

Charakterystyka wybranych markerów molekularnych



Characteristic of selected molecular markers

Paulina Bolc ✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie,
Radzików IHAR 1, 05-870 Błonie,
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych,
✉ e-mail: p.bolc@ihar.edu.pl

Postęp, jaki nastąpił w biologii molekularnej poprzez wprowadzenie markerów molekularnych nowej generacji, w ciągu ostatnich 20 lat umożliwił znaczny rozwój wielu dziedzin badań. Możliwe stało się uzyskanie dokładniejszych informacji genetycznych pozwalających na lepsze zrozumienie zasobów genetycznych organizmów. Markerem molekularnym może być każda sekwencja nukleotydowa (wybrany fragment DNA), rozproszony w całym genomie, której zmienność między osobnikami lub grupami taksonomicznymi umożliwia precyzyjną identyfikację osobnika/taksonu. Kompilacja właściwości enzymów restrykcyjnych jak również reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w technikach generujących markery molekularne pozwoliła na efektywne wykorzystanie ich w taksonomicznych, ewolucyjnych i ekologicznych badaniach roślin.

Słowa kluczowe: markery molekularne, RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SRAP, SNP, PCR, polimorfizm, różnorodność genetyczna

Over the last 20 years, the progress in molecular biology through the introduction of new generation molecular markers has allowed many areas to move forward. It has now become possible to obtain more accurate genetic information to better understand the genetic resources of organisms. A molecular marker can be any nucleotide sequence (selected DNA fragment) scattered throughout the genome, whose variability between individuals or taxonomic groups allows precise identification of the individual/taxon. The effectiveness of restriction digestion and polymerase chain reaction based on molecular markers has already proved their usefulness in taxonomic, evolutionary and ecological plant research.

Key words: molecular markers, RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SRAP, SNP, PCR, polymorphism, genetic diversity

Wstęp

Techniki molekularne są w ostatnich latach najczęściej stosowanymi metodami w wielu dziedzinach, np. w kryminalistyce, biologii molekularnej, czy hodowli roślin. W ostatnim czasie ich możliwości i łatwość wykorzystywania rośnie w szybkim tempie w naukach biologicznych, zwłaszcza w biologii molekularnej roślin, m.in. w identyfikacji genów odpowiedzialnych za określone cechy (Shulman 2007). Markery molekularne zrewolucjonizowały pracę w laboratoriach wszystkich dziedzin biologii i nie tylko, stanowiąc doskonałe narzędzie do badania struktury populacji, czy pokrewieństw między osobnikami (Kuleung i in., 2004). Szybki rozwój markerów molekularnych pozwala dziś na wybór tej techniki, która będzie najlepsza w danych badaniach. Takich możliwości nie było w latach 80. XX wieku,

kiedy następował rozwój biologii molekularnej. Aktualnie w grupie markerów molekularnych istnieją narzędzia uniwersalne, które można zastosować zarówno dla jednego gatunku, czy rodzaju oraz te bardziej specyficzne, gdzie wymagana jest wiedza na temat badanego genomu. Wybór odpowiedniego markera zależy od postawionych pytań badawczych, a także od informacji na temat badanego organizmu, jakim dysponuje eksperymentator. (Mikowska i in., 2012). Wybór określonej techniki molekularnej powinien opierać się na wiarygodności wyniku, kosztach oraz nakładzie pracy i ilości informacji, jakie niesie ze sobą wybrana metoda na temat badanego organizmu. Celem niniejszego artykułu jest przybliżenie ogólnych zasad działania, możliwości zastosowań, w tym wad i zalet wybranych markerów molekularnych.

