

"Zbornik radova", Sveska 41, 2005.

UDK 577.21:575.116.4
Pregledni rad - Review

MOLEKULARNI MARKERI II. MIKROSATELITI

Pržulj, N.¹, Perović, D.²

IZVOD

Molekularni markeri označeni kao mikrosateliti imaju više alternativnih naziva, kao što su jednostavne ponavljajuće sekvence (simple sequence repeats, SSRs), kratki tandemski ponovci (short tandem repeats, STRs) ili varijabilni broj tandemskih ponovaka (variable number tandem repeats, VNTR). Mikrosateliti se odlikuju visokim polimorfizmom, kodominantnim efektom i ponovljivošću, zbog čega imaju efikasnu primenu u mapiranju genoma, populacionoj genetici, selekciji, identifikaciji genotipova i dokazivanju srodnosti i očinstva. Efikasni su za filogenetska proučavanja do nivoa speciesa, ali se ne preporučuju za filogenetske rekonstrukcije i taksonomiju. U radu se diskutuje polimorfizam i frekvencija mikrosatelita, distribucija u genomu i citoplazmi, njihovo određivanje metodom hibridizacije sa probom i na osnovu PCR reakcije, kao i njihova primena. Dat je informativan prikaz laboratorijske procedure i komparativna analiza mikrosatelita u odnosu na druge molekularne markere. Kao i svi ostali molekularni markeri, i mikrosateliti imaju određene prednosti i nedostatke, koji su takode dati u ovom radu.

KLJUČNE REČI: mikrosateliti, polimorfizam, frekvencija, varijabilnost, primena, PCR proizvodi, prednosti, nedostaci

Uvod

Molekularni markeri označeni kao mikrosateliti (microsatellites) se često nazivaju i kratki tandemski ponovci (Short Tandem Repeats, STRs), jednostavne ponavljajuće sekvence (Simple Sequence Repeats, SSRs) ili varijabilni broj tandemskih ponovaka (Variable Number Tandem Repeats, VNTR).

Mikrosateliti su prvo otkriveni kod sisara, a njihovo prisustvo kod biljaka prvi su publikovali Condit and Hubbel (1991). Narednih godina je utvrđeno da se

-
- 1 Prof. dr Novo Pržulj, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad
 - 2 Dr Dragan Perović, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Department of Genebank, AGMOM, Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany

mikrosateliti nalaze u velikoj frekvenciji pored genoma životinja i u genomu biljaka (Jarne and Lagoda, 1996).

Definicija

Mikrosateliti su kratki segmenti DNK koji imaju ponavljajuće sekvence baza, koje se mogu sastojati od jednog do pet nukleotida, mada se, ali vrlo retko, nalaze i ponovci do 10 nukleotida (Bruford and Wayne, 1993).

- a) TTTTTTTTTT ili (T)₁₀
- b) ATATATATATATATAT ili (AT)₈
- c) CGTCGTCGTCGTCGTCGT ili (CGT)₆
- d) CCATCCATCCATCCATCCATCCAT ili (CCAT)₆

Osnovna repetitivna sekvenca ili jedinica ponavljanja mikrosatelita (a) se sastoji od jednog nukleotida, T, i ona se ponavlja deset puta; osnovna repetitivna sekvenca mikrosatelita (b) je AT i ona se ponavlja osam puta itd.

Polimorfizam mikrosatelita

Mikrosateliti su visoko polimorfni markeri, a polimorfnost je posledica variranja broja ponovaka u DNK (Levinson and Gutman, 1987). Pored tandemskih ponovaka u genomu se mogu nalaziti mnogi jednostruki ponovci. U populaciji može biti i do 80 alela u nekom lokusu koji imaju isti ponovak, a razlikuju se u dužini, odnosno broju ponovaka. Kod organizama koji su homozigotni za neki mikrosatelitni lokus nalazi se isti broj ponovaka na oba hromozoma, dok heterozigoti imaju različit broj ponovaka na hromozomima. Regioni susedni mikrosatelitnom lokusu nazivaju se bočni (flanking) regioni, i oni su manje podložni mutacijama, što olakšava sintezu prajmera (Beckmann and Solter, 1990).

Homozigot: (mikrosatelitni lokus u oba heliksa DNK/hromozoma ima isti broj ponovaka)

```

...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...
...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...
...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...
...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...

```

5' bočni kraj	repetitivne sekvence	3' bočni kraj
(5' <i>flanking region</i>)	(repetitive sequences)	(3' <i>flanking region</i>)

Heterozigot: (mikrosatelitni lokus u jednom heliksu DNK/hromozomu ima 10 a u drugom heliksu DNK/ hromozomu ima 8 ponovaka)

```

...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...
...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...
...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...
...TAGCCTTCTAGCGAGAGAGAGAGAGAGATCGTTGCAACAG...

```

U početku se smatralo da se većina mikrosatelitnih lokusa nalazi u regionu centromere, telomera i u osnovi hromatinskih petlji, i da neki od njih imaju ulogu u parenju hromozoma i sinapsisu (Jarne and Lagoda, 1996). Na osnovu

genetičkog i fizičkog mapiranja Rder et al. (1998) i Gupta et al. (1999) su utvrdili da mikrosateliti kod pšenice nisu grupisani u posebnim regionima, nego su uglavnom ravnomerno raspoređeni po celom genomu.

