

**VYUŽITIE ESTERÁZ AKO BIELKOVINOVÝCH MARKEROV NA
DIFERENCIÁCIU GENOTYPOV JAČMEŇA
DIFFERENTIATION OF BARLEY GENOTYPES USING ESTERASES AS
PROTEIN MARKERS**

¹Marián Tomka, ²Jana Bradová, ¹Zdenka Gálová

ABSTRACT

The aim of this work was to differentiate 30 barley genotypes using esterases as protein markers. We observed isoenzyme polymorphism at 4 loci (Est 1, Est 2, Est 4, Est 5). It revealed significant polymorphism using polyacrylamide gel electrophoresis. Forty three lines and 12 esterase profiles in 30 analyzed varieties were observed. A total of 13 alleles have been detected at 4 loci of which 4 alleles of Est 1 with frequencies of 2.3 – 62.8 %, 3 alleles at locus Est 2 with frequencies ranging from 4.7 to 93.0 % and 2 alleles of Est 4 with frequencies 32.6 and 67.4 %. Frequency of 4 detected alleles at locus Est 5 varied from 2.3 to 85.0 %. Ten of the 30 examined genotypes showed intravarietal polymorphism. The number of detected lines in analyzed varieties varied from 1 to 4. Two of the 43 lines were heterozygotes.

Key words: barley, esterase, polymorphism, genetic diversity, protein marker

ÚVOD

Jačmeň jarný je na Slovensku významnou obilninou. Približne 20-25 % produkcie zrna sa využíva na výrobu sladu, ktorý je základnou surovinou pri výrobe piva, veľmi obľúbeného nápoja. Výťažky z jačmenného sladu sa využívajú na rôzne farmaceutické výrobky, pretože sú zdrojom vitamínov skupiny B, minerálnych látok (najmä železa) a bielkovín (Candráková, 2006).

Leistumaitė a Paplauskienė (2007) uvádzajú, že medzi genetickými zdrojmi rastlín je často genetická variabilita a preto je dôležité poznať zdroj ktorý sa použije na šľachtenie. Na tento účel sa používali agromorfologické markery aj keď majú obmedzené použitie pre hodnotenie stupňa variability pretože sú mnohokrát ovplyvňované environmentálnymi faktormi a podmienkami rastu. Pre hodnotenie genetickej variability rastlín sa preto používajú rôzne biochemické a molekulárne metódy. Biochemické metódy na rozdiel od morfologických sú viacej premenlivé, menej závislé na prostredí a informatívne v akomkoľvek vývojovom štádiu rastlín.

Použitím molekulárnych techník je v možné urýchliť prenos génov medzi odrodami a zaviesť nové gény z divo rastúcich príbuzných druhov. Polygénny charakter, ktorý bol v minulosti ťažko stanoviteľný pomocou tradičných metód, je v súčasnosti ľahko detegovateľný pomocou molekulárnych markerov (Mohan et al., 1997).

Identifikácia a charakteristika jednotlivých genotypov rastlín je základným predpokladom zvyšovania kvality pestovaných odrôd v šľachtiteľských programoch. Na druhej strane, informácia o pôvode odrody môže pomôcť pestovateľom pri výbere vhodnej odrody na pestovanie do konkrétnych agroklimatických podmienok, ako aj pre koncové využitie danej plodiny pre výživu ľudí, zvierat a pod. (Žáková a Benková, 2004).

Genetické zdroje kultivovaných jačmeňov pozostávajú z genetickej diverzity medzi vyšľachtenými odrodami, prvotnými odrodami a divo rastúcimi populáciami ich vývojových príbuzných. Genetické hodnotenie týchto zdrojov prostredníctvom štúdia

izoenzymov poskytuje dôležitú pomoc pre vhodný zber, uskladnenie a použitie (**Brown a Clegg, 1983**).

Nevo (1990) pomocou izoenzymov zostavil molekulárnu fylogénu pšenice a jačmeňa a odhalil nové príbuzenské odrody, pričom navrhuje ďalšie teoretické a praktické štúdium izoenzymov na úrovni DNA a bielkovín. Práce viacerých autorov (**Brown a Munday, 1982; Sakti a Pietrzak, 1988; Konishi, 1995; Liu et al, 1999**) poukazujú na vysoký stupeň polymorfizmu v esterázových lokusoch, čo dokazuje využiteľnosť esteráz ako molekulárnych markerov. **Kahler a Allard (1981)** dokázali analýzou esterázových lokusov, že zákonitosti geografického rozmiestnenia esterázových alel nie sú náhodné, pričom pozorovali rozdiely v spektre alel na jednotlivých kontinentoch.

