



Zastosowanie metod molekularnych i cytogenetycznych w hodowli i selekcji zwierząt

Ewa Słota, Barbara Rejduch, Anna Radko

Zakład Immuno- i Cytogenetyki, Dział Biotechnologii,
Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa

The utilization of molecular biology methods in farm animals breeding and selection

Summary

On the basis of the literature, the new molecular methods useful in animal breeding and selection are described.

DNA restriction fragment length polymorphism analysis is a tool in the diagnosis of some genetic diseases (RYR1 in pigs, BLAD and DUMPS in cattle). Microsatellite DNA polymorphism is useful in parentage control, genetic characteristic of populations, as well as in gene mapping and marker assisted selection.

Cytogenetic analyses are recently supported by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and primed *in situ* labelling (PRINS) which make the chromosome aberration diagnosis more precise.

One of the expanded method is bio-chip construction for genome analyses.

Key words:

gene mapping, markers, DNA polymorphism, FISH, biochips.

Adres do korespondencji

Ewa Słota,
Zakład Immuno-
i Cytogenetyki,
Dział Biotechnologii,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa.

biotechnologia

1 (60) 84-92 2003

1. Wstęp

W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku wraz z rozwojem genetyki klasycznej rozpoczęto poszukiwania nowych metod badawczych, które mogłyby wzbogacić istniejące metody analiz genomu zwierząt. Bardzo owocne stały się metody molekularne, umożliwiające poznanie genomu poszczególnych gatunków zwierząt, zjawiska konserwatyizmu genetycznego i bioróż-

norodności, a także diagnozę zmian aparatu genetycznego i wykrywanie genetycznych aberracji.

Genom – czyli całkowity DNA komórki, obejmujący zarówno geny, jak i odcinki niekodujące, zawiera kilkadziesiąt tysięcy genów, przy czym sekwencje kodujące stanowią około 3% całego genomu. Obecnie najważniejszym celem biologii molekularnej jest poznanie genomów jak największej liczby żywych organizmów. Umożliwi to dalszy rozwój genetyki, ale także zrozumienie czynności żywych komórek, pomoże w wyodrębnieniu genów odpowiedzialnych za choroby dziedziczne, natomiast w hodowli identyfikację genów warunkujących cechy ważne z punktu widzenia praktycznego i ekonomicznego, które będzie można wykorzystać jako narzędzia selekcji. Należy podkreślić, że selekcja, szczególnie ukierunkowana na pojedyncze cechy, bez poznania mechanizmów ich genetycznego uwarunkowania może spowodować efekty niekorzystne, takie jak wzrost współczynnika homozygotyczności (inbredu), czy też utratę innych cech wpływających, np. na zdrowotność zwierząt, jak również rozprzestrzenienie się genów, na ogół o charakterze recesywnym, powodujących choroby genetyczne (takie jak BLAD, DUMPS u bydła czy RYR1 u świń).

Dotychczas postęp genetyczny u zwierząt gospodarskich uzyskiwany był drogą selekcji na podstawie fenotypu lub oceny wartości hodowlanej, prowadzonej w oparciu na cechach fenotypowych. Dopiero znaczny postęp, jaki dokonał się w dziedzinie biologii molekularnej, w ostatnich dwóch dziesięcioleciach umożliwił rozpoczęcie badań na poziomie DNA i wykorzystania ich w hodowli.

Punktem zwrotnym w analizie kwasów nukleinowych, było odkrycie w latach siedemdziesiątych enzymów restrykcyjnych, mających zdolność rozpoznawania specyficznych dla nich sekwencji nukleotydowych i przecinania ich w obrębie podwójnej nici DNA, w skutek czego, po trawieniu genomowego DNA odpowiednią endonukleazą, otrzymujemy fragmenty restrykcyjne, których długość zależy od wystąpienia mutacji punktowych. Zjawisko to określa się terminem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*). Fragmenty restrykcyjne DNA były pierwszymi, powszechnie stosowanymi markerami molekularnymi (1,2). Charakteryzują się one jednak małą heterozygotycznością, a zatem i niewielkim stopniem polimorfizmu, natomiast metoda ich badania jest pracochłonna, a skuteczność nie zawsze jest 100%.

2. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Obecnie technika RFLP wraz z łańcuchową reakcją polimerazy – PCR, opracowaną w 1985 r. przez Mullisa i Faloona (3), szeroko wykorzystywana jest w hodowli zwierząt do identyfikacji genów „głównych”, czyli o dużym efekcie fenotypowym w zakresie cech produkcyjnych, określanych również jako *locus* cech ilościowych – QTL (*quantitative trait locus*). Przykładem może tu być identyfikacja genu receptora estrogeny ES u świń, wpływającego na wielkość miotu (4,5), genów białek mleka

κ -kazeiny i β -laktoglobuliny mające znaczenie w produkcji mleka, czy genu hormonu wzrostu GH związanego z wydajnością mleczną u bydła (6).

Metoda PCR/RFLP znalazła również zastosowanie w diagnostyce chorób genetycznych. Obecnie w praktyce hodowlanej rutynowo wykonuje się diagnostykę mutacji:

1. Genu receptora ryanodiny u świń RYR1 (6,7) odpowiedzialnego za wrażliwość świń na stres oraz wpływającego na jakość mięsa. Wykrycie molekularnego podłoża podatności świń na stres (mutacja C→T, zamiana cytozyny na tyminę w genie receptora ryanodiny RYR1) i wykorzystanie testu PCR/RFLP do diagnozowania tej mutacji pozwala na dokładne określenie genotypu badanych osobników w odniesieniu do *locus* RYR1. Możliwość ustalenia genotypów RYR1 pozwala na dobór zwierząt do kjarzeń w taki sposób, by zapobiegać stratom ponoszonym przez hodowców trzody chlewnej, powstającym na skutek upadków zwierząt wrażliwych na stres oraz uzyskiwanie od takich osobników mięsa złej jakości – PSE (bladego, miękkiego, wodnistego), nie nadającego się do przetwórstwa.

2. Genu jednej z podjednostek beta-2 integryny u bydła, którego mutacja przejawia się wrodzonym niedoborem leukocytarnych cząstek adhezyjnych – BLAD (*bovine leukocyte adhesion deficiency*). Efektem tej mutacji jest granulocytopenia, której następstwem są utrzymujące się infekcje bakteryjne, często prowadzące do śmierci zwierzęcia. Powstanie defektu genetycznego BLAD warunkowane jest mutacją punktową A→G w obrębie genu kodującego podjednostkę CD18 adhezyjnych cząstek leukocytarnych, odpowiedzialnych za przyleganie leukocytów do miejsc infekcji (8). Mutacja BLAD jest rozprzestrzeniana w populacji przez zwierzęta heterozygotyczne, u których nie występują objawy zaburzeń ze strony układu odpornościowego. Skłonność do infekcji spowodowaną tym defektem przejawiają jedynie homozygoty recesywne. Przy braku ekspresji zmutowanego allelu BLAD u osobników heterozygotycznych oraz braku występowania objawów specyficznych dla syndromu BLAD, jedyną skuteczną metodą wykrywania tej mutacji jest metoda PCR/RFLP. Mutacja ta jest najbardziej rozpowszechniona w populacji bydła rasy hf na świecie i wykazuje silny dodatni związek z wydajnością mleczną u krów tej rasy. Szeroki import bydła rasy hf w ostatnich trzydziestu latach spowodował, że mutacja BLAD, oprócz Kanady i USA, objęła swym zasięgiem także kraje Europy Zachodniej, istnieje zatem konieczność prowadzenia profilaktycznych badań na nosicielstwo tego zmutowanego allelu BL.

3. Genu syntazy monofosforanu urydyny, którego mutacja powoduje wrodzony niedobór syntazy monofosforanu urydyny – DUMPS (*deficiency of uridine monophosphate synthase*), objawiając się wczesną zamieralnością zarodków u bydła. Molekularnym podłożem wystąpienia tego schorzenia jest podstawienie nukleotydu tyminy przez cytozynę (C→T) w genie syntazy monofosforanu urydyny (UMPS), skutkiem tego jest utrata aktywności enzymu UMPS, a następnie zamieranie zarodków bydłych (u homozygot recesywnych). Mutacja ta jest w związku z tym określana również jako „gen obumieralności zarodków” (9). Dostrzegając zagrożenie jakie niesie ze sobą obecność genu DUMPS w populacji bydła i możliwość jego ekspansji

drogą sztucznej inseminacji, pod koniec lat osiemdziesiątych w Stanach Zjednoczonych i w Europie Zachodniej wprowadzono program testowania bydła na nosicielstwo mutacji DUMPS. Wraz z poznaniem sekwencji genu DUMPS w 1993 r. otworzyły się możliwości jego identyfikacji metodą PCR/RFLP. Analiza próbek DNA tą metodą pozwala w precyzyjny i łatwy sposób odróżnić osobniki heterozygotyczne, będące nosicielami tej mutacji od zwierząt nie posiadających zmutowanego allelu (8).

