

# Sposoby identyfikacji markerów RAPD w roślinach

Waldemar Marczewski  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
Młochów

## 1. Wprowadzenie

Śpośród metod amplifikacji DNA wykorzystujących łańcuchową reakcję polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) (1,2), metoda RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (3,4) jest najczęściej stosowana w genetycznych badaniach roślin. RAPD jest szybką metodą powielania 1-10 fragmentów DNA o długości 100-2000 par zasad, przy zastosowaniu jednego, 10-nukleotydowego startera, a nie pary różnych starterów jak w klasycznej wersji reakcji PCR. Sekwencja startera RAPD powinna zawierać przynajmniej 50% zasad G i C, przy braku przeciwnie ukierunkowanych, powtarzających się odcinków nukleotydowych. Zastosowanie tak krótkiego startera znacznie zwiększa prawdopodobieństwo powielania, występujących w obrębie całego genomu, fragmentów DNA, których końce są wyznaczone przez dwie takie same sekwencje starterowe, ale o przeciwnej orientacji nukleotydów. Produkty amplifikacji są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i identyfikowane w świetle UV po barwieniu bromkiem etydyny (5). Liczba powielanych fragmentów DNA oraz ich ruchliwość elektroforetyczna mogą być różne dla porównywanych genotypów, linii, odmian czy też gatunków roślin, co wynika z odmiennych sekwencji nukleotydowych lub zróżnicowania w drugorzędowej strukturze DNA (1). Metoda RAPD jest wykorzystywana do mapowania genomów roślinnych (6) oraz do określania pokrewieństwa genetycznego odmian i gatunków (1,7-10). Niebagatelne znaczenie ma identyfikacja markerów RAPD będących wyróżnikami określonych cech. Dalsza część artykułu jest poświęcona temu zagadnieniu, które przedstawione zostanie na przykładach genów warunkujących odporność roślin na choroby wywoływane przez szkodniki, grzyby, bakterie i wirusy.

Marker i allel warunkujący odporność mogą występować w fazie przyciągania (*coupling-phase*) lub odpychania (*repulsion-phase*). Faza przyciągania (układ *cis*) oznacza, że marker RAPD i allel warunkujący odporność znajdują się na tym samym chromosomie homologicznym (rys. 1A).

a)

M X

faza przyciągania markera **M** z allelem **X** warunkującym odporność  
(odpychanie z allelem **Y** warunkującym podatność)

Y

b)

X

faza odpychania markera **N** z allelem **X** warunkującym odporność  
(przyciągania z allelem **Y** warunkującym podatność)

N Y

Rys.1. Konfiguracje między markerami RAPD a allelami genu odporności. Oznaczenia: M i N, markery RAPD; X, allel warunkujący odporność; Y, allel warunkujący podatność.

Natomiast są one w fazie odpychania (układ *trans*), gdy występują na różnych chromosomach homologicznych (rys. 1B). Faza przyciągania między określonym markerem a allelem warunkującym odporność oznacza, że marker ten jest w fazie odpychania z allelem decydującym o podatności (rys. 1A). Odwrotnie, marker będący w fazie odpychania z allelem determinującym odporność będzie w fazie przyciągania z allelem warunkującym podatność (rys. 1B). Na rysunku 1 nie zaznaczono, czy odporność jest warunkowana przez allel dominujący, czy allel recesywny genu. W roślinach występują oba rodzaje odporności, co należy uwzględnić przy identyfikacji markerów RAPD.

## 2. Identyfikacja markerów RAPD

Produktami amplifikacji DNA z roślin podatnej i odpornej mogą być fragmenty DNA o tej samej ruchliwości elektroforetycznej, a także fragmenty polimorficzne. Celem badań jest określenie, które z polimorficznych odcinków DNA są sprzężone z genem odporności, a które są tylko wyróżnikami indywidualnych cech poszczególnych genotypów. Nieodzowne do tego jest odpowiednie przygotowanie materiału badawczego przy zastosowaniu jednej z trzech metod:

- 1) zbiorczych pul DNA (BSA, *bulked segregant analysis*);
- 2) zrekombinowanych linii wsobnych (RILs, *recombinant inbred lines*);
- 3) linii bliskoizogenicznych (NILs, *near-isogenic lines*).

