

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV

Katedra genetiky a šľachtenia rastlín

**Hodnotenie genofondu Panu siateho a Puľka zemiakového
na úrovni polymorfizmu DNA**

Autoreferát dizertačnej práce na získanie
vedecko-akademickej hodnosti „*philosophiae doctor*“
vo vednom odbore 15-03-9 genetica

Ing. PaedDr. Jana Žiarovská

Nitra 2007

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre genetiky a šľachtenia rastlín, Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorandka: Ing. PaedDr. Jana Žiarovská
Katedra genetiky a šľachtenia rastlín,
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita

Vedúci dizertačnej práce: prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.
Katedra genetiky a šľachtenia rastlín,
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov,
Slovenská poľnohospodárska univerzita

Oponentka/ti: doc. RNDr. Dana Urmínská, CSc.
Katedra biochémie a biotechnológie,
Fakulta biotechnológií a potravinárstva,
Slovenská poľnohospodárska univerzita

prof. Ing. Štefan Hraška, DrSc.
Katedra botaniky a genetiky,
Fakulta prírodných vied,
Univerzita Konštantína Filozofa

RNDr. Andrej Kormuťák, DrSc.
Ústav genetiky a biotechnológií rastlín,
Slovenská akadémia vied, Nitra

Autoreferát bol rozoslaný dňa

Stanovisko k dizertačnej práci vypracovala Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ SPU v Nitre.

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 15-03-9 Genetika na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Miesto konania: Katedra genetiky a šľachtenia rastlín,
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: knižnica katedry

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Predseda komisie pre obhajobu vo vednom odbore 15-03-9:

prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc.
Katedra genetiky,
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
Mlynská Dolina B-2, 842 15, Bratislava

SÚHRN

V analýzach genómovej DNA sme pracovali s 23 genotypmi ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) technikami PCR–RAPD, PCR–ISSR, PCR–IRAP, PCR–RBIP a PCR–REMAP. Celkový polymorfizmus pri použití jednotlivých prajmerov predstavoval 65–91,6 % a tieto techniky sa ukázali vhodnými pre analýzu genetických vzťahov ľanu. Zhlukovanie UPGMA analýzou prebehlo podľa genetického pozadia rodokmeňov jednotlivých genotypov. V rámci analyzovanej kolekcie boli všetkými použitými prajmermi v rovnakých zhlukoch vetvového členenia v prípade PCR–RAPD techniky spájané tri skupiny genotypov a v prípade techniky PCR–ISSR dve skupiny genotypov. Použitím prajmerov odvodených od LTR úsekov retrotranspozónov pre techniky PCR–IRAP, PCR–RBIP a PCR–REMAP sme v súbore dosiahli polymorfizmus 68,7–86,4 %, pričom v zhlukoch vetvového členenia sa odhalili fylogenetické vzťahy nezávisle od príslušnosti populácie ku krajovým odrodám, moderným odrodám a líniam.

Analýza polymorfizmu medzigénovej DNA bola použitá pre odrody a ich vzájomné F₁ hybridy ľuľka zemiakového. Na základe výsledkov DNA analýz môžeme konštatovať, že vysoký stupeň polymorfizmu sledovaných odrôd a ich hybridov je dôsledkom aktivity a vysokého zastúpenia Tst1 retrotranspozónu v genóme ľuľka zemiakového. Včleňovanie sa kópií Tst1 retrotranspozónu do genómu, tetraploidný počet chromozómov jadra bunky a pôvod odrôd boli pravdepodobne podstatou zistenej vysokej variability DNA polymorfizmu hybridov. PCR–ISSR technikou boli F₁ hybridy rozdelené do troch zhlukov, spolu s každou odrodou vstupujúcou do kríženia a samostatného zhluku medzi oboma týmito odrodami.

Získané výsledky je možné použiť v oblasti získavania objektívnych údajov pre identifikáciu a vzájomné rozlišovanie odrôd, ktoré sa uplatnia v génových bankách a pri právnej a obchodnej ochrane výsledku šľachtenia, množenia osiva, autorských, licenčných a iných práv šľachtiteľa, množiteľa a majiteľa odrody a pri tvorbe východiskového šľachtiteľského materiálu.

Kľúčové slová: ľan siaty, (*Linum usitatissimum* L.), ľuľok zemiakový, (*Solanum tuberosum* L.), retrotranspozón Tst1, retrotranspozón FRODO, PCR–RAPD, PCR–ISSR, PCR–IRAP, PCR–RBIP, PCR–REMAP

ABSTRACT

A total genomic DNA of twenty-three flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes were analyzed using PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP and PCR-REMAP techniques. The range of total polymorphism using different primers was 65–91,6 % what make the techniques suitable for flax germplasm analyses. Clustering of flax population using UPGMA was based on pedigrees of every single population. Three groups of populations for PCR-RAPD and two groups of populations for PCR-ISSR were found as repeating in the nearest clusters in the scope of analyzed collection after evaluation of all dendrograms. The range of polymorphism using primers designed from LTR of retrotransposons for PCR-IRAP, PCR-RBIP and PCR-REMAP was 68,7–86,4 %. Clustering of flax population in this case was based on relations of old land populations with cultivars.

The intergene DNA polymorphism analyses of potato F_1 hybrids and cultivars used in breeding process was accomplished by PCR-IRAP, PCR-RBIP and PCR-REMAP techniques. We can conclude that the polymorphism degree of tested genotypes is due to Tst1 potato retrotransposon activity and high accumulation in potato genome.

The insertion variability of Tst1 retrotransposon copies, tetraploids genome and genotype origin has resulted in high hybrids variability. The variability was characterized by significant cluster polymorphism within the F_1 generation and its connection towards ancestors. Two clusters with cultivars used in breeding process and one between them was achieved using UPGMA analysis of PCR-ISSR technique.

Results can be used in the field of identification, distinguishing and managing populations in the gene banks and in legal and commercial sphere by protecting the rights of plant-breeders and cultivar owners as good as by breeding new cultivars.

Key words: flax, (*Linum usitatissimum* L.), potato, (*Solanum tuberosum* L.), retrotransposon Tst1, retrotransposon FRODO, PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP, PCR-REMAP

ÚVOD

Jedným zo základných postupov používaných k hodnoteniu biologickej rozmanitosti sa v súčasnosti stali genetické markéry. Tieto umožňujú na úrovni bielkovín alebo priamo reťazca deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) určovať, aké alely sú prítomné v genómoch jednotlivých jedincov.

Predchodcami molekulárných markérov pri hodnotení genofondu rastlín boli morfológické a fyziologické markéry, ktoré však alebo vykazovali nízky polymorfizmus, keďže vo fenotypovom prejave majú väčšinou dve až tri varianty, alebo intenzita ich prejavu bola podmiená prostredím.

Genetické markéry sa zameriavajú na hodnotenie molekuly DNA, a to alebo nepriamo cez bielkoviny, tzv. molekulové markéry, alebo priamo na reťazcoch molekuly DNA, DNA markéry. Pri hodnotení molekuly DNA sa výsledky získané týmito technikami stávajú nezávislé na podmienkach, v ktorých je rastlinný materiál pestovaný, čo poskytuje v porovnaní s ich predchodcami týmto technikám obrovskú výhodu.

Pri voľbe zo širokého spektra možností hodnotenia populácií na molekulárnej úrovni musíme brať do úvahy charakter informácií, ktoré chceme analýzou polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) získať, laboratórna a ekonomická náročnosť techniky ako aj vlastnosti použitého rastlinného materiálu.

Technika schopná produkcie diagnostických znakov akejkoľvek DNA vzorky nerádioaktívnym značením v krátkom čase, využívajúca jeden prajmer s náhodným usporiadaním pre zmoženie náhodných úsekov v genóme bez poznania konkrétneho poradia nukleotidov je označovaná ako PCR-RAPD, teda polymorfizmus náhodne zmoženej DNA.

Opakujúce sa poradia nukleotidov v genómoch rastlín umožňujú zmoženie oblastí medzi jednoduchými opakovaniami nukleotidov, označované ako PCR-ISSR, kedy predĺžovanie fragmentov DNA v PCR reakcii je zabezpečené naviazaním prajmerov zložených z opakujúcich sa poradí nukleotidov mikrosatelitu.

