

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA



České Budějovice

2006

JIHOČESKÁ UNIVERZITA

Zemědělská fakulta

České Budějovice

Obor: *Všeobecné zemědělství*

Specializace: *Genové inženýrství a šlechtění rostlin*

Katedra: *Rostlinné výroby*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**HODNOCENÍ VARIABILITY PROTEINŮ ZRNA DRUHU
HORDEUM VULGARE L. NA ÚROVNI SOUBORU
SVĚTOVÝCH GENOTYPŮ**

Vedoucí:

Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Autor:

David Formánek

2006

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Hodnocení variability proteinů zrna druhu *Hordeum vulgare* L. na úrovni souboru světových genotypů“ vypracoval samostatně na základě vlastních výsledků a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Lišově dne 8. května 2006

.....
David Formánek

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat zvláště panu Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za poskytnutí informací, odborné vedení a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Dále chci poděkovat Ing. Janu Kresanovi, Janě Kotyzové, Věře Formánkové a ostatním za všestrannou pomoc.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **David Formánek**

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Název tématu: **Hodnocení variability proteinů zrna druhu *Hordeum vulgare* L. na úrovni souboru světových genotypů**
Evaluation of grain protein variability of *Hordeum vulgare* L. in collection of world-wide range genotypes

Zásady pro vypracování:

(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Cílem práce bude detailní hodnocení variability proteinových spekter druhu *Hordeum vulgare* L. na úrovni souboru 20 vybraných světových genotypů. Porovnány budou odlišné přístupy hodnocení elektroforetických spekter – klasické (ruční) stanovení hodnot REM u jednotlivých proteinových pruhů vs. softwarové hodnocení proteinových profilů. Materiálně bude práce vycházet z SDS-PAGE analýz souboru genotypů ječmene, které jsou k dispozici na Biotechnologickém centru ZF JU a budou diplomantovi pro účel DP poskytnuty. Metodicky bude práce probíhat podle následujícího schématu:

1. Základní hodnocení míry genotypové variability mezi frakcemi proteinů podle rozpustnosti.
2. Provedení klasického (ručního) stanovení hodnot REM u jednotlivých proteinových pruhů včetně intenzit detekčního barvení.
3. Zpracování elektroforeogramů pomocí digitální obrazové analýzy.
4. Hodnocení proteinových profilů pomocí speciálního software BioProfil 1 D++ případně GelManager.
5. Zpracování získaných výsledků, statistické hodnocení (matice podobnostních koeficientů, konstrukce dendrogramů) a hodnocení rozsahu genotypové variability proteinových profilů.

Rozsah grafických prací: 10 stran

Rozsah průvodní zprávy: 30-40 stran

Seznam odborné literatury:

Čurn V. (1995): Studium uplatnění metod elektroforézy bílkovin ve šlechtění řepky olejné. Doktorská disertační práce. ZF JU, České Budějovice, 164 p.

Černý J., Šašek A. (1998): Využití elektroforetické analýzy BGM k charakteristice odrůd pšenice a ječmene. ÚZPI, Praha, 36 p.

Vilber Lourmat (1999): Bio-Profil, BIO-1D++, Version 99. Image Analysis Software.

Bárta J., Čurn V., Diviš J. (2003): Study of biochemical variability in thirteen European and five Czech potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties by soluble protein, isoesterase, and isoperoxidase electrophoretic patterns. Plant Soil Environ., 49 (5): 230-236.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: 4. února 2005

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2006

L.S.

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.
Vedoucí katedry

doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
Děkan

V Českých Budějovicích dne 4. února 2005

OBSAH

	str.
1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. Botanické rozdělení	3
2.2. Charakteristika a šlechtění současných odrůd	5
2.3. Trendy	5
2.4. Hordeinové bílkoviny	6
2.5. Hordeinové geny	7
2.6. Hordeinové bloky	8
2.7. Enzymové bílkoviny	9
2.8. Biochemické markery	10
2.9. Využití biochemických markerů	12
2.10. Elektroforetické metody	13
2.10.1. Polyakralamid (PAGE)	15
2.10.2. SDS-PAGE	16
2.10.3. Dvojrozměrná elektroforéza (SDS-PAGE)	16
2.10.4. Isoelektrická fokusace (IEF)	16
2.10.5. Kapilární elektroforéza (HPCE)	17
3. Cíle diplomové práce	18
4. Materiál a metody	19
4.1. Charakteristika biologického materiálu	19
4.2. Extrakce proteinů	20
4.3. Elektroforetická separace (SDS-PAGE)	21
4.4. Detekce separovaných proteinů na gelu	22
4.5. Zpracování elektroforetických dat	23
5. Výsledky	24
5.1. Frakce prolaminů	24
5.2. Frakce Albuminů a globulinů	27
5.3. Frakce glutelinů	32
5.4. SDS-celkový protein	35

6. Diskuze	39
6.1. Prolaminy	39
6.2. Albuminy a globuliny	41
6.3. Gluteliny	42
6.4. SDS-celkový protein	42
6.5. Odlišnosti ve výsledcích	43
7. Závěr	44
8. Seznam literatury	46
9. Seznam příloh	50
10. Přílohy	52

1. Úvod

Ječmen je jako druh jednou z nejstarších obilnin. Dějiny pěstování zasahují do doby zhruba 10 000 let před naším letopočtem. Naši předkové se zabývali pěstováním ječmene šestiřadého a čtyřřadého už ve starém Egyptě a Babylonu. V Evropě se s pěstováním ječmene začalo v pravěku a až v době bronzové nastupuje na scénu ječmen čtyřřadý. Ječmen dvouřadý je mnohem mladší. Zeměpisný původ *Hordeum vulgare* spadá do dvou oblastí. Oblast původu šestiřadých ječmenů spadá do jihozápadní Asie. Ve východoafrické Habeši se pak vyskytovaly nejen šestiřadé, ale i dvouřadé ječmeny (DIVIŠ a kol., 2000).

Na našem území se začalo s pěstováním ječmene asi 5000 let před naším letopočtem. Hlavní rozvoj pěstování ječmene nastal v novověku po zavedení Norfolského osevního postupu. Zařazení okopanin poskytlo ideální podmínky pro pěstování zejména jarního ječmene. E. Proskowetz zachránil několik krajových odrůd a v roce 1875 vyšlechtil z klasického hanáckého ječmene „Proskowetzův Haná pedigrée“, který svojí vynikající sladovnickou kvalitou zaujal velmi významné postavení v Rakousko-Uhersku. Šlechtění ječmene probíhá až do dnešní doby. V roce 1965 vyšlechtil ing. Josef Bouma, CSc. odrůdu Diamant metodou mutačního šlechtění. Zaměřil se na zvýšení výnosu, kterého dosáhl vyšším počtem odnoží. Dále na zkrácení stébla, čímž se zamezí nadměrnému poléhání a podařilo se mu udržet sladařskou kvalitu zrna (DIVIŠ a kol., 2000).

V devadesátých letech u nás byly povoleny nové domácí odrůdy Lunet (1990), Okal a Kromoz (1992) a Kamil, Kromir a Luxor (1930-1996).

Šlechtění ječmene je v současné době soustředěno u šlechtitelských firem Selen, a.s., Britech, a.s., CEZEA, a.s., Plant Select, s.r.o. a ZVÚ Kroměříž (ČURN, GRAMAN, 1998).

Mnoho ekonomicky významných druhů rostlin zahrnuje velký počet odrůd, z nichž mnohé jsou blízce příbuzné. V případě agronomicky cenných druhů má značný ekonomický význam možnost odlišení odrůd. Ve šlechtitelství může být uznána jen taková odrůda, která má svou jasnou charakteristiku. Odrůda se musí lišit od všech ostatních povolených odrůd. U mnohých významných druhů existuje značné množství odrůd a mnohé nové odrůdy vzniklé v novošlechtění často nejsou akceptovány vzhledem k nemožnosti rozlišení ve znacích používaných pro odlišení a charakteristiku odrůd nebo genotypů (NIELSEN, 1985).

Tradiční metody stanovení odrůdové pravosti a čistoty odrůd ječmene jsou založeny na posuzování souboru morfo-fyziologických znaků a vlastností rostlin hodnocených ve vegetačních zkouškách. Tento způsob je však časově náročný a neumožňuje rychlou a plně

spolehlivou, vnějšími faktory neovlivnitelnou identifikaci odrůd (BRADOVÁ, SÝKOROVÁ 2005).

Porovnáváním genotypů ječmene a stanovením odlišnosti, homogenity a stálosti odrůd se u nás odborníci zabývali v devadesátých letech. Využily metody bílkovinných signálních genů. Do té doby se odlišnost, stejnorodost a stálost odrůd určovala pomocí morfologických a fyziologických znaků a vlastností. Bylo zjištěno, že elektroforetická analýza prolaminů představuje rychlou exaktní metodu, umožňující objektivní posouzení odlišnosti, deklarovaného původu, stupně homogenity a stálosti odrůd ječmene. Elektroforéza prolaminů tak může vhodně doplňovat a objektivizovat stávající způsoby stanovení odlišnosti, homogenity a stálosti odrůd, založené na morfologických a fyziologických kritériích (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

2. Literární přehled

2.1. Botanické rozdělení

Rod *Hordeum* L. se podle počtu chromozomů ($n = 7$) rozděluje na diploidní, tetraploidní a hexaploidní, ale i v rámci druhu se mohou vyskytovat různé stupně ploidity. Předchůdcem dnešních ječmenů byl pravděpodobně ječmen víceřadý *H. agriocrithon* Åberg. Z něho pravděpodobně vznikly ječmeny dvouřadé. Všechny kulturní ječmeny představují jeden kulturní diploidní ($n=14$) druh *Hordeum vulgare* L., ječmen setý dále členěný na convariety (PETR, HÚSKA a kol., 1997).

V současnosti je nejvíce používána klasifikace podle ORLOVA a VAVILOVA (1936). Tito autoři kulturní ječmen rozdělují podle řadosti klasu, tedy počtu plodných kvítků v klásku, na tři poddruhy: *H. vulgare* L. (víceřadý ječmen), *H. distichum* L. (dvouřadý ječmen) a *H. intermedium* Vav. et Orl. (přechodný ječmen). Další členění uvnitř těchto poddruhů je podle morfologie klasu na variety, kterých je v současnosti popsáno asi 200 (LEKEŠ, 1985).

Ječmen setý víceřadý – *Hordeum vulgare* convar. *vulgare* se rozlišuje na dva typy, typ šestiřadý a typ čtyřřadý.

Typ šestiřadý má všechny tři klásky plodné, klasy se šesti podélnými řadami obilek, stejnoměrně rozdělenými kolem vřetene v podobě šestičlenného přeslenu. Obilky protilehlých postranních řad jsou na straně ke střední obilce jednostranně prohnuté.

Typ čtyřřadý má rovněž všechny klásky plodné, klas je řídkší se šesti řadami obilek, ale se střední řadou obilek těsně přilehlou k vřetenu klasu a postranní obilky se částečně překrývají, takže na vřetenu jsou zdánlivě jen čtyři řady obilek. Patří sem většina kultivarů krmného ječmene. U nás se tyto typy pěstují jako ozim. Víceřadé formy jarního ječmene se vyskytují v severních oblastech, zvláště Kanada a Skandinávie, kde nízké teplota po zasetí umožňují diferenciaci také klásků postranních.

Ječmen setý přechodný - *H.v.* convar. *intermedium* má střední klásky plodné, postranní částečně nebo úplně neplodné. Zahrnuje ječmeny východoasijské a tibetské, některé skotské a švédské.

Ječmen setý různotvarý – *H.v. convar. labile*

Na klásku klasového větene se vyvíjí nestejný počet plodných klásků, řada rozmanitých forem původem patrně ze severovýchodní Afriky a Arábie. Právě ječmen labilní prokazuje, že dvouřadost a víceřadost klasu ječmene může být ovlivněna klimatickými podmínkami. V oblastech, kde při jarním výsevu ječmene je do třetí etapy organogeneze vzrostného vrcholu jeho další diferenciaci velmi rychlá vlivem vyšších teplot a delšího dne, nemohou se vyvinout postranní jednokvěté klásky. Vytvoří se jen prostřední, který od určité fáze inhibuje růst postranních klásků.

Ječmen setý dvouřadý – *H.v. convar. distichon* nese tři klásky ve skupině, ale jen střední je plodný a často i osinatý. Okrajové klásky jsou někdy s prašníky nebo jalové, bezosinné, vždy s pluchou a pluškou. Zralé zploštělé klasy mají jen dvě podélné řady obilek na plodných lících stranách článků větene, mezi nimi je z každé strany dvojité řada bezosinných, drobných, jalových klásků. Člení se do několika variet, z nichž hlavní jsou:

Ječmen nící – var. *nutans*

Klas je dlouhý 50 až 130 mm, při zrání háčkuje. Osiny jsou dlouhé souběžně přiléhající, obilky pluchaté. Tato varieta zahrnuje nejdůležitější sladovnické odrůdy.

Ječmen vzpřímený - var. *erectum*

Má krátký hustý klas, který zůstává do plné zralosti vzpřímený. Osiny odstávají od větene.

Ječmen paví - var. *zeoctrithon*, syn. var. *breve*

Jeho klas je krátký, velmi hustý, u báze široký, u vrcholu se zužuje. Obilky odstávají od větene. Na klasu jsou osiny vějířovitě rozestálé.

Ječmen nahý – var. *nudum*

Obilka nesrůstá s pluchou a pluškou. Vyznačuje se nízkým obsahem vlákniny. Ačkoliv je velmi hodnotným krmivem, pěstuje se jen velmi málo.

(PETR, HÚSKA a kol., 1997; BOTHMER a kol.1995)

2.2. Charakteristika a šlechtění současných odrůd

Současné odrůdy víceřadých ozimých ječmenů mají vesměs vysoký výnosový potenciál. Odrůdy povolené v posledních letech vynikají vysokým výnosem i zlepšenou krmnou hodnotou. Jedná se zejména o odrůdy Kamil, Kromir a Luxor. Zvláště u našich šlechtění, především v Kroměříži a Lužanech, je dobré až velmi dobré přezimování odrůd a alespoň střední odolnost nebo alespoň tolerance k padlí travnímu. Je možné použití dvouřadých ozimých ječmenů jako sladovnických odrůd. Takto jsou využívány především v některých zemích EU, ale slad je poněkud horší kvality. Náš sladovnický průmysl tyto dvouřadé ozimé ječmeny neakceptuje jako sladovnické. Předností ozimého, zejména víceřadého ječmene je jeho menší náročnost na agroekologické podmínky a vysoký výnosový potenciál i na horších půdách a v horších oblastech. Nevýhodou i u moderních odrůd je jejich menší odolnost k nízkým teplotám (DIVIŠ a kol., 2000).

Šlechtění je dnes zaměřeno u jarních dvouřadých forem především na tvorbu odrůd pro sladovnické účely, ozimé formy pro krmné účely. Žádají se odrůdy výnosné, s odpovídající úrovní jakostních ukazatelů, odolné vůči nepříznivým vlivům a vhodné pro mechanizovanou technologii pěstování a sklizně (ČURN, GRAMAN, 1998).

V dnešní době nachází ječmen využití i v potravinářském průmyslu. Zpracovává se hlavně na kroupy a na mouku. Pro potravinářské využití se šlechtí tzv. Waxy ječmeny s vyšším obsahem beta – glukánů a biologicky aktivních antioxidantů, především tokoferolů, tokotrienolů a vitamínu E. Nemalý význam má i ječmen určený pro průmyslové zpracování, především výroba etanolu, whisky, produkce ječného škrobu a kosmetických či farmaceutických přípravků (PELIKÁN, SÁKOVÁ, 2001).

2.3. Trendy

Jarní ječmen by se podle všeho měl stát hlavní komoditou rostlinné výroby ČR. Slad, chmel a pivo mají šanci být nosným agrárním komplexem exportu ČR. K tomu je nutné výrazně zvýšit výnosy jarního ječmene při udržení vysoké kvality zrna. Vstupy do produkce musí přinášet rentabilní přírůstek tržeb. Je nutné, aby souběžně s růstem pěstování jarního ječmene přibývaly i technologické poznatky, nové vstupy, rozvíjel se obchod a odbyt. Souběžným cílem také musí být český export „pivní kultury“ vysoké kvality do světa. Co se

týče výhledu do budoucnosti sladovnického ječmene v EU, má ČR vynikající podmínky pro ječmen z hlediska výnosů, kvality, tradice, sladoven, pivovarnictví, skladování a exportu. Sladovnický ječmen je hlavní exportní plodinou ČR (VAŠÁK, 2006).

