

MOŽNOST VYUŽITÍ ELEKTROFORÉZY HLÍZOVÝCH PROTEINŮ A ESTERÁZ K CHARAKTERIZACI REGISTROVANÝCH ODRŮD BRAMBOR

*The Possibility of Use of Tuber Protein and Esterase Electrophoresis for the
Characterization of Potato Registered Cultivars*

Světlana Sýkorová, Jana Bradová, Eva Matějová, Marie Berová
VÚRV Praha

Abstract

Potatoes represent a very fundamental and irreplaceable crop and food. The cultivar verification and identification as well as the possibility of the cultivar genuineness control have become an obvious necessity. The electrophoretic profiles of soluble tuber proteins and enzymes are considered as appropriate for the cultivar identification. Two methods of PAGE – UPOV (1996, 2002) were used for the characterization and identification of the registered potato cultivars. Potato cultivars were found by both methods used to be distinguishable and identifiable.

Key words: *potatoes, cultivars, identification, tuber protein, enzym, electrophoresis*

Souhrn

Brambory jsou velmi důležitou plodinou a nenahraditelnou potravinou. Odrůda je současně přímým nositelem kvalitativních znaků. Verifikace a identifikace odrůdy jakož i možnost kontroly pravosti odrůdové deklarace jsou velmi důležitým nástrojem např. pro kontrolu sadby. K tomuto účelu jsou velmi dobře využitelné elektroforetické profily rozpustných hlízových proteinů a enzymů. Pro identifikaci a charakterizaci registrovaných odrůd brambor byly použity dvě metody elektroforézy v polyakrylamidovém gelu podle UPOV (1996, 2002). Odrůdy byly rozlišitelné a identifikovatelné oběma metodami.

Úvod

Brambory jsou důležitou a v našich podmínkách i těžko nahraditelnou plodinou a potravinou, u níž je význam odrůdy jako nositele kvality nesporný. Brambory se stávají potravinou v okamžiku, kdy jsou uváděny do oběhu k přímému prodeji spotřebiteli a vztahuje se na ně ustanovení Zákona o potravinách (Zákon č.110/97 Sb.). Vzhledem k tomu, že prováděcí vyhláška k tomuto zákonu připouští pouze 2% příměsi cizí odrůdy, je velmi žádoucí disponovat metodami, které umožní identifikaci, verifikaci a provedení kontroly pravosti odrůdové deklarace u brambor. Celý proces musí samozřejmě začínat již u šlechtitele a producenta sadby. Metody identifikace odrůd založené na morfologických znacích rostlin a hlíz nejsou příliš objektivní, tyto znaky jsou značně závislé na podmínkách prostředí a ročníku; proto za nejvhodnější pro identifikaci odrůdy jsou pokládány stabilní znaky hlíz, např. rozpustné hlízové proteiny a enzymy, které tyto závislosti nevykazují, jsou tedy geneticky fixovány.

Hlízy brambor představují relativně homogenní pletivo, z něhož lze rozpustné proteiny hlíz poměrně snadno extrahovat. Rozpustné proteiny získávané z čerstvě sklizených zralých hlíz jsou převážně albuminy a globuliny. Glykoprotein patatin tvoří až 20% rozpustných proteinů, hlavní protein z frakce albuminů tuberin vykazuje esterázovou aktivitu (Desborough,1983). Vhodnou a účinnou metodou pro separaci těchto proteinů je elektroforéza v polyakrylamidovém nebo škrobovém gelu v alkalickém i kyselém prostředí, přičemž elektroforetické spektrum proteinů se nemění v hlízách

skladovaných po několik měsíců v chladu ani v bramborách pěstovaných na různých lokalitách a v různých ročnících (Desborough, 1983). Katalog evropských odrůd brambor založený na variabilitě elektroforetických spekter proteinů a esteráz vypracovali Stegemann a Loeschcke (1977). Také mezinárodní organizace pro ochranu práv k odrůdám UPOV doporučila využití polymorfismu hlízových proteinů a enzymů ke zjištění odlišnosti, homogenity a stability (DUS) – (UPOV, 1996, 2002).