Ďalšími informatívne nosnými technikami sú analýzy medzigénovej DNA rastlín na základe polymorfizmu vytváraného jedinečným biologickým procesom, retrotranspozíciou. Využitelnosť retrotranspozónov ako molekulárných markérov je daná ich úsekmi na obidvoch koncoch retrotranspozónu s variabilnou dĺžkou a poradím nukleotidov. V prípade hodnotenia polymorfizmu dĺžky produktov PCR vo vnútri retrotranspozónu alebo medzi dvoma retrotranspozónmi označujeme tieto techniky ako PCR-RBIP a PCR-IRAP. Ak hodnotíme polymorfizmus zmoženej úsekov medzi retrotranspozónmi a mikrosatelitmi, ide o PCR-REMAP techniku.

Riešenie dizertačnej práce nadväzuje na výskumné projekty Katedry genetiky a šľachtenia rastlín FAPZ SPU v Nitre v oblasti mapovania genómu rastlín.

1. PREHEAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1.1 Hodnotenie zbierok genofundu rastlinných druhov

Predchodcami dnes používaných molekulárných markérov pri hodnotení genofondov rastlín boli morfológické, fyziologické a biochemické markéry. Nevýhodami ich používania však sú závislosť na vplyve prostredia alebo malý počet pri morfológických markéroch a nepotvrdenie rozdielov medzi genotypmi pri biochemických markéroch. Molekulové markery sú zamerané na hodnotenie molekuly DNA, čím sa výsledky získané týmito technikami stávajú nezávislé na podmienkach, v ktorých je rastlinný materiál pestovaný. Dnes je rozpracovaný široký rozsah týchto markérov umožňujúci zistiť rozmanitosť na rôznej úrovni.

1.2 Polymorfizmus náhodne zmoženej DNA

Technika schopná produkcie diagnostických znakov založených na poradí nukleotidov akejkoľvek DNA vzorky nerádioaktívnym značením v krátkom čase a využívajúca jeden prajmer náhodného poradia nukleotidov pre zmoženie náhodných úsekov v genóme bez poznania konkrétnej sekvencie je označovaná ako Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) alebo Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD), teda polymorfizmus náhodne zmoženej DNA (Welsh a McClelland, 1990; Williams et al., 1990).

PCR-RAPD technika je veľmi vhodná na použitie pri mapovaní DNA jedincov odlišných v bazových pároch. Tieto zmeny poradia nukleotidov sa môžu prejaviť ako zmeny vzoriek zmožnených produktov po agarózovej gélovej elektroforéze. PCR-RAPD technika si vyžaduje prítomnosť jedného náhodne sa naväzujúceho oligonukleotidu, ktorý sa v podmienkach PCR reakcie správa ako priamy aj spätný prajmer. Individuálny PCR-RAPD prajmer má definované poradie nukleotidov, avšak toto sa obvyčajne vyberá náhodne. Individuálne markéry sú schopné hybridizácie k niekoľkým stovkám oblastí bez cieľovej DNA. Hoci PCR-RAPD nie je náročnou technikou, reprodukovateľné výsledky sa dosahujú iba dôkladnou štandardizáciou protokolu. Nedostatkom techniky je práve nízka reprodukovateľnosť, slabé alebo rozmazané produkty PCR reakcie po elektroforetickom delení a ťažkosti spojené s objektívnym hodnotením výsledných vizualizovaných produktov, čo môže viesť k nesprávnym záverom.

1.3 Techniky molekulárnej biológie a genetiky využívajúce mikrosatelity

Približne 30 – 90 % genómu prakticky všetkých druhov je zložených z opakujúcich sa poradií nukleotidov DNA, ktoré sú vysoko polymorfne a teda vhodné na rozlišovanie druhov na molekulárnej úrovni. Tieto oblasti obsahujú lokusy skladajúce sa z niekoľkých stoviek alel, odlišujúcich sa jeden od druhého v dĺžke, konkrétnom poradí nukleotidov alebo oboch variantách. Opakujúce sa DNA oblasti majú v genóme významnú úlohu pri absorpcii mutácií a poskytujú základ pre systémy markérov využiteľné v najrôznejších aplikáciách analýzy rastlinných genómov, pričom sú využívané markéry založené na báze hybridizácie aj PCR (Swati, 1999). Mikrosatelity sú molekulové markéry lokusov tvorené tandemovo opakovanými krátkymi jednotkami nukleotidového motívu a označujú sa aj ako tzv. Short Tandem Repeats (STRs) alebo Simple Sequence Repeats (SSRs). Ako genetické markéry sú mikrosatelity využívané pri sledovaní diverzity, populačných štúdiách, mapovaní génov a väzbových skupín, ako aj v súdnom znelectve, pričom ako charakteristiky ovplyvňujúce výsledky molekulárnych analýz uvádzajú Wiesner et al. (2001) dĺžku kotvy mikrosatelitného prajmeru, ukotvenie na 3' alebo 5' koci, poradie nukleotidov kotvy, dĺžku hlavného opakujúceho sa motívu a poradie nukleotidov hlavného opakujúceho sa motívu.

V oblasti molekulárných analýz založených na PCR a mikrosatelitných opakovaniach nukleotidov sú možné dva prístupy. Prvým je polymorfizmus daných mikrosatelitných lokusov, kedy prajmer tvoria hraničné poradia nukleotidov mikrosatelitu a druhou možnosťou

je zisťovanie dĺžkového polymorfizmu medzi mikrosatelitmi, kedy prajmer tvoria poradia nukleotidov mikrosatelitu ukotvené na 5' P alebo 3' P konci, napr. technika PCR-ISSR.

Zmnoženie oblastí medzi jednoduchými opakovaniami nukleotidov (PCR-ISSR; Inter Simple Sequence Repeats), je postup, kde sa predlžovanie fragmentov DNA v PCR reakcii zabezpečuje naväzovaním sa prajmerov zložených z opakujúcich sa poradí nukleotidov mikrosatelitov. PCR-ISSR markéry sú úseky DNA, 100 – 3000 bp veľké, zmnožené PCR s použitím prajmera, ktorý má jadro mikrosatelitného poradia nukleotidov a niekoľkých selektívnych nukleotidov označovaných ako kotva. Veľkosť prajmera sa pohybuje od 16 do 18 nukleotidov. Zmnožené fragmenty sú oddeľované gélovou elektroforézou alebo PAGE a polymorfizmus je zisťovaný ako prítomnosť alebo neprítomnosť fragmentu konkrétnej veľkosti, pričom celkový počet zmnožených fragmentov DNA sa pohybuje v rozpätí 10 – 60.

1.4 Techniky molekulárnej biológie a genetiky využívajúce retroelementy

Polymorfizmus DNA sledovaný na základe retrotranspozónov je vytváraný jedinečným biologickým procesom retranspozície vyúsťujúcim do inzercii na nové miesta bez straty rodičovských kópií, pričom nové miesta včlenenia sú od seba vzdialené v rozpätí niekoľkých sto bp až niekoľkých kbp a včlenenia sú ireverzibilné. Retrotranspozóny sú vzhľadom na svoje vlastnosti vhodným nástrojom molekulárnej genetiky v oblasti molekulárnych markérov pre analýzu fylogenetických vzťahov, genetickej rozmanitosti a väzby génov, ako aj v oblasti mapovania a analýz génov (Bežo et al., 2001).

Využitelnosť retrotranspozónov ako molekulárnych markérov je daná ich LTR sekvenciami, ktoré sa opakujú na oboch koncoch retrotranspozónu, sú variabilné v dĺžke i poradí nukleotidov a najmä sú na reťazci DNA v dostatočnom počte.