Visoka varijabilnost SSR lokusa je posledica visoke frekvencije mutacija kod ovih nukleotidnih sekvenci, koje kod di- i tetranukleotidnih ponovaka iznose 0,001 mutacija po generaciji (Goldstein and Pollock, 1997). Postoje dve hipoteze koje objašnjavaju kako nastaju mutacije kod mikrosatelita: (1) pogrešna replikacija (strand-slippage replication) i (2) nejednak crossing over tokom mejoze (Levinson and Gutman, 1987; Li et al., 2002). Pogrešna replikacija se smatra osnovnim tipom mutacija kod mikrosatelita. Ovaj tip mutacija nastaje tokom sinteze zaostajućeg lanca DNK, kada polimeraza izostavlja, tj. ne replicira sve ponovke ili replicira neke ponovke više puta. Kao rezultat toga nastaje novi lanac DNK koji ima različit broj ponovaka u odnosu na roditeljski lanac. Drastičnije promene u veličini mikrosatelita su posledica nejednakog crossing overa, u kojem jedan hromozom dobija više, a drugi manje ponovaka (Jarne and Lagoda, 1996). Stopa mutacija SSR lokusa može biti visoka čak i kod vrsta za koje je utvrđena niska genetička divergentnost. Tako, kod različitih sorti soje Rongwen et al. (1995) su našli 12-16 alela po lokusu i prosečnu heterozigotnost od 0,87 za sedam SSR lokusa.

Variranje mikrosatelita je uglavnom neutralno i nema fenotipsku ekspresiju. U genomu čoveka 90% poznatih mikrosatelita se nalazi u nekodirajućim regionima DNK. Kada mutiraju mikrosateliti koji se nalaze u kodirajućim sekvencama DNK dolazi do pojave određene bolesti. Tko npr. na hromozomu broj 4 nalazi se mikrosatelit sa osnovnim ponovkom CAG, i ukoliko mutacijama dođe do enormnog povećanja broja ponovaka kod odraslih osoba dolazi do pojave Hantingtonove bolesti (Cummings and Zoghbi, 2000). CAG ponovak se nalazi u prvom egzonu HD gena sa 6-35 ponovaka kod zdravih osoba, a 36-121 kod obolelih osoba. Povećanje osnovnog ponovka CTG, koji se nalazi u nekodirajućem regionu hromozoma 19, sa normalnog broja 5-37 na 50-1000, dovodi do mišićne distrofije i svih ostalih pleiotropnih efekata. Povećanje CGG ponovaka na X hromozomu, sa normalnog broja 6-53 na 60-200 dovodi do mentalne retardiranosti i niz fenotipskih promena kod muškaraca, u frekvenciji 1/4000 (<http://www.conquerfragilex.org>). Postoji još niz primera bolesti izazvanih promenama u mikrosatelitima (<http://www.ich.ucl.ac.uk>).

Frekvencija i distribucija mikrosatelita u genomu

Frekvencija mikrosatelita značajno varira između različitih organizama (Lagercrantz et al., 1993; Wang et al., 1994; Gupta et al., 1996; Weising et al., 1998). Procenjuje se da humani genom sadrži u proseku 10 puta više mikrosatelita nego biljni genomi (Powell et al., 1996). Kod gajenih biljnih vrsta, kod kojih su ispitivani mikrosateliti- pirinač, pšenica, kukuruz, ječam, duvan itd, od dinukleotida najzastupljeniji su (AC)_n i (GA)_n, a od trinukleotida (AAG)_n i (AAT)_n (Gupta et al., 1996). Većina mikrosatelita pšenice su dinukleotidi, trinukleotida ima deset puta manje od dinukleotida, dok su tetranukleotidi veoma retki (Ma et al., 1996). Dinukleotidi imaju uglavnom do 40 ponovaka. Kod DNK kloroplasta mikrosateliti (cpSSRs) su zastupljeni u manjoj frekvenciji (Wang

et al., 1994), mada su Powell et al. (1995) i Proven et al. (1999) otkrili kod različitih biljaka oko 500 kraćih do srednje dugih mikrosatelita, obično sa mononukleotidnim ponovcima.

Tab. 1. Terminologija upotrebe mikrosatelita (Gupta and Varshney, 2000, Orig)

Tab. 1. Microsatellite application terminology

Oznaka Sign	Naziv metode Method	Autor Author
SSR	Simple sequence repeat	Hearne et al., 1992.
STR	Short tandem repeat	Edwards et al., 1991.
STMS	Sequence Tagged microsatellite site	Beckman & Soller, 1990.
SSLP	Simple sequence length polymorphism	Tautz, 1989.
MP-PCR	Microsatellite - primed PCR	Meyer et al., 1993.
SPAR	Single primer amplification reaction	Gupta et al., 1994.
AMP-PCR	Anchored microsatellite primed PCR	Wolff et al., 1995.
ISA/ISSR	Inter-SSR amplif/Inter-simple sequence repeats	Zietkiewicz et al., 1994.
ASSR	Anchored simple sequence repeat	Wu et al., 1994.
RAM	Random amplified microsatellite polymorphism	Wu et al., 1994.
RAMPO	Random amplified microsatellite polymorphism	Richardson et al., 1995.
RAHM	Random amplified hybridization microsatellites	Cifarelli et al., 1995.
RAMS	Random amplified microsatellites	Ender et al., 1996.
SAMPL	Selective amplification of microsatellite polymorphic loci	Morgante and Vogel, 1994.
REMAP	Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism	Kalender et al., 1999.

