

MOLEKULARNI MARKERI. SLUČAJNO UMNOŽENA POLIMORFNA DNK

PRŽULJ N.¹, PEROVIĆ D.²

IZVOD: Segmenti genomske DNK čije se umnožavanje odvija pod kontrolom jednog prajmera, veličine 8-10 proizvoljno odabranih nukleotida, predstavljaju molekularne markere koji se nazivaju slučajno umnožena polimorfna DNK (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD). Tokom PCR reakcije dolazi do umnožavanja sekvenci DNK ako su prajmeri na rastojanju 0,2-2,0 kb, vezani na različitim lancima dvostrukog heliksa i okrenuti svojim 3' krajevima jedan prema drugom. Kod genoma prosečne veličine, na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu, formira se 5-10 traka. RAPD aleli su dominantni markeri, gde se polimorfizam između individua označava prisustvom ili odsustvom specifične trake. RAPD molekularni markeri mogu se koristiti za konstrukciju genetičkih linkage mapa, markiranje gena, identifikaciju sorti, određivanje genetičkog variranja u populacijama i vrstama, proučavanje filogenetskih odnosa i razvoj markera specifičnih za vrstu, genom i bromozom. U odnosu na druge markere, RAPD su jednostavniji, jeftiniji i ne zahtevaju poznavanje genomskih sekvenci, primenu radioaktivnih proba i velike količine DNK. Osnovni nedostaci ovih markera su mala pouzdanost, slaba reproducibilnost i osetljivost na uslove eksperimenta. Na bazi RAPD tehnike razvijeno je više formi molekularnih markera, kao što su SCAR i DAF

Ključne reči: RAPD, SCAR, DAF, polimorfizam RAPD, frekvencija RAPD, primena RAPD, molekularno oplemenjivanje, prednosti RAPD, nedostaci RAPD

UVOD: Krajem 1990. godine, dva istraživačka tima razvila su istovremeno novi sistem molekularnih markera pod dva različita imena; Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) (Welsh and McClelland, 1990) i Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) (Williams et al., 1990). Pošto se radi o identičnim tehnikama većina molekularnih biologa i genetičara prihvatili su jednostavniji naziv- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), ili slučajno umnožena polimorfna DNK. Primena ovih markera zasniva se na korišćenju proizvoljno odabranih prajmera i PCR reakcije. RAPD molekularni markeri omogućavaju određivanje fingerprinta bilo koje genomske DNK, bez ikakvih prethodnih informacija o njoj.

Definicija

RAPD molekularni markeri su segmenti genomske DNK koji se umnožavaju pod uticajem jednog PCR prajmera dužine 8-10 (Williams et al., 1990) ili 18-24 nukleotida (Welsh and McClelland, 1990). Oligonukleotid istog redosleda baza funkcioniše kao prajmer na jednom segmentu DNK, odnosno na oba lanca tog segmenta DNK. Pošto su lanci dvostrukog heliksa antiparalelni, prajmer na jednom lancu može se označiti kao prajmer "napred" (forward), a na komplementarnom lancu kao prajmer "nazad" (reverse). To znači da prajmer pronalazi segmente genomske DNK - molekularne markere, koji imaju reverzan redosled nukleotida u prajmerskoj sekvenci matične DNK. Prajmernih sekvenci u genomske DNK obično ima više i prajmer će

Pregledni rad (Review paper)

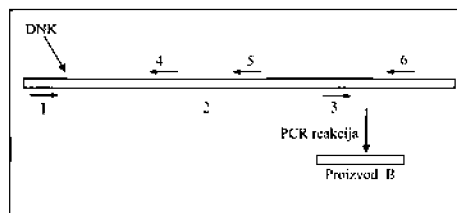
¹ Prof. dr NOVO PRŽULJ, naučni savetnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

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

se vezati za sve njih, ali to ne znači da će se u PCR reakciji umnožiti svi segmenti DNK koji su označeni prajmerima (Edwards, 1998). Drugim rečima, svi segmenti genomske DNK označeni prajmerima ne predstavljaju matičnu DNK za umnožavanje (Sl. 1). Da bi se obavilo umnožavanje nekog RAPD alela označenog prajmerima, prajmeri moraju ispuniti tri osnovna uslova. Prvo, moraju biti vezani na komplementarnim lancima DNK; drugo, okrenuti svojim -3' krajevima jedan prema drugom i treće, biti na određenoj udaljenosti (Jones et al., 1997). Udaljenost prajmera prema Jones et al. (1997) treba biti između 200 i 2000 bp, a prema Ranade et al. (2001) može iznositi i do 5 kb. Na Sl. 1. prajmer(i) 3 i 6 nalaze se na suprotnim lancima DNK, okrenuti su -3' krajem jedan prema drugom, udaljenost prajmera je u granicama koje omogućavaju PCR reakciju i obavlja se umnožavanje segmenta matične DNK i dobija produkt B. Prajmeri 4 i 5 nalaze se sa iste strane DNK heliksa i okrenuti su u istom smeru, dok se prajmeri 4 i 1 nalaze na suviše velikom rastojanju, te u oba slučaja ne dolazi do umnožavanja segmenta DNK između njih.

Sl. 1. Umnožavanje matičnog segmenta genomske DNK. Segment B ispunjava neophodne uslove za umnožavanje: prajmeri se nalaze na komplementarnim lancima DNK, okrenuti su svojim -3' krajem jedan prema drugom i udaljenost između prajmera manja je od granične vrednosti za PCR reakciju

Sl. 1. Amplification of the template DNA. The primers must anneal within a reasonable distance of one another and in a particular orientation, i.e. they must point towards each other. According to the previous terms only product B is produced



Zavisno od veličine genoma, tokom PCR reakcije nastaje veći broj fragmenata različite veličine. Kod genoma prosečne veličine obično je dobro vidljivo 5-10 traka na gelu (Jones et al., 1997; Fahima et al., 1999).