Rôzni autori (Kumar, Benetzen, 1999; Kalendar et al., 1999) uvádzajú ako výhody využitia retrotranspozónov pre účely molekulárnych markérov zastúpenie retrotranspozónov vo veľkom počte heterogénnych kópií, lokalizáciu na rôznych miestach chromozómu, možnosť mapovania polymorfizmu v rámci, aj medzi druhmi, ich hojný zastúpenie v euchromatine, ktoré dáva možnosť tvorby markérov viazaných na agronomicky zaujímavé vlastnosti, obsahujú dlhé a presne definované poradie nukleotidov využiteľné k tvorbe špecifických markérov, sú to aktívne úseky DNA a ich začleňovanie vedie k rozširovaniu už existujúceho polymorfizmu.

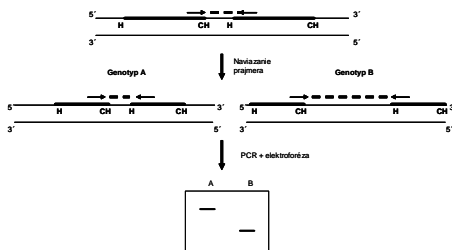
Techniky molekulárnej genetiky pracujúce s retrotranspozónmi vychádzajú z kombinácií orientácie retrotranspozónov na reťazcoch molekuly DNA a z použitia jednotlivých možných prajmerov k zmnoženiu úsekov medzi jednotlivými retrotranspozónmi, medzi retrotranspozónom a miestom štiepenia nukleáz alebo medzi retrotranspozónom a mikrosatelitnou sekvenciou.

1.4.1 Polymorfizmus začlenenia retrotranspozónu

Technika PCR-RBIP (Retrotransposon Based Insertion Polymorphism) analyzuje prítomnosť alebo neprítomnosť včlenenia retrotranspozónu v genóme pomocou prajmerov vytvorených tak, aby obsahovali aj koncové úseky retrotranspozónov (obrázok 1). Tento systém je kodominantný a dá sa ním zhodnotiť prítomnosť jednotlivých alel v rámci lokusu (Flavel et al, 1998; Garber et al, 1999).

Je to technika pracujúca so štyrmi prajmermi (dvojica prajmerov smerujúcich von z LTR úsekov retrotranspozónu a dvojica prajmerov smerujúcich dovnútra LTR úsekov). Táto technika vyžaduje poznanie úseku DNA, ktorý obklopujú retrotranspozón a umožňuje analýzy jednotlivých lokusov a jasnú identifikáciu heterozygotov (Flavell et al., 1998). RBIP

metóda spolu s SSAP metódou sa využíva aj pri zhodnotení variability včlenenia a aktivity retrotranspozónov vyvolanej pôsobením abiotického a biotického stresu.



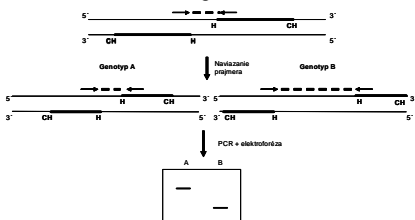
Obrázok 1. Princíp polymorfizmu stanoveného technikou PCR-RBIP

1.4.2 Polymorfizmus zmožených úsekov medzi opačne orientovanými retrotranspozómni

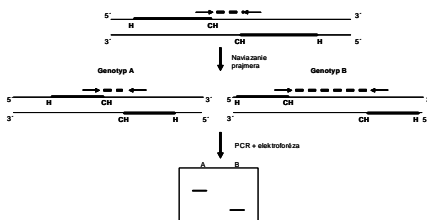
Technika PCR-IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) zisťuje polymorfizmus prítomnosti retrotranspozónov v genóme v závislosti na vzdialenosti medzi opačne orientovanými retrotranspozómni, ktoré sa v tomto postavení nachádzajú blízko seba (Kumar, Hirochika, 2001). V PCR reakcii sa pri tejto technike syntetizujú úseky DNA medzi LTR oblasťami dvoch retrotranspozónov. PCR-IRAP pracuje s dvojicou prajmerov smerujúcich von z LTR úsekov opačne orientovaných retrotranspozónov (obrázok 2). Predpokladá sa, že PCR-IRAP markéry majú kodominantný charakter a sú aplikovateľné pre akýkoľvek rastlinný druh, ktorý má vo svojom genóme LTR retrotranspozóny a je známe poradie nukleotidov LTR úseku alebo vnútorných oblastí retrotranspozónu (Kalendar et al., 1999).

Principiálne je PCR-IRAP technika možná na základe poznatkov, že skupiny retroelementov nevykazujú tendenciu náhodnej inzercie v genóme, ale naopak včleňujú sa v skupinách blízko seba, dokonca sa včleňujú jeden do druhého.

Orientácia retrotranspozónov 5' LTR úsekmí /



3' LTR úsekmí k sebe:

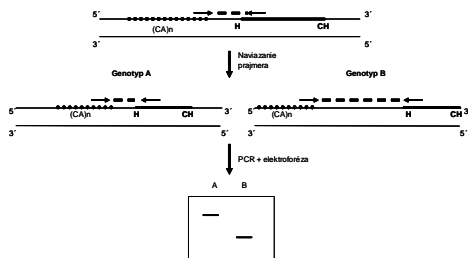


Obrázok 2. Princíp polymorfizmu stanoveného technikou PCR-IRAP

1.4.2 Polymorfizmus zmožených úsekov medzi retrotranspozómni a mikrosatelitmi

Technika PCR-REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) vychádza z analýz poradia nukleotidov mikrosatelitných klonov jačmeňa, ktoré ukázali, že retrotranspozóny sú v tesnom spojení s mikrosatelitmi, elementami, ktoré sú v genóme rastlín rozšírené rovnako ako retrotranspozóny (Provan et al, 1999). Jedná sa o polymorfizmus prítomnosti retrotranspozónov v genóme v závislosti na vzdialenosti medzi retrotranspozómom a mikrosatelitnou sekvenciou (obrázok 3). Táto technika dokáže rozlišovať odtlačky DNA

pre druhy v rámci rodov (Kalendar et al, 1999) a boli ňou vytvorené mapy genetických vzdialeností u jačmeňa (Provan et al, 1999).



Obrázok 3. Princíp polymorfizmu stanoveného technikou PCR-REMAP

Súčasné úspešné využívanie retrotranspozónov v molekulárnych analýzach je podmienené dĺžkou LTR úseku, počtom kópií cieľového retrotranspozónu v genóme a samotnou štruktúrou genómu. Ako najefektívnejšie sa javia LTR úseky dlhé iba niekoľko sto bp, pri dlhších je nutné definovanie prajmera v blízkosti konca, čo predpokladá presnú znalosť poradia nukleotidov. Retrotranspozóny, ako nástroje molekulárnej biológie, by v budúcnosti mali slúžiť najmä pre analýzy štruktúry genómov a pri objasňovaní funkcií génov.

2. CIELE PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce na tému „Hodnotenie genofondu ľanu siateho a ľuľka zemiakového na úrovni polymorfizmu DNA“ bolo:

1. Získanie *in vitro* rastlín ľanu siateho vhodných pre izoláciu celkovej genomickej DNA pre molekulárne analýzy.
2. Optimalizácia protokolu izolácie DNA vhodnej kvality a množstva z ľanu siateho pre PCR.
3. Optimalizáciu zloženia reakčnej zmesi a podmienok PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP reakcií.
4. Overenie možnosti uplatnenia PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP techník a vhodnosť vybraných prajmerov pre štúdium genetickej variability ľanu siateho a ľuľka zemiakového.
5. Určenie vhodnej kombinácie prajmerov pre analýzy polymorfizmu pozícií retrotranspozónov Tst1 a FRODO v medzigénovej DNA ľanu siateho a ľuľka zemiakového.
6. Porovnanie biologickej rozmanitosti kolekcie populácií ľanu siateho a ľuľka zemiakového na úrovni polymorfizmu DNA technikami molekulárnej biológie a genetiky (PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP).
7. Určenie genetickej príbuznosti/vzdialenosti medzi populáciami ľanu siateho.
8. Vyhodnotenie zoskupení populácií ľanu siateho pri použití jednotlivých DNA markérov v PCR reakciách pre zistenie rozmanitosti genofondu ľanu siateho.
9. Genetická analýza F₁ hybridného potomstva ľuľka zemiakového, pomocou DNA markérov.
10. Vyhodnotenie zoskupení populácií ľuľka zemiakového pri použití jednotlivých DNA markérov v PCR reakciách pre výber populácií s jedinečnými vlastnosťami.

