

## GENETSKI BILJEZI I NJIHOVA UPORABA U BILJNOJ GENETICI, OPLEMENJIVANJU I SJEMENARSTVU

Z. ŠATOVIĆ

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Zavod za sjemenarstvo

Faculty of Agronomy, University of Zagreb  
Department of Seed Science and Technology

### SAŽETAK

Genetski biljezi, a naročito DNA biljezi, se široko koriste u biljnim istraživanjima i oplemenjivanju. Dan je pregled glavnih svojstava različitih genetskih biljega, te su raspravljani načini njihove uporabe u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu.

Ključne riječi: genetski biljezi, izrada genetskih karata, odabir pomoću biljega

### UVOD

Genskim biljegom (genski marker; *genetic marker*) smatramo bilo koji ulomak DNA koji pokazuje neki oblik uočljivog polimorfizma između analiziranih jedinki. Genski biljezi nisu nužno geni u strogom smislu definicije gena, no takovima se mogu smatrati tijekom analize jer se nasljeđuju po istim načelima. Zato se različiti oblici biljega nazivaju alelima, a mjesto biljega na kromosomu lokusom. Isto tako, kombinaciju alela biljega određene jedinke nazivamo fenotipom odnosno genotipom biljega.

Osnovna svojstva idealnog sustava genskih biljega mogla bi se sažeti na sljedeći način (Arús i Moreno-González, 1993): (1) Brzo i lako uočavanje svih genotipskih klasa biljega; (2) Mogućnost ranog uočavanje biljega tijekom rasta i razvitka biljke; (3) Nazočnost određenog alela biljega ne utječe na normalan rast i razvitak biljke; (4) Biljeg ne pokazuje interakciju s drugim biljezima, penetracija je potpuna, a ekspresija stabilna.

Uporabna vrijednost određenog biljega odnosno sustava genskih biljega ovisi uvelike i o vrsti koja se ispituje kao i o cilju istraživanja, no općenito govoreći od konkretnog se biljega (sustava genskih biljega) u praksi traži također i (Weeden et al., 1991): (1) Pouzdanost (ponovljivost) i univerzalnost; (2) Visoka razina uočenog polimorfizma između analiziranih jedinki; (3)

Zanimljiva pozicija na genskoj karti odnosno postojanje veze između biljega i gena za svojstvo koje nas zanima.

Važno je napomenuti da se po definiciji svi funkcionalni geni koji uzrokuju jasne fenotipske razlike između jedinki također mogu koristiti kao biljezi. Takovi se geni odnosno svojstva koja kodiraju često nazivaju morfološkim biljezima i u tu su svrhu bili i korišteni u mnogobrojnim genetskim istraživanjima, te u oplemenjivanju bilja i sjemenarstvu.

## VRSTE GENSKIH BILJEGA

Genske biljege možemo podijeliti na morfološke i molekularne.

### *1. Morfološki biljezi*

Prvi korišteni biljezi bili su morfološki tj. bila su to lakouočljiva morfološka svojstva monogenskog tipa nasljeđivanja. U većini se slučajeva tu radi o morfološkim mutacijama koje nastaju spontano u prirodi ili su inducirane mutagenezom (Weeden, 1991). Morfološki biljezi se ponekad nazivaju i fenotipskim biljezima.

Najvažnija svojstva morfološkim biljega su sljedeća: (1) U većini se slučajeva lako uočavaju, no često na razini cjelokupne biljke, a u mnogim slučajevima samo u određenim stadijima rasta i razvitka; (2) Pokazuju tipično mendelsko razdvajanje, no u većini su slučajeva dominantni što otežava fenotipsko razlikovanje svih genotipskih klasa; (3) Utječu na morfologiju i fiziologiju biljke. Kod nekih taj je utjecaj toliki da priječi njihovu uporabu u oplemenjivanju (npr. patuljavost, albinizam, unifoliata itd.), a u mnogim je slučajevima u suprotnosti s ciljevima oplemenjivanja i potrebama proizvođača; (4) Između gena za morfološka svojstva mogu se zamijetiti mnogi tipovi epistatičkih interakcija koji kompliciraju analizu razdvajanja i smanjuju broj genotipskih klasa koje se mogu uočiti; (5) Neki geni za morfološka svojstva ne pokazuju potpunu penetraciju ili imaju nestalnu ekspresiju što ovisi o genetskom zaleđu (*genetic background*) jedinke, te o interakciji s okolišem što povećava mogućnost krive genotipske klasifikacije pojedinih jedinki; (6) Broj upotrebljivih morfoloških biljega unutar određene vrste je ograničen. Štoviše, iz gore navedenih razloga mnogi se morfološki biljezi ne mogu usporedo pratiti i analizirati u istoj generaciji razdvajanja. Stoga je relativno mala vjerojatnost pronalaska morfološkog biljega koji je usko vezan za gen koji kodira određeno zanimljivo svojstvo.

Iako ova svojstva morfoloških biljega govore o ograničenim mogućnostima njihove uporabe oni se i danas često koriste u različite svrhe. Opisi svojstava primki banaka gena u svrhu njihovog razlikovanja i klasificiranja i danas se u

većini slučajeva temelje na morfološkim biljezima. Liste deskriptora pripremljene od strane Međunarodnog instituta za biljne genetske izvore (International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI) kao i liste deskriptora pojedinačnih banaka gena, te one pripremljene u okviru Europskog programa suradnje u svezi biljnih genetskih izvora (European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks - ECP/GR) uglavnom se sastoje od morfoloških biljega.

Isto tako, morfološki se biljezi koriste i pri opisu svojstava novonastalih kultivara. Preporuke za provođenje testova različitosti, ujednačenosti i stabilnosti (Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability - tzv. DUS testing) Međunarodnog udruženja za zaštitu novih kultivara bilja (International Union for the Protection of New Varieties of Plants - UPOV) također se temelje prvenstveno na morfološkim biljezima.

Uloga morfoloških biljega je još uvijek znatna i u oplemenjivačkim programima u svrhu kontrole križanja (naročito povratnih križanja) i nadzora razdvajajućih generacija. U razvitku genskih karata mnogobrojnih biljnih vrsta često se uključuju i morfološki biljezi u svrhu nadzora ishodišne populacije i razdvajajućih generacije pri izradi karata.

Uporabu morfoloških biljega u uočavanju lokusa za kvantitativna svojstva (Quantitative Traits Loci - QTLs) predložio je Sax (1923) uočavajući vezu između boje sjemene ljuske graha (*Phaseolus vulgaris* L.) i veličine sjemena, dok je Smith (1937. prema Burr et al., 1983) pokazao vezu između boje cvijeta i veličine latica kod duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Bilo kako bilo, danas su morfološki biljezi u analizi lokusa za kvantitativna svojstva u potpunosti zamijenjeni molekularnima.

## 2. Molekularni biljezi

Molekularne biljege možemo podijeliti u dvije skupine: izoenzimski biljezi i DNA biljezi.

### 2.1 Izoenzimski biljezi

Izoenzimi se definiraju kao različiti molekularni oblici istog enzima koji djeluju na isti supstrat (tj. kataliziraju istu biokemijsku reakciju), ali se razlikuju po električnom naboju. Ako se biljni ekstrakt smjesti na škrobni ili poliakrilamidni gel na koji djeluje električno polje doći će do razdvajanja molekula bjelančevina ovisno o njihovom naboju i kiselosti sredine. Budući da su enzimi bjelančevine oni izravno odražavaju promjene nastale u sekvenci DNA mijenjajući sastav amino-kiselina. Promjene u aminokiselinskom sastavu često preinačuju naboj, a time i elektroforetsku pokretljivost određenog izoenzima. Bez obzira na zalihost genetskog koda (tj. postojanje različitih tripleta baza koji kodiraju istu amino-

kiselinu), te mogućnost zamjene jedne amino-kiseline drugom, a da se cjelokupni električni naboj enzima ne promijeni, izoenzimi su se pokazali vrlo dobrom metodom analize za najrazličitija istraživanja (Shields et al., 1983; Kephart, 1990).

Nakon bojenja metodama koje su specifične za određeni enzimski sustav na gelu može se uočiti elektroforetički fenotip koji se obično sastoji od jedne ili više obojenih traka svojstvenih određenom organizmu, tkivu i enzimu. Broj uočenih traka nekog enzimskog sustava ovisit će o broju kodirajućih gena, alelnom stanju jedinke (homozigot ili heterozigot), kvartarnoj strukturi izoenzima kao i o staničnoj organeli u kojoj se izoenzimi nalaze. Ukoliko su različite trake kodirane alelima istog lokusa nazivaju se aloenzimima odnosno alozimima (Shaw i Prasad, 1970; Wendel i Weeden, 1989).