2.4. Hordeinové bílkoviny

Hordeiny jsou prolaminové bílkoviny ječmenného zrna a představují genetické bílkovinné markery. Jsou proto vhodné k rozlišení a identifikaci jednotlivých genotypů ječmene (linií, odrůd) i k markerování hospodářsky významných vlastností. Hordeiny jsou polymorfní a snadno zjistitelné pomocí elektroforézy. Nutná je vysoká dědivost hordeinových spekter a jejich specifčnost u jednotlivých genotypů ječmene (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

Hordeiny jsou velmi podobné gliadinům procentickým zastupením jednotlivých aminokyselin, obsahují však větší podíl prolinu, glycinu a valinu, ale méně kyseliny asparagové (EWART, 1980).

Hordeinovou frakci rozdělujeme do třech základních skupin označených písmeny A,B,C. Rozdíl mezi složkami je v molekulárních hmotnostech. Později se ještě podařilo odhalit skupinu čtvrtou označenou písmenem D.

složka:

- A 14 000 - 22 000 daltonů
- B 28 000 - 49 000 daltonů
- C 50 000 - 85 000 daltonů
- D nad 100 000 daltonů

Bylo však zjištěno, že složky skupiny A se svými fyzikálně – chemickými vlastnostmi (molekulárními hmotnostmi, izoelektrickými body, rozpustností), aminokyselinovým složením (vyšší obsah lyzinu, glutaminu a prolinu) výrazně liší od typických prolaminů. Také geny řídící jejich syntézu nejsou lokalizovány na chromozomu 5, ale 1 a 4 chromozomu (SALCEDO et al., 1982).

Skupiny B a C jsou typické hordeiny, neboť vykazují vysoký stupeň polymorfismu. Liší se zastoupením cysteinu a molekulárními hmotnostmi. Skupina D je tvořena polypeptidy s relativně vysokou molekulární hmotností a vyšším zastoupením glycinových zbytků, které se podobají spíše podjednotkám pšeničných glutelinů s vysokou molekulární hmotností (SHEWRY, 1983).

2.5. Hordeinové geny

Geny, které řídí syntézu prolaminových bílkovin, se nachází v krátkém ramenu chromozomu 5. V dlouhém ramenu téhož chromozomu se zase nachází geny podmiňující vznik složek blízkých prolaminům (KONAREV, 1983). Jeden z těchto hordeinových lokusů, označený H-1, odpovídá za tvorbu C hordeinu, druhý lokus H -2 podmiňuje syntézu B hordeinu. Síla vazby mezi oběma těmito geny se rovná 16,1 Morganu. Lokus H-1 je situován blíž k centromere (ČERNÝ, ŠAŠEK 1998).

D hordein je geneticky determinován hordeinovými geny, které se nacházejí v dlouhém rameni chromozomu 5 (LAURENCE, SHEPHERD, 1980). SHEWRY et al. (1983) uskutečnili genetickou analýzu D hordeinu a zjistili, že lokus označený jako H-3 odpovídá za jeho syntézu.

Síla vazby mezi lokusem H – 3 a centromerou činí 10 Morganů, což je podobné síle vazby mezi centromerou a lokusy podjednotek glutelinů Glu 1A, Glu 1B, Glu1D. Potvrzuje to představy o složkách D hordeinů jako o bílkovinách glutelinového typu (SOZINOV, 1985).

POMORCEV (1985) dosáhl výrazného rozdělení hordeinů do tří frakcí vertikální elektroforézou ve sloupcích škrobového gelu. Jednotlivé frakce byly označeny jako A, B, a F hordeiny. Mezi A a B hordeiny některých odrůd ječmene jsou přítomny minoritní složky C a D hordeinu. Lokusy, které determinují hordeiny A, B, F, C, D a E, jsou lokalizovány v krátkém ramenu chromozomu 5 v pořadí Hrd A, Hrd B, Hrd F, Hrd C, Hrd D, Hrd E. Prokázala se ještě existence dalšího hordeinového lokusu, který se označuje jako Hrd G. Ten determinuje výskyt dvou polypeptidů v oblasti B hordeinů. Gen Hrd G je v silné vazbě s lokusem Hrd A (NECVETAJEV, 1983).

Podle SOZINOVA et al. (1985) se hordeinové složky A hordeinů dědí v blocích a současně se potvrdila existence mohutného alelismu lokusu Hrd A.

Podobným způsobem se dědí B hordeiny (DĚMINA, 1984). Jednotlivé bloky složek hordeinů jsou geneticky determinovány alelickými variantami lokusu Hrd B. Rovněž F hordeiny se dědí obdobně jako A a B hordeiny (POMORCEV, 1985).

Hordeinové lokusy Hrd C, Hrd D, Hrd E a Hrd G podmiňují výskyt, nebo nepřítomnost minoritních složek v zóně nízké mobility elektroforetického spektra hordeinů. Tyto lokusy nemají tak složitou polycistronickou strukturu jako lokusy Hrd A a Hrd B. Skládají se pouze z jednoho genu v dominantním či recesivním stavu (SOZINOV, 1985).

Lokusy Hrd A, Hrd B a Hrd F podmiňují více typů bílkovin. Největší počet složek byl zjištěn v oblasti hordeinového spektra, který je determinován lokusem Hrd A. Nejmenší počet složek v oblasti hordeinového spektra byl determinován v lokusu Hrd F. Jestliže je každá hordeinová složka elektroforetického spektra geneticky podmíněná nejméně jedním genem, musí být hordeinový lokus, který řídí syntézu bloku hordeinových složek, složen z více genů – cistronů (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

Jednotlivé cistrony se ve složitém lokusu nacházejí v silné vazbě, proto jsou rekombinace uvnitř bloku hordeinových genů velkou vzácností. Spontánní mutace cistronů se vyskytují jen velmi málo. Z toho vyplývá, že bloky hordeinových složek jsou velmi stabilní a ve štěpících populacích se manifestují prakticky beze změny (SOZINOV, 1985).

Označování hordeinů vychází z genetické determinace bloků hordeinových složek. Základem rozlišování jsou alelické varianty bloků hordeinových složek. Blok se označuje symbolem HRD, který odpovídá symbolu hordeinového lokusu Hrd. Velké písmeno určuje hordeinový lokus (např. A, B, G atd.). Číslo v označení vyjadřuje alelickou variantu bloku hordeinových složek. Tento způsob označování navrhl SOZINOV (1985).

2.6. Hordeinové bloky

V důsledku vazby vloh genů, mohou bloky hordeinových složek působit jako genetické markery ostatních znaků a vlastností vázaných do zmíněné vazbové skupiny. Využití hordeinů jako genetických markerů umožňuje vysoká dědivost skladby elektroforetických hordeinových spekter (SHEWRY, 1978).

POMORCEV (1982) prokázal hodnocením 370 genotypů ječmene ozimého, které geny markerují jeho vyšší mrazuvzdornost. Jsou to geny Hrd – B4 a Hrd – F3.

Genotypy tureckých ječmenů s alelou Hrd – A3 vykazovaly lepší přezimování než ostatní genotypy (DĚMINA, 1984). Další využití markerování je u výnosu zrna ječmene, kdy NECVETAJEV a SOZINOV (1982) prokázali významnou korelaci mezi vyšším výnosem zrna a vyšší HTS.

POMORCEV (1982) dokázal, že biotopy ječmene ozimého „Oksamit“ s geny Hrd A1, Hrd B1, Hrd F1 a Hrd A3, Hrd B1, Hrd F1 se vyznačují, při stejně vysokém obsahu bílkovin zrna, nižším podílem hordeinů a vyšším zastoupením glutelinů, což se projevilo ve vyšším obsahu lyzinu. Z toho lze usuzovat, že markerování se dá využít i ve zjišťování skladby bílkovin zrna.

Markerování sladovnické jakosti ječmene prokázali DĚMINA a NECVETAJEV (1984) korelací mezi alelickou proměnlivostí hordeinových lokusů a sladovnickou jakostí. Zjistili, že genotypy HRD A2 B21 nebo HRD A2 B19 vykazovaly vyšší sladovnickou jakost než genotypy z hordeinovými bloky HRD A2 B8, HRD A2 B17.

2.7. Enzymové bílkoviny

V každém organismu jsou všechny chemické pochody podmíněny činností enzymů. Izoenzymy jsou enzymy katalyzující v organismu stejnou reakci, ale liší se svojí strukturou, molekulovou hmotností a nábojem. Pro odlišení izoenzymů se využívá jejich různá elektroforetická pohyblivost. Enzymy, které se zjišťují elektroforeticky, se vyznačují vysokou heritabilitou, a proto mohou plnit úlohu genetických markerů. Izoenzymy určitého enzymu se mezi sebou liší kinetikou enzymatické katalýzy. Výskyt několika odlišných izoenzymů proto napomáhá uchovat optimální enzymatickou aktivitu v podmínkách, kde na organismus působí větší počet odlišných faktorů prostředí, např. různé teploty. Obecně lze označit způsob genetické determinace izoenzymů jako olygogenní, při němž je tvorba určitého enzymu podmíněna jedním či několika geny velkého účinku. Některé izoenzymové soustavy jsou determinovány serií alelických genů jednoho lokusu, jiné několika lokusy s různým počtem alel. Ve spektru některých hybridních izoenzymů se mohou manifestovat tzv. hybridní zóny, tedy nové bílkoviny, které se nevyskytují v elektroforetickém spektru daného izoenzymu rodičovských forem. V případě enzymů triploidního endospermu se projevuje v jejich

elektroforetickém spektru tzv. účinek dávky genů jako důsledek setkání v endospermu dvou genetických informací mateřské formy a jedné genetické informace otcovské formy (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

Enzymové geny, lokusy zjišťované pomocí škrobové, či polyakrylamidové elektroforézy charakterizovali NIELSEN a JOHANSEN (1986).

Odlišnost elektroforetických spekter enzymových systémů byla zjištěna při analýze enzymů nacházejících se v zrnech a listech ječmene u morfologicky vyrovnaných odrůd. To znamená, že populace jsou složeny z několika čistých linií (PRZYBYLSKA, 1974).

Pro identifikaci odrůd se využívá dvou hordeinových a třicetidevíti izoenzymových lokusů stanovených elektroforézou v polyakrylamidovém a škrobovém gelu (NIELSEN, JOHANSEN, 1986).

K diferenciaci je nutné použít i další polymorfní bílkovinné lokusy, neboť nižší polymorfismus a vazba hordeinových lokusů zabraňuje zhruba u 20 % odrůd ječmene jejich identifikaci pomocí elektroforézy hordeinů (GLAZKO, SOZINOV, 1993).

Dnes se používají k určování standartních odrůd alely esterázových lokusů Est 1, Est 2, Est 4 a Est 5 z listů ječmene (HVID, NIELSEN 1977), pomocí nichž charakterizovali SÝKOROVÁ a ŠAŠEK (1996) soubor v ČR povolených odrůd ozimého a jarního ječmene.

Vytvořený katalog esterázových alel popisuje odrůdy jako čisté linie nebo směs sesterských linií, čímž přispívá k vzájemnému rozlišení odrůd ječmene i v případech, kdy polymorfismus hordeinů není postačující. Jako příklad lze uvést hordeinově identické odrůdy Jaspis a Orbit, lišící se spektrem esteráz (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

KONISHI a MATSUURA (1987) zjistili, že enzymové alely se mohou uplatnit rovněž jako markery odolnosti ke žluté virové mozaice ječmene. Rovněž se prokázala vazba genů rezistence ke rzi *Puccinia hordei* s geny některých enzymů u zpětných kříženců kulturního ječmene odrůdy Clipper s vnesenými segmenty z *Hordeum spontaneum* (ČERNÝ, ŠAŠEK 1998).

2.8. Biochemické markery

Genetický marker (signální gen) se používá pro označení jasně se fenotypově projevujícího znaku s jednoduchou dědičností. Označení marker pak předpokládá spojení

tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními či kvalitativními znaky (SOZINOV, 1985).

Genetické biochemické markery se musí vyznačovat dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrancí a rovněž vysokou heritabilitou, tj. nezávislostí na podmínkách prostředí (ŠAŠEK, ČERNÝ, SÝKOROVÁ, 1983).

V současnosti se využívají dva druhy genetických markerů:

- 1) biochemické markery – do této skupiny patří proteinové markery, to jsou izoenzymy a zásobní bílkoviny, mastné kyseliny, sekundární metabolity
- 2) molekulární DNA markery (GRAMAN a kol., 1999)

Výhodou molekulárních markerů je, že jsou nezávislé na vnějších podmínkách prostředí. Další výhodou bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu. Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků. Navíc je velmi často možné testovat rostliny v klíčovém stavu a dále si ponechat jen rostliny vhodného genotypu, tento fakt je příznivý zejména pro aplikace ve šlechtění (ČURN, 1995).

Bílkoviny mohou velmi dobře splňovat kritéria pro genetické markery, neboť se vyznačují vysokým stupněm geneticky fixovaného polymorfismu, kodominantní dědičností, rozlišitelností alel v individuích, jistou mírou nezávislosti na vnějších podmínkách. Takovými systémy mohou být zásobní bílkoviny nebo izoenzymy. V principu všechny bílkoviny vykazují genetický polymorfismus, mohou být využity jako diferenční markery odrůd, a to s větším efektem než klasické morfologické markery (SÝKOROVÁ, HADAČOVÁ, 1992).

V roli biochemických markerů se kromě izoenzymů používají i neenzymatické bílkoviny jako jsou zásobní proteiny. Podstatně méně se využívá polymorfismu jiných biologických molekul, jako jsou mastné kyseliny, sekundární metabolity a pigmenty (ČURN, 1995).

Volba vhodného biochemického markerovacího systému (na úrovni DNA, proteinu nebo enzymu) je založena na třech následujících požadavcích, kterými jsou:

- dostatečná frekvence genetických variant u daného druhu
- exprese nezávislá na podmínkách prostředí
- vhodná elektroforetická a detekční technika (NIELSEN, 1985).

2.9. Využití biochemických markerů

Nedocenitelnou úlohu mají biochemické markery ve šlechtitelských programech při využití technik fragmentační analýzy – AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) nebo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Detekce RAPD polymorfismu byla úspěšně použita nejen při rozlišování odrůd ječmene ale i ostatních plodin jako pšenice, pícní trávy zeleniny, kukuřice, brambor a hrachu (ČURN, SÁKOVÁ, GRAMAN, 1995).

Využití izoenzymů a proteinů pro účely identifikace odrůd. Izoenzymové a proteinové markery nacházejí využití v semenářské kontrole pro hodnocení pravosti a čistoty osiva (ČERNÝ, ŠAŠEK 1998). Analýza izoenzymového spektra je používána i k predikci heterózního efektu F₁ hybridů (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

Pokud bychom chtěli využít morfologické znaky jako markery, nese to v rostlinné genetice i řadu nevýhod. Recesivní alely mohou být ve svém projevu maskovány přítomností aktivní či dominantní alely. Také epistatický nebo pleiotropický efekt některých genů může limitovat počet markerů použitelných v jednom souboru. Naproti tomu alely většiny izoenzymových lokusů jsou kodominantní a mohou se pak projevit i v případě recesivity nebo pleiotropie. Tato kodominance také umožňuje rozlišit heterozygoty od homozygotů (ČURN, 1995).

V současné době již existují rychlé a spolehlivé metody identifikace odrůd ječmene, založené na využití různých bílkovinných systémů uplatňujících se jako genetické markery, které umožňují charakterizovat genotyp na základě geneticky definovaného polymorfismu jednotlivých bílkovinných složek, prakticky nezávislých na vnějších faktorech. Ze stávajících metod se jeví jako výhodná metoda elektroforézy bílkovinných genetických markerů, která představuje jednu z nejúčinnějších metod identifikace odrůd ječmene. Podstatou elektroforetického stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty je existence bílkovinných genů, které podmiňují tvorbu zásobních bílkovin zrna – hordeinů, specifických pro jednotlivé odrůdy ječmene. Při elektroforéze ve škrobovém nebo polyakrylamidovém gelu se tyto odrůdově specifické bílkoviny rozdělí na jednotlivé složky podle velikosti elektrického náboje a tvaru molekul, dojde k jejich vizualizaci v podobě dobře barvitelných pruhů a vytvářejí specifické soubory zón analyzovaných bílkovin tzv. elektroforetická bílkovinná spektra,

typická pro jednotlivé odrůdy ječmene. Základem využívání elektroforézy genetických markerů pro identifikaci odrůd ječmene jsou vzorová elektroforetická spektra bílkovin jednotlivých odrůd – etalonů. Tato vzorová elektroforetická spektra mohou být vyjádřena rovněž v podobě alelického vzorce, souborů alelických bloků společně děděných zón, vyčleněných z elektroforetických spekter hordeinů (BRADOVÁ, SÝKOROVÁ, 2005).

