PRIMJENA MOLEKULARNIH MARKERA U ZOBI

Martinov, Zvjezdan

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:571129

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Zvjezdan Martinov, apsolvent

Sveučilišni preddiplomski studij Bilinogojstvo

PRIMJENA MOLEKULARNIH MARKERA U ZOBI

Završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Zvjezdan Martinov, apsolvent

Sveučilišni preddiplomski studij Bilinogojstvo

PRIMJENA MOLEKULARNIH MARKERA U ZOBI

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Sonja Marić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
3. doc.dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Osijek, 2015.

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. Molekularni markeri 2

1.2. Primjena molekularnih markera 2

1.3. Lančana reakcija polimerazom (Polymerase chain reaction) 3

1.4. Cilj istraživanja 4

2. MATERIJAL I METODE 5

2.1. Biljni materijal 5

2.2. Laboratorijski pokus 5

2.2.1. Uzgoj klijanaca 5

2.2.2. Izolacija genomske DNA 6

2.2.3. PCR metoda i elektroforeza 10

3. REZULTATI I RASPRAVA 13

4. ZAKLJUČAK 15

5. LITERATURA 16

6. SAŽETAK 18

7. SUMMARY 19

8. POPIS SLIKA 20

9. POPIS TABLICA 21

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 22

1. UVOD

Zob je strna žitarica stara otprilike 3500 g. Potječe sa starih kontinenata: Europe, Azije i Afrike. Svake godine se zob sije na sve manje površina. Do smanjenja je došlo zbog smanjenog broja stoke, pogotovo konja te slabog zanimanja znanstvenih institucija za usavršavanjem selekcije. Zbog toga su prinosi dosta niski, oko 2 t/ha. Zob je prije korištena za proizvodnju kruha, no zbog porasta standarda koristi se za proizvodnju drugih prehrambenih proizvoda kao što je griz, zobene pahuljice, brašno za posebne namjene itd. Takvi proizvodi imaju veliku hranidbenu vrijednost te su lako probavljivi. Koristi se naročito u prehrani konja jer sadrži potrebne aminokiseline. Zob dobro podnosi teža, kiselija, vlažnija i zbijenija tla pa je zato proizvodnja zobi iskoristivija na takvim tlima od drugih žitarica (Gagro, 1997.).



Slika 1. Jara zob Kupa (izvor: http://www.bc-agroslavonija.hr)

Avena sativa L. je glavna kultivirana zob, uključujući bijelu i crvenu zob. Bijela zob se koristi u mlinarskoj industriji, u proizvodnji hrane za ljude te u proizvodnji stočne hrane, posebice za perad i konje. Crvena zob (*Avena byzantina* K. Koch) se koristi za sijeno (Stevens i sur., 2004.).

Genski markeri se već tridesetak godina koriste kao pomoćni alat u biološkim istraživanjima, pa tako i u oplemenjivanju bilja, a dijele se na morfološke i molekularne. Morfološki markeri su bili prvi markeri koji su se koristili. To su bila morfološka svojstva monogenskog tipa nasljeđivanja koja su se mogla lako uočiti na fenotipu. Uglavnom se radilo o mutacijama koje su nastajale spontano u prirodi ili su bile inducirane mutagenezom. Genski marker je bilo koji odsječak DNA na kojem se uočava oblik polimorfizma između određenih analiziranih jedinki. Oni ne moraju nužno biti geni, no smatraju se takvima jer se nasljeđuju po istim načelima. Idealan sustav genetskih markera treba omogućiti brzu i laku uočljivost svih genotipskih klasa markera tijekom razvoja biljke, a da pri tom ne smiju utjecati na njen razvoj niti pokazivati interakciju s drugim markerima (Šatović, 1999.). Najvažnija svojstva genskog markera uvjetuju pouzdanost metode primjene, ponovljivost, velika razinu polimorfizma između i unutar analiziranih jedinki te postojanje veze marker – svojstvo.

1.1. Molekularni markeri

Molekularni markeri su podijeljeni u dvije skupine: DNA markeri i izoenzimski markeri. Izoenzimi su različiti molekularni oblici istog enzima koji djeluju na isti supstrat, ali im je električni naboj različit.

DNA markeri otkrivaju genetsku varijabilnost izravno na razini DNA. Do sada je poznato više vrsta molekularnih markera, pa su tako jedne od najčešće korištenih jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR-Simple Sequence Repeats) - SSR markeri ili mikrosateliti. SSR markeri su sveprisutni u biljkama (Powell i sur., 1996.) te imaju vrlo visok stupanj polimorfizma i mogućnost razlikovanja vrlo srodnih genotipova, velikog broja kulturnog bilja kao što je pšenica (Morgante i Olivieri, 1993.), zob (Pal i sur., 2002.) i kukuruz (Reif i sur., 2005.).

