

ALEKSANDRA PIETRUSIŃSKA¹**PAWEŁ CZ. CZEMBOR**²¹Zakład Hodowli i Genetyki Stosowanej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie²Zakład Fitopatologii, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Ocena wybranych metod izolacji DNA pod względem ich przydatności w hodowli pszenicy

Evaluation of selected DNA isolation methods for wheat breeding purposes

Opracowano wiele metod izolacji roślinnego DNA. Jednak większość z nich nie jest powszechnie wykorzystywana do selekcji wspomaganą markerami z uwagi na złożoność procedur, dużą czasochłonność i wysokie koszty. Porównano przydatność trzech metod izolacji DNA pod kątem wykorzystania ich w masowej selekcji w hodowli pszenicy. Zastosowano metody: zestaw DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), DNAzol Direct (Molecular Research Center) oraz lizę alkaliczną opartą o NaOH. Wszystkie matryce przechowywane były w jednakowych warunkach. Aby ocenić trwałość preparatów, do reakcji PCR pobrano DNA po jednym, dziesięciu, trzydziestu i czterdziestu dniach od izolacji. W analizie molekularnej łącznie wykorzystano dwanaście markerów mikrosatelitarnych (SSR). Ocena przydatności każdej z trzech metod izolacji DNA polegała na analizie liczby zamplifikowanych produktów w reakcji PCR, przeprowadzonej po czterech różnych okresach przechowywania DNA, a także na analizie uzyskanych produktów pod względem ich intensywności. Otrzymane wyniki wykazały, że najbardziej stabilnym układem oprócz referencyjnej metody opartej o zestaw DNeasy Plant Mini Kit, okazały się matryce po tak zwanej szybkiej ekstrakcji z udziałem NaOH. Wykorzystanie tej metody do selekcji opartej o mikrosatelity może być z powodzeniem stosowane, ponieważ jest niezawodna, szybka i znacznie obniża koszty programów hodowlanych. Natomiast przy izolacji DNA za pomocą odczynnika DNAzol Direct otrzymano inne wyniki od opisywanych w literaturze.

Słowa kluczowe: izolacja DNA, pszenica

There are many methods of plant DNA isolation. However, most of them are unacceptable for marker assisted breeding since their procedures are long, complex and expensive. Therefore, we evaluated three methods that could be used in marker assisted selection in wheat breeding: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), DNAzol Direct (Molecular Research Center) and alkaline lysis based on NaOH. All isolated DNA were kept in the same conditions. In order to evaluate stability of DNA matrices, they were tested in PCR reaction after one, ten, thirty and forty days of storage. Each DNA sample was amplified in PCR with twelve SSRs (Simple Sequence Repeats). Three DNA isolation methods were assessed based upon number of the amplified PCR products and their intensity after various periods of DNA storage. Besides the reference method DNeasy Plant Mini Kit, the most stable and acceptable results were obtained with fast DNA extraction method based on NaOH. The last

method coupled with microsatellite assisted selection seems to be the most reliable and cost effective in breeding programs, whereas DNAzol Direct method gave results different to that described in the literature.

Key words: DNA isolation, wheat

WSTĘP

We współczesnej hodowli roślin, markery molekularne często są wykorzystywane jako narzędzie diagnostyczne w selekcji materiału roślinnego (ang. marker-assisted selection, MAS). Korzyści wynikające z zastosowania markerów DNA widoczne są szczególnie przy wprowadzaniu pojedynczych genów (recesywnych) drogą krzyżowań wypierających i cech o niskiej odziedziczalności. W porównaniu do metod konwencjonalnych, zastosowanie markerów DNA umożliwia szybszą selekcję w obrębie segregujących populacji z uwzględnieniem pożądanego genu lub kombinacji genów (Ribaut i Hosington, 1998).