Metoda zbiorczych pul DNA obejmuje przygotowanie dwóch mieszanin DNA. Pierwsza mieszanina składa się z 10-15 połączonych ilościowo próbek DNA wyizolowanych z roślin podatnych, najczęściej pokolenia F<sub>2</sub>. Druga mieszanina zawiera DNA z roślin odpornych. Dzięki temu, że badane są mie-

szaniny DNA uzyskane z roślin selekcionowanych pod kątem jednej cechy, jest szansa wyróżnienia polimorficznych fragmentów DNA sprzężonych z genem odporności. Segregacje markera i allelu odporności w pokoleniu  $F_2$  są podstawą do określenia ich wzajemnego sprzężenia genetycznego (11). Metoda BSA, jak się okazało, była przydatna m.in. w badaniach ziemniaka, który charakteryzuje się heterozygotycznością, silną depresją wsobną i samoniezgodnością na poziomie diploidalnym. Cechy te uniemożliwiają uzyskanie linii o wysokiej homozygotyczności, poprzez krzyżowania wsteczne lub linii wsobnych.

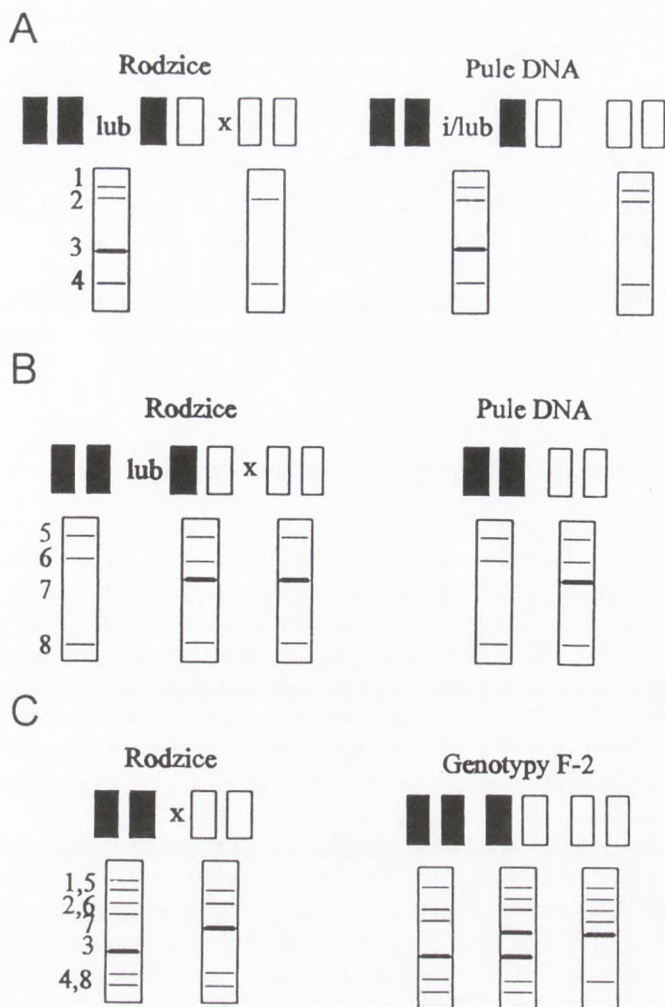
Celem metody zrekombinowanych linii wsobnych jest uzyskanie szeregu linii wsobnych roślin pokolenia  $F_2$  (12). Z takich linii, podatnych i odpornych, przygotowywane są zbiorcze pule DNA. Ich wysoka homozygotyczność może przyczynić się do zwiększenia liczby identyfikowanych markerów RAPD (13, 14).