Alozimi se obično nasljeđuju kodominantno tako da jedinka nastala križanjem homozigotnih roditelja koji nose različite alele određenog izoenzimskog gena posjeduje obje roditeljske trake. No, u  $F_1$  generaciji mogu se pojaviti i hibridne trake koje nisu uočene niti u jednom od roditelja, a čiji broj ovisi o kvartarnoj strukturi izoenzima. Hibridne trake u pravilu imaju intermedijarnu elektroforetičku pokretljivost. Kvartarna struktura označava broj podjedinica od kojih je određeni aktivni enzim sastavljen tako da razlikujemo monomerne, dimerne, tetramerne i heksamerne izoenzime. Stoga dimerni će izoenzimi u  $F_1$  generaciji biti predstavljeni s tri trake (dvije roditeljske homodimerne trake, te jednom heterodimernom hibridnom trakom), a tetramerni s pet: dvije homotetramerne (AAAA, BBBB) i tri heterotetramerne (AAAB, AABB, ABBB). Mnogi enzimski sustavi se sastoje od više izoenzima koji su kodirani različitim genima. Ukoliko se navedeni izoenzimi nalaze u istoj staničnoj organeli postoji mogućnost slučajnog spajanja podjedinica kodiranih alelima različitih gena u aktivne enzime. Tako nastaju intergenski heteromultimeri za razliku od intragenskih koji su proizvodi spajanja podjedinica kodiranih različitim alelima istog gena (Tanksley, 1983a; Weeden i Wendel, 1989).

Jedno od mogućih objašnjenja postojanja više izoenzima koji kataliziraju istu biokemijsku reakciju je različita stanična lokacija pojedinih izoenzima. Mnogi se enzimski sustavi sastoje od više izoenzima koji se nalaze u citosolu, plastidima i mitohondriju. U navedenim organelama je različita koncentracija metabolita i pH tako da su specifični izoenzimi potrebni za učinkovitu katalizu. Bez obzira na mjesto djelovanja izoenzima geni koji ih kodiraju nalaze se u jezgri a ne u organelama. Jedina je iznimka izoenzim ribulaza bifosfataza karboksilaza (RUBISCO) čiju manju podjedinicu kodira gen jezgrine DNA, a veću gen plastidne DNA. Važno je napomenuti da nemogućnost tvorbe intergenskih multimera ne dokazuje različitu staničnu lokaciju izoenzima jer postoje i izoenzimi koji se nalaze u istoj staničnoj organeli ali ne tvore multimerne proizvode (Weeden i Wendel, 1989).

Imajući na umu navedena svojstva enzimskih sustava (broj gena, alelna stanje, kvartarna struktura, stanična lokacija) određivanje genetske osnove elektroforetskih fenotipova katkad je otežano zbog različitih pojava. Heterodimeri ne moraju pokazivati intermedijarnu pokretljivost, a u krajnjem slučaju mogu imati manju ili veću pokretljivost od oba homodimera. Neki izoenzimi posjeduju alele koji kodiraju proizvode bez enzimatske aktivnosti, te ih nazivamo nulnim (*null*) alelima. često je primjećena pojava dvostrukih ili višestrukih traka koji se genetski ponašaju kao jedinstveni aleli, a u praksi se nazivaju trakama 'sjenama' (*shadow band*) ili pak trakama 'duhovima' (*ghost band*). U mnogim je slučajevima sa sigurnošću dokazano da se tu ne radi o udvostručenim genima, no pravi razlog ovoj pojavi nije do kraja razjašnjen. Moguća objašnjenja su poslijetranslacijske promjene *in vivo* ili pak promjene u kemijskim uvjetima ili strukturi enzima *in vitro*.

Unatoč navedenim problemima izoenzimi se vrlo često koriste kao genski biljezi. Svojstva izoenzima kao genskih biljega su stoga sljedeća: (1) Polimorfizam izoenzimskih biljega može se analizirati na različitim biljnim organima (pelud, sjeme, korijen, list, plod), no elektroforetički fenotip nije uvijek istovjetan; (2) Pokazuju tipično mendelijansko razdvajanje i u većini su slučajeva kodominantni; (3) Ne utječu na morfologiju niti fiziologiju biljke, ne ulaze u epistatičke interakcije s drugim biljezima, a okolišni uvjeti ne utječu na njihovu ekspresiju; (4) Metode bojenja su specifične za određeni enzim; (5) Kao i u slučaju morfoloških biljega broj izoenzimskih biljega koje je moguće otkriti u određenom biljnom materijalu u većini je slučajeva prenizak za izradu genetske karte (Weeden i Wendel, 1989).

## 2.2 DNA biljezi

DNA biljezi otkrivaju genetsku varijabilnost izravno na razini DNA. Razvitak i uporaba DNA biljega temelji se na vrlo značajnim okrićima molekularne genetike kao što su restrikcijski enzimi, lančana reakcija polimerazom, te mikrosateliti. Danas postoji velik broj različitih tehnika molekularne genetike koje imaju za cilj tvorbu velikog broja lakouočljivih i jeftinih i ponovljivih biljega. Tehnike se mogu podijeliti u četiri skupine:

2.2.1 Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP*)

2.2.2 Slučajno amplificirana polimorfna DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD*)

2.2.3 Ponavljajuće jednostavne sekvence (*Simple Sequence Repeats - SSR*)

2.2.4 Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka (*Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP*)

### 2.2.1 Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (*RFLP*)

Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP*) je tehnika koja se temelji na otkriću restrikcijskih enzima endonukleaza. Endonukleaze imaju sposobnost rezanja dvostrukog lanca DNA. Pojedina endonukleaza prepoznaje specifičan ulomak dužine četiri do šest parova baza omeđen mjestima restrikcije. Budući da se mjesta restrikcije javljaju posvuda po genomu primjena restrikcijskih endonukleaza na cjelokupnu genomsku DNA uzrokuje rezanje DNA na milijune ulomaka. Frekvencija pojave mjesta restrikcije ovisi o restrikcijskom enzimu i biljnoj vrsti. Ulomci DNA dobiveni restrikcijom pomoću specifičnog enzima bit će različitih dužina (odnosno molekularnih težina) tako da ih je moguće odijeliti pomoću elektroforeze. Identifikacija genomskih DNA ulomaka provodi se tehnikom preslikavanja (*'bugaćenja'*) po Southernu (*Southern blotting*). Ulomci DNA odvojeni elektroforezom prenose se na nitrocelulozni ili najlonski filter te se hibridiziraju s sondom (*probe*). Sonde su obično kratki (500 do 3,000 parova baza) klonirani ulomci DNA koji mogu sadržavati ulomak određenog kloniranog gena ili pak biti nepoznati ulomci genomske DNA. Nakon hibridizacije koja se temelji na komplementarnom spajanju parova baza sonde i ulomaka DNA *RFLP* fenotip možemo uočiti radiografijom (u slučaju radioaktivno označenih sondi) ili nakon uranjanja u niz specifičnih kemijskih otopina (u slučaju kolorimetrijski označenih sondi). *RFLP* fenotip bit će vidljiv kao jedna ili niz traka koje će označavati ulomke koji su se hibridizirali s sondom. Specifične kombinacije restrikcijskih enzima i sondi dat će ponovljive *RFLP* fenotipove za određenu jedinku. Razlike između jedinki proizaći će iz razlika u ulomku na mjestima restrikcije (onemogućavajući restrikciju na određenom mjestu) ili pak u dužini ulomka DNA između dvaju mjesta restrikcije (Burr et al., 1983; Paterson et al., 1988; Tanksley et al., 1989).

Glavna svojstva *RFLP* biljega su sljedeća: (1) Mogu se uočiti na uzorku DNA bilo kojeg tkiva i u bilo kojem razvojnom stadiju biljke; (2) Potrebna je relativno velika količina DNA (od 5 do 10  $\mu\text{g}$ ) visoke kakvoće pri čemu u nekim slučajevima pojava polifenola i polisaharida ograničavanje njihovu uporabu; (3) Pokazuju kodominantno nasljeđivanje; (4) Budući da se digestijom genomske DNA eukariota restrikcijskim enzimima prosječno može dobiti  $10^6$  ulomaka, a dosad je opisano preko 100 restrikcijskih enzima potencijalan broj *RFLP* biljega određene biljne vrste je praktično beskonačan; (5) Vrlo su pouzdani tako da ista kombinacija sonde i enzima na istim uzorcima daje potpuno iste rezultate kad se ispituje u različitim laboratorijima tako da je vrlo lako razmjenjivati podatke i objedinjavati rezultate različitih istraživanja; (6) Ukoliko ne postoje opisane sonde za određenu biljnu vrstu nove se sonde moraju izolirati iz DNA kolekcija

što iziskuje stručnost i troškove. U nekim se slučajevima mogu koristiti sonde srodnih vrsta (heterologne sonde), a uspješnost sondi razmjerna je srodnosti vrsta; (7) *RFLP* biljezi iziskuju relativno mnogo vremena, teško je automatizirati postupak, a troškovi istraživanja su relativno visoki; (8) Dodatni problem je radioaktivnost ukoliko se koriste radioaktivno označene sonde.

