

UDK

MAPIRANJE BILJNIH GENOMA MIKROSATELITIMA

PRODANOVIĆ S¹., ŽIVANOVIĆ T.¹, DRAŽIĆ, S.²

IZVOD: Mikrosateliti su DNA markeri, zasnovani na polimorfizmu broja repetitivnih sekvenci nukleotida. Spadaju u grupu PCR-markera i koriste se uglavnom kao dopuna drugim tipovima markera. Njihove odlike i tehnička strana primene diskutovani su u ovom radu. Navedeni su neki rezultati dobijeni korišćenjem mikrosatelitske DNA u genetičkom mapiranju biljnih genoma. Iako mikrosateliti omogućuju identifikaciju genotipova unutar jedne vrste, njihov nedostatak je da nisu pogodni za komparativno mapiranje različitih vrsta.

Ključne reči: mikrosateliti, repetitivne sekvence, markeri, PCR

UVOD: Rezultati oplemenjivanja bilja doprinose razvoju čovečanstva. S jedne strane se kroz ovu nauku upoznaje struktura i ekspresija genoma, odnosno genski efekti osobina (Dražić, 1990; Prodanović, 1993; Rakonjac et al., 1994; Todorović et al., 1997), a s druge se stečena saznanja primenjuju u selekciji biljaka (Jovanović i sar., 1995; Živanović, 1997; Dražić, 1997), odnosno stvaranju novih i sve boljih formi od interesa za tržište (Dražić 1986; Dražić i Arsić 1986; Dražić i Kojičić 1987). Oplemenjivanje bilja obuhvata primenu različitih metoda uključujući klasičnu selekciju (Dražić 1986a), primenu biometrijskih analiza (Dražić i Gordana Šurlan 1990; Dražić i Prodanović 1999), hromozomski inženjering i drugo. Od 1970-tih godina molekularna biologija postaje izuzetno moćno oruđe u istraživanjima i praksi.

Metode mapiranja biljnih genoma

Novе metode omogućile su da se počne sa mapiranjem genoma primenom DNA markera. Uobičajeno korišćenje morfoloških (Sax, 1923, Jovanović et al., 1992, Milutinović et al., 1996) i proteinskih (Yan et al, 1994; Jovanović et al., 1995a), odnosno izoenzimskih markera (Mather & Jinks, 1971) ima najveći nedostatak u pogledu njihovog

relativno malog broja, tako da se genetičke mape hromozoma ne mogu dovoljno popuniti. Veliki broj DNA markera, koji predstavljaju određene sekvence, mogu pokriti ceo biljni genom. Njima se ne detektuje genski produkt, već prisustvo odgovarajuće sekvence na DNA, bilo kod nekog genotipa (za njegovu identifikaciju), bilo kod neke hibridne populacije (za genetičko mapiranje).

Genetički markeri nisu podložni uticaju ekoloških faktora, kao što su to neka kvantitativna morfološka svojstva (Jovanović et al., 1992a; Šurlan-Momirović et al., 1996). U odnosu na proteinske i izoenzimске markere, DNA markeri nisu vezani ni za kakve funkcije u organizmu, tj. ne zavise od kvaliteta zrna i enzimskih karakteristika genotipova (Yan et al., 1997). Specifičnost sekvenci roditelja za ukrštanja, obezbeđuje da se njihov polimorfizam ispolji kroz segregaciju DNA markera u generacijama potomstva i da se izračuna procenat rekombinacija u cilju genetičkog mapiranja hromozoma. Paralelno sa genetičkim razvijalo se i fizičko mapiranje hromozoma, koje ima svoju specifičnu ulogu (Kuenzel et al., 2000).

Prve mape sa DNA markerima bile su RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Botstein et al., 1980) mape, zasnovane na razlikama u dužini restrikcioniх fragmenata.