Rozwój biologii molekularnej sprawił, że obecnie dostępne są odpowiednie systemy markerowe gwarantujące wykrywanie polimorfizmu DNA badanych osobników. Jednak koszty selekcji na masową skalę są nadal zbyt wysokie (Paris i Carter, 2000; Koebner i in., 2003). Dlatego też, powinno dążyć się do redukcji kosztów jednostkowych, przede wszystkim związanych z samym etapem izolacji DNA, ponieważ są one zazwyczaj najwyższe w procesie selekcji wspomaganej markerami.

Obecnie na rynku istnieją gotowe zestawy do izolacji genomowego DNA (np. Qiagen, USA; Autogen, USA; A&A Biotechnology, Polska) za pomocą, których otrzymywane DNA jest dobrej jakości, a procedury są mało skomplikowane. Jedyną wadą jest wysoki koszt przypadający na jedną próbkę, dlatego też wykorzystanie tych metod izolacji w programach hodowlanych (MAS) nie znajduje powszechnego zastosowania.

Innym ważnym zagadnieniem jest wybór odpowiedniej metody uwzględniającej wielkość analizowanej populacji, czasochłonność izolacji, złożoność procedury i docelowe wykorzystanie uzyskanego DNA. Do selekcji materiału hodowlanego za pomocą markerów DNA, gdy w krótkim czasie trzeba przebadać setki (a czasem tysiące) obiektów, przede wszystkim należy wybierać metody niezawodne, tanie i szybkie. W literaturze opisano wiele szybkich metod ekstrakcji DNA, a otrzymane DNA jest wykorzystywane do reakcji amplifikacji PCR (Wang i in., 1993; Thomson i Henry, 1995; Haymes, 1996; Lange i in., 1998; Tuvešson i in., 1998; Paris i Carter, 2000; Warner i in., 2001; Burr i in., 2001; Stein i in., 2001; Werner i in., 2002; Ata-ur-Rehman i in., 2003; Post i in., 2003). W metodach tych, otrzymany ekstrakt zawierać może wiele inhibitorów reakcji PCR pochodzących z zanieczyszczeń roślinnych, tj.: taniny, polisacharydy, pigmenty. Wszystko to sprawia, że wspomniane wyżej metody nie znalazły szerszego zastosowania w systemach markerowych, które wymagają większych ilości DNA i obejmują etap trawienia enzymami restrykcyjnymi (RFLP, AFLP) (Peist i in., 2001; Kourakousis i Langridge, 2003).

W ostatnich latach pojawiły się również na rynku gotowe roztwory alkaliczne do izolacji DNA (DNAzol Direct, Molecular Research Center, USA; DNAzol ES, Molecular

Research Center, Inc., USA; DNAzol Reagent, Invitrogen Corp., USA; Plant DNAzol, Life Technologies, USA), za pomocą których technika ekstrakcji DNA stała się bardzo szybka i prosta w wykonaniu. W ich skład wchodzi alkaliczne detergenty, odpowiedzialne za uszkodzenie ścian komórkowych i błon jądrowych. W literaturze opisano wiele przykładów wykorzystywania gotowych odczynników do izolacji roślinnego DNA (Peng i in., 2000; Ching i in., 2002; Rudnóy i in., 2002; Caldwell i in., 2004; Hong i Hwang, 2005; Konishi i in., 2005; Hu i in., 2005; Navajas-Pérez i in., 2005; Yamane i Kawahara, 2005). Z danych literaturowych wynika, że wyizolowane DNA za pomocą odczynnika DNAzol ES (Extra Strength) jest z powodzeniem wykorzystywane w takich systemach markerowych jak: AFLP, RAPD, SSR, RFLP (Peng i in., 2000) jak również do klonowania genów (Hu i in., 2005).

Celem pracy było porównanie efektywności trzech różnych metod izolacji DNA pod kątem możliwości zastosowania do masowej selekcji materiałów hodowlanych przez obniżenie kosztów i czasu izolacji DNA.

MATERIAŁ I METODY

Do izolacji DNA użyto siewki 5 odmian pszenicy ozimej: Bogatka, Kobra, Nadobna, Lexus, Satyna, które wykorzystywane są w programach hodowlanych jako dawcy cech wysokiej wartości użytkowej i 7 odmian/linii: Pavon76, translokowana linia 6VS/6AL Yangmai 5, KS90WGRC10, KS96WGRC36, KS91WGRC11, KS92WGRC16 i linia zawierająca gen *Pm29*, będące źródłami genów odporności na choroby, ale o niskiej wartości innych cech użytkowych.