### 2.2.2 Slučajno amplificirana polimorfna DNA (*RAPD*)

Okrićem lančane reakcije polimerazom (Saiki et al., 1985; Mullis i Faloona, 1987) došlo je do razvitka brojnih tehnika za izradu genskih biljega koje katkad skupno nazivaju *MAAP* tehnikama (*Multiple Arbitrary Primed PCR* - Višestruka proizvoljna lančana reakcija polimerazom) (Caetano-Annoles, 1994). Sve se tehnike temelje na uporabi klica (početnica; *primer*) – oligomernih ulomaka DNA proizvoljne sekvence - u lančanoj reakciji polimerazom. Tehnike se razlikuju u točnom postupku provedbe, a nazivaju se: *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Slučajno amplificirana polimorfna DNA) (Williams et al., 1990.), *AP-PCR* (*Arbitrary primed PCR* - Proizvoljna lančana reakcija polimerazom) (Welsh i McClelland, 1990), te *DAF* (*DNA Amplification Fingerprinting* - Izrada amplifikacijskog otiska DNA) (Caetano-Annoles, 1994).

Uz pomoć lančane reakcije polimerazom (*Polymerase Chain Reaction* - *PCR*) moguće je proizvesti veliki broj kopija određene kromosomske regije omeđene ulomcima DNA komplementarnima korištenim klicama, te je tako učiniti vidljivom na gelu. Identifikacija *RAPD* biljega podrazumjeva uporabu proizvoljnih klica (ulomak DNA obično dužine od 10 slučajno odabranih nukleotida) što rezultira mnogobrojnim amplificiranim regijama. *RAPD* biljezi imaju dominantnu ekspresiju jer nije moguće razlikovati da li se ulomak DNA koji se amplificirao nalazi na samo jednom kromosomu (u slučaju heterozigota) ili na oba (u slučaju homozigota).

Tehnologija analize *RAPD* biljega je dostupnija oplemenjivačima i sjemenarima jer ima niz prednosti pred *RFLP* biljezima (Helentjaris, 1989), a te su sljedeće: (1) Potreban je znatno manji uzorak DNA (10-40 ng) nego kod *RFLP* (5-10 µg); (2) Sonde koje se upotrebljavaju za *RFLP* su specifične ovisno o vrsti (ili pak skupini srodnih vrsta) dok su klice za *RAPD* slučajne sekvence i mogu se upotrebljavati na svim vrstama; (3) Proces je jednostavniji i brži; (4) Laboratorijska oprema je jeftinija; (5) Sigurniji je jer se ne rabi radioaktivnost kao kod nekih *RFLP* metoda; (6) *RAPD* su često vrlo polimorfni i broj koji se može uočiti je praktički beskonačan.

Postoji niz metoda koje se također temelje na lančanoj reakciji polimerazom (*PCR*) i vrlo su srodne *RAPD* sustavu genskih biljega, od kojih su najkorištenije *SCAR*, *ASAP*, *SPAR* i *CAPS*.

#### 2.2.2.1 Amplificirane regije svojstvene sekvence (*SCAR*)

*SCAR* biljezi (*Sequence Characterized Amplified Regions* - Amplificirane regije svojstvene sekvence) se temelje na *RAPD* biljezima uz neke dodatne preinake (Paran i Michelmore, 1993). Postupak se sastoji od kloniranja i sekvencioniranja krajeva amplificiranih *RAPD* proizvoda. Poznavanje sekvence na krajevima *RAPD* proizvoda omogućava tvorbu 24-mernih oligonukleotidnih klica. Uporabom dvaju usmjerenih 24-mernih klica doći će do amplifikacije jedne jedine trake koja će imati istu molekularnu težinu kao i klonirani *RAPD* ulomak. Polimorfizam će se u ovom slučaju uočiti kao nazočnost ili odsustvo trake ili će se pojaviti razlike u veličini amplificiranog ulomka. Polimorfizam duljine amplificiranog ulomka čest je slučaj pri uporabi ove tehnike tako da se dominantni *RAPD* biljezi mogu preinačiti u kodominantne *SCAR* biljege.

#### 2.2.2.2 Alelno specifične klice (*ASAP*)

*ASAP* (*Allele-Specific Associated Primers* - Alelno specifične klice) je vrlo skorašnja preinaka koja se također temelji na *PCR* tehnologiji, a slična je *SCAR* biljezima (Gu et al., 1995; Timmerman et al., 1994). Nakon amplifikacije *RAPD* proizvoda, njegovog kloniranja, te sekvencioniranja krajeva *RAPD* ulomaka konstruira se klica specifična za određeni alel gena koji nas zanima. Uporabom *ASAP* klica amplificira se samo jedan DNA ulomak obično koristeći više temperature spajanja. Ulomak DNA je nazočan samo kod onih jedinki koje nose određeni alel tako da odvajanje DNA ulomaka elektroforezom nije potrebno. Stoga su *ASAP* biljezi mnogo pouzdaniji od *RAPD* biljega i vrlo su pogodni za brzu analizu velikog broja jedinki u svrhu odabira onih koje imaju specifični alel određenog gena.

#### 2.2.2.3 Reakcija amplifikacije uporabom jedne klice (*SPAR*)

*SPAR* biljezi (*Single Primer Amplification Reaction* - Reakcija amplifikacije uporabom jedne klice) također se temelje na *RAPD* sustavu genskih biljega, no klice koji se koriste za dobivanje *SPAR* biljega su ponavljajuće jednostavne sekvence odnosno mikrosateliti Švidi pod (B.2.3) Ponavljajuće jednostavne sekvence (*Simple Sequence Repeats* - *SSRs*) Ć. Gupta et al. (1994) su koristili klice dužine 16 do 29 parova baza koji su se sastojali od di-, tri-, tetra- i pentanukleotidnih ponavljajućih sekvence i zaključili da tetranukleotidne ponavljajuće sekvence amplificiraju najveći broj polimorfnih proizvoda. Isto tako, moguće je koristiti istovremeno dvije različite klice pri čemu se također može uočiti visoka razina polimorfizma. Ista je tehnika poznata pod imenom *MP-PCR* (*Microsatellite-primed PCR* - Lančana reakcija polimerazom uz pomoć klica komplementarnih mikrosatelitskim sekvencama) (Weising et al., 1995).



Ponešto kompliciranija tehnika koja uključuje *PCR* amplifikaciju uz pomoć klica slučajno odabranih sekvenci ili pak sekvenci komplementarnih mikrosatelitima, a nakon toga elektroforetičko razdvajanje amplificiranih proizvoda te hibridizaciju radioaktivnim sondama koje se sastoje od mono-, tri- ili tetranukleotidnih ponavljajućih sekvenci naziva se *RAMPO* (*Random-amplified microsatellite polymorphism* - Polimorfizam slučajno amplificiranih mikrosatelita) (Richardson et al., 1995; Ramser et al., 1997).

*SPAR* biljezi ima slične prednosti i nedostatke kao i *RAPD* biljezi, no uočeno je da se katkad nasljeđuju kodominantno. Njihova je prednost pred *SSR* biljezima što nije potrebno znati sekvencu koja omeđuje ponavljajuću regiju u izradi klica već se sekvence klica slučajno odabiru. Uporabom različitih ponavljajućih sekvence broj klica koje je moguće izraditi na ovaj način praktički je neograničen.

#### 2.2.2.4 Izrezane polimorfne amplificirane sekvence (*CAPS*)

*CAPS* sustav genskih biljega (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* - Izrezane polimorfne amplificirane sekvence) temelji se na kombinaciji *PCR* i *RFLP* tehnike, a sastoji se od amplifikacije ulomaka pomoću klica poznate sekvence u lančanoj reakciji polimerazom, te digestijom amplificiranih ulomaka pomoću restrikcijskih enzima (Konieczny i Ausubel, 1993). Sekvence klica su u tom slučaju već otprije poznate sekvence gena. Iako bi se *CAPS* biljezi jednostavno i učinkovito mogli analizirati naročito kod vrsta kod kojih postoji mnogo informacija o DNA sekvencama, *CAPS* biljezi se relativno rijetko koriste.

#### 2.2.3 Ponavljajuće jednostavne sekvence (*SSRs*)

Uočeno je da se u genomu viših organizama često javljaju vrlo varijabilne regije koje se sastoje od ponavljajućih DNA sekvenci različitih dužina. Sustavi genskih biljega koji se temelje na polimorfizmu broja ponavljajućih sekvenci poznati su pod imenom *VNTRs* (*Variable Number of Tandem Repeats* - Promjenjiv broj tandemnih ponavljanja).