Markery RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*)

Metoda RFLP była jedną z pierwszych stosowanych do analizy DNA w kryminalistyce oraz typowaniu genetycznym, obecnie jest zdecydowanie rzadziej stosowana (Al-Samari i Al-Kazaz, 2015). Markery RFLP opierają się na analizie długości fragmentów restrykcyjnych DNA różniących się między sobą wielkością. Endonukleazy rozpoznają określone miejsca (4-6 par zasad) i specyficjnie trawią DNA, a fragmenty rozdzielane są w żelu i przenoszone na membrany (Sztuba-Solińska 2005). Wielkość fragmentów waha się od kilku do ponad kilku tysięcy par zasad. Podstawą polimorfizmu w tej metodzie są mutacje obejmujące miejsca restrykcyjne, czy też insercje, substytucje i delecje w pobliżu miejsc restrykcyjnych. Identyfikacja polimorfizmu odbywa się przy udziale znakowanych sond, które są komplementarne do fragmentów homologicznych na membranach (Yang i in., 2013). Ważną cechą markerów RFLP jest kodominujący charakter i wysoki polimorfizm. Markery RFLP wykorzystywane są do analiz polimorfizmu DNA chloroplastowego i mitochondrialnego, badań filogenetycznych i taksonomicznych (Besnard i in., 2002). Inne analizy przy użyciu RFLP przyczyniły się znacząco do mapowania genomu ludzkiego oraz dostarczania informacji dotyczących chorób genetycznych (Emadi i in., 2010, Prystupa i in., 2011). Do wad stosowania markerów RFLP zaliczyć można znaczną ilość wymaganego materiału wyjściowego, dosyć żmudną i powolną procedurę, a także duży koszt i pracochłonność.

Markery AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Technika AFLP została opracowana przez Vosa i współpracowników w 1995 roku i jest jedną z bardziej informatywnych metod opartych na reakcji PCR (*Polymerase Chain Reaction*). AFLP polega na braku lub obecności amplifikowanych, specyficznych fragmentów restrykcyjnych, więc łączy ze sobą zalety reakcji PCR i techniki RFLP (Matuszczak 2002). W AFLP wykorzystywane są dwa enzymy restrykcyjne (często i rzadko tnący), następnie dołączane są adaptory posiadające sekwencję rdzeniową oraz specyficzną dla miejsca restrykcyjnego, po czym następuje amplifikacja fragmentów i ich rozdział w żelu ([<https://patents.google.com/patent/EP0534858B2/en>]). Technika jest w stanie wygenerować setki markerów genetycznych w krótkim czasie, co zapewnia szerokie spektrum badań przesiewowych dowolnego genomu. Ważnym aspektem techniki AFLP jest możliwość

stosowania jej w badaniach organizmów niemo-delowych, bez znajomości sekwencji, złożoności i struktury genomu w przeciwieństwie do mikrosatelitów (Sztuba-Solińska 2005). Markery AFLP były często stosowane w badaniach u roślin jak również w analizie pokrewieństwa, czy określaniu płci u zwierząt (Griffits i Orr, 1999, Chybicki i in., 2011). Szczególnie pomocne okazały się w przypadku genetyki populacyjnej i badaniach zróżnicowania genetycznego, jak również w tworzeniu map genetycznych. Niewątpliwą zaletą AFLP jest to, że technika ta wykrywa większą różnorodność genetyczną niż markery SSR i RAPD, oprócz tego charakteryzuje się wysoką powtarzalnością i wiarygodnością (Lourdes Rocha i in., 2015), a do analizy potrzebne są niewielkie ilości materiału wyjściowego (ok. 0,5µg) (Mendelson i in., 2005). Negatywnym aspektem zastosowania markerów AFLP jest fakt, że zaliczane są do markerów dominujących (uniemożliwia to ocenę heterozygotyczności), z kolei niski poziom zanieczyszczeń (np. obcym DNA) może wpłynąć na wyniki, a analiza jest żmudna i wieloetapowa (Al-Samari i Al-Kazaz, 2015).