Naša práca bola zameraná na hodnotenie polymorfizmu esteráz v štyroch lokusoch (Est 1, Est 2, Est 4, Est 5) a na jeho základe sa pokúsiť o diferenciaciu 30 genotypov jačmeňa siateho. Esterázové lokusy Est 1, Est2 a Est 4, ktoré sú najčastejšie študované, sa nachádzajú v tesnej väzbe na chromozóme 3H (**Konishi a Matsuura, 1987**) a sú usporiadané v poradí Est 2 - Est 1 – Est4 (**Kahler a Allard, 1970**).

Podľa **Bradovej et al. (1998)** môžu byť detegované esterázové alely použité na detailnejšiu charakterizáciu a rozlíšenie línií jačmeňa s identickým hordeínovým profilom. Podobne ako **Ward a Bamforth (2002)** sme na separáciu esterázových alel použili elektroforézu v polyakrylamidovom géle.

MATERIÁL A METODIKA

Analyzovali sme 30 genotypov jačmeňa siateho, ktoré nám poskytla Génová banka semenných druhov SR Výskumného ústavu rastlinnej výroby SCPV v Piešťanoch, ÚKSUP v Bratislave, Génová banka semenných druhov ČR a AGRO BSS s.r.o. Sládkovičovo. Väčšina genotypov mala slovenský pôvod.

Metóda elektroforézy esteráz v 7 dňových listoch jačmeňa bola realizovaná podľa **Sýkorovej a Šaška, 1996** (modifikovaná metóda Davisa a Jonesa) a predstavuje ďalšiu možnosť, ako rozšíriť škálu genetických markerov u odrôd jačmeňa, ktorých genetický základ je pomerne úzky (**Bradová a Sykorová, 2006**).

Esterázy boli izolované zo šiestich rastlín jačmeňa. Prvý list naklíčenej rastliny sa odstrihol, bol zväžený a následne rozotrený v trecej miske s 10 násobným objemom vychladeného extrakčného pufru. Zmes bola prenesená do malých (1,5 ml) centrifugačných kyviet bez viečok, tie boli vložené do väčších (10 ml) kyviet pre centrifúgu K-24. Centrifugovali sme pri -4 °C 10 minút pri 10 000 ot/min. K 100 µl odpipetovaného supernatantu sme pridali 5 µl vzorkového pufru.

Do jamiek gélu bolo pomocou Hamilton syringe nanášané po 30 µl vzorky. Elektroforetický prístroj bol pomocou Frigostatu vopred vychladený na 2 °C. Po naliatí elektródového pufru boli nastavené počiatkové podmienky elektroforézy: 50 mA a 300V. Po prejdení horného gélu markerovacím čelom (cca po 30 minútach) bol zvýšený prúd na 75 mA, stabilizovalo sa napätie cca 300V.

Elektroforéza prebiehala tak dlho, kým modré čelo nedoputovalo cca 2 cm k dolnému okraju gélu (cca za 2 hod. 50 min.).

Na detekciu alel bol použitý roztok pripravený z dvoch roztokov:

- a) 10 mg 1-naftylacetátu + 10 mg 2-naftylacetátu rozpustené v 1 ml dimetylformamidu
- b) 100 mg fast Blue RR rozpustených v 1 ml dimetylformamidu

Tieto dva roztoky sa tesne presne pred detekciou vmiešajú do 100 ml fosfátového pufru. Po objavení hnedých a červených pruhov esteráz (cca 15 -20 minút) sa sledoval postup vyfarbovania pričom sa vzorky nenechali príliš rozdifundovať. Následne boli gély fixované zastavovacím roztokom (70 ml kys. octovej + 930 ml destilovanej vody) a premyté destilovanou vodou.