Metoda linii bliskoizogenicznych polega na przeprowadzeniu kilku krzyżowań wstecznych w celu uzyskania linii odpornej i podatnej, stanowiących parę, o wysokiej homozygotyczności (15). Pary linii bliskoizogenicznych mogą być badane niezależnie, a także jako próby zbiorcze DNA z roślin różnych linii odpornych i podatnych. Często wykonywane są dodatkowe krzyżowania linii wsobnych. Maleje wtedy prawdopodobieństwo zakwalifikowania niespecyficznych fragmentów DNA jako markerów RAPD (16, 17). Linie bliskoizogeniczne można również otrzymać z heterogenicznych grup linii wsobnych (HIFs, *heterogeneous inbred families*) (18). Wadą metod RILs i NILs jest ich czasochłonność (6, 16). Jednakże metoda linii bliskoizogenicznych została z powodzeniem zastosowana w badaniach pomidora (19-21). Dla tego gatunku stosowano również metodę BSA (22). Przykładami zastosowania metody RILs są badania prowadzone na grochu (13, 23), fasoli (13), ryżu (14).

Identyfikacja markerów RAPD dla linii o wysokiej homozygotyczności jest prostsza niż przy wykorzystaniu metody BSA. Na rysunku 2 przedstawiono schematy postępowania przy stosowaniu metody BSA do wyróżniania markerów RAPD, z uwzględnieniem możliwości występowania badanego genu w stanie heterozygoty.

## 2.1. Odporność warunkowana przez allel dominujący

Przy wyróżnianiu markerów RAPD będących w fazie przyciągania z allelem dominującym, warunkującym odporność, pula DNA przygotowana z roślin odpornych może być mieszaniną DNA będących w stanie homozygoty i (lub) heterozygoty względem badanego locus. Natomiast pula DNA przygotowana z roślin podatnych obejmuje tylko DNA homozygotyczne względem tego locus (rys. 2A). W przypadku krzyżówki „odporny” × „podatny” potwierdzeniem markerowego charakteru wyróżnionego fragmentu DNA (prażek 3) jest jego amplifikacja dla DNA rodzica odpornego. Rodzic odporny może być przy tym w stanie homozygoty dominującej lub heterozygoty względem genu odporności. Za pomocą markerów RAPD nie można bowiem rozróżnić homozygoty i heterozygoty. Jest to powód, że określenie „dominujący” odnosi się także



Rys. 2. Schematy wyróżniania markerów RAPD będących w fazie przyciągania (A) i odpychania (B) z allelem dominującym, warunkującym odporność. Wyróżnienie heterozygoty za pomocą obu rodzajów markerów (C). Markery RAPD (prążki 3 i 7) zaznaczono pogrubioną kreską. Oznaczenia: ■■ — locus odporności w stanie homozygoty dominującej; □□ — locus odporności w stanie homozygoty resesywnej; ■□ — locus heterozygotyczny.

do markerów RAPD. Przykładem markerów kodominujących są markery RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (2). Na rysunku 2A zaznaczono również trzy inne prążki. Prążki 2 i 4 reprezentują fragmenty DNA, które są powielane dla DNA obu rodziców i puli zbiorczych. Natomiast prążek 1 reprezentuje fragment DNA, który jest wprowadzicie wyróżnikiem polimorfizmu rodziców, jednak jego amplifikacja dla DNA puli zbiorczej z roślin podatnych wskazuje, że nie jest to marker genu odporności.

Markery RAPD, które są w fazie odpychania z allelem dominującym warunkującym odporność, można zidentyfikować tylko, wówczas gdy jest możliwe przygotowanie puli DNA utworzonej z DNA roślin odpornych, będących homozygotami dominującymi względem badanego locus (rys. 2B). Wyróżnienie genotypów homozygotycznych wymaga zastosowania metod pośrednich. Jednym ze sposobów jest przeprowadzenie oceny odporności roślin pokolenia F<sub>3</sub>. Można również zastosować metodę RFLP w celu wyróżnienia z populacji F<sub>2</sub> roślin cechujących się homozygotycznym regionem genomu, obejmującym identyfikowany gen (24-27).

Markery RAPD w fazie przyciągania oraz odpychania można również zidentyfikować dla krzyżówki heterozygotycznej „odporny” x „odporny”. Wyróżnione markery badanego genu będą wtedy powielane dla DNA obu rodziców (24).