2.10. Elektroforetické metody

Patří mezi elektromigrační metody. V principu využívají rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí, ve kterých separace probíhá a na síle použitého elektrického pole. Techniky probíhají výhradně v kapalně fázi, obvykle ve vodných roztocích (DRBAL, KRÍŽEK, 1999).

Jsou to jednoduché, relativně rychlé a vysoce citlivé metody, které se využívají hlavně pro analýzu makromolekul (bílkovin, nukleových kyselin), ale mohou být použity i pro dělení cukrů, aminokyselin, peptidů, nukleotidů a jednoduchých iontů (HOEFER, 1994).

Elektroforetické separační techniky patří k nejdůležitějším metodám biochemické analýzy a hrají klíčovou roli v klinické diagnostice chorob, v soudním lékařství, potravinářství, šlechtění, kontrole kvality a v genovém inženýrství (ANDREWS, 1993).

Elektroforézu lze provádět v prostředí, kde se na přenosu náboje uplatňují ionty samotného vzorku – metody bez nosného elektrolytu, mezi něž patří izotachoforéza a volná elektroforéza. Volná elektroforéza je metoda pohyblivého rozhraní, kde je samotný vzorek diskontinuálním prostředím (KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUML, 2001).

V průběhu separačního procesu dochází k rozmývání zón separovaných látek. K rozmývání dochází vlivem difuze, gradientu hustoty, ohřevu separačního sloupce a elektroosmotického proudění. Proto je nutné zóny stabilizovat. Stabilizace se provádí užitím porézních nosičů, hydrofilních gelů nebo převedením do kapiláry (STAŇKOVÁ, ČÁP, 1991).

Mezi elektromigrační metody patří také izotachoforéza. Termín „izotachoforéza lze přeložit jako elektroforéza při stejné rychlosti. Různé ionty mají různou pohyblivost. Pohyb stejnou rychlostí u iontů s rozličnou pohyblivostí je možný jen tehdy, působí-li na jednotlivé ionty elektrická pole o různé intenzitě (BARTUŠEK, 1984). U izotachoforézy je vzorek umístěn mezi dva různé elektrolyty se zvolenými pohyblivostmi (KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUML, 2001).

Na nejčastější použití elektroforetických technik ukazuje tabulka č.1

Tab.č 1: Nejčastější aplikace jednotlivých elektroforetických technik.

Aplikace	PAGE HB	PAGE MPB	SDS-PAGE	PGGE	2D PAGE	IEF	Acetyl cel.	SGE	Papír, TLE
Proteiny									
Analýza neznámé směsi	*	**	**	**	*	*		*	
Srovnání známého a neznámého vzorku	*	*	*	*		*			
Membránové proteiny	*	*	**	*					
Testování homogenity (čistoty) vzorku	*	*	*	*					
Určení molekulové hmotnosti	*		**	**					
Isoenzymová elektroforéza	*	**		**			*	*	
Nukleové kyseliny									
Genové mapování a fingerprinting	**	*							
Molekulová hmotnost	**						*		*
Sekvenování	**						*		**
Analýzy aminokyselin									
Taxonomické studie	*	**	*		*				
Klinické aplikace		*	*		*		**		
Soudní lékařství		*	*		*				
Analýza potravin		*	*						
Analýza peptidů		*	*				*		**
Analýzy aminokyselin							*		

modifikováno dle ANDREWS (1993), Čurn (1995)

Legenda k tab č. 1:

- PAGE HB polyakrylamidová elektroforéza v homogenním pufrovém systému
- PAGE MPB polyakrylamidová elektroforéza v multifázovém pufrovém systému
- SDS-PAGE polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti detergentu (SDS)
- PGGE polyakrylamidová koncentrační gradientová elektroforéza
- 2D-PAGE dvourozměrná elektroforéza
- IEF isoelektrická fokusace
- Acet.Cel. elektroforéza na acetyl celulóze
- SGE škrobová elektroforéza
- TLE elektroforéza na tenké vrstvě

2.10.1 Polyakrylamid (PAGE)

Velmi často používanou metodou je Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Ta se provádí ve speciálních aparátech, v nichž se nosič se vzorkem k separaci umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud. Uspořádání elektroforézy je dvojího typu. Elektroforéza v trubičkách, která má sloupcové uspořádání, nebo elektroforéza v plošném uspořádání na destičkách s tenkou vrstvou gelu (KRÁLOVÁ, RAUCH, FUKAL, RUMIL, 2001).

Polyakrylamidový gel se získává polymerací akrylamidu ($\text{CH}_2 = \text{CH-CO-NH}_2$) a N,N-methylénbisakrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH-CO-CH-NH}_2$) za přítomnosti katalyzátorů polymerace. Akrylamidové monomery polymerují do dlouhých řetězců a jsou kovalentně spojeny crosslinkerem - bisakrylamidem. Polymerace je dosahováno chemickou nebo fotochemickou metodou. Při nejběžnější chemické metodě je používán persíran amonný a kvartérní amin, N,N,N,N – tetramethylendiamin (TEMED) jako iniciátor polymerace a katalyzátor. Fotochemická reakce je iniciována dlouhovlnným ultrafialovým světlem pomocí zářivky. Polymerace je inhibována kyslíkem, směs monomerů musí být odvdoušněna ve vakuu. Rovněž při přípravě gelu je nutné zabránit difúzi kyslíku do polymerační směsi. Její povrch je opatrně převrstven vodou nebo vodou saturovaným *n*-butanolem. Tím se nejen zabrání pronikání vzduchu do polymerujícího gelu, ale dochází i k vytvoření dokonale plochého povrchu bez zakřivení. Zakřivený povrch může vést až k silnému narušení spektra proužků při elektroforéze.

Polyakrylamidové gely mají oproti škrobovému gelu některé výhody – jsou průhledné, pružné, termostabilní, velkou výhodou je možnost poměrně přesné regulace velikosti pórů, včetně nastavení hustotního gradientu v profilu gelu, neobsahují ionizovatelné skupiny, mají pak velmi nízký elektroosmotický potenciál, lze je vysušit a získat permanentní stabilní záznam. Je možné automatizované vyhodnocování a denzitometrické zpracování gelů.

Jejich nevýhodou je toxicita monomerů, chybějící počáteční viskozita roztoku, nízký elektrický odpor gelů. Při běžných aplikacích také není možné gel podélně rozříznout a detekovat různé enzymové systémy. Tento nedostatek lze obejít několikerým „zkopírováním“ gelu na membránu a detekcí enzymatické aktivity na membráně (ČURN, 1995).

2.10.2. SDS – PAGE

Metoda je založena na elektroforéze komplexů denaturovaných polypeptidů s anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným – SDS. Navázáním SDS se nábojové rozdíly mezi různými proteiny téměř úplně potlačí, komplexy protein – SDS jsou v neutrálním a alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě. Procházejí-li gelem o vhodné porozitě, je jejich pohyblivost dána téměř výhradně velikostí molekuly (HOŘEJŠÍ, 1985).

SDS nese poměrně velký záporný náboj a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovinných molekul a ty se pak pohybují v gelu jen podle velikosti. Mobilita komplexu SDS – bílkovina v polyakrylamidovém gelu je přímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti příslušné bílkoviny. Takto stanovené hodnoty relativní molekulové hmotnosti bílkoviny jsou všeobecně uznávány pro účely charakterizace bílkovinného preparátu (KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUMML, 2001).

Pomocí SDS – PAGE je pak možné stanovovat molekulovou hmotnost analyzovaných proteinů nebo jejich směsí.

Nevýhodou je, že vazbou SDS na bílkovinu ve většině případů dochází ke ztrátě biologické aktivity bílkoviny, takže např. enzymy již po proběhnutí elektroforézy není možné na základě aktivity prokázat (KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUMML 2001).

2.10.3. Dvojměrná elektroforéza SDS – PAGE

Další metodický postup, který využívá výhody polyakrylamidového gelu je dvouměrná elektroforéza 2 -D PAGE, používaná pro separaci a charakterizování složitých proteinových komplexů a směsí (ANDREWS, 1993; HOEFER, 1994; ČURN, 1995; KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUMML, 2001).

2.10.4. Isoelektrická fokusace (IEF)

Izoelektrická fokusace je další z elektromigračních metod. Patří do kategorie rovnovážné elektroforézy. Od zonální elektroforézy se liší tím, že v mediu mezi elektrodami se díky přítomnosti nízkomolekulárních amfolytů vytváří gradient pH. Amfoterní molekula nesoucí náboj se pohybuje vlivem elektrického proudu v gradientu pH až do okamžiku, kdy

se dostane do oblasti pH shodné s jejím izoelektrickým bodem a její pohyb se zastaví. Pokud molekula z tohoto místa difunduje pryč, změní se vstupem do oblasti s jiným pH její výsledný náboj a elektroforetický pohyb ji vrátí zpět do místa jejího izoelektrického bodu. Každá molekula je tedy fokusována (zostřena) do úzké zóny kolem svého izoelektrického bodu. Tímto způsobem je možno od sebe oddělit molekuly, jejichž izoelektrický bod se liší o 0,001 jednotky pH. (KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUMML, 2001).

V místě isoelektrického bodu se daná bílkovina zastaví a dochází k její koncentraci v důsledku ztráty náboje. Proužky, které se vytvářejí jsou velmi úzké a ostré. IEF je velmi účinná technika použitelná pro separaci proteinů. Některé proteiny totiž nemohou být separovány běžnou elektroforézou a musí se separovat elektrofokusací (ČURN, 1995).

Metoda se používá pro velmi citlivé srovnání identity nebo odlišnosti různých preparátů, pro kontrolu čistoty, určování izoelektrického bodu, stanovení titračních křivek a identifikaci jednotlivých složek separované směsi (HOŘEJŠÍ 1985; KRÁLOVÁ, FUKAL, RAUCH, RUMML, 2001).

2.10.5. Kapilární elektroforéza (HPCE)

Metoda je založena na dělení vzorku bílkovin v tenké kapiláře při velmi vysokém napětí a detekci eluovaných bílkovinných frakcí speciálním detektorem. Tento způsob detekce s vyloučením barvicích kroků umožňuje stanovení bílkovinného spektra v „reálném čase“, výrazně se zvyšuje kapacita přístroje a je zde velmi vysoká míra automatizace analýzy. Extrémně účinná separace je podmíněna velkým vnitřním povrchem v poměru k objemu separačního kanálu o kapilárních rozměrech. Velké rozlišení a vyšší citlivost této metody dovolují identifikovat i genotypy málo odlišné nebo nerozlišitelné za použití technik PAGE nebo SDS – PAGE (ČURN, 1995).

3. Cíle diplomové práce

Cílem práce bylo detailní hodnocení variability proteinových spekter druhu *Hordeum vulgare* L. na úrovni souboru 23 vybraných světových genotypů. Porovnány byly dva odlišné přístupy hodnocení elektroforetických spekter – klasické (ruční) stanovení REM u jednotlivých proteinových pruhů versus softwarové hodnocení proteinových profilů.

4. Materiál a metody

4.1. Charakteristika biologického materiálu

Variabilita proteinových frakcí byla hodnocena u 23 genotypů ječmene získaných ze ZVÚ Kroměříž v rámci řešení grantu NAZV QD 1365 (tab.2).

Tabulka č.2: Seznam a značení vzorků analyzovaného materiálu

genotyp	číslo vzorku	řadovost	typ zrna	země původu
Annabel	1	2	nud	DEU
CDC Candle	2	2	nud	CAN
CI 12785	3	2	nud	ETH
Ebsdorfer nackt	4	6	nud	DEU
HB 803	5	2	nud	-
Jersey	6	2	nud	NL
Kavkazský golozernyj	7	2	nud	SUN
KM1910	8	2	nud	CZ
KM2001	9	2	nud	CZ
KM2062	10	2	nud	CZ
KM2283	11	2	nud	CZ
Lyallpur 3647	12	2	nud	IND
Merlin	13	2	nud	CAN
Miloňov nudum	14	2	nud	CSK
Nordus	15	2	nud	DEU
Pax	16	2	nud	SK
Shimabara	17	6	nud	PRK
Tolar	18	2	nud	CZ
VKM2087	19	2	nud	CZ
Wabet	20	2	cov	USA
Wanubet	21	2	nud	USA
Wapana	22	2	nud	USA
Washonubet	23	2	nud	USA

4.2. Extrakce proteinů

a) extrakce celkového SDS proteinu

Jednotlivé vzorky v podobě zrna byly zhomogenizovány v laboratorním šrotovníku a postupně byly extrahovány jednotlivé frakce proteinů dle rozpustnosti. 50 mg jemného šrotu bylo naváženo do mikrocentrifugační tuby (1,5 ml) a promícháno s 500 μ l extrakčního pufru (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5 % 2-merkaptoethanol, 2 % SDS). Proteiny byly extrahovány po dobu 4 hodin při teplotě 4 °C. Po centrifugaci (3 min. při 14 000 g) byl čirý supernatant (200 μ l) přenesen do nové mikrocentrifugační zkumavky s 50 μ l nanášecího pufru (5 x NP: 5 ml 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.3 g SDS, 10 ml glycerol, 5 mg Bromophenol Blue; k 500 μ l pufru se těsně před použitím přidá 170 μ l 2-merkaptoethanolu). Před nanesením na gel v množství 10 μ l byly vzorky 2 minuty vařeny ve vodní lázni.

b) extrakce jednotlivých proteinových frakcí dle rozpustnosti

Frakce A – proteiny rozpustné v 0,1 M Na-fosfátovém pufru o pH 7 (směs dihydrogen a

hydrogenfosforečnanu sodného) s 1 M NaCl

Frakce B – proteiny rozpustné v 70 % etanolu

Frakce C – proteiny rozpustné v 0,2 % NaOH

Postup

1. Navážka 0,5 g jemného šrotu (po lyofilizaci).
2. Přidat 5 ml extr. roztoku 0,1 M Na-fosfátového pufru, řádně promíchat, nechat extrahovat při 4°C přes noc.
3. Centrifugace 15 min. při 6,5 tis. otáček, 100 μ l supernatantu přenést do nové mikrocentrifugační zkumavky (frakce A).
4. K peletu přidat 3 ml vychlazené vody, řádně promíchat a centrifugovat 10 min., vodu slít do odpadu (promývání).
5. K peletu přidat 5 ml 70 % etanolu, řádně promíchat a nechat extrahovat 3 hodiny při 20 °C.
6. Centrifugace 6,5 tis otáček 15 min., 100 μ l supernatantu přenést do nové mikrocentrifugační zkumavky (frakce B).

7. K peletu přidat 3 ml etanolu, řádně promíchat a centrifugovat 10 min., etanol slít do odpadu (promývání).
8. K peletu přidat 3 ml vychlazené vody, řádně promíchat a centrifugovat 10 min., vodu slít do odpadu (promývání).
9. K peletu přidat 5 ml 0,2 % NaOH a nechat extrahovat 3 hodiny při 4 °C
10. Centrifugace 15 min. 6,5 tis otáček, 100 µl supernatantu přenést do nové mikrocentrifugační zkumavky (frakce C).

K získaným extraktům jednotlivých frakcí (A, B, C) přidat 100 µl extrakčního pufru (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5 % 2-merkapt ethanol, 2 % SDS). Proteiny byly extrahovány po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C. Poté byl k výslednému objemu extraktů 200 µl přidán nanášecí pufr v množství 50 µl (5 x NP: 5 ml 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.3 g SDS, 10 ml glycerol, 5 mg Bromophenol Blue; k 500 µl pufru se těsně před použitím přidá 170 µl 2-merkapt ethanolu). Před nanesením na gel v množství 15 µl byly vzorky 2 minuty vařeny ve vodní lázni.

4.3. Elektroforetická separace (SDS-PAGE)

Použita byl diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SE 600, Hoefer, USA) - 4 % zaostřovací gel (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 + SDS) a 10 % separační gel (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 + SDS) - v prostředí systému 0.025 M Tris + 0.192 M glycine (pH 8.3) + SDS (HAMES, RICKWOOD, 1987). Podrobné složení gelových systémů a elektrodového pufru je uvedeno v tab. 7. Separace probíhala při proudu 40 mA na gel, napětí 200 V a při teplotě 4°C po dobu 4-5 hod (1 cm od spodního okraje gelu).

Tab.3: Složení roztoků pro diskontinuální SDS-PAGE (denaturační systém).

komponenta	jednotka	SEPARAČNÍ GEL (10 %)	ZAOŠŤŮVACÍ GEL (3,75 %)
redestilovaná voda	ml	21	12,15
AC/BIS	ml	13,3	2,5
pufr A	ml	5	-
pufr B	ml	-	5
SDS	μl	400	200
siřičitan sodný	μl	110	50
persíran amonný	μl	200	150
TEMED	μl	20	20
POZNÁMKY:			
AC/BIS:	30 g akrylamid + 0,8 g BIS / 100 ml		
pufr A:	36,3 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH 8,8 / 100 ml		
pufr B:	6 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH 6,8 / 100 ml		
Na ₂ SO ₃ :	nasycený vodný roztok		
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ :	15 % roztok		
SDS	10 % roztok		
elektrodotový pufr 1:	14,4 g glycin, 3 g Tris (Trizma), pH 8,3 / 1000 ml		
elektrodotový pufr 2:	144 g glycin, 30,3 g Tris (Trizma), 10 g SDS, pH 8,3 / 1000 ml		
AC/BIS	uchovávat ve tmě a v chladnu, roztok stálý cca 3 týdny		
gelové pufr	uchovávat ve tmě a v chladnu, stálé		
persíran amonný	lze uchovávat ve tmě a v chladnu 1 týden		
SDS	uchovávat ve tmě asi jeden měsíc		
elektrodotový pufr 1	připravovat před použitím		
elektrodotový pufr 2	připravovat jako 10 x koncentrovaný roztok, uchovávat ve tmě a v chladnu		
elektrodotový pufr 1	esterázy, nativní bílkoviny		
elektrodotový pufr 2	SDS-bílkoviny (pro stanovení BPK)		

4.4. Detekce separovaných proteinů na gelu

Detekce bílkovin byla provedena barvením roztokem Coomassie Brilliant Blue (C-Blue) přes noc (směs methanol, ledová kyselina octová, voda v poměru 5:1:4 + 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma Co.). Po detekci bylo odbarveno nespecifické pozadí (použita směs ethanol : kyselina octová : voda v poměru 2,5:1:16,5; s výměnou během odbarvení 2 - 3 x) a provedena fixace a dehydratace ve směsi 45 % ethanolu + 3 % glycerolu po dobu 2 – 3 hodin. Následně byly gely sušeny v celofánu na skle při laboratorní teplotě na vzduchu po 2 - 3 dny (modifikováno HAMES, RICKWOOD, 1987; ČURN, 1995).

4.5. Zpracování elektroforetických dat

Elektroforetická spektra (profily) proteinů byly zpracovány prostřednictvím digitální obrazové analýzy (DOA). Proces probíhal v následujících fázích (modifikováno podle ČURN, 1995; VEJL, 1998):

1. Transformace dat z gelu do elektronické podoby prostřednictvím stolního scanneru (při 400 dpi).
2. Úprava primárního záznamu - úprava pozadí, volba vhodné velikosti obrazu, volba formátu (TIFF), transformace do stupňů šedi a následná inverze (úprava pro software BioProfil).
3. Pro hodnocení elektroforetických spekter byly použity následující způsoby:

Hodnocení pomocí speciálního software BIOPROFIL - vzájemné porovnání spekter založené na principu poměru shodných pruhů obou hodnocených spekter ku celkovému počtu pruhů obou spekter, tzv. simple matching (Nei & Li podobnostní koeficient; VILBER LOURMAT, 1999), výstupem je matice podobnostních koeficientů nebo dendrogram. Při tvorbě dendrogramu byl zvolen konfidenční interval 3 %. Software BioProfil 1 D++ umožňuje vytvořit i tabulku molekulárních hmotností jednotlivých bílkovinných podjednotek.

Provedení klasického „ručního“ stanovení hodnot Relativní Elektroforetické Mobility (REM) u jednotlivých bílkovinných podjednotek včetně hodnocení intenzity detekčního barvení. Stanovení bylo provedeno změřením vzdálenosti od počátku dráhy, kterou jednotlivé pruhy urazily a výpočtem REM. Ten se stanoví podílem dráhy pruhu ku dráze celkové. Intenzita pruhů se stanoví subjektivním posouzením a ohodnocením číslicí ve stupnici od 1 – 5.

Vytvoření „jedno – nulové“ matice, která pomocí číslic 1 a 0, vyjadřuje přítomnost nebo absenci bílkovinné podjednotky v řadách označených písmeny abecedy jednotlivých očíslovaných profilů od 1 do 23, které zastupují jednotlivé vzorky odrůd. Matice byla převedena do programu MVSP. Finální vyhodnocení matic pomocí programu MVSP (KOVACH COMPUTING SERVIS). Program vzájemně porovnává spektra. Výstupem je grafické vyjádření v dendrogramu, které je doplněno maticí podobnostních koeficientů.

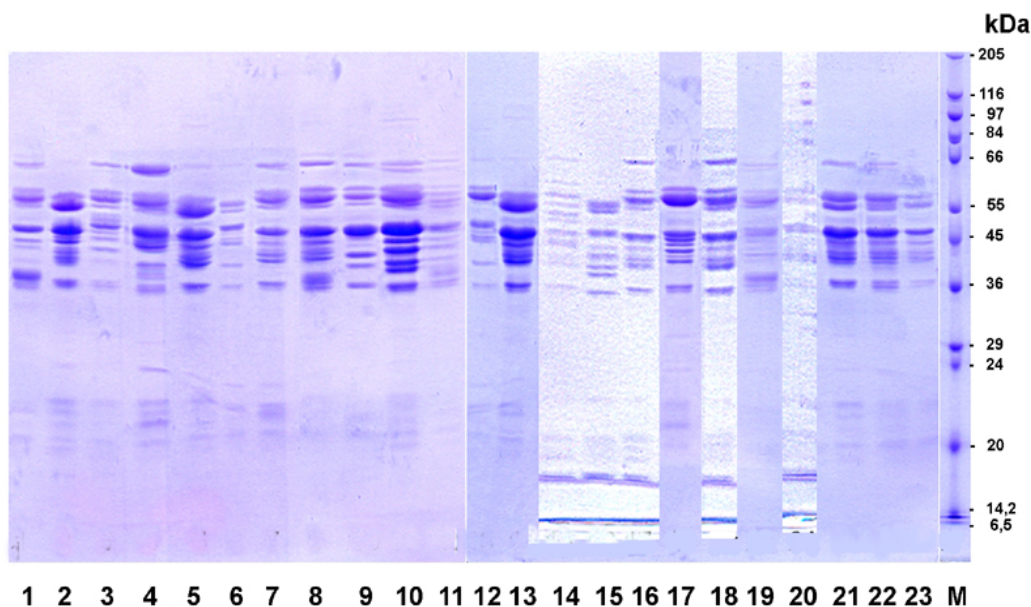
Porovnávání profilů v dendrogramu a hodnocení rozsahu genotypové variability proteinových profilů na základě získaných výsledků.

5. Výsledky

5.1. Frakce prolaminů

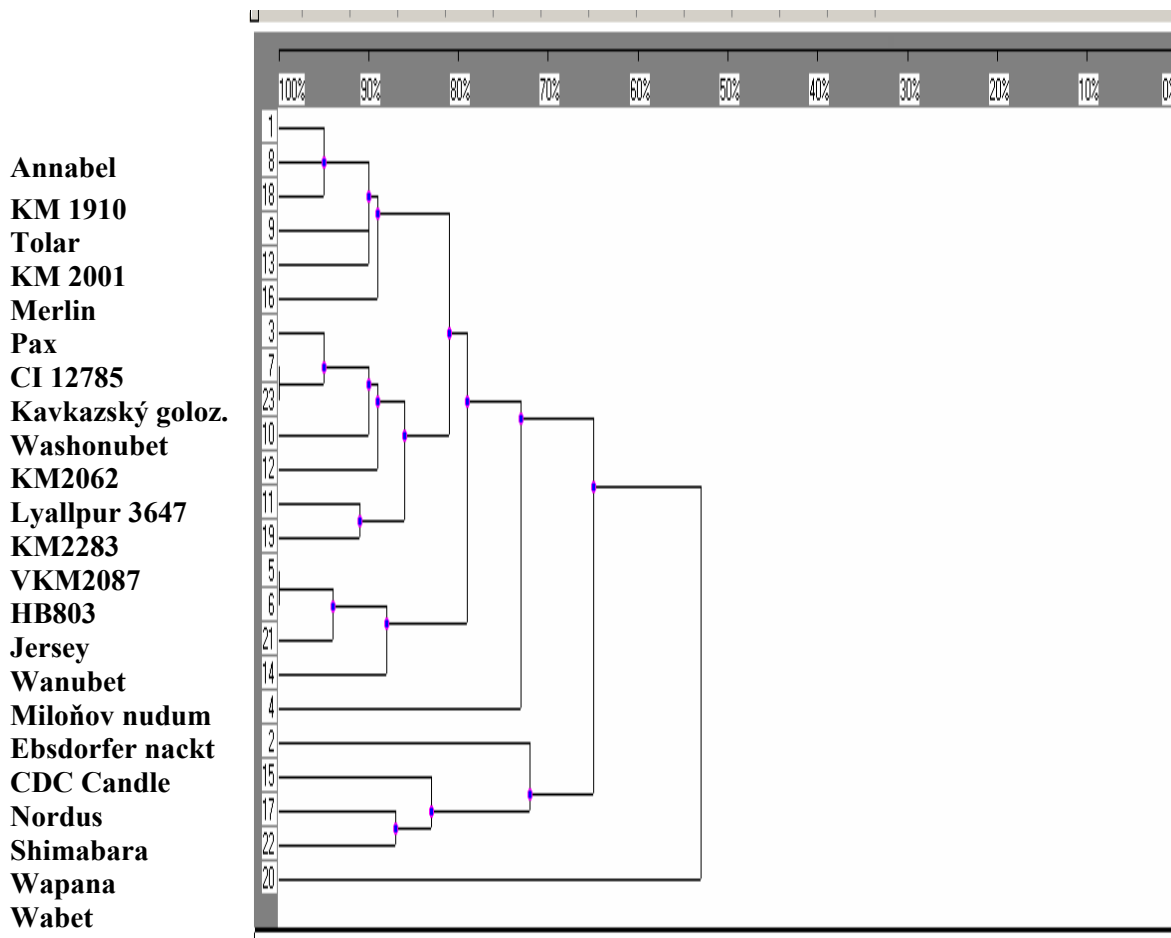
Nejvhodnější pro hodnocení je prolaminová frakce (viz. obr.1). Bílkovinné podjednotky jsou dobře čitelné a z větší části se podařilo jednotlivé odrůdy dobře rozlišit. Pruhy jsou lokalizovány zejména v rozsahu od 36 – 66 kDa (viz.příloha tab.1). Pruhy mají rozdílnou intenzitu, jsou zhuštěné, ale dobře hodnotitelné. Největší počet pruhů byl detekován v profilu odrůdy Wapana, a to celkem 13. Nejnižší počet pruhů bylo zaznamenáno u odrůdy Wabet. Jednalo se celkem o 4 pruhy. Čtyři pruhy, což je nejméně, bylo detekováno u odrůdy Wabet.

Obr.č.1: SDS-PAGE profily prolaminových proteinů



Lgenda odrůd: 1-Annabel, 2-CDC Candle, 3- CI 12785, 4- Ebsdorfer nackt, 5-HB803, 6- Jersey, 7- Kavkazský goložernyj, 8- KM 1910, 9-KM 2001, 10- KM 2062, 11-KM 2283, 12- Lyallpur 3647, 13- Merlin, 14-Miloňov nudum, 15- Nordus, 16-Pax, 17-Shimabara, 18-Tolar, 19-VKM 2087, 20-Wabet, 21-Wanubet, 22-Wapana, 23-Washonubet

Obr. č. 2: Dendrogram prolaminové frakce proteinů ječmene; vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).



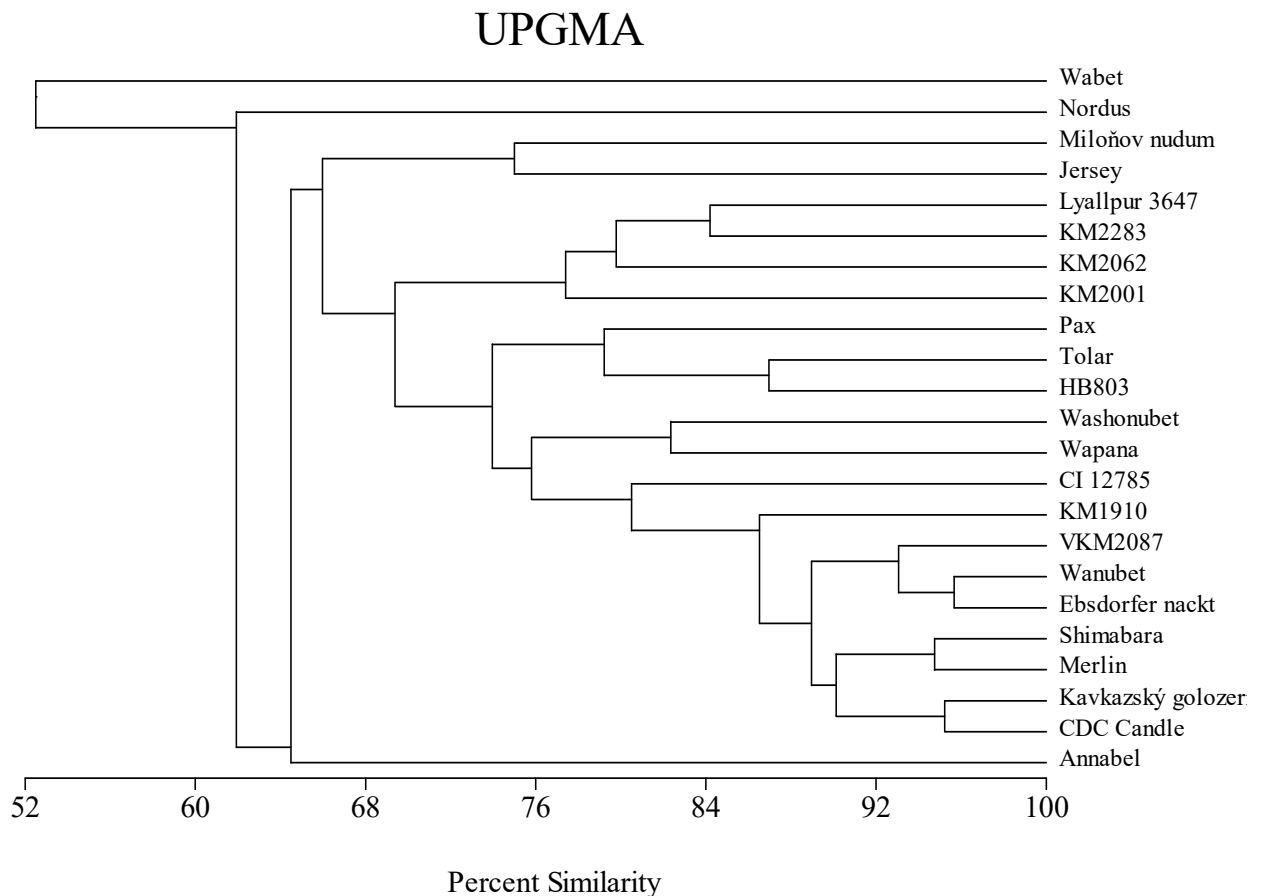
Pomocí programu BioProfil byl vytvořen dendrogram (viz.obr.č.2), který znázorňuje variabilitu prolaminové frakce ječmene u všech 23 odrůd. Z 23 vzorků se vytvořilo 17 shluků. Nejvíce shluků se pohybuje na úrovni podobnosti 80 – 90 %. V této oblasti jejich celkem 9. Vyšší podobnost než 90 % je sledována jen u třech shluků. Jedná se o shluk, který vytvářejí odrůdy Annabel, KM 1910 a Tolar. Zde se podobnost pohybuje mezi 95 – 96 %. Naprosto identické prolaminové složky byly pozorovány u odrůd Kavkazský golozernyj a Washonubet a dále HB803 a Jersey. Vykazují 100% index identity v dendrogramu i v podobnostní matici (viz.příloha tab.2). Vzájemná podobnost mezi odrůdami Washonubet, HB 803 a Jersey je podle podobnostní matice 89 %. Identita od 100 do 95 % byla sledována u celkem sedmi odrůd.

Podobnost nejvzdálenějších odrůd, konkrétně Wabet a Nordus se pohybuje pod hranicí 50 %. Matice podobnosti ukazuje přesnější údaj indexu identity u obou odrůd – Wabet – Nordus 46 % a Nordus – Wapana 47 %, což jsou nejspodnější hranice podobnosti v prolaminovém spektru.

Při porovnávání vzájemné podobnosti prolaminové frakce sledovaných odrůd pomocí matice podobnosti, se jako nejvíce variabilní vůči ostatním odrůdám ukazuje odrůda Wabet. Naopak vysokou identitu vykazují odrůdy Kavkazský golozerj, CI 12785 a Wanubet.

