

VYUŽITÍ METOD ELEKTROFORÉZY ZÁSObNÍCH A ENZYMATICKÝCH BÍLKOVIN K ROZLIŠENÍ REGISTROVANÝCH ODRŮD JARNÍHO JEČMENE A JEJICH UPLATNĚNÍ V SEMENÁŘSTVÍ

Use of Storage Protein and Esterase Electrophoresis for the Differentiation of Spring Barley Registered Varieties and The Utilization in Seed Production

Jana Bradová, Světlana Sýkorová
VÚRV Praha - Ruzyně

Abstract

The patterns of the storage proteins (hordeins) were compared by the methods of the electrophoresis in different gel matrixes in 47 spring barley varieties registered in the Czech Republic. Alleles of four esterase loci were determined in this set of varieties. Applying this protein markers, inter- and intravarietal polymorphism of the evaluated varieties was determined. Alleles of the esterase loci were used for detailed characterization and differentiation of the hordein identical varieties and lines. Only distinction of varieties Jarek and Ebson have not been successful using these methods yet.

Key words: *barley, varieties, identification, hordeins, esterases, electrophoresis*

Souhrn

47 registrovaných odrůd jarního ječmene bylo analyzováno pomocí 3 metod elektroforézy hordeinů (škrobová gelová elektroforéza, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v kyselém a zásaditém prostředí) a elektroforézou esteráz v polyakrylamidovém gelu. Pomocí výše uvedených bílkovinných markerů byl určen vnitroodrůdový a meziodrůdový polymorfismus. Alely esterázových lokusů byly použity pro detailnější charakterizaci a rozlišení hordeinově identických odrůd a linií. Kombinací výše uvedených metod se podařilo rozlišit téměř všechny registrované odrůdy ječmene s výjimkou dvojice odrůd Jarek a Ebson.

Úvod

Dávky osiv či merkantilního zrna ječmene představují významné komodity. Zárukou jejich odpovídajícího využití podle požadovaných hospodářských vlastností je především deklarace odrůdové pravosti a odrůdové čistoty. Odrůda je jedním z nejvýznamnějších faktorů rozvoje zemědělství, je tzv. "nositелеm" kvality. Metody identifikace a vzájemného rozlišování odrůd významných zemědělských plodin, se v posledních letech vyvíjejí v rychlém tempu. Souvisí to s obchodními aktivitami s osivem a sadbou mezi specializovanými firmami a společnostmi, kterým se u nás otevřel trh. S obchodováním jsou vždy spojeny problémy související s právní a obchodní ochranou zboží. Ochrana práv, která se váže na určitý rostlinný genotyp (odrůdu), se na různých úrovních týká ochrany autorských práv jak samotného autora, či majitele odrůdy, tak i dalších, kteří s odrůdou manipulují, např. na základě licence.

Význam rychlého a spolehlivého určení odrůd je podmínován odlišností odrůd v řadě hospodářsky významných vlastností. Každá odrůda se vyznačuje specifickým souborem vlastností, které rozhodují o jejím využití. Je proto v zájmu výrobců osiva a sadby i v zájmu pěstitelů, nákupu, zpracovatelského průmyslu, vnitřního a zahraničního obchodu používat jen správně zvolené a spolehlivě určené odrůdy.

Metodika

K charakterizaci odrůd ječmene byly použity etalonové vzorky semen registrovaných odrůd jarního ječmene. Vzorky byly získány z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (Odbor odrůdového zkušebnictví). Ve Státní odrůdové knize bylo k 1.10.2004 zapsáno 46 odrůd ječmene jarního. V letošním roce byla ze Státní odrůdové knihy vyřazena jarní odrůda Krona. Ke stanovení elektroforetické skladby hordeinů bylo použito 100 zrn od každé odrůdy a ke stanovení elektroforetické skladby esteráz byly použity sedmidenní listy 24 klíčících rostlin.

