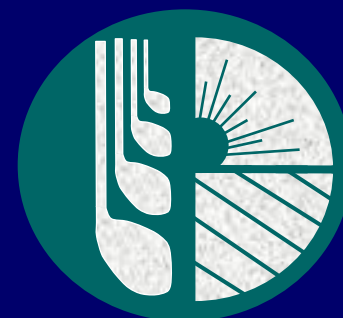


**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA  
UNIVERZITA V NITRE**



**FAKULTA AGROBIOLÓGIE  
A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV**



**KATEDRA GENETIKY  
A ŠĽACHTENIA RASTLÍN**





„PODPORUJEME VYSKUMNÉ AKTIVITY NA SLOVENSKU  
/PROJEKT JE SPOLUFINANCOVANÝ ZO ZDROJOV EÚ“



# Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity (ECOVA)



Aktivita A1.2 Biológia uchovávanania agrobiodiverzity

---

## Hodnotenie agrobiodiverzity rastlín na molekulovej úrovni pomocou Real-Time PCR

BEŽO Milan – RAŽNÁ Katarína – ŽIAROVSKÁ Jana – SENKOVÁ Slavomíra



**Agrobiodiverzita rastlín je rozmanitosť a premenlivosť spojená so zmenami ich genómu.**

**Častou podstatou premenlivosti organizmov sú nestabilné pozície genómu.**

**Transpozóny DNA, retrotranspozóny a ďalšie nestabilné pozície vplyvom podmienok prostredia aktivujú svoju činnosť, ich kópie sa začleňujú do genómu.**



**Analýzou teploty topenia PCR produktu  
v RT PCR určiť**

**(a) retrotranspozón Cassandra  
a (b) oblasť cieľového miesta včlenenia  
LIS prvku genómu ľanu siateho.**

**LIS (Včlenené poradie nukleotidov ľanu – Linum insertion sequence )**

### Retrotraspozón Cassandra

patrí medzi TRIM elementy (Terminal repeat Retrotrasposons In Miniature – Minimalizované RTN s koncovými opakovaniami), ktoré patria do I. triedy LTR neautonómnych RTN. TRIM sú zložené z 100 – 250 bp, priamych koncových opakovaní, ktoré sú totožné s LTR, alebo sú odvodené od LTR.

### LIS (Linum insertion sequence )

je 5,7 kb fragment DNA, ktorého aktivita a následný výskyt v presne definovanom mieste genómu, je dôsledkom špecifického včlenenia.

Prirodzenú schopnosť k environmentálne navodeným zmenám v genóme majú viaceré genotypy ľanu.

Výskyt LIS je špecificky viazaný na citlivé genotypy ľanu siateho schopné pomerne rýchlej genomickej reakcie na zmenu životného prostredia začlenením tohto prvku do typického cieľového miesta.



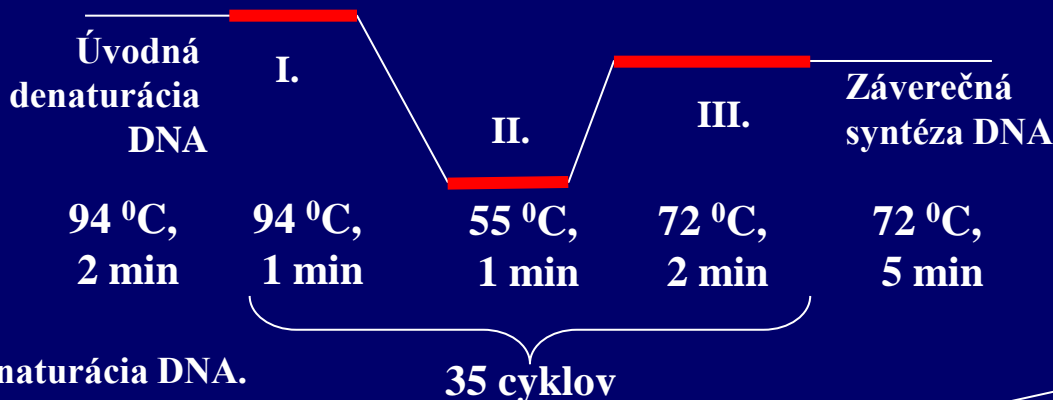
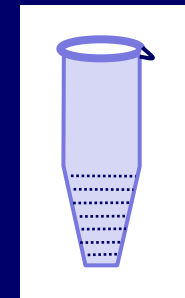
# Izolácia DNA

Invisorb® Spin Plant Mini Kit, INVITEK



# Kvalita a kvantita DNA

Quibit™ Fluorometer Invitrogen



# PCR reakcia

MyCycler™

- I. Denaturácia DNA.
- II. Naviazanie prajmera.
- III. Syntéza polynukleotida DNA.