Vedecké zameranie dizertačnej práce bolo orientované na návrh vhodných kombinácií prajmerov pre PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP. Spoločenský prínos riešenia dizertačnej práce sa predpokladá v oblasti získavania objektívnych údajov pre identifikáciu a vzájomné rozlišovanie odrôd v génových bankách a pri právnej ochrane odrôd.

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1 Biologický materiál

Pri riešení úloh dizertačnej práce boli použité semená druhu ľan siaty (*Linum usitatissimum* L.) populácií získaných z génovej banky Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch a z firmy Agritec, výzkum, šľachtení a služby, s.r.o. Šumperk. Zbierka populácií obsahovala 36 populácií priadneho a olejného typu ľanu siateho rôzneho pôvodu, konkrétne 26 odrôd, 5 krajových odrôd a 5 línií. Ďalším analyzovaným rastlinným materiálom boli rodičovská a F₁ hybridná generácia rastlín ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.) poskytnuté Výskumným a šľachtiteľským ústavom zemiakárskym, a.s. vo Veľkej Lomnici. Testovaný súbor tvorili tri kombinácie populácií vstupujúcich do kríženia a 40 jedincov F₁ hybridnej generácie rastlín z každej kombinácie.

3.2 Izolácia DNA

V prípade populácií ľuľka bola z VŠÚZ vo Veľkej Lomnici dodaná už izolovaná DNA. Izolácia sa uskutočnila podľa protokolu Rogers, Bendich et al. (1994) z čerstvých listov rastlín pestovaných v skleníku. Rovnaký protokol bol zvolený aj pre izoláciu DNA ľanu z čerstvých listov rastlín kultivovaných *in vitro* podmienkach. Kvalitu a kvantitu izolovanej DNA sme určili na 1% agarózovom géle (Amresco 3:1, Invitrogen™, Life Technologies) fluorescenčným stanovením porovnávaním stanovovaných vzoriek ku kaskáde ľudskej genómovej DNA so známou koncentráciou (Human Genomic DNA, Promega, 245 µg.ml⁻¹). Na prípravu 1% agarózového gélu sme použili 1,5 g agarózy (Amresco 3:1, Invitrogen™, Life Technologies) a 150 ml 1 x TBE tlmivého roztoku. Do gélu bolo pridaných 75 µl etidium bromidu (0,5 µg . ml⁻¹). V prvých piatich dráhach bola nanesená ľudská DNA v množstvách uvedených v tabuľke , spolu s beznukleázovou PCR vodou (Nuclease – Free Water, Amresco) a značkovačou farbou (10 Blue Juice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen). V ostatných dráhach boli nanesené vzorky izolovanej DNA ľanu alebo ľuľka (1µl vzorky + 9 µl beznukleázovej vody + 2µl značkovej farby). Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 60V a prúde 30 mA 4 hodiny. Výsledok bol vizualizovaný v transiluminátore (Transiluminator UVP) pri UV žiarení a fotografovaný pomocou dokumentačného systému KODAK EDAS 290.

3.3 Zloženie reakčných zmesí pre PCR

Po optimalizácii faktorov ovplyvňujúcich reprodukovateľnosť PCR-RAPD, PCR-IRAP a PCR-RBIP rozmiestnenia PCR produktov boli uskutočnené reakcie v 25 µl reakčnej zmesi s nasledovným zložením, ktoré udáva tabuľka 1.

Tabuľka 1. Zložky reakčných zmesí a výsledné koncentrácie v jednej reakcii

Zložka	Výrobca / dodávateľ	Množstvo / koncentrácia látkového množstva v 25 µl reakčnej zmesi do PCR	
		PCR-RAPD	PCR-IRAP; PCR-RBIP
10× tlmivý roztok*	Invitrogen™	1×	1×
MgCl ₂	Invitrogen™	3 mmol.dm ⁻³	1,5 mmol.dm ⁻³
dNTPs	Promega	0,1 mmol.dm ⁻³	0,2 mmol.dm ⁻³
Taq polymeráza	Invitrogen™	1U	1U
DNA	-	20 ng	30 ng
PCR H ₂ O	Amresco	-	-

*zloženie 10× tlmivého roztoku: 20 mmol.dm⁻³ TRIS –HCl (pH 8,0) + 50 mmol . dm⁻³ KCl

Jednotlivé prajmery pridané do reakčnej zmesi s koncentráciou látkového množstva 4 nmol.dm⁻³, ich pipetované množstvo a charakteristiku uvádza nasledovná tabuľka 2.

Tabuľka 2. Prajmery použité pri PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP analýzach

Označenie	Technika	Poradie nukleotidov (5'P → 3'P)	Množstvo v 25 µl PCR zmesi
LAN 1*	PCR-RAPD	CCTGGGCCTC	0,32 µl
LAN 2*	PCR-RAPD	CCGGCCTTAG	0,33 µl
LAN 3	PCR-RAPD	CCTGGGCCTG	0,32 µl
LAN 4	PCR-RAPD	AGGAGTGAGA	0,29 µl
LAN 5	PCR-RAPD	CCTCCCTCTT	0,29 µl
Flax 1	PCR-ISSR	(GT) ₆ CC	0,43 µl
Flax 2	PCR-ISSR	(GAG) ₃ GC	0,35 µl
Flax 3	PCR-ISSR	(GA) ₆ GG	0,42 µl
Flax 4	PCR-ISSR	(CTG) ₃ GC	0,43 µl
Flax 6	PCR-ISSR	(CA) ₆ GT	0,34 µl
P-Tst1-01	PCR-IRAP, RBIP, REMAP	ATGACTAAATCTGCCTACTCATTCAACA	0,85 µl
P-Tst1-06	PCR-IRAP, RBIP, REMAP	ACTAAATCTGCCTACTCATTCAACACTC	0,84 µl
Frodo 2	PCR-IRAP, RBIP, REMAP	ACGGCGGAGCCGATCCCGGGATGTGACA	0,87 µl

* dodávateľ GIBCO; ostatné prajmery – dodávateľ INVITROGEN™

Prajmer P-Tst1-01 je komplementárny opačne orientovaný smerom von z 5'LTR konca *Tst1* retrotranspozónu rajčiaka; prajmer P-Tst1-06 je komplementárny opačne orientovaný smerom dovnútra 3'LTR konca *Tst1* retrotranspozónu zemiaka (X52387; NCBI databáza) a prajmer Frodo2 je súhlasný priamy ku poradiu nukleotidov 588 – 615 3'LTR konca FRODO TRIM retrotranspozónu (AY860314; NCBI databáza).

3.4 Časový a teplotný profil PCR reakcií

Polymerázové reťazové reakcie (PCR) prebiehali v tlmivom roztoku obsahujúcom 20 mmol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,0), 50 mmol.dm⁻³ KCl, 30 ng DNA, 4 mmol.dm⁻³ prajmer, 1 U Taq polymerázy, 3 mmol.dm⁻³ MgCl₂ a 0,2 mmol.dm⁻³ dNTPs.

Časový a teplotný profil PCR-RAPD bol nasledovný:

[1 min pri 94 °C - 35 cyklov (1 min pri 94°C; 1 min pri 36 °C; 2 min pri 72 °C) a záverečných 7 min pri 72 °C.

Časový a teplotný profil PCR-ISSR a PCR-REMAP bol nasledovný:

[2 min pri 94 °C - 45 cyklov (1 min pri 94°C; 1 min pri 55 °C; 3 min pri 72 °C) a záverečných 7 min pri 72 °C.

Časový a teplotný profil PCR IRAP a PCR RBIP bol nasledovný:

[2 min pri 94 °C - 35 cyklov (1 min pri 94°C; 1 min pri 55 °C; 3 min pri 72 °C) a záverečných 7 min pri 72 °C.