Neke modifikacije RAPD tehnike

U cilju efikasnije upotrebe RAPD markera u oplemenjivanju neophodno je pretvoriti ove markere u formu koja je pogodna za PCR reakciju (Martin et al., 1991; Michelmore et al., 1991). Taj postupak podrazumeva identifikaciju i izolaciju polimorfnih traka RAPD molekularnih markera sa gela i njihovo kloniranje i sekvencioniranje. Na osnovu dobijene sekvence dizajniraju se dva nova prajmera (napred, nazad), koji se međusobno razlikuju po baznom sastavu. Oni sadrže veći broj baza u odnosu na ishodne RAPD prajmere, koji su poslužili za izolaciju RAPD alela. Naik et al. (1998) su za novi prajmer napred sintetisali oligonukleotid od 20 bp, koji sadrži 10 bp prvobitnog prajmera, uz još dodatih susednih 10 bp prema unutrašnjosti RAPD alela. Prajmer nazad se sastojao od potpuno novih 20 bp komplementarnih sa segmentom RAPD alela, prema unutrašnjosti alela od zadnje baze prvobitnog prajmera. Markeri dobijeni na ovakav način nazivaju se SCARs, (Sequence Characterized Amplified Regions). To su u suštini dominantni markeri, ali se mogu posebnim metodama prevesti i u kodominantne (Lahogue et al., 1998). Naik et al. (1998) ove markere označavaju kao STSs (Sequence Tagged Sites), dok Rafalsky and Tingey (1993) smatraju da je za ovu modifikaciju RAPD markera najpogodniji termin STARs (Sequence-Tagged Amplified Region). PCR produkti SCAR prajmera razdvajaju se na agaroznom gelu, obavlja se njihovo Southern prenošenje na nitroceluloznu membranu i vrši hibridizacija, gde se za probu koristi klonirani polimorfni segment DNK, koji je poslužio za sekvencioniranje i sintezu novih prajmera. U odnosu na random prajmere, SCAR prajmeri su duži, što ih čini specifičnijim za određeno mesto. Identifikacija poželjnog fenotipa takođe je lakša zbog stvaranja specifičnih traka, a povećana je i reproduciбилnost u odnosu na RAPD markere. Prevođenjem RAPD markera u SCAR markere identifikuje se poznati lokus na hromozomu.

SCAR markeri se uspešno koriste za otkrivanje polimorfizma kod pšenice, kao što je rezistentnost prema rdama (Schachermayr et al., 1995; 1997; Feuillet et al., 1995; Dedryver et al., 1996), otkrivena gar (Procurier et al., 1997) i pepelnica (Hu et al., 1997), zatim u oplemenjivanju ječma na pokrivenu gar (Adriel et al., 2002), mapiranje gena i konstrukciju linkage mapa (Myburg et

al., 1998; Huang et al., 2000; Chowdhury et al., 2001), fizičko mapiranje (Li et al., 2003), komparativno mapiranje ili homologno proučavanje između srodnih vrsta (Wei and Wang, 1995), identifikaciju polnog determinantnog faktora kod papaje (*Carica papaya* L.) (Urasaki et al., 2002) itd. Fragmenti markera umnoženi sa STS prajmerima imaju veličinu od 282 bp do 1,1 kb (Schachermayr et al., 1997).

Metod umnožavanja random sekvenci genomske DNK upotrebom jednog proizvoljnog prajmera dužine svega 5-8 baza označen je kao DAF (**D**NA **A**mplification **F**ingerprinting) (Caetano-Anolles et al., 1991). Nakon PCR reakcije dobija se karakterističan spektar kratkih umnoženih DNK proizvoda koji se određuju PAGE elektroforezom. Kraći segmenti se koriste kao genetički markeri, a duži segmenti za određivanje DNK fingerprinta (Men et al., 1999). Kao i kod originalnih RAPD prajmera, DAF ne zahteva kloniranje niti sekvencioniranje DNK. Zbog kratkih fragmenata umnožene DNK, DAF je efikasan u određivanju polimorfizma veoma bliskih genotipova, kao što su blisko izogene linije i mutanti (Caetano-Anolles et al., 1991). I ovaj metod ima određena poboljšanja i modifikacije, koji su opisani u radu Caetano-Anolles and Gresshoff (1994).

Poreklo i frekvencija polimorfizma

Polimorfizam RAPD molekularnih markera posledica je promena u genomu koje dovode do nestanka postojećih ili formiranja novih mesta gde se veže prajmer (Williams et al., 1990; Jones et al., 1997). Mutacije u tački i zamena baznih parova u prajmerskoj sekvenci matrične DNK onemogućavaju vezivanje prajmera. Isto tako, mutacije u drugom regionu mogu dovesti do formiranja novog segmenta genomske DNK koji je komplementaran prajmeru. U lokusu prajmera mogu se desiti i strukturne promene DNK tipa delecija i insercija, koje narušavaju prajmeru komplementarnu strukturu matrične DNK. Polimorfizam dužine RAPD alela može nastati i insercijom ili delecijom segmenta DNK između prajmerskih sekvenci, čime se povećava ili smanjuje udaljenost prajmerskih mesta i nastaju kraći ili duži RAPD markeri, ili nestaju zbog velike udaljenosti prajmera.