Kod pšenice mikrosateliti su pravilno raspoređeni u linkage grupama (Rder et al., 1998). Nešto veću koncentraciju mikrosatelita kod ove biljne vrste autori su otkrili u regionu centromere na hromozoma 2A, 3A, 3B, 4B, 5B i 6B. Kod nekih biljnih vrsta, kao što su šećerna repa i paradajz, mikrosateliti su koncentrisani oko centromere (Schmidt and Heslop-Harrison, 1996; T. Areshchenkova and M.W. Ganal, nepublikovano, cit. Röder et al., 1998).

U cilju maksimalnog iskorišćavanja varijabilnosti mikrosatelita, u laboratorijama je razvijen niz modifikacija ovoga sistema molekularnih markera. Sve te metode se zasnivaju na PCR reakciji, a iskorišćavaju osobine i potencijal mikrosatelita samo na drugačiji način. U Tab. 1, koja je prezentirana u originalu, bez prevoda, citirane su sve metode/modifikacije mikrosatelita koje su publikovane do 2000 godine. Neki nazivi predstavljaju samo akronime za istu metodu.

Otkrivanje mikrosatelita

U otkrivanju i proučavanju mikrosatelita koriste se dve osnovne tehnike; tehnika hibridizacija i tehnika PCR reakcije.

Opšti princip tehnike hibridizacije je da se radioaktivno ili fluorescentno označene sintetske oligonukleotidne probe, komplementarne sa ponavljajućim sekvencama, koriste za hibridizaciju sa genomskom DNK, koja je digestovana sa restrikcionim enzimima i razdvojena na agaroznom gelu. Dužina oligonukleotida probe, zavisno od porekla ispitivane DNK, cilja istraživanja, mogućnosti njene sinteze itd., može biti od nekoliko nukleotida do nekoliko stotina Kb (Gupta and Varshney, 2000). Fragmenti genomske DNK koji hibridizuju sa sintetskim oligo-

nukleotidima imaju veličinu od nekoliko stotina baznih parova do 8-10kb (Vosman et al., 1992; Arens, et al., 1995; Varshney et al., 1998). Veličina fragmenata DNK koji hibridizuju sa probom ne zavisi od mikrosatelita, nego upotrebljenih restrikcionih enzima i frekvencije i rasporeda sekvencionih mesta na koja deluju ti restrikcioni enzimi. Nekada se u okviru istog restrikcionog fragmenta nalazi više od jednog tipa SSR. Fingerprint oligonukleotida (karakterističan raspored traka DNK na gelu) dobijen na ovakav način ustvari predstavlja polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata na kojima se nalaze mikrosateliti, čak i u onim slučajevima kada nema razlike u samim satelitima koji se nalaze na restrikcionim fragmentima. Ovom tehnikom se otkriva nivo polimorfizma između srodnih genotipova.

Drugi način determinacije polimorfizma mikrosatelita/DNK se zasniva na korišćenju PCR reakcije. PCR se može iskoristiti u sledeća dva slučaja:

- 1) ako postoje specifični prajmeri za bočne krajeve mikrosatelita (Tautz, 1989) ili
- 2) ako se koriste kao prajmeri sintetički oligonukleotidi koji su komplementarni sa mikrosatelitskim ponovkom, koji se nalazi u genomu (Wu et al., 1994).

Beckmann and Soller (1990) smatraju da su bočne sekvence mikrosatelitnih lokusa u okviru vrsta jednog roda prilično konzervativne i da one mogu biti iskorišćene za sintezu prajmera. Uz upotrebu tih prajmera označava se repetitivna DNK sekvenca sa obe strane (sequence tagged microsatellite sites, STMS) i vrši njena PCR amplifikacija. Nakon toga varijabilnost u dužini te označene repetitivne sekvence registruje se na gelu i ona predstavlja polimorfizam te sekvence mikrosatelita.

