K., KAWASAKI, S. (2003): Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 806-813.
- HUANG, J., SUN, M. (1999): A modified AFLP with fluorescence-labelled primers and automated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants. *Biotechnology Techniques* 13: 277-278.
- 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., BRETTSCHEIDER, R., BETTINI, P., BUIATTI, M., MAESTRI, E., MALCEVSKI, A., MARMIROLI, 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.
- KARDOLUS, J.P., VAN ECK, H.J., VAN DEN BERG, R.G. (1998): The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 210: 97-103.
- KRAUSS, S.L. (1999): Complete exclusion of nonsires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 217-226.
- KRAUSS, S.L., PEAKALL, R. (1998): An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* 46: 533-546.
- LANGAR, K., LORIEUX, M., DESMARAIS, E., GRIVEAU, Y., GENTZBITTEL, L., BERVILL, A. (2003): Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1068-1074.
- LAW, J.R., DONINI, P., KOEBNER, R.M.D., JONES, C.R., COOKE, R.J. (1998): DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102: 335-342.
- LE THIERRY D'ENNEQUIN, M., PANAUD, O., TOUPANCA, B., SARR, A. (2000): Assessment of genetic relationships between *Setaria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1061-1066.
- LEFEBVRE, V., GOFFINET, B., CHAUVET, J.C., CAROMEL B., SIGNORET P., BRAND, R., PALLOIX, A. (2001): Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 741-750.
- LERCETEAU, E., SZMIDT, A.E. (1999): Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity of *Pinus sylvestris* L. *Heredity* 82: 252-260.
- LEWIS, P.O., SNOW, A.A. (1992): Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. *Molecular Ecology* 1: 155-160.
- LOTTI, C., SALVI, S., PASQUALONE, A., TUBEROSA, R., BLANCO, A. (2000): Integration of AFLP markers into an RFLP-based map of durum wheat. *Plant Breeding* 119: 393-401.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- MARSAN, P.A., CASTIGLIONI, P., FUSARI, F., KUIPER, M., MOTTO, M. (1998): Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 219-227.
- MACE, E.S., LESTER, R.N., GEBHARDT, C.G. (1999): AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (*Solanaceae*). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 626-633.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI MAROOF, M.A., BUSS, G.R. (1996): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 392-401.
- 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. *Molecular and General Genetics* 249: 74-81.
- MENZ, M.A., KLEIN, R.R., MULLET, J.E., OBERT, J.A., UNRUH, N.C., KLEIN, P.E. (2002): A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP®, RFLP and SSR markers. *Plant Molecular Biology* 48: 483-499, 2002.
- NAKAJIMA, Y., OEDA, K., YAMAMOTO, T. (1998): Characterisation of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus varieties* by RAPD and AFLP. *Plant Cell Reports* 17: 848-853.

- PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. (1993): Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Application. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- QI, X., STAM, P., LINDHOUT, P. (1998): Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 376-384.
- QI, X., FUFU, F., SIJTSMA, D., NIKS, R.E., LINDHOUT, P., STAM, P. (2000): The evidence for abundance of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* on the barley genome. *Molecular Breeding* 6: 1-9.
- RAFALSKI, J.A., VOGEL, J.M., MORGANTE, M., POWELL, W., ANDRE, C., TINGEY, S.V. (1996): Generating and using DNA markers in plants. *In*: Birren, B. and E. Lai (eds.) *Non-Mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide*. Academic Press, London, pp. 75-134.
- RIDOUT, C.J., DONINI, P. (1999): Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science* 4: 76-79.
- RIESEBERG, L.H. (1996): Homology among RAPD fragments in Interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99-103.
- RUSSELL, J.R., WEBER, J.C., BOOTH, A., POWELL, W., SOTELO-MONTES, C., DAWSON, I.K. (1999): Genetic variation of *Calyco-phyllum spureanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology* 8: 199-204.
- SCHUPP, K. P., TRAVIS, J.M., CLAYTON, S.E., ZHU, K., SHI, T., FERREIRA, L., WEBB, A., DAVID, M. (1997): A High-Density Soybean Genetic Map Based on AFLP Markers. *Crop Science* 37: 537-544.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 751-758.
- SINGH, S., GUEDIRA, G.B., GREWAL, T., DHALIWAL, H., NELSON, J., SINGH, H., GILL, B., (2003): Mapping of a resistance gene effective against Karnal bunt pathogen of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 287-292.
- SOLEIMANI, V.D., BAUM, B.R., JOHNSON, D.A. (2002): AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.]. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 350-357.
- TRAVIS, S.E., MASCHINSKI, J., KEIM P. (1996): An analysis of genetic variation in *Astragalus cremonophylax* var. *cremonophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology* 5: 735-745.
- TURPEINEN, T., VANHALA, T., NEVO, E., NISIL, E. (2003): AFLP genetic polymorphism in wild barley (*Hordeum spontaneum*) populations in Israel. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1333-1339.
- VAN TREUREN, R., MAGDA, A., HOEKSTRA, R., VAN HINTUM, TH.J.L., (2004): Genetic and economic aspects of marker-assisted reduction of redundancy from a wild potato germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 277-290.
- VAN DER VOORT, J.N.A.M.R., VAN ZANDVOORT, P., VAN ECK, H.J., FOLKERTSMA, R.T., HUTTEN, R.C.B., DRAAISTRA, J., GOMMERS, F.J., JACOBSEN, E., HELDER, J., BAKKER, J., (1997): Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Molecular Genetics and Genomics* 255: 438-448.
- VAN DROOGENBROECK, B., BREYNE, P., GOETGHEBEUR, P., ROMEIJN-PEETERS, E., KYNDT, T., GHEYSEN, G. (2002): AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 289-297.
- VAN ECK, H.J., VAN DER VOORT, J.R., DRAAISTRA, J., VAN ZANDVOORT, P., VAN ENCKEVORT, E., SEGERS, B., PELEMAN, J., JACOBSEN, E., HELDER, J., BAKKER, J. (1995): The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1: 397-410.
- VAN, G., ROMERO-SEVERSON, J., WALTON, M., CHADEE, D.D., SEVERSON, D.W. (1999): Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8: 951-963
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJAU, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAN, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- VUYLSTEKE, M., MANK, R., ANTONISE, R., BASTIAANS, E., SENIOR, M.L., STUBER, C.W., MELCHINGER, A.E., LÜBBERSTEDT,