Z wszystkich badanych odmian izolowano DNA trzema metodami. Pierwsza z nich (referencyjna) polegała na wyizolowaniu DNA przy pomocy zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., 27220 Turnberry Lane, Valencia, CA 91355, USA). W tym celu z każdego obiektu pobrano 200 mg młodej tkanki roślinnej, którą homogenizowano w buforze ekstrakcyjnym przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Verder, Katowice, Polska), przy ustawieniu częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch cyklach pięciominutowych. Po zakończeniu pierwszego etapu izolacji procedura przebiegała zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Spektrofotometryczny pomiar ilości UV zaabsorbowanego przez zasady w DNA oznaczono przy użyciu aparatu Genesys 10 (ThermoSpectronic, Rochester, NY 14625, USA).

Druga metoda izolacji została przeprowadzona według protokołu opracowanego przez Warner i współpracowników (2002). Z każdego obiektu pobrano około 20 mg dwutygodniowej tkanki roślinnej. Materiał roślinny następnie homogenizowano w 0,2 ml probówkach (Multi Ultra Strip Tubes & Caps, SorensonTM Bioscience, Inc., 6507 South 400 West Salt Lake City, Utah 84107, USA) w obecności roztworu alkalicznego 250mM NaOH, przy użyciu młynka miksującego MM301 i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch powtórzeniach trzydziestosekundowych. Po wstępnym ucieraniu materiał roślinny inkubowano przez 1 minutę w temperaturze 95°C, wykorzystując do tego termocykler UNO II (Biometra GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 30, D-37079 Göttingen,

Niemcy) i ponownie ucierano młynkiem miksującym MM301. Następnie do roztworu lizatu w celu uzyskania lekko zasadowego pH dodano 100 mM TRIS-HCl, pH 8,3. Po zakończeniu tego etapu otrzymany supernatant inkubowano przez 1 dobę w temperaturze 4°C.

W trzeciej metodzie do izolacji DNA wykorzystano odczynnik DNAzol Direct (Molecular Research Center, MRC, USA). Z każdego obiektu pobrano około 20 mg młodej tkanki roślinnej, a następnie homogenizowano ją w 0,2 ml probówkach (SorensonTM Bioscience) w obecności alkalicznego roztworu DNAzol Direct. Do homogenizacji materiału roślinnego użyto młynka miksującego MM301 przy ustawieniu częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch powtórzeniach trzydziestosekundowych. Po wstępnym ucieraniu próbki inkubowano przez 1 minutę w temperaturze 95°C, wykorzystując do tego termocykler UNO II, ponownie ucierano młynkiem miksującym MM301, a następnie pozostawiono je przez 1 dobę w temperaturze pokojowej.

Jakość i ilość DNA uzyskanego w trzech metodach izolacji sprawdzono elektroforetycznie na 0,7% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (Agarose NEEO ultra-quality, ROTH), przy napięciu 200 V w buforze $0,5 \times$ TBE. Obraz rozdziału elektroforetycznego sfotografowano na transiluminatorze UV za pomocą Kodak Gel Logic 200 Imagine System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY 14650, USA), wykorzystując do tego program Kodak Molecular Imaging Software, Version 4.0 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY 14650, USA).