U drugom slučaju, gde se kao prajmeri koriste oligonukleotidi komplemetrani sa određenim mikrosatelitom, razvijeno je više tehnika označavanja mikrosatelitne sekvence prajmerima, da bi se mogla izvršiti njena amplifikacija. Jedan od njih je MP-PCR (microsatellite-primed PCR) kako su ga nazivali Meyer et al. (1993) ili SPAR (single primer amplification reaction), kako su ga nazvali Gupta et al. (1994). Suština ovoga postupka je upotreba sintetskih oligonukleotida, od kojih je svaki komplementaran mikrosatelitskom ponovku sa suprotnih krajeva. Ako su prajmeri dovoljno blizu za odvijanje amplifikacije sekvenca DNK između njih biće amplificirana. Inače, da bi se amplifikacija mogla odvijati udaljenost prajmera ne bi trebala da bude veća od 1 Kb (Gupta et al., 1994). Kod AMP-PCR (Anchored microsatellite-primed PCR) ili ISA (Inter-SSR amplification) ili ISSR koriste se radioaktivno označeni di- ili trinukleotidni ponovci (Zietkiewicz et al., 1994). RAMSs (Random amplified microsatellite polymorphism) metod koristi SSR prajmer vezan na 5' kraj i RAPD primer. Polimorfizam u dužini fragmenata nastaje usled različitog položaja SSR mesta ili promenom dužine sekvence između prajmera. Ovaj amplificirani fragmet može biti upotrebljen za genetičko mapiranje, nakon digestije sa restrikcionim enzimom. SAMPL (Selective, amplification of microsatellite polymorphic loci) je verzija poboljšane STMS metode, a predstavlja kombinaciju metoda STMS i AFLP. Kod ove metode mikrosateliti se koriste za dizajniranje prajmera, ali nije potrebno prethodno kloniranje, sekvencioniranje i karakterizacija specifičnih mikrosatelitnih lokusa, što je

neophodno kod STMS metode. Kod SAMPL koristi se pre-amplifikacija (Deo AFLP metodike) da bi se smanjio broj matričnih DNK (Witsenboer, et al., 1997).

Primena mikrosatelita

Zbog visokog polimorfizma u odnosu na RFLPs, RAPDs i AFLPs, mikrosateliti se smatraju dobrim markerima za sudsku identifikaciju, analizu porekla - očinstvo, mapiranje gena, oplemenjivanje, identifikaciju sorti i populacionu genetiku (Beyermann et al., 1992; Rafalski and Tingey, 1993; Gupta et al., 1996; Jarne and Lagoda, 1996). Vosman et al. (1992) ističu da su ovi molekularni markeri najpogodniji za determinaciju genotipova i sorti koje imaju sličnu genetičku osnovu.

Za mapiranje mikrosatelitnih lokusa intenzivno je korišćena STMS analiza (Weising et al., 1998). Na osnovu toga su napravljene linkage mape mikrosatelita za hlebaru i durum pšenicu, ječmu, kukuruz, pirinač, soju, paradajz i još nekoliko biljnih vrsta (Gupta and Varshney, 2000).

Poznato je da je oplemenjivanje, odnosno stvaranje nove sorte ili hibrida, dugotrajan proces, koji se nalazi pod velikim uticajem ekoloških faktora. Svaka pouzdana i ekonomski opravdana informacija, koja omogućava raniji izbor poželjnih genotipova, skraćuje proces selekcije i čini ga efikasnijim i jeftinijim. Na osnovu linkage mapa i genetičkog mapiranja do sada je lociran značajan broj gena za važne agronomske i fiziološke osobine. Konvencionalna selekcija se uglavnom obavlja na osnovu fenotipske ekspresije tih gena. Zbog velikog uticaja negenetičkih faktora na kvantitativne, a ujedno i najvažnije agronomske osobine, konvencionalno oplemenjivanje i izbor poželjnih genotipova su otežani. Naime, postoji velika verovatnoća odhacivanja genotipa koji nosi poželjni gen slabog efekta, čija je ekspresija prikrivena negenetičkim faktorima. Zbog toga se u molekularnim markerima vidi mogućnost indirektnog otkrivanja poželjnih gena/lokusa, bez obzira na ekološke uslove i fazu porasta. Otkrivanje molekularnog markera koji je veoma blizu lokusa za neku osobinu, koji ustvari kosegregira sa tim genskim lokusom, otvara mogućnost iskorišćavanja molekularnih markera u selekciji. Naime, u tom slučaju selekcija poželjnog gena se vrši indirektno, preko determinacije prisutnosti vezanog molekularnog markera. Indirektna selekcija uz pomoć markera, koja ustvari predstavlja selekciju na genotip, se naziva marker-assisted selection (MAS).

Powell et al. (1996) smatraju da su mikrosateliti najprikladniji molekularni markeri za MAS. Mikrosatelitima je već determinisano dosta genskih lokusa kod pšenice, pirinča, ječma i soje. Kod pšenice je mikrosatelitima određeno nekoliko gena ili QTL; *Rht8* (Worland et al., 1998), *Rht12* i *Vrn1* (Korzun et al., 1997), QTL za sadržaj proteina (Prasad et al., 1999), genski lokus za prežetveno proklijavanje (Roy et al., 1999) itd. Karakousis et al. (2003) su pozicionirali 18 mikrosatelitnih markera koji se nalaze vrlo blizu 16 važnih osobina ječma. Efikasnost unošenja lokusa donora ovih osobina, koji je odabran na osnovu MAS, zavisila je od markera i kretala se od 10% do 98%. Wricke (2002) je pomoću mikrosatelita determinisao dva lokusa za masu zrna raži, koji se nalaze na 5 i 7 hromozomu, a imaju komplementarni efekat.