Ovisno o dužini ponavljajuće jedinice možemo razlikovati dvije vrste ovog polimorfizma: (1) minisateliti kod kojih se osnovna ponavljajuća jedinica sastoji od oko 16 do 100 parova baza (Karp et al., 1997), a kao sustav genskih biljega koristili su ih Fregau i Fourney (1993. prema Staub et al., 1996) kod kralježnjaka pod nazivom *AMP-FLPs* (*Amplified Fragment Length Polymorphisms* - Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka), te (2) mikrosateliti kod kojih se osnovna ponavljajuća jedinica sastoji od dva do osam parova baza (češće od dva do pet), a kao sustav genskih biljega koristili su ih Frageau i Fourney (1993. prema Staub et al., 1996) kod kralježnjaka pod nazivom *STRs* (*Short Tandem Repeats* - Kratka tandemna ponavljanja) kao i Akkaya et al. (1992)

kod soje (*Glycine max* L./ Merr.) te i mnogi drugi (npr. Rafalski i Tingey, 1993; Morgante i Olivieri, 1993; Wang et al., 1994; Rongwen et al., 1995) češće pod nazivom *SSRs* (*Simple Sequence Repeats* - Ponavljajuće jednostavne sekvence) ili pak *STMS* (*Sequence-tagged microsatellite sites* - Mikrosateliti označeni poznatim sekvencama) (Beckman i Soller, 1990. prema Karp et al., 1997).

U izradi klica za otkrivanje polimorfizma u dužini ponavljajućih sekvenci koriste se nukleotidne sekvence koje omeđuju ponavljajuću regiju. Nakon *PCR* amplifikacije pojavljuju se trake različite molekularne težine. Kod biljaka se *SSR* u prosjeku javljaju svakih 33.2 kb jezgrine DNA dok su kod sisavaca puno češći i javljaju se prosječna na svakih 6 kb (Wang et al., 1994). Najčešće su dinukleotidne ponavljajuće sekvence i to  $(AT)_n$  kod biljaka (Morgante i Olivieri, 1993) odnosno  $(AC)_n$  i  $(TC)_n$  kod sisavaca (Mohan et al., 1997).

Ova je tehnika vrlo ponovljiva i pouzdana, a razina polimorfizma koju je moguće otkriti je vrlo visoka. Budući da se temelji na polimorfizmu dužine amplificiranog ulomka (tj. o broju ponavljajućih sekvenci u amplificiranom ulomku) koristi se kao kodominantni biljeg. Potrebna količina DNA se kreće od 50 do 100 ng. No, za njihovu uporabu prvo je potrebno znati nukleotidnu sekvencu na krajevima ponavljajuće regije što je zahtijeva znatniju opremu i stručnost. Jednom poznate, sekvence se objavljuju u znanstvenim časopisima tako da ih je moguće koristiti u daljnjim istraživanjima, no tada su u većini slučajeva učinkovite su samo za određenu biljnu vrstu ili skupinu srodnih vrsta.

Ponavljajuće se sekvence također mogu koristiti kao sonde za hibridizaciju genomske DNA nakon digestije restrikcijskim enzimima (kao kod *RFLP* biljega) (Beyermann et al., 1992).

#### 2.2.4 Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka (*AFLP*)

Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - *AFLP*) najnovija je tehnika tvorbe genskih biljega koja se temelji na kombinaciji *RFLP* i *RAPD* tehnike. Radi se o selektivnoj *PCR* amplifikaciji restrikcijskih ulomaka nastalih digestijom genomske DNA. Ovaj postupak uključuje tri faze: (1) restrikcija DNA endonukleazama i spajanje (ligacija) oligonukleotidnih adaptera; (2) selektivna amplifikacija restrikcijskih ulomaka; (3) elektroforeza amplificiranih ulomaka. Cjelokupna genomska DNA se digestira obično s dva enzima: *rijetkim rezačem* ('*rare cutter*' - restrikcijski enzim čija se mjesta restrikcije rijetko javljaju u genomu tako da restrikcijom nastaje manji broj ulomaka veće molekularne težine - npr. *Eco RI*) i *čestim rezačem* ('*frequent cutter*' - restrikcijski enzim čija se mjesta restrikcije često javljaju u genomu tako da restrikcijom nastaje veći broj ulomaka manje molekularne težine - npr. *Mse I*). Nakon digestije se uporabom enzima ligaze na krajeve restrikcijskih ulomaka spajaju *adapteri* - ulomci DNA dužine petnaestak

parova baza poznate sekvence. Adapteri su potrebni budući da su sekvence mjesta restrikcije na krajevima ulomaka prekratke za izradu klica. No, *PCR* amplifikacija restrikcijskih ulomaka pomoću klica čija se sekvenca sastoji od sekvence mjesta restrikcije i sekvence adaptera obično je vrlo neselektivna tako da se javlja previše amplificiranih ulomaka koje je nemoguće razdvojiti na gelu. Zato se na krajeve klica proizvoljno dodaje jedan do četiri nukleotida. U ovom će se slučaju amplificirati samo oni ulomci koji su s klicom komplementarni ne samo u adaptoru koji se nalaze na njihovim krajevima već i u jednoj do četiri dodatna nukleotida. Što je broj dodatnih nukleotida veći amplificirat će se manji broj ulomaka. Amplificirani se ulomci mogu učiniti vidljivim bojenjem srebrom (*'silver staining'*), fluorescentnim bojenjem ili pak uporabom radioaktivnih sonda (Vos et al., 1995; Paterson, 1996).

Teoretski gledano, ovom se tehnikom mogu otkriti polimorfizmi uzrokovani točkastim mutacijama na mjestima restrikcije ili na dodatnim nukleotidima (što se uočava kao nazočnost ili odsutnost trake) ili pak pojavom insercija / delecija unutar restrikcijskih ulomaka (pojava traka različite elektroforetičke pokretljivosti). Iako je tehnika nazvana polimorfizmom dužine amplificiranih ulomaka kasnije je uočeno da je uglavnom moguće uočiti i analizirati polimorfizme u nazočnosti ili odsutnosti trake.

*AFLP* tehnika se pokazala vrlo učinkovitima za najrazličitija genetska istraživanja. Ova tehnika zahtijeva manje rada od *RFLP* analize, te je obično moguće otkriti više polimorfizama u pojedinačnoj analizi. Pouzdanija je od *RAPD* tehnike i nije potrebno poznavati određene sekvence genoma unaprijed kao što je to slučaj kod *SSR*.

*AFLP* se obično analiziraju kao dominantni biljezi iako se heterozigotne jedinice od homozigotnih mogu razlikovati po intenzitetu traka, no to je ponešto kompliciraniji postupak. Za *AFLP* tehniku potrebna je veća količina DNA (od 0,3 do 1 µg po reakciji) nego kod *RAPD* tehnike od koje su i tehnički ponešto kompliciraniji te traže više opreme i stručnosti (Vos et al., 1995; Paterson, 1996).

## UPOTREBA GENSKIH BILJEGA

Mogućnosti uporabe genskih biljega su mnogobrojne, a istraživanja uz uporabu biljega možemo općenito podijeliti na proučavanje genetske raznolikosti i na genetsko-oplemenjivačka istraživanja u najširem smislu te riječi. Bez sumnje poznavanje genetske raznolikosti također se katkad može smatrati dijelom oplemenjivanja bilja ovisno o tome kako brzo se dobiveni rezultati mogu primijeniti u oplemenjivačkoj praksi tako da, praktično gledano, većina istraživanja sadrže sastavnice i jednog i drugog smjera.

Pri proučavanju postojeće genetske raznolikosti genetski se biljezi koriste u (1) očuvanju i uporabi biljnih genetskih izvora, (2) sistematici i populacijskoj genetici, (3) identifikaciji roditelja za buduća križanja, te u (4) identifikaciji čistih linija i kultivara.