1.2. Primjena molekularnih markera

Prioritet u današnje vrijeme je očuvanje biljnih genetskih izvora za buduće naraštaje. Danas je mnogo vrsta ugroženo i uz klimatske promjene, ubrzo bi moglo doći do nestanka nekih vrsta. Pomoću markera se može odrediti upotpunjenost kolekcija te odrediti na čemu će se moći bazirati daljnja istraga te prikupljanje. Koriste se i u vođenju banki biljnih gena pomažući pronaći dvojnike u kolekciji. Istraživanja uz pomoć molekularnih genskih markera

su dala veliki doprinos razumijevanju evolucije te odnosa među bliskim genomima. Populacijska genetika se također služi molekularnim markerima u određivanju genotipskih i alelnih frekvencija u biljnim populacijama te u analizi prijenosa gena. U identifikaciji roditelja za buduća križanja genski markeri pomažu procijeniti srodstvo roditelja, provjeriti podatake o pedigreu, što dovodi do boljeg predviđanja i sastavljanja plana križanja. Osim pri proučavanju genetskih raznolikosti, genetski se markeri koriste i u genetsko-oplemenjivačke svrhe (Šatović, 1999.).

Još jedna važna uporaba molekularnih gena je u određivanju gena koji su značajni za otpornost na bolesti i štetnike. Klasično oplemenjivanje je veoma skupo, dugotrajno te puno puta osjetljive biljke izbjegnu napad štetnika što dovodi do rezultata koji nam ničemu ne služe. Stoga, utvrđivanje gena za otpornost uz markera se čini vrlo isplativa solucija, a uz to zahtjeva manje vremena i može pomoći i u kompliciranijim oplemenjivačkim programima. Genski markeri pomažu i pri prijenosu poželjnih gena povratnim križanjima.

Primjena molekularno-bioloških metoda u istraživanju genoma zobi, kao što su lokalizacija gen lokusa („gene mapping“), genetsko profiliranje („genetic fingerprinting“), istraživanje strukture populacije i filogenetička istraživanja ovise o izolaciji DNA. Genomska DNA se može izolirati iz zrna i listova. U zadnjih tridesetak godina velik broj autora opisivao je i predlagao različite metode izolacije, pri čemu su u svakoj od njih navedeni uzrok i rješenje problema s kojim su se suočavali prilikom same izolacije. Metoda koja se najčešće koristi za izolaciju DNA iz biljnog tkiva je CTAB metoda. Tako su Grau Nersting i sur., (2006.) u svom istraživanju molekularne različitosti nordijske zobi te Li i sur. (2000.) za izolaciju DNA koristili CTAB metodu. Komercijalni kitovi su također raširenі kao vrlo brza metoda izolacije DNA korišteni u istraživanju Fu i sur. (2003.) u istraživanju različitosti kanadskih kultivara te Boczkowska i Tarczyk (2013.) u istraživanju poljskih vrsta zobi.

1.3. Lančana reakcija polimerazom (Polymerase chain reaction)

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je tehnika koja je radikalno promijenila biološku znanost od trenutka kada je izumljena (Mullis, 1990.). Dr. Kary Mullis koji je izumio PCR metodu i za nju dobio Nobelovu nagradu 1993. opisuje metodu kao brzu i vrlo osjetljivu metodu umnažanja određenog odsječka molekule DNA u uvjetima *in vitro* uz pomoć termostabilne DNA polimeraze. Prva izolirana termostabilna DNA polimeraza je Taq polimeraza izolirana iz *Thermophilus aquaticus* bakterije koja živi u termalnim izvorima.

PCR reakcija se odvija u od tri koraka: 1. denaturacija dvolančane DNA u dva jednolančana lanca., 2. sparivanje početnica (amplifikacija) i 3. produljivanje lanca DNA. Stalnim ponavljanjem reakcije količina DNA eksponencijalno raste. PCR reakcijska smjesa se sastoji od DNA uzorka, oligonukleotidnih početnica, deoksinukleotid-fosfata (dNTP), pufera, magnezija i Taq polimeraze. Uspješnost PCR reakcije, odnosno prisutnost ili odsutnost specifičnog PCR produkta se provjerava elektroforezom uzoraka u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Umnoženi odsječak DNA tj. PCR produkt se boja kemijskim bojama npr. etidij bromidom, koji se interkalira između baza ili se fluorescentnim bojama označe oligonukleotidne početnice prije PCR amplifikacije (Ambriović Ristov, 2007.). Ne postoji jedinstveni protokol za svako umnožavanje odsječka DNA, nego se za svaki ulomak prilagođava reakcija. U reakciji PCR određeni odsječak se „nekontrolirano umnožava“, dok se replikacija DNA *in vivo* odvija u strogo kontroliranim staničnim procesima. No iako se PCR-om dobije nekoliko bilijuna kopija, proces je strogo kontroliran te ovisi o velikom broju čimbenika.