Laboratorijska tehnika kod mikrosatelita

Kao i kod svih ostalih metoda i kod ove tehnike je neophodno obaviti ekstrakciju DNK i odrediti njen kvantitet i kvalitet, prema nekom od mnogobrojnih protokola. Za umnožavanje mikrosatelita, koje se naziva amplifikacija (amplification), koristi se standardni PCR protokol. Zavisno od toga koja će se metoda elektroforeze izvoditi i na osnovu toga očitavanje alela, kod PCR reakcije može se koristiti neoznačeni prajmerski par ili prajmerski par kod kojeg je jedan prajmer označen radioaktivno ili fluorescentno. Elektroforeza sa neoznačenim PCR proizvodima može se izvoditi na poliakril amidnom gelu manjem od 20 cm ili na horizontalnom agaroznom gelu. Za slabije opremljene laboratorije i laboratorije koje ne koriste radioaktivno označavanje mali elektroforetski gel sistemi imaju određene prednosti nad bojenjem sa srebrnom ili korišćenjem etidijum bromida. Nedostatak malog elektroforetskog gel sistema je nesigurnost u determinisanju alela koji se razlikuju u jednom do dva para baza, kod alela koji imaju preko 200bp. Međutim, ova poteškoća može biti rešena upotrebom tetranukleotidnih mikrosatelita koji su lakši za očitavanje i kojima se sve više poklanja pažnja u dizajniranju prajmera (Francisco et al., 1996). Radioaktivno označavanje prajmera može biti izvedeno direktnim ugrađivanjem u prajmer radioaktivnih nukleotid trifosfata (dNTP) ili označavanjem kraja jednog prajmera, dok se u nekim sistemima koriste isključivo fluorescentne boje (Karp et al., 1997).

Očitavanje mikrosatelitnih gelova ili autoradiograma je obično jednostavno, jer postojeći elektroforetski sistemi uglavnom imaju visoku rezoluciju, gde se može odrediti i razlika u jednom baznom paru, a i zbog toga što se razlike u alelima mogu predvideti, zahvaljujući repetitivnim jedinicama. Tačno određivanje dužine alela vrši se njegovim poređenjem sa standardom. Neki lokusi stvaraju na gelu subtrake, što otežava očitavanje. Kompleksne, nezavisne mutacije unutar i izvan SSR regiona, uz zadržavanje istog broja nukleotida i pogrešne jednakosti alela (size homoplasy), mogu dovesti do pogrešne interpretacije SSR podataka (Péakall et al., 1998).

Mikrosateliti u odnosu na druge markere

Veliki broj molekularnih markera koji stoji na raspolaganju zahteva njihovo dobro poznavanje, da bi se odabrali najpogodniji za određene potrebe i istraživanja, kao što su npr. oplemenjivanje biljaka, DNK fingerprint, analiza genetičke divergentnosti, komparativno mapiranje i sl. Opremljenost laboratorije, osposobljenost kadra, finansiranje, cilj istraživanja, svrsishodnost i korišćenje dobijenih rezultata su najvažniji kriterijumi izbora tipa molekularnih markera. U literaturi postoji značajan broj radova koji komparativno analiziraju različite molekularne markere, radi određivanja njihove efikasnosti u determinaciji genetičkog polimorfizma. Bez obzira što su neki molekularni markeri efikasniji kod otkrivanja polimorfizma jednog lokusa, a drugi polimorfizma genoma, tj. više lokusa, moguće ih je komparativno analizirati. Komparativna analiza različitih molekularnih markera je neophodna za donošenje odluke pri formiranju laboratorije ili usvajanja novog sistema molekularnih markera. Komparativni fin-

gerprint različitih molekularnih sistema urađen je kod pšenice, ječma, kukuruza i još nekoliko biljni vrsta.

Prilikom proučavanja genetičke divergentnosti Pejić i sar. (1998) su na 33 inbred linije kukuruza komparativno procenili informativnost i efikasnost četiri osnovna sistema molekularnih markera. Najveći prosečan broj alela dobijen je kod mikrosatelita, dok su AFLP bili najefikasniji markeri kod determinisanja više lokusa kod jednog fingerprinta. Na osnovu toga autori sugerišu zamenu RFLP markera sa SSR i AFLP markerima kod proučavanja genetičke sličnosti.

Poređenjem četiri sistema molekularnih markera; RFLPs, RAPDs, AFLPs, SSRs kod analize 18 sorti ječma, Russell et al. (1997) su najveći nivo polimorfizma (100%) u jednom lokusu utvrdili kod SSRs, a najmanji kod AFLPs (48,6%). Do sličnih podataka došli su i drugi istraživači (Maughan et al., 1995; Powell et al., 1996). Međutim, iako AFLP ne otkrivaju najveći nivo polimorfizma ovi molekularni markeri su najefikasniji, jer imaju kapacitet da determinišu mnoge polimorfne lokuse u pojedinom genotipu.

Gupta et al. (1999) daju sveobuhvatnu analizu primene molekularnih markera u oplemenjivanju pšenice, gde navode prednosti i nedostatke pojedinih sistema markera. Mikrosateliti su kodominantni markeri i u odnosu na ostale markere su visoko informativni. Do sada je otkriveno preko 1000 mikrosatelitnih parova prajmera. Na osnovu njihove specifičnosti za određene lokuse i visoke polimorfnosti, mikrosateliti su najpogodniji markeri za MAS. Sa druge strane, mikrosateliti su nepogodni za karakterizaciju genoma (fingerprint), proučavanje genetičke divergentnosti u populaciji, komparativno proučavanje i proučavanje "synteny" (Gupta et al., 1999). Synteny označava nepromenjeni deo linkage mape nakon evolucionog razdvajanja, koji se nalazi u genomima vrsta sa zajedničkim pretkom (pirinač, pšenica, ječam i sl.).