Markery RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Technika RAPD opracowana została przez Williamsa i współpracowników w 1990 roku i jest uznawana za jedną z najprostszych metod umożliwiających wykrycie zróżnicowania DNA. RAPD opiera się na reakcji PCR wykorzystując losowo amplifikowany polimorficzny DNA. Zasada działania markerów polega na namnożeniu losowo wybranych fragmentów genomu stosując krótkie, 10-nukleotydowe startery o przypadkowych sekwencjach (Bardakci 2001). Dzięki temu uzyskiwane są unikalne wzory prążków w żelu charakteryzujące dany genotyp. W ten sposób możliwe jest stwierdzenie istniejących różnic między np. liniami hodowlanymi na poziomie DNA. Liczba stosowanych starterów jest nieograniczona, co jest szczególnie ważne w przypadku poszukiwania istotnych cech użytkowych, konstruowania map genetycznych, a także przy ocenie podobieństwa genetycznego taksonów roślinnych (Fukuoka i in., 1992). Polimorfizm RAPD wynika z mutacji w obrębie sekwencji komplementarnych do końca 3' startera oraz delecji lub insercji w pewnej odległości od miejsca wiązania. Za zastosowaniem metody RAPD przemawia głównie fakt, że generowana jest znaczna liczba generowanych markerów molekularnych, prostota i szybkość wykonania, a także stosunkowo niewielkie koszty i możliwość stosowania przy zupełnym braku danych dotyczących genomu referencyjnego

(Senthil Kumar i Gurusubramanian, 2011). Oczywiście technika ta ma również pewne wady, a najważniejszą jest podatność na różnego rodzaju zmiany warunków reakcji amplifikacji (np. zmiany stężenia i pochodzenia polimerazy, wahania w ilości materiału wyjściowego) oraz dominujący charakter markerów (Al-Samari i Al-Kazaz, 2015).

Markery SSR (Simple Sequence Repeat) i ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)

Technika SSR wykorzystuje proste sekwencje powtórzone i jest oparta, jak większość opisanych markerów na reakcji PCR. Określana jest również jako amplifikowane sekwencje mikrosatelitarne. SSR są krótkimi tandemowymi motywami składającymi się z 1-6 nukleotydów. Zostały zlokalizowane w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych, są szeroko rozpowszechnione w całym genomie. Technika SSR, oparta o zastosowanie markerów kodominujących (Sztuba-Solińska 2005) wykorzystywana jest w analizach roślin uprawnych, ze względu na wysoki stopień polimorfizmu, powtarzalność wyników, łatwość analizy (Kandemir i in., 2010). Dane literaturowe wskazują na częste wykorzystywanie markerów SSR do wykrywania różnorodności genetycznej u jęczmienia, w tym również dzikich gatunków, czy populacji miejscowych (Carmona i in., 2013, Viana i in., 2019, Turchetto i in., 2015). Markery SSR są używane do selekcji i mapowania pożądanych genotypów, więc znajdują zastosowanie w szeroko pojętej genetyce roślin (Szućko i in., 2012). Należy jednak wspomnieć o dosyć wysokim koszcie opracowania markerów SSR *de novo* dla każdego gatunku, co stanowi istotne ograniczenie w ich szerszym stosowaniu (Carneiro Vieira i in., 2016).

Istnieje jednak alternatywa dla markerów SSR, jaką są markery ISSR, czyli polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnych. ISSR opiera się na amplifikacji fragmentów DNA znajdujących się pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi, powtórzonymi regionami, zorientowanymi w przeciwnych kierunkach (Abate 2017). Startery stosowane w technice ISSR mogą być: niezakotwiczone (składające się z powtórzeń typu dwójkowego, trójkowego lub czwórkowego) oraz zakotwiczone (zawierające oprócz motywów powtórzeniowych dodatkowe 1-4 zasady na końcach 3' lub 5'). Startery zakotwiczone wydają się lepszą opcją, ponieważ pozwalają na specyficzne wiązanie się do matrycy i tworzenie wyraźnych prążków, a dodatkowo ograniczają liczbę powstających w reakcji PCR amplikonów (Reddy i in., 2002). ISSR są wykorzystywane w analizach polimorfizmu DNA gatunków

o istotnym znaczeniu gospodarczym, ekologicznym, dla których opracowywanie markerów mikrosatelitarnych jest zbyt kosztowne. Markery ISSR były stosowane w analizach oceny zmienności genetycznej wiśni (Najafzadeh i in., 2014), analizach zależności genetycznych orzecha włoskiego (Potter i in., 2002), czy w analizach oceny różnorodności genetycznej moreli (Liu i in., 2015). Polimorfizm tych markerów wynika z insercji, bądź delecji w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych, takie zmiany prowadzą do obecności lub braku produktu w żelu w postaci prążka. ISSR należą do grupy markerów dominujących, charakteryzują się lepszą powtarzalnością niż markery RAPD, a do przeprowadzenia analiz wymagana jest niewielka ilość materiału wyjściowego (ok. 0,5-150 ng) (Szućko i in., 2012).