W celu porównania efektywności izolacji DNA wszystkie matryce przechowywano w temperaturze 4°C przez 30 dni, a następnie, w celu przyspieszenia degradacji DNA, umieszczono je w temperaturze pokojowej na 10 dni. Do reakcji amplifikacji PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) pobrano dwanaście matryc kolejno po 1, 10, 30 i 40 dniach od izolacji. Łącznie wykorzystano dwanaście markerów mikrosatelitarnych (SSR, ang. Simple Sequence Repeats): *Xgwm136* (oczekiwany produkt 275 pz — par zasad), *Xgwm550* (156 pz), *Xbarc66* (112 pz), *Xbarc147* (105 pz), *Xbarc135* (239 pz), *Xgwm369* (184 pz), *Xgwm95* (105 pz), *Xbarc124* (250 pz), *Xgwm257* (190 pz), *Xgwm169* (193 pz), *Xgwm613* (114 pz), *Xbarc183* (166 pz) (Röder i in., 1998; Pestsova i in., 2000; Somers i in., 2004; Song i in., 2005). W każdej parze starterów amplifikujących *loci* mikrosatelitarne jeden ze starterów na końcu 5' był wyznakowany jednym z trzech barwników fluorescencyjnych ABI (6-FAM, HEX lub TET). Reakcję amplifikacji przeprowadzono przy wykorzystaniu niskoprofilowanych cienkościennych probówek (MJResearch, Inc., 149 Grove Street, Watertown, MA 02172, USA) w termocyklerze Mastercycler ep (Eppendorf AG, 22331, Hamburg, Niemcy). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wyniosła 20 μ l, a w jej skład wchodziły następujące komponenty: 1 x bufor (MBI Fermentas, V. Graiciuno g. 8, 02241 Wilno, Litwa), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M startera i 1 jednostka polimerazy *Taq* (MBI Fermentas). Ponadto w zależności od metody izolacji DNA mieszanina reakcyjna zawierała: 24 ng DNA roślinnego wyizolowanego za pomocą zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), 3 μ l supernatantu pochodzącego po ekstrakcji metodą NaOH i 2 μ l supernatantu uzyskanego po izolacji za pomocą odczynnika DNAzol Direct (MRC). W zależności od temperatury przyklejania się startera do matrycy zastosowano trzy różne profile termiczne reakcji PCR

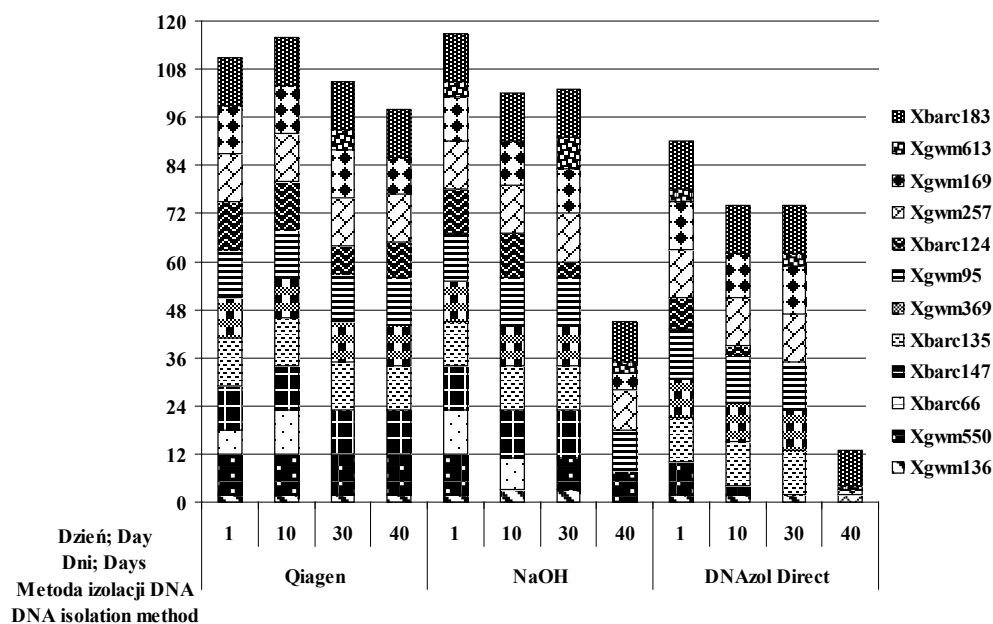
przewodzonej w termocyklerze Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy). Dla markerów: *Xgwm136*, *Xgwm369*, *Xgwm613*, *Xgwm95*, *Xgwm257* warunki amplifikacji przebiegały według następującego programu: 94°C/2 min. denaturacji wstępnej, 10 cykli składających się 94°C/30 sek., 60°C/30 sek., 72°C/1 min., a także 30 cykli 90°C/30 sek., 60°C/30 sek., 72°C/1 min. Dla markerów: *Xgwm550*, *Xbarc66*, *Xbarc183* poszczególne etapy reakcji PCR różniły się tylko temperaturą przyklejania startera do matrycy, która wynosiła 55°C/30 sek., a dla markerów: *Xbarc124*, *Xbarc147*, *Xbarc135*, *Xgwm169* temperatura hybrydyzacji wynosiła 50°C/30 sek. W ostatnim cyklu reakcji PCR, etap elongacji został wydłużony o 5 min. Temperaturę pokrywy grzewczej w termocyklerze ustawiono na 105°C we wszystkich użytych programach. Produkty PCR przed naniesieniem na żel odpowiednio rozcieńczono i denaturowano w obecności formamidu (Sigma-Aldrich sp. z o. o., ul. Szelągowska 30, 61-626 Poznań, Polska) z temperaturą pokrywy grzewczej 105°C i temperaturą bloku 95°C przez 3 min., wykorzystując do tego termocykler UNO II (Biometria, Göttingen, Niemcy).