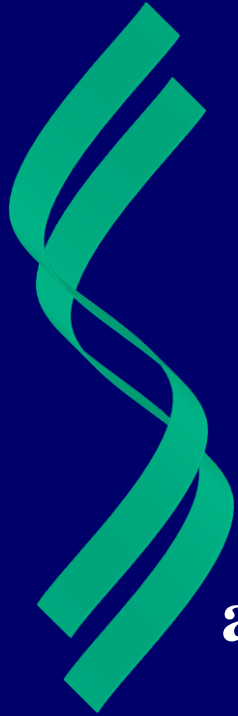
# RT PCR

iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-rad)  
CFX96 Real-time





**System Real-Time PCR (RT PCR) je založený na detekcii fluorescenčného signálu zmnožených produktov v jednotlivých cykloch v priebehu PCR. Zvyšovanie hladiny fluorescencie je priamoúmerne závislé od množstva nasyntetizovaného produktu. Analýza produktov reakcie si nevyžaduje gélovú elektroforézu.**



**V RT PCR bolo použité fluorescenčné farbivo SYBR Green, ktoré sa viaže na dvojret'azcovú molekulu DNA. SYBR Green vysiela silný fluorescenčný signál pri väzbe na dvojret'azcovú molekulu DNA. Pre PCR reakciu je potrebná jej optimalizácia a stanovenie krivky bodu topenia PCR produktu.**

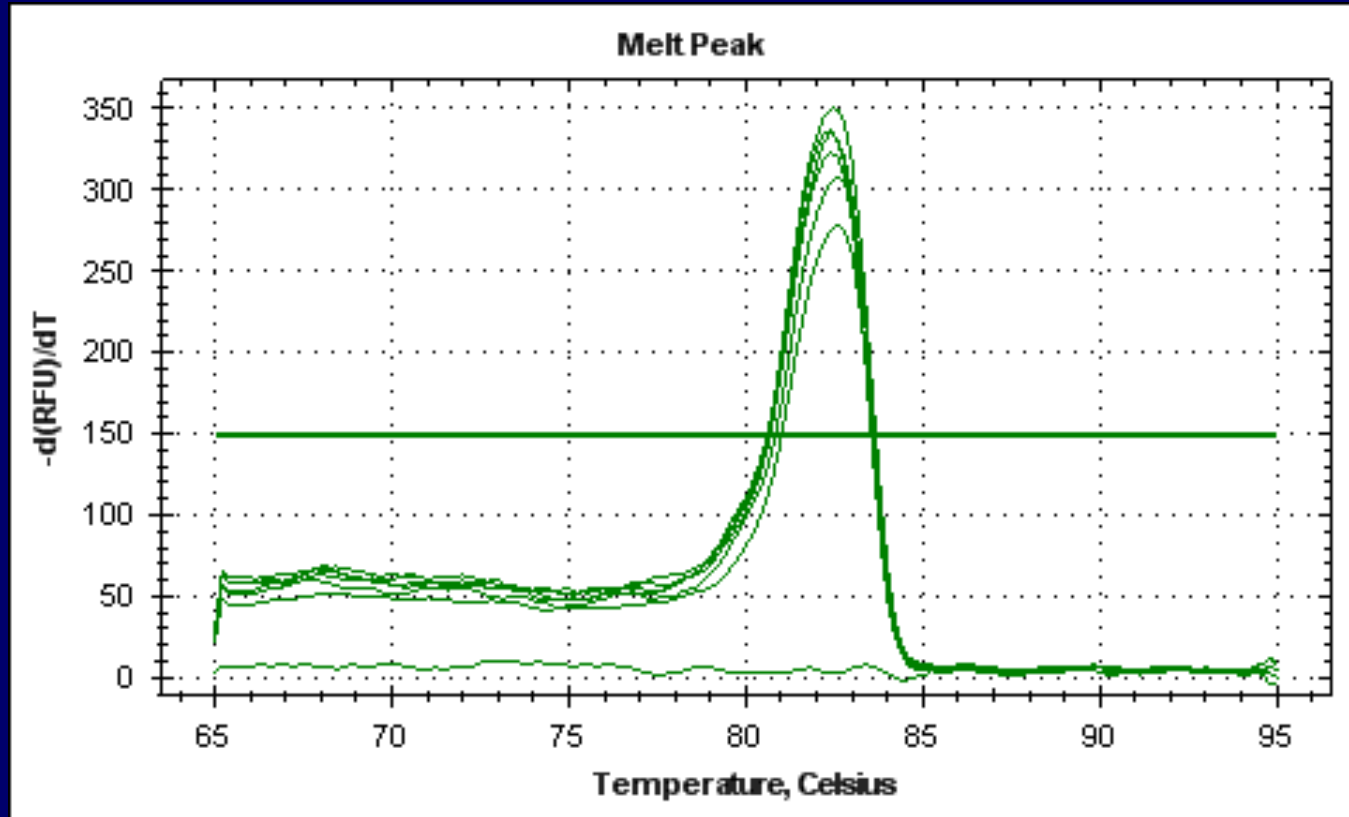




**Navrhnuté prajmery pre RTN Cassandra pre PCR a nukleotidové zloženie zmnoženého úseku Cassandra sú uvedené v článku Žiarovská Jana – Ražná Katarína – Bežo Milan – Senková Slavomíra: Genomická analýza a identifikácia retrotranspozónu Cassandra v kolekcii genetických zdrojov Ľanu siateho. V tlači, 2010.**

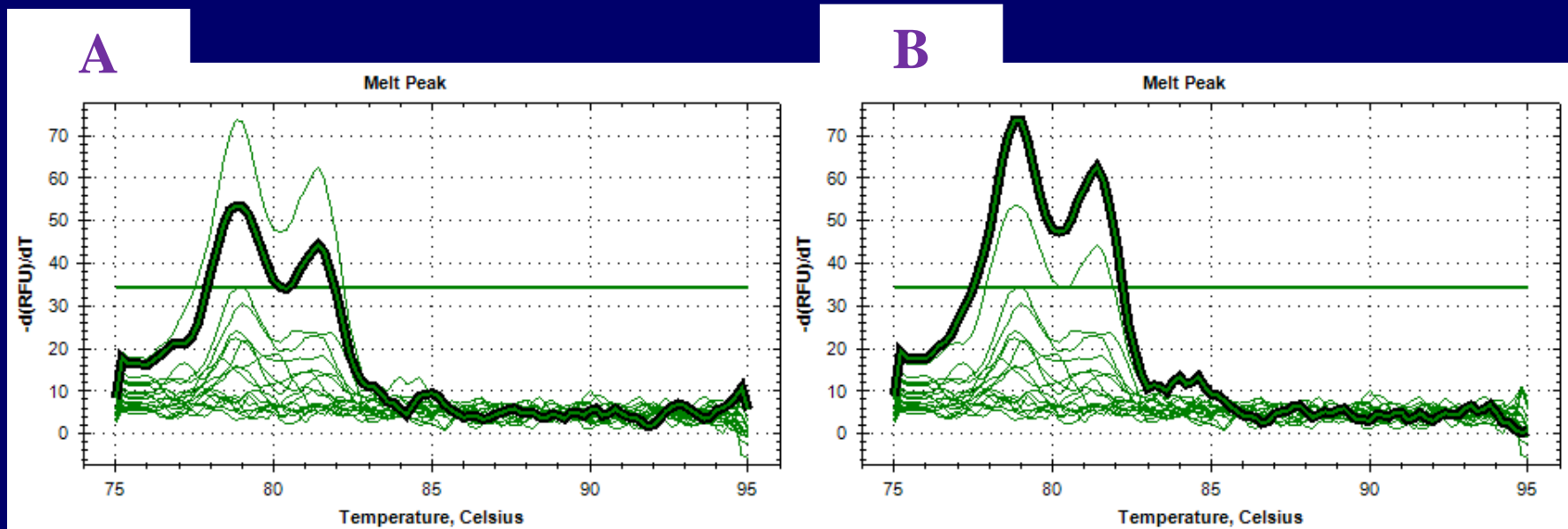
**Navrhnuté prajmery pre LIS pre PCR a nukleotidové zloženie zmnoženého úseku LIS sú uvedené v článku Ražná Katarína – Žiarovská Jana – Bežo Milan – Senková Slavomíra: Zmeny nestabilných pozícií genómu genetických zdrojov Ľanu siateho v stresových podmienkach. V tlači, 2010.**

**Hodnota  $T_m$  bola počítaná softwérom Oligo Calc dostupnom na:  
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>**

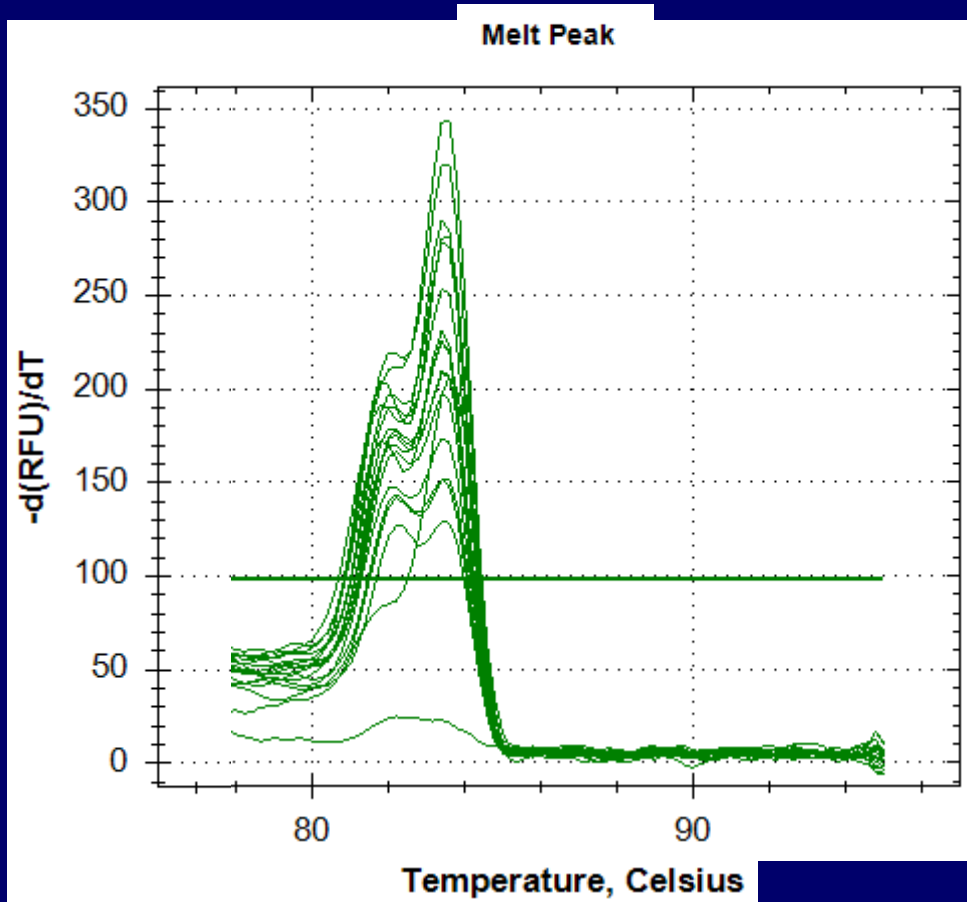


**Identifikácia retrotranspozónu Cassandra v PCR produkte  
analýzou teploty topenia v RT PCR**

**Pre RTN Cassandra je  $T_m$  produktu vypočítaná 82,0–84,0 °C  
experimentálne zistená 82,4–82,6 °C.**



**Analýza teploty topenia  $T_m$  v RT PCR pre PCR produkt miesta včlenenia LIS-1 v genotypoch Rembrant (A) a Gisa (B) ľanu siateho.**



**Identifikácia PCR produktu miesta včlenenia LIS prvku pomocou RT PCR**

**Pre miesto začlenenia LIS je  $T_m$  produktu vypočítaná 78,0–81,0 °C a experimentálne zistená 78,8–81,4 °C.**



**Zistená bola zhoda vypočítanej a experimentálne zistenej teploty topenia PCR ( $T_m$ ) pre namnožený produkt retrotranspozónu Cassandra a miesta včlenenia inzerčného prvku LIS.**

**Pre produkt retrotranspozónu Cassandra bola vypočítaná hodnota  $T_m$  82,0–84,0 °C a experimentálne zistená 82,4–82,6 °C.**

**Potvrdená bola zhoda  $T_m$  vypočítaná 78,0–81,0 °C a experimentálne zistená 78,8 –81,4 °C pre produkt zodpovedajúci miestu včlenenia inzerčného prvku LIS.**

**RT PCR je metóda vhodná na identifikáciu PCR produktov pri hodnotení agrobiodiverzity rastlín na úrovni variability genómu.**



**Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (0,5) a VEGA 1/0112/08 Vývoj molekulových markérov odvodených od tandemovo a rozptýlene sa opakujúcich poradí nukleotidov v genóme ľanu siateho (0,5).**

*Ďakujem  
za pozornosť*

*Milan Bežo*