

"Zbornik radova", Sveska 41, 2005.

UDK 577.21:575.116.4
Pregledni rad - Review

MOLEKULARNI MARKERI I. POLIMORFIZAM DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTA

Pržulj, N.¹, Perović, D.²

IZVOD

Tehnologija DNK molekularnih markera omogućava razvoj nove strategije i primenu novih metoda u genetici i oplemenjivanju. Molekularni markeri i njima srodne tehnologije predstavljaju osnovu za konstrukciju linkage mapa i određivanje nasleđivanja kvalitativnih i kvantitativnih osobina. Markeri koji se nalaze u blizini poželjnog gena imaju potencijalnu primenu u oplemenjivanju, determinisanju i unošenju gena, mada se time ne smanjuje značaj konvencionalnih metoda oplemenjivanja. Između velikog broja molekularnih markera koji su do sada publikovani, prvo je otkriven polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). RFLP markeri daju realnu sliku polimorfizma i mogu se koristiti za precizno određivanje razlika između genotipova. Na bazi ovih markera prvo je konstruisana genetička mapa kod čoveka, a kasnije kod mnogih biljnih i životinjskih vrsta. U radu je predstavljen pojam, značaj i koncept primene markera, značaj i osobine restrikcionih enzima i primena RFLP markera u mapiranju genoma i selekciji kvalitativnih i kvantitativnih osobina. U radu su takode diskutovani osnovni principi determinisanja RFLP markera i njihove prednosti i nedostaci u odnosu na druge sisteme molekularnih markera.

KLJUČNE REČI: polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata, morfološki markeri, molekularni markeri, restrikcioni enzimi, determinacija RFLP, mapiranje, selekcija uz pomoć markera, major geni, QTL lokusi

Uvod

Genetičko inženjerstvo i biotehnologija predstavljaju moćnu tehniku u određivanju genetičke osnove organizama i stvaranju varijabilnosti, u cilju izbora

-
- 1 Prof. dr Novo Pržulj, naučni savetnik, 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

genotipova sa poželjnim osobinama za čoveka, adaptiranih na određene biotičke i abiotičke faktore. Upotrebom molekularnih tehnika moguće je efikasnije koristiti gene divljih srodnika i egzotične germplazme. Određivanje lokusa kvantitativnih osobina pomoću molekularnih markera omogućava efikasnije oplemenjivanje na ove osobine. U mapiranju genoma prvo su korišćeni morfološki i biohemijski, a nakon toga molekularni markeri.

Šta su genetički markeri ?

Tanksley (1983) i Young (1994) definišu genetičke markere kao tačno određene lokacije na hromozomu, koje služe kao "obeleživači" kod analize genoma. Marker se definiše i kao fizička lokacija segmenta DNK na hromozomu, koja se može identifikovati (gen, restrikciono mesto) i čije se nasleđivanje može pratiti. Markeri mogu predstavljati regione DNK (gene) ili druge segmente DNK sa nepoznatom kodirajućom funkcijom, ali čiji se oblik nasleđivanja može odrediti. Postoje dva tipa markera: morfološki i molekularni markeri.

Morfološki markeri

Nasleđivanje morfoloških markera se prati fenotipski, bez posebnih biohemijskih i molekularnih tehnika. Nevo et al. (1979) u grupu ovih markera svrstavaju i pigmentne markere. Morfološke osobine kontrolisane jednim lokusom mogu se koristiti kao genetički markeri, ako je njihova fenotipska ekspresija stabilna i ponovljiva u različitim sredinama. Kodominantni markeri mogu biti pod uticajem genetičkih faktora (epistaza) i faktora sredine, koji modifikuju njihovu fenotipsku ekspresiju, što ograničava njihovo korišćenje u funkciji genetičkih markera.

U odnosu na veličinu genoma i broj genskih lokusa, broj morfoloških markera je zanemarljiv i ne može poslužiti kao osnova za detaljnije analize polimorfizma. Osim toga, intraalelna interakcija kod morfoloških markera je dominantno-recesivna, i onemogućava fenotipsku diferencijaciju polimorfizma heterozigotnih i homozigotno dominantnih lokusa.

Polimorfizam morfoloških, izoenzimskih i biohemijskih markera u okviru jedne vrste, posebno ako je samooplodna, je nizak (Nevo et al., 1979). Fenotipsko ispoljavanje ovih markera samo u određenoj fazi ili u određenom tkivu ili organu, promene pod uticajem epistaza i pleiotropni efekti predstavljaju osnovne nedostatke ovih markera (Peacock, 1991).

Prve linkage genetičke mape gajenih biljnih vrsta napravljene su skoro pre 80 godina (Emerson et al., 1935; MacArthur, 1934, cit. Tanksley et al., 1989). Geni, odnosno genetički markeri, koji su korišćeni za stvaranje prvih genetičkih mapa su bili uglavnom geni koji kontrolišu morfološke osobine; dominantni geni za visinu, recesivni geni za albinizam, geni koji kontrolišu oblik lista i sl. Sax (1923) (cit. po Tanksley et al., 1989) je prvi upotrebio pigment kao marker kod pasulja za analizu gena koji determinišu veličinu semena. Ideja je bila da se selekcijom na boju koja je pod kontrolom major gena, indirektno vrši selekcija na krupnoću zrna koja je pod kontrolom minor gena, što je bila u osnovi ideja selekcije uz

pomoć markera. Do praktične realizacije te ideje nije došlo zbog jakog maskirajućeg efekta major gena.

Molekularni markeri

Alelni lokusi kod kojih postoji variranje ili polimorfizam sekvenci DNK na proteinskom nivou su biohemijski markeri, a lokusi sa variranjem na nivou DNK, bez fenotipske ekspresije, su DNK markeri (Jones et al., 1997).

Biohemijski markeri su proteini koji nastaju ekspresijom određenih genskih lokusa. Ovi proteini se mogu elektroforetski identifikovati, što ustvari predstavlja indirektnu identifikaciju alela, pod čijom se kontrolom vrši sinteza proteina (Vodenicharova, 1998). Najčešće upotrebljavani proteinski markeri su izoenzimi, koji predstavljaju grupu enzima koji katalizuju istu biohemijsku reakciju, ali imaju različitu strukturu, hemijske i imunološke karakteristike i različito naelektrisanje, zbog čega u gelu zauzimaju različite položaje (McMillin, 1983; Market and Moller, 1995).

Proteinski markeri pokazuju razlike u sekvenci jednog gena i funkcionišu kao kodominantni markeri. Primena proteinskih markera je ograničena zbog njihovog malog broja i modifikacija nakon translacije (Staub et al., 1982). Pored toga, najveći deo DNK ne predstavlja kodirajuće sekvence, ne služi kao matrica za transkripciju iRNK, što znači da se ne može otkriti biohemijskim markerima. Na bazi morfoloških i izoenzimskih markera konstruisane su linkage mape za pirinač, kukuruz, pšenicu, ječam i neke druge gajene vrste (Kinoshita, 1995).

Zavisno od načina otkrivanja polimorfizma, DNK molekularni markeri mogu biti svrstani u dve grupe:

- a) otkrivanje polimorfizma na bazi hibridizacije i
- b) otkrivanje polimorfizma na bazi PCR reakcije (Polymerase Chain Reaction).

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) i polimorfizam lokusi sa promenljivim brojem združenih, tandemskih ponovaka (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) se otkrivaju hibridizacijom proba i fragmenata genomske DNK koji su nastali tretiranjem genomske DNK sa restrikcionim enzimima (Weising et al., 1992; Rogstad, 1996). Probe su obično mali (500-3000 bp) slučajni klonovi genoma, klonovi cDNK (kopirana-copy ili komplementarna-complementary DNK sintetisana na osnovu iRNK toga gena) i sintetizovane probe za mikrosatelite i minisatelite (Staub et al., 1996). RFLP markeri određeni sa jednostrukim kopijama genomske DNK i klonovima cDNK su izuzetno pogodni za komparativno mapiranje genoma (Sherman et al., 1995; Yu et al., 1996). Njihovo jedino ograničenje je nizak polimorfizam kod intraspecies analiza agronomskih osobina. Tako je npr. kod pšenice <10% RFLP markera polimorfno (Kam-Morgan et al., 1989; Cadalen et al., 1997).