Rozdział produktów amplifikacji PCR przeprowadzono na analizatorze DNA ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA) na 4,75% denaturującym żelu polyakrylamidowym (Long Ranger[®] Gel Solutiion, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, USA).

Intensywność produktów reakcji PCR oceniano na podstawie ilości prążka (zajmowanej powierzchni na żelu w jednostkach względnych) za pomocą programu WinCAM 2004a Color Area Meter (Instruments Régent Inc., 2672, Chemin Sainte-Foy, Quebec, Qc G1V 1V4, Kanada).

WYNIKI

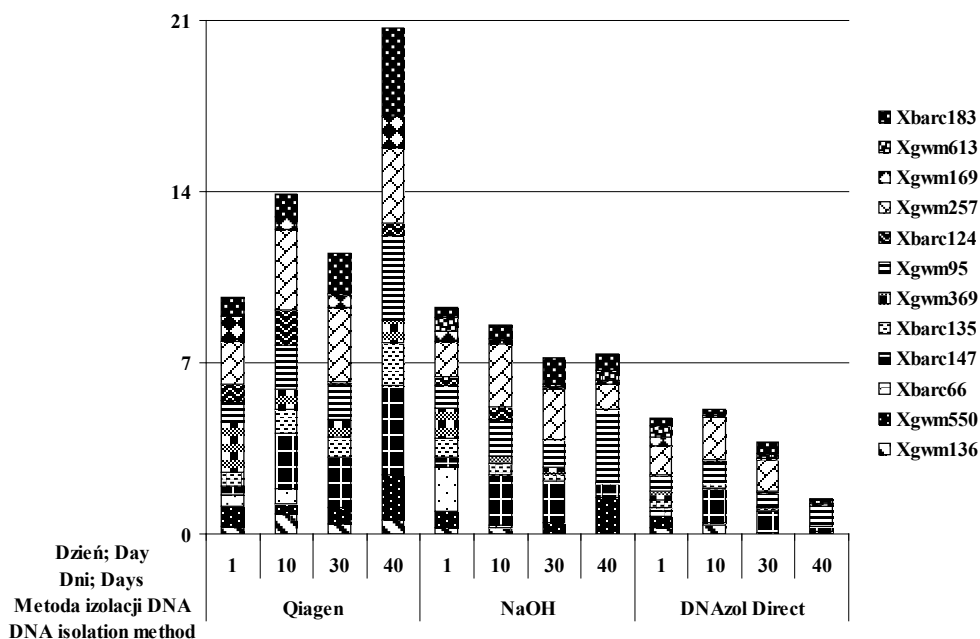
Stwierdzono, że liczba otrzymanych produktów reakcji PCR przy użyciu tego samego markera (*Xgwm95*, *Xgwm257*, *Xbarc183*, *Xgwm169*, *Xgwm369*, *Xbarc135*, *Xbarc147*, *Xgwm550*, *Xbarc124*, *Xgwm136*), dla poszczególnych metod jest taka sama i zmienia się nieznacznie wraz z upływem czasu (po 1, 10 i 30 dni) przechowywania w temperaturze 4°C (rys. 1). Po 40 dniach od izolacji (30 dni/4°C + 10 dni/temp. pokojowa) przeprowadzona ocena liczby produktów wykazała, że prawie żadna z matryc otrzymanych po izolacji Qiagen i tzw. szybkiej metodzie (NaOH) pod wpływem temperatury nie uległa degradacji i uzyskano taką samą liczbę produktów reakcji PCR (rys. 1). Wśród matryc po izolacji metodą NaOH zauważono nieznaczną ich degradację. Dla markerów: *Xgwm95*, *Xgwm257*, *Xbarc183*, *Xgwm169*, *Xbarc147*, *Xgwm550*, otrzymano średnio o dwa produkty mniej, natomiast tylko dla czterech układów: *Xgwm369*, *Xbarc135*, *Xbarc124*, *Xgwm136* nie otrzymano żadnych produktów (rys. 1). Matryce po izolacji za pomocą DNAzol Direct, podczas przechowywania przez 10 dni w temperaturze pokojowej, uległy degradacji do tego stopnia, że dla markerów: *Xgwm95*, *Xgwm257*, *Xbarc183*, *Xgwm169* liczba uzyskanych produktów była znacznie niższa. Natomiast aż w siedmiu kombinacjach (*Xgwm369*, *Xbarc135*, *Xbarc147*, *Xgwm550*, *Xbarc124*, *Xgwm136*, *Xbarc66*) nie otrzymano żadnych produktów amplifikacji *loci* mikrosatelitarnych (rys. 1).