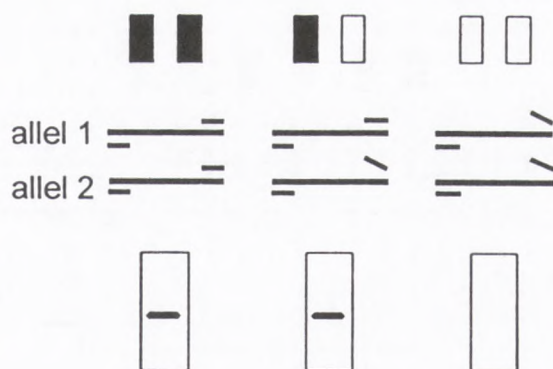
## 2.2. Odporność warunkowana przez allel recesywny

Marker RAPD będący w fazie przyciągania z allelem recesywnym warunkującym odporność jest jednocześnie w fazie odpychania z allelem dominującym tego genu. Dlatego schemat postępowania przy identyfikacji takiego markera RAPD będzie taki sam jak to przedstawiono na rysunku 2B dla markera w fazie odpychania z allelem dominującym, warunkującym odporność. Analogicznie, marker będący w fazie odpychania z allelem recesywnym warunkującym odporność występuje w fazie przyciągania z allelem dominującym, co determinuje zastosowanie procedury przedstawionej na rysunku 2A.

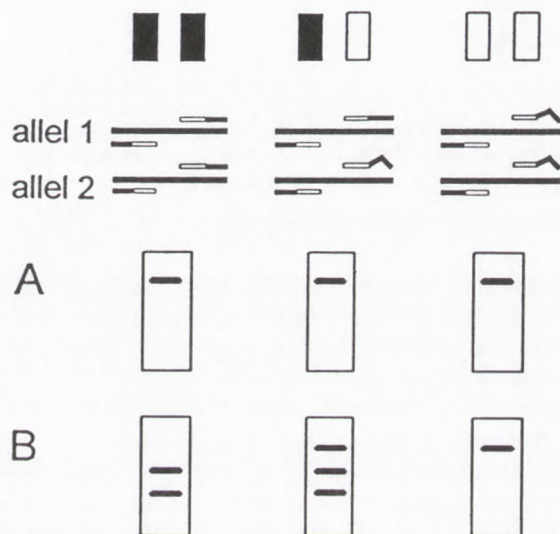
## 3. Przekształcenie markerów RAPD na markery SCAR i ASAP

Markery RAPD są dominujące, co uniemożliwia bezpośrednio wyróżnienie heterozygoty. Jest to możliwe, jeśli uda się zidentyfikować zarówno marker RAPD występujący w fazie przyciągania jak i marker w fazie odpychania z allelem warunkującym odporność, charakteryzujące się różną długością DNA (14). Amplifikacja obu markerów RAPD wskazuje na heterozygotyczny stan badanego locus (rys. 2C). Innym sposobem wyróżnienia heterozygoty jest przekształcenie markerów RAPD na markery SCAR (*sequence-characterized amplified region*) (28). Przygotowanie starterów SCAR polega na wydłużeniu 10-nukleotydowego startera RAPD o kilkanaście nukleotydów, wybranych przeważnie na podstawie sekwencji końcowych markera RAPD. Amplifikacja DNA przy użyciu starterów SCAR jest zdecydowanie bardziej specyficzna, prowadzi do zmniejszenia liczby amplifikowanych fragmentów oraz istotnej poprawy powtarzalności reakcji PCR (30).

Allele określonego locus mogą charakteryzować się występowaniem różnic, nawet punktowych, w sekwencjach nukleotydowych w obrębie miejsca wiązania startera RAPD do DNA, co może decydować o amplifikacji markera RAPD tylko dla jednego allelu (rys. 3). Użycie wydłużonych starterów SCAR może sprawić, że „błąd sekwencyjny” będzie tolerowany i nastąpi amplifikacja

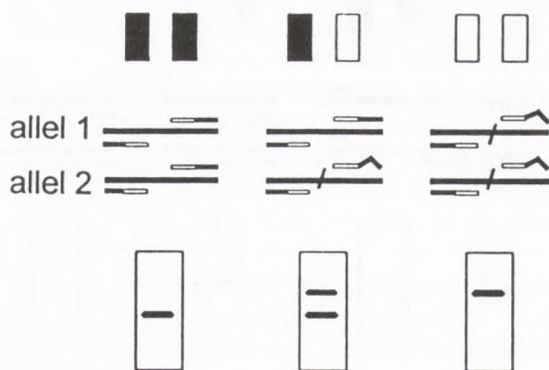


Rys. 3. Dominujący charakter markera RAPD. Oznaczenia: komplementarność sekwencji startera RAPD i DNA; brak komplementarności sekwencji startera i DNA; pozostałe jak na rys. 2.