Kod otkrivanja polimorfizma na bazi PCR reakcije koriste se prajmeri (Saiki et al., 1985). Prajmeri predstavljaju sintetičke oligonukleotide komplementarne jednostrukim lancima DNK. Da bi se determinisao neki segment DNK, on se mora umnožiti, proizvesti njegova velika količina, koja će stvoriti vidljivu traku na gelu. Za umnožavanje, tj. amplifikaciju dva komplementarna lanca segmenta denaturisane matrične DNK koristi se par oligonukleotidnih prajmera. Prajmeri se vežu za

komplementarne sekvence matričnog lanca genomske DNK na taj način da su svojim 3' krajevima okrenuti jedan prema drugom i oba su inicijatori sinteze novih komplementarnih DNK lanaca u 5'-3' smeru. Kod PCR reakcije, tokom koje se odvija amplifikacija DNK, razlikuju se tri odvojena procesa: denaturisanje matrične DNK, vezivanje prajmera za jednostruke DNK lance i enzimatsko produžavanje novosintetisanih lanaca. Tokom PCR reakcije stvara se veliki broj, 10^4 - 10^6 , kopija prajmerima ograničenog segmenta DNK (Saiki et al., 1985). Princip amplifikacije DNK pomoću PCR aparata, osobine i primena prajmera, kao i osobine i rezultati primene molekularnih markera kod kojih se koristi PCR, obrađeni su u brojnim radovima (Beckmann and Soller, 1990; Zietkiewicz et al., 1994; Vos et al., 1995; Welsh et al., 1995; McClelland et al., 1997; Gupta and Varshney, 2000; Chen and Yames, 2002).

Molekularni markeri se koriste za konstruisanje genetičkih linkage mapa (Jung, 1992; Mohan et al., 1997), komparaciju genoma taksonomski udaljenih vrsta između kojih nije moguće ukrštanje (Gebhardt et al., 1991; Whitkus et al., 1992; Devos et al., 1995; Saghai Marof et al., 1996), proučavanje odnosa između gajenih vrsta i njihovih divljih srodnika (Lee, 1998), grafičko predstavljanje pedigreea genotipova (Boutin et al., 1995), determinisanje pozicije genskih lokusa (Tanksley et al., 1989; Paterson, 1995), selekciju uz pomoć markera (marker-assisted selection, MAS) (Dudley, 1993; Yoshimura et al., 1995) i poziciono kloniranje gena (map-based cloning) (Young, 1990; Wicking and Williamson, 1991).

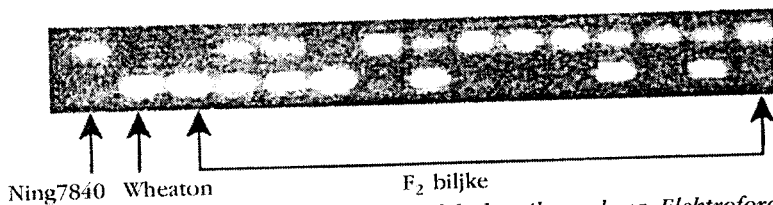
Prednost molekularnih markera u odnosu na morfološke i biohemijske markere je njihova fenotipska neutralnost, tj. na njih sredina nema uticaja, mogu se naći u svim tkivima i mogu se ocenjivati u svim fazama porasta. Do sada je razvijen veliki broj sistema molekularnih markera, od kojih je većina predstavljena u radovima Mohan et al. (1997), Kumar (1999), Gubta and Varshney (2000) i Hartl (2000).

RFLP molekularni markeri

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata predstavlja molekularne markere koji nastaju sečenjem DNK specifičnim restrikcionim enzimima na tačno određenim restrikcionim mestima u genomu (Beckmann and Soller, 1983; Tanksley et al., 1989; Staub et al., 1996).

Ako je neki organizam homozigotan za jedan genski lokus, koji predstavlja restrikcioni fragment DNK, na gelu će se pojaviti jedna traka. Na Sl. 1. sorta pšenice Ning7840 je homozigotna za lokus otpornosti prema *Fusarium* sp, koji se nalazi na 3BS hromozomu (Zhou et al., 2003). To znači da su oba fragmenta DNK homolognih hromozoma diploidnog organizma iste dužine i za vreme elektroforeze prelaze isti put. Ako dode do mutacije toga fragmenta, koja se manifestuje u promeni njegove dužine, fragment će za vreme elektroforeze preći različit put u odnosu na prvobitni, "divlji" alel. Ako se desila delecija nastao je kraći, lakši alelni fragment, koji za vreme elektroforeze prelazi duži put na gelu (sorta Wheaton). Homozigotni mutantni organizam će takode imati jednu traku na gelu. Heterozigot, koji sadrži obe alelne forme ovoga restrikcionog fragmenta će imati dve trake na gelu, čija udaljenost od početka gela odgovara udaljenosti homozigota divljeg i homozigota mutantnog alela. Na taj način nastaju tri različite

forme jednog lokusa, pa se za lokus kaže da je polimorfan, odnosno da postoji polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (Tanksley et al., 1989).



Sl. 1. Kodominantno nasleđivanje RFLP molekularnih markera. Elektroforetski raspored traka na gelu restrikcionih fragmenata DNK roditelja i F_2 generacije kod ukrštanja Ning7840/Wheaton (Zhou et al., 2003).

Fig. 1. Codominant inheritance of RFLP molecular markers. Electrophoresis pattern of polymerase chain reaction products amplified by microsatellite Xgwm493 on an agarose gel (2.5%, 180V, 1h). DNA samples are Ning7840, Wheaton, and F_2 individual plants derived from the cross Ning7840/Wheaton (Zhou et al., 2003).

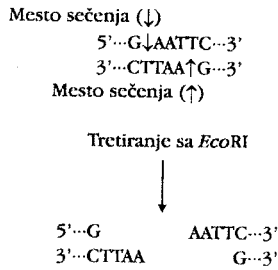
Iako restrikcioni fragmenti nisu geni, oni se nasleđuju kao svi drugi genetički markeri, segmenti DNK, pa i geni (Jones et al., 1997). Ustvari, po definiciji, i geni predstavljaju segment, tj. fragment DNK. Pošto variranje u dužini restrikcionih fragmenata može biti smatrano alelnim variranjem, kao i kod morfoloških i biohemijskih markera, moguće je mapirati ove razlike u DNK sekvencama, kao što se mapiraju morfološki ili bilo koji drugi genetički markeri.

Primena RFLP markera se zasniva na polimorfizmu dužine fragmenata DNK, koji nastaju tretiranjem genomske DNK poznatim restrikcionim enzimom. Razlike između dve genomske DNK različitog porekla se uočavaju kada dužina nastalih fragmenata kod dve DNK nije ista, što znači da se restrikciona mesta nalaze na različitim delovima DNK.

Restrikcioni enzimi

Restrikcioni enzimi ili restrikcione endonukleaze su otkriveni pre više od 30 godina (Smith and Wilcox, 1970; Kelly and Smith, 1970). Molekularni biolog Hamilton Smith je 1970. godine prvi otkrio restrikcioni enzim *HindII*, za što je dobio Nobelovu nagradu 1978. godine, zajedno sa Werner Arber i Daniel Nathans. Restrikcioni enzimi predstavljaju odbrambeni sistem bakterija, pomoću kojeg bakterije seku i degradiraju DNK bakteriofaga, koju bakteriofazi unose u bakterije. Oni funkcionišu kao mikrobiološki imuni sistem, i neki autori ih nazivaju i molekularne makaze. Da ne bi došlo do autosečenja, bakterijska restrikciona mesta su modifikovana putem metilacije. Restrikcioni enzimi jako variraju u veličini i kreću se od kratkih, npr. *Pvu* sa 157 aminokiselina, do gigantskih, npr. *CjeI* sa 1250 aminokiselina.

Svaki enzim prepoznaje sekvencu DNK sa odgovarajućim redosledom baza i na tom mestu seče genomsku DNK na karakterističan način (Zabeau and Roberts, 1979). Mnoga restrikciona mesta imaju isti redosled baza u 5'-3' i 3'-5' komplementarnom lancu (Sl. 2).



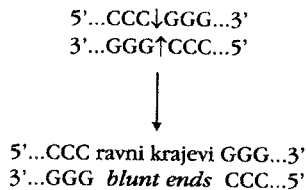
Sl. 2. Restrikciono mesto za *EcoRI* i formirane sekvence nakon sećenja. Sekvenca koja ima isti redosled baza u oba lanca se naziva palindrom, a restrikciono mesto palindromsko restrikciono mesto.

Fig. 2. Restriction site in DNA for *EcoRI* and sequences after cutting. The sequence is a palindrome, reading the same from left to right (5'→3') on the top strand, as it does from right to left (5'→3') on the bottom strand. The restriction site is palindrome restriction site.

