

Acta fytotechnica et zootechnica 2
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 29 – 34

IRAP MARKERY TRIM RETROTRANSPOZÓNU SLIVKY DOMÁCEJ IRAP MARKERS OF PLUM TRIM RETROTRANSPOSON

Slavomíra SENKOVÁ, Milan BEŽO, Mária LABAJOVÁ

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The efficiency comparison of two IRAP markers of plum (*Prunus domestica* L.) genome was realized on nine plum genotypes. Primer IRAP1 was derived from LTR's (Long Terminal Repeat) 3' end of plum retrotransposon *Cassandra* and primer IRAP2 was designed based on LTR's 5' end of the same retrotransposon. Orientation and length of primers were designed as the same. PCR products were amplified in optimized conditions. By the study of electrophoregrams it have been revealed that IRAP1 primer provided 4 polymorphic levels from 10 total levels and IRAP2 primer created 10 polymorphic levels from 18 total levels. In the case of IRAP2 primer there were registered unique bands, too. Percentage content of polymorphic fragments constitutes 23% for IRAP1 and 41% for IRAP2 primer. Four plum genotypes collected from Slovak locations of their natural occurrence (Pečovská N. Ves, Torysa, Podolíneec and Lipany) were evaluated based on genetic similarity Nei, Li coefficients as the most similar by both primers.

Keywords: IRAP markers, *Cassandra* retrotransposon, plum (*Prunus domestica* L.), genotypes

Slivka domáca (*P. domestica* L.) je hexaploid (6n) so 48 chromozómami, vznikla pravdepodobne autopolyploidizáciou slivky čerešňoplodej (*P. cerasifera* Ehrh.), ktorá sa prirodzene vyskytuje v diploidnom stave so 16 chromozómami. Slivka čerešňoplodá (*P. cerasifera* Ehrh.) sa vyskytuje na Balkáne, Kaukaze a v juhozápadnej Ázii vo viacerých formách diploidnej, tetraploidnej aj hexaploidnej, pričom hexaploid slivky čerešňoplodej (*P. cerasifera* Ehrh.) sa nápadne podobá na slivku domácu (*P. domestica* L.) (Zohary, 1992; Pandey, 2008).

V databáze EURISCO, ktorá združuje 20 štátov sveta sa nachádza 4995 záznamov o genotypoch slivky domácej (*P. domestica* L.) (EURISCO, 2012). Orientáciu v širokej škále genetickej diverzity druhu slivka domáca (*P. domestica* L.) uľahčujú molekulárne markery. Pre identifikáciu genetickej variability, podobnosti alebo nepodobnosti, pre určenie duplikátov v kolekcii genotypov sú využívané RAPD markery, SSR markery, AFLP markery (Hend, 2009; Ayanoglu, 2007; Mnejja, 2004).

Hend et al. (2009) hľadali rozdiely medzi pôvodnými, miestnymi genotypmi slivky domácej (*P. domestica* L.) a introdukovanými genotypmi v Tunise. RAPD markery, morfológické a pomologické markery preukázali značnú genetickú diverzitu medzi genotypmi. Na 27 genotypoch aplikovali 143 RAPD markerov, vďaka ktorým získali z celkového počtu prúžkov 97,28 % polymorfných prúžkov. Na základe výsledkov genetickej analýzy boli určené duplikáty v kolekcii genetických zdrojov a odhalená biodiverzita bude použitá pre zefektívnenie šľachtenia nových odrôd.

Ayanoglu et al. (2007) pomocou AFLP markerov skúmali genetickú diverzitu pôvodných genotypov slivky čerešňoplodej (*Prunus cerasifera* Ehrh.) voľne rastúcich v Turecku, v oblasti Antalya. Druh slivka čerešňoplodá (*P. cerasifera* Ehrh.) má hlavný hospodársky význam v tvorbe podpníkov pre slivku domácu (*P. domestica* L.). Doteraz nezmapované populácie voľne rastúcich genotypov slivky čerešňoplodej (*P. cerasifera* Ehrh.) boli pomocou AFLP markerov definované a porovnané s komerčne používanými genotypmi slivky čerešňoplodej (*P. cerasifera* Ehrh.) v Turecku. Vďaka AFLP získali 580 jednoznačných prúžkov. Použili šesť vybraných prajmerových kombinácií na dvadsiatich genotypoch. Všetky genotypy bolo možné jasne odlíšiť pomo-

cou špecifických profilov. Hodnoty genetickej podobnosti vypočítané pomocou Jaccardovho koeficientu podobnosti boli pomerne nízke od 0,829 do 0,985.

Molekulové markery odvodené od retrotranspozónov sa dostávajú do popredia vďaka svojim vlastnostiam. Retrotranspozóny sú zastúpené vo veľkom počte kópií, lokalizované na rôznych miestach chromozómu, s možnosťou sledovania polymorfizmu v rámci druhu aj medzi druhmi, čo ich predurčuje ako vhodný nástroj pre analýzu fylogenetických vzťahov, genetickej rozmanitosti, väzby génov, mapovania a analýzy génov (Kalendar et al. 1999, 2006, Hrubíková et al. 2006a, 2006b, Zein et al., 2010, Žiarovská et al. 2012). Podľa štatistiky vyhľadávania v databáze Web of Science najčastejšie využívané metódy odvodené od retrotranspozónov sú metódy IRAP a REMAP. Metóda IRAP zodpovedá dĺžkovému DNA polymorfizmu medzi retrotranspozónmi a metóda REMAP zodpovedá dĺžkovému DNA polymorfizmu medzi retrotranspozónom a mikrosatelitom.