K verifikaci odrůd ječmene byly použity a vzájemně porovnány čtyři postupy elektroforetické separace hordeinových a enzymatických bílkovin ječmene a sice 1. postup elektroforézy ve škrobovém gelu (SGE) podle ČSN 46 1085-1, 2. postup doporučený mezinárodní organizací semenářské kontroly ISTA, tj. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE-ISTA), která je zakotvená v ČSN 46 1085-2, dále 3. metoda elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (SDS-PAGE), doporučená mezinárodní organizací pro ochranu odrůd (UPOV, 1994), 4. metoda elektroforézy esterázových lokusů Est 1, Est 2, Est 4 a Est 5 v polyakrylamidovém gelu s tris-glycin pufrem při pH 8,3 (Sýkorová, 1996).

Výsledky a diskuse

Charakteristiky hordeinových (SGE, SDS PAGE) a esterázových elektroforetických spekter odrůd jarního ječmene, vyjádřené soubory alelických bloků zon jsou uvedeny v tabulce 1.

Polymorfismus ve skladbě hordeinů a esteráz odrůd jarního ječmene.

Pomocí hordeinových a esterázových genů lze hodnotit genetickou strukturu odrůd ječmene jako čisté linie homogenní ve skladbě hordeinů, resp. esteráz či jako populace hordeinově, resp. esterázově polymorfní. Počet bílkovinných linií a jejich relativní četnost v odrůdové populaci jsou významné pro identifikaci odrůd hodnocených ve vzorku elektroforetickou analýzou hordeinů a esteráz.

Metodou SGE bylo v hodnoceném souboru 47 odrůd jarního ječmene zjištěno 23% odrůd hordeinově polymorfních - víceliniových (Jubilant, Kompakt, Nitran, Olbram, Pejas, Primus, Scarlet, Sladko, Stabil, Terno, Viktor).

K hodnocení hordeinového polymorfismu výše zmíněného souboru byla dále použita metoda SDS PAGE, jíž lze charakterizovat odrůdy pomocí lokusů hordeinových genů, tvořících alelické série – hordeinové bloky, lišící se od alelických serií lokusů, získaných metodou SGE. V souboru odrůd jarního ječmene bylo s využitím této metody charakterizováno jako hordeinově polymorfních 17% odrůd (Jubilant, Kompakt, Nitran, Pedant, Primus, Scarlett, Sladko, Terno).

Jako další kritérium k hodnocení bílkovinného polymorfismu zmíněného souboru byla použita metoda elektroforézy esteráz, kdy z celkového počtu 47 odrůd ječmene jarního jsou pouze 3 odrůdy (Akcent, Primus, Viktor) polymorfní v elektroforetické skladbě esterázových lokusů, což činí 6%.

Odrůdová specifičnost hordeinových a esterázových elektroforetických spekter

Hordeinové geny ječmene jsou lokalizovány pouze v jednom chromozómu (krátké rameno chromozómu 5) a vyznačují se celkově nižší genetickou proměnlivostí. To se projevuje vyšší četností odrůd-linií ječmene s identickým hordeinovým elektroforetickým spektrem. Pro identifikaci odrůd ječmene je proto vhodné použít kombinaci zmíněných metod elektroforézy hordeinů a esteráz..