Očuvanje i uporaba biljnih genetskih izvora jedno je od prioritarnih istraživanja danas u svijetu (FAO, 1996). Tomu je razlog rastuća svijest o potrebi očuvanja biljnog materijala za buduće generacije i o ugroženosti mnogih vrsta, lokalnih populacija / primitivnih varijeteta kao i divljih populacija (Guarino et al., 1995; Kolak i Šatović, 1995; Orlandini et al., 1996). S druge strane sve su veći problemi vezani za genetsku uniformnost i genetsku osjetljivost modernih visokoprinosnih kultivara naročito glavnih poljoprivrednih kultura (NAS, 1972). Pretpostavka je da će u budućnosti sve više oplemenjivačkih programa uključivati tzv. egzotičnu germplazmu (za razliku od elitne germoplazme na kojoj se danas temelji većina oplemenjivačkih programa na svijetu) (Goodman, 1990; Hawkes, 1990). Isto tako, sve je žešća potraga za novim izvorima prvenstveno otpornosti na bolesti i štetnike, a zatim i na različite abiotičke stresove (npr. na sušu, zaslanjenost ili kiselost tla) (Esquinas-Alcázar, 1981; Knutson i Stoner, 1989). Moguće globalne klimatske promjene pojačavaju zabrinutost za održivost poljoprivredne proizvodnje na postojeći način i uz uporabu postojećeg biljnog materijala (Frankel et al., 1995). Genetski se biljezi pritom koriste u procjeni genetske raznolikosti unutar određenog taksona, kolekcije ili pak zemljopisne regije. Genetski biljezi pomažu boljoj organizaciji programa očuvanja biljnih genetskih izvora uključujući pripremu usmjerenih prikupljačkih ekspedicija. Pomoću genetskih biljega može se provjeriti upotpunjenost određenih kolekcija i postaviti prioritete za prikupljanje. Opis i procjena svojstava primki važna su sastavnica programa očuvanja biljnih genetskih izvora koji omogućavaju veću uporabu biljnog materijala u budućim oplemenjivačkim programima. Uz tradicionalnu uporabu morfoloških svojstava pri opisu i procjeni svojstava primki mnogi programi očuvanja danas uključuju i analizu primki uz pomoć molekularnih biljega što olakšava nadzor na prikupljenim materijalom (Dixon i Bunn, 1995; Li, 1995; Ranade i Sane, 1996; Karp et al, 1997; Ayad et al., 1997). Odnedavno se genetski biljezi (naročito molekularni) koriste i pri tvorbi sržnih kolekcija (*'core collections'*) (van Hintum, 1994; Bonierbale et al., 1997)). Sržne su kolekcije sastavljene od određenih svojstvenih primki kolekcija određene biljne vrste koje sadrže maksimalnu raznolikost unutar najmanjeg mogućeg broja primki. Sržne kolekcije pospješuju uporabu biljnog materijala jer olakšavaju provedbu različitih istraživanja u svrhu pronalaženja npr. izvora otpornosti (Holbrook i Anderson, 1995). U vezi s tim je i uporaba genetskih biljega u smanjenju zalihosti unutar i između kolekcija pronalaženjem dvojnika (udvostručeni primki) koja znatno smanjuje troškove vođenja banke biljnih gena.

Programi očuvanja biljnih genetskih izvora često su povezani i s istraživanjima na području sistematike, filogenije i evolucije biljnih taksona. Klasična se sistematika temeljila isključivo na morfološkim i fiziološkim svojstvima, a razvitkom kemosistematike uključivali su se i rezultati analiza sekundarnih metabolita (flavonidi, terpenoidi itd.) (Crawford, 1990). Istraživanja uz pomoć molekularnih genskih biljega (izoenzimi i DNA biljezi) uvelike su pridonijela boljem razumijevanju evolucije i odnosa između biljnih genoma (Doebley i Wendel, 1989). Ovakova istraživanja uključuju analizu genetske različitosti (genetske udaljenosti) uz uporabu multivarijatne statističke analize (numerička taksonomija, fenetika), uspostavu klasifikacije i rekonstrukciju evolucije različitih taksona (Abo-elwafa et al., 1995; Ahmad et al., 1996; Dani et al., 1985; Ford et al., 1997; Labdi et al., 1996; Serret et al., 1997; Sharma et al., 1996; Tayyar et al., 1996, *inter alia*).

Srodnost između vrsta jasno je vidljiva i na genskim kartama, a postojanje skupina vezanih gena koje su zajedničke različitim srodnim vrstama uvelike olakšava izradu genskih karata. Brojni su primjeri očuvanja pojedinih skupina vezanih gena između različitih vrsta žitarica (Devos et al., 1992; Devos et al., 1993a; Devos et al., 1993b; Devos i Gale, 1993) kao i krupnosjemenih mahunarki (Weeden et al., 1988; Weeden et al., 1992; Torres et al., 1993b; Torres et al., 1995; Torres et al., 1998).

Također se i populacijska genetika danas služi molekularnim biljezima u određivanju genotipskih i alelnih frekvencija u biljnim populacijama kao i u proučavanjima ekozemljopisne distribucije određenog taksona te analizi prijenosa gena (*gene flow*) i evoluciji reproduktivnih barijera između taksona.

Identifikacija roditelja za buduća križanja pomoću genskih biljega obuhvaća procjenu srodnosti roditelja kao i provjeru podataka o pedigreu. Kod mnogih vrsta kod kojih se u proizvodnji iskorištava heteroza (kukuruz, sirak, riža, proso itd.) molekularni su biljezi naročito pogodni za klasifikaciju inbred linija u heterotične skupine kao i u predviđanju prinosa hibrida i boljem shvaćanju same pojave (Melchinger et al., 1990; Smith et al. 1990; Bernardo, 1994)

Brza, jeftina i točna identifikacija kultivara je vrlo važna kako pri priznavanju novostvorenih kultivara tako i u sjemenarstvu. Prema ugovoru UPOV-a iz 1991. godine kultivar se može zaštititi ako je nov, različit, ujednačen i stabilan (UPOV, 1991). Ispitivanje ovih parametara često se naziva DUS testiranje (prema *Distinctness, Uniformity, Stability*). Kao što je bilo navedeno u prethodnom poglavlju Preporuke za provođenje testova različitosti, ujednačenosti i stabilnosti se temelje prvenstveno na morfološkim svojstvima koja mogu biti kvalitativna ili kvantitativna (UPOV, 1979; Harvey, 1991). No, ova svojstva imaju ograničenu diskriminatornu sposobnost. Sve je veći broj novostverenih kultivara sličnog podrijetla tako da ih je sve teže razlikovati samo na osnovu morfoloških svojstva. Uz već navedene nedostatke morfoloških svojstava kao

genskih biljega možemo navesti i činjenicu da često ovise o subjektivnoj procjeni, a naročiti problemi se javljaju pri ispitivanju sintetičkih kultivara kao i višegodišnjih kultura (Rasmussen, 1991). U svrhu prevladavanja ovih problema molekularni se biljezi sve više koriste i u identifikaciji kultivara i to izoenzimski biljezi (Bassiri i Rouhani, 1977; Arús et al., 1985; Goodrich et al., 1985, *inter alia*), RFLP biljezi (Lebouille et al., 1989; Nagamine et al., 1989; Vaccino et al., 1993, *inter alia*), a u najnovije vrijeme i *RAPD* biljezi (Benito et al., 1993; Torres et al., 1993a; Mailer et al., 1994, *inter alia*). Molekularni će se biljezi sve više koristiti za dokazivanje 'u osnovi izvedenih kultivara' (*essentially derived variety*). Navedeni je pojam zajedno s raspravom o 'minimalnoj genetskoj udaljenosti' prvi puta uveden u ugovoru UPOV-a iz 1991. godine. Izvedeni je kultivar onaj koji ispunja sljedeće uvjete: (a) u osnovi je izveden iz ishodišnog kultivara i to naročito uporabom oplemenjivačkih metoda koje ne mijenjaju bitno genetsku strukturu ishodišnog materijala kao što su selekcija prirodnog ili induciranog mutanta, te somaklonalne varijante, povratno križanje i transformacija pomoću genetskog inženjerstva, (b) jasno se razlikuje od ishodišnog kultivara, te (c) podudara se s genotipom ishodišnog kultivara u svemu osim u specifičnim razlikovnim svojstvima koji su rezultat korištene oplemenjivačke metode (Rasmussen, 1991). Ukoliko se dokaže da je određeni novostovoreni kultivar izveden oplemenjivač takovog kultivara mora dijeliti svoju dobit s oplemenjivačem ishodišnog kultivara. Iz samog je koncepta vidljivo da se uporabom samo morfoloških svojstava u većini slučajeva neće moći donijeti odluka o izvedenosti određenog kultivara. Ispitivanje minimalne genetske udaljenosti između kultivara nije moguće na temelju postojećih listi svojstava te se u tu svrhu sve nade polažu u tehnike molekularne genetike (Šatović i Kolak, 1995).

Osim pri proučavanju postojeće genetske raznolikosti genetski se biljezi uspješno koriste i u brojnim genetsko-oplemenjivačkim istraživanjima. Kranji je cilj navedenih istraživanja odabir pomoću biljega (Marker-assisted selection - MAS). Odabir pomoću biljega je dovoljno učinkovit u određenom oplemenjivačkom programu ukoliko su ispunjeni sljedeći zahtjevi: (1) Biljeg je usko vezan za poželjni gen; (2) Moguć je brz pregled velikih populacija; (3) Tehnika je ponovljiva, jeftna i ne iziskuje visoku stručnost.

O načinu nasljeđivanja svojstva ovisi i pristup genetskoj analizi iz koje proizlaze i razlike u uporabi prilikom odabira pomoću biljega: (1) Monogenska ili oligogenska svojstva - genetska analiza svojstva određenog jednim ili malim brojem gena; (2) Poligenska svojstva - genetska analiza lokusa za kvantitativno svojstvo (*Quantitative Trait Loci* - QTLs).