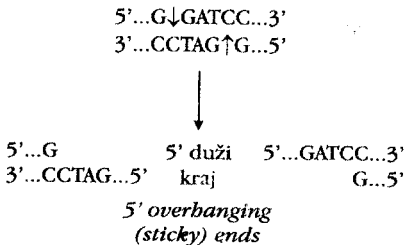
Restrikcioni enzimi mogu seći DNK heliks na dva različita načina:

- između istog para baza u komplementarnim lancima kada nastaju fragmenti sa ravnim krajevima (Sl. 3a) i
- stepenasto u simetričnim nukleotidnim parovima sekvence, kada nastaju lepljivi (sticky) krajevi sa 5' dužim krajevima (Sl. 3b) ili sa 3' dužim krajevima (overhanging ends) (Sl. 3c).

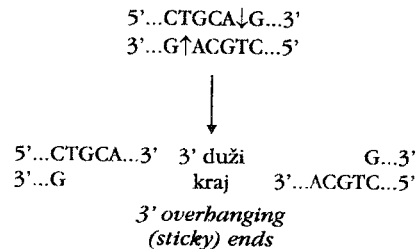
a) Sećenje sa *SmaI*



b) Sećenje sa *BamHI*



c) Sećenje sa *PstI*



Sl. 3. Restrikcioni enzimi mogu seći DNK u restrikcionim mestima ravno (a) ili stepenasto u simetričnim nukleotidnim krajevima (b, c)

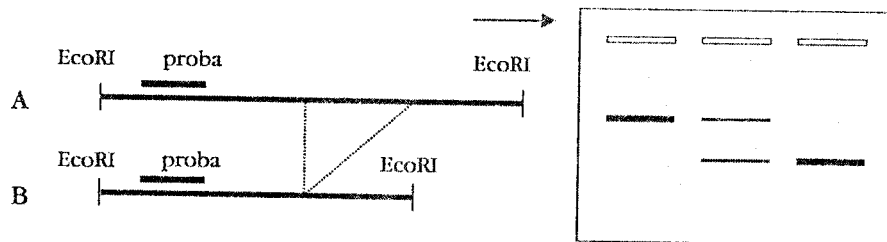
Fig. 3. Examples of how restriction enzymes cleave DNA. (a) *SmaI* results in blunt ends. (b) *BamHI* results in overhanging ("sticky") 5' ends. (c) *PstI* results in overhanging ("sticky") 3' ends.

Tab. 1. Karakteristike nekih restrikcioni enzima
 Tab. 1. Characteristics of some restrictive enzymes

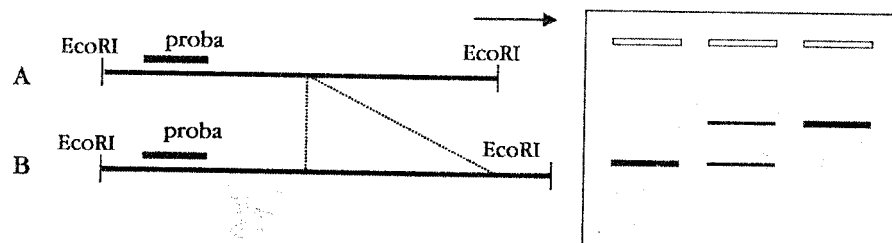
Broj bp restrikcionog mesta	Naziv enzima	Organizam iz kojeg je enzim izolovan	Restrikciona sekvenca i mesto sečenja
Enzimi 4bp restrikcioni sekvenci	<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus egyptus</i>	5' ..GG↓CC..3' 3' ..CC↑GG..5'
	<i>HbaI</i>	<i>Haemophilus emolyticus</i>	GCG↓C C↑GCG
	<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C↓CGG GGC↑C
	<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus Aureus 3A</i>	↓GATC CTAG↑
Enzimi 6bp restrikcioni sekvenci	<i>BamHI</i>	<i>Bacillus Amylolyquefaciens H</i>	G↓GATCC CCTAG↑G
	<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigi</i>	A↓GATCT TCTAG↑A
	<i>EcoRI</i>	<i>E. coli RY13</i>	G↓AATTC CTTAA↑G
	<i>HaeII</i>	<i>Haemophilus aegyptus</i>	RGCGC↓Y Y↑CGCGR
	<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	A↓AGCTT TTCGA↑A
	<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA↓G G↑ACGTC
	<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	G↓TCGAC CAGCT↑G
	<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG GGG↑CCC
Enzimi 7bp restrikcioni sekvenci	<i>MstII</i>	<i>Microcoleus species</i>	CCTNAG↓G G↑GANTCC
Enzimi 8bp restrikcioni sekvenci	<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC↓GGCCGC CGCCGG↑CG
Enzimi nesimetričnih restr. sekvenci	<i>BstXI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	CCNNNNN↓NTGG GGTN↑NNNNNCC

Restrikcioni enzimi koji proizvode lepljive krajeve kod DNK su posebno važni u kloniranju DNK. Svi fragmenti DNK, bez obzira na poreklo, koji nastaju

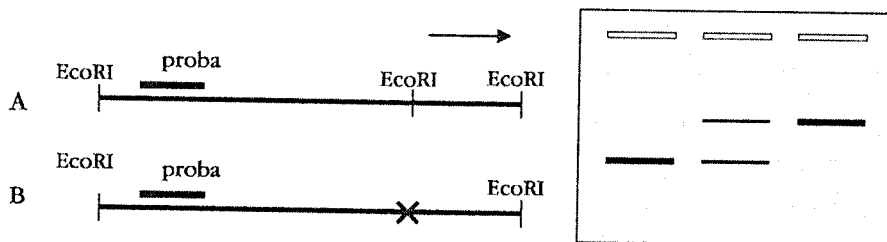
a) Delecija



b) Insercija

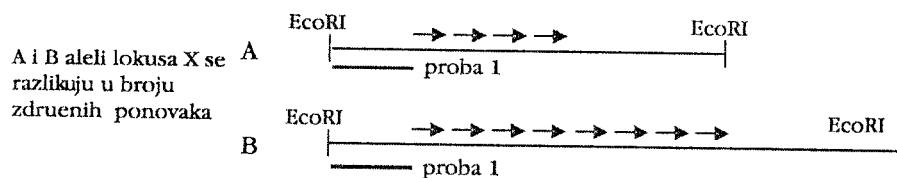


c) Mutacija



d) Promene broja združenih baznih ponovaka

- → → → mikrosatelitVNTRs dužine 2 -4 baze
- → → → ponovci trinukleotidaVNTRs dužine 3 baze
- → → → minisatelitVNTRs dužine > 12 baza



Sl. 4. Promena položaja restriktionog mesta nastaje usled (a) delecija, (b) insercija, (c) mutacija u tački i (d) promenljivog broja združenih baznih ponovaka.

Fig. 4. Position change of a restriction site is due to: (a) Deletion, (b) Insertion, (c) Point mutation, and (d) Variable number of tandem repeats.

sečenjem istim enzimom imaju iste sekvence na lepljivim krajevima. Ako se sa nekim restrikcijom enzimom, npr. EcoRI tretira istovremeno genomska DNK i neki vektor, kod obe DNK nastaje kovalentni lepljivi kraj. Uz pomoć enzima DNK ligaze segment genomske DNK može biti kloniran u genom vektora, što predstavlja osnov rekombinantne DNK i sinteze prajmera (Röder et al., 1998).

REBASE (<http://www.rebase.neb.com/rebase/rebase.htm>) je baza podataka restrikcijom enzima, gde je biohemijski okarakterisano 3576 restrikcijom enzima (Roberts et al., 2003).

Ime restrikcijom enzima sadrži tri slova, koja označavaju vrstu i rasu bakterije iz koje su izolovani. Na primer, EcoRI je izolovan iz *E. coli*, rasa RY13, HindIII iz *Haemophilus influenzae*, rasa Rd. Spisak nekih restrikcijom enzima, sa njihovim poreklom i odgovarajućim restrikcijom sekvencama je dat u Tab. 1.

Polimorfizam RFLP molekularnih markera

Polimorfizam dužine restrikcijom fragmenata je posledica različitih položaja restrikcijom mesta kod različitih genoma/genotipova (Burr et al., 1983). Promena položaja restrikcijom mesta može nastati zbog:

- a) Delecije segmenta DNK između restrikcijom mesta (Sl. 4a),
- b) Insercije segmenta DNK između restrikcijom mesta (Sl. 4b),
- c) Mutacija u tački koje dovode do nestanka funkcije postojećih ili nastanka novih restrikcijom mesta (Sl. 4c) i
- d) Promenljivog broja združenih ponovaka (VNTRs) unutar restrikcijom fragmenata. Tandemski ponovci mogu biti mikrosatelitni VNTR dužine 2-4 baze, trinukleotidni VNTR dužine 3 baze i minisatelitni VNTR dužine preko 12 baza (Sl. 4d).