- T., XIA, X.C., STAM, P., ZABEAU, M., KUIPER, M. (1999): Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 921-935.
- VUYLSTEKE, M., MANK, R., BRUGMANS, B., STAM, P., KUIPER, M. (2000): Further characterization of AFLP data as a tool in genetic diversity assessments among maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Molecular Breeding* 6: 265-276.
- XU, M.L., MELCHINGER, A.E., XIA, X.C., LÜBBERSTEDT, T., (1999): High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. *Molecular and General Genetics* 261: 574-581.
- WAUGH, R., BONAR, N., BAIRD, E., THOMAS, B., GRANER, A., HAYES, P., POWELL, W. (1997): Homology of AFLP products in three mapping population of barley. *Molecular Genetics & Genomics* 255: 311-321.
- WILLIAMS, M.N.V., PANDE, N., NAIR, S., MOHAN, M., BENNETT, J. (1991): Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theor Appl Genet* 82: 489-498.
- ZABEAU, M., VOS, P., (1993): Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application Number: 9240269.7, Publication Number: 0 534 858 A1.
- ZHU, J., GALE, M.D., QUARRIE, S., JACKSON, M.T., BRYAN, G.J. (1998): AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 602-611.

MOLECULAR MARKERS. AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

PRŽULJ N., PEROVIĆ D.

SUMMARY

Amplified Fragment Length Polymorphism molecular markers (AFLPs) has been developed combining procedures of RFLPs and RAPDs molecular markers, i.e., the first step is restriction digestion of the genomic DNA that is followed by selective amplification of the restricted fragments. The advantage of the AFLP technique is that it allows rapid generation of a large number of reproducible markers. The reproducibility of AFLPs markers is assured by the use of restriction site-specific adapters and adapter-specific primers for PCR reaction. Only fragments containing the restriction site sequence plus the additional nucleotides will be amplified and the more selected nucleotides added on the primer sequence the fewer the number of fragments amplified by PCR. The amplified products are normally separated on a sequencing gel and visualized after exposure to X-ray film or by using fluorescent labelled primers. AFLPs have proven to be extremely proficient in revealing diversity at below the species level. A disadvantage of AFLP technique is that AFLPs are essentially a dominant marker system and not able to identify heterozygotes.

Key words: AFLP, molecular markers, restriction enzymes, selective amplification, specific adapters, specific primers

Aknowledgements

The principal author is grateful to the Research Council of Norway for the fellowship for the four-months training course (January-April 2004) in molecular markers at the Agricultural University of Norway, As. The fellowship is part of Fellowship Programme 2003/04 for Cooperation within Higher Education and Research between Norway and

South Eastern Europe. Special thanks are due to NORAGRIC, Centre for International Environment and Development Studies, Department of Plant and Environmental Sciences, NLH, Professor Asmund Bjornstad for providing the principal author with the opportunity to realize the training course and Dr. Helge Skines for providing material for training and genotyping.