



Wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy podobieństwa genetycznego wykonanej techniką RAPD

Agnieszka Dobrzycka, Zbigniew Broda

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

The influence of DNA isolation's method on result of genetic similarity analysis made with RAPD technique

Summary

The study purpose was to examine the influence of DNA isolation's method on result of genetic similarity analysis made with RAPD technique. Two methods of DNA isolation were used – the Tomson-Henry method, which provides low purified DNA, and the column method, which provides high purified DNA. By using DNA isolated with these two methods the RAPD analysis of genetic distance was executed. It was noticed, that using high purified DNA resulted in higher number of amplification's products, and consequently in larger accuracy of analysis.

Key words:

DNA purity, DNA isolation, alfalfa, RAPD markers.

1. Wstęp

Markery molekularne RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) wykorzystywane są do różnego typu analiz, m.in. do badania dystansu lub podobieństwa genetycznego pomiędzy odmianami, gatunkami lub pojedynczymi osobnikami. W metodzie tej wykorzystuje się dziesięcionukleotydowe startery do amplifikacji losowo rozproszonych po genomie odcinków DNA. Celem badań było sprawdzenie wpływu metody izolacji DNA na wynik analizy RAPD – PCR. Przeprowadzono dwie analizy podobieństwa genetycznego z zastosowaniem techniki RAPD, wykorzy-

Adres do korespondencji

Zbigniew Broda,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 71C,
60-625 Poznań.

stując różne metody izolacji DNA: metodę Thomsona-Henry'ego oraz metodę kolumienkową. Metoda kolumienkowa jest metodą dłuższą i bardziej skomplikowaną, ale umożliwia otrzymanie DNA o wysokiej czystości. Jest ono pozbawione RNA poprzez traktowanie RNazą oraz filtrowane na kolumienkach w celu oddzielenia zanieczyszczeń. Metoda Thomsona-Henry'ego jest metodą prostą i szybką – polega ona na dodaniu buforu TPS do materiału roślinnego (1). W przypadku tej metody DNA nie jest w żaden sposób oczyszczane i zawiera związki występujące w komórkach roślinnych.

W przypadku obu analiz podobieństwa użyto tych samych starterów. Następnie porównano ich wyniki, zwracając szczególną uwagę na otrzymaną w obu przypadkach liczbę produktów amplifikacji.

2. Materiał i metody

Materiałem roślinnym było 16 populacji lucerny siewnej (*Medicago sativa* L. sl.), pochodzących z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Były to: 2 ekotypy (27, 212); 4 odmiany (Radius, Du Puits, Sitel, Vernal); 2 populacje syntetyczne (Syn 9-3, Syn 7-3); 2 linie wsobne S5 (B₁₀, F); 2 mieszańce pojedyncze (B₁₀ x F, F x B₁₀); 3 mutanty ('lp' – długogroniasty, 'br' – wiechowaty, 'tf' – samokończący); odmiana Ulstar (długogroniasta, wyhodowana z mutanta 'lp'). Materiał roślinny do izolacji DNA pobierano w przypadku każdej z populacji z 10 roślin rosnących w warunkach szklarniowych. DNA izolowano dla każdej z roślin osobno, a następnie sporządzano próbę zbiorczą reprezentującą daną populację.

Izolację DNA przeprowadzano dwiema metodami. Pierwszą była metoda Thomsona-Henry'ego (1). Dyski liściowe o powierzchni 50 mm² traktowano 200 µl buforu TPS o składzie: 100 mM Tris-HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA. Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut. Po inkubacji zbierano ekstrakt DNA z nad osadu resztek tkanki roślinnej i umieszczano w nowych probówkach. Końcowa objętość buforu w którym rozpuszczone było DNA wynosiła 200 µl.

Drugą wykorzystaną metodą izolacji była metoda kolumienkowa z wykorzystaniem kitu Qiagen DNeasy Plant Kit. Fragmenty liści o powierzchni 50 mm² umieszczano w probówkach z ciekłym azotem i rozcierano tkankę roślinną na proszek. Do każdej próbki dodawano 400 µl buforu AP1 oraz 3 µl RNazy. Następnie inkubowano próby przez 30 minut w temperaturze pokojowej i 30 minut w 65°C. Po inkubacji dodawano po 130 µl buforu AP2 i mieszano na vortexie. Następnie umieszczano próby na lodzie i po 15 minutach wirowano przez 20 minut w 14 000 obrotów. Po zwirowaniu zbierano supernatan, który наносzono na kolumienki, do których dodawano 60 µl buforu AP3. Próby wirowano przez 2 minuty w 8000 obrotów, a następnie dodawano 450 µl buforu AW i 50 µl buforu AE. Wyizolowane DNA przecho-

wywano w temperaturze -20°C . Końcowa objętość buforu w którym rozpuszczone było DNA wynosiła 500 μl .

