

Analýza DNA polymorfizmu v genofonde rastlín**Analysis of DNA polymorphism in plant genetic resources****prof. RNDr. Bežo Milan, CSc.****Katedra genetiky a šľachtienia rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov,
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre**

Abstract: The leaves from plantlets, cultivated under *in vitro* conditions, are suitable for genomic DNA isolation of flax (*Linum L.*). Isolated DNA has appropriate quality and yield for PCR. For optimal conditions of PCR was used TaKaRa TaqTM Taq DNA polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japan) with concentration 1,25 U.25 μ l⁻¹, 10 \times dilution of DNA and primers with 60–70 % content of GC.

Key words: Flax, PCR-RAPD, germplasm collection.

3. Riešiteľský kolektív

doc. Ing. Ján Brindza, CSc. – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Ing. Veronika Štefúnová – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Ing. Marián Miko, CSc. – KGŠR, AF, SPU v Nitre, RNDr. Kristína Bežová, CSc. – KGPB, AF, SPU v Nitre, Ing. Ján Gažo, PhD. – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Ing. Ján Petrovic, PhD. – KGŠR, AF, SPU v Nitre, RNDr. Zoltán Balogh, CSc. – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Ing. Jana Kutišová – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Ing. Jana Nôžková – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Ing. Štefan Hajdu – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Alex Oravec – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Beáta Marenčáková – KGŠR, AF, SPU v Nitre, Monika Bírová – KGŠR, AF, SPU v Nitre.

4. Ciele vecnej etapy

Cieľom vecnej etapy v prvom roku jej riešenia bolo vytvoriť systém dopestovania rastlín ľanu (*Linum L.*) v sterilných podmienkach *in vitro* pre izoláciu DNA a optimalizovať PCR-RAPD na určenie genetickej príbuznosti alebo rozdielnosti genotypov v kolekcii genofondu ľanu a okrajových ovocných druhov rastlín z čeľade ružovité.

5. Dosiahnuté výsledky

Vytvoril sa systém množení genotypov ľanu (*Linum L.*) v kultúre *in vitro* podľa schémy "semeno – klíčeneč" pre odber vzoriek na izoláciu DNA. V kultúre *in vitro* bolo pestovaných 6 genotypov ľanu siateho (Flanders, Hjulbro, ED-45, Ilona, Laura, Belinka). Semená boli po povrchovej sterilizácii 6 % chloramínom prenesené do kultúry *in vitro*. Rastliny boli kultivované na médiu podľa Murashige, Skoog (1962) pri teplote 22–24 °C, 16 hodinovej fotoperióde a osvetlení 3000 lx. Listy dopestovaných klíčencov boli vhodné na izoláciu genomickej DNA. Metódou podľa Doyle, Doyle, 1990 (DOYLE, J. J. – DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. In: Focus, 1990, no. 12, p. 13–14) sa zo vzoriek jednotlivých genotypov ľanu izolovalo priemerne 680 ng genomickej DNA z 500 mg čerstvého pletiva.

Optimalizácia podmienok polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) pre RAPD bola posudzovaná z hľadiska značky a koncentrácie DNA polymerázy, riedenia DNA a obsahu guanínu (G) a cytozínu (C) v prajmeroch. Najvhodnejšou polymerázou bola TaKaRa TaqTM (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japonsko) s koncentráciou 1,25 U.25 μ l⁻¹ v reakčnej zmesi, desaťnásobné riedenie DNA a 60–70 % GC obsah v prajmeroch.

V amplifikačných reakciách boli použité tri značky termostabilnej DNA polymerázy. Pri použití DyNAzymeTM II DNA polymerázy (Finnzymes) nebol nasyntetizovaný žiadny produkt. Vo výslednom produkte reakcií s použitím Taq DNA polymerázy (Life Technologies) a TaKaRa TaqTM polymerázy (TaKaRa Shuzo) nebol rozdiel v intenzívnych prúžkoch, RAPD profily boli takmer zhodné. Prehľadnejšie však boli profily výsledných produktov nasyntetizovaných TaKaRa TaqTM polymerázou.

Preto v ďalšom kroku pri optimalizácii koncentrácie polymerázy bola použitá TaKaRa Taq™ polymeráza.

V prípade použitia Taq DNA polymerázy (Life Technologies) boli výrazné prúžky aj v negatívnej kontrole (bez DNA), avšak v prípade použitia TaKaRa Taq™ (TaKaRa Shuzo) polymerázy bola negatívna kontrola bez akéhokoľvek produktu. Keďže sa produkty v negatívnej kontrole objavovali len v prípade prítomnosti Taq DNA polymerázy (Life Technologies), je možné predpokladať, že v reakčnej zmesi boli podmienky pre formáciu multimérov. V reakčných zmesiach, s 1 × riedenou DNA (približne 4–60 ng) sa reakcie neuskutočnili. Medzi produktami reakcií s 10 × riedenou DNA (približne 0,4–6 ng) a 50 × riedenou DNA (približne 0,08–1,2 ng) neboli rozdiely. Pre ďalšie analýzy sa zvolilo 10 násobné riedenie DNA.

Koncentrácia DNA polymerázy sa výrazne podieľala na výsledku amplifikačných reakcií. V prípade použitia prajmera 2/5 a koncentrácie polymerázy 0,75 U.25μl⁻¹ bol amplifikovaný len 1 fragment, v prípade koncentrácie 1 U.25μl⁻¹ boli amplifikované 3 fragmenty, ale pri koncentrácii 1,25 U.25μl⁻¹ bolo elektroforézou rozdelených 6 fragmentov. V prípade použitia prajmera 3/8 boli zistené podobné závislosti. Pri koncentrácii polymerázy 0,75 U.25μl⁻¹ bol nasynetizovaný 1 fragment, pri koncentrácii 1 U.25μl⁻¹ boli nasynetizované 2 fragmenty a pri koncentrácii 1,25 U.25μl⁻¹ to boli 3 fragmenty. Pri rôznych koncentráciách polymerázy boli aj rôzne profily v negatívnych kontrolách (bez DNA). Negatívna kontrola bez PCR produktov bola v prípade koncentrácie 1,25 U.25μl⁻¹, ale v ďalších variantoch (koncentrácia 0,75 a 1 U.25μl⁻¹ v prípade použitia prajmera 3/8; a 1 U.25μl⁻¹ v prípade použitia prajmera 2/5) boli prítomné fragmenty, čo pravdepodobne súvisí s priaznivými podmienkami pre formovanie multimérov prajmerov. Pre konkrétnu polymerázu (TaKaRa Taq™) sa zvolila koncentrácia 1,25 U.25μl⁻¹, jednak z dôvodu dosiahnutia vyššieho počtu amplifikačných produktov a neprítomnosti produktov v negatívnej kontrole.

Použité prajmery mali 50–70 % obsah GC. Dva prajmery (50 a 60 % GC obsah) 1/3 a 1/5 neposkytli amplifikačný produkt, a štyri prajmery (50, 60 a 70 % GC obsah) 1/6, 1/8, 2/5 a 3/8 poskytli amplifikačné produkty. Počet amplifikačných produktov bol však vyšší pri použití prajmerov so 60–70 % GC obsahom v porovnaní s prajmermi s 50 % GC obsahom.

V amplifikačných reakciách (3 mM MgCl₂, 1U Taq DNA polymerázy, Life Technologies, 0,1 mM každý deoxyribonukleotid, 0,4 μM prajmer 2/5 a 3/8, 20 ng DNA) sme nezistili rozdiely medzi DNA genotypov Flanders a Hjulsbro s použitím prajmera 2/5, ale rozdiel v podobe jedného chýbajúceho prúžku pre genotyp Hjulsbro v amplifikačnej reakcii s použitím prajmera 3/8.