Markery SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)

Spośród wyżej wymienionych markerów molekularnych ciekawą propozycją wydaje się technika SRAP. Opracowana przez Li i Quiros'a w 2001 roku. SRAP wykorzystuje kombinację starterów o długości 17 lub 18 nukleotydów: ang. „forward”, bogatych w zasady GC oraz ang. „reverse”, gdzie przeważają zasady AT. Technika SRAP opiera się na amplifikacji otwartych ramek odczytu (ORF), co może wpłynąć na wzmocnienie związku między polimorfizmami DNA, a cechami morfologicznymi (Ferriol i in., 2003). Na korzyść techniki SRAP przemawia niewielka ilość materiału wyjściowego do analiz (ok. 50ng), ponadto system nie wymaga znajomości informacji dotyczących sekwencji, czy genomu referencyjnego. Odtwarzalność tych markerów jest znacznie lepsza niż w technice RAPD, a dodatkową zaletą techniki SRAP jest możliwość zastosowania znakowanych fluorescencyjnie starterów i łączenie ich ze starterami nieznakowanymi, co pozwala na rozdział produktów w sekwenatorach kapilarnych (Li i in., 2013). Markery SRAP znalazły zastosowanie w konstrukcji map genetycznych, znakowaniu i klonowaniu genów, selekcji wspomaganiej markerami, czy klasyfikacji genealogicznej (Robarts i Wolfe, 2014, Guindon i in., 2016). Szczególnie zastosowanie znalazły w badaniach nad strukturą populacji, różnorodnością genetyczną, czy mapami powiązań genetycznych u roślin takich jak: lucerna (Castonguay i in., 2010), bawełna (Li i in., 2007), owies (Tanhuanpää i in., 2007), *Dendrobium* (Lu i in., 2012), rzepak (Sun i in., 2007). Naukowcy wykorzystali także markery SRAP do analiz różnorodności genetycznej pasożytów *Fasciola hepatica* (Alasaad i in., 2008) i *Schistosoma japonicum* (Song i in., 2011).

Markery SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu jest najczęstszym typem polimorfizmu DNA. Analiza markerów SNP, określane jako bialleliczne w przeciwieństwie do markerów multiallelicznych może być w pełni zautomatyzowana. Możliwe jest jednoczesne przeanalizowanie nawet kilku tysięcy markerów SNP (Khlestkina i Salina, 2006). Ponadto w porównaniu z markerami SNP, żaden z innych typów polimorfizmów DNA nie dysponuje tak różnorodnymi i licznymi metodami. Obecnie dostępnych jest wiele platform i systemów genotypowania SNP, nowoczesne technologie pozwalają na przeprowadzenie tego rodzaju analiz wielokrotnie skuteczniej niż w przypadku innych metod. Istnieją systemy identyfikacji zmienności nukleotydowych DNA oparte na sekwencjonowaniu NGS (*Next Generation Sequencing*): sekwencjonowanie z analizą metylomu, sekwencjonowanie pełnogenomowe i sekwencjonowanie zredukowanej frakcji genomu. Pojawienie się kompaktowych sekwenatorów pozwoliło na identyfikację nawet kilkudziesięciu tysięcy SNP, czy też krótkich insercji i delecji na jednej płytce reakcyjnej. Wyniki uzyskane z tego rodzaju analiz mogą zostać wykorzystane do badań różnicowania genetycznego, poszukiwania genów kandydatów oraz markerów do selekcji genomowej, tworzenia map genetycznych, czy analizy asocjacyjnej (Puchta i in., 2018).