Gély boli vyhodnocované na plošnom transiluminátore pomocou publikovaných alel etalónových odrôd, ktoré boli nanosené na gél súčasne so vzorkami. Podľa **Bradovej a Sýkorovej (2006)** sa osvedčilo použitie odrôd Atlas (Al, Fr, At, Pi), Drost (Ca, Dr, Nz, Pi) a Ricote (Pr, Fr, Su, Ri), ktoré majú rozmanitú zostavu esterázových alel (uvedené v poradí stúpajúcej mobility: Est 1, Est 2, Est 4, Est 5).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hneď v úvode tejto kapitoly je potrebné informovať o rozdielnostiach v nomenklatúre esterázových lokusov používaných rôznymi autormi. V našej práci sme sa pridržovali nomenklatúry uvedenej v práci **Hvida a Nielsena (1977)**, ktorá bola vytvorená na základe odporúčaní IUPAC-IUB výboru pre biochemickú nomenklatúru a medzinárodného výboru pre nomenklatúru a symboliku génov jačmeňa. Podľa tejto práce, viacerí autori uvádzajú nesprávne označenie lokusov, predovšetkým lokus Est 3, ktorý by mal byť správne označený ako Est 4. Tieto fakty uvádzame kvôli porovnateľnosti našich výsledkov.

Podľa viacerých autorov (**Brown et al., 1978; Brown, 1983; Nielsen and Johansen, 1986**) bolo jačmeni detegovaných najmenej 60 izoenzymových lokusov s priemerom 3,3 alely na lokus. Najväčší polymorfizmus bol sledovaný v lokuse Est 2 v *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* obsahujúcom 15 alel. **Dai a Zhang (1989)** svojimi analýzami, pri ktorých študovali polymorfizmus tibetských odrôd jačmeňa potvrdzujú variabilitu alel v esterázových lokusoch Est 1, Est 2 Est 3, Est 4.

Pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géle sme v štyroch esterázových lokusoch detegovali 13 alel. Z tohto počtu boli 4 alely v lokuse Est 1 (Al, Ca, Pr, 0), 3 alely v Est 2 (Dr, Fr, Un), 2 alely v Est 4 (At, Su) a 4 alely v Est 5 (Ag, Pi, Ri, Te). Priemerný počet alely na lokus bol 3,25, čo potvrdzuje práce hore uvedených autorov. Tieto alely v rôznych kombináciách vytvorili 12 esterázových profilov. Celkovo sa frekvencie jednotlivých alel pohybovali od 2,3 % do 93 % (obrázok č.2). **Kahler a Allard (1981)** v lokusoch Est 1, Est 2, Est 3 a Est 4 pozorovali minimálne 7, 12, 6 a 7 alel v uvedenom poradí. V porovnaní s našimi analýzami detegovali väčší polymorfizmus v esterázových lokusoch, pretože analyzovali súbor, ktorý pozostával z 1506 odrôd jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a divorastúceho (*H. spontaneum* Koch.). V porovnaní s touto prácou je menší počet nami detegovaných alel pravdepodobne spôsobený aj tým, že väčšina našich genotypov bola prevažne slovenského pôvodu zatiaľ čo uvedení autori pracovali s genotypmi z celého sveta. Alely ktoré sme detegovali tak môžu byť do istej miery špecifické pre Európu čo by potvrdili aj práce **Kahler a Allard (1981), Dai a Zhang (1989)** kde sa autorom podarilo preukázať, že esterázy sú pre niektoré regióny špecifické.

Na základe detegovaných alel sme zistili, že z analyzovaného súboru 30 odrôd jačmeňa bolo 10 heterogénnych resp. viaclíniových, pričom počet línií sa pohyboval od 1 do 4. Heterogenitu vo vnútri odrôd na základe polymorfizmu esteráz detegovali aj **Kahler a Allard (1981)**. Z našich analýz taktiež vyplýva, že 2 línie (Kosan, SK 5451) boli heterozygotne nakoľko v lokuse Est 2 boli detegovaná prítomnosť dvoch alel (Dr + Fr).