Vyhodnocením dendrogramů a podobnostních matic byl u prolaminové frakce zjištěn vysoký stupeň polymorfismu.

Obr .č. 3: Dendrogram prolaminové frakce proteinů ječmene; vyhodnocení software MVSP



Při zhodnocení prolaminové frakce stejných odrůd pomocí programu MVSP, zjistíme, že dendrogram (viz. obr. 3) neukazuje vzájemnou 100% podobnost u žádné z odrůd. Je zde

však pozorována větší podobnost než 90 % u čtyřech shluků. Nejvíce shluků, celkem 11, se vyskytuje na úrovni 76 – 92 %. Koeficient podobnosti vyšší než 90 % vykazuje sedm odrůd - CDC Candle, Kavkazský golozernyj, Merlin, Shimabara, Ebsdorfer nact, Wanubet a VKM 2087.

Podobnostní matice MVSP (viz. příloha tab. 3) ukazuje největší index identity u odrůd Wanubet a Ebsdorfer nact na úrovni 95,6 %. Je to zároveň i nejvyšší hodnota podobnosti mezi dvěmi odrůdami v dendrogramu. Po těchto odrůdách pak sestupně následují odrůdy Kavkazský golozernyj a CDC Candle s indexem identity 95,2 % a Merlin - Shimabara s hodnotou 94,7 %.

Největší polymorfismus vykazují podle podobnostní matice MVSP odrůdy Tolar a Babet, a to 37,5 % a odrůdy Wabet a HB 803 s hodnotou podobnosti 35,2 %.

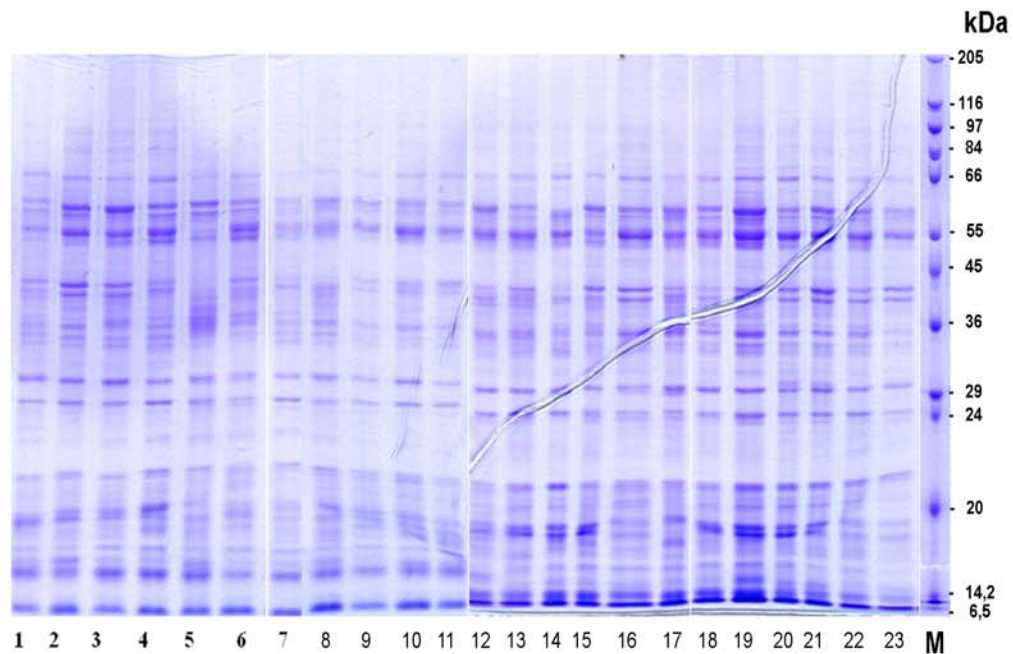
V celkovém srovnávání odrůd v podobnostní matici MVSP vykazovaly odrůdy Wanubet a Kavkazský golozernyj vysokou identitu. Nízká podobnost byla zjištěna u odrůd Wabet, Washonubet a Lyallpur 3647.

Při hodnocení prolaminové frakce ječmene pomocí programu MVSP byl u této frakce zjištěn vysoký stupeň polymorfismu.

5.2. Frakce albuminů a globulinů

Elektroforetické spektrum albuminů a globulinů (viz.obr.4) má složitý charakter, proteinové pruhy jsou na gelu detekovány v celé zóně separace vzorků. Proteinové pruhy jsou dobře čitelné a mají dobrou intenzitu detekčního barvení. V tomto profilu se bílkovinné podjednotky rozdělily do čtyřech hlavních oblastí. Marker ukazuje v jakých hodnotách se pohybují jednotlivé hlavní oblasti bílkovinných podjednotek. První oblast se pohybuje v rozmezí od 55 – 66 kDa, druhá 34 – 40 kDa, třetí v rozmezí 24 – 30 kDa a čtvrtá pod 20 kDa. Tabulka molekulových hmotností (viz.příloha č.4) ukazuje, že přesné rozpětí hmotnostního standardu proteinových podjednotek se pohybuje v rozmezí od 1 - 84 kDa.

Obr. č. 4: SDS-PAGE albuminových a globulinových proteinů



Legenda odrůd: 1-Annabel, 2-CDC Candle, 3- CI 12785, 4- Ebsdorfer nacht, 5-HB803, 6- Jersey, 7- Kavkazský golozerj, 8- KM 1910, 9-KM 2001, 10- KM 2062, 11-KM 2283, 12- Lyallpur 3647, 13- Merlin, 14-Miloňov nudum, 15- Nordus, 16-Pax, 17-Shimabara, 18-Tolar, 19-VKM 2087, 20-Wabet, 21-Wanubet, 22-Wapana, 23-Washonubet

Podle tabulky (viz. příloha č.4) se hlavní oblasti detekce albuminové a globulinové frakce pohybují v těchto hodnotách molekulové hmotnosti:

85,118 – 53,375 kDa

43,550 – 34,000 kDa

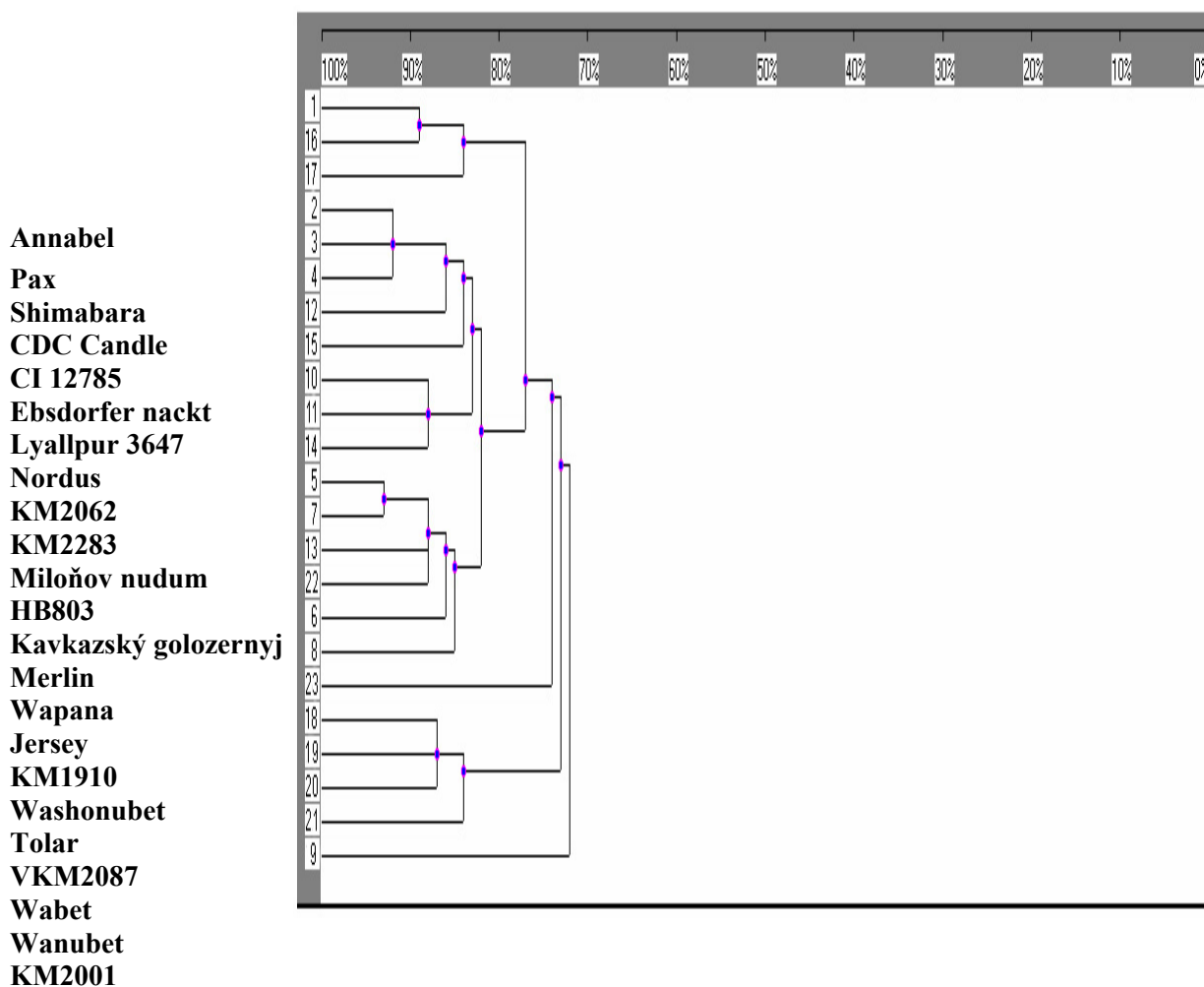
33,843 – 24,148 kDa

23,537 – 1,367 kDa

Největší počet bílkovinných podjednotek, celkem 22, se vyskytuje u odrůd CI 12785, Ebsdorfer nacht, VKM 2087 a Wabet.

Program BioProfil v dendrogramu (viz. obr. 5) rozdělil odrůdy do 17 shluků. V tabulce podobnostní matice (viz. příloha tab. č. 5) lze najít přesné hodnoty podobnosti odrůd. Nejvyšší index identity je mezi odrůdami Kavkazský golozernyj a HB 803 94 %. Vysoká podobnost je také u odrůd CDC Candle, CI 12785, Ebsdorfer nackt na úrovni 93 %. V úrovni podobnosti do 94 % odrůdy tvoří dva shluky. Odrůdy se 100 % identitou se v tomto spektru nenacházejí. Nejvíce shluků je nakumulováno ve střední oblasti 80 – 90 %, kde se nachází celkem dvanáct shluků. Nejméně shluků dendrogram ukazuje v oblasti od 70 do 90 %. Zde jsou přítomny jen tři shluky.

Obr. č. 5: Dendrogram albuminové a globulinové frakce proteinů ječmene; vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).



Přesná nejmenší podobnost zaznamenaná v podobnostní matici v příloze tab.č.5 má hodnotu 61 %. V tomto případě se jedná o odrůdy Wapana a KM 2001, Wabet a Kavkazský golozernej. Nízké hodnoty podobnosti vykazují i další odrůdy:

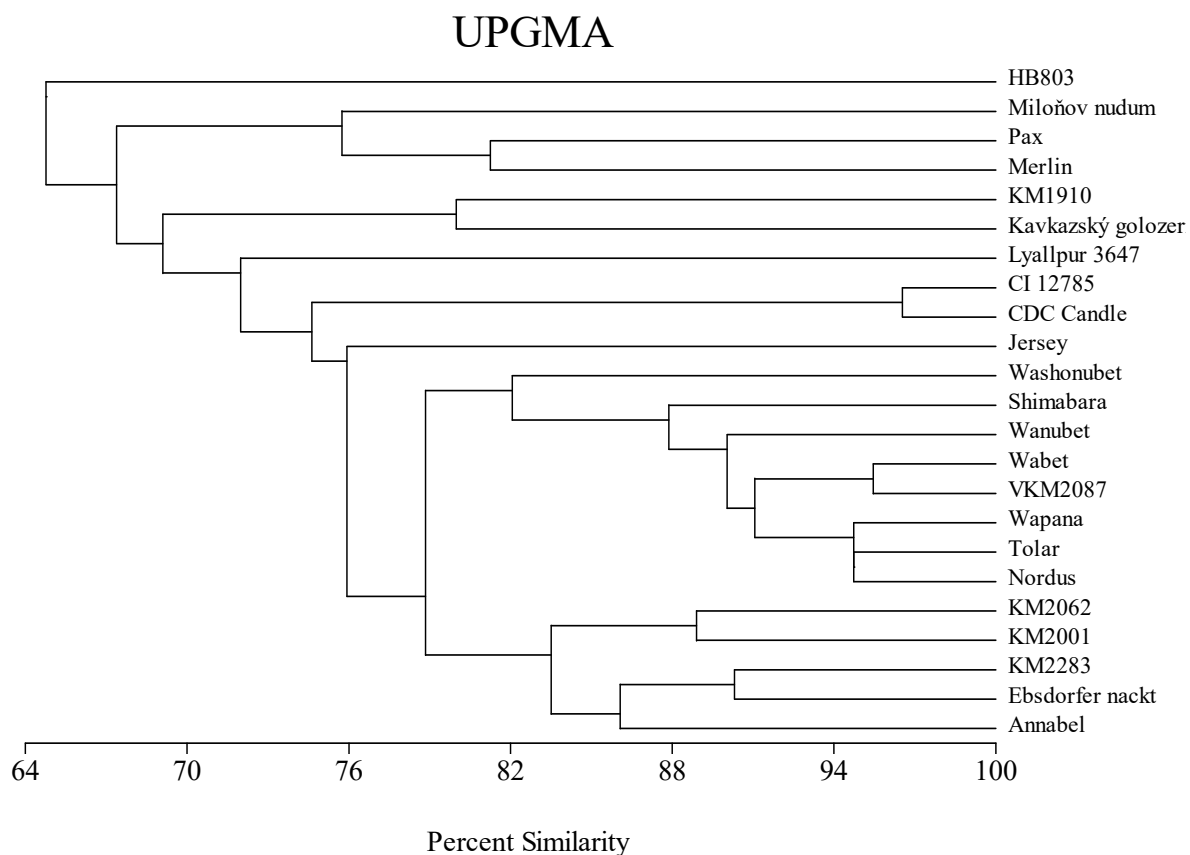
Wabet	–	KM 1910	62%
Wapana	–	KM 1910	63%
Wabet	–	Jersey	63%
Kavkazský golozernej	–	Miloňov nudum	63%
Wabet	–	KM 2001	65%

V celkovém porovnání mezi ostatními odrůdami vysokou identitu vykazují odrůdy Annabel a CDC Candle, nízkou hodnotu identity mají odrůdy KM 1910, KM 2001 a Kavkazský golozernej (viz. příloha tab. č. 5).