Rys. 1. Liczba produktów PCR uzyskanych w trakcie amplifikacji DNA uzyskanego po izolacji różnymi metodami

Fig. 1. Number of PCR products generated with the use of DNA extracted with different methods

Analiza uzyskanych produktów w reakcji PCR pod względem ich intensywności aż dla dziewięciu z dwunastu układów mikrosatelitarnych (*Xgwm95*, *Xgwm257*, *Xbarc183*, *Xgwm169*, *Xgwm369*, *Xbarc135*, *Xbarc147*, *Xgwm550*, *Xbarc124*) wykazała znaczną różnicę pomiędzy matrycami wyizolowanymi przy pomocy trzech metod (rys. 2). Różnica w intensywności produktów PCR była najbardziej widoczna pomiędzy metodami Qiagen i NaOH a metodą DNazol Direct. Dla niektórych metod izolacji DNA (Qiagen i NaOH) intensywność uzyskanych produktów (niezależnie od wieku matryc i sposobu ich przechowywania) była bardzo wysoka, co czasami utrudniało ich dokładną analizę. Natomiast dla matryc po izolacji odczynnikiem alkalicznym (DNazol Direct) dla wszystkich dwunastu układów mikrosatelitarnych, uzyskane produkty reakcji PCR były znacznie mniej intensywne, a w niektórych przypadkach były bardzo trudno dostrzegalne (*Xbarc124*, *Xbarc66*, *Xgwm369*), co znacznie utrudniło ich analizę.



Rys. 2. Intensywność (jednostki względne) produktów PCR uzyskanych w trakcie amplifikacji DNA uzyskanego po izolacji różnymi metodami

Fig. 2. Intensity (relative units) of PCR products generated with the use of DNA extracted with different methods

