

IZABELA SZUĆKO, MAGDALENA ACHREM, ANNA KALINKA

*Katedra Biologii Komórki
Wydział Biologii Uniwersytet Szczeciński
Wąska 13 71-415 Szczecin
E-mail: izabela.szucko@univ.szczecin.pl*

CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIE SSR ORAZ ISSR W BADANIACH GENOMÓW ROŚLINNYCH

WPROWADZENIE

Rośliny są doskonałym obiektem do badań zmienności z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Biorąc pod uwagę fakt, że genomy jądrowe roślin wyróżniają się wśród genomów eukariotycznych dużą zmiennością wielkości i złożonością strukturalno-organizacyjną, metody oparte na analizie DNA dają możliwość poznania i wyjaśnienia ich skomplikowanej natury. Markery molekularne odgrywają znaczącą rolę we wszystkich aspektach hodowli roślin, obejmujących między innymi identyfikację genów odpowiedzialnych za pożądane cechy z punktu widzenia agronomicznego (SHULMAN i współaut. 2004). Odkrycie, że od 30 do 90% genomu wszystkich gatunków jest

zbudowana z regionów powtarzalnego DNA o wysoce polimorficznej naturze, stało się niezwykle przydatne w opracowaniu nowych markerów molekularnych służących między innymi do identyfikacji osobników czy też gatunków. Sekwencje te mają różną wielkość, są wielokrotnie powtórzone w genomie, mogą również nabywać nowe funkcje poprzez addycję czy delecję sekwencji lub na skutek zmian w sekwencji par zasad. W regionach tych zawarte są sekwencje mikrosatelitarne, które są bardzo atrakcyjnym celem do tworzenia systemów markerowych z uwagi na dużą zdolność gromadzenia mutacji (LI i współaut. 2004, SHARMA i współaut. 2008).

CZYM JEST MARKER MOLEKULARNY?

Pod pojęciem markera molekularnego rozumiemy fragment DNA lub polipeptyd, który wykazuje polimorfizm – dziedziczy się zgodnie z prawami Mendla i nie ulega wpływowi środowiska zewnętrznego (MA-SOJC 2004, SHARMA i współaut. 2008). Według GOSTIMSKY'EGO i współaut. (2005), molekularnymi markerami DNA są polimorficzne sekwencje nukleotydów rozproszone w całym genomie, których mutacje mogą być wykrywane z użyciem technik opartych na PCR (ang. polymerase chain reaction).

Markery molekularne są bardziej użyteczne do badań nad zmiennością genetyczną niż analiza morfologiczna czy genologiczna z tego względu, że nie oddziałują na nie środowisko i odzwierciedlają one podobieństwo genetyczne bez uprzedniej wiedzy o pochodzeniu. Molekularne markery DNA można podzielić na dwie klasy: oparte na hybrydyzacji i oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (KULEUNG i współaut. 2004).

FENOMEN MIKROSATELITÓW

Mikrosatelity są dynamicznymi komponentami genomu, których liczba zmienia się w czasie. Termin mikrosatelity wprowadzili LITT i LUTY w 1989 roku. Należą one do rodziny repetetywnego DNA i występują zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych (GUR-ARIE i współaut. 2000). Wiadomym jest, że nie ma obecnie dwóch żyjących osobników, które miałyby identyczną kombinację alleli mikrosatelitarnych. Do niedawna sądzono, że mikrosatelity w roślinnym genomie występują z dziesięciokrotnie mniejszą frekwencją niż w genomie ludzkim, chociaż ostatnie badania wskazują, że ilość tych sekwencji jest porównywalna u roślin i zwierząt (SHULMAN i współaut. 2004).