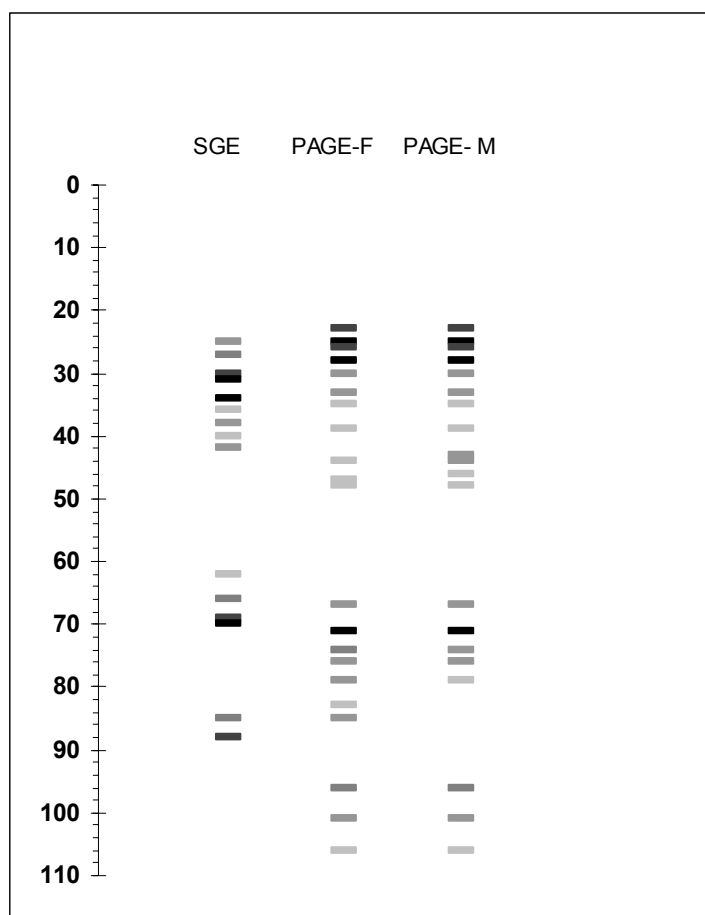
Hodnocené odrůdy, resp. jejich hordeinové linie byly roztříděny do skupin podle specifických elektroforetických a esterázových spekter. Skupiny hordeinově identických elektroforetických spekter jarního ječmene získané metodou SGE jsou uvedeny v tabulce 2, skupiny hordeinově identických elektroforetických spekter jarního ječmene získané metodou SDS PAGE jsou uvedeny v nově vytvořené tabulce 3 a skupiny esterázových elektroforetických spekter pro jarní ječmen jsou uvedeny v tabulce 4. Z těchto tabulek je patrné, že některá spektra jsou výlučná, specifická pro jednu odrůdu, linií, jiná jsou společná pro několik odrůd či linií.

Jako příklad rozlišení identických odrůd lze uvést skupinu odrůd č. 30 (tabulka 2) Forum a Malz, které se vyznačují shodnou skladbou hordeinových alel HRD AN1- HRD B8- HRD F2 získaných metodou SGE. Pomocí metody SDS PAGE byl zjištěn rozdíl mezi těmito odrůdami, kdy odrůda Forum je charakterizována elektroforetickou skladbou hordeinových alel HRD D1-HRD C10- HRD B6, zatímco u odrůdy Malz se vyskytují alely HRD D1- HRD C6- HRD B15 (tabulka 3).

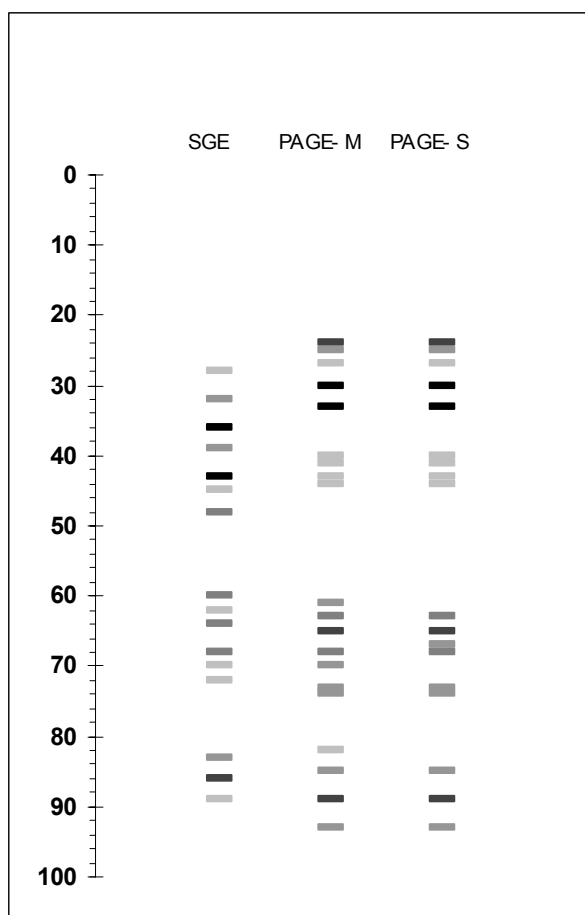
Příklad jiného rozlišení hordeinově identických odrůd jsou odrůdy Atribut a Orbit. Tyto odrůdy se vyznačují shodnou skladbou hordeinových alel získaných jak metodou SGE, tak metodou SDS PAGE. V tabulce 4 pak můžeme vidět, že odrůda Atribut je charakterizována elektroforetickou skladbou esteráz, vyjádřenou souborem alel Est1 Ca- Est2 Dr- Est4 Su- Est5 -null, která se liší od odrůdy Orbit (Est1 Ca- Est2 Fr- Est4 At- Est5 Ri) a tak je lze mezi sebou spolehlivě rozlišit.