Opracowanie metody PCR umożliwiło także badanie markerów minisatelitarnych należących do tandemowych powtórzeń sekwencji nukleotydowych DNA.

3. Sekwencje minisatelitarne

Sekwencje minisatelitarne znane również pod nazwą VNTR (*variable number of tandem repeats* – zmienna liczba tandemowych powtórzeń). Są to tandemowo powtarzające się elementy, o motywie złożonym średnio z 9-80 par zasad, występujące przeważnie w terminalnych obszarach chromosomów (10). Duża zmienność VNTR polega przede wszystkim na różnej liczbie powtórzeń danego motywu w określonym *locus*. Analiza kilku minisatelitarnych *loci* dla danego osobnika, z zastosowaniem metody PCR, pozwala uzyskać charakterystyczny dla niego elektroforetyczny obraz prążków na żelu – określany jako „genetyczny odcisk palca” (*fingerprint*). W praktyce taka analiza wykorzystywana jest do identyfikacji osobników. Prawdopodobieństwo wystąpienia tego samego układu prążków u dwóch niespokrewnionych osobników jest minimalne. W badaniach przeprowadzonych u bydła, przy zastosowaniu trzech markerów minisatelitarnych wykazano, że prawdopodobieństwo wystąpienia identycznego układu prążków wynosi 10^{-11} (11). Pomimo bardzo wysokiego polimorfizmu i stosunkowo prostej metody analizy, markery minisatelitarne nie znalazły szerokiego zastosowania w praktyce, gdyż liczba dotychczas odkrytych i scharakteryzowanych sekwencji minisatelitarnych jest zbyt mała. Obecnie najbardziej rozpowszechnione są badania nad polimorfizmem sekwencji mikrosatelitarnych DNA.

4. Sekwencje mikrosatelitarne

Sekwencje te są to krótkie 1-5-nukleotydowe, tandemowe powtórzenia DNA, opisano je po raz pierwszy w 1982 r. (12). Sekwencje te występują w genomach eukariotów z dość dużą częstością i rozmieszczone są równomiernie co 6-10 kbp (13,14).

Dotychczas zidentyfikowano ponad 2200 sekwencji mikrosatelitarnych w genomie bydła (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/>), około 1500 u świń i 650 u koni (www.theardb.org/). Ze względu na dużą liczebność, wysoki stopień polimorfizmu

oraz stosunkowo łatwą i szybką identyfikację przy użyciu reakcji PCR i laserowych sekwenatorów, stały się one w ostatnim czasie najliczniejszą klasą markerów genetycznych stosowanych w hodowli zwierząt gospodarskich.

Wysoko polimorficzne sekwencje mikrosatelitarne DNA znalazły szczególne znaczenie w kontroli pochodzenia u zwierząt gospodarskich. Wskaźnikiem przydatności poszczególnych sekwencji mikrosatelitarnych do kontroli pochodzenia jest prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa (PE). Prawdopodobieństwo prawidłowego wykluczenia ojcostwa za pomocą testu molekularnego dziewięciu markerów mikrosatelitarnych u koni wynosi 0,99 (15). U bydła, według danych Holma i Bendixena (16) analiza sześciu sekwencji mikrosatelitarnych daje możliwość wykluczenia niewłaściwego rodzica równą 0,99, a za pomocą jedenastu układów grupowych krwi 0,98. Porównanie to wskazuje, że zastosowanie testu molekularnego jest efektywniejszą i dokładniejszą techniką od konwencjonalnego badania grup krwi.