Pregledni rad (Review paper)

¹Dr SLAVEN PRODANOVIĆ docent, dr TOMISLAV ŽIVANOVIĆ, docent, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

²Dr SLOBODAN DRAŽIĆ, viši naučni saradnik Instituta za Iekovito bilje "Josif Pančić", Beograd

Ove mape su i danas aktuelne u oplemenjivanju bilja (Burr et al., 1983; Beckmann & Soller, 1988; Tanksley et al., 1989; Prodanović et al., 1997), mada je njihova tehnička strana komplikovana. Jednostavnija molekularna tehnika PCR (Polymerase Chain Reaction - Saiki et al., 1985) ili lančana reakcije polimeraze omogućila je primenu velikog broja strategija genetičkog kartografisanja: DDGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), STS (Sequence Tagged Sites - Olson et al., 1989), AS-PCR (Allele Specific PCR), SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Williams et al., 1990), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR - Welsh & McClelland, 1990), DAF (DNA Amplification Fingerprinting - Caetano-Anolles et al., 1991), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) itd.

PCR je enzimska reakcija *in vitro* koja omogućava amplifikaciju tačno određene sekvence nukleotida. Realizuje se u termocikleru, stavljanjem vrlo male količine biljne DNA (matrice) u ependorfe sa prajmerima (levim i desnim) i dezoksiribonukleinskim trifosfatima (dNTP: dATP, dTTP, dCTP i dGTP) u odgovarajućem supstratu uz prisustvo termostabilne Taq-polimeraze. DNA se prvo denaturizuje, a trifosfati se vezuju između pozicioniranih prajmera i dolazi do ekstenzije novih komplementarnih lanaca.

Jedna od tehnika PCR koristi mikrosatelite. Mikrosateliti su repetitivne sekvence DNA, sa n ponavljanja, kao što su na primer $(A)_n$, $(TG)_n$, $(GCA)_n$. Dužina ovih sekvenci je oko 100 bp, a raspoređene su nepravilno, svuda po biljnom genomu. Ove sekvence nazivali su, prema dužini ili složenosti: VNTR (Variable Number of Tandem Repeats - Leroy et al., 1997), minisateliti (Jeffreys et al., 1985) i mikrosateliti (Litt & Luty, 1989). Izdvojeno je mnoštvo prajmera koji ovičuju ove sekvence što je omogućilo primenu PCR metoda, nazvanih: SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism - Tautz, 1989), STMS (Sequenced Tagged Microsatellites Sites - Beckman et Soller, 1990), STR (Short Tandem Repeat) i SSR (Simple Sequenced Repeat - Leroy et al., 1996).

Genetičke mape i njihov značaj

Genetičke mape mikrosatelita i drugih PCR i RFLP markera su urađene za većinu

poljoprivrednih biljaka, a kod najznačajnijih vrsta korišćene su različite populacije. Na primer, kod pšenice ($2n = 42$, 16000 Mb) za mapiranje su uzete populacije Opat M85 x Syntetic W7984 (Nelson et al., 1995b), Timgalen x RL1437 (McGuire & Qualset, 1997), Chinese Spring x Syntetic W7984 (Gale, 1996) i Eureka x Renan (Prodanović et al., 1997), a kod ječma ($2n = 14$, 5000 Mb) Igri x Franka (Graner et al., 1994), Steptoe x Morex (Kleinohfs et al., 1993), L94 x Vada (Qi et al., 1998), Blenheim x E224/3 (Thomas et al., 1995) i Harrikton x Morex (Liu et al., 1996). Izabrani roditelji za ukrštanja se uglavnom odlikuju velikom divergentnošću, kako bi alelni polimorfizam markera omogućio što veću popunjenost mapa. Smatra se da je idealno da na svakih 10 cM postoji po jedan "jaki" marker, a između njih po nekoliko "slabijih", koji nisu karakteristični za sve genotipove proučavane vrste ili nisu pozicionirani po istom redosledu. Broj DNA markera je praktično neograničen, s obzirom da se DNA može iseći na neograničeni broj sekvenci, od kojih ogroman deo predstavljaju ponavljajuće (mikrosatelitske) sekvence.

Genetičke mape hromozoma imaju prevashodno značaj u lokalizaciji gena jer omogućuju da se na osnovu fenotipskog osmatranja odrede lokusi kvalitativnih (mendelovskih) osobina (MTL) i lokusi kvantitativnih osobina (QTL) između DNA markera. Izbor agronomskih osobina koje će se pratiti zavisi od programa rada instituta, a na svetskom nivou postoji podela po projektima. Na primer, INRA u Clermont-Ferrandu se bavi parametrima kvaliteta pšenice, a u Rennes-u otpornošću na bolesti pšenice. Raspored markera i položaj gena između njih određuje se preko različitih statističkih softwear-a, kao Mapmaker/EXP 3.0b (Lander et al., 1987).