Žiarovská et al. (2009) použili pre zhodnotenie 36 genotypovej kolekcie ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) dva IRAP molekulové markery a jeden REMAP molekulový marker. IRAP prajmery boli odvodené od sekvencií na 2 rozličných retrotranspozónoch, Tst1 a *Cassandra*. Tst1 (5060 bp) je autonómny copia-like element, ktorý bol pôvodne definovaný na ľuľku zemiakovom a *Cassandra* (615 bp) je neautonómny TRIM element, definovaný pôvodne na slivke domácej. REMAP prajmery boli navrhnuté kombináciou IRAP prajmera odvodeného od sekvencie na retrotranspozóne *Cassandra* a ISSR prajmera. Ukazovateľ „Percentuálny podiel polymorfných fragmentov“ (PPPF) bol najvyšší pri REMAP markeri (86,4 %), zatiaľ čo PPF IRAP markera odvodeného od sekvencie Tst1 retrotranspozónu dosiahol hodnotu 76,9 % a PPF IRAP markera odvodeného od sekvencie *Cassandra* retrotranspozónu dosiahol hodnotu 68,7 %. Vyhodnotením IRAP a REMAP markerov pomocou vetvových členení získaných metódou EDAC (Euclidian Distance Averages of Clusters) sa zistilo, že IRAP markery poukazujú na širšie genetické pozadie a vzťah krajových odrôd s vyššou diverzitou línií a REMAP marker v rámci vetvového členenia vytvoril zhluk, v ktorom sa odrážajú rodokmeňové informácie hodnotených genotypov ľanu.

Využitie IRAP a REMAP markerov pre hodnotenie genetických vzťahov medzi 12 odrodami jablone domácej (*Malus domestica* Borkh.) a ich siedmimi klonmi skúmal kolektív Antonius-Klemola et al. (2006). Súhrnnou analýzou 9 IRAP markerov a súhrnnou analýzou 3 REMAP markerov získali dvanásť unikátnych, reprodukovateľných profilov pre všetky skúmané odrody. Napriek predpokladanému vysokému počtu kópií TRIM elementov v genóme jablone domácej, sledované IRAP a REMAP markery neposkytli polymorfne profily pre sedem mutačne odvodených klonov od daných odrôd, ale vyhodnotili ich ako identické s ich pôvodnými odrodami. V analýzach získali celkový počet jasne detekovateľných prúžkov na jeden IRAP prajmer od 6 do 15 prúžkov a z hodnotenia REMAP vyplýva celkový počet jasne detekovateľných prúžkov na jeden prajmerový pár v rozmedzí od 7 do 25 prúžkov. Počet polymorfnych prúžkov získaných IRAP prajmermi v rozmedzí od 2 do 10 prúžkov a počet polymorfnych prúžkov získaných REMAP prajmerovými párami v rozmedzí od 8 do 15 prúžkov.

Cieľom tejto štúdie bolo porovnať rozlišovacia schopnosť dvoch IRAP markerov odvodených od toho istého TRIM elementu.

Materiál a metódy

Biologický materiál

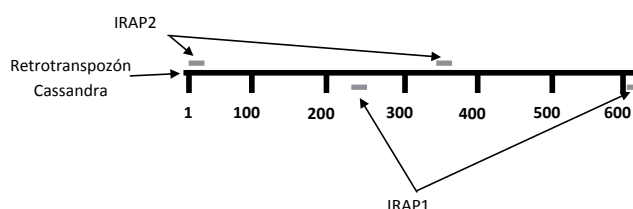
V analýzach bolo použitých 9 genotypov slivky domácej (*Prunus domestica* L.). Genotypy je možné v rámci charakteristiky rozdeliť do dvoch skupín. Prvá skupinu tvorí päť komerčne využívaných európskych odrôd pôvodom z Českej republiky, Bulharska, Maďarska a bývalej Juhoslávie. Vzorky, pre izoláciu DNA, boli získané vo forme zelených listov z technického izolátu pracoviska: Výzkumný a šlechtiteľský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Česká republika. Štyri genotypy patriace do druhej skupiny patria k botanickému druhu slivka domáca (*Prunus domestica* L.), ale bližšie špecifikované neboli. Tieto vzorky boli odobrané na štyroch lokalitách ich prirodzeného výskytu, Pečovská N. Ves (345 m n. m), Lipany (390 m n. m), Torysa (425

m n. m), Podolíneček (572 m n. m). Charakteristika použitých genotypov je uvedená v tabuľke 1.

DNA bola izolovaná zo zelených pletív listov, pomocou izolačnej súpravy Invisorb Spin Plant Mini Kit od výrobcu INVITEK podľa manuálu výrobcu.

Návrh prajmerov IRAP

IRAP1 prajmer bol odvodený od 3'konca dlhého koncového opakovania (LTR – long terminal repeat) retrotranspozónu *Cassandra* slivky domácej (*Prunus domestica* L.) s prístupovým číslom v NCBI databáze: AY860314. Marker odvodený rovnakým algoritmom bol použitý pre hodnotenie DNA polymorfizmu ľanu siateho v práci Žiarovská et al. (2009). Orientácia tohto 28 nukleotidového prajmera je totožná so sekvenciou 5' – 3' retrotranspozónu. IRAP2 prajmer je odvodený od 5'konca LTR retrotranspozónu *Cassandra* slivky domácej. IRAP2 obsahuje tiež 28 nukleotidov a je identický so sekvenciou 5' – 3' retrotranspozónu. Z vlastností retrotranspozónov vyplýva, že aj TRIM element *Cassandra* obsahuje 5' aj 3' LTR, preto v PCR každý z prajmerov prilne 2x na templát DNA. Grafické zobrazenie miest prilnutia IRAP prajmerov je znázornené na obrázku 1. Charakteristika prajmerov je uvedená v tabuľke 2.