U tu se svrhu izrađuju i stalno nadopunjuju genetske karte određenih biljnih vrsta koje služe kao temelj za brzu i učinkovitu lokalizaciju poželjnog gena (Burr et al., 1983; Tanksley, 1983a; Tanksley, 1983b; Helentjaris et al.,

1985). Štoviše, genetska karta koja pokriva sve regije genoma određene vrste može poslužiti za razdvajanje određenog kvantitativnog svojstva (npr. prinos) na seriju minor gena (*Quantitative Trait Loci* - QTL). Utvrđeni minor geni se mogu lokalizirati i tako uvelike olakšati odabir na dotično svojstvo (Law, 1967; Tanksley et al., 1982; Tanksley, 1993). Stoga je brzina prikupljanja informacija o genetskoj karti nužan preduvjet za primjenu odabira pomoću biljega u oplemenjivanju bilja.

Najbrojnija su istraživanja lokalizacije monogenских i oligogenских provedena u svrhu otkrivanja gena otpornosti na bolesti i štetnike, na lokalizirani su geni i za mnoga druga agronomski zanimljiva svojstva kao što su npr. samoinkompatibilnost (Labroche et al., 1983; Marx, 1986; Wricke i Wehling, 1985), muška sterilnost (Tanksley et al., 1984), osjetljivost na fotoperiod (Mackill et al., 1993), sadržaj linolenske kiseline (Brummer et al., 1995) itd.

Otpornost kulturnog bilja na mnoge bolesti i štetnike određeno je malim brojem gena što čini odabir pomoću biljega lako primjenjivim. Razdvajajuće se populacije dobivene iz križanja otpornog roditelja i osjetljivog roditelja koji ima mnoga druga poželjna svojstva prilikom klasičnog oplemenjivanja na otpornost moraju uzgajati na područjima gdje se navedeni patogen ili štetnik prirodno pojavljuje ili se pak provodi umjetna zaraza (na poljima, u stakleniku ili pojedinačnom infekcijom biljaka u kontroliranim uvjetima) (Melchinger, 1990). Navedeni postupci iziskuju mnogo vremena i troškovi su vrlo visoki. Štoviše, često pojedine osjetljive biljke ipak izbjegnu napad patogena ili štetnika što uvelike smanjuje učinkovitost ovakvog programa oplemenjivanja. Nadalje, troškovi održavanja specifičnih rasa patogena i štetnika također su vrlo visoki, a istovremeni pregled otpornosti biljaka na veći broj patogena i štetnika često nije moguć. Stoga odabir pomoću biljega za oplemenjivanje na otpornost može riješiti mnoge od navedenih problema, uključujući dakako i uporabu u kompliciranijim oplemenjivačkim programima kao što je piramidizacija gena otpornosti ili pak kreacija multilinijских kultivara.

Lokalizacija gena otpornosti bila je moguća već uporabom izoenzimских biljega. Klasičan je primjer uska veza između izoenzimskog lokusa za kiselu fosfatazu (*Aps-1*) i lokusa *Mi* koji biljkama rajčice daje otpornost na nematode (Rick i Fobes, 1974). Na temelju podataka navedenog istraživanja Messeguer et al. (1991) su pomoću RFLP biljega izradili visokosaturiranu kartu oko lokusa *Mi*. Isto tako, Weeden et al. (1984) dokazuju vezanost izoenzimskog lokusa za fosfoglukomutazu (*Pgm-p*) i lokusa *Mo* koji daje biljkama graška otpornost na virus žutog mozaika graha (Bean Yellow Mosaic Virus - BYMV), a Weeden i Provvidenti (1988) postojanje uske veze između izoenzimskog lokusa za alkoholnu dehidrogenazu (*Adh-1*) i gena otpornosti (*En*) na virus mozaika graška (Pea Enation Mosaic Virus - PEMV). Uvođenjem DNA biljega postupak je znatno ubrzan, a najviše je gena za

otpornost lokalizirano je kod riže (Yu et al., 1991; Nair et al., 1995), rajčice (Sarfatti et al., 1991; Klein-Lankhorst et al., 1991) i pšenice (Schachermayr et al., 1994; Hartl et al., 1995).

Prijenos poželjnih gena povratnim križanjima znatno je brži i učinkovitiji pomoću biljega. Povratno križanje (*Backcross* - BC) je uobičajena oplemenjivačka tehnika u svrhu prijenosa jednog ili malog broja gena u genotip koji je po svim ostalim svojstvima superioran. No, kako primarni genski skup mnogih kulturnih biljaka predstavlja samo mali dio ukupne genetske raznolikosti unutar taksona mnogi se geni otpornosti (odnosno geni za druga poželjna svojstva) nalaze samo u divljim srodnicima ili pak primitivnim varijetetima. Prijenosom poželjnog gena tako se prenose i mnogi nepoželjni te je potrebno više generacija povratnog križanja da bi se rekonstruirao genotip rekurentnog roditelja. Broj potrebnih generacija znatno je manji ukoliko se koriste genski biljezi čime se uvelike smanjuju troškovi oplemenjivačkog programa (Tanksley et al., 1989; Paterson, 1996).

Mnoga svojstva od iznimne agronomske važnosti (kao npr. prinos) kontrolirana su većim brojem gena. Oplemenjivanje tih svojstava dugoročan je proces otežan utjecajem okoliša i postojanjem interakcija između gena. Cilj genetske analize lokusa za kvantitativna svojstva (*Quantitative Trait Loci* - QTL) je određivanja broja, lokacije i načina djelovanja gena koji određuju dotično svojstvo. Sax (1923) je prvi izvjestio o postojanju veze između monogenskog biljega i kvantitativnog svojstva. Primjetio je da je kod graha (*Phaseolus vulgaris* L.) veličina sjemena povezana s bojom sjemene ljuske. QTL analiza pomoću morfoloških i izoenzimskih biljega vrlo je ograničena zbog određenih nepovoljnih svojstava tih sustava genskih biljega (utjecaj na morfologiju i fiziologiju biljke, ograničen broj itd.). Uporabom DNA biljega ovi su ograničavajući čimbenici prevladani. Razvijene su brojne statističke metode za QTL analizu koje se dijele na analizu pojedinačnih gena (*Single Point Analysis*) i analizu intervala (*Interval Mapping*) (Lander i Botstein, 1986; Lander i Botstein, 1989a i 1989b; Jensen, 1989; Moreno-Gonzalez, 1992; Darvasi i Soller, 1992; Tanksley, 1993; Jansen, 1995; Kersey i Pooni, 1996; Weir, 1996). Analiza intervala je daleko preciznija metoda no podrazumijeva postojanje visokosaturirane genske karte (genski biljezi na svakih 5 do 20 cM) kao što je to slučaj kod kukuruza i rajčice. Stoga je na navedenim kulturama provedeno i najviše istraživanja koja uključuju QTL analizu mase ploda, koncentracije topivih tvari kod rajčice, pH i prinosa kod rajčice (Paterson et al., 1988; Paterson et al., 1991) ili pak prinosa (Stuber et al., 1987) i otpornosti na kukuruznog moljca kod kukuruza (Schon et al., 1993). Od krupnosjemenih mahunarki najpreciznija je genska karta izrađena za soju na temelju koje su provedene QTL analize za svojstva kao što su sadržaj bjelančevina i ulja (Diers et al., 1992; Mansur et al., 1993).



## GENETIC MARKERS AND THEIR APPLICATION IN PLANT GENETICS, BREEDING AND SEED PRODUCTION

### SUMMARY

Genetic markers, especially DNA-based genetic markers, are widely used in plant research and breeding. Main characteristics of different marker types are reviewed and various aspects of their application in plant genetics, breeding and seed production are discussed.

Key words: genetic markers, genetic mapping, marker-assisted selection

### LITERATURA - REFERENCES

1. Abo-elwafa, A., Murai, K. i Shimada, T. 1995. Intra- and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 335-340
2. Ahmad, M., McNeil, D. L., Fautrier, A. G., Armstrong, K. F. i Paterson, A. M. 1996. Genetic relationships in *Lens* species and parentage determination of their interspecific hybrids using RAPD markers *Theor. Appl. Genet.* 92: 1091-1098
3. Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. i Cregan, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139
4. Arús, P. i Moreno-González, J. 1993. Marker-assisted selection. U: *Plant Breeding: Principles and prospects*. M.D. Hayward, N.O. Bosermark i I. Romagosa (ur.). Chapman & Hall, London, Velika Britanija. str. 314-332.
5. Arus, P. Shields, C. R. Orton, T. J. 1985 Application of isozyme electrophoresis for purity testing and cultivar identification of F<sub>1</sub> hybrids of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 34: 651-657
6. Ayad, W. G., Hodgkin, T., Jaradat, A. i Rao, V. R. 1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. IPGRI, Rim, Italija
7. Bassiri, A. i Rouhani, I. 1977. Identification of broad bean cultivars based on isoenzyme patterns. *Euphytica*. 26: 279-286.
8. Beckman, J. S. i Soller, M. 1990. Toward a unified approach to gene mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technol.* 8: 930-932
9. Benito, C. Figueiras, A. M. Zaragoza, C. Gallego, F. J. de la Pena, A. 1993 Rapid identification of *Triticeae* genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction *Plant Molecular Biology* 21: 181-183
10. Bernardo, R. 1994. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci.* 34: 20-25
11. Beyermann, B., Nuernberg, P., Weihe, A., Meixner, M., Epplen, J. T. i Boerner T. 1992. Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences *Theor. Appl. Genet.* 83: 691-694
12. Bonierbale, M., Beebe, S., Tohme, J. i Jones, P. 1997. Molecular genetic techniques in relation to sampling strategies and the development of core collections. U: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. i Rao, V. (ur.). IPGRI, Rim, Italija. str. 98-102
13. Brummer, E. C., Nickell, A. D., Wilcox, J. R. i Shoemaker R. C. 1995 Mapping the Fan locus controlling linolenic acid content in soybean oil. *J. Hered.* 86 (3): 245-247