3.5 Analýza PCR produktov a vyhodnotenie dát

Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 60 V a prúde 30 mA 4 hodiny. Rozdelené fragmenty boli vizualizované v transiluminátore (Transiluminator UVP) pri UV žiarení a dĺžke expozície 1; 1,5; 2 a 3 sekundy. Vyhodnotenie dát bolo uskutočnené na základe prítomnosti alebo neprítomnosti amplifikačných produktov analýzou čierno – bielych výstupov analytickým softvérom KODAK 1D, pri ktorom boli určené hladiny polymorfizmu. Vzorky boli hodnotené pri citlivosti predstavujúcej posledný stupeň, kedy boli zachytávané všetky objektívne fragmenty markéra. Vyhľadávanie optimálnej šírky rozoznávaných svetelných bodov bolo nastavené automaticky softvérom. Expozícia bola vybraná na základe svetelného optima, kedy systém ihneď spoľahlivo rozoznával všetky objektívne dráhy a prúžky.

Na základe rozdelenia produktov PCR jednotlivých variant sa medzi nimi vypočítali indexy príbuznosti (SI_{NL}) podľa Nei, Li (1979). Postup výpočtu bol nasledovný, $SI_{NL} = 2 \times$ počet spoločných fragmentov / (počet fragmentov v dráhe A + počet fragmentov v dráhe B). Z indexov príbuznosti boli vypočítané indexy vzdialenosti (DI_{NL}) podľa vzťahu, $DI_{NL} = 1 - SI_{NL}$. Vetvové členenia vzájomných závislostí boli zostrojené hierarchickou zhlukovou analýzou metódou UPGMA vytvorením zhlukov na základe priemerov euklidovskej vzdialenosti pre skutočnú pozíciu prúžkov PCR profilu (PEVZ) v štatistickom programe SYNTAX.

4. VÝSLEDKY

4.1 Molekulárne analýzy populácií ľanu siateho

Ku zhodnoteniu vzťahov medzi 36 populáciami ľanu siateho PCR-RAPD technikou bolo použitých päť prajmerov, a to LAN 1 (CCTGGGCCTC), LAN 2 (CCGGCCTTAG), LAN 3 (CCTGGGCCTG), LAN 4 (AGGAGTGAGA) a LAN 5 (CCTCCCTCTC).

Všetky prajmery sú dekaméry líšiac sa obsahom guanínu a cytozínu (GC). Prajmery LAN 1 a LAN 3 obsahujú 80 % GC, prajmery LAN 2 a LAN 5 70% GC a LAN 4 50% GC.

Analýzou pomocou týchto prajmerov v PCR reakcii sme získali jedinečné fragmenty v prípade LAN 1 pre populácie Krasnokutsk a Redwing, ktorých dĺžka bola porovnaním s molekulovým markérom známych dĺžok DNA stanovená na 870 a 872,5 bp. Pri populáciách Otofte 15/47 a Stamm Fa sme zaznamenali jedinečné fragmenty pre LAN 2, pričom ich dĺžka bola 421,4 bp a 416,7 bp. Použitím prajmera LAN 4 v PCR-RAPD reakcii sme získali tri jedinečné fragmenty pre populácie Flanders, Redwing a Ilgunuliai, s dĺžkami 939,4 a 932,7 bp a 934,6 bp.

Na základe sumárneho hodnotenia výsledkov PCR-RAPD profilov a z nich zostrojených vetvových členení je možné poukázať na tri skupiny populácií, ktoré sa pri každom nami použitom PCR-RAPD prajmeri vyskytli v najbližšie spájaných zhlukoch.

V prvom prípade boli UPGMA analýzou vyčlenené pri každom použitom prajmeri populácie Otofte 15/47, PRFGL 93, Norfolk Princess, Escalina, Muenchenberger St. 8, Renodlat Oljelin, Hor Nr 048, Albidum, Super a Marina, pričom priemerný SI_{NL} koeficient týchto populácií je 0,87. Vo všetkých prípadoch dosahoval SI_{NL} koeficient vysoké hodnoty, čo znamená, že tieto populácie vykazujú v analyzovaných úsekoch DNA vysoký stupeň príbuznosti. Rovnako v prípade vetvových členení nie sú spájané na vyššej úrovni ako 0,196 E+02 PEVZ. Všetky tieto populácie sú európskej proveniencie, okrem krajovej odrody Albidum, ktorej pôvod je v Indii. Druhá skupina populácií, ktoré sa vyskytujú v zhodných zhlukoch vetvových členení PCR-RAPD analýz je tvorená odrodami Rekord, Svaloeff, Ilguniliai, krajovými odrodami Deubgrc 28197, Deubgrc 29198 a líniou Stamm Fa 13. Priemerný SI_{NL} koeficient v tejto skupine populácií je 0,83, pričom najnižšia hodnota bola

dosiahnutá pri prajmeri LAN5, čo korešponduje aj s výsledkami UPGMA analýzy, kde v rovnakom zhluku boli umiestnené iba tri populácie tejto skupiny, konkrétne Rekord, Deubnrc 28197 a Stamm Fa 13, ktoré boli zároveň spojené na najvyššej úrovni pri porovnaní s ostatnými zhlukmi, kde sa tieto vyskytujú populácie pri ostatných vetvových členeniach. V treťom prípade boli UPGMA analýzou vyčlenené v prípade každého použitého prajmera populácie McGregor, Krasnoder a Rabenslyst La Plata, pričom priemerný SI_{NL} koeficient týchto populácií je 0,85. Najnižšia hodnota bola dosiahnutá opäť pri prajmeri LAN5 a druhá najnižšia pri prajmeri LAN3 čo korešponduje aj s výsledkami UPGMA analýzy, kedy populácie v týchto zhlukoch boli spájané na najvyšších úrovniach pri porovnaní s ostatnými zhlukmi. V prípade použitia prajmerov LAN2, LAN3 a LAN4 boli do rovnakých zhlukov spojené egyptský genotyp Gisa a indický genotyp Indien, kde sa s nimi vyskytovali populácie Marina a Ilona.

Hodnotenie zbierky populácií ľanu siateho PCR-ISSR bolo uskutočnené použitím piatich jednoduchých mikrosatelitných prajmerov ukotvených na 3' P konci, konkrétne prajmermi FLAX 1 (GT)₆CC, FLAX 2 (GAG)₃GC, FLAX 3 (CA)₆GG, FLAX 4 ((CTG)₃GC a FLAX 6 (CA)₆GT.

Použitím prajmera FLAX 1 boli zaznamenané dva jedinečné fragmenty pre genotyp Stamm Fa 13, ktorých dĺžka bola porovnaním s markérom známych dĺžok stanovená na 311,8 a 1147,9 bp. Použitím prajmera FLAX 4 bol pre túto populáciu zaznamenaný jedinečný PCR-ISSR profil. Pri populáciách San Elias 192/22 a McGregor sme pri použití prajmera FLAX 2 zaznamenali jedinečné fragmenty s veľkosťami, ktorých dĺžka bola porovnaním k markéru známych dĺžok stanovená na 507,6 bp a 516,9 bp. PCR-ISSR reakcia s prajmerom FLAX 3 poskytla v profile jedinečný fragment pre genotyp Krasnoder s veľkosťou 689,2 bp.

Na základe sumárneho hodnotenia výsledkov PCR-ISSR profilov a z nich zostrojených vetvových členení je možné poukázať na dve skupiny populácií, ktoré sa pri každom nami použitom PCR-ISSR prajmeri vyskytli v najbližšie spájaných zhlukoch. V prvom prípade boli UPGMA analýzou vyčlenené v prípade každého použitého prajmera populácie Pskow II, Hor Nr. 048, Norfolk Princess, PRFGL 93, Flanders a Daehnfeldt Elite 6, pričom priemerný SI_{NL} koeficient týchto populácií je 0,8. Druhá skupina populácií, ktoré sa vyskytujú v zhodných zhlukoch vetvových členení PCR-ISSR analýz je tvorená genotypmi Renodlat Oljelin, McGregor, Red Wing, Horan, Marina, Muenchenberger St. 8 a Daero. Priemerný SI_{NL} koeficient v tejto skupine populácií je 0,81.