Obrázok 1 Grafické zobrazenie miest prilnutia IRAP prajmerov
Figure 1 Graphical view of IRAP primer's annealing sites

Podmienky PCR

PCR produkty boli amplifikované v podmienkach, ktoré boli osobitne optimalizované pre každý prajmer. Reakcie prebehli

Tabuľka 1 Charakteristika použitých genotypov slivky domácej (*Prunus domestica* L.)

| Genotyp (1) | Typ (2) | Pôvod (3) | Rodokmeň (4) |
|-----------------------|-------------|--|-----------------------------|
| Gabrovská | odroda (5) | Bulharsko (11) | Kjustendilska × Montfortska |
| Chrudimská | odroda (5) | Česká republika (12) | náhodný semenáč (19) |
| Švestka domáci | odroda (5) | Česká republika (12) | náhodný semenáč (19) |
| Čačanská lepotice | odroda (5) | bývalá Juhoslávia (13) | Wahgheimova × Požegača |
| Anna späťch | odroda (5) | Maďarsko (14) | náhodný semenáč (19) |
| Slivka domáca PNV (7) | neznámy (6) | Slovenská republika – Pečovská N. Ves (15) | neznámy (6) |
| Slivka domáca T (8) | neznámy (6) | Slovenská republika – Torysa (16) | neznámy (6) |
| Slivka domáca P (9) | neznámy (6) | Slovenská republika – Podolíneček (17) | neznámy (6) |
| Slivka domáca L (10) | neznámy (6) | Slovenská republika – Lipany (18) | neznámy (6) |

Table 1 The characteristics of tested plum (*Prunus domestica* L.) genotypes

(1) genotype, (2) type, (3) geographical origin, (4) pedigree, (5) cultivar, (6) unknown, (7) plum PNV, (8) plum T, (9) plum P, (10) plum L, (11) Bulgaria, (12) the Czech Republic, (13) Former Yugoslavia, (14) Hungary, (15) Slovakia – Pečovská N. Ves, (16) Slovakia – Torysa, (17) Slovakia – Podolíneček, (18) Slovakia – Lipany

Tabuľka 2 Charakteristika použitých IRAP prajmerov

| Názov prajmera (1) | Sekvencia prajmera (2) | Teplota topenia (3) | Teplota prilnutia (4) | Dĺžka prajmera (5) |
|--------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| IRAP1 | ACGGCGGAGCCGATCCCGGGATGTGACA | 68,7 °C | 54 °C | 28 nt |
| IRAP2 | tctccgttggtcgatgtggatgttaca | 61,4 °C | 61 °C | 28 nt |

Table 2 Used IRAP primers characteristics

(1) primer name, (2) primer sequence, (3) melting temperature, (4) annealing temperature, (5) primer length

v roztokoch BIOTAQ™ PCR Kit od výrobcu BIOLINE. Reakčný buffer 10× NH₄ je charakterizovaný ako 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 0,1% stabilizátor. 10mM dNTP pozostávala z 2,5 mM každého zo štyroch dNTP vo forme solí lítia (pH 7,5). Zásobný roztok MgCl₂ je k dispozícii v koncentrácii 50 mM. BIOTAQ polymeráza je vysoko prečistená termostabilná polymeráza s 5' – 3' exonukleázovou aktivitou, ktorá je vhodná pre široké spektrum PCR.

Celkový objem reakcie pre prajmer IRAP1 aj IRAP2 bol 15 µl, koncentrácie jednotlivých súčastí PCR sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3 Koncentrácie jednotlivých súčastí PCR

| IRAP prajmer (1) Zložky PCR (2) | IRAP1 | IRAP2 |
|------------------------------------|-------|-------|
| dNTP v mM | 0,3 | 0,3 |
| MgCl ₂ v mM | 3 | 3,3 |
| Prajmer v mM (3) | 0,75 | 0,4 |
| DNA templát v ng/reakcia (4) | 20 | 20 |
| Buffer | 10× | 10× |
| BIOTAQ polymeráza v U (5) | 1 | 1 |

Table 3 PCR reagents concentration
(1) IRAP primer, (2) PCR reagents, (3) primer in mM, (4) DNA template in ng per reaction, (5) BIOTAQ polymerase in U

Podmienky nastavenia termocykléra pri PCR reakciách

Časovo-teplotný režim nastavenia termocykléra pre amplifikáciu PCR produktu pomocou prajmera IRAP1 bol nasledovný: úvodná denaturácia trvala 1 minútu pri 95 °C, 32× sa cyklicky opakovali kroky: denaturácia 1 minútu pri 95 °C, nasadenie prajmera 1 minútu pri 54 °C a syntéza DNA 3 minúty pri 72 °C. Finálna syntéza DNA zabezpečujúca dokončenie syntézy DNA fragmentov a trvala 10 minút pri 72 °C. Po ukončení PCR boli vzorky schladené na 4 °C.