K determinaci hordeinových genů je možno používat další postup elektroforetické separace hordeinů, a to oficiální metodiku PAGE – ISTA. Elektroforetická spektra získaná touto metodou jsou charakterizována relativní elektroforetickou mobilitou (REM) a intenzitou zbarvení jednotlivých pruhů. V této studii byla metoda PAGE ISTA uplatněna u modelového souboru odrůd jarního a ozimého ječmene, které byly shledány hordeinově identickými s použitím metody SGE (tabulka 2). Metodou PAGE - ISTA se podařilo rozlišit pouze dvojice jarních odrůd Forum – Malz (obrázek 1) a Maridol – Signál (obrázek 2).

Obrázek 1: Forum – Malz



Obrázek 2: Maridol - Signal



Závěr

Základní metodou SGE hordeinů byla zjištěna sestava hordeinových alelických bloků jednotlivých odrůd ječmene. Byla zjištěna homogenita, resp. heterogenita jednotlivých odrůd. Alternativou k SGE je SDS PAGE hordeinů, od níž lze očekávat přibližně stejné výsledky jako od SGE, je však pracovně i finančně poněkud náročnější, její výhodou je to, že je doporučena UPOV. Metoda PAGE esteráz a PAGE ISTA pak představuje další stupeň zjištění meziodrůdového polymorfismu. Nevýhodou posledně uvedené metody je absence genetické interpretace získaných hordeinových elektroforetických spekter na rozdíl od ostatních používaných postupů.

Nesporným přínosem těchto metod je, že umožňují vhodnou kombinací vzájemné rozlišení téměř všech registrovaných odrůd jarního ječmene, což je důležité hlavně z hlediska sladařské jakosti. Z celého sortimentu registrovaných jarních odrůd ječmene má totiž 26% odrůd nesladovnickou jakost. Pomocí zmíněných metod se nepodařilo rozlišit pouze dvojici odrůd Jarek a Ebson. Nutno však poznamenat, že odrůda Ebson je povolena pouze pro vývoz osiva, ne k pěstování v ČR a je tedy menší pravděpodobnost jejího výskytu.

Literatura

- ČSN 46 1085-1 Pšenice obecná a ječmen – Stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty – Část 1: Elektroforéza bílkovin ve škrobovém gelu (SGE) ČNI Praha, 1998
- ČSN 46 1085-2 Pšenice obecná a ječmen – Stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty – Část 1: Elektroforéza bílkovin v polyakrylamidovém gelu (PAGE) ČNI Praha, 1998
- Sýkorová, S. Šašek, A.: Alely esterázových lokusů u souboru českých odrůd jarního a ozimého ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.). Genet. a Šlecht, 32,1996(2):123-134.
- UPOV: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Barley. (Additional usefull explanation). TG/19/10 94-11-04

Tato práce byla podpořena řešením projektu NAZV QF 3050 a QF 3133.