6. Realizačné výstupy

6.1 Heslá v domácich slovníkoch – využitie poznatkov teoretickej prípravy na riešenie vecnej etapy pri spracovaní hesiel v slovníku Geneticky modifikované organizmy. Základné pojmy, Ed. J. Duha., Smolenice 2001.

7. Prezentácia výsledkov na vedeckých podujatiach, vo vedeckej a odbornej tlači

AFD

7.1 BEŽO, M. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽOVÁ, K. – KUTIŠOVÁ, J.: Techniky molekulárnej genetiky pri práci s genetickými zdrojmi rastlín. In: UŽÍK, M.: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Piešťany: Výskumný ústav rastlinnej výroby v Piešťanoch, 2001, s. 11–15. ISBN 80-88790-19-0

7.2 BEŽO, M. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽOVÁ, K. – KUTIŠOVÁ, J.: DNA čipy. In: BEŽO, M. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – KUTIŠOVÁ, J.: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. BIOS 2001. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2001, s. 7–12. ISBN 80-7137-915-8.

8. Napojenie doktorandských prác na riešenie problematiky

Ing. Jana Nôžková – Hospodárska významnosť a možnosť ďalšieho využitia udržiavaného genofondu ľanu (*Linum ssp.*).

9. Napojenie študentov na riešenie problematiky formou diplomových prác

9.1 Andrea Korimová – Optimalizácia podmienok kultivácie ľanu siateho v podmienkach *in vitro*.

10. Zahraničná a domáca spolupráca

10.1 Spolupracujúce inštitúcie: nie sú

10.2 Absolvované zahraničné pobyty / účel a prínos:

Účasť členky riešiteľského kolektívu, Ing. Veroniky Štefúnovej na medzinárodnom kurze „FAO/IAEA Interregional Training Course on Mutant Germplasm Characterisation using Molecular Markers“, ktorý organizovala Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture v Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory v Seibersdorfe, v Rakúsku.

Na kurze boli získané teoretické vedomosti a praktické zručnosti z oblasti molekulárnych markérov, zamerané na hodnotenie genetickej diverzity v kolekciách genetických zdrojov – RAPD (polymorfizmus náhodne zmnoženej DNA), RFLP (polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov), SSR (amplifikácia mikrosatelitných úsekov DNA), ISSR (amplifikácia úsekov DNA s prajmermi obsahujúcimi mikrosatelitné sekvencie), AFLP (polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov), IRAP (polymorfizmus amplifikovaných fragmentov medzi retrotranspozónmi), REMAP (polymorfizmus amplifikovaných fragmentov medzi mikrosatelitnými sekvenciami a retrotranspozónmi), ktoré budú využité pri riešení projektu.

11. Návrh na využitie dosiahnutých výsledkov a realizačné výstupy z riešenia problematiky

11.1 Výsledky riešenia hodnotenia polymorfizmu DNA v genofonde ľanu majú uplatnenie pri identifikácii jednotlivých genotypov (odtlačky DNA), určení genetickej príbuznosti, prípadne genetickej vzdialenosti medzi druhmi, genetickom mapovaní a vyhľadávaní genetických markérov hospodársky významných znakov ľanu.

11.2 Realizačným výstupom riešenia vecnej etapy je protokol PCR pre analýzu polymorfizmu DNA (RAPD) genofondu ľanu a diagram genetickej príbuznosti genotypov ľanu.

12. Súhrn

Na izoláciu genomickej DNA v genofonde ľanu (*Linum L.*) je vhodné použiť vzorky listov semenáčikov dopestovaných v podmienkach *in vitro*. Získaná DNA je kvalitou a množstvom vhodná pre PCR. Optimálna amplifikačná reakcia (PCR) pre RAPD v termocyklére MG Research PTC 150 sa uskutočňovala pri použití polymerázy TaKaRa Taq™ (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japonsko) koncentrácii 1,25 U.25µl⁻¹ v reakčnej zmesi, desaťnásobnom riedení DNA a pri použitých prajmeroch s obsahom 60–70 % GC.

13. Kľúčové slová: ľan siaty, PCR-RAPD, genofond.