Podmienky amplifikácie PCR produktu prajmerom IRAP2 boli zabezpečené nasledovne: úvodná denaturácia trvala 3 minúty pri 95 °C. Cyklus denaturácie, príľnutia prajmera a syn-

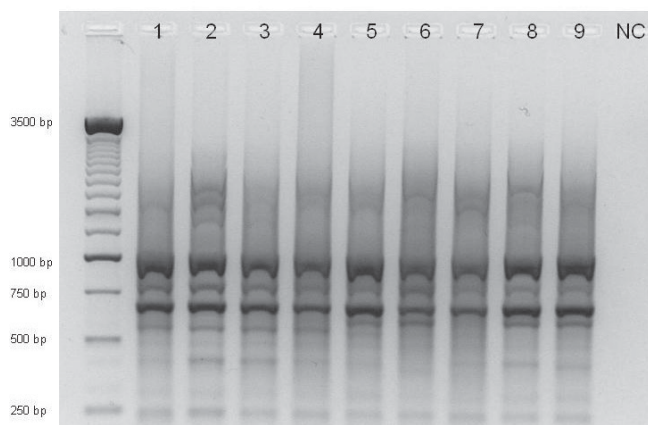
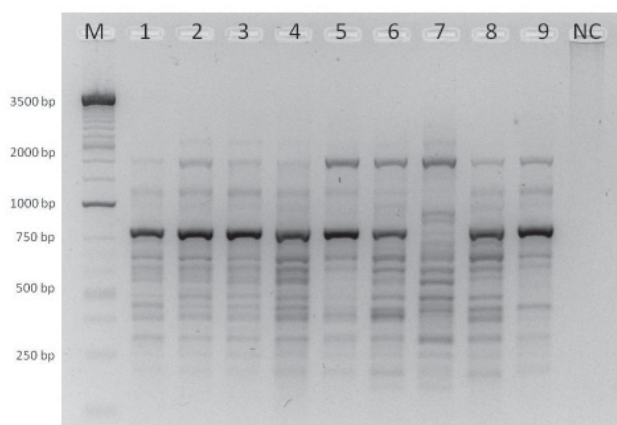
tézy DNA sa opakoval 32× v krokoch: 40 sekúnd denaturácia pri 95 °C, 40 sekúnd príľnutie prajmera pri 61 °C a syntéza DNA trvala 2 minúty pri 72 °C. Finálna syntéza DNA 5 minút pri 72 °C. Po ukončení PCR boli vzorky schladené na 4 °C.

Elektroforetická separácia PCR produktu a analýza dát

Separácia PCR produktov bola realizovaná elektroforeticky v 1,7% agarózovom géle (Applichem) a v 1× TBE roztoku. Vzorky boli farbené interkalačnou farbivkou Gel Red 10 000× (Biotium). Elektroforéza trvala 4 hodiny pri variabilnom prúde a konštantnom napätí 60 V. Elektroforeogramy boli získané pomocou fotodokumentačného systému KODAK EDAS 290. Veľkosť jednotlivých fragmentov bola hodnotená oproti molekulárnemu markeru 250 bp DNA Ladder (Invitrogen). Hodnotenie elektroforeogramov bolo realizované vizuálne v prostredí MS Excel. Fragmety DNA sme stanovili ako prítomné (1) alebo neprítomné (0) a výsledky sme previedli do binárnej matice. Indexy podobnosti boli vypracované podľa metódy Nei a Li (1979) ako $SI_{NL} = 2 \times \text{počet spoločných prúžkov v dráhach A a B} / (\text{počet prúžkov v dráhe A} + \text{počet prúžkov v dráhe B})$.

Výsledky a diskusia

Oba testované IRAP markery boli odvodené z toho istého TRIM elementu *Cassandra*, ktorého sekvencia sa pokladá za charakteristickú pre druh slivka domáca (*Prunus domestica* L.). Už v rámci porovnávanej kolekcie deviatich genotypov slivky domácej sme zaznamenali výrazný rozdiel v efektívnosti a využiteľnosti týchto markerov, aj napriek tomu, že prajmery IRAP1 a IRAP2 (elektroforeogram uvedený na obrázku 2) boli navrhnuté na základe toho istého LTR úseku a mali rovnakú orientáciu, aj dĺžku. K rovnakému zisteniu dospeli aj pracovníci kolektívu Antonius-Klemola et al. (2006), kedy porovnávali 4 IRAP markery odvodené od toho istého LTR úseku TRIM elementu *Cassandra*. Svoje porovnávania vypracovali na druhu jablň domáca (*Malus domestica* L.) a pre návrh prajmera im slúžila sekvencia retrotranspozónu *Cassandra* typická pre druh



Obrázok 2A a 2B Elektroforeogram PCR produktov získaných amplifikáciou pomocou prajmera IRAP1 (2A) a IRAP2 (2B)

Popis elektroforeogramu: M... molekulový marker (250 bp DNA Ladder, Invitrogen), 1 ... slivka domáca PNV (lokalikta odberu vzorky: Pečovská Nová Ves), 2... slivka domáca T (lokalita odberu vzorky: Torysa), 3... slivka domáca P (lokalikta odberu vzorky: Podolíneček), 4... slivka domáca L (lokalikta odberu vzorky: Lipany), 5... odroda Gabrovská, 6... odroda Chrudimská, 7... odroda Švestka domáci, 8... odroda Čačanská lepotice, 9... odroda Anna späť.