1.4. Cilj istraživanja

Cilj ovoga istraživanja je uspješno primijeniti postupak lančane reakcije polimerazom (PCR) na uzorcima DNA pet kultivara zobi.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na pet kultivara zobi. Sve analizirane zobi pripadaju vrsti *Avena sativa* L., bijela samooplodna zob, aloheksaploid s osnovnim brojem kromosoma 2n=6x=42. Sastoji se od tri osnovna genoma A, C i D (Rajhathy i Thomas, 1974., prema Pal i sur., 2002.). Zob Marta je jedina ozima zob (Bc institut), dok su sve ostale zobi jare: Istra i Kupa (Bc institut), a Zlatna grana i Šampionka (Hrvatski stočarski selekcijski centar). U sklopu PCR analize korišten je još jedan kultivar zobi kanadskog podrijetla (Winnipeg), kao pozitivna kontrola, te jedan kultivar pšenice, hrvatskog podrijetla (Srpanjka) kao negativna kontrola.

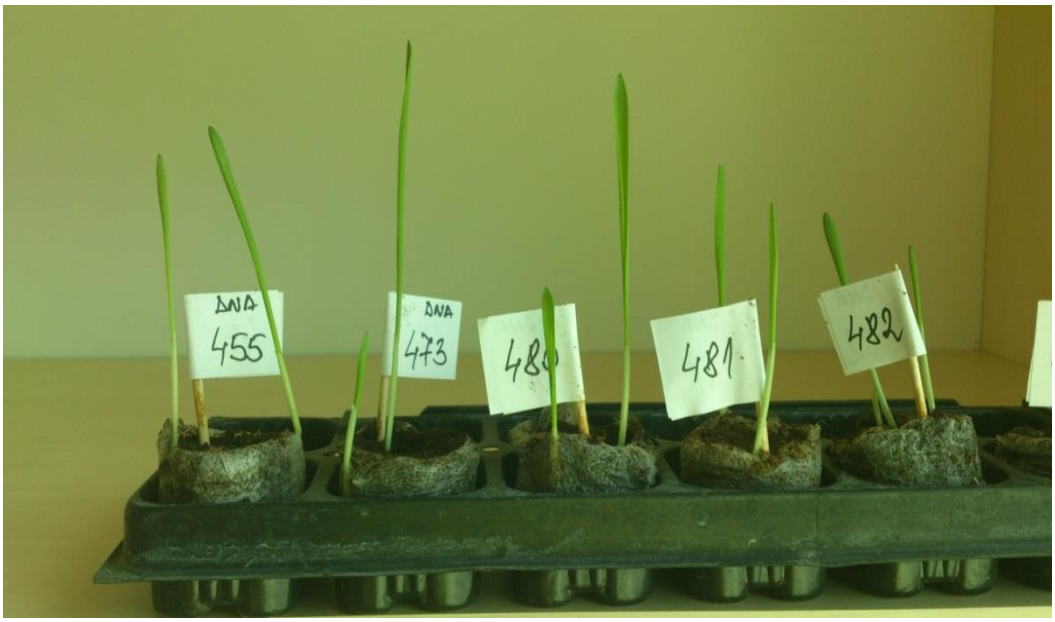
U svijetu najviše se zobi u proizvodi u Europi, čak 64 %. U Hrvatskoj je 2013. godine proizvedeno 63 000 tona zobi. Najveći proizvođač je Rusija koja prosječno proizvodi malo manje od 5 milijuna tona. Drugi proizvođač je Kanada sa skoro 3,5 milijuna tona, a treći je Amerika koja slijedi s 1,3 milijuna tona (http://faostat3.fao.org/).

2.2. Laboratorijski pokus

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku tijekom akademske godine 2014./2015. Sastojao se od četiri faze: uzgoja klijanaca, DNA izolacije, PCR metode, postupka elektroforeze te očitavanja rezultata.

2.2.1. Uzgoj klijanaca

Kultivari zobi su posijani u tresetne pločice. Svaka zob je posijana sa 3 sjemena u pločice koje su netom prije toga nakvašene vodom. Naklijavane su dva tjedna u klima komori. Temperatura u klima komori je bila 20°C, 12 sati su bile na svjetlu, a 12 sati u mraku uz povremeno zalijevanje. Listovi su bili sakupljeni u fazi dva do tri lista i zatim su pohranjeni u zamrzivač na -80°C.