Najdalje je mapiranje genoma i pozicioniranje MTL, QTL i "gena kandidata" odmaklo kod biljaka koje su izabrane za modele, zbog svog relativno malog genoma kao što su *Arabidopsis* - *Arabidopsis thaliana* ($2n = 20$, 100 Mb) kod dikotila i pirinač - *Oryza sativa* ($2n = 24$, 400 Mb) kod monokotila. U odnosu na pšenicu ove vrste imaju 40, odnosno 160 puta manji genom.

Dobijeni rezultati omogućuju u kasnijoj fazi izolaciju i kloniranje odgovarajućih gena za željena svojstva. Na primer, kod pšenice se radi o sledećim genima za:

1) Otpornost na *Blumeria graminis* f. sp. tritici *Pm3*, *Pm4a* (Ma et al., 1994), otpornost na nematode *Cre1* (Williams et al., 1994), otpornost na *Puccinia recondita* f.sp. tritici *Lr13*, *Lr34* (Nelson et al., 1995c), Otpornost na *Puccinia graminis* f.sp. *graminis Sr33* (Jones et al., 1991)

2) Restauraciju muške fertilitnosti *Rf3* (Ma & Sorrells, 1995)

3) Vernalizaciju *Vrn1*, *Vrn3* (Nelson et al., 1995)

4) Pigmentaciju *Rg2* (Jones et al., 1990), *R1*, *R2* (Nelson et al., 1995b), *Rc1*, *Rc2* (Nelson et al., 1995c)

5) Različite funkcije *ATPase*, *NOR* - nukleolarni organizator (Van Deynze et al., 1995), *Cxp3* - karboksipeptidaza, *Dbn5* - dehidrin, *Prk* - fosforibulokinaza (Marino et al., 1996), *W2* - inhibitor voska, *pBS128* - odgovor na ABA, *pKABAG* - protein kinaza (Nelson et al., 1995a)

6) Kvantitativna svojstva kao što je otpornost na proklijavanje *Qpbs.cln* (Anderson et al., 1993).

Poslednja faza po kloniranju gena je njihovo premeštanje (transfer) u druge vrste primenom biotičkih (*Agrobacterium*) i abiotičkih (vakum pištolji) vektora, čime se zaokružuje proces savremene selekcije uz pomoć markera, nazvane MAS (Marker-Assisted Selection - Isaac, 1997).

Specifičnosti i tehnička strana primene mikrosatelita pri mapiranju

Pošto su sagledani opšti principi i cilj mapiranja genoma biljaka potrebno je naglasiti specifičnosti metode primene mikrosatelitske (μ SAT) DNA (tabela 1).

Metod mapiranja mikrosatelitima se odnosi na poznate sekvence, za razliku od RFLP, gde se restrikcionim endonukleazama dobijaju (uglavnom duži) segmenti DNA čija sekvenca nije poznata. Pri RFLP se vrši blotovanje kako bi se segmenti genomske DNA preneli na membrane, a kod mikrosatelita se segmenti amplifikuju pomoću poznatih prajmera i analiziraju na gelu. Membrana sadrži veliki broj segmenata i koristi se više puta za hibridizacije sa različitim DNA probama, dok se mikrosatelitska DNA koristi jedanput. Polimorfizam mikrosatelita se zasniva na modifikacijama u dužini repetitivne sekvence, odnosno razlikama u broju ponavljajućih parova nukleotida (Roder et al., 1997), a polimorfizam RFLP na mutacijama, insercijama i delecijama. Nivo polimorfizma je veći za mikrosatelite nego za RFLP, a kvantitet potrebne DNA manji. Oba tipa markera su kodominantni sa približno istom cenom po jedinom uzorku, s tim što su nešto veća ulaganja u opremu za mikrosatelite. Mikrosateliti se ne zasnivaju na upotrebi radioaktivnosti, a za RFLP se mogu koristiti i "tope" probe.