Kontaktní adresa autora: Ing. Jana Bradová, VÚRV Praha – Ruzyně, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, E-mail: bradova@vurv.cz

Tabulka 1: Hordeinové (SGE,SDS PAGE) a esterázové genetické markery registrovaných odrůd ječmene jarního

Odrůda	HRD alelické bloky (SGE)						HRD alel. bloky (SDS PAGE)					Alely esterázových lokusů					
	linie	%	A	B	F	min.hor.	linie	%	D(3)	C(1)	B(2)	linie	%	Est-1	Est-2	Est-4	Est-5
Akcent	A	100	12	21	1		a	100	1	6	(16)	e1	70	Ca	Dr	Su	Pi
												e2	30	Ca	Fr	Su	Pi
Amulet	A	100	12	47	1	E,C	a	100	1	6	15	e1	100	Ca	Dr	Su	Pi
Annabell	A	100	2	17	3	E,C	a	100	1	1	1	e1	100	Ca	Fr	Su	null
Atribut	A	100	21	25	1		a	100	1	10	4	e1	100	Ca	Dr	Su	null
Biatlon	A	100	23	29	3		a	100	1	6	2	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
Bolina	A	100	2	8	2	D	a	100	1	2	4	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
Calgary	A	100	18	17	3		a	100	1	2	1	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Diplom	A	100	23	29	3		a	100	3	11	16	e1	100	Pr	Dr	Su	null
Ditta	A	100	32	21	1		a	100	1	ne	14	e1	100	Pr	Dr	Su	Pi
Ebson	A	100	2	19	1		a	100	1	1	9	e1	100	Ca	Fr	Su	Ri
Faustina	A	100	2	8	2	D	a	100	1	2	4	e1	100	Ca	Fr	Su	Ag
Forum	A	100	N1	8	2		a	100	1	10	6	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
Heris	A	100	2	47	1	E	a	100	1	1	15	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
Jarek	A	100	2	19	1		a	100	1	1	9	e1	100	Ca	Fr	Su	Ri
Jersey	A	100	23	8	2		a	100	1	1	15	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Jubilant	A	94	23	29	3		a	69	1	10	4	e1	100	Ca	Fr	Su	Te
	B	6	N2	29	3		b	31	1	10	7						
Kompakt	A	79	2	19	1		a	75	1	1	9	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
	B	21	21	2	3		b	25	1	1	(17)						
Krona	A	100	23	29	3		a	100	1	4	2	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Ladik	A	100	23	21	1	G	a	100	1	4	(16)	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Lumar	A	100	5	17	3		a	100	1	(6)	1	e1	100	Ca	Fr	At	Ri
Madeira	A	100	23	29	3		a	100	1	11	16	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Madonna	A	100	23	29	3		a	100	1	4	2	e1	100	Ca	Dr	Su	Pi
Maridol	A	100	N3	N2	1		a	100	1	11	8	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Malz	A	100	N1	8	2		a	100	1	6	15	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
Nordus	A	100	23	29	3		a	100	1	11	5	e1	100	Ca	Dr	Su	Pi
Novum	A	100	32	21	0		a	100	1	1	(13)	e1	100	Ca	Un	Nz	Pi
Olbram	A	90	4	21	1	G	a	100	1	2	7	e1	100	Ca	Dr	Su	Me
	B	10	5	17	2												
Orbit	A	100	21	25	1		a	100	1	10	4	e1	100	Ca	Fr	At	Ri
Orthega	A	100	N4	29	3		a	100	1	11	8	e1	100	Ca	Fr	At	Pi
Pax	A	100	2	19	1		a	100	1	1	21	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
Pejas	A	92	2	47	1	E	a	100	1	1	7	e1	100	Ca	Fr	At	Pi
	B	6	2	47	1												
Philadephia	A	100	23	29	3		a	100	3	1	8	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Prestige	A	100	2	17	2		a	100	1	1	4	e1	100	Ca	Fr	Nz	Te
Primus	A	43	21	25	1		a	68	1	2	4	e1	75	Ca	Fr	Su	Ri
	B	57	2	25	1		b	32	1	10	4	e2	25	Ca	Fr	Su	Pi
Respekt	A	100	2	5	1		a	100	1	4	8	e1	100	Pr	Fr	At	Ri
Prosa	A	100	2	19	1		a	100	1	1	9	e1	100	Ca	Fr	At	Pi
Sabel	A	100	2	29	3	E	a	100	1	4	4	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Saloon	A	100	23	29	3		a	100	1	4	4	e1	100	Ca	Fr	Su	null
Scarlet	A	35	2	8	2	D	a	60	1	2	8	e1	100	Pr	Fr	Su	Pi
	B	42	2	5	1												
	C	17	N1	8	2												
	D	6	21	5	1												
Signal	A	100	N3	N2	1		a	100	1	11	(17)	e1	100	Ca	Fr	At	Pi
Sladko	A	58	12	21	1	G	a	83	1	6	N	e1	100	Ca	Dr	Su	Ri
	B	42	12	21	1	E,G	b	17	1	6	(16)						
Stabil	A	83	2	47	1		a	100	1	2	8	e1	91	Ca	Fr	At	Pi
	B	17	N2	47	1							e2	9	Ca	Dr	Su	Ri
Terno	A	75	21	(17)	2		a	50	1	2	1	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
	B	25	2	(17)	2		b	50	1	10	1						
Tolar	A	100	2	19	1		a	100	1	1	9	e1	100	Ca	Fr	Su	Pi
Viktor	A	75	2	17	3		a	100	1	1	1	e1	85	Ca	Fr	At	Pi
	B	25	2	17	3	E						e2	15	Ca	Fr	Su	Pi