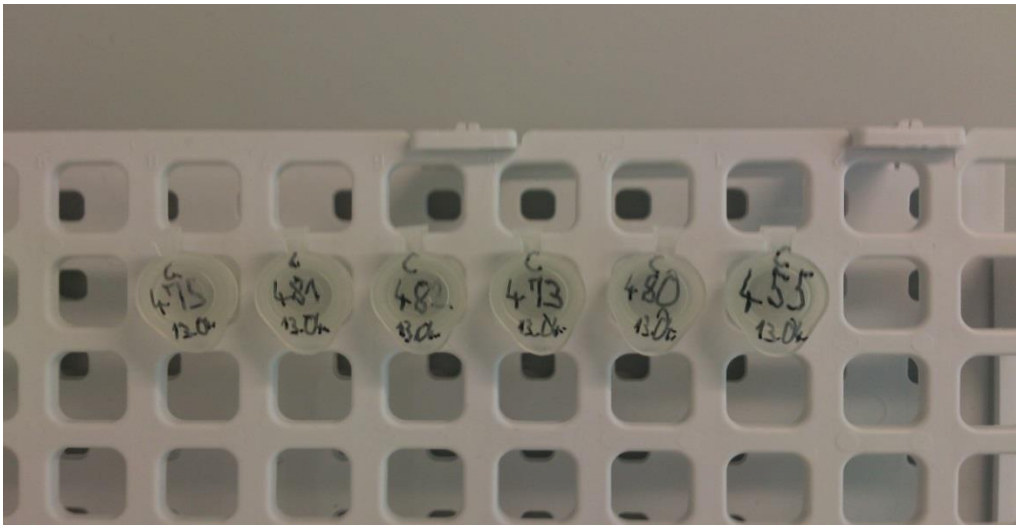
Slika 2. Zob u fazi jednog lista (foto original; Z. Martinov)

2.2.2 Izolacija genomske DNA

Izolacija DNA iz listova rađena je prema CTAB metodi (prema Doyle i Doyle, 1987. i Cullings, 1992.). Od svake vrste zobi sakupljeno je dva lista, koji su stavljeni u tarionike prethodno ohlađene tekućim dušikom. Listovi su u tarioniku smrvljeni u prah uz pomoć tučka. U svaki uzorak je dodano 500µl izolacijskog CTAB pufera, tekuća smjesa je zatim izlivena u tubice (slika 3). Tubice su pojedinačno kratko protresene (vorteksirane). CTAB pufer je dobiven od sljedećih komponenti:

- 100 ml 1 M Tris HCl pH=8.0
- 280 ml 5 M NaCl
- 40 ml 0,5 M EDTA
- 20 g CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)
- ostatak napuniti do 1 litre s d. d. H2O

Tubice su stavljene sat vremena u vodenu kupelj (slika 4) na 55°C, jednom promiješane nakon pola sata. Nakon inkubacije u vodenoj kupelji u svaki uzorak je dodano 1,5µl RNAze kako bi DNA bila čista te su ponovno vraćene u kupelj na još 15 minuta, ali na temperaturu od 37°C.



Slika 3. Označene tubice s brojem uzorka (foto original; Z. Martinov)



Slika 4. Vodena kupelj (foto original; Z. Martinov)

Nakon djelovanja enzima RNAze tubice su izvađene iz kupelji te je u digestoru u svaku dodano 500µl kloroforma, prilikom čega je svaka pojedinačno lagano okrenuta gore-dolje.

Slijedio je proces odvajanja krute tvari iz smjese uzorka u centrifugi u trajanju od 8 minuta na 14000 o/min (slika 5).



Slika 5. Uređaj za centrifugiranje (foto original; Z. Martinov)

Poslije centrifugiranja pipetom je izvučena vodena faza iz svake tubice (oko 400µl) te je prenesena u nove tubice, za svaki kultivar zobi posebno. U tubice je zatim dodano 32µl amonijeva acetata i 233µl izopropanola i izokretane su 30 puta. Potom su inkubirane u ledu u trajanju od 40 minuta. Slijedilo je centrifugiranje uzoraka u trajanju od 4 minute na 14000 o/min. Nakon centrifugiranja tekućina je izlivena u otpad, posebno obraćajući pažnju na malu bijelu peleticu (DNA) kako ne bi bila bačena skupa s tekućinom. U sljedećih nekoliko koraka slijedi pranje pelete s etanolom (EtOH) različite koncentracije iza kojeg slijedi centrifugiranje uzoraka. U prvom koraku se koristi 700µl 70% EtOH, pri čemu se tubice invertiraju 10 puta. U drugom koraku se koristi 700µl 95% EtOH, a uzorak se opet miješa invertiranjem u deset ponavljanja. Nakon zadnjeg centrifugiranja u trajanju od 2 minute na 14000 o/min, etanol je izliven, a tubice su naopako položene na čisti papir petnaestak minuta kako bi se osušile. Zatim su se okrenule i ostavile još pola sata sušiti pokrivene papirom. Nakon sušenja u tubice je dodano 50µl TE pufera kako bi se peletice otopile. Tako su ostavljene preko noći na sobnoj temperaturi i idući dan su pohranjene u hladnjak na -20°C.