Mikrosatelity to sekwencje z motywami powtórzonymi tandemowo. Motywy te zawierają od 1-6 pz powtórzonych kilka razy (SHULMAN 2007). U roślin mikrosatelity zawierają wielokrotnie powielone sekwencje typu $(AT)_n$ oraz $(TAT)_n$, znacznie rzadziej występują sekwencje $(GA)_n$ i sporadycznie $(CA)_n$ – te ostatnie powszechne są w genomach zwierzęcych (MASOJĆ 2004, SZTUBA-SOLIŃSKA 2005, WANG i współaut. 2005, SHULMAN 2007, SHARMA i współaut. 2008). Oprócz mikrosatelitów „doskonałych” $(GC)_n$, poprzez substytucje, delecje czy insercje, powstają mikrosatelity „niedoskonałe” $(GC)_n(N)(GC)_n$, które są stabilniejsze od „doskonałych” i odgrywają znaczną rolę w regulacji aktywności genów (SURESH I NAGARAJARAM 2007). Przyпуска się, że mikrosatelitarne sekwencje mają także wpływ na organizację chromatyny, rekombinacje, replikacje DNA, cykl komórkowy oraz system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (ang. mismatch repair, MMR) (LI i współaut. 2004).

Mikrosatelity są równomiernie rozproszone w chromosomach lub wykazują preferencje do obszarów przycentromerowych. Występują zarówno poza genami, jak i w ich obrębie (u roślin sekwencje dwunukleotydo- we występują powszechniej w intronach, zaś trójnukleotydo- we głównie w egzonach) oba rodzaje sekwencji liczniejsze są w obszarach flankujących 5' niż 3' (ROGALSKA i współaut. 2005). Wykazano, że u roślin wyższych se-

kwencje mikrosatelitarne występują rzadziej w regionach kodujących niż w niekodujących (WANG i współaut. 2005). W regionach kodujących większa ilość tych motywów zlokalizowana jest w transkrybowanych regionach genomu obejmujących geny kodujące białka (ang. expressed sequence tags). Zwiększenie/zmniejszenie liczby kopii mikrosatelitów w regionach kodujących prowadzi często do przesunięcia ramki odczytu, czego konsekwencją są zmiany w produkcie końcowym - białku, a w regionach niekodujących powoduje to zmiany w regulacji aktywności genów (SURESH i NAGARAJARAM 2007). KASHI i KING (2006) podają, że mikrosatelity są źródłem zmienności genetycznej stanowiącej podstawę ewolucji adaptacyjnej. Wśród wielu cech korzystnych, opisujących charakter mikrosatelitów, najistotniejsze jest to, że obficie występują w genomie, wykazując silny polimorfizm długości determinowany różną liczbą powtórzeń sekwencji podstawowej. Szacuje się, że polimorfizm charakteryzujący mikrosatelity sięga 90%. Może być on następstwem pomyłek polimerazy DNA, tzw. „ślizgania” się polimerazy (ang. polymerase slippage), które prowadzi do wydłużania dinukleotydo- wych sekwencji powtórzonych. Częściej poślizg ten prowadzi do wstawienia, rzadziej do delecji, przynajmniej jednej z powtórzonych jednostek. Zatem, co pewien czas poślizg polimerazy prowadzi do powstania nowego wariantu sekwencji mikrosatelitarnej o innej długości wzbogacając zestaw alleli znajdujących się w populacji. W genomie ludzkim na polimorfizm tych motywów mogą również wpływać mutacje dynamiczne, będące następstwem poślizgu polimerazy, których istotą jest zwielokrotnienie charakterystycznych, krótkich sekwencji mikrosatelitarnych w obrębie określonego genu.

Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych oraz to, że flankujące je sekwencje są specyficzne dla określonych miejsc w DNA sprawia, że są one wykorzystywane jako cecha diagnostyczna w mapowaniu genomu i analizie sprzężeń, w genetyce populacyjnej, w badaniach filogenetycznych i ewolucyjnych (SŁOMSKI i współaut. 2004a, b; BROWN 2009).

SYSTEM MARKEROWY SSR I JEGO ZASTOSOWANIE

Amplifikowane sekwencje mikrosatelitarne tworzą system markerów określany jako

SSR (ang. simple sequence repeats; proste sekwencje powtarzalne) albo STR (ang. short