Z. Šatović: Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu Sjemenarstvo 16(99)1-2, str. 73-95

---

14. Burr, B., Evola, S., Burr, F.A. i Beckman, J.S. 1983. The application of restriction fragment polymorphisms to plant breeding. U: Genetic Engineering: Principles and Methods, Vol. 5. J.K. Setlow i A. Halaender (ur.). Plenum Press, New York. str. 45-59.
15. Caetano-Anolles, G. 1994. MAAP - A versatile and universal tool for genome analysis. *Pl. Molec. Biol.* 25: 1011-1026
16. Crawford, D. J. 1990. Plant molecular systematics: Macromolecular approaches. John Wiley and Sons, New York, NY, SAD
17. Dani, R. G. i Murty, B. R. 1985. Genetic divergence and biology of adaptation in *Cicer arietinum* L. *Theor. Appl. Genet.* 69: 383-392
18. Darvasi, A. i Soller, M. 1992. Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor. Appl. Genet.* 85: 353-359
19. Devos, K. M. i Gale, M. D. 1993. Extended genetic maps of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 649-652
20. Devos, K. M., Atkinson, M. D., Chinoy, C. N., Francis, H. A., Harcourt, R. L., Koebner, R. M. D., Liu, C. J., Masojć, P., Xie, D. X. i Gale, M. D. 1993b. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 85: 673-680
21. Devos, K. M., Millan, T. i Gale, M. D. 1993a. Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 784-792
22. Devos, K.M., Atkinson, M.D., Chinoy, C.N., Liu, C.J. i Gale, M.D. 1992. RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 83: 931-939.
23. Diers, B. W., Keim, P., Fehr, W. R. i Shoemaker, R. C. 1992. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. *Theor. Appl. Genet.* 83: 608-612
24. Dixon K. i Bunn E. 1995. Biotechnology and the science of saving endangered plants. *Australian Biotechnology* 5(5): 300-302
25. Doebley, J. F. i Wendel, J. D. 1989. Application of RFLPs to plant systematics. U: Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Helentjaris, T. i Burr, B. (ur.). Cold Spring Harbor Laboratories, New York, SAD. str. 57-67
26. Esquinas-Alcázar, J. T. 1981. Los recursos fitogenéticos: Una inversión segura para el futuro. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, Španjolska
27. FAO 1996. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Background documentation prepared for the International Technical Conference on Plant Genetic Resources. Rim, Italija
28. Ford, R., Pang, E. C. K. i Taylor, P. W. J., 1997. Diversity analysis and species identification in *Lens* using PCR generated markers. *Euphytica* 96 (2): 247-255
29. Frankel, O. H., Brown, A. H. D. i Burdon, J. J. 1995. Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge, MA, SAD
30. Fregeau, C. J. i Fourney, R. M. 1993. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechnics* 15: 100-119
31. Goodman, M. M. 1990. Genetic and germ plasm stocks worth conserving. *J. Hered.* 81: 11-16
32. Goodrich, W. J. Cooke, R. J. Morgan, A. G. 1985 The application of electrophoresis to the characterization of cultivars of *Vicia faba* L. *FABIS Newsletter* 13: 8-11
33. Gu, W. K., Weeden, N. F., Yu, J. i Wallace D. H. 1995. Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor. Appl. Genet.* 91: 465-470
34. Guarino, L., Ramanatha Rao, V. i Reid, R. 1995. Collecting plant genetic diversity. CAB International, Wallingford, Velika Britanija
35. Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J. i Owen, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006

36. Hartl, L., Weiss, H., Stephan, U., Zeller, F. J. i Jahoor, A. 1995. Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90: 601-606
37. Harvey, J. 1991. The UPOV convention - The scope of protection and its general provisions. U: UPOV Seminar on the nature of and rationale for the protection of plant varieties under the UPOV Convention, Budimpešta 19-21. listopada 1990. UPOV, Geneva. str. 44-49
38. Hawkes, J. G. 1990. What are genetic resources and why should they be conserved. *Impact of science on society* 158: 97-106
39. Helentjaris, T. 1989. Development and applications of molecular markers to problems in plant genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
40. Helentjaris, T., King, G., Slocum, N., Siedenstrang, C. i Wegman, S. 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Pl. Mol. Biol.* 5:109-118.
41. Hintum, T. J. L. van 1994. Drowning in the genepool: managing genetic diversity in genebank collections. Disertacija. Swedish Univ. Agric. Sciences, Svalof, Švedska
42. Holbrook CC. i Anderson WF. 1995. Evaluation of a core collection to identify resistance to late leafspot peanut. *Crop Sci.* 35(6):1700-1702
43. Jansen, C. R. 1995. Genetic mapping of quantitative trait loci in plants - a novel statistical approach. Doktorska disertacija, Wageningen Agricultural University, Wageningen, Nizozemska. str. 109
44. Jensen, J. 1989. Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci. *Theor. Appl. Genet.* 78: 613-618
45. Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayad, W. G. i Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI, Rim, Italija
46. Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77(5): 693-712
47. Kersey, M. J. i Pooni, H. S. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. Chapman and Hall, London, Velika Britanija
48. Klein-Lankhorst, R., Rietveld, P., Machiels, B., Verkerk, R., Weide, R., Gebhardt, C., Kornneef, M. i Zabel, P. 1991. RFLP markers linked to the root knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 81: 661-667
49. Knutson, L. i Stoner, A. 1989. Biotic diversity and germplasm preservation: Global imperatives. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nizozemska
50. Kolak, I. i Šatović, Z. 1995. Hrvatska banka biljnih gena: Stanje i mogućnosti. *Sjemenarstvo* 6: 451-464
51. Konieczny, A. i Ausubel, F. M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4(2): 403-410
52. Labdi, M., Robertson, L. D., Singh, K. B. i Charrier, A. 1996. Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphism. *Euphytica* 88: 181-188
53. Labroche, P., Poirier-Hamon, S. i Pernes, J. 1983. Inheritance of leaf peroxidase isoenzymes in *Nicotiana glauca* and linkage with the S-incompatibility locus. *Theor. Appl. Genet.* 65: 163-170.
54. Lander, E.S. i Botstein, D. 1986a. Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 7353-7357.
55. Lander, E.S. i Botstein, D. 1986b. Mapping complex genetic traits in humans: New methods using a complete RFLP linkage map. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 49-62.
56. Lander, E.S. i Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage groups. *Genetics.* 121:185-199.
57. Law, C.N. 1967. The location of factors controlling a number of quantitative characters in wheat. *Genetics* 56: 445-461.

58. Lebouille, J. L. M. Van Son, K. G. M. Hofstra, H. i Heidekamp, F. 1989 Barley variety identification by restriction fragment length polymorphism (RFLP) Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 54: 1357-1367
59. Mackill, D. J., Salam, M. A., Wang, Z. Y. i Tanksley S. D. 1993. A major photoperiod-sensitivity gene tagged with RFLP and isozyme markers in rice. Theor. Appl. Genet. 85: 536-540
60. Mailer, R. J., Scarth, R. i Fristensky, B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Theor. Appl. Genet. 87: 697-704
61. Mansur, L., Lark, K. G., Kross, H. i Oliveira, A. 1993. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morfological and seed traits of soybean (*Glycine max* /L./ Merr.). Theor. Appl. Genet. 86: 907-913
62. Marx, G.A. 1986. Linkage relations of *Curl*, *Orc* and "*Det*" with markers on chromosome 7. Pisum Newslett. 18: 45-48.
63. Melchinger, A. E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. Plant Breeding 104(1): 1-19
64. Melchinger, A. E., Lee, M., Lamkey, K. R., Hallauer, A. R. i Woodmann, W. L. 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphism and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. Theor. Appl. Genet. 80: 488-496
65. Messeguer, R., Ganai, M., de Vicente, M.C., Young, N.D., Bolkan, H. i Tanksley, S.D. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. Theor. Appl. Genet. 82: 529-536.
66. Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R. i Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding 3: 87-103
67. Moreno-Gonzalez, J. 1992. Genetic models to estimate additive and non-additive effects of marker-associated QTL using multiple regression techniques. Theor. Appl. Genet. 85: 435-444
68. Morgante, M. i Olivieri, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal 3(1): 175-182
69. Mullis, K. B. i Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350
70. Nagamine, T., Todd, G.A., McCann, K.P., Newbury, H.J., Ford-Lloyd, B.V. 1989. Use of Restriction fragment length polymorphism to fingerprint beets at the genotype and species levels. Theor. Appl. Genet. 78:847-851
71. Nair, S., Kumar, A., Srivastava, M. N. i Mohan, M. 1996. PCR-based DNA markers linked to a gall midge resistance gene, *Gm4t*, has potential for marker-aided selection in rice. Theor. Appl. Genet. 92 660-665
72. NAS 1972. Genetic vulnerability of major crops. National Acaemy of Sciences, Washington, D.C., SAD
73. Orlandini, S., Kolak, I., Šatović, Z. i Rukavina, H. 1996. Prikupljanje germplazme krupnosjemenih mahunarki za potrebe Hrvatske banke biljnih gena. Sjemenarstvo 5-6: 399-415
74. Paran, I. i Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.
75. Paterson, A. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press, San Diego, CA, SAD. str. 330
76. Paterson, A. H., Damon, S., Hewitt, J. D., Zamir, D., Rabinowitch, H. D., Lincoln, S. E., Lander, E. S. i Tanksley, S. D. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. Genetics 127: 181-197
77. Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E. i Tanksley, S.D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 335: 721-726.