Čistoća izolirane DNA provjerena je u Varian Cary® 50 UV-visible spektrofotometru. Razrjeđenja DNA su pripravljena izdvajanjem 15µL čiste DNA i 735µL TE pufera. Za svaki

uzorak su napravljena dva ponavljanja. Čistoća DNA je utvrđena na temelju omjera apsorbanci A 260 i A 280. Vrijednost čistoće je bila prihvatljiva u rasponu od 1,5 do 2,0. Koncentracija DNA u ng/µl određena je iz izračunatih vrijednosti apsorbanci prema formuli:

$$[DNA] = A\ 260 * A\ 280 * 502$$

Poslije određivanja koncentracije pripremljeni su uzorci za PCR reakcije. Za svaki uzorak je određena količina DNA (1) i TE pufera za PCR razrjeđenje 1:5 (tablica 1) prema formulama:

$$(1)\ DNA\ (\mu L) = (20 / [DNA]) * 50$$
$$(2)\ TE\ 8.0(\mu L) = 50{,}0 - DNA\ (\mu L)$$

Tablica 1. Koncentracija DNA i PCR razrjeđenja

				PCR razrjeđenje 1:5 (µL)	
Br.	**Kultivar**		**[DNA] ng/µL**	**DNA**	**TE pufer**
1.	**Zob**	BC Marta	301,5	3,3	46,7
2.		Šampionka	318	3,1	46,9
3.		Zlatna grana	104,9	9,5	40,5
4.		Istra	297,2	3,4	46,6
5.		Kupa	372	2,7	47,3
6.		Winnipeg	145,3	6,9	43,1
7.	**Pšenica**	Srpanjka	372	2,7	47,3

Količina izolirane DNA provjerena je elektroforezom uspoređujući ju s lambda (λ)-DNA. Količina λ -DNA je unaprijed određena. Pripremljen je 0,75% agarozni gel u 1 × TAE puferu na koji su nanošeni uzorci pomoću pipete. Za pripremu uzoraka za elektroforezu korišteno je 3µL razrijeđene DNA, 2µL STOP miksa (5 × SGB - 1M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M

Na2EDTA; Bromfenolblue boja; 87%- tni glicerin; SDS) i 2µL ultra čiste vode (H2O). Za uzorke lambde (λ)-DNA uzeto je 1µL λ-DNA, 2µL Stop miksa i 7µL d.d. H2O. Uvjeti za elektroforezu bili su sljedeći 80 V; 60 mA; 5 W. Postupak izolacije je ponovljen za one uzorke za koje je spektrofotometrijskom analizom i elektroforezom s λ –DNA utvrđena loša kvaliteta.

2.2.2. PCR metoda i elektroforeza

Prije pripreme reakcijske smjese obavljena je optimizacija PCR reakcije s molekularnim markerom SCAR AF20 (Tanhuanpää i sur., 2007.). Sekvence markera navedene su u tablici 2. Koncentracije za reakcijsku smjesu navedene su u tablici 3. Očekivani PCR produkt iznosi 957 parova baza (pb).

Tablica 2. Sekvence korištenih početnica

Marker	**Sekvence početnica (5´→3´)**
SCAR AF20	F: CAC GAA CCT CCT CGA AAA AG R: CGA ACC TCG CCA AGA GTA AG

Tablica 3. Koncentracija i sastav reakcijske smjese

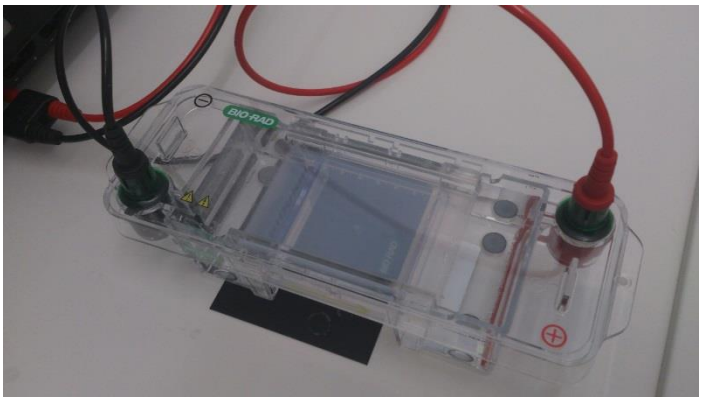
Reakcijska smjesa	**Volumen po reakciji (µl)**
PCR pufer	5
MgCl2	1,5
dNTP	0,5
L – početnica	0,5
D – početnica	0,5
Taq polimeraza	2,5
Genomska DNA	2
d.d. H2O	8,1

Za PCR reakciju korišten je uređaj Eppendorf Mastercycler® Thermal Cyclers prema sljedećem programu:

1. korak denaturacija 2 minute na 95 °C;
2. korak amplifikacija 38 ciklusa od:
    - 30 sekundi na 95 °C,
    - 30 sekundi na 66 °C,
    - 1 minuta na 72 °C;
3. završni produljenje korak 5 minuta na 72 °C

Provjera PCR produkata izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Produkti PCR analize naneseni su na 2% agarozni gel koji je bio debljine 1 cm i veličine 7x10 cm. Gel je pripravljen na sljedeći način: U Erlenmayerovu tikvicu od 200 ml odvagano je 1,2 g agaroze Lonza SeaKem® te je menzurom dodano 60 ml 1x TBE pufera. Zatim je tikvica zagrijavana u mikrovalnoj pećnici oko 2 min uz povremeno miješanje svakih 10-15 sekundi. Potom je tikvica ohlađena pod mlazom hladne vode uz lagano miješanje. U tikvicu su dodane 2-3 kapi fluorescentne Olerup SSP® GelRed boje te je cijeli sadržaj izliven u kadicu koja je ranije pripremljena. Gel u kadici je ostao stajati na sobnoj temperaturi dvadesetak minuta. Nakon hlađenja gela izvađeni su češljići koji su stavljeni kako bi se stvorile jažice u koje će se nanijeti uzorci. Gel je potom stavljen u uređaj za elektroforezu, Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT, gdje je bio uronjen u 1x TBE pufer (slika 6). U svaku jažicu je nanesen uzorak volumena 5µl. Uređaj je spojen na struju jačine 60 V, 50 mA i 40 W pušten u rad. Elektroforeza je trajala oko sat vremena.



Slika 6. Uređaj za elektroforezu (foto original; Z. Martinov)

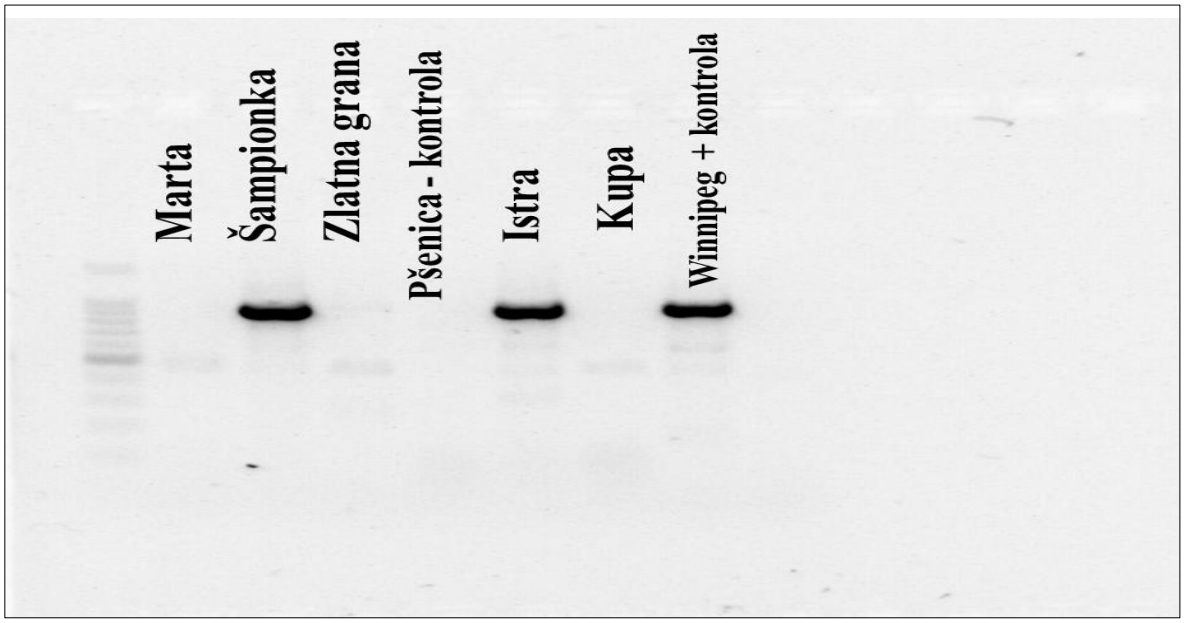
Nakon što je elektroforeza završena gel s PCR produktima uslikan je sa Syngene® G:BOX F3 uređajem za snimanje (slika 7) koji u sebi ima ugrađenu kameru rezolucije 3,8 megapixela te GeneSys softver. Rezultati su očitani koristeći Syngene® program GeneTools pomoću kojeg je određena veličina PCR produkta.