W przypadku obu metod izolacji mierzono stężenie otrzymanego ekstraktu DNA posługując się fluorymetrem Gene Quant II firmy Pharmacia Biotech. Następnie sporządzano rozcieńczenia ekstraktów DNA w celu wyrównania stężeń wszystkich prób. Po przeprowadzeniu izolacji DNA metodą Thomsona-Henry'ego (metoda I) zmierzone stężenie wahało się od 2147 $\mu\text{g/ml}$ do 2513 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku DNA izolowanego metodą kolumnkową (metoda II) stężenie wynosiło od 2492 $\mu\text{g/ml}$ do 3465 $\mu\text{g/ml}$. W obu przypadkach rozcieńczono otrzymane ekstrakty DNA, doprowadzając je do stężenia 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) z wykorzystaniem DNA izolowanego obiema metodami przeprowadzono w objętości 12,5 μl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1 M Tris-HCl, MgCl_2 (25 mM), BSA (20 mg/ml), dNTP (2 mM), starter, Taq polimeraza (5U/ μl), ekstrakt DNA. Amplifikację DNA przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 firmy BIOMETRA. Na przebieg reakcji PCR składało się 45 cykli; denaturacja DNA zachodziła w 94°C , przyłączanie starterów w 37°C , natomiast synteza nowych nici w 72°C . Następnie próby schładzane były do temperatury 4°C . Analizę dystansu genetycznego techniką RAPD przeprowadzono w następujący sposób: elektroforezę produktów amplifikacji prowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Zdjęcia produktów amplifikacji wykonywane były na transiluminatorze w świetle UV. Analizę z każdym ze starterów powtarzano dwa razy, wybierając do dalszego opracowania jedynie prążki powtarzające się. Analiza umożliwiająca określenie podobieństwa genetycznego (GS) pomiędzy badanymi obiektami w formie dendrogramu została sporządzona przy użyciu programu komputerowego UVIMAP wykorzystującego funkcję podaną przez Nei i Li (2).

Dla obu analiz podobieństwa (wykonanych na DNA wyizolowanych różnymi metodami) policzono liczbę produktów amplifikacji wygenerowanych przez użyte w doświadczeniu startery.

3. Wyniki

Spośród 35 przetestowanych starterów oligonukleotydowych wybrano 10, które dawały najwięcej produktów amplifikacji. Na wybranych 10 starterach wykonano dwie serie analiz podobieństwa, z wykorzystaniem DNA izolowanego dwiema metodami. Startery oraz ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1

Startery i ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm

| Numer startera | Sekwencja nukleotydowa 5'-3' |
|----------------|------------------------------|
| OPA 01 | CAGGCCCTTC |
| OPA 03 | AGTCAGCCAC |
| OPA 04 | AATCGGGCTG |
| OPA 07 | GAAACGGGTG |
| OPB 07 | GGTGACGCAG |
| OPC 08 | TGGACCGGTG |
| OPC 18 | TGAGTGGGTG |
| OPE 14 | TGCGGCTGAG |
| OPI 02 | GGAGGAGAGG |
| OPJ 20 | AAGCGGCCTC |

W zależności od metody izolacji DNA użytego do reakcji PCR otrzymano różną liczbę produktów amplifikacji. Stosując DNA izolowane metodą Thomsona-Henry'ego najmniejszą liczbę produktów amplifikacji uzyskano przy zastosowaniu startera OPB 07 (średnio 3,5 w przeliczeniu na populację) (tab. 2). Największą liczbę produktów amplifikacji wygenerowano stosując starter OPA 01 (6,3 w przeliczeniu na populację). W przypadku gdy mieszaninę przygotowano używając DNA izolowane metodą kolumnkową, liczba produktów dla jednej populacji wynosiła średnio od 6,7 przy użyciu startera OPE 14 do 10,6 w przypadku startera OPB 07. Zauważono, że przy wykorzystaniu DNA izolowanego metodą kolumnkową średnia liczba wygenerowanych prążków była prawie dwukrotnie wyższa niż w przypadku gdy wykorzystano DNA izolowane metodą Thomsona-Henry'ego (tab. 2).