Ako ďalší spôsob hodnotenia vzťahov v zbierke populácií ľanu siateho na úrovni medzigénovej DNA boli zvolené techniky pracujúce s prajmermi odvodenými od LTR úsekov retrotranspozónov Tst1 (ATGACTAAATCTGCCTACTCATTCAACA) a FRODO (ACGGCGGAGCCGATCCCGGGATGTGACA). Polymorfizmus dosiahnutý v súbore ľanu sa významne nelíšil od hodnôt dosiahnutých PCR-RAPD a PCR-ISSR technikami. Prajmerom odvodeným od Tst1 retrotranspozónu sme v súbore ľanu siateho zaznamenali 76,9% polymorfizmus a prajmerom odvodeným od FRODO retrotranspozónu 68,7%. Zoskupenie populácií v prípade PCR-IRAP a PCR-RBIP reakcií neprebehlo podľa priamych vzťahov medzi genotypmi založených na vzájomnej príbuznosti ovplyvnenej rodokmeňmi šľachtania, ale do dĺžkového polymorfizmu vzdialeností medzi retrotranspozónmi sa premietajú širšie genetické vzťahy krajových odrôd s registrovanými a líniami. Porovnaním dostupných údajov o populáciách, sú tieto v PCR-REMAP do zhlukov spojené na základe genetického pozadia križenia jednotlivých populácií, ako naznačujú spojenia populácií McGregor s Flanders (Flanders → McGregor × Dufferin) a La Plata s Daehnfeldt Elite 6 (La Plata je predkom Daehnfeldt Elite 6) v jednom zhluku, ako aj spojeneie Marina a Super (Marina → Belinka × Natasja; Super → Lux × Natasja) do najbližšie spojených skupin zhlukov.

4.2 Molekulárne analýzy populácií Fuľka zemiakového

Porovnávané boli jedince troch F_1 hybridných populácií Fuľka zemiakového, pochádzajúce z kríženia populácií Fambo (rrrr) a Monalisa (rrrr), ktoré sú náchylné voči háďatku zemiakovému a populácií Tomensa (RRrr), Europa (RRrr) a Vitesse (RRrr) vykazujúcim voči háďatku zemiakovému odolnosť.

Prajmery pre PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP boli navrhnuté na základe poradi nukleotidov retrotranspozónov Tst1 a FRODO.

Analýza hybridnej kombinácie F_1 17/05 pochádzajúcej z kríženia odolnej a náchylnej odrody (Europa \times Fambo) voči háďatku zemiakovému poskytla veľkosť nasynetizovaných fragmentov DNA v rozpätí od 348,8 bp po 2416,7 bp. Zaznamenal sa 90 % polymorfizmus a 14 fragmentov, ktoré vzhľadom na ich jedinečnú pozíciu môžeme označiť za monomorfné.

Analýzy hybridnej kombinácie F_1 21/05 pochádzajúcej z kríženia dvoch odolných odrôd (Tomensa \times Vitesse) voči háďatku zemiakovému poskytli veľkosti nasynetizovaných fragmentov DNA v rozpätí od 231,6 bp po 2409,1 bp. V analyzovanej vzorke bol zaznamenaný 77,8 % polymorfizmus. Táto hybridná kombinácia má v porovnaní s ostatnými (F_1 3/05 a F_1 17/05) najnižší polymorfizmus, to znamená že viaceré prúžky testovaných jedincov mali zhodné pozície. Aj napriek najnižšiemu polymorfizmu sa v hybridnej kombinácii zaznamenalo 9 jedinečných fragmentov.

Analýzy hybridnej kombinácie F_1 3/05 pochádzajúcej z kríženia odolnej a náchylnej odrody (Vitesse \times Monalisa) voči háďatku zemiakovému poskytli veľkosti nasynetizovaných fragmentov DNA v rozpätí od 272,1 bp po 2384,6 bp. V analyzovanej vzorke populácií bol zaznamenaný 100 % polymorfizmus, čo znamená, že rozmiestnenie prúžkov testovaných jedincov hybridnej kombinácie F_1 3/05 bolo odlišné. V súbore sa zaznamenalo 11 jedinečných prúžkov, ktoré môžeme považovať za monomorfné.

Hybridná kombinácia F_1 3/05 bola zvolená ako východiskový súbor pre analýzy nadväzujúce na PCR-IRAP a PCR-RBIP techniky a zároveň ako súbor pre analýzu použitím prajmerov odvodených od poradia nukleotidov retrotranspozónu FRODO pre tieto techniky ako aj pre PCR-REMAP prajmery P-Tst1-01 a FLAX2.

Zhodnotenie populácie $F_1/3$ technikou PCR-REMAP poskytlo 11 úrovní rozdelenia fragmentov s dosiahnutým 63,6% polymorfizmom. Priemerný DI_{NL} vypočítaný pre tento súbor má hodnotu 0,19 (populácie sú v polymorfizme sledovanej oblasti pomerne príbuzné), čo korešponduje aj s dosiahnutým polymorfizmom ako aj s vetvovým členením zostrojeným UPGMA analýzou.

Celkovým vyhodnotením všetkých PCR reakcií a zostrojením vetvového členenia sa F_1 hybridná populácia a populácie vstupujúce do kríženia zoskupili do troch zhlukov (obrázok 5.40). Prvý zhluk tvorí 10 populácií zoskupených okolo Monalisa, druhý zhluk je tvorený 16 genotypmi, pričom sa s prvým spája na 36. úrovni s hodnotou 0,247 E+03 PEVZ. Genotyp Vitesse sa spolu so skupinou 7 populácií pripája ku všetkým ostatným na 38. úrovni s hodnotou 0,267 E+03 PEVZ. Na poslednej úrovni sa k ostatným pripája dvojica populácií F_1 33/3/05 a F_1 54/3/05.

Porovnaním s jednotlivými vetvovými členeniami je možné z nami hodnotenej hybridnej populácie určiť dve skupiny populácií. Prvá, tvorená genotypmi F_1 2/3/05, F_1 60/3/05 a Monalisa sa vyskytujú v jednom zhluku nielen v súhrnnom hodnotení, ale aj v troch čiastkových. Druhé zoskupenie tvorené F_1 58/3/05, F_1 5/3/05, F_1 67/3/05, F_1 21/3/05, F_1 71/3/05, F_1 12/3/05, F_1 15/3/05, F_1 34/3/05, F_1 8/3/05, F_1 44/3/05, F_1 69/3/05, F_1 64/3/05 a F_1 70/3/05 je v rovnakých zhlukoch v piatich ďalších prípadoch, pričom skupina týchto populácií sa v troch prípadoch pripája k Vitesse a v dvoch k Monalisa.

Za predpokladu vplyvu variability včleňovania sa kópií TstI retrotranspozónu, prenosu genetického materiálu na potomstvo z tetraploidov a pôvodu populácií v genóme F₁ hybridných kombinácií, je možné očakávať vysokú variabilitu v tomto potomstve, ktorá sa prejaví vysokým stupňom odlišnosti jednotlivých zhlukov vetvového členenia v rámci F₁ generácie a jej vzťahu k predkom.

Metódami PCR-IRAP a PCR-RBIP boli vyčlenené skupiny populácií v F₁ hybridného potomstva s nízkou hodnotou odlišnosti od predkov. Populácie priradené oboma metódami do skupín najbližších k predkom môžeme považovať z genetického hľadiska za najviac zhodné s genetickým základom svojich predkov.

Napriek zistenej nízkej hodnote odlišnosti určitých populácií vo všetkých troch hybridných kombináciách od priamych predkov, nie je možné predpokladať, že súčasťou ich genómu sú gény súvisiace s odolnosťou voči hädatku zemiakovému prítomné v genómoch predkov.

Cieľom dizertačnej práce na tému „Hodnotenie genofondu ľanu siateho a ľuľka zemiakového na úrovni polymorfizmu DNA“ bolo na základe teoretických poznatkov a vlastných experimentálnych výsledkov analyzovať a zhodnotiť možnosti využitia analýz polymorfizmu náhodne zmnoženej DNA (PCR-RAPD), analýz zmnoženia úsekov DNA medzi jednoduchými opakujúcimi sa poradiami nukleotidov (PCR-ISSR) a techník založených na využití retrotranspozónov v analýzach medzigénovej DNA (PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP) pre:

- hodnotenie genofondu rastlín,
- ako podklady pre identifikáciu populácií,
- pri výbere populácií pre šľachtiteľské programy,
- určovania genetickej podobnosti a vzdialenosti,
- vytvorenia databázy DNA odtlačkov kolekcie genofondu ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) a F₁ hybridnej populácie a populácií vstupujúcich do kríženia ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.).