Frekvencija i distribucija RFLP markera u genomu

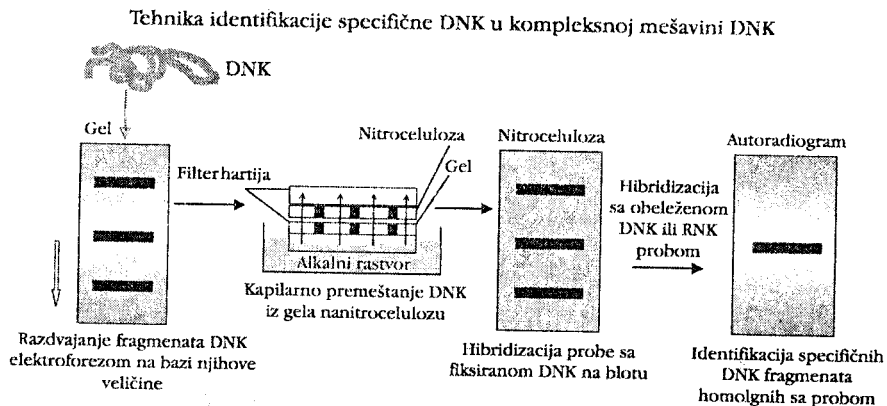
Frekvencija i distribucija restrikcijom fragmenata zavisi od broja i rasporeda restrikcijom mesta u genomskoj DNK. Enzimi koji prepoznaju restrikcijom mesta sa četiri baze seku približno svakih 256 baza (4^4), tj. stvaraju fragmente DNK dužine 256 baza, što je mnogo češće od enzima koji prepoznaje restrikcijom mesta sa šest baze (DNK fragmenti oko 4000 bp) ili osam baze (DNK fragmenti oko 64000 bp). Kada jedan enzim seče identične genome uvek nastaje identičan broj restrikcijom fragmenata, koji su identične dužine.

Osnovni principi determinacije RFLP markera

Kod mapiranja genskih lokusa RFLP molekularnim markerima važno je odrediti pozicije restrikcijom mesta. Ovi podaci se mogu koristiti kod komparacije homolognih gena različitih vrsta, u analizi organizacije introna ili kloniranju delova gena, kao što su promotori ili regulacione sekvence kod vektora. Ukoliko postoji veća genetička distanca između dve individue postoji veća verovatnoća da poseduju različite oblike RFLP fragmenata.

Raspored restrikcijom mesta u genomu može biti analiziran i bez kloniranja gena, odnosno bez tretiranja genomske DNK restrikcijom enzimima, ako se raspolaze sa odgovarajućom, obeleženom probom. Probu može predstavljati klon

cDNK ili klon istog gena kod srodnih organizama. Kada se klon obeleži radioaktivno ili fluorescentno nastaje proba, koja se koristi za determinaciju poželjnog gena u populaciji genomskih fragmenata koji su nastali nakon tretiranja sa restrikcionim enzimima (Tanksley et al., 1989) (Sl. 5).



Sl. 5. Southern blot procedura analize genske DNK

Fig. 5. Southern blot technique used to identify a specific DNA in a complex mixture of DNAs

Jednom od mnogobrojnih procedura vrši se ekstrakcija genske DNK, zatim tretiranje sa odabranim restrikcionim enzimom, nakon čega nastaje populacija DNK fragmenata. Restrikcioni fragmenti se razdvajaju elektroforetski na agaroznom gelu u kojem se nalazi etidijum bromid, koji omogućava vizuelizaciju fragmenata pod ultravioletnim svetlom (Sl. 5a). Kada je genska DNK tretirana restrikcionim enzimima, a restrikcioni fragmenti nisu obeleženi probom koja omogućava vizuelizaciju određenog fragmenata, na elektroforetskom gelu se dobije razmaz. Razmaz predstavlja veliku populaciju fragmenata različite veličine, od malih do velikih, zavisno od broja i rasporeda restrikcionijskih mesta u genomu. Kada se upotrebi proba koja omogućava vizuelizaciju određenog restrikcionog fragmenta na gelu se vidi samo traka u kojoj se nalazi taj fragment, dok ostali restrikcioni fragmenti nisu vidljivi jer su neobeleženi.

Fragmenti DNK se prebacuju (blotting) na nitrocelulozni filter ili najlon membranu, tehnikom koja je po njenom pronalazaču, Edward Southern, dobila naziv Southern blot tehnika (Southern blot technique) (Southern, 1975). Southern blot tehnika se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju specifičnih DNK sekvenci. Gel sa trakama DNK se potapa u alkalni rastvor gde se vrši denaturisanje DNK, usled čega nastaju jednostruki lanci. Nakon toga gel se neutrališe i DNK prebacuje sa elektroforetskog gela na nitrocelulozni filter ili najlon membranu, za koji se permanentno veže zagrevanjem (Sl. 5b). Fragmenti na najlon membrani imaju isti raspored kao na elektroforetskom gelu.

Najlon membrana sa DNK se inkubira sa označenom jednolančanom probom, gde dolazi do hibridizacije probe sa komplementarnim jednostrukim lancem genske DNK (Sl. 5c). Višak DNK, nevezana i slabo vezana DNK, se odstranjuje ispiranjem. Detekcija probe zavisi od njenog označavanja i može biti

autoradiografska (radioaktivno označavanje) ili neradiografska (fluorescentno označavanje) (Sl. 5d). Ako su DNK markeri razdvojeni u različite trake mogu se izračunati veličine genomskih restrikcionih fragmenata. Od dobijenih fragmenata formira se restrikciona mapa koja pokazuje relativnu poziciju restrikcionih mesta.

Klonirani DNK fragmenti mogu poslužiti za određivanje sekvenci nukleotidnih parova DNK (sekvencioniranje DNK), što su najdetaljnije informacije koje se mogu dobiti o nekom DNK fragmentu. Na osnovu toga se određuju sekvence gena i regulatorne sekvence u okviru fragmenta i vrši njihovo poređenje sa sekvencama homolognih gena različitih organizama. Walter Gilbert i Frederick Sanger su 1980. godine dobili Nobelovu nagradu za hemiju, za njihov doprinos u determinisanju baza sekvenci u nukleinskim kiselinama.

Primena RFLP molekularnih markera

RFLP markeri su prvi otkriveni molekularni markeri, intenzivno korišćeni u mapiranju gena i genoma, te o njima postoji veliki broj publikacija. Kasnije otkriveni molekularni markeri zasnovani na osobinama restrikcionih enzima i PCR reakcije (AFLP) ili prajmera i PCR reakcije (RAPD, SSR itd.) su, zahvaljujući njihovom polimorfizmu, doprineli detaljnijem mapiranju genoma i određivanju genetičke varijabilnosti. Iako svaki sistem molekularnih markera ima određene specifičnosti po kojima se razlikuje od drugih, svi molekularni markeri se u oplemenjivanju biljaka koriste za mapiranje genoma i određivanje pozicije gena radi primene MAS (Staub et al., 1996; Mohan et al., 1997; Gupta et al., 1999). Molekularne linkage mape su konstruisane za više od 30 biljnih vrsta (Tanksley et al., 1995).

Ne može se govoriti samo o primeni jednog molekularnog markera a da se to istovremeno ne odnosi i na ostale. Tako npr. u stvaranju linkage mapa i otkrivanju lokusa kvantitativnih osobina koriste se svi markeri. U narednom tekstu daće se prikaz primene markera, sa posebnim osvrtom na RFLP markere.

Mapiranje genoma

Mapiranje predstavlja određivanje položaja markera na hromozomu, relativne genetičke distance između njih i njihovo svrstavanje u linkage grupe na bazi rekombinacionih vrednosti (Jones et al., 1997). Mape nastaju statističkom analizom podataka genotipskog proučavanja markera u laboratoriji i fenotipske evaluacije. Markeri mapirani kao jedna linkage grupa se nalaze na istom hromozomu, te broj različitih linkage grupa ustvari odgovara broju hromozoma.

RFLP markeri se nasleđuju prema Mendelovim principima, što omogućava otkrivanje mutantnog gena koji kosegregira sa RFLP segmentom. Efikasnost RFLP markera u genetičkom mapiranju se zasniva na činjenici da oni predstavljaju stvarno variranje DNK sekvenci, a ne variranje u produktima gena ili fenotipu. Za analizu individualnih organizama neophodan je uzorak DNK, a organizam ne mora biti živ. Upotrebljiva DNK može biti izolovana i iz muzejskih uzoraka (Abbott et al., 1999), a u nekim slučajevima i iz fosilnih ostataka (Hill and Whang, 1996). Uzorci DNK se mogu uzeti u bilo kojoj fazi porasta, koja obezbeđuje neophodnu količinu DNK.