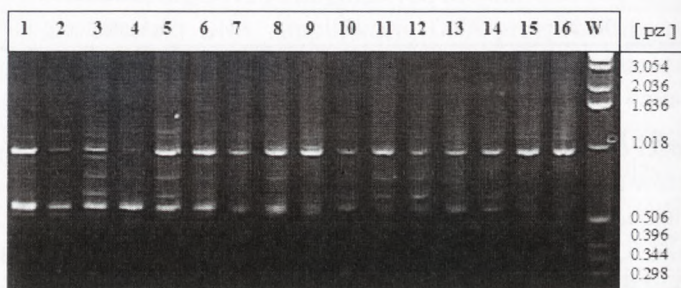
Tabela 2

Średnia liczba produktów amplifikacji wygenerowanych dla jednej populacji przez każdy z użytych starterów

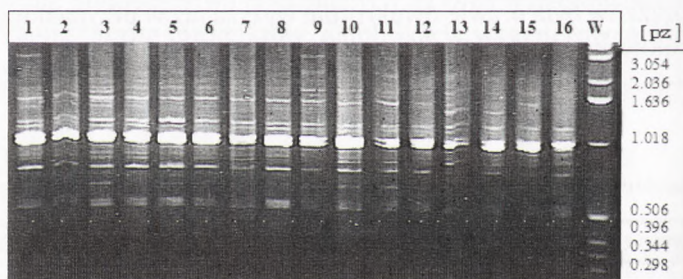
| Starter | Metoda I | Metoda II |
|---------|----------|-----------|
| 1 | 2 | 3 |
| OPA 01 | 6,3 | 9,1 |
| OPA 03 | 5,3 | 9,7 |
| OPA 04 | 4,4 | 8,8 |
| OPA 07 | 4,1 | 6,8 |
| OPB 07 | 3,5 | 10,6 |
| OPC 08 | 4,1 | 7,2 |
| OPC 18 | 5,2 | 8,9 |

| 1 | 2 | 3 |
|---------|-----|-----|
| OPE 14 | 4,2 | 6,7 |
| OPI 02 | 5,1 | 8,5 |
| OPJ 20 | 4,0 | 7,7 |
| Średnia | 4,6 | 8,4 |

Porównanie dwóch analiz podobieństwa genetycznego z wykorzystaniem tego samego startera (OPB 07) przedstawiono na fotografiach 1 i 2.



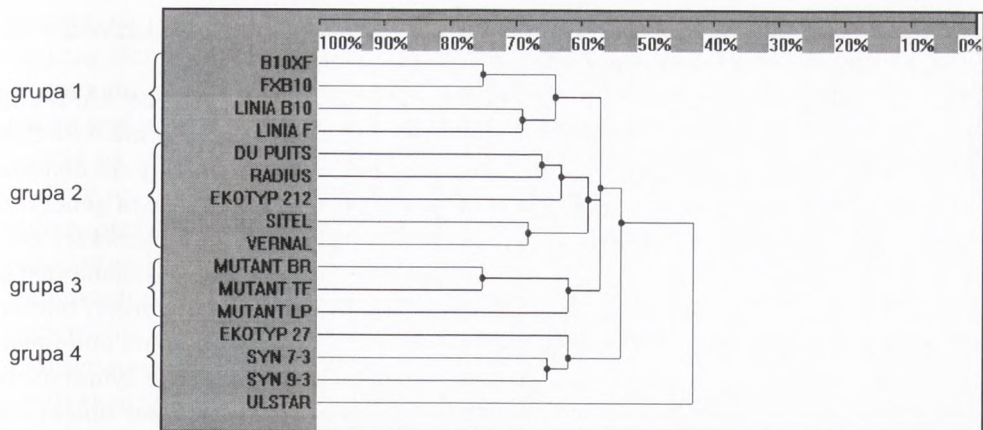
Fot. 1. Elektroforogram produktów amplifikacji DNA wykonany techniką RAPD-PCR z zastosowaniem startera OPB 07 o sekwencji: 5' GGTGACGCAG 3'. DNA izolowano metodą Thomsons-Henry'ego.