Prednosti mikrosatelita

Mikrosateliti su hipervarijabilni molekularni markeri i otkrivaju visok nivo polimorfizma. Ovim sistemom markera je utvrđeno da jedan lokus soje ima 26 alela (Cregan et al., 1995). SSR markeri su pogodni za identifikaciju sorti i analizu očinstva (Hokanson et al., 1998). U odnosu na druge markere, koji takođe determinišu jedan lokus, kao što su RFLP i izoenzimi, mikrosateliti pokazuju veći polimorfizam. Tako npr. McCouch et al. (1997) su kod pirinča utvrdili 2-25 alela po mikrosatelitnom lokusu u odnosu na 2-4 alela po RFLP lokusu.

Mikrosateliti su kodominantni markeri, što znači da se heterozigoti mogu lako identifikovati (Gupta et al., 1996). Kodominantnost ovoga molekularnog sistema povećava njegovu efikasnost i tačnost u populacionoj genetici u odnosu na AFLP i RAPD molekularne markere.

Pošto se mikrosatelitimima analizira DNK, kod analize se može koristiti i suvi materijal, što nije slučaj kod aloenzima.

Kada su već određeni prajmeri nekog mikrosatelita testiranje genetičkog materijala (kolekcije, generacije razdvajanja i sl.) je relativno jeftino. Pošto su bočne sekvence konzervativne i retko podležu mutacijama, mikrosateliti se uglavnom mogu koristiti za skrining rodova u okviru familije, što proširuje njihovu upotrebu, jer nije potrebno identifikovati prajmere za svaku vrstu i rod (Beckmann and Soller, 1990).

Nedostaci mikrosatelita

Nedostatak ove metode je neophodnost sinteze prajmera za svaki lokus, za što je neophodno klonirati i sekvencionirati klonove koji sadrže SSR. Skrining organizama za pronalazak mikrosatelita i određivanje njihovih prajmera je posebno komplikovan i skup proces, koji nekada daje prilično skromne rezultate. Tako su Kelley and Willis (1998), upotrebom SSR proba, obavili skrining 150.000 klonova DNK, od kojih su 179 hibridizovale sa probom i kasnije sekvencionirane.

Tokom reakcije polimeraza može pogrešno obaviti amplifikaciju (slippage), stvarajući DNK lance koji se razlikuju za jedan do pet ponovaka u odnosu na matičnu DNK (Ciofi et al., 1998). Slippage može predstavljati značajan problem kada su mono- i dinukleotidi osnovne jedinice mikrosatelita. Ovakvi rezultati su praktično neupotrebljivi. Slippage posebno predstavlja problem kod heterozigota, jer u tom slučaju nije moguće razlikovati heterozigot i slippage fragmente.

Tag polimeraza ima tendenciju povremenog dodavanja nukleotida adenozina na 3'-kraj matičnih i amplificiranih lanaca, što dovodi do pogrešne identifikacije alela (Ciofi et al., 1998). Ginot et al. (1996) su razradili metod korekcije ove moguće greške.

Haberl and Tautz (1999) navode da kod automatski sekvencioniranog gela, odnosno automatskog određivanja veličine alela, postoji razlika između stvarne veličine amplificiranog segmenta i vrednosti koju za taj segment pokazuje kompjuter. Tako je za alel dužine 18 nukleotida kompjuter prikazao srednju vrednost od 16,68 nukleotida. Tačna veličina alela se može odrediti njegovim sekvencioniranjem, i kasnijim korišćenjem tog segmenta kao standarda.

Najveći problem korišćenja mikrosatelita u filogenetskim analizama predstavlja homologija. Princip korišćenja sistema mikrosatelita podrazumeva da su komigrirajući fragmenti DNK homologni. Međutim, nehomologija može biti posledica mutacija u bočnim sekvencama i u mikrosatelitima, što može dovesti do pogrešne identifikacije alela, ako se samo determiniše njegova veličina. Sekvencioniranje bočnih fragmenata i mikrosatelita pruža podatak o tačnoj strukturi tog oligonukleotida. Detaljnije objašnjenje problema homologije kod mikrosatelita nalazi se u radovima Blanquer-Maumont and Crouau-Roy (1995), Butler et al. (1999), Ujino et al. (1998), Doyle et al. (1998) i Swofford et al. (1997). Mutacije u bočnim regionima, za koje se vežu prajmeri, mogu inhibirati vezivanje prajmera, što može dovesti do smanjenja ili gubitka PCR proizvoda (Callen et al., 1993). Takvi proizvodi se označavaju kao nulti aleli, i mogu se porediti sa nultim alelima koji su identifikovani kod aloenzima. Nulti aleli se mogu manifestovati kao smanjenje frekvencije heterozigota u odnosu na očekivanu u populacijama slobodne oplodnje, ili kao pojava "praznih linija" na gelu. (Morgante et al., 1998). Tako kod heterozigota, koji ima dva različita mikrosatelitna alela, ako jedan od alela ne može biti amplificiran zbog nemogućnosti vezivanja prajmera, tada će se fenotip (na SSR gelu) pojaviti kao jednostruka traka, koja je inače karakteristična za homozigot. Na taj način SSR markeri pokazuju manju heterozigotnost od one koja je u populaciji.