Markery mikrosatelitarne charakteryzujące się wysokim polimorfizmem oraz równomiernym rozproszeniem w całym genomie stały się niezwykle przydatnym narzędziem w mapowaniu QTL. Z początkiem lat dziewięćdziesiątych uruchomiono projekty mapowania genomu świni (PiGMap), bydła (BoVMap), psa (DoGMap) oraz owcy i kury, których celem jest wysycenie map genomu zwierząt markerami, tak by odległość między nimi nie przekraczała 20 cM, a następnie wykorzystania ich do zmapowania *loci* cech ilościowych (QTL). Analiza segregacji licznych, równomiernie rozmieszczonych w genomie markerów mikrosatelitarnych oraz zmienność określonej cechy produkcyjnej w rodzinie referencyjnej może doprowadzić do wskazania regionu chromosomowego, w którym prawdopodobnie występuje *locus* genu głównego. Poprzez analizę taką oznaczono u świń szereg *loci*, zlokalizowanych na różnych chromosomach, które wykazują istotne zależności z tempem wzrostu, z jakością tuszy i mięsa, czy z cechami związanymi z rozrodem. U bydła wykazano takie zależności z wydajnością mleka, białka oraz ze wzrostem i jakością tuszy. Podobne badania przeprowadzane są w celu stwierdzenia asocjacji między markerami mikrosatelitarnymi a genami warunkującymi odporność na różnego rodzaju choroby, które są przyczyną poważnych strat ekonomicznych w hodowli zwierząt. Przykładem może tu być wykrycie zależności między markerami 513, BM1443 i BM302 a mastitis u bydła (17).

Ostatnio do poszukiwań QTL z powodzeniem zastosowano metodę *selective DNA pooling*, umożliwiającą wytypowanie w obrębie genomu *loci* cech ilościowych przydatnych dla celów selekcyjnych (18). Jest to metoda detekcji sprzężonych z QTL markerów mikrosatelitarnych na podstawie densytometrycznego pomiaru frekwencji alleli, przeprowadzonego w zbiorczych próbkach DNA osobników o skrajnych wartościach analizowanej cechy. Metoda *selective DNA pooling* pozwala na określenie częstości alleli będących markerami w obrębie alternatywnych grup, wyższych i niższych wartości rozkładu fenotypowego cech ilościowych i na redukcję do jednej trzeciej liczby testowanych osobników poprzez zastosowanie łącznych prób DNA. Metoda ta może zatem zmniejszyć koszty badań, a przez to przyspieszyć prace nad identyfikacją sprzężeń.

Rozwijające się dynamicznie badania nad mapowaniem genów oraz analizą asocjacji między zmapowanymi markerami a cechami ilościowymi umożliwią identyfikację genów istotnych z hodowlanego punktu widzenia. Markery te mogą być wykorzystywane do selekcji pośredniej MAS (*Marker Assisted Selection*), w której kryterium wyboru zwierzęcia jest jego genotyp w *locus* markera genetycznego wykazującego asocjację z doskonałą cechą użytkową. Przykładem tu może być gen *FecB*, wpływający na plenność owiec rasy Booroola. Locus tego genu sprzężony jest z markerami mikrosatelitarnymi BM1329 i OarAE101, zlokalizowanymi na chromosomie 6. Ustalenie genotypu w tych *loci* pozwala na przewidywanie genotypu w *locus* *FecB*. Innym przykładem może być ujawnienie ponad stu powiązań markerów DNA z cechami użytkowości mlecznej bydła (19). Selekcja taka jest znacznie bardziej intensywna i dokładna w porównaniu z selekcją tradycyjną, a postęp genetyczny może być uzyskiwany w krótszym czasie.

Poznanie budowy DNA oraz rozwój metod analizy molekularnej genomu zwierząt doprowadziły do skonstruowania w 1993 r. przez Fodora i in. (29) tzw. biochipów. Na biochipach znajdują się krótkie, zwykle 5-25-nukleotydowe, zsyntetyzowane odcinki jednoniciowego DNA. Działanie chipów polega na hybrydyzacji dokładnie znanych sekwencji nukleotydowych umieszczonych na tzw. „płytkach DNA” z sekwencjami w badanych próbkach. Do chwili obecnej opracowano cztery rodzaje biochipów:

- 1) oligonukleotydowe – składające się z co najmniej kilku nukleotydów – wykorzystywane w identyfikacji mutacji genowych,
- 2) cDNA, znakowane barwnikami fluorescencyjnymi – składające się średnio z 5-25 pz – będące markerami konkretnych genów,
- 3) białkowe mikrocząstki – składające się z białek oraz przeciwciał – wykorzystywane w badaniach interakcji białko-białko, a także zależności pomiędzy białkami a odpowiedzialnymi za ich syntezę genami,
- 4) tkankowe – składające się z kilkuset fragmentów różnych tkanek – wykorzystywane do wykrywania nowych i weryfikacji już odkrytych genów, a także znajdujące zastosowanie w diagnostyce klinicznej, przeważnie do identyfikacji chorób nowotworowych.