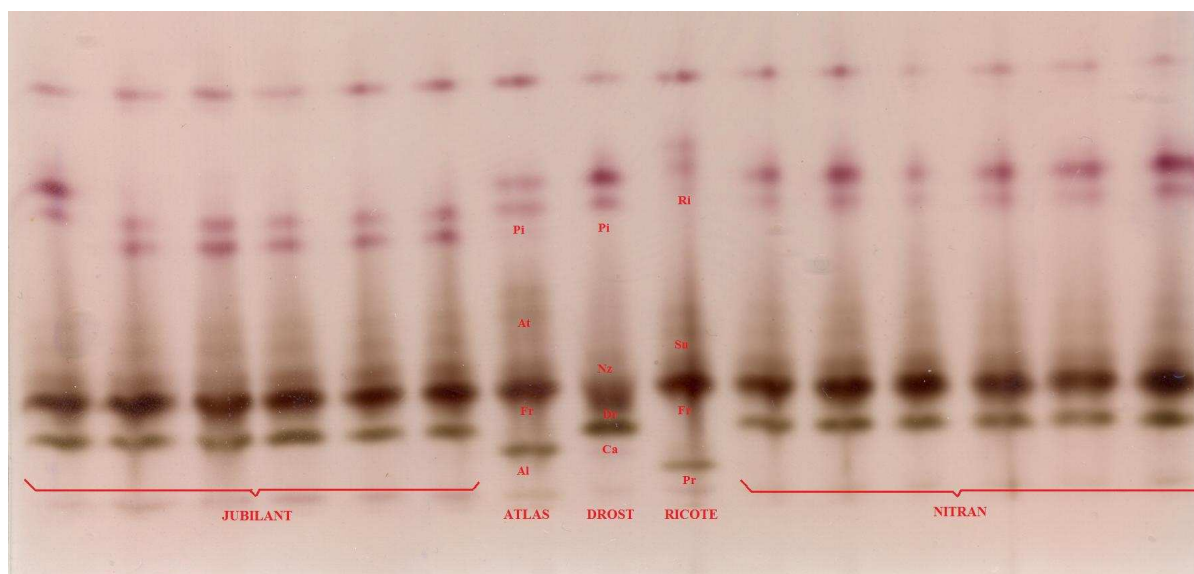
Počty a frekvencie detegovaných alel sa nachádzajú v tabuľke č.1 a prehľad profilov je uvedený v tabuľke č.2.

Tab. 1 Počet a frekvencia detegovaných alel

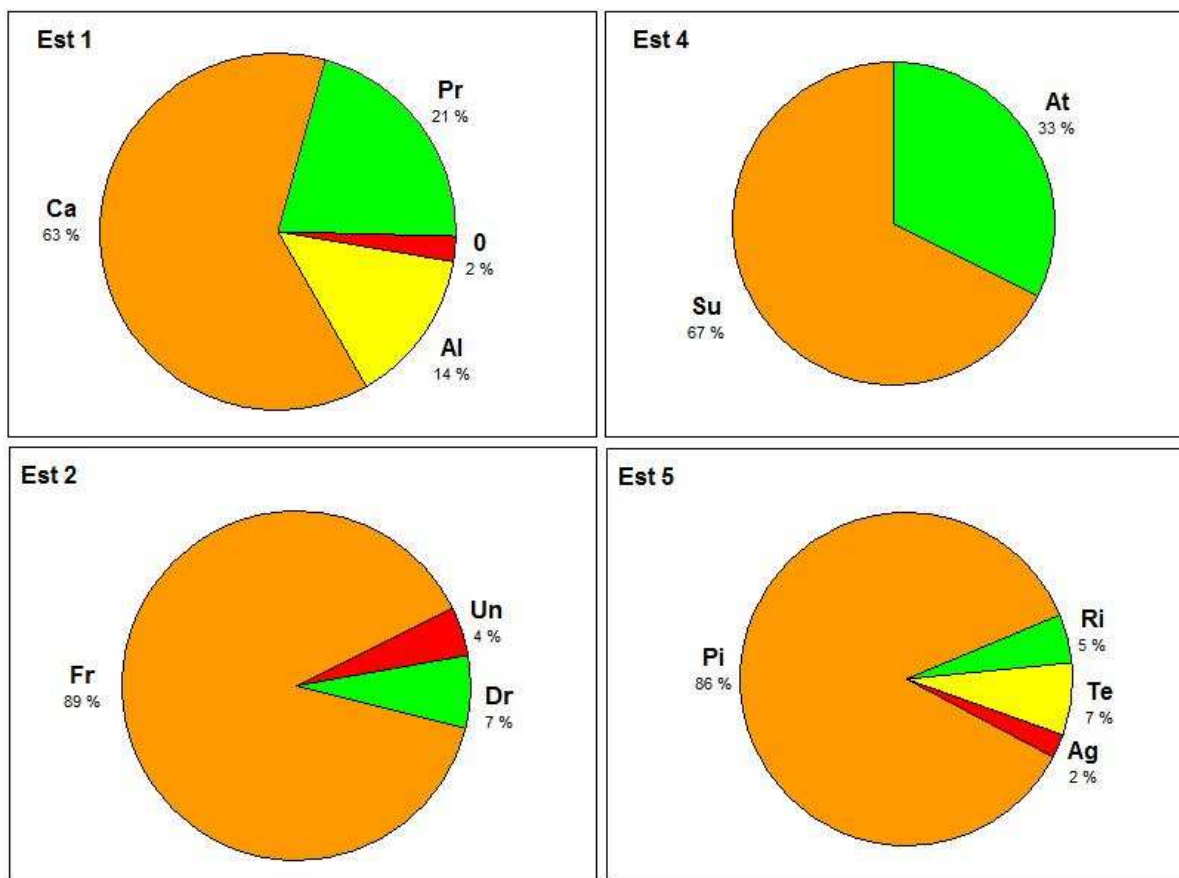
Lokus	Est 1				Est 2			Est 4		Est 5			
Alela	Al	Ca	Pr	0	Dr	Fr	Un	At	Su	Ag	Pi	Ri	Te
Počet	6	27	9	1	3	40	2	14	29	1	37	2	3
Frekvencia	14.0	62.8	20.9	2.3	7.0	93.0	4.7	32.6	67.4	2.3	86.0	4.7	7.0