Tab. 1. Poređenje molekularnih markera RFLP i mikrosatelita
Tab. 1. Comparison between RFLP and microsatellite markers

Metod	RFLP	mSAT
Princip	Restrikcioni enzimi Southern blot Hibridizacija	Amplifikacija DNA Poznate sekvence Poznati prajmeri
Tip polimorfizma	Mutacije Insercije Delecije	Modifikacije u Dužini repetitivnih sekvenci
Nivo polimorfizma	Ošrednji	Visok
Nasledivanje	Kodominantno	Kodominantno
Kvantitet DNA	2 - 10 mg	50 - 100 ng
Poznavanje sekvence	ne	da
Upotreba radioaktivnosti	da i ne	ne
Troškovi po uzorku	osrednji	osrednji
Investicioni troškovi(oprema)	osrednji do visoki	visoki

Tehnički u radu sa mikrosatelitima, prvo je potrebno odrediti polimorfnost roditelja. Posle izolacije njihove DNA, vrši se

amplifikacija u PCR-mašini korišćenjem odgovarajućih prajmera. Nekoliko sekvenci prajmera prikazano je u tabeli 2.

Tab. 2. Sekvence mikrosatelitskih prajmera
Tab. 2. Sequences of some microsatellite primers

Kod mikrosatelita	Detalji sekvence (leve i desne)	Dužina sekvence	Tip repeticije
WMS 2	CTGCAAGCCTGTGATCAACT CATTCCTCAAATGATCGAACA	60 54	(CA) ₁₈
PSP 3000	TCCC GCCATGAGTCAATC TTGGGAGACACATTTGGCC	56 56	(CAA) ₁₅
WMS 10	CGCACCATCTGTATCATTTCTG TGGTCGTACCAAAGTATACGG	62 62	(AT) ₅ (GT) ₁₅
AC 14	GAAAGACCAAGTGAAACACG TGAATAAAGAAGGGAGCATC	58 56	(TG) ₇ (T) ₃ (GT) ₁₈
WMS 18	TGGCGCCATGATTCATTATCTTC GGTTGCTGAAGAACCCTTATTTAGG	70 68	(CA) ₁₇ (TA) ₄
WMS 154	TCACAGAGAGAGGGAGGG ATGTGTACATGTTGCCCTGCA	64 58	(GA) ₄ (GGGA) ₄ (GA) ₂₅

Umnoženi segmenti DNA se razdvajaju na poliakrilamidnom gelu elektroforetske ćelije za sekvencioniranje. Korišćenje odgovarajućih češljeva omogućuje da se deponira odjednom 97 uzoraka (+ kontrola), odnosno dovoljno velika populacija za mapiranje. U DNA se dodaje plava front boja da bi se pratilo njeno kretanje, a sam proces traje oko 2 h na 2000 V. Gel je jako tanak (oko 1 mm), te se ostavlja vezan za jedno od dve staklene ploče ćelije, pripremljene tako da ga zadržava. Fiksiranje mikrosatelitske DNA na gelu se vrši sirćetnom kiselinom, ispiranje vodom, bojenje srebro-nitratom, a razvijanje natrijum-karbonatom i natrijum-tiosulfatom. Time se dobijaju jasne trake za svaki uzorak. Pri radu sa mikrosatelitskom DNA nema pozadinskih efekata od "toplih" ili "hladnih" izvora zračenja koji postoje na autoradiogramima dobijenim metodom RFLP.

Mikrosateliti se retko kad koriste kao jedini markeri pri mapiranju biljaka. Kod pšenice, na primer, vrlo malo mikrosatelita je mapirano na hromozomima grupe D, te je neophodno koristiti i druge markere, različitih generacija. Generalno, RFLP markeri pripadaju prvoj generaciji, mikrosateliti i ostali spomenuti PCR markeri pripadaju drugoj generaciji, a danas se radi na markerima treće generacije. Iako najstariji, RFLP markeri za sada nisu odbačeni, jer su jedini koji omogućavaju komparativno mapiranje između različitih vrsta (Kurarta et al., 1994; Sherman et al., 1995). Takva njihova karakteristika od značaja je za proučavanje evolucije i lokalizaciju gena sa istim funkcijama kod različitih vrsta. U tom smislu,

mikrosatelite treba posmatrati kao dopunske markere i markere koji omogućuju identifikaciju i diferencijaciju genotipova unutar istih vrsta.