tandem repeats; krótkie tandemowe powtórzenia). Każdy odcinek mikrosatelitarny sąsiaduje z unikatowymi sekwencjami, które można wykorzystać do projektowania specyficznych starterów. Markery SSR mają wiele zastosowań w genetyce i hodowli roślin ze względu na ich multialleliczną naturę, kodominacyjny sposób dziedziczenia, powszechność w genomie oraz łatwość analizy (KULEUNG i współaut. 2004, VARSHNEY i współaut. 2005, DECLERCK i współaut. 2009). Mikrosatelity są obecnie szeroko stosowane do uzupełnienia genetycznych map sprzężeń kilku gatunków zbóż takich jak: kukurydza (CORDEIRO 2000), jęczmień (THIEL i współaut. 2003), ryż (TEMNYKH i współaut. 1999, DECLERCK i współaut. 2009), pszenica (RÖDER i współaut. 1998) oraz pszenżyto (TAMS i współaut. 2004). Oprócz tworzenia map genetycznych można ich używać także do identyfikacji osobniczego DNA i oznaczania rodzicielstwa, jak również w genetyce populacyjnej takich gatunków roślinnych jak brzoskwinia (*Prunus persica* L.) czy słodka wiśnia (*P. avium* L.) (DIRLEWANGER i współaut. 2002, NICOT i współaut. 2004). Oszacowano częstość występowania motywów mikrosatelitarnych w takich roślinach jak *Arabidopsis thaliana*, ryż, soja, kukurydza i pszenica, u których rozmiar genomu haploidalnego mieści się w zakresie 125Mpz do 5,660Mpz. U tych gatunków całkowita częstość sekwencji mikrosatelitarnych była odwrotnie proporcjonalna do rozmiaru genomu i ilości powtarzalnego DNA, ale pozostała niezmienna w częściach

genomu, które podlegają transkrypcji. Częstość sekwencji mikrosatelitarnych była wyższa w obszarach transkrybowanych, zwłaszcza w regionach nie podlegających translacji (UTR). Motywy (CT)₁₀, (GAA)₅, (AAT)₆ wykorzystano do określenia różnorodności genetycznej w badaniach taksonomicznych, do analizy pochodzenia, a także do identyfikacji genotypów takich gatunków roślin jak ryż, pszenica, soja czy winorośl (MORGANTE i współaut. 2002, SURESH i NAGARAJARAM 2007). Dzięki wykorzystaniu markerów SSR zaprojektowanych dla pszenicy, przeanalizowano sekwencje zlokalizowane w chromosomach żyta (FU i współaut. 2010). Udowodniono także, że sekwencje SSR są obecne w obrębie EST (ang. expressed sequence tags; sekwencyjne znaczniki ekspresji) i wiele z nich zostało wykorzystanych do stworzenia markerów „EST-SSR”. Tego typu markery umożliwiają szybką identyfikację szukanych genów, a markery zaprojektowane dla sekwencji EST jednego gatunku mogą zostać wykorzystane do analiz gatunków z nim spokrewnionych. Znalazły one zastosowanie w konstruowaniu porównawczej mapy pszenicy i ryżu (KANTEY i współaut. 2002, YU i współaut. 2004). Markery SSR obrazowały także podobieństwo genetyczne pomiędzy różnymi odmianami pszenżyta, bez względu na ich pochodzenie genealogiczne, geograficzne czy wymagania wzrostowe. Wykazano, że markery SSR zaprojektowane dla pszenicy i żyta mogą stać się użyteczne do badań genetycznych nad pszenżytem (KULEUNG i współaut. 2004).

SYSTEM MARKEROWY ISSR I JEGO ZASTOSOWANIE

Polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnych (ang. inter simple sequence repeats, ISSR) został wykorzystany po raz pierwszy jako system markerowy przez ZIĘTKIEWICZ i współaut. w 1994 roku. Analiza ISSR obejmuje amplifikację fragmentów DNA usytuowanych pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi, powtórzonymi regionami zorientowanymi w przeciwnych kierunkach. Oligonukleotydowe startery wykorzystywane do ISSR-PCR składają się z powtarzalnych, tzw. „zakotwiczonych” jednostek na końcu 5' lub 3', dzięki ich użyciu możliwa jest amplifikacja fragmentów DNA o zmiennej długości z obszarów pomiędzy motywami mikrosatelitarnymi. Polimorfizm ISSR wynika z mutacji, insercji lub delecji w obrębie sekwencji mikrosatelitarnej. Zmiany te powodują wystąpienie lub