Metodika

Jako rostlinný materiál k elektroforetickým analýzám byl použit modelový soubor hlíz 15 v ČR registrovaných odrůd brambor (standardní etalonové vzorky) poskytnutý Hlavní odrůdovou zkušebnou ÚKZÚZ Lída u Havlíčkova Brodu a hlízy 10 kalibračních etalonových odrůd, užívaných podle UPOV. Používané hlízy musí být zralé a čerstvě sklizené. Tyto vzorky byly poskytnuty z IPK Genbank Luesewitz, SRN. Extrakty pro elektroforézu byly získány vymačkáním hlízové vody z hluboce zmrazených a následně rozmrazených hlíz, stabilizací s antioxidačním činidlem (roztok siřičitanu a disiřičitanu sodného), zahuštěním a obarvením koncentrovaným roztokem sacharózy a amidočerní a centrifugací. Získané supernatanty byly buď ihned použity k elektroforetickým analýzám nebo zmrazeny při -24°C a skladovány (použitelnost minimálně 1 rok). K charakterizaci a identifikaci odrůd brambor byly použity dvě metody elektroforézy hlízových proteinů a esteráz v polyakrylamidovém gelu (PAGE) doporučené UPOV. První vhodná k identifikaci hlízových proteinů a esteráz je založena na systému 1 gelu a Tris-borátovém pufru o pH 7,9 (UPOV 1996), druhá metoda doporučená hlavně pro patatiny využívá soustavy dvou gelů (zaostřovacího a dělicího) a pufru Tris – Glycin o pH 8,9 (UPOV 2002).

Získaná elektroforetická spektra patatinů byla usušena mezi dvěma vrstvami celofánu, následně proměřena, vypočteny hodnoty relativní elektroforetické mobility (REM) jednotlivých pruhů, sestrojena grafická schemata elektroforeogramů a sestavena matice indexů identity celého souboru. Elektroforetická spektra esteráz byla rovněž usušena, proměřena a základní pruhy byly zkalištrovány pomocí kalibračních odrůd. Následně bylo provedeno jejich předběžné zařazení do kategorií esteráz podle postupu navrženého UPOV (2002).

Výsledky a diskuse

Přehled použitých odrůd je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled souboru registrovaných a kalibračních odrůd brambor

Registrované odrůdy	Kalibrační odrůdy
Camilla S38	Hansa
Fresco S39	Karolin
Karmela S40	Cinja
Molli S41	Corine
Vivaldi S42	Diana
Vital S43	Leyla
Remarka S44	Sieglinde
Cicero S47	Obelix
Felsina S49	Jetta
Karlina S50	Premiere
Katka S51	Ute
Klera S52	
Victoria S58	
Vineta S59	
Amylex S60	

Matice indexů identity (ii) pro jejich velký rozsah neuvádíme. Z matice indexů identity esteráz u souboru registrovaných odrůd vyplynulo, že z celkem porovnávaných 105 párů odrůd 14 párů mělo hodnotu ii vyšší nebo rovnou 50, s maximem 67% u páru Amylex - Katka a Vineta – Klera, 34 párů mělo hodnotu ii mezi 0 a 10% a 57 párů mezi 10 a 50. Průměrná hodnota ii esteráz souboru testovaných odrůd činila 25%. Ze sestrojené matice indexů identity patatinů u souboru registrovaných odrůd, obsahující 105 porovnávaných párů odrůd, vyplývá, že maximální nalezená hodnota ii činí 70 % a byla zjištěna u dvou párů odrůd, a to Vital – Remarka; Katka – Felsina. Celkem ze 105 párů mělo hodnotu ii vyšší než 50% 9 párů, mezi 10 a 50% 81 párů a pod 10 % 15 párů. Průměrná hodnota indexu identity patatinů testovaného modelového souboru registrovaných odrůd činila 28 %.

Pokud se týká matice indexů identity kalibračních odrůd, bylo porovnáváno celkem 45 párů odrůd, u esteráz maximální hodnota činila 80% a byla zjištěna u dvou párů odrůd Leyla-Hansa a Sieglinde-Corine, u 5 párů byla zjištěna hodnota ii nad 50%, u 25 párů hodnota ii činila 0% a u 15 párů se hodnota ii

pohybovala mezi 0 a 50%. Průměrná hodnota ii esteráz tohoto souboru činila 20%. Z matice indexů identity patatinů u kalibračních odrůd vyplynulo, že jeho maximální hodnota činila maximálně 67 % u páru Jetta – Sieglinde; u celkem 6 párů dosahovala hodnot nad 50% a u zbylých 38 párů se hodnota ii patatinů pohybovala mezi 15 a 50%. Průměrná hodnota ii patatinů souboru kalibračních odrůd činila 15%.

Postupem podle UPOV (2002), který vyplývá z práce Stegemann a Loeschcke (1977) byly zjištěny kalibrační hodnoty REM jednotlivých pruhů spektra patatinů a esteráz a provedeno zařazení do skupiny podle příslušného lokusu nejprve u souboru kalibračních odrůd (tabulka 2) a předběžně u souboru testovaných odrůd (tabulka 3). Z tabulky 3 je patrné, že se toto zařazení zdařilo jen u některých odrůd, intenzivní práce v tomto směru budou pokračovat.

Tab. 2: Kalibrační hodnoty REM pro odrůdy - etalony a skupiny patatinů a esteráz (UPOV)

Odrůda	Patatiny	Pat.sk.	Est2	Est2 skup.	Est3	Est 3 skup.	
Hansa	15,21,26,33,43,50,59	8.15	74,83	j	0	o	74,83
Karolin	15,31,43,52	3.05	74,84	j	88	c	74,84,88
Cinja	13,15,23,43,49,60	4.07					
Corine	15,21,26,33,43,50,59	8.15	74,75				74,75
Diana	15,26,31,43	1.01	65,67				65,67
Leyla	15,23,31,43	Keř.rohl.	74,76,83	dl tot.l	0	o	74,76,83
Sieglinde	15,26,33,43,60	?	75,77	l	88	c	75,77,88
Obelix	15,21,26,31,43,59	2.02	66,75	c	0	o	66,75
Jetta	15,26,31,43	1.01	73,76	h	0	o	73,76
Premiere	15,21,26,43,59		71,74	g	86	b	71,74,86
Ute	15,23,33,43,50	7.03	74,82	j	86	b	74,82,86

Tab. 3: Pokus o předběžné zařazení odrůd do skupin patatinů a esteráz podle UPOV (2002)

Odrůda	Patatiny	Pat.sk.	Esterázy	Est.sk.
Camilla S38	15,33,43,50	7.04	69,75,79,85,86	?
Fresco S39	15,31,43,50	3.01	67,71,75,83,89	?
Karmela S40	15,26,31,43,50	3.02	67,75,78,84,91	67+Fambo
Molli S41	15,31,43,50	3.01	71,76,82,91	?
Vivaldi S42	15,23,33,43,50	7.03	74,84,86	?
Vital S43	15,21,26,33,43,59	5.01	67,75,77,88	67+Sieglinde
Remarka S44	15,21,26,43,59	Premiere	71,75,84,91	?
Cicero S47	13,15,26,31,43,53	3.06 Tegal	75,84	?
Felsina S49	13,15,21,26,31,43,53,59	13+4.06 Vineta	(69,74,77,83); 70,75,84	?
Karlena S50	13,15,26,31,33,43,52,59,60	?	66,75,79,84	79,84+Obelix
Katka S51	13,15,21,26,30,43,52,60	?	75,77,84,88	84+Sieglinde
Klera S52	15,23,33,43	Baltica	75,77,83,88	83+Sieglinde
Victoria S58	13,15,21,26,31,43,53,59	13+4.06 Felsina	67,75,77,85	Pod.Kuras
Vineta S59	13,15,21,26,31,43,52,59	13+4.03	71,75,78,84	?
Amylex S60	15,21,26,33,43,52,59	8.02,8.03	69,75,77,86,91	69,75,91+Donald

Závěr

Aplikací obou popsaných metod na modelový soubor registrovaných odrůd brambor bylo zjištěno, že je lze pomocí uvedených postupů vzájemně rozlišit a identifikovat a tím jednoznačně a objektivně verifikovat odrůdovou deklaraci a odrůdovou čistotu jak u šlechtitelského materiálu, tak u certifikované sadby i konzumních vzorků brambor. Snaha o genetickou interpretaci získaných výsledků – zařazení odrůd do příslušných skupin patatinů a esteráz bude pokračovat v dalších letech řešení výzkumných projektů.

Literatura

- Desborough ,S.L.: Potato (Solanum Tuberosum L.). S.D.Tanksley,T.J.Orton(Eds.) Isozymes in Plant genetics and breeding, Part B. Elsevier Science Publishers B.V.,Amsterdam: 1983, s. 167-188.
- Stegemann, H.- Loeschcke,V.: Das europäische Kartoffelsortiment und seine Indexierung. Potato Res.20, 1977, s.101-110.
- UPOV, Bundessortenamt, 1996
- UPOV TWA 31/6 Bundessortenamt (Rio de Janeiro 2002) Draft test guedelines for potato

Výsledky byly získány v rámci řešení projektů NAZV QF 3050 a 1B44011.

Kontaktní adresa autora: Mgr. Světlana Sýkorová, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, E-mail: sykorova@vurv.cz