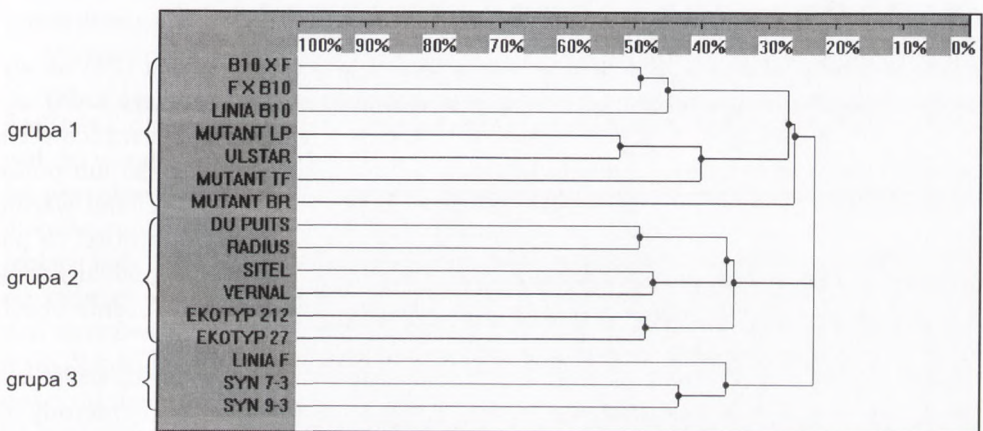
Fot. 2. Elektroforogram produktów amplifikacji DNA wykonany techniką RAPD-PCR z zastosowaniem startera OPB 07 o sekwencji: 5' GGTGACGCAG 3'. DNA izolowano metodą kolumnienkową.

Kolejność ścieżek odpowiada następującym genotypom:

1. Ekotyp 27, 2. Ekotyp 212, 3. Du Puits, 4. Radius, 5. Sitel, 6. Vernal, 7. Syn 7-3, 8. Syn 9-3, 9. Linia B₁₀, 10. Linia F, 11. Mieszaniec F x B₁₀, 12. Mieszaniec B₁₀ x F, 13. Mutant 'br', 14. Mutant 'tf', 15. Mutant 'lp', 16. Odmiana Ulstar, W – wzorzec – 1KB DNA Ladder.



Rys. 1. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi obiektami – analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry’ego.



Rys. 2. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi obiektami – analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą kolumnkową.

Wynik analizy podobieństwa genetycznego metodą RAPD-PCR także różnił się w zależności od metody izolacji DNA. Przy wykorzystaniu DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry’ego badane populacje utworzyły cztery grupy zróżnicowania genetycznego, a podobieństwo między nimi wahało się od 45 do 78% (rys. 1). W grupie pierwszej znalazły się linia B₁₀, linia F oraz dwa mieszańce: F x B₁₀ i B₁₀ x F. Podobieństwo genetyczne pomiędzy tymi obiektami wahało się od 56 do 78%. Grupę drugą utworzyły odmiany Du Puits, Radius, Sitel, Vernal oraz ekotyp 212, pomiędzy którymi podobieństwo wahało się od 58 do 72%. Grupę trzecią utworzyły mutanty *br*, *tf* oraz *lp*, wykazujące podobieństwo w granicach 62-78%. W grupie czwartej znalazły się dwie populacje syntetyczne – Syn 9-3 i Syn 7-3 oraz ekotyp 27. Najmniej-

sze podobieństwo genetyczne do wszystkich badanych obiektów wykazywała odmiana Ulstar wyhodowana z mutanta 'lp' – wynosiło ono 45%.

W przypadku gdy do badania podobieństwa genetycznego metodą RAPD-PCR użyto DNA izolowanego metodą kolumnkową wynik analizy był inny niż wówczas gdy używano DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego. Obiekty na dendrogramie będącym wynikiem tej analizy utworzyły trzy grupy podobieństwa genetycznego, którego wartość wahała się od 23 do 52% (rys. 2.). W grupie pierwszej znalazły się linia B₁₀, mieszańce F x B₁₀, B₁₀ x F, mutanty *lp*, *tf*, *br* oraz odmiana Ulstar podobieństwo między nimi wahało się od 27 do 52%. Grupę drugą utworzyły odmiany Du Puits, Radius, Sitel i Vernal oraz ekotypy 27 i 212, pomiędzy którymi podobieństwo wynosiło od 36 do 48%. W grupie trzeciej znalazły się populacje syntetyczne Syn 7-3 i Syn 9-3 oraz linia F; podobieństwo genetyczne między tymi obiektami wahało się od 36 do 43%.

4. Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach testowano wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy podobieństwa genetycznego techniką RAPD – PCR. Markery RAPD wykorzystywane są m.in. do: określenia pochodzenia materiałów mieszańcowych, identyfikacji gatunków oraz odmian hodowlanych (3,4), oceny dystansu lub podobieństwa genetycznego (5), identyfikacji markerów sprzężonych z genami warunkującymi korzystne cechy ilościowe (6) oraz jakościowe – m.in. odporności na patogeny (7), badania polimorfizmu wewnątrz- i międzygatunkowego u wielu gatunków (8). Segregacje markerów RAPD wg praw Mendla oraz ich dziedziczenie obserwowano, np. u jęczmienia, lucerny oraz soi (9,10).

Najczęściej napotykanym problemem przy posługiwaniu się techniką RAPD jest niska powtarzalność uzyskanych wyników, wynikająca z wrażliwości tej metody na zmiany warunków amplifikacji (11). Liczba, powtarzalność i intensywność produktów otrzymanych w technice RAPD są funkcją wielu parametrów: stężenia chlorku magnezu, trójfosforanów deoksynukleotydów, *Taq* polimerazy DNA, koncentracji oraz metody izolacji DNA, liczby cykli, temperatury przyłączania starterów oraz typu termocyklera (12-15). Wpływ stężenia próbki DNA na analizę RAPD został odnotowany, ale obserwacje różniły się dość znacznie. Niektórzy autorzy odnotowali, że stężenie DNA nie wpływa istotnie na powtarzalność analiz RAPD, a jedynie na intensywność prążków (16,17). Również Ellsworth i in. (18) zaobserwowali jedynie spadek intensywności prążków wraz z rozcieńczeniem próbki DNA, bez pojawiania się nowych produktów. Inne wyniki uzyskano prowadząc badania wpływu koncentracji DNA na wynik analizy techniką RAPD przy użyciu 2 różnych starterów i 9 próbek DNA (12). Autorzy zaobserwowali, że przy wysokich stężeniach (1-100 ng/μl) liczba wyraźnych prążków była najwyższa i wahała się od 1 do 6. Przy niższych stężeniach DNA większość pojawiających się wcześniej wyraźnych prążków nie była wi-

doczna, natomiast pojawiły się średnio i słabo wyraźne prążki różnych rozmiarów. Autorzy sformułowali tezę, że pojawiają się one, gdy relatywnie większa zawartość startera umożliwia efektywną amplifikację miejsc, które były niedostępne w przypadku wyższych stężeń próbek. Obserwacje te wskazują na istotny wpływ stężenia próbki na reakcję PCR.

Przy rozpatrywaniu wpływu metody izolacji DNA na wynik analizy RAPD-PCR rezultaty otrzymane przez autorów zajmujących się tym problemem różnią się od siebie. Colton i Clark (19) przeprowadzali izolację DNA z przechowywanych w różnych warunkach tkanek *Drosophila melanogaster* trzema metodami. Nie zauważyli oni istotnych różnic w wynikach reakcji PCR dla trzech zastosowanych metod izolacji DNA – zaobserwowane przez nich różnice miały związek jedynie ze sposobem przechowywania tkanek przed izolacją. Inne wnioski przedstawił autorzy badający wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy RAPD u *Staphylococcus epidermis* i *Streptococcus faecalis* (20). Testowali oni 3 metody izolacji (Chelex, *microwave* oraz fenol/chloroform). W przypadku każdej z trzech analiz otrzymano znacząco różny rozkład produktów. Technika *microwave* generowała najbardziej powtarzalny wzór i według autorów jest najodpowiedniejsza przy wykorzystywaniu techniki RAPD dla bakterii gramdodatnich.