Rys. 4. Identyfikacja markerów SCAR o jednakowej długości nukleotyduowej. Brak polimorfizmu DNA obu alleli (A). Polimorfizm DNA obu alleli ujawniony po trawieniu produktów amplifikacji DNA enzymem restrykcyjnym (B). Oznaczenia: i , startery SCAR; pozostałe jak na rys. 2.

fragmentów DNA o takiej samej długości dla obu alleli badanego locus (rys. 4A). Jednak dla takich odcinków DNA mogą również występować różnice w sekwencjach nukleotyduowych poza miejscem hybrydyzacji startera do DNA. Polimorfizm sekwencji może być wtedy ujawniony przez trawienie powielanego DNA enzymem restrykcyjnym. Wyznacznikiem heterozygoty będzie



Rys. 5. Identyfikacja markerów SCAR o różnej długości nukleotydowej. Oznaczenia:  $\diagup$  dłuższa sekwencja DNA; pozostałe jak na rys. 2 i 4.

takie spektrum fragmentów restrykcyjnych DNA, które jest sumą wszystkich prążków charakterystycznych dla obu homozygot (29) (rys. 4B). Natomiast gdy odległość między miejscami hybrydyzacji starterów SCAR do DNA obu alleli jest różna, produktami amplifikacji DNA będą dwa fragmenty o różnej długości. Będą one powielane osobno dla obu homozygot oraz razem w przypadku heterozygoty (30,31) (rys. 5). Mówimy wówczas o konwersji dominującego markera RAPD na kodominujące markery SCAR. Na rysunkach 4 i 5 zaznaczono jedynie prążki DNA sprzężone z genem odporności. W praktyce na żelu mogą występować również inne produkty amplifikacji DNA, przeważnie o słabszej intensywności, które nie są markerami SCAR.

Wówczas gdy celem badań jest wyróżnienie genotypów odpornych, bez określania czy dany locus jest w stanie homozygoty czy heterozygoty, warto podjąć próbę identyfikacji markerów ASAP (*allele-specific associated primers*). Przygotowanie starterów ASAP przebiega podobnie jak starterów SCAR. Długości starterów ASAP, przeważnie od 18 do 24 nukleotydów, są dobrane w taki sposób aby inicjować powielanie tylko jednego fragmentu DNA, który jest sprzężony z genem odporności. To z kolei umożliwia identyfikację markera ASAP bez potrzeby przeprowadzania rozdzielania elektroforetycznego, przez wybarwienie DNA bromkiem etydy, bezpośrednio w mieszaninie reakcji PCR (13,32).

#### 4. Wykorzystanie markerów w hodowli odpornościowej

W tradycyjnej hodowli roślin podniesienie odporności roślin na patogeny i szkodniki odbywa się poprzez selekcję bardziej odpornych genotypów. Selekcji dokonuje się na podstawie badań odporności w warunkach naturalnej

presji czynnika chorobotwórczego lub przynajmniej częściowo kontrolowanych. W obu przypadkach ocena odporności jest kosztowna, czasochłonna i nie zawsze skuteczna (33). Nie ma wprawdzie doniesień o odmianach wyhodowanych przy wyłącznym stosowaniu do selekcji markerów molekularnych (MAS, *marker-assisted selection*), jednak jest coraz więcej informacji o ich przydatności w hodowli odpornościowej wielu gatunków roślin (33,34). Warunkiem koniecznym do tego, aby metody stosowane w MAS były powszechnie wykorzystywane w programach hodowlanych jest silne i trwałe sprzężenie markera z genem odporności oraz możliwość oceny dużej liczby genotypów (33,35). Takie wymogi spełnia metoda RAPD, która jest procedura bezizotopową i stosunkowo tania (36). Prezentowane w tym artykule schematy, cytowane przykłady, dotyczą odporności warunkowanych przez pojedyncze geny. Metoda RAPD jest coraz częściej stosowana również w badaniach odporności warunkowanych poligenicznie (*QTL, quantitative trait loci*) (5,37-39). Markery RAPD regionu *QTL* sprzężonego z odpornością pomidora na TYLCV (*tomato yellow leaf curl virus*) są już wykorzystywane w hodowli (40).