Kod mikrosatelita postoje i problemi pri analizi podataka (Murphy, 1993) i izračunavanja frekvencije alela (Buth and Murphy, 1999).

Robinson and Harris (1999) smatraju da je upotreba mikrosatelita nesigurna za filogenetska istraživanja na većem taksonomskom nivou od speciesa, ali je vrlo vredna metoda za populacione oplemenjivače i genetičare.

LITERATURA

- Arens, P., Odinet, P., van Heusden, A.W., Lindhout, P., Vosman, B. (1995): GATA- and GACA- repeats are not evenly distributed through-out tomato genome. *Genome* 38: 84-90.
- Beckmann, J.S., Solter, M. (1990): Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* 8: 930-932.
- Beyermann, B., Nrnberg, P., Weihe, A., Meixner, M., Epplen, J.T., Börner, T. (1992): Fingerprinting plant genomes with oligo nucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 691-694.
- Blanquer-Maumont, A., Crouau-Roy, B. (1995): Polymorphism, monomorphism and sequences in conserved microsatellites in primate species. *Journal of Molecular Evolution* 41: 492-497.
- Buth, D.G., Murphy, R.W. (1999): The use of isozyme characters in systematic studies. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 117-129.
- Butler, M.I., Jarret, J.L., LaBonte, D.R. (1999): Sequence characterisation of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 123-132.
- Bruford, M.W., Wayne, R.K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 939-943.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R. (1993): Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.
- Ciofi, C., Funk, S.M., Coote, T., Cheesman, D.J., Hammond, R.L., Saccheri, I.J., Bruford, M.W. (1998): Genotyping with microsatellite markers. *In*: Karp, A., P.G. Isaac and D.S. Ingman (Eds.). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp 195-201.
- Condit, R., Hubbel, S. (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Cregan, P.B., Bhagwat, A.A., Akkaya, M.S., Rongwen, J. (1995): Microsatellite fingerprinting and mapping in soybean. *Methods in Molecular Cell Biology* 5: 49-61.
- Cummings, C.J., Zoghbi, H.Y. (2000): Trinucleotide repeats: mechanism and pathophysiology. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1: 281-328
- Doyle, J.J., Morgante, M., Tingley, S.V., Powell, W. (1998): Size homoplasy in chloroplast microsatellites of wild perennial relatives of Soybean (*Glycine* subgenus *Glycine*). *Molecular Biology and Evolution* 15: 215-218.
- Francisco, L.V., Langston, A.A., Mellersh, C.S., Neal, C.L., Ostrander, E.A. (1996): A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359-362.

- Ginot, F., Bordelais, I., Nguyen, S., Gyapay, G. (1996): Corrections of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucleic Acids Research* 24: 540-541.
- Goldstein, D.B., Pollock, D.D. (1997): Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of polygenetic inference. *Journal of Heredity* 88: 335-342.
- Gupta, M., Chyi, J., Romero-Severson, J., Owen J.L. (1994): Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006
- Gupta, P.K., Balyan, I.S., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1996): Microsatellites in plants - a new class of molecular markers. *Current science* 70: 45-54.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1999): Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K. (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Haberl, M., Tautz, D. (1999): Comparative allele sizing can produce inaccurate allele size differences for microsatellites. *Molecular Ecology* 8: 1347-1350.
- Hokanson, S.Z., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F., McFerson, J.R. (1998): Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. Core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 671-683.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Karakousis, A., Barr, A.R., Chalmers, K.J., Albert, G.A., Holton, T.A., Henry, R.J., Lim, P., Langridge, P. (2003): Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1197-1210
- Karp, A., Edwards, K.J., Bruford, M., Funk, S.M., Vosman, B., Morgante, M., Seberg, O., Kremer, A., Boursot, P., Arctander, P., Tautz, D., Hewitt, G.M. (1997): Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnology* 15: 625-628.
- Kelley, A.J., Willis, J.H. (1998): Polymorphic microsatellite loci in *Mimulus guttatus* and related species. *Molecular Ecology* 7: 769-774.
- Korzun, V., Rder, M.S., Worland, A.J., Brner, A. (1997): Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*RHT12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding* 116: 227-232.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs between plants and vertebrates. *Nucl Acids Res* 21: 1111-1115.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4: 203-221.