78. Rafalski, J. A. i Tingey, S. V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9(8): 275-279
79. Ramser, J., Weising, K., Chikalake, V. i Kahl G. 1997. Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. *BioTechniques* 23(2): 285-290
80. Ranade, S. A. i Sane, P. V. 1996. Analysis of genetic diversity in plants with molecular techniques. *Tropical Ecology* 37(1): 31-37
81. Rasmussen, J. 1991. The UPOV Convention - The concept of variety and the technical criteria of distinctness, uniformity and stability U: UPOV Seminar on the nature of and rationale for the protection of plant varieties under UPOV Convention. UPOV Publication No. 697 : 51-57
82. Richardson, T., Cato, S., Ramser, J., Kahl, G. i Weising, K. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD - a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research* 23 (18): 3798-3799
83. Rick, C.M. i Fobes, J.F. 1974. Association of an allozyme with nematode resistance. *Rept. Tomato Coop.* 24:25.
84. Rongwen, J., Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., Lavi, U. i Cregan, P. B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90: 43-48
85. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. i Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-1354
86. Sarfatti, M., Abu-Abied, M., Katan, J. i Zamir, D. 1991. RFLP mapping of *11*, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1. *Theor. Appl. Genet.* 82: 22-26
87. Sax, K. 1923. the association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560
88. Schachermayr, G., Siedler, H., Gale, M. D., Winzeler, H. Wenzler, M. i Keller, B. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88: 110-115
89. Schon, C. C., Smith, J. S. C., Bowen, S. L., Tenborg, R. A. i Wall, S. J. 1993. Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second generation European corn borer in maize with the aid of RFLPs. *Heredity* 70: 648-659
90. Serret, M. D., Udupa, S. M. i Weigand, F. 1997. Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea using microsatellite-derived RFLP markers: Implications for origin. *Plant Breeding* 116: 573-578
91. Sharma, S. K., Knox, M. R. i Ellis, T. H. N., 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 751-758
92. Shaw, C.R. i Prasad, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. *Biochemical Genetics.* 4: 297-320.
93. Shields, C. R., Orton, T. J. i Stuber, C. W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. U: *Isozymes in Plant Genetic and Breeding, Part A.* Tanksley, S. D. i Orton, T. J. (ur.) Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Nizozemska. str. 443-468
94. Smith, O. S., Smith, J. S. C., Bowen, S. L., Tenborg, R. A. i Wall, S. J. 1990. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree,  $F_1$  grain yield, heterosis and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 80: 833-840
95. Staub, J. E., Serquen, F. C. i Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortSci.* 31(5): 729-741
96. Stuber, C.W., Edwards, M.D. i Wendel, J.F. 1987. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.* 27: 639-648.
97. Šatović, Z. i Kolak, I. 1995. Zaštita prava oplemenjivača: UPOV 1978, UPOV 1991 i hrvatsko zakonodavstvo. *Sjemenarstvo* 12 (6): 477-484

Z. Šatović: Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu  
Sjemenarstvo 16(99)1-2, str. 73-95

98. Tanksley, S.D. 1983a. Gene mapping. U: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. S.D. Tanksley i T.J. Orton (ur.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. pp. 105-138.
99. Tanksley, S.D. 1983b. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 3-8.
100. Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205-233.
101. Tanksley, S.D., Medina-Filho, H. i Rick, C.M. 1982. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity* 49: 11-25.
102. Tanksley, S.D., Rick, C.M. i Vallejos. 1984. Tight linkage between a nuclear male-sterile locus and an enzyme marker in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 68: 109-113.
103. Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. i Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/Technology* 7: 257-264.
104. Tayyar, R. I. i Waines, J. G. 1996. Genetic relationships among annual species of *Cicer* (*Fabaceae*) using isozyme variation. *Theor. Appl. Genet.* 92: 245-254
105. Timmerman, G. M., Frew, T. J., Miller, A. L., Weeden, N. F. i Jermyn, W. A. 1993. Linkage mapping of sbm-1, a gene conferring resistance to pea seed-borne mosaic virus, using molecular markers in *Pisum sativum*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 609-615
106. Torres, A. M. Millan, T. i Cubero, J. I. 1993a Identifying rose cultivars using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *HortScience* 28: 333-334
107. Torres, A.M., Patto, M.C., Šatović, Z. i Cubero, J.I. 1998. New isozyme loci in faba bean (*Vicia faba* L.) - genetic analysis and mapping using trisomics. *Journal of Heredity.* 89(3):271-275
108. Torres, A.M., Šatović, Z., Cánovas, J., Cobos, S. i Cubero, J.I. 1995. Genetics and mapping of new isozyme loci in *Vicia faba* L. using trisomics. *Theor. Appl. Genet.* 91:783-789
109. Torres, A.M., Weeden, N.F. i Martín, A. 1993b. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 937-945
110. UPOV 1979. Revised general introduction to the guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability of new varieties of plants. UPOV, Geneva. str. 11
111. Vaccino, P., Accerbi, M. i Corbellini, M. 1993. Cultivar identification in *T. aestivum* using highly polymorphic RFLP probes. *Theor. Appl. Genet.* 86: 833-836.
112. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, Th., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. i Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414
113. Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G. i Tanksley, S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6
114. Weeden, N.F. 1991. Chromosomal organization and gene mapping. U: Advanced methods in plant breeding and biotechnology. D. Murray (ed.). C.A.B. International, Wallington. pp. 23-49.
115. Weeden, N.F. i Provvidenti, R. 1988. A marker loci, *Adh-1* for resistance to Pea Enation Mosaic Virus in *Pisum sativum*. *J. Hered.* 79: 128-131.
116. Weeden, N.F. i Wendel, J.F. 1989. Genetics of plant isozymes. U: Isozymes in plant biology. D.E. Soltis i P.S. Soltis (ur.). Chapman and Hall, London. pp. 46-72.
117. Weeden, N.F., Muehlbauer, F.J. i Ladizinsky, G. 1992. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. *J. Hered.* 83:123-129.
118. Weeden, N.F., Provvidenti, R. i Marx, G.A. 1984. An isozyme marker for resistance to bean yellow mosaic virus in *Pisum sativum*. *J. Hered.* 75: 411-412.
119. Weeden, N.F., Zamir, D. i Tadmor, T. 1988. Applications of isozyme analysis in pulse crops U: World Crops: Cool Season Food Legumes. R.J. Summerfield (ed.). Kluwer Academic Publishers, Amsterdam. pp. 979-987.
120. Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, SAD

Z. Šatović: Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu  
Sjemenarstvo 16(99)1-2, str. 73-95

---

121. Weising, K., Atkinson, R. G. i Gardner R. C. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR - A critical evaluation. *PCR Methods and Applications* 4(5): 249-255
122. Welsh, J. i McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
123. Wendel, J.F. i Weeden, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. U: *Isozymes in plant biology*. D.E. Soltis i P.S. Soltis (ur.). Chapman and Hall, London. pp. 4-45.
124. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
125. Wricke, G. i Wehling, P. 1985. Linkage between an incompatibility locus and a peroxidase isozyme locus (*P<sub>rx</sub> 7*) in rye. *Theor. Appl. Genet.* 71: 289-291.
126. Yu, Z. H., Mackill, D. J., Bonman, J. M. i Tanksley, S. D. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 81: 471-476

Adresa autora - Author's address:  
Dr. sc. Zlatko Šatović  
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Zavod za sjemenarstvo  
Svetošimunska 25  
HR-10000 Zagreb

Primljeno - Received:  
10. lipnja 1998.