V dendrogramu (viz. obr. 6), který byl vytvořen pomocí programu MVSP, se celkem vytvořilo 20 shluků. Nebyly nalezeny odrůdy se 100 % indexem identity. Rozmezí podobnosti se pohybuje od 64 – 94 % podle dendrogramu. Nad 94 % se vyskytují tři shluky nejpodobnějších odrůd – Tolar, Wapana, Nordus, Wabet, VKM 2087, CI 12785 a CDC Candle. Tuto skutečnost vyjadřuje podobnostní matice v přesných hodnotách (viz. příloha tab. 6). Nejvyšší hodnoty koeficientu podobnosti mezi jednotlivými vzorky byly nalezeny u odrůd:

CDC Candle	–	CI 12785	96,5 %
Wabet	–	VKM 2087	95,4 %
Nordus	–	Tolar	94,7 %
Tolar	–	VKM 2087	92,7 %
Tolar	-	Wabet	92,7 %
VKM 2087	–	Wapana	92,6 %

Obr. č. 6: Dendrogram albuminové a globulinové frakce proteinů ječmene; vyhodnocení software MVSP

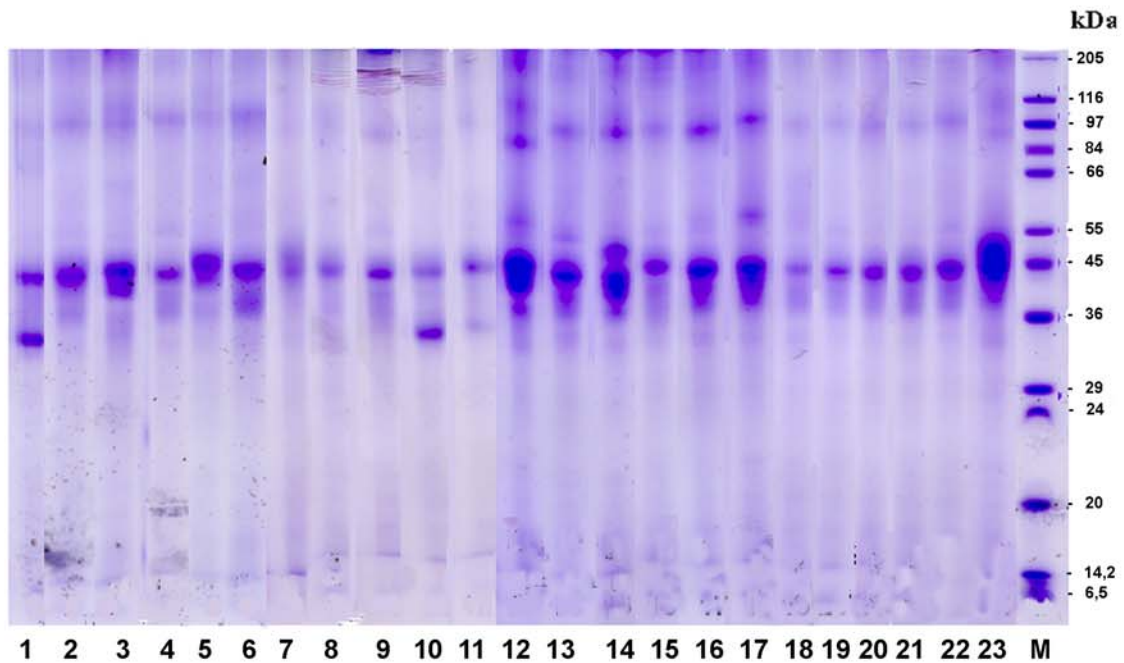


Střední úroveň identity se pohybuje od 90 do 76 %, kde je soustředěno 11 shluků. Odrůda s nejmenší identitou v albuminové – globulinové frakci je Merlin. Nejnižší index identity je sledován u odrůd Merlin a Kavkazský golozer 42,857 %. U odrůd Merlin a KM 1910 je hodnota indexu identity o něco vyšší, a to 44,4 %.

Vysoká variabilita albuminové a globulinové frakce ječmene byla při použití vyhodnocení pomocí programu MVSP zjištěna u odrůd KM 1910, KM 2001 a HB 803, zatímco vysoká podobnost byla zjištěna u odrůd Nordus, Tolar a VKM 2087.

5.3. Frakce glutelinů

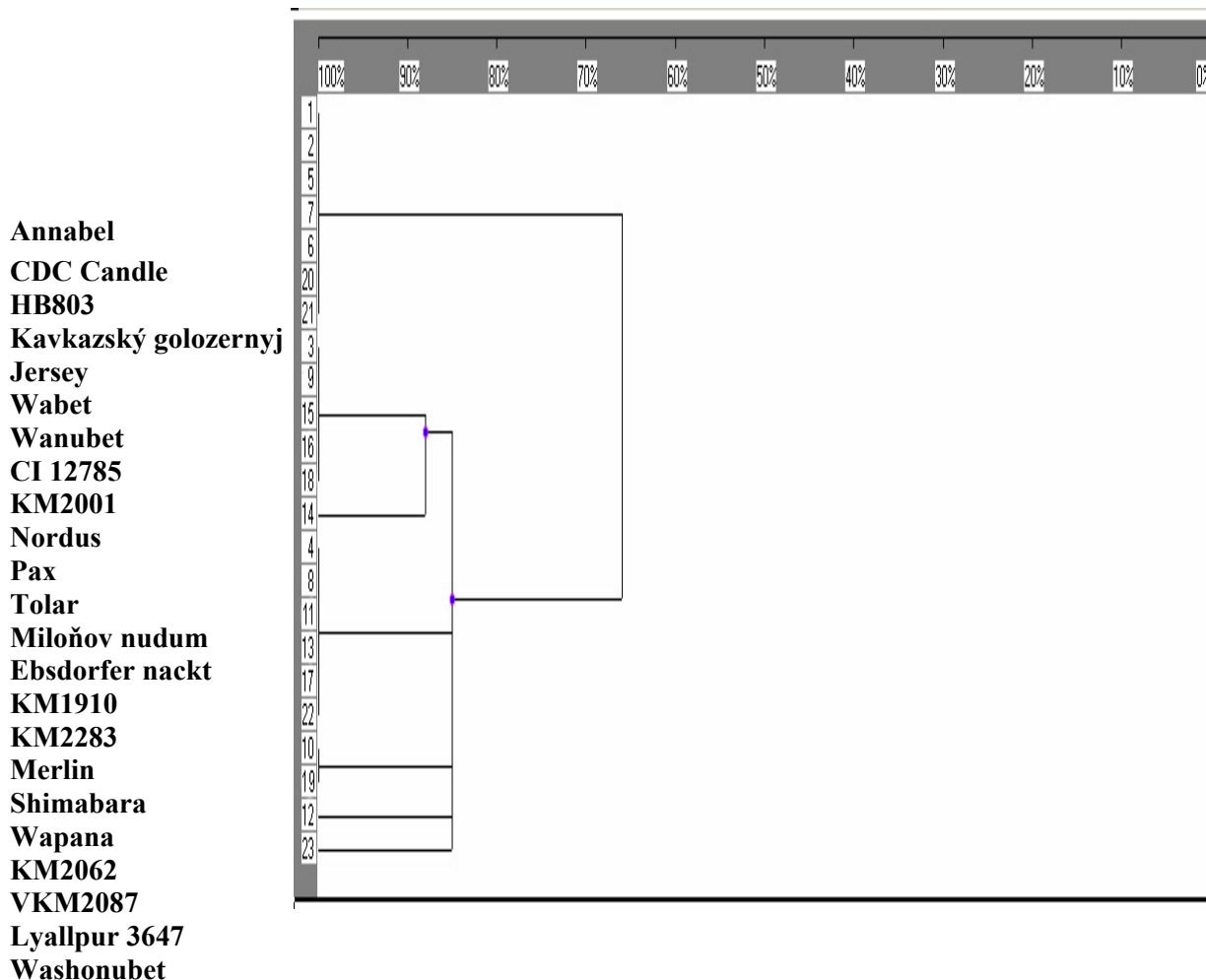
Obr. č. 7: SDS-PAGE profily glutelinových proteinů



Legenda odrůd: 1-Annabel, 2-CDC Candle, 3- CI 12785, 4- Ebsdorfer nact, 5-HB803, 6- Jersey, 7- Kavkazský golozerij, 8- KM 1910, 9-KM 2001, 10- KM 2062, 11-KM 2283, 12- Lyallpur 3647, 13- Merlin, 14-Miloňov nudum, 15- Nordus, 16-Pax, 17-Shimabara, 18-Tolar, 19-VKM 2087, 20-Wabet, 21-Wanubet, 22-Wapana, 23-Washonubet

Glutelinové spektrum je špatně čitelné. Bílkovinné podjednotky se pohybují na úrovni mezi 36 – 55 kDa. Vykazují velkou intenzitu detekčního barvení (viz. obr. 7). Tabulka č. 7 (viz. příloha č. 7) obsahuje přesné molekulové hmotnosti detekovaných bílkovinných pruhů glutelinové frakce ječmene. Hmotnostní rozpětí těchto pruhů je 34,884 – 49,906 kDa.

Obr. č. 8: Dendrogram glutelinové frakce proteinů ječmene; vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

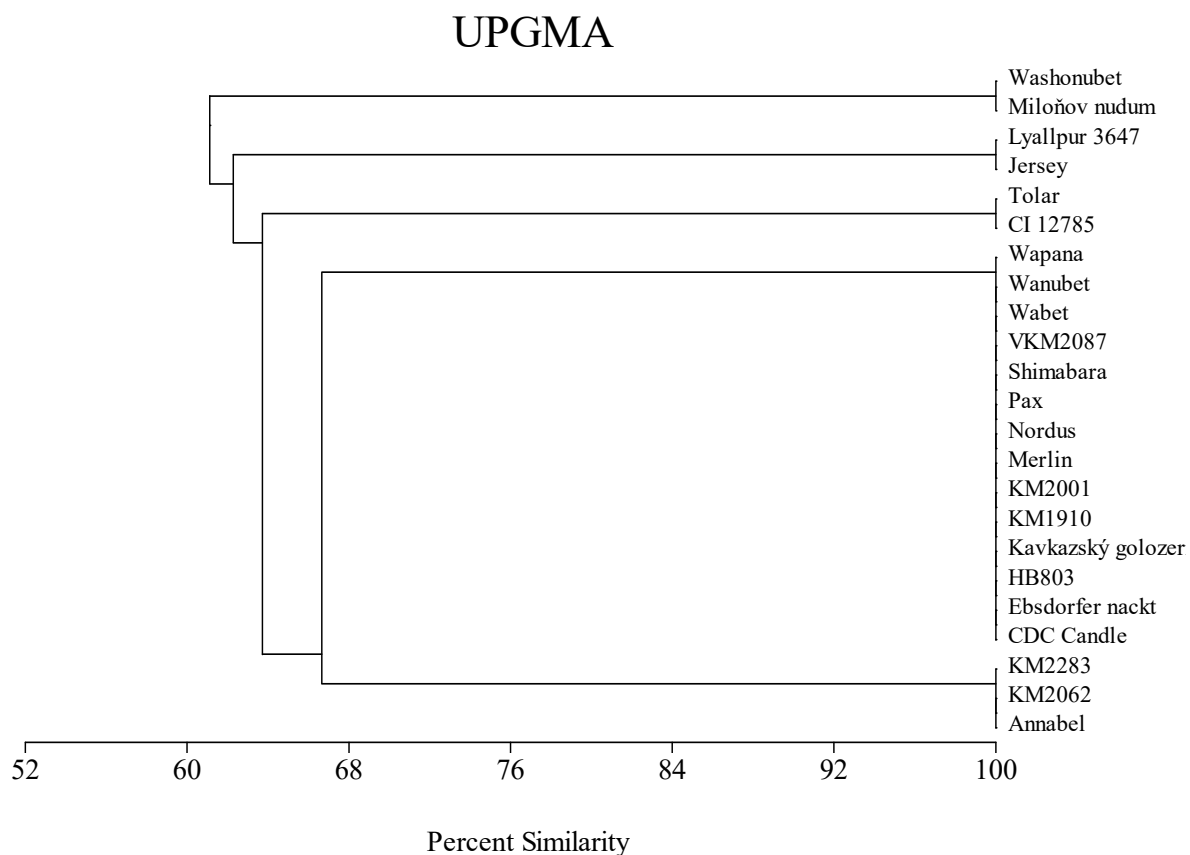


Dendrogram, který byl vypracován pomocí programu BioProfil (obr. 8), ukazuje, že při hodnocení podobnosti odrůd ječmene pomocí glutelinové frakce je dosaženo nejvyšší podobnosti odrůd v porovnání s variabilitou zjištěnou při vyhodnocování prolaminové či albuminové a globulinové frakce. 100% podobnost vykazuje 20 odrůd. Hodnoty podobnosti se pohybují od 65 – 100 %. V této oblasti se celkem nachází sedm shluků. V nejvyšší oblasti podobnosti jsou čtyři shluky. Při pohledu do podobnostní matice (viz. příloha tab. č. 8) bylo zjištěno, že nejnižší hodnota identity je hluboko pod hodnotami z dendrogramu. Index identity je na úrovni 33 % mezi odrůdami Lyallpur a HB 803 a stejně Lyallpur a Jersey. Velmi nízký koeficient podobnosti lze nalézt v tab.8 (viz. příloha č. 8) i mezi odrůdami:

VKM 2087	–	Annabel	40 %	Wabet	–	Annabel	50 %
Wanubet	–	Annabel	50 %	Kavkazský golozer	–	Jersey	50 %

Střední úroveň identity se pohybuje od 90 do 70 %. V komplexním hodnocení odrůd mezi sebou se jeví jako nejpodobnější odrůdy Wapana, Ebsdorfer nackt, Wanubet, KM 2062, CI 12785. Odrůda s nejnižší podobností podle podobnostní matice je Annabel.

Obr. č. 9: Dendrogram glutelinové frakce proteinů ječmene; vyhodnocení software MVSP

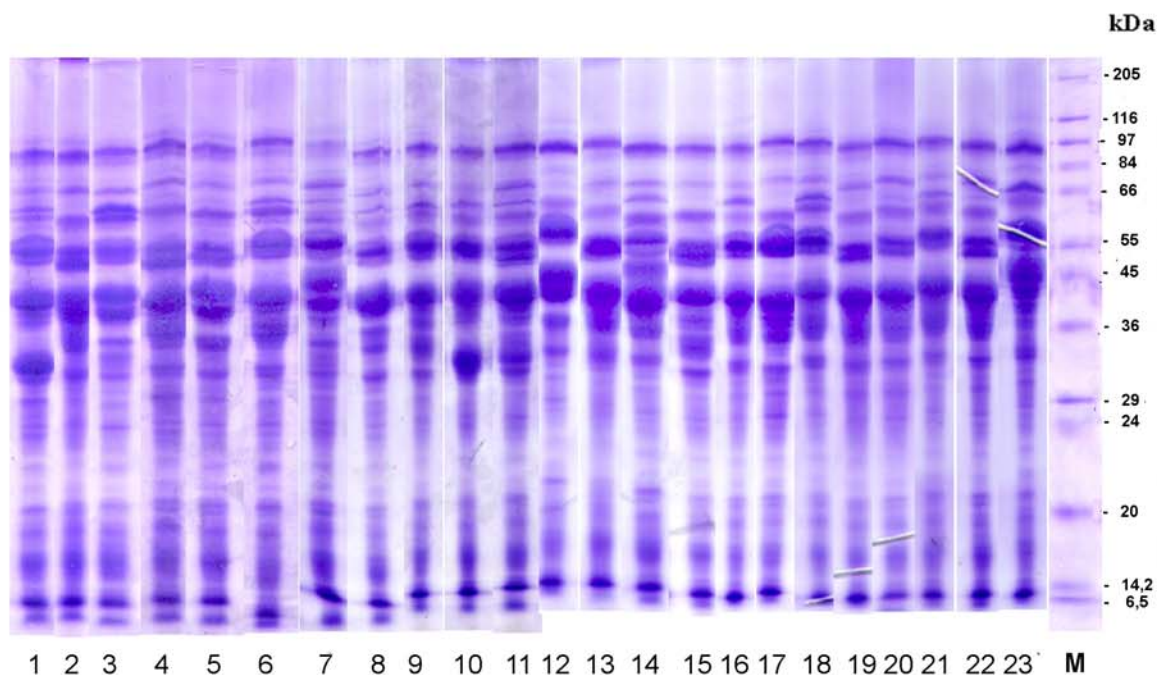


Dendrogram MVSP (obr.9) rozděluje všechny odrůdy do osmi shluků. Hodnoty podobnosti se pohybují v rozmezí mezi 60 – 100 %. 100% identitu dendrogram ukazuje u všech 23 odrůd a ty pak spojuje do pěti shluků. V rozmezí hodnot od 60 - 68 % se vyskytují tři shluky. Při pohledu do podobnostní matice (viz. příloha tab. 9) se zjistilo, že spodní hranice podobnosti neklesá pod úroveň 50 %. Střední hodnoty identity se pohybují kolem 66 % a nejvyšší hodnoty jsou na úrovni 100 %. Nejvíce identické odrůdy v porovnání s ostatními jsou CDC Candle, Ebsdorfer nackt, HB 803, Kavkazský golozer, KM 1910, Shimabara,

Nordus a Pax. Nejnižší podobnost v glutelinové frakci vykazují odrůdy Tolar, Miloňov nudum, Washonubet a Jersey.