Pre zavedenie do rutínnej praxe sú dôležité aj praktické vlastnosti týchto techník, predovšetkým ich časová nenáročnosť, možnosť automatizácie, požiadavky na technické vybavenie, finančné náklady a malé množstvo DNA postačujúce pre analýzy.

Na základe výsledkov uvedených v dizertačnej práci odporúčame:

- Dôkladnú optimalizáciu podmienok PCR reakcií a premyslený výber markérov, ktoré zabezpečia aj pri technikách s náhodným naväzovaním sa prajmerov dostatočný polymorfizmus poskytujúci rozčlenenie súborov ako aj monomorfné fragmenty vhodné k jednoznačnej identifikácii odrôd.
- Populácie zoskupené do rovnakých zhlukov, teda majúce v genómoch podobné vlastnosti, využiť pre praktické účely klasického i molekulárneho šľachtenia, ale aj v ďalších porovnávacích analýzach ako referenčné súbory populácií.
- Populácie F₁ hybridnej populácie rozčlenené technikami pracujúcimi s retrotranspozónmi môžu poskytnúť vhodný genetický základ pre ich ďalšie využitie v šľachtiteľských programoch smerom k rozširovaniu biologickej variability pri medziodrodovom krížení. Populácie vyčlenené ako odlišné od predkov môžu byť prínosom pri prekonávaní nevýhod príbuzenského kríženia.

5. ZÁVER

Ku zhodnoteniu vzťahov medzi populáciami ľanu siateho a ľuľka zemiakového boli použité techniky PCR-RAPD, PCR-ISSR, PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP. Biologickú rozmanitosť sme hodnotili použitím celkovo trinástich DNA markérov.

Z výsledkov analýz je možné odvodiť nasledovné závery.

- Pomocou jedinečných DNA fragmentov sa dajú PCR-RAPD technikou s prajmerom LAN 1 identifikovať populácie Krasnokutsk a Red Wing, s prajmerom LAN 2 populácie Otofte 15/47 a Stamm Fa 13 a s prajmerom LAN 4 populácie Flanders, Red Wing a Ilguniliai.

- Porovnaním dostupných údajov o populáciách ľanu siateho boli tieto spájané technikami PCR-RAPD a PCR-ISSR do zhlukov na základe genetického pozadia kríženia jednotlivých populácií.

- Na základe sumárneho hodnotenia výsledkov PCR-RAPD profilov a z nich zostrojených vetvových členení je možné poukázať na tri skupiny populácií, ktoré sa pri každom nami použitom PCR-RAPD prajmeri vyskytli v najbližšie spájaných zhlukoch.

- V prípade použitia prajmerov LAN2, LAN3 a LAN4 boli do rovnakých zhlukov spojené africký genotyp Gisa a indický genotyp Indien, kde s nimi boli zoskupené európske holandské populácie ľanu siateho Marina a Ilona.

- PCR-ISSR analýzou s mikrosatelitnými prajmermi ukotvenými na 3'P konci boli populácie zoskupené do dvoch až štyroch zhlukov v závislosti na použitom prajmeri.

- Spoľahlivo bolo možné rozlíšiť PCR-ISSR technikou možné identifikovať populáciu Stamm Fa prajmerom FLAX 1, prajmerom FLAX 2 populácie San Elias 192/22 a McGregor a prajmerom FLAX 3 genotyp Krasnoder. Použitím prajmera FLAX 4 v PCR reakcii sme získali celý jedinečný PCR profil pre genotyp Stamm Fa, ktorý sa podarilo jednoznačne identifikovať aj PCR-RAPD reakciou.

- Pri dvoch principiálne odlišných technikách, akými sú PCR-RAPD a PCR-ISSR sme získali porovnateľnú úroveň dosiahnutého polymorfizmu ako aj podobný počet jedinečných DNA fragmentov schopných jednoznačne identifikovať jednotlivé populácie.

- Na základe sumárneho hodnotenia výsledkov PCR-ISSR profilov a z nich zostrojených vetvových členení je možné poukázať na dve skupiny populácií, ktoré sa pri každom nami použitom PCR-ISSR prajmeri vyskytli v najbližšie spájaných zhlukoch.

- V PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP boli populácie spájané do zhlukov na základe genetického pozadia kríženia jednotlivých populácií ľanu siateho, ale pri porovnaní s výsledkami PCR-RAPD a PCR-ISSR nastal posun v zoskupovaní populácií, kedy sa v zhlukoch v previazanosti na odrody vyskytujú populácie krajových odrôd a línií.

- Pre techniky PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP ľuľka zemiakového bola nájdená kombinácia prajmerov, ktorá umožňuje efektívne a jednoduché mapovanie medzigénovej DNA pri menovaných technikách prajmermi navrhnutým tak, aby boli komplementárne k obom LTR koncom retrotranspozónu. Týmto spôsobom sme dokázali zmožiť polymorfné úseky medzi retrotranspozómni a aj v ich včleneniach použitím iba jedného namiesto dvojice prajmerov pri technike PCR-IRAP a použitím iba jedného namiesto štvorice prajmerov pri technike PCR-RBIP.

- Tieto techniky sú vysoko polymorfné a F₁ hybridnú kombináciu populácií ľuľka rozdelili do skupín zoskupených okolo genotypov vstupujúcich do kríženia s vyčlenením skupiny medzi nimi. V zoskupení sa odrážajú širšie genetické, šľachtiteľské a environmentálne súvislosti všetkých predkov a ich usporiadania medzigénovej DNA.

- Na základe získaných výsledkov sme vyčlenili populácie, ktoré vykazujú najvyššiu genetickú podobnosť s genotypmi vstupujúcimi do jednotlivých krížení a mohli by byť vhodnými kandidátmi pre využitie v šľachtiteľskom procese. Uvedené populácie môžu

poskytnúť vhodný genetický základ pre ich ďalšie využitie v šľachtiteľských programoch smerom k rozširovaniu biologickej variability pri medziodrodovom krížení. Populácie vyčlenené ako odlišné od predkov môžu byť prínosom pri prekonávaní nevýhod príbuzenského kríženia.

- Porovnaním výsledkov techník PCR-IRAP, PCR-RBIP a PCR-REMAP použitých v práci je možné konštatovať, že prajmery odvodené od retrotranspozónu Tst1 poskytujú vyšší polymorfizmus pri ľuľku zemiakovom, kde tento prajmer vykazuje retranspozičnú aktivitu a spoľahlivo rozlišuje populácie až na úrovni F1 hybridnej populácie. Použitím tohto prajmera v reakciách analýzy súboru ľanu siateho je dosahovaný stredný polymorfizmus a PCR profily sú vyrovnané. Prajмеры odvodené od retrotranspozónu FRODO vykazujú pri oboch druhoch strednú úroveň polymorfizmu.