- Ma, Z. Q., Rder, M., Sorrells, M.E. (1996): Frequences and sequence characteristics of di-, tri- and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39: 123-130.
- Murphy, R.W. (1993): The phylogenetic analysis of allozyme data: invalidity of coding alleles by presence/absence and recommended procedures. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 25-38.
- Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A., Buss, G.R. (1995): Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. *Genome* 38: 715-723.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T., Blair, M. (1997): Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35: 89-90.
- Meyer, W., Michell, T.G., Freedman, E.Z., Vilgalys, R. (1993): Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primer in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Jour Clinical Biol* 31: 2274-2280.
- Morgante, M., Pfeiffer, A., Jurman, I., Paglia, G., Olivieri, A.M. (1998): Isolation of microsatellite markers in plants. In: Karp, A., P.G. Isaac, D.S. Ingman (Eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp. 288-296.
- Peakall, R. (1997): PCR-Based genetic markers and their application to turfgrass breeding. *Research Journal of International Turfgrass Society* 8: 243-257.
- Pejić, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., Motto, M. (1998): Comparative analysis of genetic similarity among maize inbre lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNiol, J.W., Machray, G.C., Doyle, J.J., Tingey, S.V., Rafalski, J.A. (1995): Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* 5: 1023-1029.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996): The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis? *Mol Breed* 2: 225-238.
- Prasad, M., Varshney, R.K., Kumar, A., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Edwards, K.J., Singh, H., Dhaliwal, H.S., Roy, J.K., Gupta, P.K. (1999): A microsatellite marker associated with a QTL for grain protein content on chromosom arm 2DL of bread wheat. *Theor Appl Genet* 99: 341-345.
- Proven, J., Russell, J.R., Booth, A., Powell, W. (1999): Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology* 8: 505-511.
- Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1993): Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9: 275-280.
- Robinson, J.P., Harris, S.A. (1999): Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A Phylogenetic perspective. In: Gillet, E.M. (ed). *Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*.

- Roder, M.S., Korzun, V., Gill, B.S., Ganal, M.W. (1998): The physical mapping of microsatellite markers in wheat. *Genome* 41: 278-283.
- Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U., Cregan, P.B. (1995): The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 43-48.
- Roy, J.K., Prasad, M., Varshney, R.K., Balyan, H.S., Blake, T.K., Dhaliwal, H.S., Singh, H., Edwards, K.J., Gupta, P.K. (1999): Identification of a microsatellite on chromosome 6B and a STS on 7D of bread wheat showing association with preharvest sprouting tolerance. *Theor. Appl Genet* 99: 336-340.
- Russell, J., Fuller, J., Young, G., Thomas, B., Taramino, G., Macaulay, R., Waugh R., Powell, W. (1997): Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40: 442-450.
- Schmidt, T., Heslop-Harrison, S. (1996): The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8761-8765.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. (1997): Phylogenetic interference. *In*: Hillis, D.M., C. Moritz, B.K. Mable (Eds.) *Molecular Systematics*, 2nd edition. Sinauer Assoc. Inc., Massachusetts, pp 407-514.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acid Res* 17: 6463-6471.
- Ujino, T., Kawahara, T., Tsmura, Y., Nagamitsu, T., Yoshimaru, H., Ratnam, W. (1998): Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81: 422-428.
- Varshney, R.K., Sharma, P.C., Gupta, P.K., Balyan, H.S., Ramesh, B., Roy, J.K., Kumar, A. (1998): Low level of polymorphism detected by SSR probes in bread wheat. *Plant Breeding* 117: 182-184.
- Vosman, B., Arens, P., Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M. (1992): Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 239-244.
- Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G., Tanksley, S.D. (1994): Survey of plant short tandem repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 1-6.
- Weising, K., Winter, P., Huttel, B., Kahl, G. (1998): Microsatellite markers for molecular breeding. *J. Crop Production* 1: 113-143.
- Witsenboer, H., Vogel, J., Michelmore, R.W. (1997): Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome* 40: 923-936.
- Worland, A.J., Korzun, V., Röder, M.S., Ganal, M.W., Law, C.N. (1998): Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theor. Appl Genet* 96: 1110-1120.
- Wricke, G. (2002): Two major genes for kernel weight in rye. *Plant breeding* 121: 26-28.
- Wu, K., R. Jones, L. Dannaeburger and P.A. Scolnik (1994): Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucl Acids Res* 22: 3257-3258.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

MOLECULAR MARKERS. II. MICROSATELLITES

Pržulj, N.¹, Perović, D.²

¹Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

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

SUMMARY

Molecular markers microsatellites, alternatively known as simple sequence repeats (SSRs), short tandem repeats (STR) or variable number tandem repeats (VNTR) are tandem repeats of short oligonucleotides sequence, which contains less than 5 bp. Due to their hypervariability, co-dominance effect and reproducibility, they are useful for genome mapping, population genetic studies, marker-assisted selection, fingerprinting, pedigree analysis, variety identification, forensic identification and relatedness testing. Different molecular markers have been developed on the basis of microsatellites. This paper discusses the polymorphism, frequency and distribution of microsatellites in genomic and chloroplast DNA, their detection by hybridization and on the basis of the PCR products and their application. The short overview of lab technique and comparison of microsatellites with the other molecular markers are presented. Some advantages and disadvantages of microsatellites are also briefly reviewed.

KEY WORDS: microsatellites, polymorphism, frequency, variability, application, PCR products, advantages, disadvantages

Acknowledgements

The principal author is grateful to the Research Council of Norway for the fellowship for the four-months training course (January-April 2004) in molecular markers at the Agricultural University of Norway, As. The fellowship is part of Fellowship Programme 2003/04 for Cooperation within Higher Education and Research between Norway and South Eastern Europe. Special thanks are due to NORAGRIC, Centre for International Environment and Development Studies, Department of Plant and Environmental Sciences, NLH, Professor Asmund Bjornstad for providing the principal author with the opportunity to realize the training course and Dr. Helge Skines for providing material for training and genotyping.