Potencijalnu mogućnost primene polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata u mapiranju humanog genoma prvi su opisali Botstein et al. (1980) a prva kompletna linkage genetička mapa humanog genoma zasnovana na RFLP markerima publikovana je 1987. godine (Donis-Keller et al., 1987). Prvu linkage mapu kod biljaka su uradili Bernatzky and Tanksley (1986). Osnovni principi mapiranja sa RFLP molekularnim markerima zasnivaju se na kloniranju pojedinačnih kopija DNK kod neke vrste i upotreba tih kopija kao proba u određivanju segregacije homolognih regiona genoma kod segregirajućih populacija, kao što su F_2 , BC, dvostruki haploidi (dihaploidi, DH), blisko-izogene linije (near-izogenic lines, NIL) i rekombinantne inbred linije (recombinant inbred lines, RIL). Pošto se u jednom regionu hromozoma/DNK može testirati više različitih kopija klonova na osnovu toga može se konstruisati linkage genetička mapa koja ima veliki broj markera međusobno blisko vezanih.

Linkage mape na bazi RFLP molekularnih markera se mogu stvarati samo kod organizama koji se seksualno razmnožavaju i pod uslovom da postoje klonovi pojedinačnih kopija DNK. Većina ekonomski važnih biljnih vrsta se seksualno razmnožava i lako je dobiti potomstvo za analizu, a isto tako razvijen je niz metoda selektivnog kloniranja genomske DNK (Hohjoh, 1990).

RFLP markeri su mapirani za glavne poljoprivredne vrste, kao što su pšenica (Hartl et al., 1995), kukuruz (Helentjaris, 1987), pirinač (Causse et al., 1994), ječam (Graner et al., 1991; Kleinhofs, 1993) i krompir (Tanksley et al., 1987). Tako npr. genetička mapa pirinča sadrži 2300 DNK markera, od kojih su 1500 cDNK i 800 RFLP markeri (Causse et al., 1994). Detaljne RFLP mape svih sedam homeolognih grupa hromozoma pšenice su publikovane (Devos and Gale, 1993; Marino et al., 1996; Röder et al., 1998). Prve RFLP mape pšenice su uključivale samo nekoliko mutančnih lokusa i agronomski važnih gena, jer su korišćeni RFLP markeri bili neefikasni zbog malog alelnog variranja između sorti (Kam-Morgan et al., 1989).

Genomi nekih srodnih vrsta sadrže nepromenjene (konzervativne) segmente DNK od zajedničkog pretka, odnosno imaju zajednički, isti deo genetičke linkage mape. Naime, na određene segmente DNK nisu delovali evolucionni faktori i ti segmenti su zadržali nepromenjenu linkage mapu u sadržaju i redosledu gena i nakon evolucionog radvajanja. Taj nepromenjeni deo linkage mape, koji se nalazi u genomima vrsta sa zajedničkim pretkom, naziva se "synteny" (Tanksley et al., 1995). Synteny omogućava određivanje relativnog poretka gena između srodnih vrsta koje više nisu seksualno kompatibilne. Na osnovu toga konstruisane su detaljne komparativne mape za familiju Poaceae (pirinač, kukuruz, sirak, ječam i pšenica), Solanaceae (paradajz, krompir, paprika) i familiju Brassicaceae (*Arabidopsis*, kupus, karfiol, repica).

RFLP markeri su značajni zbog toga što su unikatni kao i zbog njihove potencijalne primene u oplemenjivanju biljaka i određivanja genetičkog diverziteta (Karp et al., 1996). Oni se mogu upotrebiti u neograničenom broju, čime se obezbeđuje visoka rezolucija, čak i za poligene osobine (Backer et al., 1995), i omogućava uspešna izolacija gena pre njihove fenotipske ekspresije (Lawrence, 1995).

Williams et al. (1991) su pretvorili RFLP molekularne markere u sekvence karakterističnih amplifikiranih regiona (Sequence Characterized Amplified Re-

gions, SCARs), kod kojih se primenjuje PCR reakcija. Sekvenciranjem krajeva klonova genomske DNK dizajnirani su oligonukleotidni prajmeri koji se kasnije direktno primenjuju za PCR reakciju amplifikacije polimorfnog regiona. Ako nije utvrđen polimorfizam amplificiranog segmenta tada se PCR fragmenti tretiraju restrikcionim enzimima u cilju otkrivanja RFLP kod amplificiranog fragmenta. Prednost SCAR je u PCR amplificiranju restrikcionog segmenta genomske DNK, uz zadržano kodominantno nasleđivanje.

Otkrivanje major gena

Upotreba RFLP markera u oplemenjivanju biljaka se zasniva na postojanju poznate čvrste veze, "linkage", između markera i poželjnog gena. Ovaj odnos omogućava otkrivanje gena indirektno preko otkrivanja molekularnog markera (Dudley, 1993). Poželjni gen se ne može tačno locirati na hromozomu, odnosno nivou DNK. Umesto izbora genotipa koji nosi poželjni gen direktno, izbor se vrši indirektno, izborom vezanog markera najbližeg poželjnom genu. Na ovom principu se zasniva selekcija uz pomoć markera. Najpouzdaniji rezultati primene MAS se dobijaju uz njihovo kombinovanje sa fenotipskim podacima (Zhou et al., 2003).

Mnoga ukrštanja u oplemenjivačkim programima imaju za cilj unošenje određenih gena donora u povoljnu genetičku osnovu recipijenta. Jedan od klasičnih primera je unošenje gena za otpornost prema patogenu u osetljivu sortu. Nakon ukrštanja vrši se selekcija biljaka koje pored gena za povoljnu genetičku osnovu sadrže i gen za otpornost od roditelja donora. Konvencionalni način otkrivanja poželjne kombinacije gena podrazumeva inokulaciju biljaka sa jednom ili više rasa patogena, pojedinačno ili istovremeno, i nakon toga selekciju biljaka bez simptoma bolesti. Ovakvo testiranje je nekada nepraktično, posebno ukoliko ne postoje odgovarajući staklenici, u kojima je moguće gajiti biljke od setve do zrelosti. Skrining na karantinske bolesti je teško ili nemoguće uraditi zbog zakonske regulative. Na osnovu veze gena za otpornost prema patogenu sa RFLP probama moguće je uraditi istovremeni skrining, bez inokulacije, više različitih gena za otpornost prema patogenu.

Otkrivanje genetičke osnove kvantitativnih osobina

Većina osobina biljaka su poligenog karaktera, kontrolisane zajedničkim delovanjem više gena slabog efekta - minor gena. Najvažnije ekonomske osobine, kao što su prinos, tolerantnost prema ekološkim činiocima, kvalitet, dužina vegetacije itd. su pod kontrolom minor gena. Suprotno kvantitativnim osobinama, gde je za major gene relativno lako napraviti linkage mape, pozicioniranje minor gena je mnogo teže. Mapiranje genetičkih lokusa agronomski važnih kvantitativnih osobina (Quantitative Trait Loci, QTL) je glavni cilj u oplemenjivanju biljaka, gde su neophodni informativni markeri, vrlo blisko vezani sa QTL (Röder et al., 1998).

Procedura određivanja QTL započinje ukrštanjem dva genotipa koji se međusobno razlikuju u proučavanoj osobini, gajenjem F_1 generacije, i nakon toga stvaranjem neke od generacija razdvajanja, segregacije, koje predstavljaju

materijal za određivanje QTL. Mogućnost otkrivanja QTL vezanog sa RFLP markerom zavisi od jačine efekta QTL na osobinu, veličine proučavane populacije i frekvencije rekombinacija između markera i QTL. Kada su RFLP markeri i QTL značajno međusobno udaljeni rekombinacije smanjuju verovatnoću njihovog zajedničkog prenošenja na potomstvo. Analize bazirane na jednom markeru QTL obično ne mogu odrediti QTL sa statističkom značajnošću, ili se može napraviti druga greška, podcjenjivanje rezultata statističke analize. Međutim, ako selekcija na bazi jednog markera daje jednako pouzdane rezultate kao i selekcija na bazi više markera, to znači da je taj marker blisko vezan sa QTL i može se koristiti individualno kao dijagnostički marker (Zhou et al., 2003).