Tab. 2 Detegované esterázové profily

Est 1	0	Al	Al	Al	Al	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Pr	Pr
Est 2	Dr+Fr	Fr	Fr	Fr	Dr	Fr	Fr	Fr	Fr	Un	Fr	Dr+Fr
Est 4	Su	At	Su	Su	Su	At	At	Su	Su	Su	Su	At
Est 5	Ag	Pi	Pi	Te	Te	Pi	Ri	Pi	Te	Pi	Pi	Pi
Počet	1	2	2	1	1	9	2	13	1	2	8	1



Obr. 1 Ukážka polyakrylamidového gélu s esterázami s označenými alelami štandardov



Obr. 2 Frekvencia detegovaných alel v lokusoch Est 1, Est 2, Est 4, Est 5

ZÁVER

Esterázy patria k izoenzýmom t.j. enzýmom s rovnakou katalytickou aktivitou, pričom sa odlišujú svojou primárnou štruktúrou. Viacerí autori v minulosti potvrdili, že izoenzými sú vynikajúcim nástrojom na biochemické a genetické štúdie. Elektroforetická analýza esteráz 30 genotypov jačmeňa preukázala variabilitu alel v štyroch esterázových lokusoch. Polymorfizmus esterázových lokusov je však menší ako bol pozorovaný u hordeínových lokusov. Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že využitie esteráz ako bielkovinových markerov má svoje opodstatnenie predovšetkým pri diferenciácii genotypov jačmeňa s rovnakým hordeínovým profilom. Tieto fakty jednoznačne poukazujú na to, že spojenie analýz polymorfizmu esteráz spolu s polymorfizmom hordeínov je excelentným nástrojom na identifikáciu a diferenciáciu genotypov jačmeňa.

LITERATÚRA

- BRADOVÁ, J. – SÝKOROVÁ, S. 2006. Optimalizace metod elektroforézy proteinů pro identifikaci odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Praha, VÚRV, 2006, 36s, ISBN: 80-86555-97-6
- BRADOVÁ, J. - SÝKOROVÁ, S. - ŠAŠEK, A. 1998. Hordeinový a esterázový polymorfizmus odrůd ječmene registrovaných v roce 1997 v České republice. In: *Czech Journal of Genetics and Breeding*, vol. 34, no. 4, 1998, p. 131-138