Po całkowitym sekwencjonowaniu genomów i dokładnym poznaniu funkcji poszczególnych genów, wykorzystanie biochipów będzie miało duże znaczenie w przyszłej hodowli zwierząt. Stanie się bowiem przydatnym narzędziem w selekcji, z uwagi na możliwość wyboru do dalszej hodowli takich osobników, których zestaw genów będzie gwarantować uzyskanie pogłowia zwierząt wykazujących cechy pożądate, z punktu widzenia ekonomicznego.

Badania cytogenetyczne u zwierząt gospodarskich, rozwijające się bardzo intensywnie od drugiej połowy ubiegłego wieku dość szybko zostały zaakceptowane jako narzędzie selekcji w praktyce hodowlanej. Stwierdzono bowiem, że liczne aberracje chromosomowe powodują na ogół niekorzystne skutki, głównie w postaci obniżenia płodności (20,21). Stąd w wielu krajach wprowadzono obowiązkowe badania

prawidłowości kariotypu, najczęściej osobników męskich przeznaczonych do rozrodu, ze względu na możliwość szybkiego rozprzestrzeniania się aberracji w dużej populacji, szczególnie w warunkach powszechnego stosowania sztucznej inseminacji (22).

Badania chromosomów w preparatach uzyskanych z gonad męskich wspomagają diagnozę różnego rodzaju nieprawidłowości kariotypu poprzez obserwację przebiegu poszczególnych etapów podziału mejotycznego u zwierząt – nosicieli tych aberracji. Przyczyną obniżenia płodności u osobników obarczonych zmianami chromosomowymi są zaburzenia przebiegu gametogenezy, co z kolei ma wpływ na przedimplantacyjną śmiertelność zarodków o niezrównoważonym kariotypie (23).

Nieprawidłowy przebieg koniugacji chromosomów u nosicieli strukturalnych aberracji powoduje w niektórych komórkach asocjacje zmienionych struktur autosomalnych z bivalentem płciowym X-Y (24). Prowadzić to może nawet do całkowitego zahamowania procesu gametogenezy. Należy podkreślić jednak, że asocjacje zachodzą tylko w niewielkim procencie komórek. Znacznie częściej chromosomy, tworzące zmienione struktury takie jak tri- lub tetrawalenty ulegają nieprawidłowemu rozdziałowi w wyniku czego powstają aneuploidalne gamety. Po połączeniu takiej wadliwej gamety, charakteryzującej się brakiem lub nadmiarem materiału genetycznego, z prawidłową komórką rozrodczą, powstaje zygota o niezrównoważonym kariotypie. Rozwijający się z niej zarodek zamiera we wczesnym stadium rozwoju embrionalnego, co znajduje odzwierciedlenie w obniżeniu wskaźników płodności u nosicieli aberracji chromosomowych. Tak na przykład u bydła wyraża się obniżeniem wskaźnika niepowtarzalności rui, natomiast u świń zmniejszeniem liczby prosiąt w miotach.

5. Technika hybrydyzacji *in situ*

W ostatnich latach wśród cytogenetyków duże zainteresowanie wzbudza technika hybrydyzacji *in situ*. Ta cytochemiczna metoda polega na hybrydyzacji specyficznych sekwencji DNA lub RNA znakowanych radioaktywnie lub fluorescencyjnie, z komplementarnymi odcinkami chromosomów utrwalonych na szkiełku mikroskopowym (25,26).

6. Technika PRINS (*Primed in situ labelling*)

Jest to nowoczesna technika molekularna łącząca w sobie elementy polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), powielającej określone odcinki DNA oraz hybrydyzację *in situ*.