Tabulka 2: Skupiny hordeinově identických elektroforetických spekter odrůd ječmene jarního získaných metodou SGE

Skupina	HRD alelické bloky zon na lokusech A,B,F	Odrůdy, případně HRD linie
1	2 - 3 - 2	Kompakt B, Nitran B
2	2 - 3 - 2 - D	Nitran C
3	2 - 5 - 1	Respekt, Scarlett B
4	2 - 8 - -2 - D	Scarlett A, Faustina, Bolina
5	2 - 17 - 2	Prestige, Terno B
6	2 - 17 - 3	Viktor A, Pedant
7	2 - 17 - 3 - E	Viktor B, Annabell
8	2 - 19 - 1	Ebson, Jarek, Kompakt A, Pax, Prosa, Tolar
9	2 - 25 - 1	Primus B
10	2 - 29 - 3	Sabel
11	2 - 47 - 1	Pejas B, Stabil A
12	2 - 47 - 1 - E	Heris, Pejas A
13	4 - 21 - 1 - G	Olbram A
14	5 - 17 - 2	Olbram B
15	5 - 17 - 3	Lumar
16	12 - 21 - 1	Akcent
17	12 - 21 - 1 - G	Sladko A
18	12 - 21 - 1 - E,G	Sladko B
19	12 - 47 - 1 - C,E	Amulet
20	18 - 17 - (3)	Calgery
21	21 - 5 - 1	Scarlett D
22	21 - 17 - 2	Terno A
23	21 - 25 - 1	Atribut, Orbit, Primus A
24	23 - 8 - 2	Jersey
25	23 - 21 - 1 - G	Ladik
26	23 - 29 - 3	Krona, Madonna, Nordus, Biaton, Diplom, Jubilant B, Madeira, Philadelphia, Saloon
27	32 - 21 - 0	Novum
28	32 - 21 - 1	Ditta
29	N1 - 3 - 2	Nitran A
30	N1 - 8 - 2	Forum, Malz, Scarlett C
31	N2 - 29 - 3	Jubilant A
32	N2 - 47 - 1	Stabil B
33	N3 - N2 - 1	Maridol, Signal
34	N4 - 29 - 3	Orthega

Pozn.: 1) označ. HRD linií velkými písmeny za názvem odrůdy(-A,-B,-C,-D)