nie, produktu, który stanie się widoczny na żelu postaci prążka (REDDY i współaut. 2000, CARVALHO i współaut. 2005, VAILLANCOURT i współaut. 2008). Technika ta nie wymaga wstępnych informacji o analizowanej sekwencji DNA. ISSR zaliczają się do markerów dominujących, w niektórych przypadkach mogą cechować się segregacją kodominacyjną. Analiza ISSR, tak jak metoda RAPD, wykazuje wysoką rozdzielczość generowanych wzorów prążkowych, lecz zapewnia lepszą powtarzalność (startery są dłuższe i komplementarne do regionów mikrosatelitarnych) (REDDY i współaut. 2000, GOSTIMSKY i współaut. 2005, VAILLANCOURT i współaut. 2008).

Markery te wykorzystuje się do określenia różnorodności genetycznej, badań filogenetycznych (CARVALHO i współaut. 2005, VA-

ILLANCOURT i współaut. 2008), identyfikacji genów (ang. gene tagging) i poszerzenia wiedzy o ewolucji wielu istotnych, z punktu widzenia rolniczego, gatunków roślin zbożowych (REDDY i współaut. 2000), tj. pszenica (NAGAOKA i OGIHARA 1997), żyto (MATOS i współaut. 2001), pszenżyto (SÖZEN 2011), kukurydza (PEJIC i współaut. 1998), ryż (QIAN i współaut. 2001, GIRMA i współaut. 2010) czy jęczmień (FERNÁNDEZ i współaut. 2002, GOSTIMSKY i współaut. 2005, KANABAR i KONDO 2011). System ten również wykorzystano do wyznaczenia markerów sprzężonych z genami odporności na choroby i wielkością ziarniaków heksaploidalnej pszenicy (AMMIRAJU i współaut. 2001), a także do analizy somatycznych hybryd *Citrus* (SCARANO i współaut. 2002). Zastosowano go również do genetycznej charakterystyki międzynarodowej

kolekcji roślin kakaowca (CHARERS i WILKINSON. 2000). ISSR wykazują wystarczający polimorfizm do odróżnienia rozmaitych odmian chryzantem (WOLFF i współaut. 1995). NKONGOLO i współaut. (2005) oraz MEHES i współaut. (2005) odnaleźli u drzew iglastych gatunkowo-specyficzne markery ISSR. Zostały one wykorzystane do identyfikacji mieszańców międzygatunkowych *Picea* i rodzaju *Pinus*. Metoda ta w prosty sposób pozwala dostrzec różnice między osobnikami. Została użyta do identyfikacji powszechnie uprawianych gatunków roślin takich jak: trójlistkowa pomarańcza (FANG i ROESE 1997) i ziemniak (PREVOST i WILKINSON 1999).

Powtarzalność na dobrym poziomie, prostota wykonania i wymóg małej ilości DNA czyni technikę ISSR-PCR odpowiednią do analizy odmiennych gatunków roślin.

PODSUMOWANIE

Pomimo że oba opisane systemy markerowe oparte są o polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych, wykazują pewne różnice. Ważnymi kryteriami wyboru techniki są jej koszty, pracochłonność i czasochłonność.

Metoda SSR, pomimo licznych zalet posiada i wady. Do zalet zaliczyć należy wysoką częstotliwość wykrywanego polimorfizmu, wynikająca ze zmiennej liczby powtórzeń motywu nukleotydowego, możliwość oceny homo- lub heterozygotyczności analizowanego osobnika na podstawie profilu genetycznego, analiza pojedynczego locus, a także możliwości automatyzacji metody poprzez technikę elektroforezy kapilarnej w żelu poliakrylamidowym z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych. Wadą jest możliwość występowania homoplazji (ang. homoplasys, allele o tej samej liczbie par zasad różnią się sekwencją) i niewykrywalność niemych alleli (ang. null alleles), a także wysokie koszty analizy obejmujące wieloetapowe przygotowanie specyficznych starterów i późniejszą reakcję PCR (NICOT i współaut. 2004, SZTUBA-SOLIŃSKA 2005, NOWAKOWSKA 2006, BROWN 2009). W przeciwieństwie do markerów SSR,

system markerowy ISSR-PCR jest stosunkowo niedrogą techniką obejmującą jednoczesną analizę wielu loci. Technika ta również nie jest czasochłonna. Punktem krytycznym w analizach ISSR-PCR jest wybór odpowiednich starterów.