- BROWN, A. H. D. – NEVO, E. - ZOHARY, D. – DAGAN, O. 1978. Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). In: *Genetica*, vol. 49, p.97-108
- BROWN, A. H. D. – MUNDAY, J. 1982. Population – genetic structure and optimal sampling of landraces of barley from Iran. In: *Genetica*, vol. 58, p. 85 - 96
- BROWN, A. H. D. 1983. Barley isozymes. In: *Plant Genetics and Breeding*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p. 57-77
- BROWN, A. H. D. - CLEGG, M. T. 1983. Isozyme assessment of plant genetic resources. In: *Isozymes: Current Topics in Biological Medical Research*, vol. 11, p. 285–295.
- CANDRÁKOVÁ, E. 2006. Adaptabilita odrôd jačmeňa jarného na pestovateľské podmienky prostredia. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. Zborník z 13. vedeckej konferencie, Piešťany : VÚRV, 2006, str. 51-53
- KAHLER, A. L. – ALLARD, R. W. 1970. Genetics of isozyme variants in barley. I. Esterases. In: *Crop science*, vol. 10, p. 444 - 448
- KAHLER, A. L. – ALLARD, R. W. 1981. Worldwide patterns of genetic variation among four esterase loci in Barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *TAG Theoretical and Applied Genetics*, vol. 59, no. 2, 1981, p. 101-111
- KONISHI, T. - MATSUURA, S. 1987. Variation of esterase isozyme genotypes in a pedigree of Japanese two-rowed barley. In: *Japanese Journal of Breeding*, vol. 37, p. 412-440
- KONISHI, T. 1995. Geographical diversity of isozyme genotypes in barley. Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.
- LEISTRUMAITĖ, A. – PAPLAUSKIENĖ, V. 2007. Genetic Resources of Spring Barley: Analysis of Hordein Polymorphism. In: *Biologija*, vol. 53, no. 3, 2007, p. 30-33.
- LIU, F. – BOTHMER, R. – SALOMON, B. 1999. Genetic diversity among East Asian accessions of the barley core collection as revealed by six isozyme loci. In: *TAG Theoretical and Applied Genetics*, vol. 98, no. 8, 1999, p. 1226 - 1233
- MOHAN, M. – NAIR, S. – BHAGWAT, A. – KRISHNA, T. G. – YANO, M. – BHATIA, C. R. – SASAKI, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. In: *Molecular Breeding*, vol. 3, p. 87 - 103
- NEVO, E. 1990. Molecular evolutionary genetics of isozymes: pattern, theory and application. In: *Progress in Clinical and Biological Research*, vol. 344, p.701-742
- NIELSEN, G. – JOHANSEN, H. B. 1986. Proposal for identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. In: *Euphytica*, vol. 35, p. 717-728
- SAKTI, J. – PIETRZAK, L. N. 1988. Comparative Assessment of Genetic Diversity in Wild and Primitive Cultivated Barley in a Center of Diversity. In: *Genetics*, vol. 119, p. 981 - 990
- SÝKOROVÁ, S. – ŠAŠEK, A. 1996. Alely esterázových lokusů v souboru českých odrůd jarního a ozimného ječmene obecného (*Hordeum vulgare* L.). In: *Genetika a šlechtění*, vol. 32, no. 2, 1996, str. 123-134
- WARD, E. – BAMFORTH, W. 2002. Esterases in Barley and Malt. In: *Cereal chemistry*, vol. 79, no. 5, 2002, p. 681-686
- ŽÁKOVÁ, M. – BENKOVÁ, M. 2004. Genetic Diversity of Genetic Resources of Winter Barley Maintained in the Genebank in Slovakia. In: *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding*, vol. 40, no. 4, 2004, str. 118–126.

Pod'akovanie

Práca bola riešená za finančnej podpory grantovej výskumnej úlohy VEGA projektu č. 1/0471/09 „Genetické a molekulárne markery kvality cereálií a pseudocereálií“.

Kontaktná adresa:

¹Ing. Marián Tomka, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB Trieda Andreja Hlinku 2, E-mail: marian.tomka@uniag.sk

²Ing. Jana Bradová, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ČR, E-mail: bradova@vurv.cz

¹prof. RNDr. Zdenka Gálová, Csc. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB Trieda Andreja Hlinku 2, Tel.: +421376415385, E-mail: zdenka.galova@uniag.sk