Figure 2A and 2B Electrophoreogram of PCR products gained by IRAP1 (2A) and IRAP2 (2B) primers amplification

Electrophoreogram description: M... molecular marker (250 bp DNA Ladder, Invitrogen), 1 ... plum PNV (location of sample collection: Pečovská Nová Ves), 2... plum T (location of sample collection: Torysa), 3... plum P (location of sample collection: Podolíneček), 4... plum L (location of sample collection: Lipany), 5... cultivar Gabrovská, 6... cultivar Chrudimská, 7... cultivar Švestka domáci, 8... cultivar Čačanská lepotice, 9... cultivar Anna späť

Tabuľka 4 Hodnotenie elektroforeogramov získaných separáciou PCR produktov IRAP1 a IRAP2 prajmerov, z hľadiska vytvorených úrovní

| Prajmer (1) | Celkový počet úrovní (2) | Počet polymorfných úrovní (3) | Počet úrovní s unikátnym fragmentom (4) | Počet úrovní s unikátnym absentujúcim fragmentom (5) |
|-------------|--------------------------|-------------------------------|---|--|
| IRAP1 | 10 | 4 | 0 | 0 |
| IRAP2 | 18 | 10 | 2 | 2 |

Table 4 Evaluation of electrophoreograms gained by IRAP1 and IRAP2 PCR products separation by created levels (1) primer, (2) total number of levels, (3) number of polymorphic levels, (4) number of levels with unique present band, (5) number of levels with unique absent band

Tabuľka 5 Hodnotenie elektroforeogramov získaných prajmermi IRAP1 a IRAP2, z hľadiska štruktúry vytvorených fragmentov

| Prajmer (1) | Celkový počet fragmentov (2) | Celkový počet polymorfných fragmentov (3) | Celkový počet monomorfných fragmentov (4) | Percentuálny podiel polymorfných fragmentov (5) |
|-------------|------------------------------|---|---|---|
| IRAP1 | 70 | 16 | 54 | 23 % |
| IRAP2 | 122 | 50 | 72 | 41% |

Tabuľka 5 Evaluation of electrophoreograms gained by IRAP1 and IRAP2 PCR products separation by created fragments (1) primer, (2) total number of bands, (3) number of polymorphic bands, (4) number of monomorphic bands, (5) percentage of polymorphic bands

jablň domáca. Prajmeri K004, K005, K008 a K009 mali rovnakú orientáciu a pochádzali z toho istého LTR úseku, líšili sa len v dĺžke prajmera, od 21 do 26 nukleotidov. Porovnaním elektroforeogramov autori zistili, že prajmer K004 dal vzniknúť celkovo šiestim úrovniam, K005 ôsmim úrovniam, K008 trinástim a K009 pätnástim úrovniam. Taktiež boli rozdiely aj pri počte zaznamenaných polymorfných úrovní, kde K004 dalo vznik len dvom polymorfným úrovniam, K005 piatim, K008 ôsmim a K009 desiatim polymorfným úrovniam. IRAP1 a IRAP2 dali vznik celkovo desiatim (IRAP1) a osemnástim úrovniam (IRAP2). Pri počte polymorfných úrovní dosiahol prajmer IRAP2 hodnotu totožnú s prajmerom K009, čiže 10 polymorfných úrovní a prajmer IRAP1 dal vznik štyrom polymorfným úrovniam, ako to vyplýva aj z tabuľky 4. Prajmer IRAP2 je tiež zaujímavý kvôli tvorbe dvoch úplne jedinečných fragmentov. Tento jav sa pri prajmeri IRAP1 nevyskytol.

Prajmer IRAP1, bol pod názvom P-Frodo2-02, použitý aj pri hodnotení kolekcie ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) v štúdiu o využiteľnosti, resp. možnostiach prenosu retrotranspozónových prajmerov medzi druhmi (Žiarovská et al., 2009). V prípade hodnotenia 36 genotypov ľanu siateho prajmer P-Frodo2-02 (IRAP1) umožnil vznik celkovo šestnástich úrovní a jedenást polymorfných úrovní. Percento polymorfných fragmentov bolo v tejto práci vyhodnotených 68,7 %, čo bolo tiež vyššie ako pri 9 genotypoch slivky domácej (23 %) (tabuľka 5). Tak výrazný rozdiel v hodnotení toho istého prajmera bol spôsobený aj veľkosťou kolekcie, ktorá nie je zrovnateľná. Autori porovnali aj efektívnosť IRAP prajmera P-Frodo2-02 s IRAP prajmerom P-Tst1-01, ktorý bol navrhnutý na základe sekvencie autonómneho retrotranspozónu Tst1. Prajmer P-Tst1-01 dal vznik 76,9 % polymorfných fragmentov.

Ďalšie hodnotenie prajmerov bolo realizované na základe hodnotenia vlastnej genetickej príbuznosti jednotlivých genotypov slivky domácej, pomocou Nei a Li koeficientov genetickej podobnosti. Ako vyplýva z tabuliek 6 a 7 genetická podobnosť medzi skúmanými genotypmi nadobúdala rozdielne hodnoty; pre prajmer IRAP1 0,75 až 1,00 a 0,32 až 0,643 pre prajmer IRAP2. Z čoho vyplýva, že prajmer IRAP1 celý súbor genotypov vyhodnotil ako vzájomne geneticky podobnejší v porovnaní s prajmerom IRAP2.

Vzorky druhého súboru sledovaných genotypov slivky domácej boli síce odobrané v geograficky rozdielnych lokalitách, ale aj napriek tomu Nei a Li koeficienty pri oboch prajmeroch potvrdili najvyššiu genetickú príbuznosť v rámci tejto skupiny genotypov. Genotypy G1-G4 (vzorky slivky domácej z rozličných lokalít, porovnaj s tabuľkou 6) dosahovali koefi-