Rezultati primene mikrosatelita u mapiranju genoma

Prodanović et al. (1997) su pozicionirali dva mikrosatelitska markera između RFLP markera na hromozomima pšenice 1A i 1B. Utvrđeno je da se mikrosatelit Xgwm 135 nalazi na 28.3 cM od Xfbb 274 i na 4.2 cM od lokusa Glu-1 na hromozomu 1A. Na hromozomu 1B mikrosatelit Xgwm 18 se nalazi na 12.9 cM od Xcdo 99 i na 9.7 cM od Xfba 245.

Liu et al. (1996) su integrirali u RFLP mapu hromozoma ječma 46 mikrosatelita na osnovu proučavanja četiri različite populacije. Na hromozomu 1H je smešteno 6 mSAT markera, na 2H - 7, na 3H - 8, na 4H - 7, na 5H - 4, na 6H - 7 i na 7H - 7.

Plaschke et al. (1997) su locirali 23 dinukleotidna mikrosatelitska markera na 15 različitih hromozoma pšenice, koji su prethodno bili mapirani sa STS, RFLP i RAPD markerima kod 40 sorata u cilju ocene njihove divergencije.

Na osnovu mikrosatelita Ko & Henry (1997) su izvršili evaluaciju australijskih sorti pšenice i omogućili njihovu brzu identifikaciju.

Devos et al. (1995) su koristili dve mikrosatelitske sekvence kod rezervnih proteina pšenice kao molekularne markere.

Plaschke et al. (1996) su upotrebili aneuploide da bi odredili mikrosatelitske lokuse kod pšenice.

Zhao & Kochert (1993) su mapirali (GGC)_n mikrosatelite iz pirinča u cilju proučavanja njihove filogenetske distribucije.

Većina istraživača koji su radili sa mikrosatelitima su uglavnom njima dopunjavali genetičke mape različitih tipova markera kod biljnih vrsta.

Zaključak

Mikrosateliti su genetički markeri koji imaju značaj u mapiranju genoma biljnih

vrsta. Pozicioniranje repetitivnih sekvenci nukleotida DNA (<100 bp), koje su napravnološko raspoređene po celom genomu, uglavnom služi kao dopuna drugim tipovima markiranja. Visok nivo polimorfnosti mikrosatelita koji postoji između različitih genotipova omogućuje identifikaciju genotipova unutar iste vrste ali ne i komparativno mapiranje između različitih vrsta.

LITERATURA

- ANDERSON, J.A., SORRELLS, M.F., TANKSLEY, S.D. (1993): RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to preharvest sprouting in wheat. *Crop Sci.* 33, 453-459.
- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. (1988): Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Appl. Genet.* 76, 228-236.
- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. (1990): Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *BioTechnology* 8, 930-932.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- BURR, B., EVOLA, S.V., BURR, F.A., BECKMANN, J.S. (1983): The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: *Genetics Engineering - Principles and Methods* (J.K. Setlow & A. Hollaender, eds). Plenum Press. NY, 5, 45.
- CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF, P.M. (1990): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology* 9, 553-557.
- DEVOS, K.M., BRYAN, G.J., COLLINS, A.J., STEPHENSON, P., GALE, M.D. (1995): Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular marker. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 247-252.
- DRAŽIĆ S. (1986): Prilog ispitivanju morfoloških i produktivnih svojstava novih linija flue-cured duvana. *Tutun/Tobacco*, 7-8, 5-16.
- DRAŽIĆ S. (1986a): Prilog proučavanju heterozisa i interakcije nealelnih gena duvana (*N.tabacum L.*). *Tutun/Tobacco*, 3-4, 99-108.
- DRAŽIĆ S., ARSIĆ B. (1986): Prilog ispitivanju morfoloških i produktivnih svojstava novih linija duvana tipa Jaka. *Tutun/Tobacco*. 9-10, 291-298
- DRAŽIĆ S., KOJIČIĆ V. (1987): Ispitivanje proizvodnih svojstava novih linija duvana tipa burley. *Tutun/Tobacco*. 7-8, 231-245.
- DRAŽIĆ S. (1990): Kombinacione sposobnosti genotipova flue-cured duvanau dialelnom ukrštanju. *Tutun/Tobacco*. 1-6, 21-34.
- DRAŽIĆ S., GORDANA ŠURLAN (1990): Genetic and phenotypic path analysis and heritability in tobacco (*N.tabacum L.*). *Genetika*, 2, 99-104
- DRAŽIĆ S. (1997): Dostignuća i pravci promena u oplemenjivanju duvana. *Selekcija i semenarstvo*, 3-4, 165-175.
- DRAŽIĆ S., PRODANOVIĆ S. (1999): Phenotypic divergence of flue-cured virginia tobacco varieties. *Genetika*, 1, 81-86.
- GALE, M.D., ATKINSON, M.D., CHINOY, C.N., HARCOURT, R.L., JIA, J., LI, Q.Y., DEVOS, K.M. (1995): Genetic map of hexaploid wheat. *Proc. 8th Int. Wheat Genetics Symp.*, Beijing, China, p. 29-40.
- GRANER, A., BAUER, A., KELLERMANN, S., KIRSHNER, J., MURAYA, K., JAIHOOR, A., WENZEL, G. (1994): Progress of RFLP-map construction in winter barley. *Barley Genetics Newsletter*, 23, 53-64.
- ISAAC, P. (1997): Choosing appropriate technologies for marker-assisted breeding. In: *Progress in Genome Mapping of Wheat and Related Species* Guire, P., Qualset, C., Eds.). University of California, USA.