2) N1, N2, N3, N4-dosud nekatalogizované alelické bloky

3) C, D, E, G (sloupec 2 tj. HRD alelické bloky) - minoritní hordeinové složky

Tabulka 3: Skupiny hordeinově identických elektroforetických spekter odrůd ječmene jarního získaných metodou SDS PAGE

Skupina	HRD alelické bloky zon na lokusech D,C,B	Odrůdy, případně HRD linie
1	1 - 1 - 1	Annabell, Viktor, Nitran a
2	1 - 1 - 4	Prestige
3	1 - 1 - 7	Pejas
4	1 - 1 - 9	Ebson, Jarek, Kompakt a, Prosa, Tolar, Nitran-b, Pedant-b
5	1 - 1 - (13)	Novum
6	1 - 1 - 15	Heris, Jersey
7	1 - 1 - (17)	Kompakt- b
8	1 - 1 - 21	Pax
9	1 - 2 - 1	Terno- a
10	1 - 2 - 4	Primus -a, Scarlet- b, Bolina
11	1 - 2 - 7	Olbram
12	1 - 2 - 8	Scarlet -a, Stabil
13	1 - 4 - 2	Krona, Madonna
14	1 - 4 - 4	Sabel, Saloon
15	1 - 4 - 8	Respekt
16	1 - 4 - (16)	Ladik
17	1 - (6) - 1	Lumar, Pedant-a
18	1 - 6 - 15	Amulet, Malz
19	1 - 6 - (16)	Akcent, Sladko- b
20	1 - 6 - N	Sladko- a
21	1 - 10 - 1	Terno- b
22	1 - 10 - 4	Atribut, Jubilant-a, Orbit, Primus- b,
23	1 - 10 - 6	Forum
24	1 - 10 - 7	Jubilant- b
25	1 - N - 14	Ditta
26	1 - 11 - 5	Nordus
27	1 - 11 - 8	Maridol, Orthege
28	1 - 11 - 16	Madeira
29	1 - 11 - (17)	Signal
30	3 - 1 - 8	Philadelphia
31	3 - 11 - 16	Diplom

Pozn.: 1) označ. HRD linií malými písmeny za názvem odrůdy(-a,-b)

2) N- neznámé, dosud nekatalogizované alelické bloky

Tabulka 4: Skupiny esterázově identických elektroforetických spekter odrůd ječmene jarního

Skupina	Alely ester. lokusů				Odrůdy, případně est. linie
	Est.1	Est.2	Est.4	Est.5	
1	Ca	Dr	Su	Pi	Akcent-e1, Amulet, Madonna, Nordus
2	Ca	Dr	Su	null	Atribut
3	Ca	Dr	Su	Me	Olbram
4	Ca	Dr	Su	Ri	Sladko, Stabil- e2
5	Ca	Fr	Su	Pi	Akcent-e2, Krona, Jersey, Ladik, Madeira, Maridol, Philadelphia, Primus-e2, Sabel, Terno, Tolar, Viktor-e2, Pedant
6	Ca	Fr	At	Pi	Orthega, Pejas, Prosa, Signal, Stabil-e1, Viktor -e1
7	Ca	Fr	At	Ri	Lumar, Orbit
8	Ca	Fr	Su	Ri	Ebson, Jarek, Primus-e1
9	Ca	Fr	Su	Te	Jubilant
10	Ca	Fr	Su	null	Annabell, Saloon
11	Ca	Fr	Su	Ag	Faustina
12	Ca	Fr	Nz	Te	Prestige
13	Ca	Un	Nz	Pi	Novum
14	Pr	Dr	Su	Pi	Ditta
15	Pr	Fr	Su	Pi	Bolina, Forum, Heris, Kompakt, Pax, Biaton, Calgary, Malz, Scarlett, Bolina, Nitran
16	Pr	Fr	At	Ri	Respekt
17	Pr	Fr	Su	null	Diplom

Pozn.: 1) označ. esterázových linií písmenem "e" a číslicí 1,2