Slika 7. Uređaj za snimanje gela G:BOX (foto original; Z. Martinov)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Izolacija molekule DNA iz zobi je uspješno provedena. Uzorci DNA su bili vrlo dobre čistoće i kvalitete. PCR metodom je obavljena amplifikacija korištenih početnica molekularnog markera SCAR AF20, a procesom elekroforeze produkti su razdvojeni. Na slici 8 je prikazan gel na kojemu je ukupno osam različitih uzoraka. U ukupno dva uzorka vidljiv je PCR produkt od 957 pb i to u kultivara Šampionka i Istra, dok u tri uzoraka (Marta, Zlatna grana, i Kupa) nije utvrđena amplifikacija. Zadnji uzorak je zob Winnipeg koja je služila kao pozitivna kontrola, a peti uzorak je pšenica koja nam je služila kao negativna kontrola.



Slika 8. Produkti amplifikacije DNA (foto original; Z. Martinov)

Tanhuanpää i sur. (2007.) navode kako se navedeni marker u nekih kultivara može razlikovati u nekoliko parova baza (10) te također navode kako se navedenim markerom uz kombinaciju s markerom SCAR AF 15 mogu identificirati kultivari s niskom akumulacijom kadmija.

Koristeći samo jedan molekularni marker uspjeli smo razlikovati pet kultivara zobi. Monitilla-Bascon i sur. (2013) procijenili su populacijsku strukturu 177 kultivara zobi i prirodnih populacija iz Španjolske koristeći 31 par mikrosatelitnih početnica pri čemu su utvrdili veliku varijabilnost između crvene i bijele zobi.

Okon i Kowalczyk (2011.) navode da se molekularni markeri u zobi, kao i u svim ostalima žitaricama, koriste u različite svrhe. Najčešće su: procjena genetske sličnosti, utvrđivanje gena kontroliraju akumulaciju korisnih i štetnih mikroelemenata te izrada genske mape zobi. Daljnje razlikovanje navedenih kultivara treba ići u smjeru kombinacije agronomskih, morfoloških svojstava i molekularnih markera na puno većem broju kultivara s ciljem utvrđivanja genetske različitosti.

4. ZAKLJUČAK

U provedenom istraživanju primjene molekularnih markera u zobi je uspješno provedena PCR metoda koristeći molekularni marker SCAR AF20. PCR produkt od 957 pb utvrđen je u dva kultivara zobi, u Šampionke i Istre. Amplifikacija nije bilja zabilježena u preostala tri kultivara (Marta, Zlatna grana i Kupa). Mogućnost razlikovanja pet kultivara zobi na razini DNA potvrđena je korištenjem samo jednog molekularnog markera. U usporedbi s ostalim žitaricama, mali broj funkcionalnih markera je identificirano u zobi i ne postoji dovoljno precizna i gusta genetska mapa. Daljnja istraživanja utvrđivanja genetske različitosti trebaju ići u smjeru povećavanja broja istraživanih kultivara zobi, broja molekularnih markera te njihovog povezivanja s fenotipskim svojstvima.

5. LITERATURA

1. Ambriović Ristov, A. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
2. Cullings, K.W. (1992): Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular Ecology, 1:233-240.
3. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19:11-15.
4. Fu, Y.B., Peterson, G.W., Scoles, G., Rossnagel, B., Schoen, D.J., Richards, K.W. (2003): Allelic diversity changes in 96 Canadian oat cultivars released from 1886 to 2001. Crop Science, 43: 1989-1995
5. Gagro M. (1997): Ratarstvo obiteljskoga gospodarstva. Žitarice i zrnate mahunarke, Zagreb
6. Grau Nersting L., Bode Andersen S., von Bothmer R., Gullord M., Bagger Jorgensen R. (2006): Morphological and molecular diversity of Nordic oat through one hundred years of breeding. Euphytica,150: 327–337.
7. Li, C.D., Rossnagel, B.G., Scoles, G.J. (2000): The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among Avena species and oat cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 101:1259-1268
8. Martinčić J., Kozumplik V. (1996): Oplemenjivanje bilja, Zagreb
9. Montilla-Bascón, G., Sánchez-Martín, J., Rispail, N., Rubiales, D., Mur, L., Langdon, T., Griffiths, I., Howarth, C., Prats, E. (2013): Genetic diversity and population structure among oat cultivars and landraces. Plant Molecular Biology Reporter, 31:1305-1314.
10. Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993:) PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal, 3(1): 01-08
11. Pal, N., Sandhu, J.S., Domier, L.L., Kolb, F. (2002): Development and characterisation of microsatellite and RFLP-derived PCR marker sin Oat. Crop Science, 42:912-918.
12. Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1(7): 215-222.
13. Okon, S., Kowalczyk, K. (2012): Description of DNA analysis techniques and their application in oat (*Avena* L.) genome research. Acta Agrobotanica, 65(1): 3-10
14. Reif, J.C., Hamrit, S., Heckenberger, M., Shipprack, W. (2005): Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analysis of individuals and bulks. Theoretica and Applied Genetics, 111: 906-913.