Thoday (1960) je predložio upotrebu dva markera kod određivanja QTL koji se nalaze sa obe strane QTL i ustvari markiraju segment DNK u okviru koga se nalazi taj QTL. Kod upotrebe dva (ili više) markera zajedno postoji manje nepoznanica između pozicije i veličine efekta QTL, što je osnovni nedostatak upotrebe jednog markera. Termin intervalno mapiranje (Interval Mapping, IM) se koristi za metodu procene pozicije QTL unutar dva markera. Intervalno mapiranje se izvodi na bazi maksimalne verovatnoće (likelihood map) (Lander and Botstein, 1989), a postoji i mogućnost procene upotrebom proste regresije (Haley and Knott, 1992). Intervalno mapiranje je efikasnije i zahteva manje potomstvo nego metod direktne analize markera (Lander and Botstein, 1989; Zeng, 1994). Kombinacijom IM sa multipli regresionom analizom razvijen je metod kompozitnog intervalnog mapiranja (Composite Interval Mapping, CIM) (Jansen, 1994; Zeng, 1994).

QTL mape i intervalne analize omogućavaju direktno proučavanje broja i prirode QTL lokusa određene osobine. Svaki QTL može biti proučavan pojedinačno i određene njegove individualne i interakcijske osobine. RFLP markeri takođe omogućavaju brzo i precizno uvođenje QTL u superiorne sorte ili druge genetičke osnove koje služe za dalja proučavanja.

Primena molekularnih markera kod povratnih ukrštanja

RFLP markeri mogu u znatnoj meri pojeftiniti, olakšati i ubrzati proces povratnih ukrštanja, kod oplemenjivanja rekurentnog roditelja na jednu osobinu. Kod povratnih ukrštanja mogu se koristiti dva tipa markera; markeri specifični za genotip donora ili markeri specifični za rekurentnog roditelja (Reys-Valdes, 2000). Ako je poželjni gen donora markiran dovoljno blizu vezanim RFLP markerima skrining populacije povratnih ukrštanja može se obaviti u fazi sejanaca, pre fenološke ekspresije gena donora. Ova tehnika je posebno efikasna kada je efekat unetog gena slab, što onemogućava sigurnu fenotipsku selekciju. Osim QTL, na isti način može se obaviti determinacija genotipova nosioca major gena, koji su markirani RFLP markerima.

Segregirajuće potomstvo nakon povratnih ukrštanja sadrži hromosome koji se sastoje od pojedinih delova roditeljskih hromozoma. Pored determinacije poželjnog gena donora u oplemenjivanju je važno imati i informaciju o genetičkoj strukturi svakog hromozoma, odnosno imati informaciju koji delovi hromozoma pripadaju rekurentnom roditelju a koji donoru. Na osnovu poznavanja RFLP genotipa u određenom lokusu dobija se informacija o poreklu alela tog segmenta

hromozoma. Analogno jednom lokusu, poznavanje RFLP genotipova velikog broja vezanih lokusa u celom genomu omogućava tačno određivanje porekla pojedinih lokusa hromozoma. Kada se poreklo svih poznatih RFLP markera predstavi grafički dobije se grafički genotip (graphical genotype) određenog ukrštanja (Tanksley et al., 1989). Homologni segmenti hromozoma ne mogu biti predstavljeni grafički. Grafičko predstavljanje hromozoma omogućava odabiranje potomstava kod kojih pored poželjnog donor gena, postoji i najveća verovatnoća da ostali deo genoma vodi poreklo od rekurentnog roditelja. Takvu kombinaciju je moguće pronaći i u mladim generacijama, nakon nekoliko povratnih ukrštanja.

Prilikom unošenja poželjnog gena u genotip rekurentnog roditelja, sa cross-ing over unesenim segmentom poželjnog gena unose se i susedni geni, poželjni ili nepoželjni. Zbog toga se i ne mogu očekivati brzi rezultati kod ukrštanja rekurentnog roditelja sa donorom, koji pored poželjnog ima i niz negativnih lokusa. Stam i Zeven (1981) navode da se i posle 20 povratnih ukrštanja, sa poželjnim genom zadržava segment donora veličine 10 cM, u kojem ima na stotine gena, među kojima su i nepoželjni geni. Kod oplemenjivanja soje na otpornost prema insektima Lambert i Tyler (1999) navode da su stvorene tri sorte sa unesenim poželjnim genom iz japanske germplazme. QTL za otpornost je identifikovan pomoću RFLP markera. Međutim, nijedna od ovih sorti nije prihvaćena od proizvođača zbog neadekvatnog nivoa otpornosti, niskog prinosa i loših agronomskih osobina. Narvel et al. (2001) smatraju da loše osobine ovih sorti mogu biti posledica kvantitativne prirode otpornosti i prenošenja i zadržavanja nepoželjnih alela iz donora koji su vezani sa lokusom otpornosti (linkage drag).

Veoma detaljna mapa RFLP i drugih markera u regionu donor gena omogućava izbor biljaka sa najmanjim segmentom koji nosi poželjni gen, odnosno biljaka sa najpovoljnijom rekombinacijom između hromozoma donora i hromozoma rekurentnog roditelja.

Molekularni markeri su efikasni i kod upotrebe egzotične germplazme i divljih srodnika, koji su često nosioci gena koji mogu poboljšati osobine gajenih biljaka (Tanksley and McCouch, 1997). Introgresija poželjnih gena iz divljih vrsta u postojeće sorte i negativna selekcija nepoželjnih karakteristika divljeg roditelja može biti brža korišćenjem MAS nego upotrebom konvencionalnih metoda (Solomon-Blackburn and Barker, 2001).

Uz pomoć MAS može se vršiti oplemenjivnje na nekoliko osobina istovremeno, kao što je npr. akumulacija različitih gena za otpornost u postojeće sorte (Liu et al., 2000). Gen za otpornost prema vašima kod salate je unesen iz divljeg srodnika, gde je pored tog gena unesen i veliki broj nepoželjnih lokusa (Peleman and van der Voort, 2003). I nakon velikog broja povratnih ukrštanja sa rekurentnim roditeljem novi genotip je imao loš kvalitet i nizak prinos i nije bio prihvatljiv za tržište. Upotrebom molekularnih markera ustanovljeno je da je nepovoljni linkage drag bio recesivan sa obe strane gena za otpornost, što je stvaralo teškoće prilikom izbora rekombinantnih genotipova na bazi fenotipa. Izbor rekombinantnih genotipova sa mestom rekombinacije veoma blizu poželjnog gena obavljen je na osnovu molekularnih markera, što bi upotrebom klasičnih metoda selekcije bilo vrlo teško izvodljivo.

RFLP u odnosu na druge molekularne markere

RFLP markeri, isto kao i morfološki markeri, predstavljaju segment DNK. Između ove dve vrste segmenata DNK/markera postoji niz razlika (Jones et al., 1997; Kumar, 1999). Prvo, morfološki markeri imaju jedan ili više lokusa sa jednim ili više alela između kojih postoje intraalelne i interalelna interakcije. Pošto se RFLP markeri determinišu direktno na nivou DNK oni se ponašaju kodominantno, što omogućava otkrivanje bilo kojeg genotipa. Drugo, nivo alelnog variranja za RFLP markere je mnogo veći nego što je variranje morfoloških markera. Treće, pretpostavlja se da je većina RFLP markera fenotipski neutralna i da selekcija ne menja njihovu frekvenciju. Morfološki markeri se određuju fenotipski i ukoliko fenotip ne odgovara ciljevima oplemenjivača vrši se negativna selekcija, što znači da će se na te morfološke markere vrši selekcionirani pritisak, menjaju njihove frekvencije i postojeći polimorfizam. Četvrto, kod RFLP markera nema epistatičkih efekata i zbog toga se može posmatrati njihov neograničen broj u jednoj populaciji. Suprotno tome, broj morfoloških markera je ograničen zbog interakcija.

Za razliku od multilokusnih markera, kao što su RAPD i AFLP, najveći broj RFLP proba hibridizuje sa jednim fragmentom diploidnih genoma, odnosno dva fragmenta tetraploidnih genoma (Sherman et al., 1995; Mohan et al., 1997). Upravo ova osobina omogućava primenljivost RFLP kod više ukrštanja, što praktično znači da odnosi utvrđeni između markera i gena kod jednog ukrštanja važe i kod drugih ukrštanja. Markeri zasnovani na PCR reakciji su specifični za svaku vrstu, dok se RFLP markeri mogu koristiti kod velikog broja srodnih vrsta. Upravo ova osobina čini RFLP markere pogodnim kod transfera gena između različitih vrsta i kod komparativnog mapiranja (Tanksley et al., 1995).

RFLP markeri imaju niži nivo polimorfizma u odnosu na mikrosatelite (Russell et al., 1997) i manje su efikasni u odnosu na AFLP markere (Powell et al., 1996). Iako je teško proceniti genetičke distance i porediti publikovane podatke za različite sisteme molekularnih markera, ipak genetička sličnost na bazi RFLP ima nešto veću korelaciju sa procenjenom srodnosti predaka nego što se dobija kod SSR markera (Backes et al., 2003). Kod analize genotipova soje unutar subspeciesa *Glycine max* Powell et al. (1996) su dobili slične rezultate primenom RFLP i AFLP molekularnih markera. Kod pšenice, genetička sličnost određena na bazi RFLP manje odstupa od procenjene sličnosti predaka, nego što je to slučaj sa SSR markerima (Bohn et al., 1999).