- JEFFREYS, A.J., WILSON, V., LAY THEIN, S. (1985): Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73.
- JONES, S.S., DVORAK, J., QUALSET, C.O. (1990): Linkage relations of Gli-D1, Rg2 and Lr21 on the short arm of chromosome 1D in wheat. *Genome* 33, 937-940.
- JONES, S.S., DVORAK, J., KNOTT, D.R., QUALSET, C.O. (1991): Use of double-ditelosomic and normal chromosome 1D recombinant substitution lines to map Sr33 on chromosome arm 1DS in wheat *Genome*, 34, 505-508.
- JOVANOVIĆ, B., ĐOKIĆ, A., PRODANOVIĆ, S., MLADENOV, N., MALETIĆ, RADOJKA. (1992): Uticaj morfoloških osobina klasa na masu zrna pšenice. *Savremena poljoprivreda*, 40/4, 31-35.
- JOVANOVIĆ, B., PRODANOVIĆ, S., MALETIĆ, RADOJKA. (1992a): Estimates of environmental effects in comparative variety trials. *Review of Research Work at the Faculty of Agriculture - Belgrade*, 37/2, 167-172.
- Jovanović, B., Prodanović, S., Mladenov, N. (1995): Primena bulk metode za ocenu osobina hibridnih populacija F2 i F3 generacije. *Selekcija i semenarstvo*, 1/1, 17-19.
- JOVANOVIĆ, B., YAN, Y., PRODANOVIĆ, S., MLADENOV, N. (1995a): Genetic models of wheat gliadin components in the F2 generation of Skopjanka x Agrounija cross. *Genetika*, 27/3, 151-158.
- KLEINHOF, A., KILIAN, A., SAGHAI MAROOF, M.A., BIYASHEV, R.M., HAYES, P., CHEN, F.Q., LAPITAN, N., FENWICK, A., BLAKE, T.K., BOLLINGER, J., KNAPP, S.J., LUI, B., SORELLS, M., HEUN, M., FRANCKOWIAK, J.D., HOFFMAN, D., SKADSEN, R., STEFFENSON, B.J. (1993): A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordem vulgare* L.) genome. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 705-712.
- KO, H.L., HENRY R.J. (1997): Distinction of Australian wheat varieties using microsatellites. *Progress in Genome Mapping of Wheat and Related Species* (Guire, P., Qualset, C., eds.). University of California, USA.
- K NZEL, G., PRODANOVIĆ, S., ENDO, T.R. (2000): Integration of deletion breakpoints of chromosome 7H (1) into the Igri/Franka-derived RFLP map. *Barley Genetics Newsletter*, 30 (in press).
- Kurarta, N., Moore, G., Nagamura, Y., Foote, T., Yano, M., Minobe, Y., Gale, M. (1994): Conservation of genome structure between rice and wheat. *Biotechnology* 12, 276-278.
- LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M.J., LINCOLN, S.E., NEWBURG, L. (1987): Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1, 174-181.
- LEROY, P., NEGRE, S., TIXIER, MH., PERRETANT, MR., SOURDILLE, P., GAY, G., BERNARD, M., COVILLE, JL., QUETIER, F., NELSON, C., SORRELIS, M., MARINO. CL., HART, G., FRIEBE, B., GILL, BS, RODER, M. (1996): A genetic reference map for the bread wheat genome *Triticum aestivum* L. em Thell. In: 6th Public ITMI Workshop. Sydney, Australia.
- LEROY, P., TIXIER, MH., CHAREF, B., LOUSSERT, A., GAY, G., SOURDILLE, P., BERNARD M., NELSON, C., SORRELLS, M., HART, G., KORZUN, V., RODER, M. (1997): Les microsatellites, une nouvelle generation de marqueurs moleculaires pour l'analyse genetique et la selection assistee par marqueurs (SAM) chez le ble tendre - ITMImap & IWMMN. In: 6th Public ITMI Workshop, Clermont-Ferrand, France.
- LITT, M., LUTY, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 397-401.
- LIU, Z.W., BIYASHEV, R.M., SAGHAI MAROOF, M.A. (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 869-876.
- MA, Z.Q., SORRELLS, M.E., TANKSLEY, S.D. (1994): RELP markers linked to powdery mildew resistance genes Pm1, Pm2, Pm3 and Pm4 in wheat. *Genome* 37, 871-875.
- MA, Z.Q., SORRELLS, M.E. (1995): Genetic analysis of fertility restoration in wheat using restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.*, 1137-1143.
- MARINO, C.L., NELSON, J.C., LU, Y.H., SORRELLS, M.E., LEROY, P., TULEEN, N.A., LOPES, C.R., HART, G.E. (1996): Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Genome*, 39, 359-366.