15. Šatović, Z, (1999): Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. Sjemenarstvo 16(1-2): 73-95.

Mrežni izvori:

http://www.bc-agroslavonija.hr

http://faostat3.fao.org

6. SAŽETAK

Upotreba molekularnih markera u istraživanju različitosti kulturnog bilja je danas vrlo raširena. Molekularni markeri se koriste u genetskom profiliranju, u očuvanju biljnih genetskih izvora, u identifikaciji čistih linija i kultivara, genskom lociranju. Razvojem PCR metode omogućeno je brzo i učinkovito korištenje velikog broja različitih tipova molekularnih markera. Cilj ovog istraživanja je bio primijeniti PCR metodu kroz primjenu SCAR AF20 molekularnog markera na pet kultivara zobi. Utvrđen je PCR produkt u dva kultivara zobi (Šampionka i Istra), dok u tri (Marta, Zlatna grana i Kupa) nije zabilježen.

Ključne riječi: DNA, molekularni markeri, PCR metoda

7. SUMMARY

Today the use of molecular markers in genetic diversity studies is widespread to all cultivated species. Molecular markers are used in kultivar fingerprinting, preservation of plant genetic resources, identification of pure lines, and genetic mapping. With development of PCR method enabled very fast and efficient utillisation of different classes of molecular markers. Aim of this research was to apply PCR method through usage of molecular marker SCAR AF20 on five oat cultivars. Amplification product of 957 pb was identified in two oat cultivars, Šampionka and Istra. No amplification was observed in case of three oat cultivars (Marta, Zlatna grana and Kupa).

Keywords: DNA, molecular markers, PCR method

8. POPIS SLIKA

Redni broj	Naziv	Stranica
1.	Jara zob Kupa (izvor: http://www.bc-agroslavonija.hr)	1
2.	Zob u fazi jednog lista (foto original; Z. Martinov)	6
3.	Označene tubice s brojem uzorka (foto original; Z. Martinov)	7
4.	Vodena kupelj (foto original; Z. Martinov)	7
5.	Uređaj za centrifugiranje (foto original; Z. Martinov)	8
6.	Uređaj za elektroforezu (foto original; Z. Martinov)	11
7.	Uređaj za snimanje gela G:BOX (foto original; Z. Martinov)	12
8.	Produkti amplifikacije DNA (foto original; Z. Martinov)	13

9. POPIS TABLICA

Redni broj	Naziv	Stranica
1.	Koncentracija DNA i PCR razrjeđenja	9
2.	Sekvence korištenih početnica	10
3.	Koncentracija i sastav reakcijske smjese	10

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J. J. Strossmayera
Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

PRIMJENA MOLEKULARNIH MARKERA U ZOBI

USE OF MOLECULAR MARKERS IN OAT

SAŽETAK: Upotreba molekularnih markera u istraživanju različitosti kulturnog bilja je danas vrlo raširena. Molekularni markeri se koriste u genetskom profiliranju, u očuvanju biljnih genetskih izvora, u identifikaciji čistih linija i kultivara, genskom lociranju. Razvojem PCR metode omogućeno je brzo i učinkovito korištenje velikog broja različitih tipova molekularnih markera. Cilj ovog istraživanja je bio primijeniti PCR metodu kroz primjenu SCAR AF20 molekularnog markera na pet kultivara zobi. Utvrđen je PCR produkt u dva kultivara zobi (Šampionka i Istra), dok u tri (Marta, Zlatna grana i Kupa) nije zabilježen.

Ključne riječi: DNA, molekularni markeri, PCR metoda

SUMMARY: Today the use of molecular markers in genetic diversity studies is widespread to all cultivated species. Molecular markers are used in kultivar fingerprinting, preservation of plant genetic resources, identification of pure lines, and genetic mapping. With development of PCR method enabled very fast and efficient utillisation of different classes of molecular markers. Aim of this research was to apply PCR method through usage of molecular marker SCAR AF20 on five oat cultivars. Amplification product of 957 pb was identified in two oat cultivars, Šampionka and Istra. No amplification was observed in case of three oat cultivars (Marta, Zlatna grana and Kupa).

Keywords: DNA, molecular markers, PCR method

Datum obrane: