

## DIFFERENTIATION BETWEEN BARLEY GENOTYPES USING PROTEINS AS MARKERS

*Marián Tomka, Jana Bradová, Zdenka Gálová*

### ABSTRACT

The aim of this work was to differentiate 30 barley genotypes using proteins as markers. We observed polymorphism at 4 isozyme loci (Est 1, Est 2, Est 4 and Est 5) and 7 hordein loci (Hrd A, Hrd B, Hrd F, Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd G). We revealed significant polymorphism using polyacrylamid gel electrophoresis for isoenzyme and starch gel electrophoresis for hordein separation. We observed 85 lines and 50 profiles based on hordein polymorphism and 43 lines and 12 esterase profiles in 30 analyzed varieties. A total of 29 alleles have been detected at 3 major hordein loci at which 10 alleles were at Hrd A with frequencies of 1,2 – 47,1 %, 16 alleles at Hrd B with frequencies of 1,2 – 14,1 %, and 3 alleles at Hrd F with frequencies of 16,5 – 58,8 %. At esterases loci we detected 4 alleles of Est 1 with frequencies of 2,3 – 62,8 %, 3 alleles at locus Est 2 with frequencies 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 Est 5 varied from 2,3 to 85 %. Esterases polymorphism was used to differentiate barley lines with identical hordein profile.

**Key words:** barley, hordein, 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).

Leistrumaitė 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 morfológických 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).

Zásobné bielkoviny zrna pšenice a jačmeňa sú v praxi najviac využívané pre účely identifikácie a diferenciacie genotypov. Sú lokalizované v špecializovaných rastlinných pletivách alebo orgánoch, kde sa nachádzajú v dostatočnom množstve a sú relatívne ľahko extrahovateľné (Chňápek, 2008).

Na diferenciaciu genotypov jačmeňa použili polymorfizmus hordeínov viacerí autori Pomortsev et al. (2002, 2007, 2008), Yin et al. (2003).

Černý a Šašek (1998) hodnotili možnosti markerovania ôsmich agronomických znakov jačmeňa siateho formy jarnej a ozimnej koeficientmi asociácie. Medzi počtom alel hordeínových génov a kvalitatívnou triedou použitých znakov (HTZ; podiel zrna 2,2 mm; podiel zrna 2,5 mm; extrakt v sušine sladu, odolnosť k múčnatke trávovej, hrdzi jačmeňovej, poliehaniu, dĺžka rastliny). Použitý postup markerovania bol overovaný pri použití súboru 63 domácich a zahraničných odrôd jačmeňa jarného a ozimného.

Nevo (1990) pomocou izoenzymov zostavil molekulárnu fylogénu pšenice a jačmeňa a odhalil nové príbuzenské odrody, pričom navrhuje ďalšie

teoretické a praktické štúdium izoenzýmov 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 hordeínov a esteráz. Polymorfizmus hordeínov bol hodnotený v 7 lokusoch (Hrd A, Hrd B, Hrd F, Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd G) a polymorfizmus esteráz v štyroch lokusoch (Est 1, Est 2, Est 4, Est 5) a na ich základe sa pokúsiť o diferenciáciu 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**). Najčastejšie sledovanými hordeínovými lokusmi sú Hrd A a Hrd B, pričom niektoré alely z týchto lokusov predstavujú potenciálne markery agronomických a technologických parametrov jačmeňa.

### MATERIÁL A METÓDY

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.

Zásobné bielkoviny sme izolovali z endospermu celých, suchých, zreých zrn podľa optimalizovanej ČSN 46 1085-1 (**Bradová, Sýkorová, 2006**). Zrno sme zhomogenizovali mechanicky - rozmliaždením, vložili do eppendorfovej skúmavky, kde prebehla samotná extrakcia hordeínov v 65 % etanole.

Elektroforézu, fixáciu a farbenie škrobových gélov sme uskutočnili podľa optimalizovanej ČSN 46 1085-1 (**Bradová, Sýkorová, 2006**). Na detekciu hordeínov v stĺpcoch škrobových gélov sme použili farbivá roztok nigrosínu a následne boli jednotlivé gély vyhodnotené a naskenované. Výsledný dendrogram bol zostrojený hierarchickou klastrovou analýzou využitím UPGMA algoritmu.

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**).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jedným z prvých produktov expresie génov sú bielkoviny, a preto z ich zloženia možno predpokladať skladbu génov, a tým získavať informácie o genotype. Princíp bielkovinových markerov umožňuje podľa bielkovín stanoviť pôvod kultúrnych rastlín, určiť štruktúru ich genómu, uskutočniť ich genómovú analýzu, presne a rýchlo identifikovať odrody, detegovať línie a mutanty (**Gregová et al. 1995; Gálová et al. 2003**).

Celkovo sme detekovali 85 línií a 50 hordeínových profilov. Väčšina odrôd (20) vykazovala vnútroodrodový polymorfizmus hordeínov. Počet línií sa pohyboval od 1 do 8. Celkovo sme v majoritných lokusoch detekovali 29 alel, z toho 10 v Hrd A, 16 v Hrd B a 3 alely v lokuse Hrd F. V minoritných lokusoch sme zistili prítomnosť 5 alel (Tabuľka 1). Jednotlivé alely sa v lokuse Hrd A vyskytovali s frekvenciou od 1,2 % do 47,1 %. V lokuse Hrd B sa frekvencia alel pohybovala od 1,2 % do 14,1 %. Frekvencia alel v Hrd F sa pohybovala od 16,5 % do 58,8 %. V minoritných lokusoch (Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd G) sa alely vyskytovali s frekvenciou 1,2 % - 60,0 %. Vysoký stupeň polymorfizmu, ktorý sme pozorovali v hordeínových lokusoch potvrdzujú aj **Prugar a Hraška (1989), Pomortsev et al. (2007, 2008), Yin et al. (2003)** a ďalší.

Tabuľka 1 Typy a počet detekovaných alel na jednotlivých lokusoch.

Majoritné lokusy											
Hrd A											
Alela	Počet	Alela	Počet	Alela	Počet	Alela	Počet	Alela	Počet	Alela	Počet
2	40	12	12	21	11	31	2	N2	5		
3	2	14	2	23	9	N1	1	N	1		
Hrd B											
1	3	8	1	(17)	2	21	8	34	2	N	2
3	12	9	1	18	1	25	8	47	12		
5	4	17	3	19	12	29	12	64	2		
Hrd F											
1	50	2	14	3	21						
Minoritné lokusy											
Hrd C	8	Hrd D	4	Hrd E	21	Hrd G	1	0	51		

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 alel na lokus bol 3,25, čo potvrdzujú práce autorov **Brown, 1983; Nielsen and Johansen, 1986 Dai a Zhang (1989)**. Tieto alely v rôznych kombináciách vytvorili 12 esterázových profilov. Celkovo sa frekvencie jednotlivých alel pohybovali od 2,3 % do 93 %. **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 tým, že väčšina našich genotypov bola prevažne slovenského pôvodu zatiaľ čo uvedení autori pracovali s celosvetovou kolekcii genotypov jačmeňa. 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.

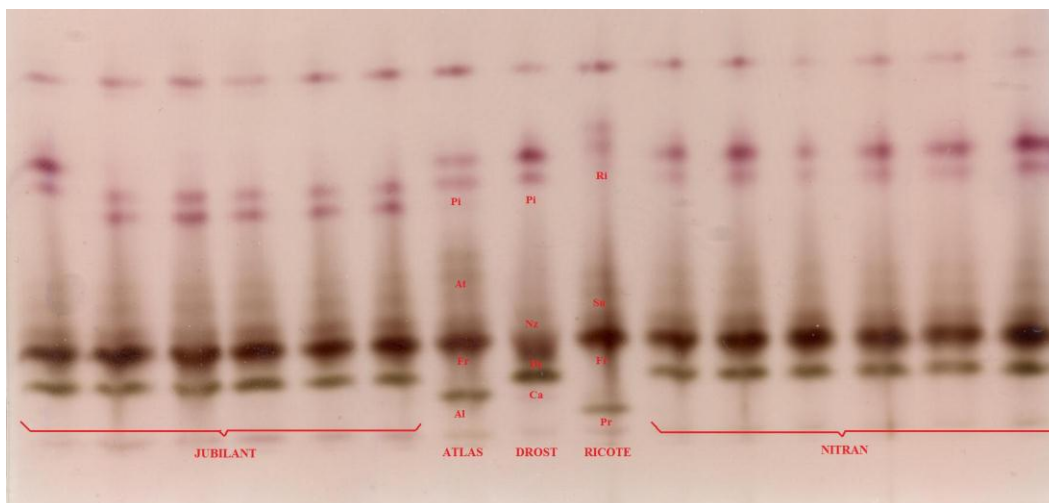
Na základe detegovaných alel sme zistili, že z analyzovaného súboru 30 odrôd jačmeňa bolo 10 heterogénnych resp. viacliniových, pričom počet línií sa pohyboval od 1 do 4. Počty a frekvencie detegovaných alel sa nachádzajú v tabuľke č.2 a prehľad profilov je uvedený v tabuľke č.3.

Tabuľka 2 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

Tabuľka 3 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



Obrázok 1 Ukážka polyakrylamidového gélu s esterázami s označenými alelami štandardov

## ZÁVER

Výsledky, ktoré sme získali našimi analýzami, poukazujú na možnosť aplikácie bielkovinových markerov pri identifikácii a diferenciacii genotypov jačmeňa siateho. Vysoký stupeň detekovaného polymorfizmu v hordeínových lokusoch predpokladá jeho využitie pri štúdiu genetickej diverzity. Podľa detekovaných alel je možné predikovať kvalitu jačmeňa a na základe nej určiť smer jeho ďalšieho využitia. Pomocou bielkových markerov sme dokázali v analyzovanom súbore sledovať aj heterogenitu odrôd, čo sa dá následne využiť pri štúdiu vnútroodrodového polymorfizmu. 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 diferenciacii 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 diferenciaciu genotypov jačmeňa. Nevýhodou bielkovinových markerov oproti DNA markerom je to, že umožňujú sledovať polymorfizmus iba v kódujúcich sekvenciách DNA.

## 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
- 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
- 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
- ČERNÝ, J. – ŠAŠEK, A. 1998. Stanovení odrůdové pravosti pšenice a ječmene elektroforézou bílkovinových genetických markerů. *Metodiky pro zemědělskou praxi* 6, 1998, 60s.
- DAI, X. – ZHANG, Q. 1989. Genetic diversity of six isozyme loci cultivated barley of Tibet. In: *TAG Theoretical and Applied Genetics*, vol. 78, no. 2, 1989. p. 281-286
- GÁLOVÁ, Z. – STAROVIČOVÁ, M. – KNOBLOCHOVÁ, H. – GREGÁŇOVÁ, Ž. 2003. Biochemical and molecular characterization of new wheat genotypes. *Biologia*, 58, 2003, s. 1061-1066
- GREGOVÁ, E. – KRAIC, J. – ŽÁK, I. 1995. Charakterizácia odrôd pšenice pomocou glutenínov. *Biochemické, molekulárne*

a morfológické techniky v identifikácii odrôd rastlín, ÚKSUP, 1995, s.11-14

CHŇAPEK, M. 2008. *Využitie bielkovinových markerov pri identifikácii, diferenciacii a charakteristike genotypov pšenice letnej, tvrdej, špaldy a jačmeňa jarného*: Dizertačná práca. SPU Nitra, 2008, 142 s.

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.

LEISTRUMAITĚ, A. – PAPLAUSKIENĚ, 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

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

POMORTSEV, A.A. – KALABUSHKIN, B.A. – TERENTIEVA, I.A. 2002. Hordein Polymorphism in Barley Varieties from Northern Africa. In: *Russian Journal of Genetics*, vol.38, no.11, 2002, p. 1267–1278

POMORSTEV, A.A. – MARTYNOV, S.P. – LIALINA, E.V. 2007. Hordein Locus Polymorphism of Cultivated Barley (*Hordeum vulgare* L.) in Turkey. In: *Russian Journal of Genetics*, vol. 43, no. 11, 2007, p. 1294–1300

POMORSTEV, A.A. – MARTYNOV, S.P. – LIALINA, E.V. 2008. Hordein locus polymorphism in near eastern local populations of

cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) In: *Russian Journal of Genetics*, vol.44, no.6, 2008, p. 815-828

PRUGAR, J. – HRAŠKA, Š. 1989. Kvalita jačmeňa. Príroda Bratislava, 1989, s. 226

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

YIN, Q.Y. – MA, D.Q. – DING, Y. 2003. Analysis of genetic diversity of hordein in wild close relatives of barley from Tibet. In: *Theoretical and Applied Genetics*, vol.107, 2003, p. 837-842

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:

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

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

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