Wpływ metody izolacji zarówno na intensywność, jak i liczbę produktów badał Weder (21). Testował on 11 metod izolacji DNA i ich wpływ na rezultat analizy RAPD-PCR dla czterech gatunków roślin: soi, soczewicy, pszenicy i żyta. Zaobserwował, że w zależności od metody izolacji uzyskiwano produkty o różnej intensywności (wyraźne, średnio i słabo wyraźne). W przypadku liczby wygenerowanych produktów zaobserwowane w obrębie jednego gatunku różnice dla jedenastu metod izolacji były znaczne, np. u ryżu przy jednej z testowanych metod nie zaobserwowano żadnych produktów, natomiast przy zastosowaniu innej metody uzyskano bardzo wyraźne prążki. Najwięcej wyraźnych i średnio wyraźnych produktów uzyskano u soi. Zaobserwowane przez autora różnice w rezultatach analiz RAPD-PCR w zależności od użytej metody izolacji pokrywają się z wynikami uzyskanymi w tej pracy. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że w przypadku wykorzystania dwóch metod izolacji – Thomsona-Henry'ego oraz kolumienkowej, obraz produktów otrzymany po analizie RAPD różni się znacznie (fot. 1 i 2). W przypadku analiz RAPD wykonanych na DNA izolowanym metodą Thomsona-Henry'ego, która jest metodą prostą i szybką, jednak dającą DNA o niskiej czystości, liczba otrzymanych produktów była niewielka i wynosiła średnio 4,6 na ścieżkę (wartość średnia dla dziesięciu testowanych starterów). Wartość ta była porównywalna do liczby produktów otrzymanych w analizach RAPD przez innych autorów. Yu i Pauls (22) studiowali zależność genetyczne między odmianami lucerny na próbach zbiorczych DNA (*bulked DNA*) z użyciem 10 starterów, które generowały średnio po 5 produktów. W przypadku analiz wykorzystujących DNA izolowane metodą kolumienkową, która jest metodą dłuższą i bardziej skomplikowaną, lecz dającą DNA o dużej czystości, liczba uzyskanych po reakcji PCR produktów amplifikacji była prawie dwukrotnie wyższa – wynosiła średnio 8,4 produktu na ścieżkę (dla dziesięciu testowanych starterów). Róż-

nica ta jest najbardziej widoczna w przypadku startera OPB 07 – w przypadku metody Thomsona-Henry'ego otrzymano dla niego najmniejszą liczbę produktów (3,5), a w przypadku metody kolumnkowej – największą liczbę prążków (10,6). Trudno jest jednoznacznie określić przyczynę tak dużej różnicy w liczbie uzyskanych prążków – prawdopodobnie jest to związane z wyższą czystością DNA uzyskanego metodą kolumnkową. Podczas tej metody izolacji DNA traktowane jest RNazą oraz oczyszczane na kolumnkach, co nie występuje w przypadku metody Thomsona-Henry'ego (gdzie materiał roślinny jest jedynie traktowany buforem TPS i ogrzewany – nie następuje oczyszczanie otrzymanego ekstraktu). Możliwe jest, że w zanieczyszczonym DNA nie wszystkie miejsca startu amplifikacji są dostępne dla startera – mogłoby to tłumaczyć mniejszą liczbę produktów amplifikacji.

Izolację DNA metodą kolumnkową wykorzystano również w doświadczeniu, w którym porównywano 4 metody izolacji DNA z homogenatu nasion soi (23). Porównano DNA izolowane metodą kolumnkową (z użyciem kitu Qiagen DNeasy Plant Kit), metodę CTAB oraz 2 inne metody wykorzystujące popularne kity do izolacji DNA. Zauważono, że użyta metoda izolacji miała wpływ na jakość genomowego DNA, a co za tym idzie na jakość obrazu uzyskaną po elektroforezie tego DNA na żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Metoda CTAB miała największą wydajność (pozwalała uzyskać największą liczbę produktów), jednak masa uzyskanych fragmentów DNA była bardzo mała w porównaniu do fragmentów otrzymanych po zastosowaniu innych metod izolacji. Autor sugeruje, że w zależności od dalszego zastosowania DNA, preferowana może być metoda dająca mniejszą liczbę produktów, jednak o większych masach molekularnych.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zastosowana metoda izolacji DNA miała wpływ nie tylko na liczbę otrzymanych produktów amplifikacji, ale również na końcowy wynik analizy podobieństwa genetycznego, przedstawiony na dendrogramach podobieństwa (rys. 1 i 2). W przypadku analizy z wykorzystaniem DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego obiekty na dendrogramie utworzyły 4 grupy podobieństwa genetycznego, przy czym odmiana Ulstar nie znalazła się w żadnej z tych grup i była najmniej podobna do innych badanych obiektów (rys. 1). Wynik ten był zaskakujący ze względu na fakt, że odmiana Ulstar wyprowadzona została z mutanta długogroniastego 'lp' i posiada wiele cech tego mutanta, m.in. wspomnianą cechę długogroniastości. W przypadku wykorzystania DNA izolowanego metodą kolumnkową, obiekty na dendrogramie utworzyły 3 grupy podobieństwa genetycznego. Zważywszy, że dendrogram utworzony na podstawie wyników analizy wykorzystującej DNA izolowane metodą kolumnkową powstał na podstawie prawie dwukrotnie większej liczby danych (produktów amplifikacji), możemy uważać go za dokładniejszy. O bardziej wiarygodnym wyniku analizy z DNA izolowanego metodą kolumnkową z użyciem kitu Qiagen może też świadczyć fakt, że na dendrogramie drugą odmianą Ulstar znalazła się w jednej grupie podobieństwa z mutantem 'lp', z którego została wyprowadzona (rys. 2). Wyniki analizy podobieństwa otrzymane przy wykorzystaniu metody RAPD z DNA izolowanym metodą kolu-