Svaki sistem molekularnih markera ima određene prednosti ili nedostatke u odnosu na druge sisteme. U daljem tekstu su sumirane prednosti i nedostaci RFLP molekularnih markera (Burr et al., 1983; Dudley, 1993; Mohan et al., 1997; Jones et al., 1997; Russell et al., 1997; Robinson et al., 1999).

Prednosti RFL markera.

RFLP su kodominantni markeri, što znači da ovaj sistem molekularnih markera otkriva sve alele (morfe) lokusa - homozigote i heterozigote, na osnovu čega je sistem informativniji u odnosu na markere koji pokazuju punu dominantnost.

Ovi molekularni markeri su stabilni i ponovljivi, dajući konstantne rezultate za različite periode testiranja, odnosno gajenja ispitivanih organizama i za različite lokacije.

Nedostaci RFL markera.

Za primenu RFLP molekularnih markera navodi se niz, uslovno rečeno, nedostataka, čiji stepen zavisi od niza faktora; među prvim finansiranja i svrhe testiranja, kao i kadrovske i tehničke osposobljenosti laboratorije.

RFLP je metoda molekularnih markera koja zahteva izuzetno i dugotrajno laboratorijsko angažovanje. Pre dobijanja konačnog rezultata mora se slediti dugotrajna metodika, koja znatno poskupljuje ovaj metod. Visoka cena koštanja je jedna od najznačajnijih prepreka šire primene ove metode.

Ekstrakcija DNK za analizu molekularnih markera je uglavnom jednostavna, dok neophodna količina i njen kvalitet može da predstavlja problem. RFLP molekularni markeri zahtevaju veliku količinu DNK, visokog kvaliteta, što je nekada teško obezbediti.

Prve metode otkrivanja restrikcionih fragmenata radene su sa radio izotopima, što je predstavljalo poseban problem i opasnost. Iako su kasnije razvijene metode sa fluoroscencijom i dalje se najbolji rezultati dobijaju uz korišćenje radio izotopa.

Kod sintetisanja proba postoje dva problema. Prvo, kod nekih vrsta probe su nedostupne. Drugo, dužina proba mora biti adekvatno određena; preduge probe otkrivaju malo polimorfizma, a suviše kratke otkrivaju previše polimorfizma, koji nekada nije tipičan.

Niska frekvencija poželjnog polimorfizma kod poliploidnih organizama, kao što je npr. pšenica, smanjuje efikasnost primene RFLP markera.

Nabrojane i druge teškoće ostavljaju otvoreno pitanje ekonomske efikasnosti upotrebe molekularnih markera (Moreau et al., 2000).

LITERATURA

- Abbott, I., Wills, A., Burbidge, T. (1999): Historical incidence of *Perthida leafminer* species (*Lepidoptera*) in southwest Western Australia based on herbarium specimens. *Australian Journal of Ecology* 24: 144-150.
- Backer, G., Graner, A., Foroughi, B., Fischbeck, G., Wenzel, G., Jahoor, A. (1995): Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 90: 294-302.
- Backes, G., Hatz, B., Jahoor, A., Fishbeck, G. (2003): RFLP diversity within and between major groups of barley in Europe. *Plant Breeding* 122: 291-299.
- Beckmann, J.S., Soller, M. (1983): Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics* 67: 35-43.
- Beckmann, J.S., Soller, M. (1990): Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* 8: 930-932.
- Bernatzky, R., Tanksley, S.D. (1986): Toward a saturated linkage map of tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112: 887-898.

- Bohn, M., Utz, H.F., Melchinger, A.E. (1999): Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of the RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Science* 39: 228-237.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980): Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Boutin, S.R., Young, N.D., Lorenzen, L.L., Shoemaker, R.C. (1995): Marker-based pedigrees and graphical genotypes generated by Supergene software. *Crop Science* 35: 1703-1707.
- Burr, B., Evolva, S.V., Burr, F.A., Beckman, J.S. (1983): The application of restriction fragment length polymorphisms to plant breeding. In: Setlow, J.K. and A. Hollaender (eds), *Genetic engineering principles and methods*, Vol 5. New York, Plenum, pp 45-59.
- Cadalen, T., Boeuf, C., Bernard, S., Bernard, M. (1997): An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. Em. Thell. And comparison with a map from a wide cross. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 367-377.
- Causse, M.A., Fulton, T.M., Cho, Y.G., Ahn, S.N., Chunwingse, J., Wu, K., Xiao, J., Yu, Z., Ronald, P.C., Harrington, S.E., Second, G., McCouch, S.R., Tanksley, S.D. (1994): Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Chen, B-Y., Yames, H.Y. (2002): PCR Cloning Protocols, 2nd edition. In: *Methods in Molecular Biology*, Volume 192. Totowa, NJ: Humana Press.
- Devos, K.M., Gale, M.D. (1993): Extended genetic maps of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat, rye, and barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 649-652.
- Devos, K.M., Moore, G., Gale, M.D. (1995): Conservation of marker synteny during evolution. *Euphytica* 85: 367-372.
- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T.P., Bowden, D.W., Smith, D.R., Lander, E.S., Botstein, D., Akots, G., Rediker, K.S., Gravius, T., Brown, W.A., Rising, M.B., Parkers, C., Powers, J.A., Watt, D.E., Kauffman, E.R., Bricker, A., Phipps, R., Muller-Kahle, H., Fulton, T.R., Ng, S., Schumm, J.W., Braman, J.C., Knowlton, R.G., Barker, D.F., Crooks, S.M., Lincoln, S.E., Daly, M.J., Abrahamson, J. (1987): A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51: 319-337.
- Dudley, J.W. (1993): Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Science* 33: 660-668.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schachtschabel, U., Kaufmann, H., Thompson, R.D., Bonierbale, M.W., Ganai, M.W., Tanksley, S.D., Salamini, F. (1991): RFLP maps of potatoe and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 49-57.
- Graner, A., Jahoor, A., Schondelmaier, J., Siedler, H., Pillen, K., Fischbeck, G., Wenzel, G., Herrmann, G.R. (1991): Construction of an RFLP-map in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 250-256.
- 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.

- Gupta, P.K., Varshney, R.K. (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Haley, C.S., Knott, S.A. (1992): A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.
- Hartl, L., Weiss, H., Stephan, U., Zeller, F.J., Jahoor, A. (1995): Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum*). *Theoretical and Applied Genetics* 90: 601-606.
- Hartl, D.L. (2000): A primer of population genetics. Third edition. Sinauer Associates, Inc. pp 1-58.
- Helentjaris, T. (1987): A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends in Genetics* 3: 217-222.
- Hill, R.S., Whang S.S. (1996): A new species of Fitzroya (*Cupressaceae*) from Oligocene sediments in north-western Tasmania. *Australian Systematic Botany* 9: 867-875.
- Hohjoh, H., Minakami, R., Sakaki, Y. (1990): Selective cloning and sequence analysis of the human L1 (LINE-1) sequences which transposed in the relatively recent past. *Nucleic Acids Res* 18: 4099-4104.
- Jansen, R.C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 85: 946-952.
- Jansen, R.C., Stam, P. (1994): High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Jones, N., Ougham, H. Thomas, H. (1997): Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137: 165-177.
- Jung, C. (1992): Utilization of RFLP markers in plant breeding. *Advances in Molecular Genetics* 5: 101-117.
- Kam-Morgan, L.N.W., Gill, B.S., Muthukrishnan, S. (1989): DNA restriction fragment length polymorphisms: a strategy for genetic mapping of D genome of wheat. *Genome* 32: 724-732.
- Karp, A., Seberg, O., Buiatti, M. (1996): Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. *Annals of Botany* 78: 143-149.
- Kelly, T.J.Jr., Smith, H.O. (1970): A Restriction Enzyme for *Haemophilis influenzae*. II. Base sequence of the recognition site. *Journal of Molecular Biology* 51: 393-400.
- Kinoshita, T. (1995): Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage group. *Rice Genetics Newsletter* 12: 9-153.
- Kleinhofs, A., Kilian, A., Maroof, M.A.S., Biyashev, R.M., Hayes, P., Chen, F.Q., Lapitan, N., Fenwick, A., Blake, T.K., Kanazin, V., Ananiev, E., Dahlen, L., Kudrna, D., Bollinger, J., Knapp, S.J., Liu, M., Sorrells, B., Heun, M., Franckowiak, J.D., Hoffman, D., Skadsen, R., Steffenson, B.J. (1993): A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 705-712.
- Kumar, L.S. (1999): DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances* 17: 143-182.
- Lambert, L., Tyler, J. (1999): An appraisal of insect resistant soybeans. In J.A. Webster and B.R. Wiseman (eds.) *Economic, environmental, and social benefits of insect resistance in field crops*. Entomological Society of America, Lanham, MD.

- Lander, E.S., Botstein, D. (1989): Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics* 121: 185-199.
- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A., Ellis, J.G. (1995): The L6 gene for leaf rust resistance is related to the bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene. *Journal of Plant Cell* 7: 195-206.
- Lee, M. (1998): Genome, projects and and gene pools, new germplasm for plant breeding? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2001-2004.
- Liu, J., Liu, D., Tao, W., Li, W., Wang, S., Chen, P., Chen, S., Gao, D. (2000): Molecular marker- facilitated pyrimiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breeding* 119: 21-24.
- Market, C.L., Moller, F. (1995): Multiple forms of enzymes: Tissues, ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45: 753-763.
- Marino, C.L., Nelson, J.C., Lu, J.H., Sorrells, M.E., Leroy, P. and et al. (1996): Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Genome* 39: 359-366.
- McClelland, M., Honeycutt, R., Mathieu-Daude, F., Vogt, T., Welsh, J. (1997): Fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Methods in Molecular Biology* 85:13-24.
- McMillin, D.E. (1983): Plant isozymes ahistorical perspective. In: S.D. Yanksley and T.J. Orton (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier Science Publisher. B.V. Amsterdam, pp 3-13.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Jano, M., Bhatia, C.R., Saski, T. (1997): Genome, mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.
- Moreau, L., Lemari, S., Charcosset, A., Gallias, A. (2000): Economic efficiency of one cycle of marker assisted selection. *Crop Science* 40: 329-337.
- Narvel, J.M., Walker, R., Rector, B.G., All, J.N., Parrott, W.A., Boerma, H.R. (2001): A Retrospective DNA Marker Assessment of the Development of Insect Resistant Soybean. *Crop Science* 41: 1931-1939.
- Nevo, E., Zohary, D., Brown, A.H.D., Haber, M. (1979): Genetic diversity and environmental associations of wild barley *Hordeum spontaneum* in Israel. *Evolution* 33: 815-833.
- Paterson, A.H. (1995): Molecular dissection of quantitative traits: Progress and Prospects. *Genome Research* 5: 321-333.
- Peacock, J. (1991): Plant science in the 1990s. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 4398-444.
- Peleman, J.D., van der Voort, J.R. (2003): The challanges in Marker Assisted Breeding. In: Th.J.L. van Hintum, A. Lebeda, D. Pink and Schut (eds), *Eucarpia Leafly Vegetables 2003*, pp 125-130.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. Rafalski, A. (1996): The comparision of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Reys-Valdes, M.H. (2000): A Model for Marker-Based Selection in Gene Introgression Breeding Programs. *Crop Science* 40: 91-98.
- Roberts, J.R., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. (2003): REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 31 418-420.

- Robinson, J.P., Harris, S.A. (1999): Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A Phylogenetic perspective. *In*: Gillet, E.M. (ed). Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.-H., Leroy, P., Ganal, W. (1998): A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Rogstad, S.H. (1996): Assessing genetic diversity in plants with synthetic tandem repetitive DNA probes. *Stadler Genet Symp Ser* 21: 1-14.
- Russell, J.R., Fuller, J., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, W.P., Waugh, R. (1997): Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLP's, AFLP's, SSR's, and RAPD's. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 714-722.
- Saghai Maroof, M.A., Yang, G.P., Biyashev, R.M., Maughan, P.J., Zhang, Q. (1996): Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP linkage mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 541-551.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of β 1 globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sherman, J.D., Fenwick, A.L., Namuth, D.M., Lapitan, N.L.V. (1995): A barley RFLP map: alignment of the three barley maps and comparisons to gramineae species. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 681-690.
- Smith, H.O., Wilcox, K.W. (1970): A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. *International Journal of Molecular Biology* 51: 379-391.
- Solomon-Blackburn, R.M., Barker, H. (2001): Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86: 17-35.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.
- Stam, P., Zeven, A.C. (1981): The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by back-crossing. *Euphytica* 30: 227-238.
- Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B., Grun, P. (1982): Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *Jam Sci* 107: 405-408.
- Staub, J.E., Serquen, F.E., Gupta M. (1996): Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience* 31: 729-739.
- Tanksley, S.D. (1983): Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 3-8.
- Tanksley, S.D., Miller, J.C., Paterson, A., Bernatzky, R. (1987): Molecular mapping of plant chromosomes. *In*: J.P. Gustafson and R. Appels (eds.), *Chromosome Structure and Function*, pp 157-173. Plenum Press, New York.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., Bonierbale, M.W. (1989): RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology* 7: 257-264.
- Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Martin, G.B. (1995): Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends in Genetics* 11: 63-68.

- Tanksley, S.D., McCouch S.R. (1997): Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066.
- Thoday, J.M. (1960): Location of polygenes. *Nature* 191: 368-370.
- Vodenicharova, M. (1998): Use of proteins as molecular-genetic markers in plants. *Genet Sel* 22: 269-277.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijaus, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Weising, K., Kacmer, D., Ramser, J., Bierwerth, S., Kahl, G. (1992): Plant DNA fingerprinting with simple repetitive oligonucleotides. *DNA Polymorphisms in Eucaryotic Genomes. Advances in Molecular Genetics* 5: 135-156.
- Welsh, J., Rampino, N., McClelland, M., Perucho, M. (1995): Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. *Mutation Research* 338: 215-229.
- Whitkus, R., Doeble, J., Lee, K. (1992): Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics* 132: 1119-1130.
- Wicking, E., Williamson, B. (1991): From linked marker to gene. *Trends in Genetics* 7: 288-293.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 489-498.
- Yoshimura, S., Yoshimura, A., Iwata, N., McCouch, S.R., Abenes, M.L., Baraoidan, M.R., Mew, T.W., Nelson, R.J. (1995): Tagging and combining bacterial blight resistant gene in rice using RAPD and RFLP markers. *Molecular Breeding* 1: 375-387.
- Young, N.D. (1990): Potential application of map-based cloning to plant pathology. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 81-94.
- Young, N.D. (1994): Plant gene mapping. *Encyclopedia of Agricultural Science* 3: 275-282.
- Yu, X.G., Bush, A.L., Wise, R.P. (1996): Comparative mapping of homoeologous group1 regions and genes for resistance to obligate biotrophs in *Avena*, *Hordeum*, and *Zea mays*. *Genome* 39: 155-164.
- Zabeau, M., Roberts, R.J. (1979): The role of restriction endonucleases in molecular genetics. In: Taylor, J.H. (ed) *Molecular genetics*, Vol III. Academic Press, London New York, pp 1-63.
- Zeng, Z.B. (1994): Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zhou, W.C., Kolb, F.L., Bai, G.B., Domier, L.L., Boze, L.K., Smith, N.J. (2003): Validation of a major QTL for scar resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding* 122: 40-46.

MOLECULAR MARKERS I. RESTICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

Novo Pržulj¹, Dragan Perović²

¹Institute of Field and Vegetable Crops Novi Sad

²Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Department of Genebank,
AGMOM, Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany

SUMMARY

With the development of DNA molecular marker technology, geneticists and breeders were supplied with tools for new strategies and methods in overcoming problems encountered during research and breeding. Molecular markers and related technologies are basis for linkage map construction and the analysis of the molecular and genetic background of qualitative and quantitative traits inheritance. Molecular markers that are closely linked to genes of interest have potential utility in improvement programs, although they are likely to have little or no effect in reducing the need for conventional trials across location and environments. Among the various molecular markers developed to date, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) was developed first. RFLP is the most reliable polymorphism which can be used for accurate scoring of genotypes. Using RFLP markers, genetic maps have been developed in many species. RFLP markers facilitate the selection of progenies with desirable genotypes. Analyses comprising RFLP markers are labor intensive and time consuming. In this paper, a concept of markers is discussed, with emphasis on molecular markers, restriction enzymes, polymorphism, and application of RFLP markers in the mapping and marker-assisted selection. The basic principles of RFLP markers determination and their advantages and disadvantages regarding other molecular markers are briefly discussed.

KEY WORDS: restriction fragment length polymorphism, morphological markers, molecular markers, restriction enzymes, RFLP determination, mapping, molecular marker assisted selection, major genes, QTL loci, advantages of RFLP, disadvantages of RFLP

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, 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.