DYSKUSJA

W celu zastosowania w selekcji materiału hodowlanego efektywnych, szybkich i tanich metod izolacji DNA w badaniach wykorzystano dwie metody ekstrakcji: za pomocą alkalicznego buforu NaOH i gotowego odczynnika DNazol Direct. Okazało się, że jedynie za pomocą ekstrakcji w obecności roztworu NaOH otrzymane matryce nie uległy tak szybko degradacji pod wpływem upływu czasu i sposobu przechowywania, jak miało to miejsce w przypadku matryc po izolacji odczynnikiem DNazol Direct. Dokonywana po różnym czasie przechowywania wyizolowanego DNA, ocena efektywności trzech różnych metod izolacji dla dwunastu markerów mikrosatelitarnych (SSR) potwierdziła, że ekstrakcja DNA za pomocą NaOH jest metodą, która daje dobre wyniki, a przy tym jest szybka, prosta, a także tania. Wybór tej metody ekstrakcji DNA do przeprowadzenia izolacji dużej liczby obiektów w krótkim czasie jest jak najbardziej uzasadniony. Według Warner i współpracowników (Warner i in., 2001) za pomocą ekstrakcji w obecności NaOH, w ciągu jednego dnia roboczego jedna osoba jest w stanie wyizolować aż 400 próbek roślinnych, podczas gdy za pomocą zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)

tylko 48 próbek (obserwacje własne). Zasadniczą zaletą tej metody jest bardzo niski koszt jednostkowy. Według Warner i zespół (Warner i in., 2001) wyizolowanie jednej próbki za pomocą metody NaOH kosztuje w przybliżeniu 0,54 \$, podczas gdy za pomocą gotowych zestawów koszty, w zależności od producenta, wynoszą ponad 4,00 \$ za jedną próbkę. Jednak jakość i czystość otrzymanego DNA za pomocą ekstrakcji w obecności NaOH jest czynnikiem znacznie ograniczającym wykorzystanie tej metody izolacji w technikach molekularnych składających się z wielu etapów (AFLP, RFLP), a przez to wymagających znacznie większych ilości DNA, pozbawionego jakichkolwiek zanieczyszczeń, będących inhibitorami reakcji PCR (Peist i in., 2001; Warner i in., 2001; Kourakousis i Langridge, 2003).

Według zebranej literatury na temat zastosowania do izolacji roślinnego DNA gotowego odczynnika alkalicznego (DNAzol Direct, Molecular Research Center, USA; Plant DNAzol, Life Technologies, USA) wynika, że do niektórych procedur wprowadzono dodatkowy etap związany z oczyszczaniem wyizolowanego DNA (Ching in., 2002; Caldwell i in., 2004). Może to sugerować, że w celu uzyskania DNA lepszej jakości, konieczne jest wprowadzenie tego punktu do procedury izolacji za pomocą tego odczynnika. Jednak oznacza to, że wykorzystanie tej metody do izolacji z dużej liczby obiektów roślinnych, może znacznie przedłużyć selekcję wspomaganą markerami, na co nie zawsze można sobie pozwolić.

WNIOSKI

1. Metoda izolacji za pomocą NaOH dała porównywalne wyniki w stosunku do referencyjnej metody izolacji za pomocą zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).
2. Ze względu na wysoką efektywność szybkiej ekstrakcji DNA za pomocą alkalicznego buforu NaOH, zastosowanie tej metody izolacji do selekcji wspomaganą markerami mikrosatelitarnymi (MAS), wydaje się jak najbardziej uzasadnione, gdyż znacznie obniża koszty analizy i skraca jej czas.
3. Metoda izolacji DNA za pomocą odczynnika DNAzol w naszych doświadczeniach nie dała oczekiwanych wyników.

LITERATURA

- Ata-ur Rehman, Raman R., Read B., Raman H. 2001. High throughput DNA isolation method for routine marker assisted selection in barley. Proceedings of the 10th Australian Barley Technical Symposium, 2001.
- Burr K., Harper R., Linacre A. 2001. One-step isolation of plant DNA suitable for PCR amplification. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 367 — 371.
- Caldwell K. S., Dvorak J., Lagudah E. S., Akhunov E., Luo M. C., Wolters P., Powell W. 2004. Sequence polymorphism in polyploid wheat and their D-genome diploid ancestor. Genetics 167: 941 — 947.
- Ching A., Caldwell K., Jung M., Dolan M., Smith O., Tingey S., Morgante M., Rafalski A. J. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. BMC Genetics 3: 19.
- Haymes K. M. 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. Plant Mol. Biol. Rep. 14: 280 — 284.
- Hong J. K., Hwang B. K. 2005. Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic PR-1 gene in *Arabidopsis*. Physiologia Plantarum 124: 267 — 277.