mienkową pokrywają się zatem z danymi na temat pochodzenia badanych obiektów. W przypadku badań podobieństwa genetycznego lucerny metodą RAPD należałoby zatem polecić wykorzystywanie DNA o wyższej czystości, tj. izolowanego, np. metodą kolumnkową.

5. Wnioski

1. Reakcja PCR przeprowadzona z DNA izolowanym metodą kolumnkową dała prawie dwa razy więcej produktów amplifikacji niż w przypadku DNA izolowanego metodą Thomsons-Henry'ego.

2. Na większą liczbę otrzymanych produktów amplifikacji ma prawdopodobnie wpływ większa czystość DNA izolowanego metodą kolumnkową, a zatem większa dostępność startera do miejsca początku amplifikacji.

3. Większa liczba produktów amplifikacji zwiększa dokładność analizy dystansu genetycznego, a zatem wykorzystanie DNA izolowanego metodą kolumnkową pozwala otrzymać bardziej wiarygodne wyniki.

Literatura

1. Thomson D., Henry R., (1995), *Biotechniques*, 19, 394-400.
2. Nei M., Li W. H., (1979), *Proceeding National Academy of Sciences USA*, 79, 5269-5273.
3. Hu J., Quiros C. F., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 505-511.
4. Weder Jurgen K. P., (2002a), *Lebensm.-Wiss. und Technol.*, 35, 504-511.
5. Marilla E. F., Scoles G. J., (1996), *Genome*, 39, 646-654.
6. Waugh R., Powell W., (1992), *Trends Biotech.*, 10, 186-191.
7. Schachermayr G., Siedler H., Gale M. D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 88, 110-115.
8. Brown P. T. H., Lange F. D., Kranz E., Lorz H., (1993), *Mol. Gen. Genet.*, 235, 157-165.
9. Willams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
10. Echt C. S., Erdahl L. A., McCoy T. J., (1992), *Genome*, 35, 84-87.
11. Słomski R., (2001), *Przykłady analiz DNA*, pr. zb., Wyd AR, Poznań, 185-190.
12. Davin-Regli A., Abed Y., Charrel R. N., Bollet C., Micco P., (1995), *Res. Microbiol.*, 146, 561-568.
13. Meunier J. R., Grimont P. A. D., (1993), *Res. Microbiol.*, 144, 373-379.
14. Park Y. H., Kohel R. J., (1994), *Biotech.*, 16, 652.
15. Penner G. A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S. J., Fedak G., (1993), *PCR Methods Appl.*, 2, 341-345.
16. Muralidharan K., Wakeland E. K., (1993), *Biotech.*, 14, 362-364.
17. van Belkum A., (1994), *Clin. Microbiol. Rev.*, 7, 174-184.
18. Ellsworth D. L., Rittenhouse K. D., Honeycutt R. L., (1993), *Biotech.*, 14, 214-217.
19. Colton L., Clark J. B., (2001), *Dros. Inf. Serv.*, 84, 180-182.
20. Abed Y., Davin-Regli A., Charrel R. N., Bollet C., Micco P., (1995), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 238-239.
21. Weder Jurgen K. P., (2002b), *Lebensm.-Wiss. und Technol.*, 35, 233-238.
22. Yu K., Pauls K. P., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 788-794.
23. <http://www.btc-bti.com/applications/soyhomogenization.htm>