- MATHER, K., JINKS J.L. (1971): Biometrical genetics. The study of continuous variation. In: Chapman and Hall Ltd. London, p. 382.
- MCGUIRE, P., QUALSET, C. (1997): Progress in genome mapping of wheat and related species. Genetic resources conservation program. University of California. Davis, CA USA.
- MILUTINOVIĆ, M., ŠURLAN-MOMIROVIĆ, G., RAKONJAC, V., ŽIVANOVIĆ, T., RALEVIĆ, N., RALEVIĆ, I. (1996): Multivariate analysis in different wild sweet cherry (*Prunus avium* L.) populations. *Genetika*, 28/2, 79-84.
- NELSON, J.C., VAN DEYNZE, A.E., AUTRIQUE, E., SORRELLS, M.E., LU, Y.H., MERLINO, M., ATKINSON, M., LEROY, P. (1995a): Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 2. *Genome*, 38, 516-524.
- NELSON, J.C., VAN DEYNZE, A.E., AUTRIQUE, E., SORRELLS, M.E., LU, Y.H., NEGRE, S., BERNARD, M., LEROY, P. (1995b): Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 3. *Genome*, 38, 525-533.
- NELSON, C., SORRELLS, M.E., VAN, DEYNZE, A.E., LU, Y.H., ATKINSON, M., BERNARD, M., LEROY, P., FRAIS, J.D., ANDERSON, J.A. (1995c): Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5 and 7. *Genetics*, 141, 721-731.
- OLSON, M., HOOD, L., CANTOR, C., BOTSTEIN, D. (1989): A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245, 1434-1435.
- PLASCHKE, J., BORNER, A., WENDEHAKE, K., GANAL, M.W., Roder, M.S. (1996): The use of wheat aneuploides for the chromosomal assignment of microsatellite loci. *Euphytica*, 89, 33-40.
- PLASCHKE, J., GANAL, M., Roder, M. (1997): Estimation of genetic diversity in elite material of hexaploid bread wheat with microsatellite markers. In: Progress in Genome Mapping of Wheat and Related Species (Guire, P., Qualset, C., eds.). University of California. Davis, USA.
- PRODANOVIĆ, S. (1993): Genetic values of F1 wheat hybrids obtained in diallel crosses. Review of Research Work of the Faculty of Agriculture - Belgrade, 38/2, 25-37.
- PRODANOVIĆ, S., BOEUF, C., GAY, G., BERNARD, M. (1997): Molecular analysis of group 1 chromosomes of two bread wheat sister varieties, their parents and their DH progeny. International Triticeae Mapping Initiative, ITMI Public Workshop, France.
- QI, X., NIKS, R.E., STAM, P., LINDHOUT, P. (1998): Identification of QTLs for partial resistance of leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 96, 1205-1215.
- RAKONJAC, V., ŽIVANOVIĆ, T., NIKOLIĆ, D. (1994): Components of variability and heritability of some cherry characters. *Genetika* 26/3, 189-193.
- RODER, M., PLASCHKE, J., GANAL, M. (1997): Isolation, characterization and application of microsatellite markers in wheat. In: Progress in Genome Mapping of Wheat and Related Species (Ed. Guire, P. Qualset, C.). University of California, USA.
- SAIKI, R., SCHARF, S., FALLOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350.
- Sax, K. (1923): The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 52-560.
- SHERMAN, J.D., FENWICK, A.L., NAMUTH, D.M., LAPITAN, N.L.V. (1995): A barley RFLP map: alignment of the three barley maps and comparison to garminae species. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 681-690.
- ŠURLAN-MOMIROVIĆ G., BJELIĆ, V., RAKONJAC, V., ŽIVANOVIĆ, T., TODOROVIĆ, G. (1996): Genetic, phenotypic variability and correlation analysis in some cabbage cultivars. *Acta Horticulturae*, 462/1, 111-119.
- TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H., BONIERBALE, M.W. (1989): RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *BioTechnology*, 7, 257-264.
- TAUTZ, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA marker. *Nucleic Acid Research*, 17, 6463-6471.
- THOMAS, W.T.B., POWELL, W., WAUGH, R., CHALMERS, J.K., BARUA, U.M., JACK, P., LEA, V., FOSTER, B.P., SWANSTON, J.S., ELLIS, R.P., HANSON, P.R., LANCE, R.C.M. (1995): Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 91, 1037-1047.
- TODOROVIĆ G., ŠURLAN-MOMIROVIĆ, G., ŠATARIĆ, I., ŽIVANOVIĆ, T., PRODANOVIĆ, S. (1997): Genetic analysis and heterosis of