Odporność roślin na chorobę jest często determinowana przez odrębne geny lub różne allele tego samego locus, o tej samej lub odmiennej specyficzności działania. Przykładowo, zidentyfikowano przynajmniej 15 genów specyficznych dla poszczególnych ras, mających różne pochodzenie, a decydujących o odporności sałaty na mączniaka rzekomego (*Bremia lactucae*) (41). Wyróżniono dominujące i recesywne allele determinujące odporność fasoli na wirus zwykłej mozaiki fasoli (BCMV, *bean common mosaic virus*) (32). Opisano przynajmniej 26 genów odporności pszenicy na pryszczarka heskiego (*Mayetiola destructor*) (42). Markery RAPD są bardzo często wyróżnikami tylko niektórych alleli genu odporności (41,43-46). Markery SCAR mogą spowodować identyfikację również innych alleli określonego locus (32). Markery RAPD i SCAR są stosowane do selekcji naturalnych źródeł odporności (33,43,47,48). W IHAR Młochów są one wykorzystywane w selekcji diploidalnych klonów ziemniaka z odpornością na wirus S ziemniaka (*potato virus S*), która jest warunkowana przez allel *Ns*.

Za pomocą markerów molekularnych możliwe jest równoczesne monitorowanie obecności w roślinie kilku alleli różnych genów lub alleli tego samego locus, co pozwala na prowadzenie hodowli w kierunku ich kumulacji. Tworzenie w procesie hodowli tzw. piramid genowych (*pyramiding of genes*) stwarza szansę na uzyskanie genotypów o stabilniejszej, wysokiej lub podwyższonej odporności na różne izolaty, szczepy, czy też rasy danego patogena. W konsekwencji oznacza to istotną poprawę skuteczności hodowli odpornościowej (35,42).

Autor dziękuje dr Ewie Zimnoch-Guzowskiej i doc. Jerzemu Syllerowi za uwagi oraz dr. Bogdanowi Flisowi za dyskusję.



## Literatura

1. Gresshoff P. M., (1995), *New Diagnostics in Crop Sciences*, Eds. Skerritt J. H., Appels R., CAB International, Wallingford, 101-125.
2. Marczewski W., (1995), *Postępy Biochemii*, 41(4), 237-243.
3. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Lavak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. Y., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531-6535.
4. Welsh J., McClelland M., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18, 7213-7218.
5. Waugh R., Powell W., (1992), *Trends Biotechnol.*, 10, 186-191.
6. Tingey S. V., del Tufo J. P., (1993), *Plant Physiol.*, 101, 349-352.
7. Heun M., Murphy J. P., Philips T.D., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 689-696.
8. Wei J. Z., Wang R. R. C., (1995), *Genome*, 38, 1230-1236.
9. Cooke R. J., (1995), *New Diagnostics in Crop Sciences*, Eds. Skwrriitt J. H., Spells R., CAB International, Wallingford, 33-63.
10. López-Braña I., Romero M. D., Delibes A., (1996), *Genome*, 39, 118-122.
11. Michelmore R. W., Paran I., Kesseli R. V., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9828-9832.
12. Burr B., Burr F. A., (1991), *Trends Genet.*, 7(2), 55-60.
13. Gu W. K., Weeden N. F., Yu J., Wallace D. H., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 465-470.
14. Nair S., Bentur J. S., Prasada Rao U., Mohan M., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 68-73.
15. Young N. D., Zamir D., Ganal M. W., Tanksley S. D., (1988), *Genetics*, 120, 579-585.
16. Michelmore R. W., Kesseli R. V., Francis D. M., Fortin M. G., Paran I., Yang C. H., (1992), *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*, 2, Eds. Gurr S. J., McPherson M. J., Bowles D. J., IRL Press, Oxford, 233-288.
17. Foisset N., Delourme R., Barret P., Renard M., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 756-761.
18. Tuinstra M. R., Ejeta G., Goldsbrough P. B., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 1005-1011.
19. Klein-Lankhorst R. M., Vermunt A., Weide R., Liharska T., Zabel P., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 83, 108-114.
20. Martin G. B., Williams J. G. K., Tanksley S. D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2336-2340.
21. Williamson V. M., Ho J.-Y., Wu F. F., Miller N., Kaloshian I., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 757-763.
22. Chagué V., Mercier J.C., Guénard M., de Courcel A., Vedel F., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 1045-1051.
23. Timmerman G. M., Frew T. J., Weeden N. F., Miller A. L., Goulden D. S., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 88, 1050-1055.
24. Barzen E., Stahl R., Fuchs E., Borchardt D. C., Salamini F., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 231-238.
25. Giovannoni J. J., Wing R. A., Ganal M. W., Tanksley S. D., (1991), *Nucl. Acids Res.*, 19, 6553-6558.
26. Ballvora A., Hesselbach J., Niewöhner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 249, 82-90.
27. Naqvi N. I., Bonman J. M., Mackill D. J., Nelson R. J., Chattoo B. B., (1995), *Mol. Breed.*, 1, 341-348.
28. Paran I., Michelmore R. W., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993.
29. Ohmori T., Murata M., Motoyoshi F., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 151-156.
30. Nair S., Kumar A., Srivastava M. N., Mohan M., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 660-665.
31. Naqvi N. I., Chattoo B. B., (1996), *Genome*, 39, 26-30.
32. Melotto M., Afanador L., Kelly J. D., (1996), *Genome*, 39, 1216-1219.
33. Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T. G., Yano M., Bhatia C. R., Sasaki T., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 87-103.
34. Staub J. E., Serquen F. C., Gupta M., (1996), *Hort Sci.*, 31(5), 729-741.