- Hu W. W., Gong H., Pua E. C. 2005. Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-methionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiologia Plantarum* 124: 25.
- Karakousis A., Langridge P. 2003. A high-throughput plant DNA extraction method for marker analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 95a — 95f.
- Koebner R. M. D., Summers R. W. 2003. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? *Trends in Biotechnology* 21 (2): 59 — 63.
- Konishi T., Yasui Y., Ohnishi O. 2005. Original birthplace of cultivated common buckwheat inferred from genetic relationships among cultivated populations and natural populations of wild common buckwheat revealed by AFLP analysis. *Genes & Genetic Systems* 80 (2): 113 — 119.
- Lange D. A., Penuela S., Denny R. L., Mudge J., Concibo V. C., Orf J. H., Young N. D. 1998. A plant DNA isolation protocol suitable for polymerase chain reaction based marker-assisted breeding. *Crop Sci.* 38: 217 — 220.
- Navajas-Pérez R., Herrán R., González G. L., Jamilena M., Lozano R., Rejón C. R., Rejón M. R., Garrido-Ramos M. A. 2005. The evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within *Rumex* (*Polygonaceae*) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 22 (9):1929 — 1939.
- Paris M., Carter M. 2000. Cereal DNA: A rapid high-throughput extraction method for marker assisted selection. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 357 — 360.
- Peist R., Hansel D., Twieling G., Löffert D. 2001. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *QIAGEN News* 3: 7 — 9.
- Peng J., Korol A. B., Fahima T., Röder S., Ronin Y. I., Li Y. C., Nevo E. 2000. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasi-linkage. *Genome Res.* 10: 1509 — 1531.
- Pestsova E., Ganal M. W., Röder M. S. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689 — 697.
- Post R., Post L., Dayteg C., Nilsson M., Forster B. P., Tuvešson S. 2003. A high-throughput DNA extraction method for barley seed. *Euphytica* 130: 255 — 260.
- Ribaut J. M., Hoisington D. 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends in Plant Science* 3(6): 236 — 239.
- Röder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P., Ganal M. W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007 — 2023.
- Rudnóy S., Bratek Z., Páldi E., Rácz I., Lásztity D. 2002. FLC-like factors in wheat (cv. Mv15) and *Conyza* sp. *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology*.
- Somers D. J., Isaac P., Edwards K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1105 — 1114.
- Song Q. J., Shi J. R., Singh S., Fickus E. W., Costa J. M., Lewis J., Gill B. S., Ward R., Cregan P. B. 2005. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 110: 550 — 560.
- Stein N., Herren G., Keller B. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120: 354 — 356.
- Thompson D., Henry R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissues for analysis by PCR. *Biotechniques* 19: 394 — 400.
- Tuvešson S. L. v Post, Öhlund R., Hagberg P., Graner A., Svitashv S., Schehr M. & Elovsson. 1998. Molecular breeding for the BaMMV/BaYMV resistance gene *ym4* in winter barley. *Plant Breed.* 117: 19 — 22.
- Wang H., Qi M., Cutler A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* 21 (17): 4153 — 4154.
- Warner P., Karakousis A., Schiemann A., Eglinton J., Langridge P., Barr A. 2001. An investigation of a rapid DNA extraction method for routine MAS in the S.A. Barley Improvement Program. *Proceedings of the 10th Australian Barley Technical Symposium*.
- Werner O., Ros M. R., Guerra J. 2002. Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *J. Bryology* 24: 127 — 131.

Yamane K., Kawahara T. 2005. Intra- and interspecific phylogenetic relationships among diploid *Triticum-Aegilops* species (*Poaceae*) based on base-pair substitutions, indels, and microsatellites in chloroplast noncoding sequences. *Am. J. Botany* 92(11): 1887 — 1898.