Już w latach 90. ubiegłego wieku zwrócono uwagę, że sekwencje mikrosatelitarne mogą zostać wykorzystane do opracowania markerów. Ich ogromne znaczenie wynika z ich wysokiego polimorfizmu. Dzięki temu znalazły zastosowanie w badaniach filogenetycznych i populacyjnych (DÁVILA i współaut. 1999). Udowodniono, że markery oparte o proste sekwencje powtórzone, pozwalają na zrozumienie organizacji genomu roślin. Dzięki ich wykorzystaniu można prześledzić dziedziczenie chromosomów (SŁOMSKI i współaut. 2004A). Dzięki wszechobecności i łatwym metodom wykrywania, sekwencje mikrosatelitarne stały się powszechnie używanym narzędziem służącym do identyfikacji osobników, gatunków i odmian. Znalazły one pełne zastosowanie w tak ważnej dziedzinie, jaką jest hodowla roślin (CUADRAODO i SCHWARZACHER 1998).

CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIE SSR ORAZ ISSR W BADANIACH GENOMÓW ROŚLINNYCH

Streszczenie

W badaniach roślin markery DNA stanowią odpowiednie narzędzie pozwalające na szczegółową

genetyczną analizę, mapowanie genów oraz określenie genetycznego zróżnicowania. Sekwencje mikro-

satelitarne i obszary znajdujące się między nimi okazały się ważnym źródłem markerów DNA i były z powodzeniem stosowane przy badaniach genetycznego zróżnicowania, mapowaniu genomów, selekcji cech pożądaných w rolnictwie oraz przy rozróżnianiu genotypów. Markery SSR (ang. *simple sequence repeat*) i ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*) wykazują

wiele zalet w porównaniu do innych markerów stosowanych w badaniach genetycznych. Charakteryzują się one wysokim polimorfizmem i dużą częstością występowania. Niniejszy przegląd przedstawia cechy i zastosowanie markerów SSR i ISSR w badaniach genomów roślinnych.

CHARACTERISTIC AND APPLICATIONS OF SSR AND ISSR IN STUDY OF PLANT GENOMES

Summary

In plant investigations, DNA based markers are suitable tools for detailed genetic analysis, gene mapping and estimation of genetic diversity. Microsatellites and regions between them are important source of DNA markers and have been successfully applied for detection of genetic diversity, genome mapping, marker assisted selection of agronomically

important traits and genotype differentiation. Simple sequence repeat (SSR) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers have many advantages for genetic studies over other markers. They are highly polymorphic and abundant. This review aimed to characterize and present possible applications of SSR and ISSR in plant genome research.