cienty 0,941 až 1,00 pre hodnotenie s prajmerom IRAP1, čiže ako úplne identické boli označené genotypy G1 – G4 a G2 – G3, veľmi malý rozdiel bol zaznamenaný medzi genotypmi slivky broskyňovej G1 – G2, G3 a G4 – G2, G3. V rámci hodnotenia Nei, Li koeficientov pre prajmer IRAP1 je možné ako dva úplne identické genotypy tiež označiť odrody čačanská lepotica (G8) a Anna späťch (G9). Najvyššie hodnoty Nei, Li koeficientov pri analýze prajmera IRAP2 tiež dosahovali vzorky slivky domácej z rôznych geografických území, ale na rozdiel od Nei, Li koeficientov prajmera IRAP1 nebol v rámci skupiny G1 – G4 zaznamenaný žiadny rozdiel (tabuľka 7). Ako najmenej geneticky podobné genotypy v rámci hodnotenia prajmera IRAP1 boli označené genotypy G5 (odroda Gabrovská) – G2, G3 (slivka domáca) a G6 (odroda Chrudimská) – G2, G3 (slivka domáca). Analýza genetickej podobnosti prajmera IRAP2 označila ako geneticky najmenej podobné genotypy G7 (švestka domáci) – G5 (Gabrovská) a G9 (Anna späťch) – G7 (švestka domáci).

Tabuľka 6 Nei a Li koeficienty genetickej príbuznosti získané na základe hodnotenia IRAP1 markera

| | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G1 | 1,000 | 0,941 | 0,941 | 1,000 | 0,800 | 0,800 | 0,857 | 0,875 | 0,875 |
| G2 | | 1,000 | 1,000 | 0,941 | 0,750 | 0,750 | 0,800 | 0,824 | 0,824 |
| G3 | | | 1,000 | 0,941 | 0,750 | 0,750 | 0,800 | 0,824 | 0,824 |
| G4 | | | | 1,000 | 0,800 | 0,800 | 0,857 | 0,875 | 0,875 |
| G5 | | | | | 1,000 | 1,000 | 0,923 | 0,933 | 0,933 |
| G6 | | | | | | 1,000 | 0,923 | 0,933 | 0,933 |
| G7 | | | | | | | 1,000 | 0,857 | 0,857 |
| G8 | | | | | | | | 1,000 | 1,000 |
| G9 | | | | | | | | | 1,000 |

G1 ... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Pečovská Nová Ves), G2... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Torysa), G3... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Podolíneec), G4... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Lipany), G5... odroda Gabrovská, G6... odroda Chrudimská, G7... odroda Švestka domáci, G8... odroda Čačanská lepotice, G9... odroda Anna späťch

Table 6 Nei and Li coefficients of genetic similarity obtained based on IRAP1 marker evaluation

G1 ... plum PNV (location of sample collection: Pečovská Nová Ves), G2... plum T (location of sample collection: Torysa), G3... plum P (location of sample collection: Podolíneec), G4... plum L (location of sample collection: Lipany), G5... cultivar Gabrovská, G6... cultivar Chrudimská, G7... cultivar Švestka domáci, G8... cultivar Čačanská lepotice, G9... cultivar Anna späťch

Tabuľka 7 Nei a Li koeficienty genetickej príbuznosti získané na základe hodnotenia IRAP2 prajmera

| | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G1 | 1,000 | 0,643 | 0,643 | 0,643 | 0,480 | 0,600 | 0,429 | 0,571 | 0,560 |
| G2 | | 1,000 | 0,643 | 0,643 | 0,480 | 0,600 | 0,429 | 0,571 | 0,560 |
| G3 | | | 1,000 | 0,643 | 0,480 | 0,600 | 0,429 | 0,571 | 0,560 |
| G4 | | | | 1,000 | 0,480 | 0,600 | 0,429 | 0,571 | 0,560 |
| G5 | | | | | 1,000 | 0,444 | 0,320 | 0,480 | 0,545 |
| G6 | | | | | | 1,000 | 0,467 | 0,600 | 0,519 |
| G7 | | | | | | | 1,000 | 0,429 | 0,320 |
| G8 | | | | | | | | 1,000 | 0,560 |
| G9 | | | | | | | | | 1,000 |

G1 ... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Pečovská Nová Ves), G2... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Torysa), G3... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Podolíneč), G4... slivka domáca (lokalita odberu vzorky: Lipany), G5... odroda Gabrovská, G6... odroda Chrudimská, G7... odroda Švestka domáci, G8... odroda Čačanská lepotice, G9... odroda Anna späč

Table 7 Nei and Li coefficients of genetic similarity obtained based on IRAP2 marker evaluation

G1 ... plum PNV (location of sample collection: Pečovská Nová Ves), G2... plum T (location of sample collection: Torysa), G3... plum P (location of sample collection: Podolíneč), G4... plum L (location of sample collection: Lipany), G5... cultivar Gabrovská, G6... cultivar Chrudimská, G7... cultivar Švestka domáci, G8... cultivar Čačanská lepotice, G9... cultivar Anna späč

Záver

IRAP prajmery odvodené od retrotranspozónu *Cassandra* slivky domácej (*P. domestica* L.) sú vhodné pre hodnotenie genetickej diverzity medzi genotypmi slivky domácej. O možnostiach analýzy genetickej diverzity, ako aj o jej efektívnosti rozhoduje kvalitatívny charakter prajmera.

Porovnávané IRAP prajmery, IRAP1 a IRAP2, síce boli navrhnuté podobným spôsobom, ale ich využitie a možnosti vzájomného porovnania genotypov slivky domácej sa odlišovali.

Na základe porovnania počtu vytvorených polymorfných úrovní môžeme zhrnúť, že prajmer IRAP1 (4 polymorfné úrovně) nedosahuje také možnosti hodnotenia polymorfizmu ako prajmer IRAP2 (10 polymorfných úrovní). Tiež percentuálny podiel polymorfných fragmentov získaných prajmerom IRAP2 bol takmer dvojnásobne vyšší ako tento podiel získaný prajmerom IRAP1.

Aj pri Nei, Li koeficientoch genetickej príbuznosti sme zaznamenali výrazný rozdiel vyhodnotenia kolekcie deviatich genotypov slivky domácej. Nei, Li koeficienty získané z matice prajmera IRAP1 mali vyššie hodnoty ako koeficienty získané z matice prajmera IRAP2. Toto poukazuje na vyššiu genetickú podobnosť medzi tými istými genotypmi pri hodnotení prajmerom IRAP1, ako pri hodnotení prajmerom IRAP2. Vzorky slivky domácej, odobrané zo 4 pôvodných lokalít Slovenska, boli vyhodnotené ako geneticky najpodobnejšie. Takýto výsledok sme získali porovnaním Nei, Li koeficientov genetickej podobnosti v prípade oboch prajmerov.

Súhrn

Porovnanie efektivity dvoch IRAP markerov genómu slivky domácej (*Prunus domestica* L.) bolo realizované na deviatich genotypoch slivky domácej. Prajmer IRAP1 bol odvodený od 3' konca dlhého koncového opakovania (LTR – long terminal

repeat) retrotranspozónu *Cassandra* slivky domácej (*Prunus domestica* L.) a prajmer IRAP2 bol navrhnutý na základe 5' konca LTR, toho istého retrotranspozónu. Orientácia aj dĺžka oboch prajmerov boli navrhnuté ako rovnaké. PCR produkty boli amplifikované v optimalizovaných podmienkach. Zo štúdia elektroforeogramov vyplynulo, že IRAP1 poskytuje celkovo 10 úrovní, z toho štyri úrovně sú polymorfné a IRAP2 dáva vznik spolu osemnástim úrovniam, z ktorých až 10 úrovní je polymorfných. Pri prajmeri IRAP2 boli zaregistrované aj unikátne fragmenty. Percentuálny podiel polymorfných fragmentov pri prajmeri predstavoval 23% (IRAP1) a 41% (IRAP2). Štyri genotypy slivky domácej získané zo slovenských lokalít ich prirodzeného výskytu (Pečovská N. Ves, Torysa, Podolíneč a Lipany) boli vyhodnotené pomocou Nei, Li koeficientov genetickej podobnosti ako najpodobnejšie, pomocou oboch prajmerov.

Kľúčové slová: IRAP markery, retrotranspozón *Cassandra*, slivka domáca (*Prunus domestica* L.), genotypy

Literatúra

- ANTONIUS-KLEMOLA, K. – KALENDAR, R. – SCHULMAN, A. H. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 112, 2006, p. 999 – 1008.
- AYANOGLU, H. – BAYAZIT, S. – INAN, G. – BAKIR, M. – AKPINAR, A. E. – KAZAN, K. – ERGUL, A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region. In: Scientia Horticulturae, vol. 114, 2007, p. 263 – 267.
- HEND, B.T. – GHADA, B. – SANA, B. M. – MOHAMED, M. – MOKHTAR, T. – AMEL, S. H. 2009. Genetic relatedness among Tunisian plum cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis and evaluation of phenotypic characters. In: Scientia Horticulturae, vol. 121, 2009, p. 440 – 446.
- HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – CANDRÁKOVÁ, A. 2006a. Retrotranspozóny, ich význam a využitie v mapovaní genómu organizmov. In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 6, 2006, mimoriadne číslo, s. 74 – 77. ISSN 1335-258X.
- HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V. 2006b. Variabilita rozmiestnenia kópií Tst1 retrotranspozónu v hybridnej kombinácii ľulka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.). In: Biotechnology 2006 : sborník Zemědělské fakulty, České Budějovice : Jihočeská univerzita, 2006, s. 1130 – 1132. ISBN 8085645-53-X.
- KALENDAR, R. – SCHULMAN, A. H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. In: Nature Protocols, vol. 1, 2006, no. 5, p. 2478 – 2484.
- KALENDAR, R. – GROB, T. – REGINA, M. – SUONIEMI, A. – SCHULMAN, A. 1998. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 98, 1998, no. 5, p. 704 – 711.
- MNEJJA, M. – GARCIA-MAS, J. – HOWAD, W. – BADENES, M. L. – ARÚS, P. 2004. Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina*, Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. In: Molecular Ecology Notes, vol. 4, 2004, p. 163 – 166.
- NEI, M. – LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 76, 1979, p. 5296 – 5273.
- PANDEY, A. – ROSHINI NAYAR, E. – VENKATESWARAN, K. – BHANDARI, D. C. 2008. Genetic resources of *Prunus* (*Rosaceae*) in India. In: Genetic Resources and Crop Evolution, 2008, no. 55, p. 91 – 104.
- Search results for „Prunus domestica“ In National Inventory Reports [online]. 2012. [cit. 2012-02-13]. Dostupné na internete: <http://eurisco.ecpgr.org/>.
- ZEIN, I. – JAWHAR, M. – ARABI, M. I. E. 2010. Efficiency of IRAP and ITS-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea*. In: Genetics and Molecular Biology, vol. 33, 2010, no. 2, p. 328 – 332.

ZOHARY, D. 1992. Is the European plum, *Prunus domestica* L. a *P. cerasifera* EHRH. × *P. spinosa* L. allo-polyloid? In: Euphytica, vol. 60, 1992, no. 7, p. 75 – 77.

ŽIAROVSKÁ, J. – RAŽNÁ, K. – SENKOVÁ, S. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽO, M. 2012. Variability of *Linum usitatissimum* L. based on molecular markers. In: Journal of Agricultural and Biological Science, vol. 7, 2012, no. 1, pp. 50 – 58.

ŽIAROVSKÁ, J. – BAČOVÁ, N. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. 2009. Hodnotenie kolekcie ľanu siateho (*Linum usitatissimum*, L.) retrotranspozónovými prajmermi pôvodom iných druhov metódou IRAP a REMAP. In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 12, 2009, mimoriadne číslo, s. 701 – 711.

<<http://eurisco.ecpgr.org/>> (13.2.2012)

Kontaktná adresa:

Ing. Slavomíra Senková, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, tel.: 421 37 641 48 11, e-mail: slavomira.senkova@uniag.sk

Acta fytotechnica et zootechnica 2

Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 34 – 37

VPLYV PREDHRIATIA NÁSADOVÝCH VAJEC PRED SKLADOVANÍM NA LIAHNUTIE HYDINY

EFFECT OF PRE-STORAGE INCUBATION OF HATCHING EGGS ON HATCHABILITY OF POULTRY

Cyril HRNČÁR, Jozef BUJKO

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Present study reports the effect of two different pre-storage incubation (PRESI) periods (6 and 12 hours) on hatchability and embryo mortality of chickens. All 450 hatching eggs which were obtained from a parent flock of Oravka were divided into three groups containing 50 eggs each with three replicates. Control group without PRESI was stored 10 days under controlled conditions (temperature 15 °C, relative humidity 70%), group PRESI 6 was being heated at 37.5 °C for 6 hours and stored 10 days at control storage conditions, group PRESI 12 was being heated at 37.5 °C for 12 hours at control storage conditions in period of 10 days. Hatching eggs were incubated in commercial incubator F5005 in standard conditions for chicken hatching. The result was that hatchability was positively affected by pre-storage incubation, with hatchability 81.54, 92.81 and 88.04%. Maximum embryo mortality we recorded in the control group (12.93%), while PRESI 6 had minimum mortality (3.23%). Pre-storage incubation did not affect length of incubation and live weight of one-day chickens. Incubation of hatching eggs for pre-store incubation in 6 hours was effective in comparison with long-term heating in all tested parameters.

Keywords: hatching, chicken, pre-store incubation, hatchability, embryo mortality

Liahnutie je biologický proces, pri ktorom sa v oplodnenom vajci zárodok vyvíja na nového jedinca (Benková, 2008). Pre správny vývoj zárodka je nevyhnutné vytvoriť optimálne podmienky, dané najmä vhodným klimatickým prostredím (teplota, vlhkosť, výmena vzduchu, obracanie vajec a pod.).

Na úspešnosť liahnutia vplyvajú dva hlavné činitele. Prvým činiteľom je biologická hodnota násadových vajec, druhým činiteľom je vlastná technika liahnutia (Veterány, 2001).

Biologická hodnota násadových vajec predstavuje komplex fyzikálnych, chemických a biologických vlastností vajec, ktoré podmieniajú ich optimálnu liahnivosť, dobrú životaschopnosť vyliahnutých mláďat a ich neskoršiu úžitkovosť (Baumgartner a Benková, 2006).

Pre biologickú hodnotu násadových vajec je veľmi dôležitá dĺžka uskladnenia. Najvyššia liahnivosť sa dosahuje pri uskladnení násadových vajec do 7 dní. Pri uskladnení násadových vajec nad 14 dní sa už výrazne znižuje ich liahnivosť. Pri krátkodobom uskladnení môže byť teplota okolo 20 °C (uskladnenie 3 až 4 dni). Pri uskladnení 6 až 7 dní môže byť teplota okolo 16 °C, pri dlhšom uskladnení násadových vajec by mala byť nižšia. Relatívna vlhkosť vzduchu by mala byť v rozmedzí od 55 do 75 % (Hrnčár, 2006).

Pri nízkej relatívnej vlhkosti dochádza k rýchlejšiemu vysychaniu násadových vajec, zahusťuje sa ich obsah a tým sa

znižuje liahnivosť a zvyšuje sa embryonálna mortalita. Naopak, pri vysokej relatívnej vlhkosti vzduchu v uskladňovacích priestoroch sa na škrupine násadových vajec kondenzujú vodné pary, čím vzniká vhodné prostredie pre rozmnožovanie patogénnych mikroorganizmov (Veterány a Weis, 2001).

Skladovanie násadových vajec po dobu dlhšiu než 7 dní je spojené s predĺžovaním dĺžky liahnutia, poklesom liahnivosti a kvality jednoduchých mláďat. Predhriatie násadových vajec pred skladovaním (PRESI) je navrhnuté ako metóda, ktorá môže znížiť negatívne účinky dlhodobého skladovania zmenou vývojovej fázy embrya. Počas predhrievania vajec pred skladovaním sú násadové vajcia inkubované po dobu 6 a 9 hodín, kedy je embryo vystavené teplote 37,5 °C, čo umožňuje embryonálny vývoj zárodokov do štádia, pri ktorom sa predpokladá, že sú odolnejšie voči dlhodobému skladovaniu, než vývojová fáza embrya hneď po znesení vajca (Vitásková et al., 2010).

Po znesení vajca je zárodok vystavený rôznym mikroklimatickým podmienkam, ktoré môžu ovplyvniť životaschopnosť embrya, liahnivosť a kvalitu jednoduchého mláďata. Jedným z najdôležitejších faktorov vplyvajúcich na vývoj zárodka v násadovom vajci je teplota (Mahmud et al., 2011). Reijrink et al. (2008) uvádzajú, že vývojové zmeny v zárodke nenastávajú pri teplotách pod 20 °C a táto teplota býva označovaná ako „fyziologická nula“.