5.4. SDS - celkový protein

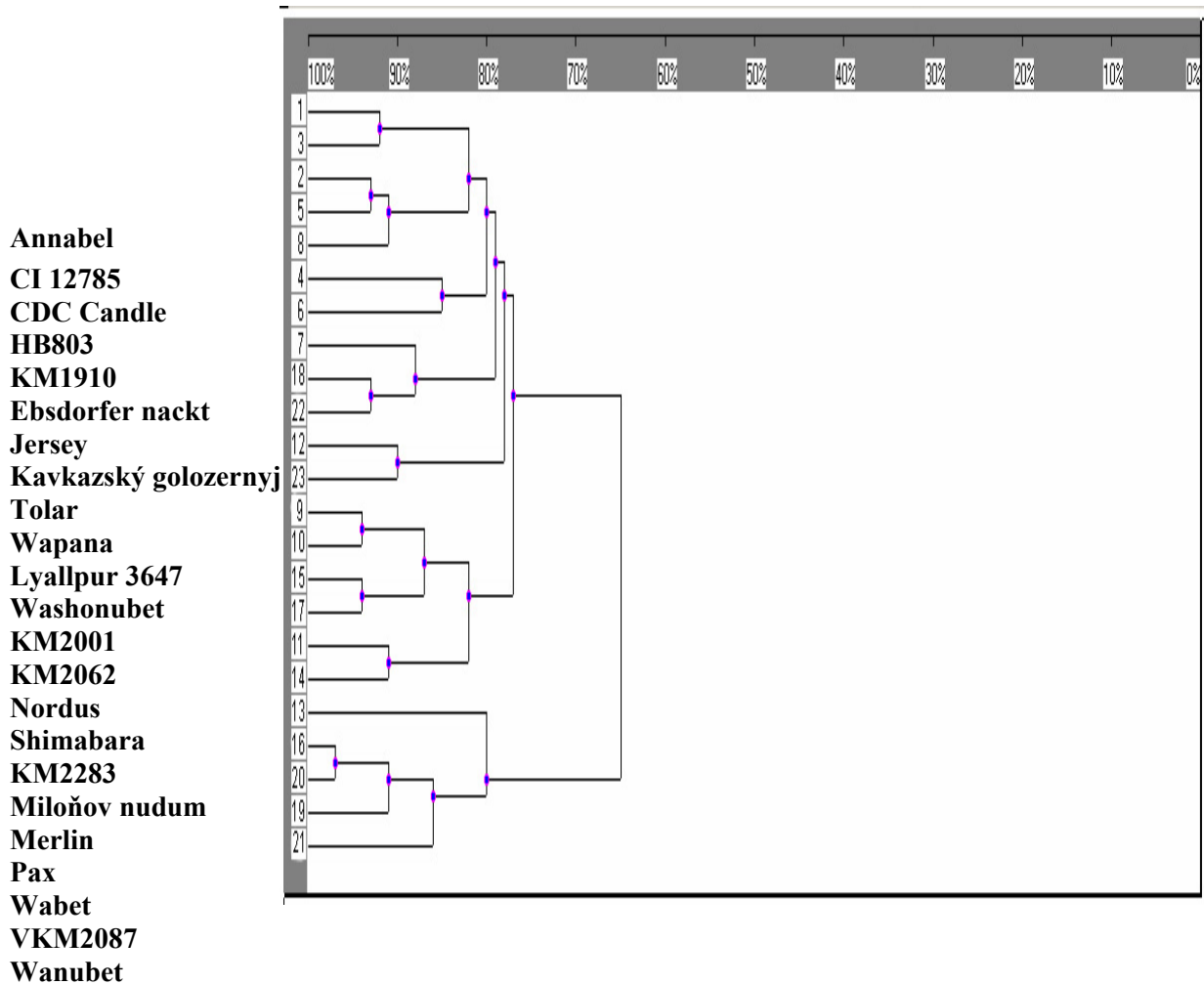
Obr. č. 10: SDS-PAGE profil SDS-celkového proteinu



Legenda odrůd: 1-Annabel, 2-CDC Candle, 3- CI 12785, 4- Ebsdorfer nackt, 5-HB803, 6- Jersey, 7-Kavkazský goložernyj, 8- KM 1910, 9-KM 2001, 10- KM 2062, 11-KM 2283, 12- Lyallpur 3647, 13-Merlin, 14-Miloňov nudum, 15- Nordus, 16-Pax, 17-Shimabara, 18-Tolar, 19-VKM 2087, 20-Wabet, 21-Wanubet, 22-Wapana, 23- Washonubet

Frakce celkového SDS-proteinu (obr. 10) je obtížně hodnotitelná. Proteinové pruhy se rozdělily do čtyřech úrovní v rozmezí od 8 – 100 kDa. Hlavní oblasti pruhů představují u spekter celkového SDS-proteinu zóny nad 66 kDa, od 33 do 66 kDa a pod 21 kDa. Přesné molekulové hmotnosti bílkovin nalezneme v tabulce (viz. příloha tab. č. 10). Pruhy mají vysokou intenzitu detekčního barvení.

Obr. č.11 : Dendrogram frakce SDS-celkového proteinu ječmene; vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).



Jak ukazuje dendrogram BioProfil (obr. 11), identita odrůd ve spektru se pohybuje od 65 – 95 %. Přesný údaj z podobnostní matice (viz. příloha tab. 11) ukazuje hodnoty od 59 – 97 %. Odrůdy jsou v dendrogramu rozděleny do 21 shluků ve třech úrovních. Nejvyšší úroveň podobnosti je nad 90 % a patří sem odrůdy:

Shimabara – Pax 97 %

Shimabara – Nordus 95 %

KM 2062 – KM 2001 94 %

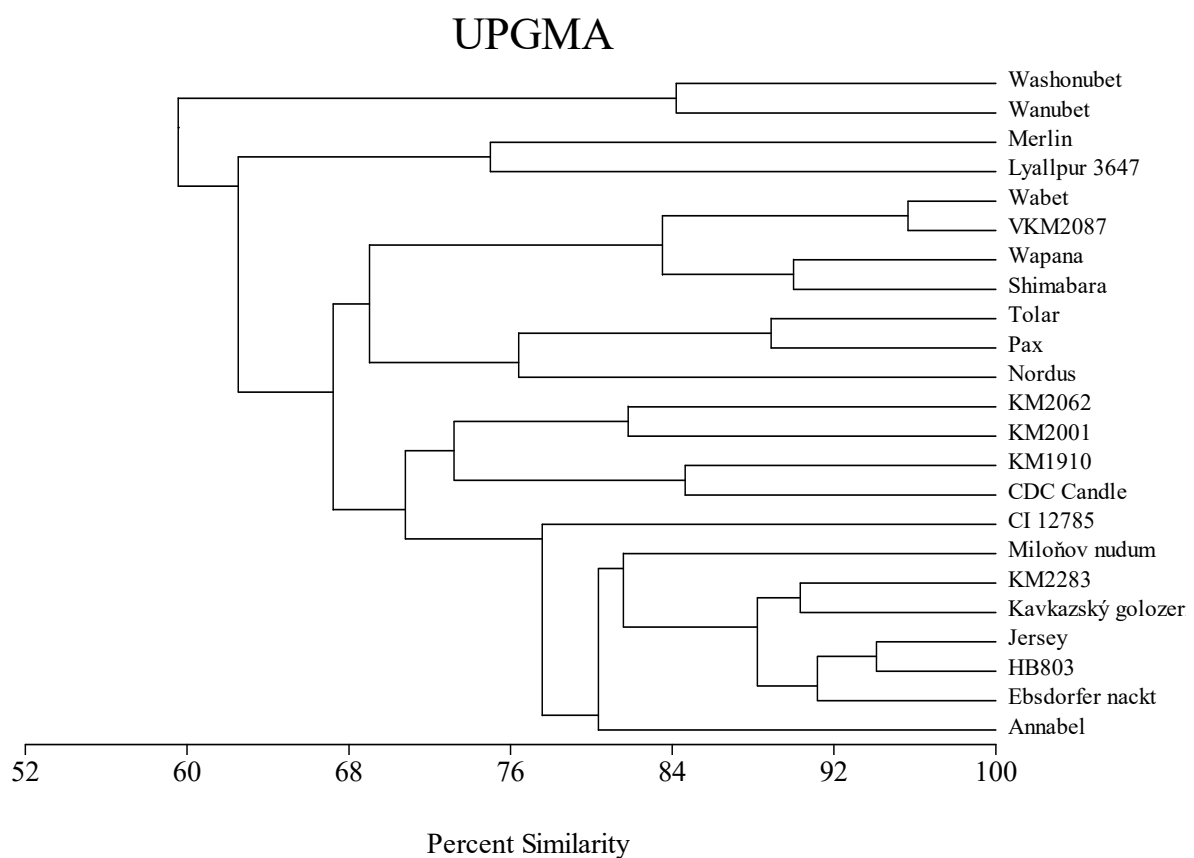
Tolar – Wapana 93 %

CDC Candle – Annabela 92 %

Střední hodnoty podobnosti jsou mezi 80 a 90 %. Zde se nachází devět shluků. Absolutně nejnižší index identity, 59 %, byl zaznamenán u odrůd Wapana – Ebsdorfer nact.

V celkovém porovnání odrůd (viz. příloha tab. 11) se jako vysoce identické jeví odrůdy Nordus, Miloňov nudum, Pax, KM 2001 a CDC Candle. Nejméně podobné jsou odrůdy Ebsdorfer nact a Lyallpur.

Obr. č.12: Dendrogram frakce SDS-celkového proteinu ječmene; vyhodnocení software MVSP



Dendrogram MVSP (obr. 12) ukazuje rozmezí hodnot identity mezi 50 – 95 %. Přesný údaj odečtený z podobnostní matice (viz. příloha tab.12) je od 42,105 - 94,118 %. Celkem se vytvořilo 21 shluků ve třech úrovních. Úsek největší podobnosti nad 92 % obsahuje čtyři shluky. Zde se nacházejí čtyři odrůdy s nejvyšším indexem identity (viz.příloha tab.12):

Tolar – Shimabara 95,652 %
Ebsdorfer nackt – CI 12785 94,118 %
CDC Candle – Ebsdorfer nackt 91,429 %
CDC Candle – CI 12785 90,9 %

Odrůdy s nejnižší identitou jsou:

Nordus – KM 1910 42,105 %
VKM 2087 – Lyallpur 43,478 %
Nordus – Merlin 47,059 %

Nejmenší podobnost v celkovém porovnání odrůd mezi sebou byla zjištěna mezi odrůdami KM 2062, KM 1910, KM 2283 a Merlin. Nejvyšší hodnoty podobnosti byly sledovány u odrůd Pax, CDC Candle a KM 2001.

6. Diskuze

Tato diplomová práce se zabývá porovnáváním odrůd ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.). Smyslem práce bylo detailně zhodnotit variabilitu proteinových spekter. Byla hodnocena variabilita spektra prolaminů, albuminů a globulinů a glutelinů. Doplnkově byla hodnocena i frakce celkového SDS-proteinu. Variabilita proteinových frakcí byla hodnocena u zrna 23 genotypů ječmene získaných ze ZVÚ Kroměříž. Na základě získaných výsledků se určovala variabilita mezi jednotlivými odrůdami.

Tyto údaje by se mohly využít např. k identifikaci odrůd, popřípadě k určení odrůdové čistoty v rámci rutinního testování, jak uvádí různí autoři. Identifikaci odrůd ječmene se v devadesátých letech také zabývali na VÚRV v Praze různí autoři.

6.1. Prolaminy

Hordeiny jsou prolaminové bílkoviny ječmenného zrna, které představují genetické bílkovinné markery. Hordeiny je jen jiné označení pro prolaminovou frakci (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998).

Autoři ČERNÝ a ŠAŠEK (1998) využily k verifikaci odrůd ječmene podle elektroforetické skladby hordeinů různé metody elektroforézy např. elektroforézu ve škrobovém gelu nebo elektroforézu hordeinů v polyakrylamidovém gelu a další. Alelické hordeinové bloky byly vyčleněny z elektroforetických spekter získaných elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE).

ŠAŠEK et. al. (1991) kontrolovali elektroforézou hordeinů např. odrůdovou pravost genetických zdrojů ječmene. ČERNÝ et. al. (1993) analyzovali soubor 31 odrůd dvouřadých ječmenů. Zjištěná skladba hordeinů těchto ječmenů byla porovnávána s elektroforetickou skladbou hordeinů 35 genotypů. Bylo zjištěno, že lze rychle a objektivně vertikální elektroforézou hordeinů ve škrobovém gelu rozlišit hodnocené soubory odrůd a nových šlechtění ozimých dvouřadých ječmenů a jarních dvouřadých ječmenů.

Na základě zhodnocení spekter jednotlivých proteinových frakcí ječmene setého lze jako nejlepší frakci pro hodnocení variability odrůd ječmene setého označit prolaminovou

frakci. Prolaminová frakce se jeví jako nejvhodnější, protože bílkovinné podjednotky jsou dobře čitelné a z větší části se podařilo jednotlivé odrůdy dobře rozlišit. Hlavní bílkovinné pruhy této frakce byly detekovány zejména v rozsahu molekulové hmotnosti 36 – 66 kDa. To znamená, že podle způsobu dělení hordeinové frakce podle KOIBE et. al. (1976) prolaminy patří do skupin B a C hordeinů. Skupiny B a C lze považovat za typické hordeiny s vysokým stupněm polymorfismu. Vzájemně se liší nejen uvedenými molekulárními hmotnostmi, ale i zastoupením cysteinu. Hordein B obsahuje 2,5 % a hordein C jen stopová množství. Výsledky studia zastoupení jednotlivých aminokyselin, jakož i sekvence 10 aminokyselinových zbytků od N-konce některých izolovaných hordeinových složek C hordeinu, dokázaly jejich výraznou podobnost (SHEWRY et. al., 1981).

Vzhledem k diskutované výši uvedené možnosti využití polymorfismu proteinových frakcí zrn k verifikaci odrůd (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1998), je významné především zjištění vysokého stupně variability prolaminové frakce u sledovaného souboru 23 odrůd.

Tento výsledek se shoduje i s tvrzením autorů ČERNÝ a ŠAŠEK (1998) kteří uvádějí, že prolaminové bílkoviny ječmeného zrna jsou vhodné k rozlišení a identifikaci jednotlivých genotypů ječmene. Jsou polymorfní a snadno zjištělné pomocí elektroforézy.

Program BioProfil určil jako identické prolaminové složky u odrůd Kavkazský golozernej a Washonubet a dále HB803 a Jersey. Bohužel se neví, jak byly tyto odrůdy vyšlechtěny a tak lze jejich původ jen těžko přesně určit. U odrůdy HB 803 se nepodařilo nalézt ani zemi původu. Přesto se můžeme domnívat, že by tyto uvedené odrůdy mohly být vyšlechtěny ze společných předků. Nejzajímavější je podobnost odrůd Kavkazský golozernej a Washonubet, které dokonce pocházejí z jiných částí světa – Rusko a USA. Nelze však toto tvrzení nijak potvrdit. Vysoké hodnoty podobnosti, kolem 95 %, ukazuje dendrogram BioProfil u shluku odrůd Annabel, KM 1910 a Tolar. Odrůdy Tolar a KM 1910 pocházejí z ČR. Je zde velmi pravděpodobné, že k jejich šlechtění mohli být použiti podobní předci.

Při hodnocení výsledků získaných z testovaných vyhodnocovacích programů BioProfil a MVSP byl zjištěn minimální rozdíl mezi výsledky těchto programů v oblasti vysoké podobnosti odrůd. Odlišnosti ve výsledcích získaných pomocí programů BioProfil a

MVSP lze nalézt především ve střední úrovni podobnosti. Hranice podobnosti byla v případě programu MVSP posunuta až k 76 %, kde se nachází jedenáct shluků oproti devíti z dendrogramu BioProfil 1 D++. Rozdíl je patrný i v nejnižších hodnotách podobnosti, kdy podobnostní matice ukazuje na nejnižší hodnotu podobnosti na úrovni 46 % oproti podobnostní matici MVSP, kde je hodnota o 10,7 % nižší. Nejvíce se výsledky hodnocení MVSP odlišují absencí 100% identity a nižšími hodnotami jednotlivých úrovní identity mezi odrůdami. Na úrovni nejvyšší podobnosti se v obou případech umístilo sedm odrůd. Z těchto sedmi odrůd se ovšem v obou systémech hodnocení shoduje jen odrůda Kavkazskij golozernyj. Tento rozdíl v hodnocení obou programů je způsoben rozdílným počtem detekovaných pruhů při „ručním“ a softwarovém hodnocení elektroforetických spekter těchto odrůd.

6.2. Albuminy a globuliny

Spektra proteinů rozpustných v 0,1 M Na-fosfátovém pufru (albuminy + globuliny), mají podobný poměrně složitý charakter jako frakce SDS-celkového proteinu. U frakce albuminů a globulinů lze obecně považovat za hlavní oblasti proteinové podjednotky v rozmezí 55 – 66 kDa, 34 – 40 kDa, 24 – 30 kDa a pod 20 kDa. Nevýhodou obou těchto proteinových systémů je především také jejich složitost. To je způsobeno tím, že se na gelu nacházejí spektra albuminových a globulinových bílkovin zrn ječmene která, se vzájemně překrývají, jako v případě frakce SDS-celkového proteinu. Toto spektrum se jeví jako méně vhodné pro charakteristiku odrůd.

Frakce albuminů a globulinů vykazuje vysoké hodnoty podobnosti, neboť oba dendrogramy ukazují nejvyšší hodnoty identity mezi odrůdami kolem 94 %. Porovnání výsledků BioProfil a MVSP shodně ukazuje vysoké podobnosti spektra. Hodnoty variability v dendrogramech se v zásadě neliší, jen celkový počet shluků se liší o tři shluky. Údaje z podobnostní matice MVSP mají větší rozpětí hodnot, než v matici BioProfil. Oba programy se shodují na některých nejméně podobných odrůdách v celé frakci. Jsou to odrůdy KM 1910 a KM 2001. V odrůdách s nejvyšší podobností se obě hodnocení rozcházejí.

6.3. Gluteliny

Spektra glutelinů, proteinů rozpustných v 0,2 % NaOH, která zřejmě mají (podle molekulové hmotnosti) velmi podobnou skladbu proteinových podjednotek jako profily proteinů rozpustných v 70 % etanolu, lze považovat za prakticky méně použitelná. Důvodem je špatná čitelnost spekter, zřejmě způsobená vlivem alkalické hydrolyzy proteinů.

Program BioProfil ve frakci glutelinů detekoval v jednotlivých profilech od dvou do pěti pruhů. Rozdílný výsledek vychází z klasického ručního hodnocení, kde byl v profilech identifikován jen jeden nebo dva pruhy. Programy BioProfil a MVSP shodně ukázaly podobnost v glutelinovém spektru jako nejvyšší. Dendrogram MVSP hodnotil spektrum v méně shlucích, ale u více odrůd stanovil 100% index identity. Hodnocení podobnostních matic se výrazně liší hlavně úrovněmi nejnižší podobnosti a rozdělením odrůd ve shlucích. Ve frakci glutelinů byl detekován malý počet variabilních pruhů. Glutelinová frakce zrn ječmene setého je tedy nevhodná pro hodnocení variability mezi odrůdami, a to nejen z důvodů špatné čitelnosti spektra, ale především vzhledem k nízkému stupni polymorfismu u této frakce.

6.4. SDS-celkový protein

Elektroforetická spektra SDS-celkového proteinu mají složitý charakter. Proteinové pruhy jsou rozmístěny v celé dráze separace vzorku. Celkový protein v podstatě představuje složená spektra albuminů a globulinů, protaminů a glutelinů dohromady. Toto spektrum je pak velmi složité hodnotit, neboť se jednotlivá složená spektra vzájemně překrývají. Pro charakteristiku odrůd ječmene je tato frakce méně vhodná. Hlavní oblasti pruhů představují u spekter celkového SDS-proteinu zóny nad 66 kDa, od 33 - 66 kDa a pod 21 kDa. Velmi jasně lze tedy v tomto spektru rozeznat např. prolaminovou frakci, která se nachází přesně v zóně molekulových hmotností od 33 – 66 kDa. Prolaminy a gluteliny pak překrývá frakce albuminů a globulinů, která má proteinové podjednotky rozmístěny přes celé pole hmotnostního standardu.

Hodnocení z programu MVSP a BioProfil se při bližším srovnání odlišují. Program MVSP ukazuje širší rozmezí hodnot identity než program BioProfil. Oba programy se shodují v počtu shluků a dále v odrůdách s nejvyšší podobností např. u odrůd CDC Candle a Pax.

6.5. Odlišnosti ve výsledcích

Při hodnocení výsledků, které poskytly vyhodnocovací programy BioProfil a MVSP, byly u všech hodnocených proteinových frakcí zaznamenány rozdíly v konečných výsledcích. Je to způsobeno odlišným způsobem hodnocení. Pravděpodobným důvodem těchto odlišností je, že pro vyhodnocování u obou programů byly použity rozdílné vstupní údaje. Pro vyhodnocování pomocí MVSP byly primárně použity „jedno-nulové“ matice vzniklé na základě ručního vyhodnocování. Program BioProfil pracoval s údaji získanými pomocí digitální obrazové analýzy hodnocených spekter. Program BioProfil je schopen detekovat i obtížně viditelné bílkovinné podjednotky, které při ručním vyhodnocování nejsou zaznamenány. BioProfil detekoval více pruhů a bylo možné přesně určit jejich pozici a odečíst molekulovou hmotnost. Rozdíly jsou patrné při porovnávání dendrogramů obou softwarů. Hodnocení se liší rozdělením odrůd do shluků a počtem shluků v dendrogramu i počtem odrůd ve shluku. Program MVSP u všech čtyřech frakcí vykazuje vždy větší rozpětí hodnot podobnosti než BioProfil. Lze říci, že výsledky z programu BioProfil jsou mnohem přesnější než výsledky z MVSP, které vycházejí z ručně stanovených dat.

7. Závěr

Z výsledků práce lze odvodit, že prolaminová frakce se jevila pro charakterizaci genotypů ječmene v porovnání s ostatními frakcemi jako nejvhodnější. Při porovnání matic podobnosti a dendogramů, které byly ze spekter prolaminové frakce vytvořeny pomocí programu BioProfil a MVSP se jako nejvíce variabilní vůči ostatním odrudám ukázala odrůda Wabet. Naopak u párů genotypů Kavkazský golozernej a Washonubet či HB 803 a Jersey byl pomocí programu BioProfil zjištěn index 100% identity. Vysoké hodnoty podobnosti měli také např. odrůdy CI 12785, Wanubet, Annabel, KM 1910 a Tolar. Programy BioProfil a MVSP ukazovaly v obou hodnoceních odrůdu Kavkazský golozernej jako jednu z odrůd s nejvyšší podobností.

U profilu albuminů a globulinů se bílkoviny rozdělily do čtyřech dobře hodnotitelných úrovní. Podobnost se pohybovala v rozmezí hodnot od 70 do 94 % podle dendrogramu vytvořeného v programu BioProfil. Podle tohoto programu byl největší koeficient podobnosti zaznamenán mezi odrůdami Kavkazský golozernej a HB 803, zatímco nejvíce polymorfní byla odrůda Wabet. Oba programy ukazovaly podobný index identity u odrůd CDC Candle a CI 12785 (96,5 % - MVSP, 93 % - BioProfil). Nízké hodnoty podobnosti vykazovaly ve výsledcích obou programů odrůdy KM 1910 a KM 2001.

Rozmezí podobnosti elektroforetického spektra celkového SDS-proteinu se pohybovalo od 95 – 65 %. Nejvyšší míra podobnosti byla zaznamenána u odrůd Shimabara, Pax, Tolar a CDC Candle.

Při hodnocení glutelinové frakce byla v porovnání s ostatními hodnocenými frakcemi zaznamenána nejvyšší míra podobnosti v souboru hodnocených odrůd, a to na základě vyhodnocení spekter glutelinové frakce pomocí obou programů. Dendrogram BioProfil vytvořil čtyři shluky se 100% podobností, do kterých zahrnul celkem dvacet odrůd. Nejvzdálenější v celé frakci byla odrůda Kavkazský golozernej vůči odrůdě Jersey. Dendrogram MVSP ukazoval jako jedny z nejvzdálenějších odrůdy Washonubet a Miloňov Nudum.

Závěrem lze říci, že pomocí elektroforézy hordeinů lze určovat rozdíly mezi jednotlivými odrůdami ječmene. Právě hordeinová frakce byla k tomuto účelu nejvhodnější, neboť byla dobře čitelná a hodnotitelná a vykazovala vysoký stupeň polymorfismu. Hodnocení odrůd

pomocí SDS-celkového proteinu nebo frakce albuminů a globulinů nebylo moc vhodné, protože tyto frakce měly velmi složitý charakter. Bílkovinné podjednotky se v jednotlivých spektrech překrývali a byly rozmístěny napříč celému rozpětí hmotnostního standardu. Glutelinová frakce měla vlivem alkalické hydrolyzy velmi špatnou čitelnost spekter a proto byla pro hodnocení méně vhodná.

8. Seznam literatury

- ANDREWS A. T., (1993): Electrophoresis. Tudory and Biochemical and Clinical Applications, Oxford University Press, New York.
- BARTUŠEK M., (1984): Úvod do elektroanalytických metod. Univerzita J. E. Purkyně v Brně, vydalo SPN Praha, s. 42-49.
- BOTHMER R., JACOBSEN N., BADEN C., JØRGENSEN R. B., LINDE-LAURSEN I. (1995): An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 129 s.
- BRADOVÁ J., SÝKOROVÁ S. (2005): Praktické využití bílkovinných genetických markerů k identifikaci odrůd jarního ječmene. Ječmenářská ročenka 2006. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha, 316 s.
- DĚMINA V., NECVETAJEV V., (1984): Bloki komponentov gordeina i kačestvo zerna, Genetika, Moskva.
- DĚMINA V., (1984): Soprjažennosť blokov gordeina i priznakov u jarovogo jařmena, Biol., Selchoz.
- ČERNÝ J., ŠAŠEK A. (1998): Využití elektroforetické analýzy BGM k charakteristice odrůd pšenice a ječmene. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 49 s.
- ČURN V., (1995): Studium uplatnění metod elektroforézy bílkovin ve šlechtění řepky olejné. Doktorská disertační práce. Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 164 s.
- ČURN V., BÁRTA J. (2004): Protein fractions and the assessment of their genotype variability. Proceedings from 9th International Barley Genetics Symposium, 20-26 June, Brno, s. 525-530.
- ČURN V., GRAMAN J., (1998): Šlechtění zemědělských plodin (obiloviny, luskoviny). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 194 s.
- ČURN V., SÁKOVÁ L., GRAMAN J., (1995): Elektroforéza isoenzymů a neenzymatických bílkovin metody a aplikace v genetice a šlechtění rostlin. Genet. a Šlecht., s. 207-228.
- DIVIŠ J. a kol., (2000): Pěstování rostlin. Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 258 s.

- DRBAL K., KŘÍŽEK M., (1999): Analytická chemie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, s.179-182.
- EWART J.A.D., (1980): Isolation of a hordein of low electrophoretic mobility. J. Sci. Fd. Agric., s.82-85.
- GLAZKO V. I., SOZINOV I. A. (1993): Genetika izifermentov životnych i rastěnij. Kijev.
- GRAMAN J., ČURN V., (1998): Šlechtění zemědělských plodin (obiloviny, luskoviny). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, s. 47-70.
- GRAMMAN J. a kol., (1999): Semenářství – dodatky k učebním textům. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice.
- HVID S., NIELSEN G., (1977): Esterase isoenzyme variants in barley. Heredita, s. 155-162.
- HOEFER (1994): Protein electrophoresis-applications guicle. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, s.1-106.
- HOŘEJŠÍ J., (1985): Moderní elektroforetické metody. Pracovní materiály pro kurs, ČÚV společnosti průmyslu, Praha, s. 35.
- KOIBE B., PEDERSEN K. et. al. (1976): Composition and nutrition duality of barley protein. Ecaluation of seed protein alterations by mutation breeding. Vinna, IAEA, s.55-61.
- KONAREV V., (1983): Belki rastěnij kak genetičeskije markry. Kolos, Moskva.
- KONISHI T., MATSUURA S., (1987): Variation of esterase isoenzyme genotype in a pedigree of Japanese two-rowed barely. Japan J. Breed., s. 415-420.
- KRÁLOVÁ B, FUKAL L., RAUCH P., RUML T., (2001): Bioanalytické metody. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 254 s.
- LAURENCE G., SHEPHERD K., (1980): Variation in gluten subunits of wheat, Austral. J.,Biol. Sci., s.221-233.
- LEKEŠ J. a kol., (1985): Ječmen. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, s. 10-28.
- NECVETAJEV V., OBRAZCOV I., SOZINOV A., (1983): Kartirovanije pokusy Hrd G v chromosomě 5 jačmeňa. Molokuljarnyje mechanizmy genetičeskych procesov, Nauka, Moskva.
- NECVETAJEV V., SOZINOV A., (1982): Gordein kondirujuščije lokus i produktivnost rastěnij jarovogo jačmena. Sbor. nauč. Tr. Genet. Inst. Vsesojuz, s. 63-66.

- NIELSEN G. (1985): The use of isozymes as probes to identify a label plant varieties and cultivars. *Isozymes: Currents Tropics Biol. Medical Res.*, s.1-32.
- NIELSEN G., JOHANSEN H.B., (1986): Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica*, s. 717-728.
- PELIKÁN M., SÁKOVÁ L., (2001): Jakost a zpracování rostlinných produktů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice s. 20-21.
- PETR J., HÚSKA J. a kol., (1997): Speciální produkce rostlinná I. (obecná část a obilniny). Agronomická fakulta ČZU v Praze, Praha, s. 125-127.
- POMORCEV A. A., NECVETAJEV V. P., SOZINOV A. A., (1985): Polymorfizm kulturnogo jačmeňa (*Hordeum vulgare*) po gordeinam, *Genetika*, Moskva, s.629-639.
- POMORCEV A.A., (1982): Genetičeski obuslovlennyj polimorfizm gordeina i vozmožnosti ego ispolzovanija v selkciji ozimogo jařmena. Němčinovka, 1982.
- PRZYBYLSKA J., ZIMMIIAK-PRZYBYLSKA Z., DABROWSKA T., (1974): Isoenzyme patterns in several cultivated varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genet. pol.*, s. 61-69.
- SHEWRY P., FINCH R., et al. (1983): Chromosomal location of HOR 3, a new locus governing storage proteins in barley. *Heredity* s.179-189.
- SHEWRY P., PRATT H., MIFLIN B., (1978): Varieta identification of single seeds of barley by analysis of hordein polypeptides. *J. Sci Fd Agric.*, s. 587-596.
- SALCEDO G., SANCHEZ-MONGE r., et al. (1982): Low molecular weight prolamins : purification of a komponent from barley endosperm. *J. Agric Food Chem.*, s. 1155-1157.
- SOZINOV A. A., (1985): Polymorfizm belkov i jeho značenije v genetike i selekci. Nauka, Moskva
- STAŇKOVÁ O., ČÁP L., (1991): Vybrané metody z analýzy organických sloučenin. Universita Palackého v Olomouci, Olomouc, s. 56-60.
- SÝKOROVÁ S., HADAČOVÁV., (1992): Využití izoenzymů pro určování některých hospodářsky důležitých druhů a jejich kultivarů. *Rostlinná výroba*, s. 861-874.
- SÝKOROVÁ S., ŠAŠEK A., (1996): Alely esterasových lokusů u souboru českých odrůd jarního a ozimého ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.). *Genet. a Šlecht.*

ŠAŠEK A., ČERNÝ J., SÝKOROVÁ S., (1983): An innovated catalogue of Iliadin markers of Czechoslovak common wheat varieties. *Scientia Agric. bohemoslov.*, s. 93-100.

VAŠÁK (2006): Pěstování ječmene na území ČR. Kompendium vybraných poznatků při pěstování jarního sladovnického ječmene a cukrovky. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 120 s.

9. Seznam příloh

Příloha tabulka 1: Molekulové hmotnosti bílkovinných podjednotek prolaminů, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 2: Podobnostní matice prolaminové frakce, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 3: Podobnostní matice prolaminové frakce, vyhodnocení software MVSP (KOVACH COMPUTING SERVIS).

Příloha tabulka 4: Molekulové hmotnosti bílkovinných podjednotek albuminů a globulinů, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 5: Podobnostní matice frakce albuminů a globulinů, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 6: Podobnostní matice frakce albuminů a globulinů, vyhodnocení software MVSP (KOVACH COMPUTING SERVIS).

Příloha tabulka 7: Molekulové hmotnosti bílkovinných podjednotek glutelinů, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 8: Podobnostní matice glutelinové frakce, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 9: Podobnostní matice glutelinové frakce, vyhodnocení software MVSP (KOVACH COMPUTING SERVIS).

Příloha tabulka 10: Molekulové hmotnosti bílkovinných podjednotek SDS celkového proteinu, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 11: Podobnostní matice SDS celkového proteinu, vyhodnocení software Bio-Profil 1D++ (Vilbert Lourmat).

Příloha tabulka 12: Podobnostní matice SDS celkového proteinu, vyhodnocení software MVSP (KOVACH COMPUTING SERVIS).

Příloha tabulka č. 13: Ruční měření a hodnoty REM frakce prolaminů

Příloha tabulka č.14: Jedno-nulová matice frakce prolaminů

Příloha tabulka č.15: Ruční měření a hodnota REM frakce albuminů a globulinů

Příloha tabulka č.16: Jedno-nulová matice frakce albuminů a globulinů

Příloha tabulka č.17: Ruční měření a hodnoty REM frakce glutelinů

Příloha tabulka č.18: Jedno-nulová matice frakce glutelinů

Příloha tabulka č.19: Ruční měření a hodnoty REM frakce SDS-celkového proteinu

Příloha tabulka č.20: Jedno-nulová matice frakce SDS-celkového proteinu

10. Přílohy