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

BEŽO, M. – ŠTEFÚNOVA, V. – BEŽOVÁ, K. – KUTIŠOVÁ, J. 2001 Techniky molekulárnej genetiky pri práci s genetickými zdrojmi rastlín. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník zo 6. odborného seminára. Piešťany: VÚVR. 2001. 216 s. ISBN 80 – 88790 – 19 – 0

FLAVELL, A. J. – KNOX, M. – PEARCE, S.R. – ELLIS, T.H. 1998. Retrotransposon based insertion polymorphism (RBPI) for high throughput marker system analysis. In: Plant J. vol 16. 1998, p. 643 -650

GARBER, K. – BILIC, I. – PUSCH, O. – TOHME, J. – BACHMAIR, A. 1999. The Tpv 2 family of retrotransposons of *Phaseolus vulgaris*: structure, integration characteristics, and use of populácii classification. In: Plant. Mol. Biol. vol. 39, 1999, p. 797-807

SWATI P.J. – PRABHAKAR K.R. – VIDYA S.G. 1999. Molecular Markers in Plant Genome Analysis dostupné na: <http://www.ias.ac.in/currsci/jul25/articles15.htm>

KALENDAR, R. – GROB, T. – REGINA, M. – SUONIEMI, A. – SCHULMAN, A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. In: Theor. Appl. Genet., vol. 98. p. 704 – 711

KUMAR, A. – BENNETZEN, J.L. 1999. Plant Retrotransposons. In: Annu. Rew. Genet., vol.33. p. 479 – 532

KUMAR, A. – HIROCHIKA, H. 2001. Application of retrortansposons as genetic tools in plant biology. In: Trends in Science, vol.6. p. 127 – 134

NEI, M. – LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction andonucleases. In: Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 76, 1979, no. 10, p. 5296-5273

PROVAN, J. – THOMAS, W.T.B. – FORSTER, B.P. – POWELL, W. 1999. Copia-SSR: a simple marker technique which can be used on total genomic DNA. In: Genome. Vol. 42, p. 363–366

ROGERS, S.O. – BENDICH, A.J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: GELVIN, S.B. – SCHILPEROORT, R.A.: Plant Molecular Biology Manual D1. Ordrecht, The Netherlands: Kluwer Academics Publishers, 1994, p. D1/1 – D1/8. ISBN 0 – 7923 – 2858 – 2

WELSH, J. – McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. In: Nucleic Acids Res., 1990, 19, 861-866

WILLIAMS, J.G.K. – KUBELIK, A.R. – LIVAK, K.J. – RAFALSKI, J.A. – TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucleic Acid Research*. vol.18, 1990. p. 6531–6535

WIESNER, I. – WIESNEROVÁ, D. – TEJKLOVÁ, E. 2001. Effect of anchor and core sequences in microsatellite primers on flax fingerprinting patterns. In: *Journal of Agriculture Science*. Vol. 137. p. 37 – 44

7. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORKY SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU

Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách a v časopisoch

BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. Retrotranspózy v hodnotení génu rastlín. In: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3.

ŽIAROVSKÁ, J. – BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. , BEŽOVÁ, K. – KUTIŠOVÁ, J. Význam retrotranspozónov v molekulárnych technikách. In: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3.

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V. Využitie polymorfizmu zmnožených úsekov medzi kópiami Tst1 retrotranspozónu pre analýzu F1 hybridov ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.). In: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3.

BEŽO, M. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. Využitie včlenených kópií Tst1 retrotranspozónu pre analýzu F1 hybridov ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.). In: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3.

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – KERTÉZSOVÁ, N. – ŽIAROVSKÁ, J. – BEŽO, M. ml. – ŠTEFÚNOVÁ, V. Využitie retrotranspozónu Tst1 pre zhodnotenie populácií ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.). In: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3.

ŽIAROVSKÁ, J. – BEŽO, M. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽO, M. ml. – HRUBÍKOVÁ, K. PCR-RAPD hodnotenie genofondu ľanu sieteho. In: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3.

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – ŽIAROVSKÁ, J. – KUTIŠOVÁ, J. Genova – genetické inžinierstvo rastlín (výučbový program). In: BIOS 2005 : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-587-3. (CD-ROM)

BEŽO, M. – CANDRÁKOVÁ, A. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. ml.: Identification of flax germplasm collection duplicates using randomly amplified polymorphic dna markers (PCR-RAPD). In: *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 8, 2005, č. 3, s.62-66

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – CANDRÁKOVÁ, A.: Retrotranspozóny, ich význam a využitie v mapovaní genómu organizmov. In: Acta fytotechnica et zootechnica, mimoriadne číslo vy dané z medzin. vedec. konf. XXII Dni genetiky, 2006, s. 74–77.

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – CANDRÁKOVÁ, A.: Retrotranspozóny, ich význam a využitie v mapovaní genómu organizmov. Poster. In: Medzin. Vedec. konf. XXII Dni genetiky, 2006.

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽO, M. ml.: Určenie genetickej vzdialenosti medzi odrodami ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.) na základe polymorfizmu pozícií Tst1 retrotranspozónu. In: Acta fytotechnica et zootechnica no.4, 2005, s. 85-89

BEŽO, M. – CANDRÁKOVÁ, A. – KRALOVIČOVÁ, M. – BEŽO, M. ml. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K.: Genetická analýza DNA ľanu sieteho mikrosatelitmi. In: Acta fytotechnica et zootechnica no. 1, 2006, s. 1- 4

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V.: Variabilita pozícií retrotranspozónu Tst1 v populáciách ľuľka zemiakového s rôznou odolnosťou voči háďatku zemiakovému. In: Poľnohospodárstvo, 53, 2007, s. 73-80

Skriptá a učebné texty

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – KUTIŠOVÁ, J. – ŽIAROVSKÁ, J.: Genetické inžinierstvo rastlín. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. 192 s. ISBN 80-8069-636-3

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – KUTIŠOVÁ, J. – ŽIAROVSKÁ, J.: Genetické inžinierstvo rastlín v obrazoch : časť 1. - 1. vyd. - E-vzdelávanie v genetike. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. (CD-ROM) ISBN 80-8069-627-6

Redakčné a zostavovateľské práce

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – KUTIŠOVÁ, J. – ŽIAROVSKÁ, J.: BIOS 2005 [elektronický zdroj] : biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. Elektronický konferenčný zborník. - Nitra : SPU, 2005. (CD-ROM) ISBN 80-8069-587-3

Vedecké práce publikované v zborníkoch (z konferencií) v medzinárodných - recenzovaných zborníkoch

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V.: Variabilita rozmiestnenia kópii Tst1 retrotranspozónu v hybridnej kombinácii ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.). In: Biotechnology 2006, Zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie. České Budějovice : Scientific Pedagogical Publishing, 2006. Supplements. ISBN 80-85645-54-8 (CD-ROM).

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – ŽIAROVSKÁ, J. – BEŽO, M. ML. – CANDRÁKOVÁ, A.: Plant germplasm evaluation using retrotransposons and microsatellites. In: Biotechnology 2006, Zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie. České Budějovice : Scientific Pedagogical Publishing, 2006, s. 30–35. ISBN 80-85645-54-8 (CD-ROM).

HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – HELDÁK, J.: Retrotransposon as molecular markers of potato genome variability. In: 23rd World Congress of Czechoslovak Society of Arts and Sciences. České Budějovice, 2006, s. 78. ISBN 80-903600-5-X.

ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. – CANDRÁKOVÁ, A. – KERTÉSZOVÁ, N.: The Use of Ty-1 copia and TRIM retrotransposons for flax germplasm analysis. In: Plant Biotechnology: Impact on High Quality Plant Production, Book of Abstract. Stará Lesná, June 10-16. 2007, 2007, s.61. ISBN 978-80-89088-51-5

Vedecké práce publikované v zborníkoch (z konferencií) v domácich - recenzovaných zborníkoch

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – ŽIAROVSKÁ, J. – CANDRÁKOVÁ, A.: Hodnotenie genetickej vzdialenosti medzi populáciami / odrodami ľuľka zemiakového, ľanu siateho a jačmeňa siateho PCR–PCR-ISSR markérmí. In: Nové poznatky z genetiky a šľacht. poľ. rastlín. Zborník z 13. vedec.konf. Piešťany, 2006, s. 103–104. ISBN 80-88872-57-X.

BEŽO, M. ML. – BRINDZA, J. – BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – ŽIAROVSKÁ, J. – CANDRÁKOVÁ, A.: Genetická analýza populácií lipnice lúčnej (*Poa pratensis*, L.) PCR–PCR-ISSR markérmí. In: Nové poznatky z genetiky a šľacht. poľ. rastlín. Zborník z 13. vedec.konf. Piešťany, 2006, s. 105–106. ISBN 80-88872-57-X.

ŽIAROVSKÁ, J. – CANDRÁKOVÁ, A. – BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K.: Analýza medzigénovej DNA ľanu siateho retrotranspozónmi a mikrosatelitmi. In: Zborník z vedeckej konf. doktorandov s medzinár. účasťou. Nitra, 2006, s. 60-62. ISBN 80-8069-782-5.