Podsumowanie

Markery molekularne można podzielić na dwie grupy: oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i oparte na hybrydyzacji (Jones i in., 2009). Oprócz wspomnianego podziału wśród markerów znaleźć można również te, bazujące na DNA jądrowym, chloroplastowym i mitochondrialnym, z kolei wśród nich istnieją markery dominujące i kodominujące (Mikowska i in., 2012). Mimo przynależności do różnych grup, markery są często wykorzystywane w różnego rodzaju analizach jak np. badaniu zmienności i różnorodności genetycznej, konstruowaniu map genetycznych, identyfikacji osobników, mapowaniu i klonowaniu genów, czy selekcji wspomaganej markerami (Kuleung i in., 2004, Adhikari i in., 2017). Brak oddziaływania środowiska na markery molekularne jest niewątpliwym atutem przemawiającym za częstym stosowaniem tego rodzaju metod. Wielu naukowców prowadząc badania początkowo posiada niewiele informacji na temat analizowanego organizmu, co przy wykorzystywaniu niektórych typów markerów molekularnych nie jest wymagane (Szućko i in., 2012). Obecnie istnieje wybór między licznymi technikami molekularnymi, a decyzja

dotycząca zastosowania określonych markerów powinna być wypadkową zalet oraz ograniczeń, które mogą wpłynąć na uzyskane wyniki. Przy wyborze techniki powinny być brane pod uwagę aspekty takie jak: poziom polimorfizmu, cel badawczy, skala i rodzaj analiz oraz fundusze (Sztuba-Solińska 2005).

Literatura

- Abate, T., (2017). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers for genetic diversity studies in *Trifolium* species. *Advances in Life Science and Technology* 55: 34-36.
- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., Ghosh, P., (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus* 60: 283-297.
- Al-Samari, F. R., Al-Kazaz, A. A., (2015). Molecular Markers: an introduction and applications. *European Journal of Molecular Biotechnology* 9(3): 118-121.
- Alasaad, S., Li, Q. Y., Lin, R. Q., Martin-Atance, P., Granados, J. E., Diez-Banos, P., Perez, J. M., Zhu, X. Q., (2008). Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP markers. *Parasitology Research* 103(1): 181-186.
- Bardakci, F., (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology* 25: 185-196.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., Bervillé, A., (2002). Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 139-144.
- Carmona, A., Friero, E., de Bustos, A., Jouve, N., Cuadrado, A., (2013). Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 949-961.
- Carneiro Vieira, M. L., Santini, L., Lima Diniz, A., de Freitas Munhoz, C., (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39(3): 312-328.
- Castonguay, Y., Cloutier, J., Bertrand, A., Michaud, R., Laberge, S., (2010). SRAP polymorphism associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theoretical Applied Genetics* 120: 1611-1619.
- Chybicki, I. J., Oleksa, A., Burczyk, J., (2011). Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. *Heredity* 107: 589-600.
- Emadi, A., Crim, M. T., Brotman, D. J., Necochea, A. J., Samal, L., Wilson, L. M., Bass, E. B., Segal, J. B., (2010). Analytic validity of genetic tests to identify factor V Leiden and prothrombin G20210A. *American Journal of Hematology* 85(4): 264-270.
- Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F., (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and

- AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 271-282.
- Fukuoka, S., Hosaka, K., Kamijima, O., (1992). Use of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japanese Journal of Genetics* 67: 243-252.
- Griffiths, R., Orr, K., (1999). The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology* 8: 671-674.
- Guindon, M. F., Martin, E., Zayas, A., Cointy, E., Cravero, V., (2016). Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L.. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16: 182-188.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H., Pašakinskienė, I., (2009). Marks and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183: 935-96.
- Kandemir, N., Yildirim, A., Gunduz, R., (2010). Determining the levels of genetic variation using SSR markers in three Turkish barley materials known as Tokak. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 34: 17-23.
- Khlestkina, E. K., Salina, E. A., (2006). SNP Markers: Methods of Analysis, Ways of Development, and Comparison on an Example of Common Wheat. *Russian Journal of Genetics* 42(6): 585-592.
- Kuleung, C., Baenziger, P. S., Dweikat, I., (2004). Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics* 108(6): 1147-1150.
- Li, G., McVetty, P. B. E., Quiros, C. F., (2013). SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science, w ed. Sven Bode Andersen, *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, IntechOpen, Dania.
- Li, G., Quiros, C. F., (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 455-461.
- Li, W., Lin, Z., Zhang, X., (2007). A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboreum* L.) Detected by Molecular Markers. *Journal of Genetics and Genomics* 34(7): 634-640.
- Liu, M. P., Du, H. Y., Zhu, G. P., Fu, D. L., Tana, W. Y., (2015). Genetic diversity analysis of sweet kernel apricot in China based on SSR and ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* 14(3): 9722-9729.
- Lourdes Rocha, C. M., Vellisce, G. R., García, M. G., Pardo, E. M., Racedo, J., Perera, M. F., de Lucia, A., Gilli, J., Bogado, N., Bonnacarrère, V., German, S., Marcelino, F., Ledesma, F., Reznikov, S., Ploper, L. D., Welin, B., Castagnaro, A. P., (2015). Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. *Electronic Journal of Biotechnology* 18: 439-444.
- Lu, J. J., Wang, S., Zhao, H. Y., Liu, J. J., Wang, H. Z., (2012). Genetic linkage map of EST-SSR and SRAP markers in the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4654-4667.
- Matuszczak, M., (2002). Zastosowanie metody AFLP do analizy DNA rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste XXIII*: 255-256. [<https://patents.google.com/patent/EP0534858B2/en>], dostęp 27.11.2019.
- Mendelson, T. C., Shaw, K. L., (2005). Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology* 395: 161-177.
- Mikowska, M., Świergosz-Kowalewska, R., Śliwińska, E., (2012). Ocena różnorodności genetycznej przy pomocy markerów molekularnych - zastosowanie w ekotoksykologii. *Wszechświat* 113: 171-175.
- Najafzadeh, R., Arzani, K., Bouzari, N., Saei, A., (2014). Genetic Diversity Assessment and Identification of New Sour Cherry Genotypes Using Intersimple Sequence Repeat Markers. *International Journal of Biodiversity* 2014: 1-8.
- Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leslie, C., McGranahan, G., (2002). Intersimple Sequence Repeat Markers for Fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127(1): 75-81.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., Siddiq, E. A., (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Prystupa, A., Buś-Kicman, M., Dzida, G., Styliński, R., Piwoarczyk, P., Sawa, M., Janowska, M., Mosiewicz, J., (2011). Application of RFLP-PCR method for molecular diagnostics of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 5(2): 70-73.
- Puchta, M., Bolc, P., Piechota, U., (2018). Review of genome sampling methods in sequencing libraries preparation protocols. *Agronomy Science* LXXIII(4): 93-105.
- Robarts, D. W. H., Wolfe, A. D., (2014). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences* 2(7): 1-8.
- Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G., (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* 3: 116-124.
- Shulman, A., (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321.
- Song, H. Q., Mo, X. H., Zhao, G. H., Li, J., Zou, F. C., Liu, W., Wu, X. Y., Lin, R. Q., Weng, Y. B., Zhu, X. Q., (2011). Electrophoretic detection of genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates by sequence-related amplified polymorphism. *Electrophoresis* 32: 1364-1370.
- Sun, Z., Wang, Z., Tu, J., Zhang, J., Yu, F., McVetty, P. B. E., Li, G., (2007). An ultradense genetic recombination map for Brassica napus, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 114(8): 1305-1317.
- Sztuba-Solińska, J., (2005). Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos* 54(2-3): 227-239.
- Szućko, I., Achrem, M., Kalinka, A., (2012). Charakterystyka i zastosowanie SSR oraz ISSR w badaniach genomów

roślinnych. Kosmos 61(4): 597-601.

Tanhuanpää, P., Kalendar, R., Schulman, A. H., Kiviharju, E., (2007). A major gene for grain cadmium accumulation in oat (*Avena sativa* L.). *Genome* 50: 588-594.

Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Beduschi, J., Bonatto, S. L., Freitas, L. B., (2015). Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants* 7: 1-9.

Vianna, L. S., Pereira, T. N. S., Santos, E. A., Viana, A. P., Pereira, M. G., Ramos, H. C. C., Rossi, A. A. B., (2019). ISSR and SSR markers for determining genetic relationships among three wild species of *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research* 18(1): 1-9.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, 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 Research* 23(21): 4407-4414.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.

Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., Fang, M., (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of animal science and biotechnology* 4:1-6.

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:

