

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 73 – 80

VYUŽITIE METÓDY CAPS NA DETEKCIU POLYMORFIZMU REŠTRIKČNÝCH MIEST GBSSI GÉNU MUTANTNÝCH LÍNIÍ LÁSKAVCA

THE USE OF CAPS METHOD TO DETECT POLYMORPHISMS OF RESTRICTION SITES IN GBSSI GENE OF AMARANTH MUTANT LINES

Mária LABAJOVÁ,¹ Katarína RAŽNÁ,¹ Alena GAJDOŠOVÁ,² Andrea HRICOVÁ²

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre¹
Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre²

The aim of presented paper was to detect the *GBSSI* gene. Concretely, the detection of polymorphisms in restriction sites using restriction endonuclease *HpaII* was performed. Firstly, four parts of the *GBSSI* gene were amplified in PCR reactions, and then the amplified parts of the *GBSSI* gene were digested using restriction endonuclease *HpaII*. The presence of the restriction site 5'CCGG 3' was confirmed in control genotypes, and in the lines of amaranth exposed to radiation-induced mutagenesis as well. The cleavage in all amaranth mutant lines and their controls, two fragments were cleaved. In the part of the *GBSSI* gene with the size of 1255 bp – 2 725 bp (primer *GBSSI* 1) there were two fragments with the size of 1 261 bp and 229 bp; in the part of the *GBSSI* gene with the size of 1 bp – 1 098 bp (primer *GBSSI* 3) there were two fragments with the size of 797 bp and 301 bp; and in the part of the *GBSSI* gene with the size of 2548 bp – 3461 bp (primer *GBSSI* 4) there were two fragments with the size of 215 bp and 692 bp.

Keywords: amaranth *GBSSI* gene, PCR, restriction cleavage, mutant lines

Prístupy a techniky molekulárnych analýz v súčasnosti poskytujú metodickú oporu najširšiemu spektru hodnotenia biologického materiálu cez sledovanie a popisovanie epidemiologických zmien v ľudskej populácii (Zeleňáková et al., 2011, 2012a,b), vyhodnocovanie pravosti a autentifikácie potravín (Revák et al., 2011; Židek et al., 2012) až po hodnotenie rozmanitosti genofondu kultúrnych či voľne rastúcich rastlín (Bežo et al., 2005; Hrubíková et al., 2007; Oslovičová et al., 2010; Vívodík et al., 2011; Žiarovská, 2003).

Techniky molekulárnej genetiky umožňujú aj priamu analýzu konkrétnych génov rastlinného organizmu zodpovedných za hospodársky významné vlastnosti. Jedným z predmetov molekulárnych analýz láskavca je *GBSSI* gén (granule bound starch synthetase I) – *waxy* gén. Štruktúra génu *GBSSI* pre láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.), ktorý je v databáze NCBI evidovaný pod kódom AB456685, je uvedená na obrázku

1. *GBSSI* gén má 3492 bp, 12 intrónov a 13 exónov. Tento gén bol zaznamenaný aj v genóme iných druhov napr. pšenica letná (*Triticum aestivum* L.) v databáze NCBI uvedený pod kódom AF286320, ryža siata (*Oryza sativa* L.) AF141955 a i., kukurica siata (*Zea mays* L.) HQ423245, a iné. Zaznamenaný bol aj v genómoch iných druhov rodu láskavec, ako napr. láskavec chvostnatý (*Amaranthus caudatus* L.) a láskavec smutný (*Amaranthus hypochondriacus* L.).

Pomocou BLAST analýzy bol v *GBSSI* géne zaznamenaný vysoký stupeň podobnosti na základe aminokyselinových sekvencií medzi láskavcom a ostatnými rastlinnými druhmi (Park et al., 2009).

GBSSI gén, tiež známy ako *waxy* bielkovina, je zodpovedný za syntézu amylozy v amyloplastoch rastlinných zásobných orgánoch (James et al., 2003; Tsai 1974). Produkcia amylozy je kontrolovaná len jedným hlavným štruktúrnym génom *waxy*



Obrázok 1 Schematické znázornenie *GBSSI* génu. Obdĺžniky reprezentujú exóny a čiary medzi nimi intróny. CDS – kódujúce oblasti génu sú nasledujúce (bp) 1–330, 503–423, 596–694, 873–784, 1238–1301, 1416–1516, 1598–1707, 1784–2027, 2116–2292, 2422–2613, 2707–2793, 2899–3027, 3121–3237

Zdroj: Park et al., 2009

Figure 1 Schematic depiction of the *GBSSI* gene. The rectangles represent exons, and lines between them represent introns. CDS – coding regions of the gene are as follows (bp) 1–330, 503–423, 596–694, 873–784, 1238–1301, 1416–1516, 1598–1707, 1784–2027, 2116–2292, 2422–2613, 2707–2793, 2899–3027, 3121–3237

Source: Park et al., 2009

(GBSSI) s waxy recesívnou alelou k dominantnej waxy alele (Konishi et al., 1985; Okuno a Sakaguchi 1981; Park et al., 2009; Sugimoto et al., 1981). Nachádza sa na waxy lokuse (Park et al., 2009). Škrob je lokalizovaný v bunkách perispermu, v ktorých sa tvoria veľmi malé škrobové zrná s priemerom 1–2 µm (Macone, 2001). V súčasnosti je známych len málo dostupných informácií, ktoré poukazujú na genetickú kontrolu veľkosti zŕn (Lindeboom, Chang and Tyler, 2004). V *Amaranthus cruentus* L. podobne ako aj v *Amaranthus hypochondriacus* L. boli pozorované dva typy škrobu nevoskový typ (non-waxy) s obsahom amylozy 19,4 – 27,8 %, teda perisperm tohto typu obsahuje aktívny GBSSI gén a voskový (waxy) s obsahom 0 % amylozy neaktívny (Inouchi et al. 1999; Park et al., 2009).

Park et al. (2010) sledovali variabilitu waxy génu v troch rozdielnych druhoch rodu láskavec (*Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus cruentus* L. a *Amaranthus hypochondriacus* L.), pričom porovnaním ich nukleotidovej sekvencie bol zaznamenaný vysoký stupeň podobnosti. Mutácie GBSSI génu v podstate vylučujú alebo redukujú obsah amylozy v škrobe narušením expície alebo znížením funkcie GBSSI génu (Park et al., 2011). Nakurama et al. (1998) ukázal významné rozdiely v aktivite GBSSI génu medzi endospermom waxy a non-waxy typom pšenice. Fujita et al. (1998) zistili, že nebola detegovaná žiadna aktivita GBSSI génu vo waxy mutantoch pšenica jednozrná (*Triticum monococum* L.). Tento gén a pochopenie jeho expície predstavuje hlavnú úlohu v stanovovaní funkcie v potravinárskom a nepotravinárskom priemysle. Preto zlepšovanie kvality škrobu a funkcie závisí na pochopení činnosti a účinkov tohto génu. Pre efektívne využívanie genetických zdrojov, tvorbu nových kmeňov s rozdielnym zložením škrobu, je potrebná analýza genetickej diverzity z rozličných regiónov (Park et al., 2009; Park et al., 2011).

Cieľom práce bolo vypracovanie protokolu identifikácie a detekcie génu GBSSI pri krokovom zmožení pomocou PCR reakcie a analýza prítomnosti reštrikčných miest štiepenia

enzýmom HpaI deviatich mutantných línií láskavca a dvoch kontrolných genotypov.

Materiál a metódy

Použitý biologický materiál (tabuľka 1) rodu láskavec *Amaranthus* L. bol reprezentovaný genotypom Fica druhu *Amaranthus cruentus* L. a hybridom K-433, ktorý je výsledkom medzidruhového kríženia druhov láskavec hybridný (*Amaranthus hybridus* L.) a láskavec smutný (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Semenný biologický materiál je výsledkom indukovanej mutagenézy 8 generácia (radiálneho – γ žiarenia v dávke 175 Gy), pričom jednotlivé línie sa vyznačujú štatisticky preukazne zvýšeným hmotnosť tisíc semien (HTS) (Gajdošová, 2008). Biologický materiál bol poskytnutý Ústavom genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre.

Genotyp Fica je charakterizovaný ako poloskorá odroda s veľkými semenami, svetlej farby s hmotnosťou tisícich zŕn 0,85 g. Hybrid K-433 bol vytvorený v Rodalo Research Centre v Pensylvánii v USA ako produkt medzidruhového kríženia druhov *Amaranthus hybridus* L. a *Amaranthus hypochondriacus* L. Charakterizovaný je ako poloskorá odroda s veľkými semenami, svetlej farby s hmotnosťou tisícich zŕn 0,73 g.

Pre účely amplifikácie GBSSI génu boli zo semenného materiálu dopestované rastliny v *in vitro* podmienkach na kultivačnom médiu. DNA bola izolovaná zo zelených častí 7-dňových klíčencov izolačnou súpravou Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex).

Prajmery pre zmoženie génu (tabuľka 2) boli navrhnuté autormi Park et al. (2009) a na základe sekvencie génu GBSSI pre *Amaranthus cruentus* L. s veľkosťou 3 492 bp, ktorý je v databáze NCBI uložený pod prístupovým kódom AB456685.

Dvojica prajmerov GBSSI 1 zabezpečuje zmoženie úseku 1 255 – 2 725 bp, poradia nukleotidov GBSSI génu, dvojica

Tabuľka 1 Charakteristika použitého biologického materiálu láskavca

| Mutantná línia (1) | Pôvod mutantných línií (2) |
|---|--|
| C 15/1; C 26/2; C 26/3; C 27/5 C 82/1; C 236/1 Kontrola A | genotyp Fica, láskavec metlinatý (<i>Amaranthus cruentus</i> L.) |
| D 54/1; D 279/1; D 282/1 Kontrola B | hybrid K-433, ktorý je výsledkom interšpecifickej hybridizácie druhov láskavec smutný (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.) × láskavec hybridný (<i>Amaranthus hybridus</i> Lindl.) |

Table 1 Characteristics of amaranth biological material used in the work
(1) mutant line, (2) origin of mutant lines

Tabuľka 2 Sekvencie prajmerov a teplota naväzovania jednotlivých dvojíc

| Označenie prajmera (1) | Sekvencia prajmera (2) | Teplota naväzovania (3) |
|------------------------|----------------------------|-------------------------|
| GBSSI 1 F | CAGGCAGCTTTGGAGGCACCA | 68 °C |
| GBSSI 1 R | TGGAGGCTACCACAGGCACCT | 68 °C |
| GBSSI 2 F | TTCAGGCCAGGGGACACCGT | 65 °C |
| GBSSI 2 R | CGTGGGTAGTCCGCCAAGGC | 65 °C |
| GBSSI 3 F | ATGGAAACAGTAACATCTTCTCACT | 61 °C |
| GBSSI 3 R | CATCTTTTCATAGAATAGCCAAGTCA | 61 °C |
| GBSSI 4 F | ATGTTAATCTAGCAGATTGGA | 57 °C |
| GBSSI 4 R | CTTTGTGAATTTGTTGTTGAATA | 57 °C |

Table 2 The sequences of primers and their annealing temperature
(1) name of primer, (2) sequence of primer, (3) annealing temperature of primer

Tabuľka 3 Časový a teplotný profil PCR zmoženia úsekov *GBSSI* génu

| Fáza CAPS reakcie (1) | Časový interval (2) | Teplota (3) | Počet opakovaní (4) |
|-------------------------|---------------------|-------------|---------------------|
| Úvodná denaturácia (5) | 3 minúty | 95 °C | – |
| Denaturácia (6) | 15 sekúnd | 95 °C | 32 |
| Naviazanie prajmera (7) | 40 sekúnd | 57–68 °C | |
| Polymerizácia (8) | 2 minúty | 72 °C | |
| Polymerizácia (8) | 7 minút | 72 °C | – |
| Chladenie (9) | 10 minút | 4 °C | – |

Table 3 Time and temperature profile of PCR for amplification of the *GBSSI* gene (1) steps of *GBSSI* reaction, (2) time profile, (3) temperature profile, (4) number of cycle, (5) initial denaturation, (6) denaturation, (7) annealing, (8) extension, (8) final extension, (9) cooling

GBSSI 2 úseku 437 – 1 659 bp, dvojica *GBSSI* 3 úsek 1 – 1 098 bp a dvojica prajmerov *GBSSI* 4 zabezpečuje zmoženie úseku 2548bp – 3461 bp poradia nukleotidov *GBSSI* génu láskavca.

PCR reakcie prebiehali v tlmivom ustálenom roztoku 1× PCR obsahujúcom: 100 mmol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,8), 500 mmol.dm⁻³ KCl a 1,5 mmol.dm⁻³ MgCl₂ (Applichem), spolu s 0,2 mmol.dm⁻³ d NTP (InvitrogenTM, Life Technologies), prajmerom 450 nmol.dm⁻³ prajmer (Microsynth), 1 U *Taq* polymerázy (Applichem) a 50 ng.µl⁻¹ DNA v celkovom objeme 15 µl za podmienok uvedených v tabuľke 3.

PCR produkty boli vystavené štiepeniu pomocou reštrikčnej endonukleázy *Hpa*II. Štiepenie prebiehalo v tlmivom ustálenom roztoku 1× Buffer Tango™ obsahujúcom 33 mmol.dm⁻³ Tris-acetát (pH 7,9), 10 mmol.dm⁻³ octan horečnatý, 66 mmol.dm⁻³ draselný acetát, 0,1 mg.ml⁻¹ BSA (Fermentas – Life science), spolu s 10 U.µl⁻¹ *Hpa*II dodávaný v 10mmol Tris-HCl (pH 7,4; 25 °C), 100 mmol.dm⁻³ NaCl, 1 mmol.dm⁻³ DTT, EDTA, 0,2 mg.ml⁻¹ BSA a 50 % glycerol), DNA a vodou. Štiepenie prebehlo pri teplote 37 °C počas 14 hodín v termoboxe. Štiepne produkty boli ďalej elektroforeticky spracované a vyhodnocované. Štiepne fragmenty pre stanovenie prítomnosti alebo absencie ampflikovanej časti génu boli elektroforeticky rozdeľované v 2% agarózovom géli 1× TBE. Pre určenie veľkosti štiepných fragmentov bol použitý markér Lonza 50 – 2 500 bp. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 65 V. Fotodokumentácia elektroforeogramov bola realizovaná zariadením G.Box. Elektroforeogramy boli spracované pomocou GeneSnap – verzia: 7.09 (Syngene) a GeneTools – verzia: 4.01 (Syngene). Profily boli vyhodnocované z hľadiska prítomnosti alebo neprítomnosti žiadaných štiepných produktov.

Výsledky a diskusia

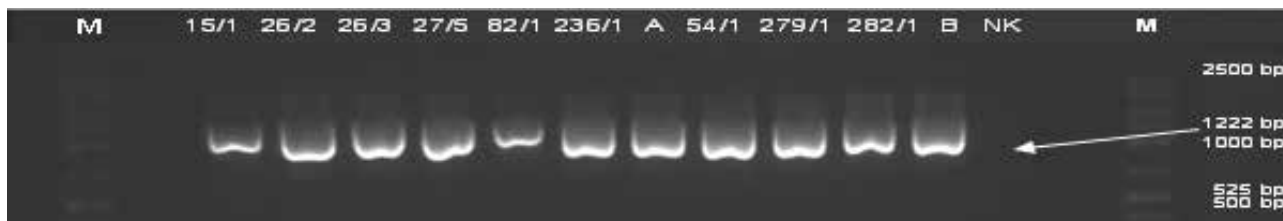
Poznatky o genetickej rozmanitosti a vzťahoch medzi a v rámci kultúrnych druhov a ich voľne rastúcich príbuzných sú nevyhnutné najmä z hľadiska efektívneho budovania a využívania jednotlivých kolekcií genetických zdrojov rastlín (Chan and Sun, 1997).

V prípade zrnových typov láskavca sú až po súčasnosť stále platné dve hypotézy ich evolučného vývinu (Sauer, 1967). Prvou je hypotéza, že všetky tri zrnové typy láskavca boli domestikované z voľne rastúcich druhov nezávisle od seba na troch odlišných územiach – *Amaranthus caudatus* L. z láskavca ecuadorský (*Amaranthus quitensis* Kunth. in H., B. et. K.) v Južnej Amerike, *Amaranthus cruentus* L. z *Amaranthus hybridus* L. v Strednej Amerike a *Amaranthus hypochondriacus* L. z láskavca zelenoklasý (*Amaranthus powellii* S. Watson) v Mexiku.

Molekulárne analýzy jednotlivých zložiek genómu láskavca sú teda žiaducim nástrojom s potenciálom objasniť niektorú z platných hypotéz. Bližšia charakteristika evolučných vzťahov jednotlivých druhov rodu láskavec so zameraním sa na stanovenie vzťahov medzi jednotlivými kultivovanými aj voľne rastúcimi druhmi bola uskutočnená pomocou RAPD markérov a izoenzymov (Chan and Sun, 1997), AFLP a ISSR markérov (Xu and Sun, 2001), ako aj metodikami mikromorfológie (Costea et al., 2006).

Gén *GBSSI* pre *Amaranthus cruentus* L. s veľkosťou 3 492 bp je v databáze NCBI evidovaný pod prístupovým kódom AB456685.1. *GBSSI* gén je zodpovedný za syntézu škrobu. Patrí medzi intenzívne študovaný gén láskavca podieľajúcich

**Obrázok 2** Zmoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 1 – 1 098 bp prajmerom *GBSSI* 3 M – markér Lonza 50 – 2 500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavca metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola**Figure 2** Amplification of part of the *GBSSI* gene 1 – 1 098 bp with primer *GBSSI* 3 M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

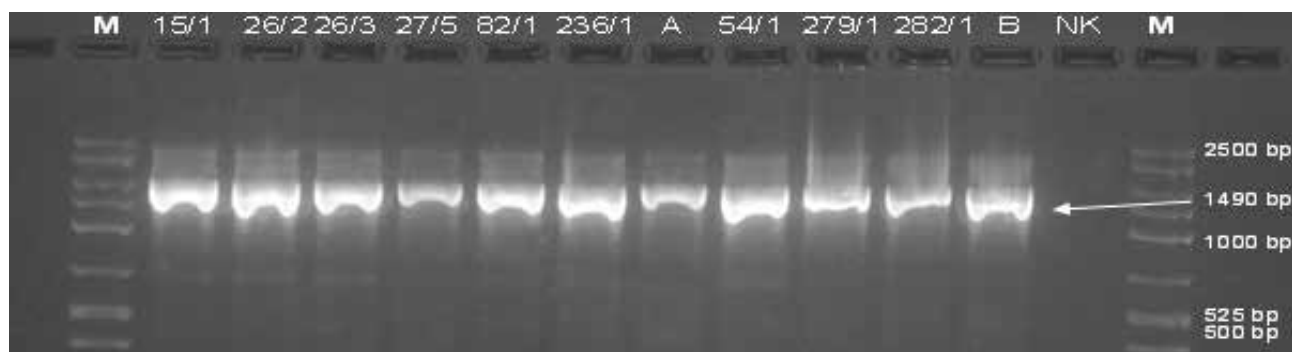


Obrázok 3 Zmnoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 437 – 1 659 bp prajmerom *GBSSI* 2

M – markér Lonza 50–2500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 3 Amplification of part of the *GBSSI* gene 437 – 1 659 bp with primer *GBSSI* 2

M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

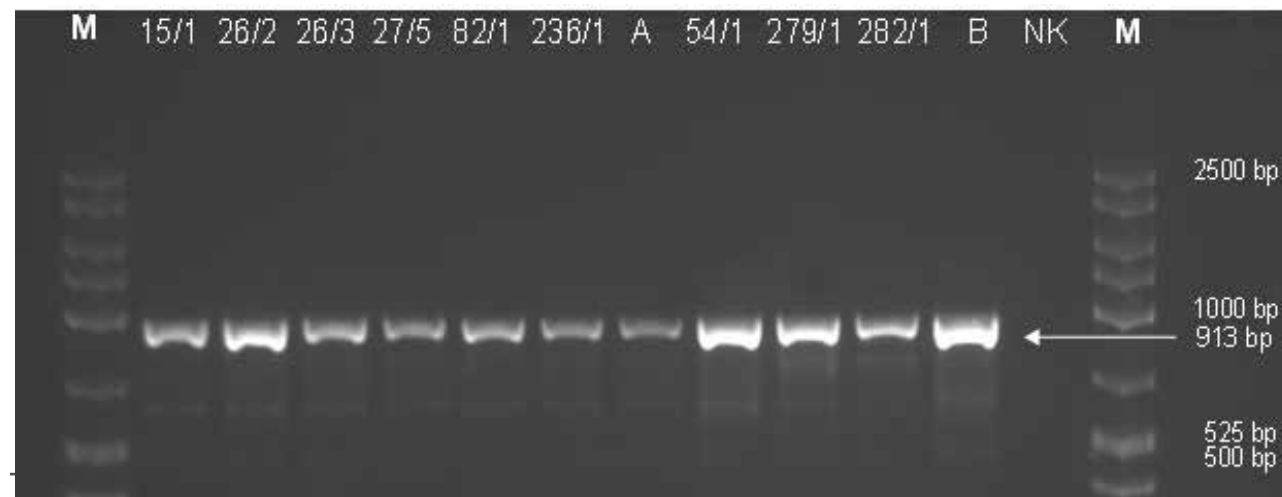


Obrázok 4 Zmnoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 1255 – 2 725 bp prajmerom *GBSSI* 1

M – markér Lonza 50–2500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 4 Amplification of part of the *GBSSI* gene 1 255 – 2 725 bp with primer *GBSSI* 1

M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control



Obrázok 5 Zmnoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 2 548 – 3 461 bp prajmerom *GBSSI* 4

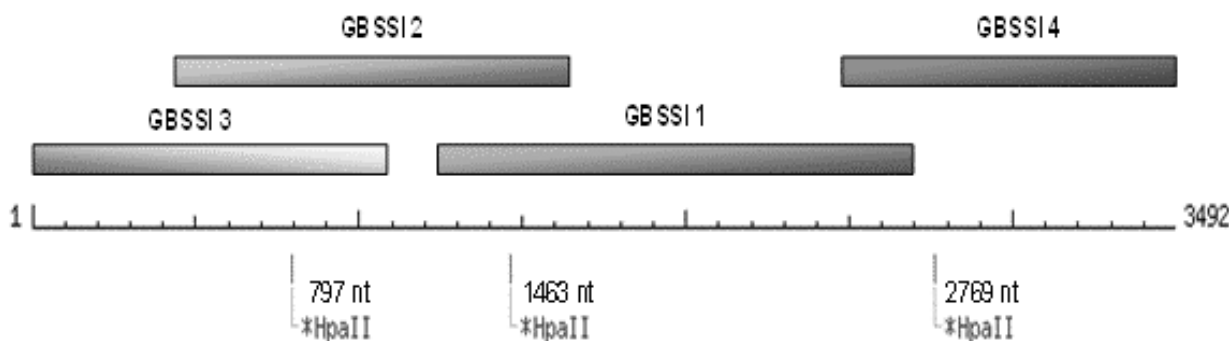
M – markér Lonza 50–2500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 5 Amplification of part of the *GBSSI* gene 2 792 – 3 461 bp with primer *GBSSI* 4

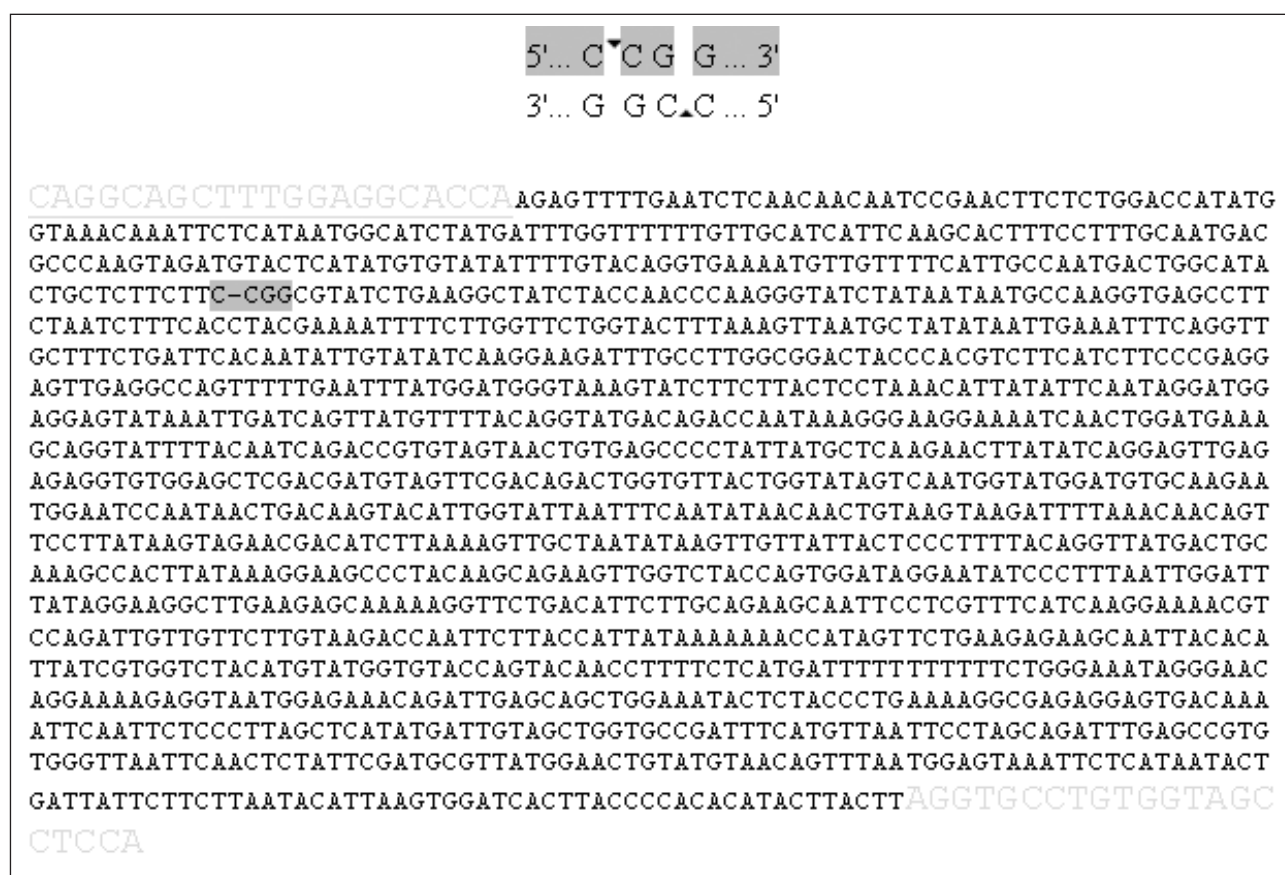
M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

sa na tvorbe zásobných látok (škrobu). Práve zmena poradia nukleotidov v tomto géne môže podmieňovať zvýšenie HTS, napríklad v dôsledku zmeny syntézy škrobu, za ktorý je daný gén zodpovedný.

Pre zmnoženie celého *GBSSI* génu boli použité prajmery s označením: *GBSSI* 1, *GBSSI* 2, *GBSSI* 3, *GBSSI* 4. Sekvencia s veľkosťou a vyznačením jednotlivých prajmerov je znázornená na obrázku 6.



Obrázok 6 Mapa reštrikčných miest použitej endonukleázy *HpaII* na *GBSSI* géne láskavca
Figure 6 Map of restriction sites with used endonuclease *HpaII* for the amaranth *GBSSI* gene



Obrázok 7 Reštrikčné miesto štiepenia úseku 1 255 – 2 725 bp *GBSSI* génu RE *HpaII*
Figure 7 Restriction site for cleavage of 1 255 – 2 725 bp segment of the *GBSSI* gene RE *HpaII*

Na analýzu potenciálnych zmien v géne *GBSSI* láskavca genotypu Fichta – *Amaranthus cruentus* L. a hybridu K-433 (*Amaranthus hybridus* L. × *Amaranthus hypochondriacus* L.) bola použitá PCR reakcia – zmoženie jednotlivých oblastí *GBSSI* génu a ich následné reštrikčné štiepenie.

Pomocou navrhnutých prajmerov boli krokovo zmožnené samostatne štyri úseky *GBSSI* génu láskavca (obrázky 2 – 5).

Pre štiepenie génu bol vybraný reštrikčný enzým *HpaII*, ktorý sa vyznačuje citlivosťou na CpG metyláciu. Štiepenie *GBSSI* génu pomocou RE *HpaII* prebehlo po predchádzajúcej analýze sekvencie *GBSSI* génu v programe NEBcutter2 voľne dostupnom na internete (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), kde bola zostrojená mapa reštrikčných miest (obr. 6) pre *HpaII* endonukleázy.

Na obrázku 7 je zobrazené štiepne miesto úseku 1 255 – 2 725bp *GBSSI* génu reštrikčného enzýmu *HpaII*, ktorý sa vyznačuje citlivosťou na CpG metyláciu.

Na základe elektroforeogramu (obrázok 8) zostrojeného po reštrikčnom štiepení vybranou reštrikčnou endonukleázou *HpaII* bolo zistené, že príslušný enzým štiepil v úseku génu s veľkosťou 1 255 – 2 725 bp vo všetkých vzorkách mutačných línií a ich kontrol rovnako. Výsledkom boli dva štiepne produkty s veľkosťou 1 261 a 229 bp. Podobne to bolo aj v úseku génu s veľkosťou 1 – 1 098 bp (prajmer *GBSSI* 3), kde výsledkom boli dva fragmenty veľkosti 797 bp a 301 bp a v úseku génu s veľkosťou 2 548 – 3 461 bp (prajmer *GBSSI* 4) to bolo fragmenty veľkosti 215 bp a 692 bp.



Obrázok 8 Štiepenie úseku génu s veľkosťou 1 255 – 2 725 bp pomocou RE – *HpaI*

M – markér Lonza 50 – 2 500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavca metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 8 Cleavage of the *GBSSI* gene segment 1 255 – 2 725 bp with RE – *HpaI*

M – Marker Lonza 50 – 2 500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

Výsledkom štiepenia je, že v dôsledku aplikovanej mutácie v podobe radiačného žiarenia nedošlo ku zmenám – mutácii na úrovni nukleotidov v miestach reštrikčného štiepenia pomocou *HpaI* enzýmu v sekvencii *GBSSI* génu láskavca.

Hricová et al. (2011) realizovala biochemický výskum mutantných línií druhov *Amaranthus cruentus* L. genotypu 'Ficha' a hybridu K-433. Nutričné hodnoty vybraných mutantných línií v porovnaní s ich kontrolnými zostávajú bez výraznejšej zmeny s výnimkou mutačnej línie C82/1.

Múdry et al. (2011) analyzoval polymorfizmus enzýmov mutantných línií genotypu Ficha a mutantných línií hybridu K-433. Najlepší výsledok bol pozorovaný v prípade fosfoglukomutázy, kde boli oba genotypy navzájom odlišené.

Ray and Roy (2009) využili RAPD a SCAR markéry na stanovenie genetickej diverzity medzi viacerými druhmi láskavca. RAPD prajmery zabezpečili produkciu tvorby celkovo 262 amplifikovaných produktov, z ktorých 96,94 % bolo polymorfnych. Priemerná hodnota koeficientu podobnosti medzi sledovanými druhmi láskavca predstavovala hodnotu 0,56. Na základe tejto hodnoty koeficientu je zrejme, že existuje variabilita medzi rozdielnymi populáciami. SCAR markéry označili ako potencionálne užitočné pre ochranu genetických zdrojov a identifikáciu ekotypov láskavca.

Park et al. (2010) sa vo svojej práci zamerali na zistenie prítomnosti a popis polymorfnych miest v poradíach nukleotidov *waxy* génov troch druhov láskavca. Porovnaním získaných sekvencií autori popísali celkovo 16 polymorfnych miest v kódujúcich úsekoch aj intrónoch, pričom väčšina bola charakteru SNP a/alebo inzercií a delécií. Jednonukleotidový polymorfizmus – SNP v kódujúcich úsekoch bol nájdený v exónoch 10 a 13, ale nevedie k zmenám v zložení aminokyselín a ani k zmenám v dozrievaní tejto bielkoviny či k ovplyvneniu jej enzymatickej aktivity. Krátke indel zmeny (delécia alebo inzercia) boli popísané v intróne 4 – konkrétne delécie 8 a 3 bp. Podobné krátke delécie existujú aj v iných rastlinných druhoch ako láskavca a vo väčšine z hľadiska na ich lokalizáciu neovplyvňujú fenotyp (Domon et

al., 2002b; Fukunaga et al., 2002; Van et al., 2008). V týchto oblastiach bolo nájdených aj niekoľko krátkych prvkov charakteru transpozónových sekvencií a rovnako ako indel zmeny, aj tieto sú zaznamenané pri viacerých rastlinných druhoch zahŕňajúc ryžu (Mochizuki et al., 1992), kukuricu (Bureau a Wessler, 1992) a proso (Fukunaga et al., 2002; Kawase et al., 2005). Molekulárna charakteristika *waxy* alel viacerých rastlinných druhov poukazuje na rôznu príčinu ich vzniku. V prípade kukurice a prosa *waxy* mutácie vznikli spontánne ako dôsledok transpozíčnej aktivity (Fedoroff et al., 1983; Wessler a Varagona, 1985; Fukunaga et al., 2002). V prípade ryže ide o dôsledok nukleotidovej substitúcie vyúsťujúci v aberáciu a zostrih 5' konca intrónu 1 (Cai et al., 1998; Hirano et al., 1998; Wang et al., 1995). V prípade pšenice existujú významné delécie génu tohto proteínu v kódujúcich oblastiach (Vrinten et al., 1999) a pri prose je *waxy* fenotyp dôsledkom delécie 5' terminálnej časti génu (Domon et al., 2002a). Testovanie diverzity genómu láskavca na molekulárnej úrovni pomocou molekulárnych markérov je účinné a je v súčasnosti vo vysokej miere používané (Park, Lee and Kim, 2009).

Záver

Reštrikčné štiepenie PCR fragmentov predstavuje efektívny nástroj druhovo špecifických analýz, ktorý efektívne a v krátkom čase umožňuje identifikáciu prítomnosti a/alebo zmeny konkrétnych poradí nukleotidov v rastlinných genómoch. Potvrdenie reštrikčného miesta *HpaI* enzýmu v *GBSSI* géne láskavca v prípade kontrolných vzoriek aj mutantných línií ukázalo, že tento úsek poradia nukleotidov nebol pozmenený v dôsledku radiačnej mutagenézy, čo dáva predpoklad pre jeho využitie v konštrukcii prajmerov ďalších molekulárnych analýz *GBSSI* génu.

Súhrn

V práci bola realizovaná detekcia *GBSSI* génu zo zámerom sledovania polymorfizmu v reštrikčných miestach pôsobenia

reštrikčnej endonukleázy *HpaII* s využitím zmnoženia štyroch úsekov *GBSSI* génu laskavca PCR reakciou a následné štiepenie produktov príslušnou reštrikčnou endonukleázou *HpaII*. Prítomnosť rozoznávateľného miesta štiepenia 5'CCGG3' bola potvrdená ako pre kontrolné genotypy, tak aj pre línie laskavca. Vo všetkých sledovaných mutačných líniiach a ich kontrolách boli vyštiepené dva fragmenty v úseku génu s veľkosťou 1 255 – 2 725 bp (prajmer *GBSSI* 1) to bolo fragmenty veľkosti 1 261 bp a 229 bp, v úseku génu s veľkosťou 1 – 1 098 bp (prajmer *GBSSI* 3) to bolo fragmenty veľkosti 797 bp a 301 bp a v úseku génu s veľkosťou 2 548 – 3 461 bp (prajmer *GBSSI* 4) to bolo fragmenty veľkosti 215 bp a 692 bp.

Kľúčové slová: *GBSSI* gén laskavca, PCR, reštrikčné štiepenie, mutantné línie

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a výskumnou úlohou VEGA 2/0109/09.

Literatúra

- BEŽO, M. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. 2005. Využitie včlenených kópií *Tst1* retrotranspozónu pre analýzu F1 hybridov ľulka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.) = : The *Tst1* retrotransposon in inserted copies in the potato (*Solanum tuberosum* L.) F1 hybrids analysis. In BIOS 2005. Nitra : SPU, 2005. s. 87–91.
- BUREAU, T. – WESSLER, S. 1992. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes, In: Plant Cell, vol. 4, 1992, p. 1283 – 1294.
- CAI, X. – WANG, Z. – XING, Y. – ZHANG, J. – HONG, M. 1998. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5'UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. In: The Plant Journal, vol. 14, 1998, p. 459 – 465.
- COSTEA, M. – BRENNER, DM. – TARDIF, FJ. – TAN, YF. – SUN, M. 2006. Delimitation of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus caudatus* L. using micromorphology and AFLP analysis: an application in germplasm identification. In: Genet. Res. Crop Evol., vol. 53, 2006, p. 1625 – 1633.
- DOMON, E. – FUJITA, M. – ISHIKAWA, N. 2002a. The insertion/deletion polymorphisms in the *waxy* gene of barley genetic resources from East Asia. In: Theor Appl Genet., vol. 104, 2002a, p.132 – 138.
- DOMON, E. – SAITO, A. – TAKEDA, K. 2002b. Comparison of the *waxy* locus sequence from a non-*waxy* strain and two *waxy* mutants of spontaneous and artificial origins in barley. In: Genes Genet Syst., vol. 77, 2002b, p. 351 – 359.
- FEDOROFF, N. – WESSLER, S. – SHURE, M. 1983. Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. In: Cell, vol. 35, 1983, p. 235 – 242.
- FUJITA, N. 1998. A 56kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seeds in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). In: Planta Academic Journal, vol. 207, 1998, p. 125 – 132.
- FUKUNAGA, K. – KAWASE, M. – KATO, K. 2002. Structural variation in the *Waxy* gene and differentiation in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]: implications for multiple origins of the *waxy* phenotype. In: Mol. Genet. Genomics, vol. 268, 2002, 214 – 222.
- GAJDOŠOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. – OSTROLUCKA M. G. – FEJÉR, J. 2008. Mutation Breeding inselected *Amaranthus* spp. In: *Amaranth* – Plant for the Future (5th International Symposium of the European Amaranth Association) Nitra : SAV, 2008, p. 93 – 94.
- HIRANO, H. – SANO, Y. 1991. Molecular characterization of the *waxy* locus of rice (*Oryza sativa*). In: Plant Cell Physiol., vol. 32, 1991, p. 989.
- HRICOVÁ, A. – KEČEŠOVÁ, M. – GÁLOVÁ, Z. – LIBIAKOVÁ, G. – GAJDOŠOVÁ, A. 2011. Skúmanie zmien profilu bielkovín v semenách laskavca podrobených radiačnej mutagenéze. In: Chemické listy, roč. 105, 2011, s. 542 – 545.
- HRUBÍKOVÁ, K. – CANDRÁKOVÁ, A. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. 2007. Retro transpozónové markéry v analýze populácií jačmeňa siateho. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : zborník zo 14. vedeckej konferencie, 13.–14. november 2007. Nitra : Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, 2007, s. 90 – 93. ISBN 978-80-88872-65-8.
- CHAN, K. F. – SUN, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species *Amaranthus*. In: Theoretical and applied genetics, vol. 95, 1997, no. 5 – 6, p. 865 – 873.
- INOUCHI, N. – NISHI, K. – TANAKA, S. – ASSAI, M. – KAWASE, Y. – HATA, Y. KONISHI, Y. – YUE, S. – FUWA, H. 1999. Characterization of amaranth and quiana starches. In: J. APPL. Glycosci., vol. 46, 1999, p. 233 – 240.
- JAMES, M.G. – DENYER, K. – MYERS A. M. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. In: Curr. Opin. Plant Biol., vol. 6, 2003, p. 215 – 222.
- KAWASE, M. – FUKUNAGA, K. – KATO, K. 2005. Diverse origins of *waxy* foxtail millet crops in East and Southeast Asia mediated by multiple transposable element insertions. In: Mol Genet Genomics, vol. 274, 2005, p.131 – 140.
- KONISHI, Y. – NOJIMA, H. – OKUNO, K. – ASAOKA, M. – FUWA, H. 1985. Characterization of starch granules from *waxy*, nonwaxy, and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. In: Agri. Biol. Chem., vol. 4, 1985, p. 1965 – 1971.
- LINDEBOOM, N. – CHANG, P.R. – TYLER, R.T. 2004. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. In: Starch/Stärke, vol. 56, 2004, p. 89 – 99
- MARCONI, M. 2001. Starch properties of *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth): a threatened plant species with potential benefits for the breeding/amelioration of present *amaranthus* cultivars. In: Food Chem., vol. 73, 2001, p. 61 – 66.
- MOCHIZUKI, K. UMEDA, M. – OHTSUBO, H. – OHTSUBO, E. 1992. Characterization of a plant SINE, p-SINE1, in rice genomes. In: Jpn J Genet., vol. 67, 1992, p. 155 – 166.
- MÚDRY, P. – HRICOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. – GAJDOŠOVÁ, A. 2011. Methodological approaches to simple enzyme polymorphism analyses of Amaranth species (*Amaranthus* sp.). In: Agriculture, vol. 57, 2011, no. 1, p. 1 – 11.
- NAKAMURA, T. – VRINTEN, P. – HAYAKAWA, K. – IKEDA, J. 1998. Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. In: Plant Physiol., vol. 118, 1998, p. 451 – 459.
- OKUNO, K. – SAKAGUCHI, S. 1981. Glutinous and non-glutinous starches in perisperm of grain amaranth. In: Cereal Res. Commun., vol. 9, 1981, p. 305 – 310.
- OSLOVIČOVÁ, V. – GÁLOVÁ, Z. – CHŇAPEK, M. – BALÁŽOVÁ, Ž. 2010. Identification of *Triticum aestivum* L., *Triticum spelta* L. and *Triticum durum* DESF. genotypes on the HMW-GS base. In: Plant, soil and environment, vol. 56, 2010, no. 2, p. 82 – 86. ISSN 1214-1178.
- PARK, Y.J. – NEMOTO, K. – NISHIKAWA, T. – MATSUSHIMA, K. – MINAMI, M. – KAWASE, M. 2009. Molecular cloning and characterization of granule bound starch synthase I cDNA from a grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) In: Breeding Science, vol. 59, 2009, p. 351 – 360.
- PARK, Y.J. – NEMOTO, K. – NISHIKAWA, T. – MATSUSHIMA, K. – MINAMI, M. – KAWASE, M. 2010. *Waxy* strains of three amaranth grains raised by different mutations in the coding region. In: Mol Breeding, vol. 25, 2010, p. 623 – 635.
- PARK, Y.J. – NEMOTO, K. – NISHIKAWA, T. – MATSUSHIMA, K. – MINAMI, M. – KAWASE, M. 2011. Genetic diversity and expression analysis of granule bound starch synthase I gene in the new world grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). In: Journal of Cereal Science, vol. 53, 2011, p. 298 – 305.
- PARK, Y.J. – LEE, J.K. – KIM, N. S. 2009. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops. In: Molecules, vol. 14, 2009, p. 4546 – 4569.
- RAY, T. – ROY, S. C. Genetic Diversity of Amaranthus Species from the Indo-Gangetic Plains Revealed by RAPD Analysis Leading to the

- Development of Ecotype-Specific SCAR Marker. In *Journal of heredity*, vol. 100, 2009, no. 3, p. 338–347.
- REVÁK, O. – ŽIDEK, R. – BAJZÍK, P. – BELEJ, L. 2011. Detekcia lupiny (*Lupinus* spp.) ako skrytej hrozby v potravinách. In: *Proteiny 2011 : sborník příspěvků VI. ročníku mezinárodní konference*, 3. – 4. května 2011 Zlín. Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2011, s. 97 – 100. ISBN 978-80-7454-022-6.
- SAUER, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 54, 1967, p. 103 – 137.
- SUIGIMOTO, Y. – YAMADA, K. – SAKAMOTO, S. – FUWA, H. 1981. Some properties of normal-and waxy-type starches of *Amaranthus hypochondriacus* L. In: *Starch/Staerke*, vol. 33, 1981, p. 112 – 116.
- TSAI, C. Y. 1974. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. In: *Biochem. Genet.*, vol. 11, 1974, p. 83 – 96.
- VAN, K. – ONODA, S. – KIM, MY. – KIM, KD. – LEE, SH. 2008. Allelic variation of the *Waxy* gene in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] by single nucleotide polymorphisms. In: *Mol. Genet. Genom.*, vol. 279, 2008, p. 255 – 266.
- VIVODÍK, M. – GÁLOVÁ, Z. – BALÁŽOVÁ, Ž. 2011. Identification, differentiation and characterization of barley genotypes using SSR markers. In: *Potravinárstvo*, roč. 5, mimoriadne č. 2011, s. 96 – 100. ISSN 1338-0230.
- VRINTEN, P. – NAKAMURA, T. – YAMAMORI, M. 1999. Molecular characterization of *waxy* mutations in wheat. In: *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 261, 1999, p. 463 – 471.
- WANG, Z. – ZHENG, F. – SHEN, G. – GAO, J. – SNUSTAD, D. – LI, M. – ZHANG, J. – HONG, M. 1995. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. In: *The Plant Journal*, vol. 7, 1995, p. 613 – 622.
- WESSLER, S. – VARAGONA, M. 1985. Molecular basis of mutations at the *waxy* locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 82, 1985, p. 4177 – 4181.
- XU, F. – SUN, M. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. In: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 21, 2001, no. 3, p. 372 – 387.
- ZELEŇÁKOVÁ, L. – ŽIAROVSKÁ, J. – MURA, L. – KOZELOVÁ, D. 2011. Štatistická analýza zmien v epidemiológii salmonelóz na Slovensku = : Statistical analysis of changes in the epidemiology of Salmonellosis in Slovakia. In: *Forum statisticum Slovaca*, vol. 7, 2011, no. 4, p. 109 – 113. ISSN 1336-7420.
- ZELEŇÁKOVÁ, L. – ŽIAROVSKÁ, J. – KRÁČMAR, S. – MURA, L. – KOZELOVÁ, D. – LOPAŠOVSKÝ, L. – KUNOVÁ, S. – TINÁKOVÁ, K. 2012a. Application of epidemiological information system (EPIS) in the Slovak republic within the surveillance of salmonellosis and campylobacteriosis outbreaks in the European union (2001–2010). In: *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 60, 2012a, no. 1, p. 189 – 200. ISSN 1211-8516.
- ZELEŇÁKOVÁ, L. – ŽIAROVSKÁ, J. – KOZELOVÁ, D. – MURA, L. – LOPAŠOVSKÝ, L. – BOBKOVÁ, A. – ZAJÁC, P. – ČAPLA, J. – TINÁKOVÁ, K. 2012b. Campylobacteriosis: importance of strengthening surveillance and reported foodborne disease control within European Union. In: *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences : scientific journal*, vol. 1, 2012, special issue, p. 855 – 867.
- ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽO, M. 2003. Výber prajmerov pre RAPD na rozlíšenie genotypov ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) : The option of RAPD primers for determine genetic diversity of flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes. In: *BIOS 2003*. Nitra : SPU, 2003. s. 128 – 132.
- ŽIDEK, R. – BAJZÍK, P. – MARŠÁLKOVÁ, L. – GOLIAN, J. 2012. Detekcia falšovania hovädzieho mäsa pomocou Real-Time PCR = : Detection of counterfeit beef with Real-Time PCR. In: *Mäso*, roč. 23, 2012, č. 1, s. 15 – 17. ISSN 1210-4086.

Kontaktná adresa:

Ing. Mária Labajová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Tr. Andeja Hlinku 2, 949 76 Nitra, ☎ 0949 479 723, e-mail: majka.labajova@gmail.com