35. Hittalmani S., Foolad M. R., Mew T., Rodriguez R. L., Huang N., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 9-14.
36. Ragot M., Hoisington D. A., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 975-984.
37. Kutcher H. R., Bailey K. L., Rossnagel B. G., Legge W. G., (1996), *Genome*, 39, 206-215.
38. Lawson D. M., Lunde C. F., Mutschler M. A., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 307-317.
39. McNally K. L., Mutschler M. A., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 203-212.
40. Chagué V., Mercier J. C., Guénard M., de Courcel A., Vedel F., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 671-677.
41. Witsenboer H., Kesseli R. V., Fortin M. G., Stanghellini M., Michelmore R. W., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 178-188.
42. Dweikat I., Ohm H., Patterson F., Cambron S., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 94, 419-423.
43. Haley S. D., Miklas P. N., Stavely J. R., Byrum J., Kelly J. D., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 505-512.
44. Johnson E., Miklas P. N., Stavely J. R., Martinez-Cruzado J. C., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 90, 659-664.
45. Tartarini S., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 803-810.
46. Marczewski W., Ostrowska K., Zimnoch-Guzowska E., (1998), *Plant Breed.*, 117, 88-98.
47. Miklas P. N., Afanador L., Kelly J. D., (1996), *Crop Sci.*, 36, 86-90.
48. Poulsen D. M. E., Henry R. J., Johnston R. P., Irwin J. A. G., Rees R. G., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 270-273.

## Identification of RAPD markers in plants

### Summary

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) method is based on random amplification of DNA fragments, *via* PCR, using short primers of arbitrary sequence. RAPD markers have been applied to construct linkage maps, to assess genetic diversity, to study taxonomic relationships, and to tag disease resistance genes in plants. RAPD markers linked to a resistance gene can be identified using bulked segregant analysis (BSA), recombinant inbred lines (RILs) or near-isogenic lines (NILs). More reliable and specific PCR-based markers known as sequence-characterized amplified region (SCAR) and allele-specific associated primer (ASAP) were developed. There are several examples of the application of these DNA marker systems in marker-assisted plant breeding.

### Key words:

RAPD markers, BSA, RILs, NILs, disease resistance genes, plants.

### *Adres do korespondencji:*

Waldemar Marczewski, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Młochów, 05-832 Rozalin.