LITERATURA

- AMMIRAJU J. S. S., DHOLAKIA B. B., SANTRA D. K., SINGH H., LAGU M. D., TAMHANKAR S. A., DHALIWAL H. S., RAO V. S., GUPTA V. S., RANJEKAR P. K., 2001. *Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat*. Theor. Appl. Genet. 102, 726-732.
- BROWN T. A., 2009. *Genomy*. PWN, Warszawa.
- CARVALHO A., LIMA-BRITO J., GUEDES-PINTO H., MATOS M., BENITO C., 2005. *DNA fingerprinting of F1 interspecific hybrids from the Triticeae tribe using ISSRs*. Euphytica 143, 93-99.
- CHARERS Y. M., WILKINSON M. J., 2000. *The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm*. Theor. Appl. Genet. 100, 160-166.
- CORDERIO G. M., 2000. *Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (Saccharum spp.) ESTs cross transferable to Erianthus and Sorghum*. Plant Sci. 160, 115-1123.
- CUADRAODO A., SCHWARZACHER T., 1998. *The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes*. Chromosoma 107, 587-594.
- DÁVILA J. A., LOARCE Y., FERRER E., 1999. *Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley*. Theor. Appl. Genet. 98, 265-273.
- DECLERCK G., CARTINHO S., MCCOUCH S., TEMNYKH S., LUKASHOVA A., 2009. *Computational and experimental analysis microsatellites in rice (Oryza sativa L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential*. Cold Spring Harb Laboratory Press 11, 1441-1452.
- DIRLEWANGER E., CROSSON A., TAVAUD P., ARANZANA M. J., POIZAT C., ZANETTO A., ARÚS P., LAIGRET L., 2002. *Development of microsatellite markers in peach and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry*. Theor. Appl. Genet. 105, 127-138.
- FANG D. Q., ROESE M. L., 1997. *Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers*. Theor. Appl. Genet. 95, 408-417.
- FERNÁNDEZ M. E., FIQUEIRAS A. M., BENITO C., 2002. *The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin*. Theor. Appl. Genet. 104, 845-851.
- FU S., TANG Z., REN Z., ZHANG H., YAN B., 2010. *Isolation of rye-specific DNA fragment and genetic diversity analysis of rye genus Secale L. using wheat SSR markers*. J. Genet. 89, 889-892.
- GIRMA G., TESFAYE K., BEKELE E., 2010. *Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of wild and cultivated rice species from Ethiopia*. Afr. J. Biotech. 9, 5048-5059.
- GOSTIMSKY S. A., KOKAEVA G., KONOVALOV F. A., 2005. *Styding plant genome variation using molecular markers*. Russ. J. Genet. 41, 378-388.
- GUR-ARIE R., COHEN C. J., EITAN Y., SHELEF L., HALLERMAN E. M., KASHI Y., 2000. *Simple sequence repeats in Escherichia coli: abundance, distribution, composition, and polymorphism*. Genome Res. 10, 62-71.
- KANABAR A., KONDO K., 2011. *Efficiency of ISSR and RAPD dominant markers in assessing genetic diversity among Japanese and Syrian cultivars of barley (H. vulgare L.)*. Res. J. Agric. Biol. Sci. 7, 4-10.
- KANTETY R. V., ROTA M. L., MATTHEWS D. E., SORRELS M. E., 2002. *Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat*. Plant Mol. Biol. 48, 501-510.
- KASHI Y., KING D., 2006. *Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution*. Trends Genet. 22, 253-259.
- KULEUNG C., BAENZIGER P. S., DWEIKAT I., 2004. *Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale*. Theor. Appl. Genet. 108, 1147-1150.
- Li Y., Karol A.B., Fahima T., Nevo E., 2004. *Microsatellites within genes: structure, function, and evolution*. Mol. Biol. Evol. 21, 991-1007.
- LITT M., LUTY J. M., 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.
- MASOJC P., 2004. *Ustalenie tożsamości genetycznej*. [W:] *Biotechnologia roślin*. MALEPSZY S. (red.). PWN, Warszawa.
- MATOS M., PINTO-CARNIDE O., BENITO C., 2001. *Phylogenetic relationships among Portuguese rye*