Frekvencija RAPD markera zavisi od dužine prajmera i sa njom se nalazi u negativnoj

korelaciji (Edwards, 1998). Kod prajmera sa 10 nukleotida postoji verovatnoća vezivanja prajmera u proseku na svakih milion baza (Jones et al., 1997). U proseku svaki prajmer dovodi do umnožavanja nekoliko različitih lokusa u genomu, što RAPD markere čini pogodnim za određivanje polimorfizma između individua (Tingey et al., 1993).

O distribuciji RAPD lokusa u genomu nema posebnih podataka u literaturi, mada su Kojima et al. (1998) utvrdili da su RAPD markeri pogodni za mapiranje regiona genoma koji su siromašni sa RFLP markerima.

Primena RAPD markera

RAPD molekularni markeri se koristi za konstruisanje genetičkih linkage mapa (Levi et al., 2002), markiranje gena (Mehlenbacher, 2004), mapiranje QTL za agronomske osobine (Taran et al., 2003; Koeyer et al., 2004), identifikaciju sorti, vrsta i njihovih hibrida (Scheepers et al., 2000), ocenu genetičkog variranja u populacijama i vrstama (Chalmers et al., 1992; Reiter et al., 1992; Nesbitt et al., 1995), proučavanje filogenetskih odnosa između vrsta, podvrsta i sorti (Landry et al., 1994; Nicolosi et al., 2000), proučavanje genetičkog diverziteta (Baum et al., 1997; Owuor et al., 1997; Nevo et al., 1998) i za bilo koju fingerprinting primenu (Scheepers et al., 2000).

Gupta et al. (1999) su dobili kod pšenice nizak nivo polimorfizma i relativno slabu reproducibilnost RAPD markera. Devos and Gale (1992) smatraju da je to posledica ogromnog genoma pšenice i njegove poliplodne prirode. Pored toga, 80% genomske DNK pšenice sadrži visoko repetitivne elemente, koji ometaju identifikaciju ređe kopirajućih sekvenci (low-copy sequences) (Devos and Gale, 1992). Visoko repetitivne DNK sekvence formiraju sekundarne strukture u matričnoj DNK, koje su uzrok mnogim nepodudarnim mestima sa prajmerima. Odstranjivanjem ovih sekvenci DNK iz genoma dovodi do smanjenja njihove konkurencije i relativnog povećanja frekvencije retkih sekvenci (Eastwood et al., 1994). Gupta et al. (1999) ističu da, bez obzira na delimične uspehe drugih autora, kod pšenice nije moguće konstruisati RAPD mapu i razviti molekularne markere za potrebe oplemenjivanja zbog velikog genoma pšenice, niskog nivoa polimorfizma i odsustva reproducibilnosti. Pored toga, mora se testirati

veliki broj prajmera, što poskupljuje primenu ove metode. Nasuprot tome, RAPD molekularni markeri su kod pšenice primenjivani za procenu genetičke divergentnosti između diploidnih (Vierling and Nguyen, 1992), tetraploidnih (Joshi and Nguyen, 1993) i heksaploidnih vrsta, određivanje gena rezistentnosti (Fahima et al., 1995; Talbert et al., 1996; Sun et al., 1997) i gena otpornosti na štetočine (Dweikat et al., 1994).

Mali broj nukleotida u prajmerima RAPD molekularnih markera čini ove markere specifičnim za određenu vrstu organizama, gde se koriste za proučavanje biodiverziteta i filogenetska istraživanja u okviru vrsta (Wei and Wang, 1995).

RAPD tehnika se vrlo uspešno koristi za stvaranje specifičnih molekularnih markera za vrstu (species-specific markers), genom (genome-specific markers) i hromozom (chromosome-specific markers) (Wang et al., 1995; Chen et al., 1998). Sve tri vrste specifičnih markera identifikovane su kod *Brassica* upotrebom adicijonih linija (Quiros et al., 1991). Hromozom specifični RAPD markeri određeni su kod paradajza i pšenice upotrebom nuli-tetrasomik linija (King et al., 1993; Wang et al., 1998), a genom specifični RAPD markeri kod *Triticeae* (Wei and Wang, 1995). Analizom heksaploidne pšenice, tritikalea i raži sa 29 RAPD prajmera Myburg et al. (1997) odredili su specifične prajmere za genome, sorte i vrste. Cao et al. (1999) su odredili specifične RAPD molekularne markere za *Triticum aestivum* (AABBDD genomi) i *T. timopheevii* (AAGG genomi), ali ne i za *T. turgidum* ssp. *dicoccum* (AABB genomi) i *T. monococcum* (AA genom), koji imaju zajedničke genome (A i B) sa drugim vrstama. Species specifični RAPD markeri otkriveni su kod *Triticum aestivum* i *T. timopheevii* jer imaju po jedan genom, D i G, koji je specifičan samo za njih.

Kod većeg broja uzoraka RAPD markeri se mogu koristiti za utvrđivanje taksonomskog identiteta, kao npr. kod takse *Triticum*, kao i za proučavanje evolucije i analizu kompozicije genoma (Wei and Wang, 1995). Upotrebom RAPD markera Demeke et al. (1992) utvrdili su sistematsku povezanost između diploidnih i amfidiploidnih *Brassica* taksonomskih kategorija. Uz ovakve molekularne analize obično se izvode i klasični citogenetički testovi, gde se utvrđuje parenje

hromozoma u metafazi I, što je dobar pokazatelj stepena sličnosti genoma.

Primena RAPD markera u oplemenjivanju

Markeri su značajni za oplemenjivače kao izvori genetičkih informacija o biljnim vrstama i za indirektnu selekciju, na osobine sa kojima su markeri blisko vezani. Indirektna selekcija nekog markiranog gena, preko selekcije poznatog molekularnog markera, naziva se selekcija uz pomoć markera ili marker asistirana selekcija (Marker-Assisted Selection, MAS) (Weising et al., 1998). Oplemenjivanje uz korišćenje molekularnih markera naziva se molekularno oplemenjivanje (Reynolds et al., 2004). Upotreba morfoloških markera u oplemenjivanju nemoguća je za mnoge gene, jer za njih markeri nisu identifikovani, prisutni su mnogi nepoželjni pleiotropni efekti i ne postoji mogućnost ocene multiplih mutančnih morfoloških osobina u jednoj segregirajućoj populaciji (Paterson et al., 1991). Upotreba enzima u oplemenjivanju kao genetičkih markera takođe je ograničena (Tanksley and Orton, 1983).

Markiranje gena podrazumeva identifikaciju gena u genomskoj DNK ili introdukciju novih gena, koji mogu funkcionisati kao markeri poželjnih gena (Sharp et al., 2001). Da bi sekvenca DNK bila marker nekog gena moraju biti ispunjeni sledeći uslovi (Ranade, 2001):

- 1) sekvenca marker i gen koji markira moraju biti u međusobnom strukturalno-funkcionalnom odnosu ili moraju biti fizički blizu jedan drugom,
- 2) marker mora omogućavati primenu Southern blotinga ili PCR reakcije i
- 3) frekvencija rekombinacija između markera i gena koji obeležava mora biti minimalna, bez obzira na nivo variranja obeleženog gena.

Efikasnost primene molekularnog oplemenjivanja zavisi od broja poznatih molekularnih markera na genomskoj DNK, odnosno saturacije genomske DNK sa markerima (Peleman and van der Voor, 2003). Visoka rezolucija markera preduslov je identifikovanja, mapiranja, markiranja i izolacije ili transfera lokusa kvantitativnih osobina. U krajnjoj liniji molekularni markeri omogućavaju kloniranje gena, koji su se ocenjivali samo fenotipski.

U molekularnom oplemenjivanju poslednjih godina razvijen je metod kombinovanja RFLP molekularnih markera sa RAPD ili nekim drugim markerom na bazi PCR reakcije. Na taj način dobija se detaljnija genetička mapa, koja omogućava uspešniju primenu molekularnih markera u selekciji i akumuliranju poželjnih gena (Castro et al., 2003).

Oplemenjivači nastoje da molekularne markere iskoriste na najefikasniji način u procesu stvaranja novih sorti, zbog čega je mapiranje gena izuzetno važno. Teško je naći rad o molekularnim markerima, koji se odnosi na oplemenjivanje, a da ne obrađuje mapiranje gena. Za primenu molekularnih markera u mapiranju gena neophodno je proizvesti specifične segregirajuće genetičke populacije kod kojih je prisutan polimorfizam. U te populacije spadaju F_1 , F_2 , F_3 i naredne familije, segregirajuće populacije povratnih ukrštanja, dvostruki haploidi (dihaploid, DH), blisko izogene linije (near-isogene lines, NILs) i rekombinantne inbred linije (recombinant inbred lines, RILs).

F_1 generacija, segregirajuće generacije kao i potomstva povratnih ukrštanja uglavnom se koriste kod mapiranja gena rezistentnosti prema bolestima (Gianfranceschi et al., 1996; Grandelement and Thomas, 1996; Dedryver et al., 1996; Procunier et al., 1997; Lu et al., 2000; Cao et al., 2001), ali i gena neutralnosti ovasa prema fotoperiodu (Wight et al., 1994), gena tolerantnosti raži na aluminijum (Gallego et al., 1998) itd.

Mapiranje gena za otpornost prema niskim temperaturama kod jabuke obavljeno je na tkivu korena (Landry et al., 1994), a gena rezistentnosti ječma prema virusima koji se prenose zemljištem (Ordon et al., 1997), gena patuljivosti kod *Brassica napus* L. (Barret et al., 1998) i gena vezanih za muške biljke kod konoplje (Mandolino et al., 1999) upotrebom različitih sorti. Gen otpornosti krompira prema virusu X određen je upotrebom tetraploidnih genotipova krompira (Bendahmane et al., 1997), a gena krompira pod čijom se kontrolom nalazi usvajanje gvožđa korišćenjem mutanata (Ling et al., 1996). Genetička linkage mapa lubenice određena je na osnovu populacije test ukrštanja (Levi et al., 2002). Adicione linije sa stranim hromozomima poslužile su za mapiranje gena za boju semena kod *Brassica campestris* (Chen et al., 1997) i gena otpornosti pšenice prema

virusnoj patuljivosti ječma-BYDW (Nie et al., 1996). Upotrebom linija pšenice sa translociranim stranim hromozomom otkriven je gen rezistentnosti pšenice prema pepelnici (Qi et al., 1996), a upotrebom disomik adicionih linija i amfidiploida otkriven je gen otpornosti prema lisnoj rđi i pepelnici (Peil et al., 1997).

RAPD u odnosu na druge markere

Davos and Gale (1992) i Joshi and Nguyen (1993) kod pšenice (*Triticum aestivum*) a Barua et al. (1993), Chalmers et al. (1993) i Tinker et al. (1993) kod ječma (*Hordeum vulgare* L.) ističu veću efikasnost RAPDs markera u odnosu na RFLP molekularne markere, koji kod samooplodnih vrsta otkrivaju relativno nizak nivo polimorfizma unutar vrste. Međutim, kao što je već navedeno, Gupta et al. (1999) smatraju da su RAPD molekularni markeri nepogodni za samoopodne vrste sa velikim genomima, kao što je pšenica.

Fahima et al. (1999) su ispitivali polimorfizam populacije divlje pšenice (wild emmer), *Triticum aestivum*, gde su polimorfne produkte determinisali elektroforetski. RAPD analiza je otkrila veliki polimorfizam između različitih genotipova, gde je preko 80% registrovanih traka bilo polimorfno. Produkti manji od 300 bp i veći od 3 kb dali su nejasne i nereproducibilne trake, te je većina ocenjenih produkata bila veličine 0,3-2 kb. RAPD prajmeri su umnožili između 5 i 15 traka po genotipu, ali su se mogle ocenjivati samo trake veličine 400-1700 bp.

Slaba rezolucija RAPD markera na agaroznom gelu, gde su prisutne svega 1-3 glavne trake, može biti poboljšana različitim tehnikama koje se izvode tokom postavljanja gela. Detaljniji podaci o tome mogu se naći u radovima He et al. (1992), Dweikat et al. (1994) i Penner and Bezte (1994).

Prednosti RAPD markera

RAPD molekularni markeri znatno su jednostavniji i jeftiniji nego ostali markeri, jer nije potrebno prethodno poznavati sekvencu genomske DNK i ne moraju se koristiti radioaktivne probe. Svi molekularni markeri na bazi PCR reakcije, kao što je i RAPD, potencijalno skraćuju vreme ispitivanja i smanjuju troškove prilikom molekularnog mapiranja.

Tokom PCR reakcije umnožavaju se sekvence manjih lokusa genoma. Proizvodi RAPD reakcije segregiraju prema Mendelovim zakonima, što znači da se uspešno mogu koristiti kao genetički markeri.

RAPD tehnika zahteva relativno malu količinu DNK koja može biti i lošijeg kvaliteta, što omogućava brzu i jeftiniju ekstrakciju.

Može se brzo i jeftino sintetisati neograničen broj različitih prajmera, jer u stvari ne postoji ograničenje u broju prajmera u genomu. RAPD prajmeri su neutralni, jer se ne vrši svesni selekcionni pritisak na njih.

Nedostaci RAPD markera

Osnovni nedostatak RAPD molekularnih markera je njihova slaba pouzdanost i reproducibilnost, kao i osetljivost na uslove eksperimenta (Karp et al., 1996). Pouzdano otkrivanje polimorfizma još uvek je limitirajući faktor veće primene RAPD molekularnih markera. Međutim, problemi polimorfizma i reproducibilnosti mogu se delimično otkloniti povećanjem frekvencije low-copy sekvenci (Eastwood et al., 1994).

Nedostatak ove metode bila je slaba rezolucija traka na agaroznom gelu, jer više fragmenata slične veličine može biti prisutno u istom regionu agaroznog gela. Izdvajanje i prečišćavanje fragmenata iz agaroznog gela je proces koji produžava vreme neophodno za stvaranje svakog STS, što poskupljuje primenu RAPD markera. Antolin et al. (1996) su delimično rešili ovaj problem razdvajanjem fragmenata na akrilamidnom gelu, gde je povećana rezolucija i lakše se izdvajaju trake za PCR umnožavanje.

Devos and Gale (1992) i Gupta et al. (1999) navode da RAPD aleli nisu pogodni za stvaranje genetičkih markera, jer testiranje ovim markerima nije reproducibilno u različitim laboratorijama. Ako hromozomska lokacija sličnih traka nije potvrđena u različitim analizama, uvek ostaje pitanje porekla traka slične veličine; da li su sa istog ili različitih lokusa/hromozoma.

RAPD su dominantni markeri, gde su na gelu prisutne (+) ili odsutne (-) trake nekog alela. Kao kod svih dominantnih markera ne mogu se razlikovati dominantni homozigoti (++) od heterozigota (+-).

LITERATURA

- ADRIEL, G.S., GREWAL, T.S., DEBERDT, P., ROSSNAGEL, B.G., SCOLES, G.J. (2002): Inheritance of resistance to covered smut in barley and development of a tightly linked SCAR marker. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 454-456.
- ANTOLIN, M., BOSIO, C., COTTON, J., SWEENEY, W., STRAND, M., BLACK, W. (1996): Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon bebeter*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with single strand conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics* 143: 1727-1738.
- BARRET, P., DELOURME, R., FOISSET, N., RENARD, M. (1998): Development of a SCAR (sequence characterised amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 828-833.
- BARUA, U.M., CHALMERS, K.J., HACKETT, C.A., THOMAS, W.T.B., POWELL, W., WAGH, R. (1993): Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71: 177-184.
- BAUM, B.R., NEVO, E., DOUGLAS, A., JOHNSON, A., BEILES, A. (1997): Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genet Res Crop Evol* 44: 147-157.
- BENDAHMANE, A., KANYUKA, K., BAULCOMBE, D.C. (1997): High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potatoe. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 153-162.
- CAO, W., SCOLES, G., HUCL, P., CHIBBAR, R.N. (1999): The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 602-607.
- CAO, W., HUGHES, G.R., MA, H., DONG, Z. (2001): Identification of molecular markers for resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 551-554.
- CAETANO-ANOLLES, G., BASAM, J., GRESHOFF, P.M. (1991): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary

- oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9: 553-557.
- CAETANO-ANOLLES, G., GRESSHOFF, P. M. (1994): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary mini-hairpinoligonucleotide primers. *Bio/Technology* 12: 619-623.
- CASTRO, A.J., CHEN, X., COREY, A., FILICHINA, T., HAYES, P.M., MUNDT, C., RICHARDSON, K., SANDOVAL-ISLAS, S., VIVAR, H. (2003): Pyramiding and Validation of Quantitative Trait Loci (QTL) Allels Determining Resistance to Barley Stripe Rust: Effects on Adult Plant Resistance. *Crop Science* 43: 2234-2239.
- CHALMERS, K.J., WAUGH, R., SPRENT, J.I., SIMONS, A.J., POWELL, W. (1992): Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. Maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.
- CHALMERS, K.J., BARUA, U.M., HACKETT, C. A., THOMAS, W.T.B., WAUGH, R., POWELL, W. (1993): Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 314-320.
- CHEN, B.Y., JORGENSEN, R.B., CHENG, B.F., HENCEN, W.K. (1997): Identification and chromosomal assignment of RAPD markers linked with a gene foe seed colour in a *Brassica campestris-alboglabra* additional line. *Hereditas* 126: 133-138.
- CHEN, J.M., XUE, X., CAI, D., JENSEN, K.B., CHATTERTON, N.J. (1998): Development and characterization of Elymus rectisetus species and accession-specific RAPD markers. *In*: A.E. Slinkard (ed.) Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp., Vol. 3, 98-101, Univ. Extension Press, Univ. Of Saskatchewan, Saskatoon.
- CHOWDHURY, M.A., ANDRAHENNADI, C.P., SLINKARD, A.E., VANDENBERG, A. (2001): RAPD and SCAR markers for resistance to acochyta blight in lentil. *Euphytica* 118: 331-337.
- DEDRYVER, F., JUBIER, M.F., THOUVENIN, J., GOYEAU, H. (1996): Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. *Genome* 39: 830-835.
- DEMEKE, T., ADAMS, R.P., CHIBBAR, R.N. (1992): Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 990-994.
- DEVOS, K.M., GALE, M.D. (1992): The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 567-572.
- DWEIKAT, I., OHM, H., MACKENZIE, S., PATTERSON, F., CAMBRON, S., RATCLIFFE, R. (1994): Association of a DNA marker with the Hessian fly resistance gene H9 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 964-968.
- EASTWOOD, R.F., LAGUDAH, E.S., APPLES, R. (1994): A direct search for DNA sequences tightly linked to cereal cyst nematode resistance genes in *Triticum tauschii*. *Genome* 37: 311-319.
- EDWARDS, K.J. (1998): Randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *In*: Karp, A., P.G. Isaac and D.S. Ingman (eds.). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp 171-179.
- FAHIMA, T., GRAMA, A., KOROL, A., TURPEINEN, T., NEVO, E. (1995): Identification of DNA markers linked to novel yellow rust resistance genes introgressed from *Triticum dicoccoides*. *Wheat News Lett* 41: 125.
- FAHIMA, T., SUN, G.L., BEHARAV, A., KRUGMAN, T., BEILES, A., NEVO, E. (1999): RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 434-447.
- FEUILLET, C., MESSMER, M., SCHACHERMAYR, G., KELLER, B. (1995): Genetic and physical characterisation of the *Lr1* leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular and General Genetics* 248: 553-562.
- GALLEGO, F.J., CALLES, B., BENITO, C. (1998): Molecular markers linked to the aluminum tolerance gene *Alt1* in rye (*Secale cereale* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1104-1109.
- GIANFRANCESCHI, L., KOLLER, B., SEGLIAS, N., KELLERHALS, M., GESSLER, C. (1996): Molecular selection in apple for resistance to scabed caused by *Venturia inaequalis*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 199-204.
- GRANDELEMENT, C., THOMAS, G. (1996): Detection and analysis of QTLs based on RAPED markers for polygenic resistance in *Plasmiodophora brassicae* Woron in Bras-

- sica oleracea L. Theoretical and Applied Genetics 93: 86-90.
- GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., SHARMA, P.C., RAMESH, B. (1999): Molecular markers and their application in wheat breeding. Plant Breeding 118: 369-390.
- HE, S., OHM, S., MACKENZIE, S. (1992): Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. Theoretical and Applied Genetics 84: 573-578.
- HU, X.Y., OHM, H.W., DWEICAT, I. (1997): Identification of RAPD markers linked to the gene *Pm1* for resistance to powdery mildew in wheat. Theoretical and Applied Genetics 94: 832-840.
- HUANG, C.C., CUI, Y.Y., WENG, C.R., ZABEL, P., LINDHOUT, P. (2000): Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene *Ol-1* on chromosome 6 of tomato. Theoretical and Applied Genetics 101: 918-924.
- JONES, N., H. OUGHAM AND H. THOMAS. (1997): Markers and mapping: we are all geneticists now. New Phytologist 137: 165-177.
- JOSHI, C.P., NGUYEN, H.T. (1993): RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based on intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Sci 93: 95-103.
- KARP, A., SEBERG, O., BUIATTI, M. (1996): Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Annals of Botany 78: 143-149.
- KING, I.P., PORDIE, K.A., REZANOOR, H.N., KOEBNER, R.M.D., MILLER, T.E., READER, S.M., NICHOLSON, P. (1993): Characterization of *Tbinopyrum besarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic in situ hybridization. Theoretical and Applied Genetics 86: 895-900.
- KOEYER, D.L., TINKER, N.A., WIGHT, C.P., DEYL, J., BURROWS, V.D., O'DONOGHUE, L.S., LYBAERT, A., MOLNAR, S.J., ARMSTRONG, K.C., FEDAK, G., WESENBERG, D.M., ROSSNAGEL, B.G., MC-ELROY, A.R. (2004): A molecular linkage map with associated QTLs from a hulles c covered spring oat population. Theoretical and Applied Genetics (online).
- KOJIMA, T., NAGAOKA, T., NODA, K., OGIHARA, Y. (1998): Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 96: 37-45.
- LAHOUE, F., THIS, P., BOUQUET, A. (1998): Identification of codominant scar markers linked to the seedlessness character in grapevine. Theoretical and Applied Genetics 97: 950-959.
- LANDRY, B.S., LI, L.Q., CHEUNG, W.Y., GRANGER, R.L. (1994): Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. Theoretical and Applied Genetics 89: 847-852.
- LEVI, A., THOMAS, C., JOOBEUR, T., ZHANG, X., DAVIS, A. (2002): A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population (*Citrullus var. citroides* x *C. lanatus var. lanatus*) x *Citrullus colocynthis*. Theoretical and Applied Genetics 105: 555-563.
- LI, L., LU, S., O'HALLORAN, D.M., GARVIN, D. F., VREBALOV, J. (2003): High-resolution genetic and physical mapping of the cauliflower high- β -carotene gene *Or (Orange)*. Mol Gen Genomics 270: 132-138.
- LING, H.Q., PICH, A., SCHOLZ, G., GANAL, M.W. (1996): Genetic analysis of two mutants affected in the regulation of iron metabolism. Mol. Gen. Genet. 252: 87-92
- LU, Y.H., MELERO-VARA, J.M., GARCIA-TEJADA, J.A., BLANCHARD, P. (2000): Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broorape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. Theoretical and Applied Genetics 100: 625-632.
- MANDOLINO, G., CARBONI, A., FORAPANI, S., FAETI, V., RANALLI, P. (1999): Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 98: 86-92.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G., TANKSLEY, S.D. (1991): Rapid identification of markers near a *Pseudomonas* resistance gene in tomato using random primers and near-isogenic lines. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 88:2336-2340.
- MEHLENBACHER, S.A., BROWUN, R.N., DAVIS, J.W., CHEN, H., BASSIL, N.V., SMITH, D.C., KUBISIAK T.L. (2004): RAPD markers linked to the eastern filberth blight resistance in *Corylus avellana*. Theoretical and Applied Genetics 108: 651-656.
- MEN, A.E., BORISOV, A.Y., ROZOV, S., USHAKOV, K.V., TSYGANOV, V.E., TIKHONOVICH, I.A., GRESSHOFF, P.M. (1999): Identifica-

- tion of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis-infective *sym31* mutation of pea. Theoretical and Applied Genetics 98: 929-936.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELL, R.V. (1991): Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregant populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9829-9832.
- MYBURG, A.A., BOTHA, A.M., WINGFIELD, B.D., WILDING, W.J.M. (1997): Identification and genetic distance analysis of wheat cultivars using RAPD fingerprinting. Cereal Research Communication 25: 875-882.
- MYBURG, A.A., CAWOOD, M., WINGFIELD, B. D., BOTHA, A.M. (1998): Development of RAPD and SCAR markers linked to the Russian wheat aphid resistance gene *Dn2* in wheat. Theoretical and Applied Genetics 96: 1162-1169.
- NAIK, S., GILL, K.S., PRAKSANO RAO, V.S., GUPTA, V.S., TAMHANKER, S.A., PUJAR, S., GILL, B.S., RANJKAR, P.K. (1998): Identification of STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene Lr28 in wheat. Theoretical and Applied Genetics 97: 535-540.
- NESBITT, K.A., POTTS, B.M., VAILLANCOURT, R. E., WEST, A. K., REID, J. B. (1995): Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Heredity 74: 628-637.
- NEVO, E., BAUM, B., BEILES, A., JOHNSON, D.A. (1998): Ecological correlates of RAPD DNA diversity of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. Genet Res Crop Evol 45: 151-159.
- NICOLOSI, E., DENG, Z.N., GENTILE, A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., TRIBULATO, E. (2000): Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 100: 1155-1166.
- NIE, D.T., JIA, X., HU, S.Q., ZHU, L.H., HU, H., ZHOU, G.H., QIAN, Y.L., ZHUANG, J.J. (1996): Development and characterisation of new barley yellow virus (BYDV9 resistance wheat germplasm. Science in China Series. C. Life Science 39: 337-341.
- ORDON, F., SCHIEMANN, A., FRIEDT, W. (1997): Assessment of genetic relatedness of barley accessions (*Hordeum vulgare* s.l.) resistente to soil-born mosaic-inducing viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) using RAPDs. Theoretical and Applied Genetics 94: 325-330.
- OWUOR, E.D., FAHIMA, T., BEILES, A., KOROL, A., NEVO, E. (1997): Population genetic response to microsite ecological stress in wild barley, *Hordeum spontaneum*. Mol Ecol 6: 1177-1187.
- PATERSON, A.H., TANKSLEY, S.D., SORRELLS, M.E. (1991): DNA markers in plant improvement. Adv. Agron. 46: 39-90.
- PEIL, A., SCHUBERT, V., SCHUMANN, E., WEBER, W.E. (1997): RAPD as molecular markers for the detection of *Aegilops markgraffi* chromatin in addition and euploid introgression lines of hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics 94: 934-940. Theoretical and Applied Genetics 94: 934-940.
- PELEMAN, J.D., VAN DER VOORT, J.R. (2003): Breeding by Design. Trends in Plant Science 8: 330-334.
- PENNER, G.A., BEZTE, L.Z. (1994): Increased detection of polymorphism among randomly amplified wheat DNA fragments using a modified temperature sweep gel electrophoresis (TSGE) technique. Nucleic Acid Research 9: 1780-1781.
- PROCUNIER, J.D., KNOX, R.E., BERNIER, A. M., GRAY, M.A., HOWES, N.K. (1997): DNA markers linked to a T10 loose smut resistance gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome 40: 176-179.
- QI, L., CAO, M., CHEN, P., LI, W., LIU, D. (1996): Identification, mapping and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat. Genome 39: 191-197.
- QUIROS, C.F., HU, J., THIS, P., CHEVRE, A.M., DELSENY, M. (1991): Development and chromosomal localization of genom-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. Theoretical and Applied Genetics 82: 627-632.
- RAFALSKY, J.A., TINGEY S.V. (1993): Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. Trends in Genetics 9: 275-280.
- RANADE, S.A., FAROOQUI, N., BHATTACHARYA, E., VERMA, A. (2001): GNA Tagging with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Molecular Breeding in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences 20: 251-275.

- REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN, K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P.A. (1992): Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477-1481.
- REYNOLDS, M.P., TRETOWAN, R., CROSSA, J., VARGAS, M., SAYRE, K.D. (2004): Erratum to "Physiological factors associated with genotype by environment interaction in wheat". *Field Crop Research* 85: 253-274.
- SCHACHERMAYR, G.M., MESSMER, M.M., FEUILLET, C., WINZELER, H., WINZELER, M., KELLER, B. (1995): Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 30: 982-990.
- SCHACHERMAYR, G.M., FEUILLET, C., KELLER, B. (1997): Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds. *Molecular Breeding* 3: 65-74.
- SCHEEPERS, D., ELOY, M.-C., BRIQUET, M. (2000): Identification of larch species (*Larix decidua*, *Larix kaempferi* and *Larix eurolepis*) and estimation of hybrid fraction in seed lots by RAPD fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 71-74.
- SHARP, P.J., JOHNSTON, S., BROWN, G., MCINTOSH, R.A., PALLOTTA, M., CARTER, M., BARIANA, H.S., KHATKAR, S., LAGUDAH, E.S., SINGH, R.P., KHAIRALLAH, M., POTTER, R., JONES, M.G.K. (2001): Validation of molecular markers for wheat breeding. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1357-1366.
- SUN, G.L., FAHIMA, T., KOROL, A.B., TURPEINEN, T., GRAMA, A., RONIN, Y.I., NEVO, E. (1997): Identification of molecular markers linked to the Yr15 *stripe* rust resistance gene of wheat originated in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 622-628.
- TALBERT, L.E., BRUCKNER, P.L., SMITH, L.Y., SEARS, R., MARTIN, T.J. (1996): Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 463-467.
- TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. (1983): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, parts 1A and 1B*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- TARAN, B., WARKENTIN, T., SOMERS, D.J., MIRANDA D., VANDENBERG A., BLADE, S., WOODS, S., BING, D., XUE, A., DEKOEYER, D., PENNER, G. (2003): Quantitative trait loci for lodging resistance to *mycosphaerella* blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1482-1491.
- TINKER, N.A., FORTIN, M.G., MATHER, D.E. (1993): Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 976-984.
- TINGEY, S.V., RAFALSKI, J.A., WILLIAMS, J.G.K. (1993): Application of RAPD Technology to Plant Breeding. In: Neff, M. (ed.) ASHS Publishers, Minnesota, 1993, pp. 3-8.
- URASAKI, N., TOKUMOTO, M., TARORA, K., BAN, Y., KAYANO, T., TANAKA, H., OKU, H., CHINEN I., TERAUCHI, R. (2002): A male and hermaphrodite species RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 281-285.
- VIERLING, V.A., NGUYEN, H.T. (1992): Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 835-838.
- WANG, R.R.-C., CHEN, J., JOPPA, L.R. (1995): Production and identification of chromosome specific RAPD markers for Langdon durum wheat disomic substitution lines. *Crop Science* 35: 886-888.
- WANG, Y., TULEEN, N.A., HART, G.E. (1998): Construction of a consensus physical map of wheat homeologous group-6 chromosomes and comparison with linkage maps. In: A.E. Slinkard (ed.) *Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp.*, Vol. 3, 162-164, Univ. Extension Press, Univ. Of Saskatchewan, Saskatoon.
- WEI, J.Z., WANG, R.R.C. (1995): Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analysis. *Genome* 38: 1230-1236.
- WEISING, K., WINTER, P., HUTTEL, B., KAHL, G. (1998): Microsatellite markers for molecular breeding. *J. Crop Production* 1:113-143.
- WELSH, J., MCCLELLAND. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18: 7213-7218.
- WIGHT, C.P., PENNER, G.A., O'DONOUGHUE, L.S., BURROWS, V.D., MOLNAR, S.J., FEDAK, G. (1994): The identification of RAPD

markers for daylength insensitivity in oat. Genome 37: 910-914.
WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J.,
RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990): DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. 18: 6531-6535.

MOLECULAR MARKERS. RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

PRŽULJ N., PEROVIĆ D.

SUMMARY

Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers are based on the amplification by PCR reaction of random genomic DNA segments determined by single primer consisting of about 10 arbitrary nucleotides. The primer amplifies DNA sequences in length of 0,2-2 kb that lies between two opposite-oriented copies flanked to each strand of DNA. In average sized genome between 5 and 10 amplification products can be separated by electrophoresis on agarose or polyacrylamide gels. RAPDs are usually dominant markers with polymorphisms between individuals defined as the presence or absence of a specific band. RAPD can be used for the construction of genetic linkage maps, gene tagging, identification of genotypes, assessment of genetic variation in populations and species, study of phylogenetic relationships and development of species-specific, genome-specific and chromosome-specific markers. In relation to the other molecular markers, RAPD markers are simpler, less expensive, can be used with uncharacterized genomes, there is no need for radioactive probes and require small quantities of DNA. The main disadvantages of this marker assays are poor reliability and reproducibility, and their sensitivity to experimental conditions. On the basis of RAPD technique the other molecular markers, e.g. SCAR and DAF, has developed.

Key words: RAPD, SCAR, DAF, polymorphism of RAPD, frequency of RAPD, application of RAPD, marker-assisted selection, advantages of RAPD, disadvantages of RAPD

Acknowledgements

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, s. 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.