7. Technika fluorescencyjna (FISH)

Technika ta może być wykorzystana u zwierząt gospodarskich w identyfikacji zarówno niewielkich mutacji strukturalnych, polimorfizmu regionów chromosomowych, konserwatywności genetycznej, mapowaniu genów, jak i w identyfikacji poszczególnych chromosomów autosomalnych oraz heterosomów X i Y zarówno w komórkach somatycznych, jak i rozrodczych (27). W 1996 r. Speicher i in. (28) opracowali metodę równoczesnego barwienia (malowania) wszystkich chromosomów w analizowanej komórce (*multi-colour M-FISH*), która znajduje coraz szersze zastosowanie w diagnostyce klinicznej.

Praca częściowo finansowana ze środków KBN – projekt badawczy nr PBZ-KBN 036/PO6/2000/16.

Literatura

1. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W., (1980), *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314-331.
2. Beckmann J. S., Soller M., (1987), *Bio/Technology* 5, 573-576.
3. Mullis K. B., Faloona F. A., (1987), *Methods Enzymol.*, 155, 335-350.
4. Rotshild M., Larson G., Jacobson C., Pearson P., (1991), *Anim. Genet.*, 22, 444.
5. Rotshild M., Jacobson C., Vaske D., Tuggle C., Wang L., Short T., Eckhardt G., Sasaki S., Vincent A., McLaren D., Shoutwood O., Steen H., Mileham A., Piastow G., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 201-205.
6. Kurył J., (1998), *Prace i materiały zootechniczne, Zesz. Spec.* 8, 9-18.
7. Fuji J., Otsu K., Zorzato F., DeLeon S., Khanna V. K., Weiler J. E., O'Brien P. J., Mac Lennan D. H., (1991), *Science*, 253, 448-451.
8. Kamiński S., Czarnik U., (1997), *J. Appl. Genet.*, 38(1), 51-55.
9. Grzybowski G., Lubieniecki K., Żurkowski M., Kurył J., (1995), *Przegl. Hod.*, 5, 10-14.
10. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985), *Nature*, 314, 67-73.
11. Charon K., (1997), *Prz. Hod., Zesz. Nauk.* 33, 65-93.
12. Hamada H., Kakunaga T., (1982), *Nature*, 302, 396-398.
13. Tautz D., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 16, 76463-76471.
14. Beckmann J. S., Weber J. L., (1992), *Genom*, 12, 627-631.
15. Martin J. P., Checa M. L., Canon J., Vega J. L., Dunner S., (1996), 25th International Conference on Animal Genetics, 21-25 July, Tours, France, 5.
16. Holm L-E., Bendixen C., (1996), *Anim. Genet.*, 27 (2), 17-42.
17. Ashwell M., Rexroad C. Jr, Miller R., VanRaden P. M., (1996), *Anim. Genet.*, 27 (2), 101-119.
18. Lipkin E., Mosing M. O., Darvasi A., Ezra E., Shalom A., Friedmann A., Soller M., (1998), *Genet.*, 149, 1557-1567.
19. Mosig M. O., Lipkin E., Khutoreskaya G., Tchourzyna E., Soller M., Friedman A., (2001), *Genet.*, 157, 1683-1698.
20. Rejduch B., Słota E., Świtoński M., (1994), *Genet. Pol.*, 35, 4, 323-332.
21. Danielak-Czech B., Świtoński M., Słota E., (1997), *J. Anim. Breed. Genet.*, 144, 69-78.
22. Sysa P. S., Sławomirski J. W., Słota E., (1989), Instrukcja nr 1/89, Min. Rol. Leśn. Gosp. Żywn., Dep. Wet. z 29.05.1989.
23. Świtoński M., Stranzinger G., (1998), *J. Hered.*, 89, 473-480.
24. Słota E., Świtoński M., (1992), *Genet. Pol.*, 33, 3, 227-231.
25. Chowdary B. P., (1991), *SLU (Dissertation)*, Uppsala, 11-63.

26. Pinkel D., Gray J. W., Trask B., van den Engh G., Fuscoe J., van Dekken H., (1986), in: *Proceedings of Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1, 151-157.
27. Mohaddes S. M., Boyd E., Morris A., Morrison N., Connor J. M., (1996), *Molec. Cell. Probes*, 10, 147-154.
28. Speicher M. R., Gwyn Ballard S., Ward D. C., (1996), *Nature Genet.*, 12 (4), 368-375.
29. Fodor S. P., Rava R. P., Huang X. C., Pease A. C., Holmes C. P., Adams C. L., (1993), *Nature*, 363, 555-556.