- based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134, 229–236.
- MEHES M., NKONGOLO K. K., MICHAEL P., 2005. *Genetic analysis of Pinus strobus and P. monticola populations using ISSR and RAPD markers: Development of genome-specific SCAR markers*. *Plant Syst. Evol.* 267, 47–63.
- MORGANTE M., HANAFEY M., POWELL W., 2002. *Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes*. *Nat. Genet.* 30, 194–200.
- NAGAOKA T., OGIHARA Y., 1997. *Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers*. *Theor. Appl. Genet.* 94, 597–602.
- NICOT N., CHIQUET V., GANDON B., AMILHAT L., LEGAI F., LEROY P., BERNARD M., SOURDILLE P., 2004. *Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs)*. *Theor. Appl. Genet.* 109, 800–805.
- NKONGLO K. K., MICHAEL P., DEMERS T., 2005. *Application of ISSR, RAPD and cytological markers to the certification of Picea mariana, P. glauca and P. engelmannii trees, and their putative hybrids*. *Genome* 48, 302–311.
- NOWAKOWSKA J., 2006. *Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i towaroznawstwie*. *Leśne Prace Badawcze*. 1, 73–101.
- PEJIC L., AJMONE-MARSAN P., MORGANTE M., KOZUMPLICK V., CASTIGLIONI P., TARMINO G., MOTTO M., 1998. *Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs*. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1248–1255.
- PREVOST A., WILKINSON M. J., 1999. *A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars*. *Theor. Appl. Genet.* 98, 107–112.
- QIAN W., GE S., HONG D. Y., 2001. *Genetic variation within and among populations of a wild rice Oryza granulata from China detected by RAPD and ISSR markers*. *Theor. Appl. Genet.* 102, 440–449.
- REDDY R. P., SARLA N., SIDDIQ E. A., 2000. *Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding*. *Euphytica* 128, 9–17.
- ROGALSKA S., MAŁUSZYŃSKA J., OLSZEWSKA M., 2005. *Podstawy cytogenetyki roślin*. PWN, Warszawa.
- RÖDER M., KORSU V., WENDEHAKKE K., PLASCHKE J., TIXIER M., LEROY P., GANAL M., 1998. *A microsatellite map of the wheat genome*. *Genetics* 149, 2007–2023.
- SCARANO M. T., ABBATE L., FERRANTE S., LACRETTI S., TASA N., 2002. *ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin*. *Plant Cell Rep.* 20, 1162–1166.
- SHARMA A., NAMDEO A. G., MAHAGIK K. R., 2008. *Molecular markers in plant genome analysis*. *Pharmacognosy Rev.* 2, 23–34.
- SHULMAN A., 2007. *Molecular markers to assess genetic diversity*. *Euphytica* 158, 313–321.
- SHULMAN A., GUPTA P., VARSHNEY R., 2004. *Organization of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes*. *Cereal Genomics*. Kluwer Academic Publishers, 83–118.
- SŁOMSKI R., KOWALSKA K., KARCZMAREK M., WIELGUS K., JURA J., 2004a. *Analiza powtórzeń trinukleotydowych w DNA*. [W:] *Przykłady analiz DNA*. SŁOMSKI R. (red.). Wyd. AR im. A. Cieszkowskiego, Poznań.
- SŁOMSKI R., PŁAWSKI A., JUZWA W., SZALAŁA M., 2004b. *Analiza powtórzeń dinukleotydów (CA)*. [W:] *Przykłady analiz DNA*. SŁOMSKI R. (red.). Wyd. AR im. A. Cieszkowskiego, Poznań.
- SÖZEN E., 2011. *Evolution of ISSR markers to access genetic variability and relationship among winter triticale (X Triticosecale Wittmack) cultivars*. *Pak. J. Bot.* 42, 2755–2763.
- SURESH B., NAGARAJARAM M. A., 2007. *IMEx: Imperfect microsatellite extractor*. *Bioinformatics* 23, 1181–1187.
- SZTUBA-SOLIŃSKA J., 2005. *Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin*. *Kosmos* 54, 227–239.
- TAMS S. H., BAJER E., OETTLER G., MELCHINGER A. E., 2004. *Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient*. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1385–1391.
- TEMNYKH S., PARK W., AWERS N., CARTINHOOR S., HAUCK N., LIPOVICH L., CHO Y., ISHII T., MCCOUCH S., 1999. *Mapping and genome organization of microsatellites in rice Oryza sativa*. *Theor. Appl. Genet.* 100, 698–712.
- THIEL T., MICHAŁEK W., VARSHNEY R. K., GRANER A., 2003. *Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (Hordeum vulgare L.)*. *Theor. Appl. Genet.* 106, 411–422.
- VAILLANCOURT A., NKONGOLO K., MICHAEL P., MEHES M., 2008. *Identification, characterisation, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes*. *Euphytica* 159, 297–306.
- VARSHNEY R. K., GRANER A., SORRELS M. E., 2005. *Genic microsatellite markers in plants: features and applications*. *Trend Biotech.* 1, 48–55.
- WANG M. L., BARKLEY N. A., NEWMAN M. L., PEDERSON G. A., 2005. *Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation*. *Plant Genet. Res.* 3, 45–57.
- WOLFF K., ZIETKIEWICZ E., HOFSTRA H., 1995. *Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprinting patterns*. *Theor. Appl. Genet.* 91, 439–447.
- YU J. K., LA ROTA M., KANTETY R. V., SORRELS M. E., 2004. *EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice*. *Mol. Genet. Genom.* 271, 742–751.
- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D., 1994. *Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification*. *Genomics* 20, 176–183.