- yield in maize hybrids. *Genetika*, 29/3, 163-172.
- VAN, DEYNZE, A.E., DUBCOVSKY, J., GILL, K.S., NELSON, J.C., SORRELLS, M.E., DVORAK, J., GILL, B.S., LAGUDAH, E.S., MCCOUCH, S.R., APPELS, R. (1995): Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oat. *Genome*, 38, 5-59.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18, 7213-7218.
- 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 Acid Research*, 22, 6531-6535.
- WILLIAMS, K.J., FISHER, J.M., LANGRIDGE, P. (1994): Identification of RELP markers linked to the cereal cyst nematode resistance gene (Cre) in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 927-930.
- YAN, Y., JOVANOVIĆ, B., PRODANOVIĆ, S., ZORIĆ, D. (1994): Application of electrophoresis for gliadin characterization and varietal identification in wheat. *Journal of Sci. Agric. Research*, 55, 93-105.
- YAN, Y., PRODANOVIĆ, S., ŠURLAN-MOMIROVIĆ, G., ZORIĆ, D., LIU, G. (1997): Chromosomal location of genes coding wheat gliadin proteins by high performance capillary electrophoresis analysis. *Genetika*, 29/3, 181-194.
- ZHAO, X.P., KOCHERT, G. (1993): Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 21, 607-614.
- ŽIVANOVIĆ, T. (1997): The influence of recurrent selection on the combining ability of ZPSinS4 population traits in maize. Review of research work at the faculty of Agriculture - Belgrade, 42/2, 79-90.

MICROSATELLITE MAPPING OF PLANT GENOMES

PRODANOVIĆ S., ŽIVANOVIĆ T., DRAŽIĆ S.

SUMMARY

Microsatellites are DNA markers, based on the repeated nucleotide sequences number polymorphism. They belong to a group of PCR markers and are mainly used as an addition to other types of markers. Their characteristics and technical aspects of their application are discussed in the present study. Furthermore, some results obtained by the use of the microsatellite DNA in genetic mapping of plant genomes are also presented. Although microsatellites provide the identification of genotypes within a species, inadequacy of comparative mapping of different species is their serious blemish.

Key words: microsatellites, repeated sequences, markers, PCR