

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Genové inženýrství

Katedra: Rostlinné výroby

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Hodnocení SDS-PAGE proteinových profilů hlíz pro jejich potenciální
využití při charakterizaci odrůd brambor
(*Solanum tuberosum* L.).**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Autor:

Jiří Pešina

2007

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Jiří Pešina**

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Název tématu:

Hodnocení SDS-PAGE proteinových profilů hlíz pro jejich potenciální využití při charakterizaci odrůd brambor

Evaluation of SDS-PAGE tuber protein profiles for their potential use in potato cultivar characterization

Zásady pro vypracování:

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

Cílem práce bude zhodnocení využití SDS-PAGE proteinových profilů hlíz pro charakterizaci odrůd brambor. Proteiny bramborových hlíz jsou v současné době klasifikovány podle molekulové hmotnosti pomocí techniky SDS-PAGE na 3 hlavní skupiny: 1) patatinový komplex (39-44 kDa), 2) inhibitory proteas (6-24 kDa) a 3) ostatní proteiny. První dvě skupiny vykazují na genotypové úrovni kvalitativní variabilitu, kterou je potřebné zhodnotit s ohledem na její potenciální využití pro charakterizaci odrůd brambor. Pro uvedený cíl budou analyzovány proteinové extrakty hlíz souboru vybraných odrůd brambor registrovaných v ČR technikou SDS-PAGE. DP bude probíhat podle následujícího schématu aktivit:

1. výběr odrůd brambor pro analýzy a získání jejich hlíz z ÚKZÚZ
2. extrakce hlízových proteinů
3. elektroforetická separace proteinových extraktů technikou SDS-PAGE
4. zpracování elektroforeogramů pomocí digitální obrazové analýzy
5. hodnocení proteinových profilů pomocí speciálního software BioProfil 1 D++
6. zpracování získaných výsledků a hodnocení rozsahu genotypové variability obou proteinových systémů – patatinový komplex a skupina inhibitorů proteas.

Rozsah grafických prací: 10 stran

Rozsah průvodní zprávy: 30-40 stran

Seznam odborné literatury:

Westermeier R. (1993): Electrophoresis in Practice. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 277 p.

Shewry P. R. (2003): Tuber storage proteins. Annals of Botany 91: 755-769.

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.

UPOV (2002): Draft test guidelines for potato document TG/23/6(PROJ.1). 31. Session, Rio de Janeiro, Brazil, September 23 to 27, 2002.

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

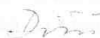
Datum zadání diplomové práce: 4. února 2005

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2007

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
LS
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice

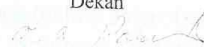
doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.

Vedoucí katedry



doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

Děkan



V Českých Budějovicích dne 4. února 2005

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Hodnocení SDS-PAGE proteinových profilů hlíz pro jejich potencionální využití při charakterizaci odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.)“ vypracoval samostatně a na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b) zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.



.....
V Českých Budějovicích 30. dubna 2007

Rád bych tímto poděkoval Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování diplomové práce. Zároveň mé poděkování patří Ing. Veronice Heřmanové za pomoc při laboratorních analýzách, poskytnutí podkladových materiálů a informací.

Výsledky práce byly získány v rámci řešení grantu NAZV 1B44011.

Annotation:

The use of various types of gel electrophoresis for characterization and identifying plant varieties is well established. This diploma work deals with the possibility characterize potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) by the help of electrophoretic technique SDS – PAGE tuber protein profiles. Soluble potato tuber proteins can be classified according to their molecular weight (kDa) into three groups: First, the major tuber protein patatin (37 – 44 kDa); second, a group constituted of protease inhibitors (6 – 24 kDa); and third group containing all other proteins. First two group manifest genetic variability, which is necessary evaluate for its potential using of potato cultivar characterization.

KEYWORDS: *Solanum tuberosum* – Potato – Varietal classification – Storage proteins – Electrophoresis – SDS - PAGE

Anotace:

Používání různých elektroforetických technik pro charakterizaci a identifikaci odrůd rostlin je v současnosti velmi rozšířené. Tato diplomová práce se zabývá možností charakterizace odrůd brambor elektroforetickou technikou SDS-PAGE bílkovinných profilů hlíz. Zásobní bílkoviny bramborových hlíz (*Solanum tuberosum* L.) mohou být klasifikovány podle své molekulové hmotnosti (kDa) do tří skupin: První skupina - patatinový komplex (37 – 44 kDa); druhá skupina - inhibitory proteas (6 – 24 kDa); a třetí skupina ostatní proteiny. První dvě skupiny vykazují variabilitu na genotypové úrovni, kterou je třeba zhodnotit s ohledem na její potencionální využití pro účely charakterizace odrůd brambor.

KLÍČOVÁ SLOVA: *Solanum tuberosum* – Brambory – Odrůdová klasifikace – Zásobní bílkoviny – Elektroforéza – SDS - PAGE

1.	ÚVOD.....	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1.	PŮVOD BRAMBORU HLÍZNATÉHO (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	3
2.2.	VÝZNAM ODRŮD.....	3
2.2.1.	REGISTRACE NOVÝCH ODRŮD.....	3
2.2.2.	VÝZNAM ODRŮDY VE VZTAHU K JAKOSTI A KVALITĚ KONZUMNÍCH BRAMBOR.....	4
2.2.3.	UPOV - PROBLEMATIKA SMĚRNICE PRO IDENTIFIKACI ODRŮD BRAMBOR.....	5
2.3.	GENETICKÉ MARKERY.....	5
2.3.1.	CHARAKTERIZACE ODRŮD BRAMBOR POMOCÍ GENETICKÝCH MARKERŮ...	6
2.4.	CHARAKTERIZACE ODRŮD BRAMBOR BIOCHEMICKÝMI BÍLKOVINNÝMI MARKERY (BBM).....	8
2.4.1.	PŘÍČINY POLYMORFISMU BÍLKOVIN.....	8
2.4.2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BIOCHEMICKÝCH BÍLKOVINNÝCH MARKERŮ (BBM).....	9
2.4.3.	MOŽNOSTI CHARAKTERIZACE ODRŮD BRAMBOR POMOCÍ BÍLKOVINNÝCH MARKERŮ.....	9
2.5.	CHARAKTERISTIKA HLÍZOVÝCH BÍLKOVIN.....	11
2.5.1.	KLASIFIKACE HLÍZOVÝCH BÍLKOVIN.....	11
2.6.	RODINA PATATINOVÝCH BÍLKOVIN.....	11
2.6.1.	FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI A GENOVÁ EXPRESE	12
2.6.2.	ROZDÍLY V MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI PATATINU.....	12
2.6.3.	BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	12
2.7.	INHIBITORY PROTEAS.....	15
2.7.1.	GENOVÁ EXPRESE.....	16
2.8.	OSTATNÍ BÍLKOVINY.....	17
2.9.	ELEKTROFORETICKÉ METODY.....	17
2.9.1.	SDS - POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS- PAGE).....	17
2.10.	VYHODNOCOVÁNÍ GENETICKÝCH MARKERŮ.....	18
2.10.1.	VYHODNOCOVÁNÍ ZÍSKANÝCH ELEKTROFOREGRAMŮ.....	19
2.10.2.	DIGITÁLNÍ OBRAZOVÁ ANALÝZA GELŮ.....	19
2.10.3.	CLUSTEROVÁ ANALÝZA.....	19
3.	CÍL PRÁCE.....	21
4.	MATERIÁL A METODIKA.....	22

4.1.	MATERIÁL PRO CHARAKTERIZACI SPEKTER HLÍZOVÝCH BÍLKOVIN.....	22
4.2.	METODIKA CHARAKTERIZACE HLÍZOVÝCH BÍLKOVIN POMOCÍ ELEKTROFORETICKÉ TECHNIKY SDS-PAGE.....	23
4.2.2.	EXTRAKCE BÍLKOVIN.....	23
4.2.3.	ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE (SDS-PAGE).....	23
4.2.4.	DETEKCE SEPAROVANÝCH BÍLKOVIN NA GELU.....	25
4.2.5.	ZPRACOVÁNÍ ELEKTROFORETICKÝCH DAT.....	25
5.	VÝSLEDKY.....	27
5.1.	CHARAKTERIZACE BÍLKOVINNÝCH PROFILŮ HLÍZ PROGRAMEM BIO 1D ++ (BioProfil).....	27
5.1.1.	ZÁKLADNÍ ÚDAJE K POKUSU.....	27
5.1.2.	ZHODNOCENÍ VARIABILITY BÍLKOVINNÝCH PROFILŮ HLÍZ PROGRAMEM BIO 1D++ (BioProfil).....	28
5.1.3.	ZHODNOCENÍ VARIABILITY BÍLKOVIN INHIBITORŮ PROTEAS PROGRAMEM BIO 1D++ (BioProfil).....	32
5.1.4.	ZHODNOCENÍ VARIABILITY PATATINOVÝCH BÍLKOVIN PROGRAMEM BIO 1D++ (BioProfil).....	34
5.2.	CHARAKTERIZACE BÍLKOVINNÝCH PROFILŮ HLÍZ PROGRAMY MVSP A STATISTICA PO VIZUÁLNÍ DETEKCI PRUHŮ.....	36
5.2.1.	ZÁKLADNÍ ÚDAJE K POKUSU.....	36
5.2.2.	CHARAKTERIZACE BÍLKOVINNÝCH PROFILŮ HLÍZ PO VIZUÁLNÍ DETEKCI..	37
5.2.3.	CLUSTEROVÁ ANALÝZA BÍLKOVINNÝCH PROFILŮ HLÍZ.....	38
5.2.4.	CLUSTEROVÁ ANALÝZA OBLASTI INHIBITORŮ PROTEAS.....	42
5.2.5.	CLUSTEROVÁ ANALÝZA OBLASTI PATATINOVÉHO KOMPLEXU.....	46
6.	DISKUSE.....	50
6.1.	EXTRAKČNÍ METODY.....	50
6.2.	SEPARAČNÍ METODY.....	50
6.3.	DETEKČNÍ METODY.....	51
6.4.	VARIABILITA ZÁSOBNÍCH BÍLKOVIN.....	52
6.4.1.	VARIABILITA ZÁSOBNÍCH BÍLKOVIN V OBLASTI PATATINOVÉHO KOMPLEXU.....	52
6.4.2.	VARIABILITA ZÁSOBNÍCH BÍLKOVIN V OBLASTI INHIBITORŮ PROTEAS.....	53

6.5.	METODY VYHODNOCOVÁNÍ SPEKTER ZÁSOBNÍCH	
	BÍLKOVIN.....	53
6.5.1.	VYHODNOCOVÁNÍ GELU DIGITÁLNÍ OBRAZOVOU ANALÝZOU POMOCÍ PROGRAMU BIO 1D++ (BioProfil).....	53
6.5.2.	VIZUÁLNÍ VYHODNOCOVÁNÍ GELU POMOCÍ PROGRAMŮ MVSP A STATISTICA.....	54
7.	ZÁVĚR.....	56
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
9.	PŘÍLOHY.....	64

1. Úvod

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) patří v celosvětovém měřítku mezi nejvýznamnější hospodářské plodiny. Brambory mají rovněž mimořádný význam z hlediska celosvětové produkce hlíznatých plodin, kterou pokrývají z asi 45 % (SHEWRY 2003).

V České republice se průměrná spotřeba brambor uvádí na úrovni 75 – 80 kg na obyvatele za rok (DIVIŠ et al. 2000). Oproti minulosti, kdy brambory patřily k základním potravinám – spotřeba před II. světovou válkou se pohybovala kolem 150 kg na osobu a rok – dnes slouží spíše jako potravinová doplňková (PELIKÁN, SÁKOVÁ 2001). Dalším významným úsekem využití brambor je jejich průmyslové zpracování na škrob a líc (DIVIŠ et al. 2000).

Z hlediska praktického využití je odrůda brambor nositelem řady charakteristických znaků a vlastností, které ovlivňují významně možnost pěstované odrůdy v daných podmínkách a determinují využití hlíz brambor z hlediska spotřeby (DIVIŠ et al. 2000). V České republice bylo koncem roku 2005 zapsáno ve Státní odrůdové knize 135 registrovaných odrůd brambor. Pro srovnání, ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin je zapsáno asi 980 odrůd brambor, které mohou být množeny a obchodovány na celém území Evropského společenství (MED 2005).

Odrůdová pravost brambor je rovněž jedním z několika kritérií, které sleduje Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Nepatří sice mezi parametry, které by mohly ohrozit zdraví spotřebitele, chrání jej však před klamáním. Odrůda je základním faktorem, který rozhoduje o kvalitě a varném typu brambor a rozdíly mezi různými odrůdami pak rozhodují o jejich postavení a uplatnění na trhu. Běžný spotřebitel nemá žádnou možnost zjistit, jestli skutečně nakupuje brambory odpovídající deklarované odrůdě, resp. varnému typu a tedy i požadované kvalitě.

Problematiku ochrany práv k odrůdám v České republice řeší zákon č. 408/2000 Sb. o ochraně práv k odrůdám, ve znění pozdějších předpisů. Podmínkou pro právní ochranu odrůd

je členství daného státu v Mezinárodní organizaci pro ochranu odrůd (dále jen UPOV). Z hlediska předpisů UPOV, jsou pro právní ochranu odrůdy vyžadovány tzv. DUS testy, tj. zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti znaků a vlastností pomocí vegetačních zkoušek. Tyto testy jsou mnohdy pro charakterizování a odlišení odrůd prováděny pouze podle morfologických znaků, což pro odlišení odrůd u některých rostlin již nepostačuje. Metody identifikace odrůd založené pouze na morfologických znacích rostlin se rovněž jeví jako nepříliš objektivní pro závislost těchto znaků na podmínkách prostředí. Identifikace odrůd brambor na základě morfologických znaků hlíz i fyziologických projevů, znaků a vlastností rostlin je značně zdlouhavá a nevhodná pro sériové použití (POPPR, HOLÁ 1993).

Proto byly hledány nové způsoby identifikace odrůd, které by byly rychlé a finančně méně náročné. Všechny tyto požadavky velmi dobře splňují genetické markery (na úrovni bílkoviny, DNA). Tyto markery již dnes nalézají uplatnění při kontrole odrůdové pravosti, ve šlechtitelské a semenářské praxi, pro účely obchodu s konzumními bramborami (SÝKOROVÁ 1999).

2. Literární přehled

2.1. Původ bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.)

Druh (*Solanum tuberosum* L.) náleží do rodu lilek – (*Solanum* Tourn.) a čeledě lilkovitých (*Solanaceae* Pers.). Brambor je u nás běžné označení pro kulturní, polokulturní a příbuzné plané druhy rodu *Solanum*. V zemědělské výrobě se u nás a téměř ve všech zemích kulturní brambor rozmnožuje pouze vegetativně hlíznami (RYBÁČEK et al. 1988). Většina autorů se shoduje v tom, že současné kulturní tetraploidní formy bramboru ($2n = 48$ chromozomů) vnikly buďto křížením nebo mutací z planě rostoucích diploidních forem ($2n = 24$ chromozomů), z nichž se později vyvinul druh *Solanum andigenum*. Hybridizací mezi jeho formami vznikl druh *Solanum tuberosum* ($2n = 48$ chromozomů) v Chile a na ostrově Chiloe a přilehlém území kolem 40. rovnoběžky j.š. Tento druh je také považován za předchůdce evropských odrůd brambor (JÚZL et al. 2000).

2.2. Význam odrůd

Odrůda je soubor rostlin náležející k nejnižšímu stupni botanického třídění, který lze vymezit projevem znaků vyplývajících z určitého genotypu nebo kombinace genotypů, odlišitelný od každého jiného souboru rostlin projevem nejméně jednoho z těchto znaků a považovaný za jednotku rozmnožovatelnou beze změny (CERKAL et al. 2003). Odrůda vzniká záměrnou činností člověka - šlechtěním. Odrůdy rostlin jsou jedním z nejvýznamnějších faktorů rozvoje zemědělství. Jejich stále se zvyšující výnosová schopnost, odolnost k chorobám a škůdcům, umožňují zemědělcům i zpracovatelům dosahovat lepších hospodářských výsledků (SÝKOROVÁ 1999).

2.2.1. Registrace nových odrůd a jejich právní ochrana

Ochranná práva mohou být podle zákona č. 408/2000 Sb. o ochraně práv k odrůdám, ve znění pozdějších předpisů udělena k odrůdám všech rodů a druhů rostlin, včetně jejich hybridů. Ochranná práva lze udělit odrůdě která splňuje tyto podmínky:

Novosti (N – newness) – odrůda splňuje podmínku novosti, jestliže ke dni podání žádosti o udělení ochranných práv nebyl její rozmnožovací materiál nebo materiál ze sklizně odrůdy šlechtitelem, popřípadě s jeho souhlasem, prodán nebo jiným způsobem poskytnut k využití jiným osobám.

Odlišnosti (D – distinctness) – odrůda splňuje podmínku odlišnosti, jestliže zřetelně odlišuje od každé jiné odrůdy, která v den podání žádosti o udělení ochranných práv obecně známa, projevem nejméně jednoho znaku vyplývajícího z jejího genotypu nebo kombinace genotypů.

Uniformity (U – uniformity) – odrůda se považuje za uniformní jestliže je dostatečně jednotná v projevu znaků, které se zahrnují do zkoušení odlišnosti, jakož i znaků používaných k popisu odrůdy, s výhradou odchylek, které lze oprávněně očekávat v důsledku zvláštností jejího rozmnožování.

Stálosti (S – stability) – odrůda se považuje za stálou, jestliže v projevu znaků zahrnutých do zkoušení odlišnosti, jakož i ve znacích používaných k popisu odrůdy zůstává beze změny po opakovaném množení, nebo v případě zvláštního rozmnožovacího cyklu na konci každého takového cyklu.

Předpokladem k podání přihlášky k právní ochraně odrůdy je absolutorium v tzv. zkoušce DUS, tj. zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti znaků a vlastností. Zkouška probíhá podle zásad Mezinárodního svazu pro ochranu odrůd (dále jen UPOV). V České republice tyto zkoušky organizuje Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně – odbor odrůdového zkušebnictví (dále jen ÚKZÚZ). Podmínkou pro právní ochranu odrůd je členství státu v organizaci UPOV (GRAMAN, ČURN 1997).

2.2.2. Význam odrůdy ve vztahu k jakosti a kvalitě konzumních brambor

Brambory se stávají potravinou v okamžiku, kdy jsou uváděny do oběhu k přímému prodeji spotřebiteli a vztahuje se na ně ustanovení zákona o potravinách (č. 110/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů). U dovážených brambor je povinností označit odrůdu a zemi původu, u konzumních brambor pozdních musí být uveden varný typ, odrůda a popř. země původu.

Přípustná příměs jiné než deklarované odrůdy může činit nejvýše 2% hmotnosti (SÝKOROVÁ 2002).

2.2.3. UPOV - problematika směrnice pro identifikaci odrůd brambor

UPOV je mezivládní organizací, která se zabývá právní ochranou nových odrůd zemědělských plodin. Základní principy ochrany odrůd jsou dány základním dokumentem této organizace, tzv. „Konvencí“. Ta nemá konstantní podobu a v průběhu let se vlivem technologického i společenského vývoje mění. Nutno podotknout, že proces této změny je velmi složitý, neboť se jedná o mezinárodní dokument, jehož signatáři jsou suverénní státy (v současné době 46 států).

Organizace UPOV vydává směrnice, které jsou závazné ústavům odrůdového zkušebnictví v členských zemích. U brambor se konkrétně jedná o směrnici z r. 2004 (TG/23/6 - Potato). Směrnice obsahuje pokyny pro DUS testování nově registrovaných odrůd brambor. Toto testování zahrnuje asi 50 morfologických znaků (patří mezi ně např. barva slupky, barva dužniny, typ trsu, tvar hlízy, silueta a tvar listů, různé charakteristiky květů atd.). Pro rychlou identifikaci a verifikaci odrůd brambor je však tento postup nedostačující. Proto je zde potřeba moderních přístupů pro charakterizaci registrovaných odrůd (nejen brambor), mezi které patří:

- 1) digitální obrazová analýza pro hodnocení morfologických znaků.
- 2) gelová elektroforéza isoenzymů a bílkovin; biochemické bílkovinné markery (BBM).
- 3) DNA fingerprinting - molekulární markery (BÁRTA 2002).

2.3. Genetické 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 (ČURN, SÁKOVÁ 1996). V současné době jsou využívány genetické markery na úrovni biochemických markerů (bílkovinné markery, isoenzymy a zásobní bílkoviny, mastné

kyseliny, sekundární metabolity) a molekulárních DNA markerů (GRAMAN et al. 1999).

Mezi základní požadavky na genetické biochemické markery patří dostatečná genetická a jí odpovídající fenotypová variabilita. Mezi další požadavky kladené na genetické biochemické markery patří:

- ❖ geneticky fixovaný a stabilní polymorfismus
- ❖ vysoká dědivost
- ❖ nezávislost na vnějších podmínkách
- ❖ vhodný způsob založení (u molekulárních markerů kodominantní založení)
- ❖ absence pleiotropních a epistatických interakcí
- ❖ projev markeru v semeni nebo na úrovni klíčící rostlinky
- ❖ vhodná separační a detekční technika

2.3.1 Charakterizace odrůd brambor pomocí genetických markerů

Pro rychlou identifikaci a verifikaci odrůd brambor existují v současnosti dva přístupy. Prvním z nich jsou bílkovinné markery. Jedná se o zásobní, ve vodě rozpustné bílkoviny, které jsou obsaženy v hlízách brambor. Spektrum bílkovin je odrůdově specifické. Účinnou metodou pro využití těchto markerů je elektroforéza. Bílkoviny extrahované z hlíz se dělí ve stejnosměrném elektrickém poli na gelovém nosiči (polyakrylamid), podle velikosti a tvaru molekuly a také elektrického náboje. Po obarvení gelu lze pozorovat pruhy, jakýsi čárový kód, který je specifický pro danou odrůdu (PTÁČEK et al. 2004).

Druhý přístup je založen na využití DNA markerů. Nejznámější je DNA fingerprinting používaný pro rozlišení různých genotypů, odrůd, či pro determinaci genetické čistoty. Dalším využitím DNA markerů je testování gamet (rodičů), sledování přenosu zajímavých přínosných genů během šlechtění, vyhledávání hospodářsky významných znaků. Velice oblíbenou metodou je PCR, která existuje v mnoha modifikacích. Techniky, u nichž je identifikace genotypu založená již na DNA markerech, jsou techniky RFLP a AFLP. Další účinnou technikou je analýza mikrosatelitních sekvencí nebo též jednoduchých repetitivních sekvencí (SSR). Jedná se o krátké sekvence jednoho až pěti nukleotidů, které se tandemově

opakují a jsou rovnoměrně rozptýleny v eukaryotickém genomu. Tyto sekvence s kodominantní dědičností se vyznačují hojností a polymorfismem, který spočívá ve variabilním počtu repetitivních elementů. Tento přístup je založen na metodě PCR a vyžaduje proto znalost sekvence DNA. Technika RAPD je založena na amplifikaci genomové DNA metodou PCR za použití krátkých oligonukleotidů (obvykle dekamerů) náhodné sekvence. Tato metoda je schopná odhalit polymorfismus i v regiorech DNA, u nichž není známá sekvence, funkce nebo lokalizace na chromozomu. (PTÁČEK et al. 2004). Užití mikrosatelitů (SSR) pro fylogenetické a fingerprintové analýzy u brambor studovali (ASHKENAZI et al. 2001). (McGREGOR et al. 2000) hodnotili navzájem možnosti molekulárních markerů - RAPD, AFLP, ISSR a SSR - pro fingerprinting odrůd brambor na modelovém souboru 39 odrůd. Zjistili, že všechny techniky jsou schopné rozlišit všechny odrůdy tohoto souboru, nicméně jednotlivé techniky se lišily hodnotou tzv. genotypového indexu (pro AFLP GI = 1,0; RAPD GI = 0,53; ISSR GI = 0,47 a pro SSR GI = 0,36), (BÁRTA 2002). Srovnání mezi jednotlivými druhy genetických markerů popisuje Tabulka č.1:

Tab. 1: Porovnání Bílkovinných a DNA markerů

	Bílkovinné markery		DNA markery			
	Isoenzymy	Zásobní bílkoviny	RAPD	SSRs	RFLP	AFLP
Polymorfismus	nízký	vysoký	nízký až vysoký	velmi vysoký	nízký až vysoký	velmi vysoký
Environmentální stabilita	střední	vysoká	vysoká	Vysoká	vysoká	vysoká
Počet lokusů	Střední (<50 lokusů)	nízký (< 10 lokusů)	vysoký	Střední	vysoký	vysoký
Molekulární základ polymorfismu	Jednoduchý	komplexní	komplexní	Komplexní	intermediární	komplexní
Rychlost a cena analýzy	rychlá, střední	rychlá, levná	rychlá, drahá	rychlá, drahá	pomalá, velmi drahá	Rychlá, velmi drahá

Převzato a upraveno podle (POŠVEC, KRULÍČKOVÁ 1999; BÁRTA 2002).

2.4. Charakterizace odrůd brambor biochemickými bílkovinnými markery

2.4.1. Příčiny polymorfismu bílkovin

Polymorfismus bílkovin znamená skutečnost, že u jedinců příslušných ke stejnému biologickému druhu, v jeho tkáních (pletivech), orgánech a dokonce i v různých kompartmentech téže buňky se mohou vyskytovat dvě nebo více bílkovin se stejnou funkcí. Tyto bílkoviny se od sebe odlišují svou strukturou (důsledek řízení různými geny) a také v některých detailních vlastnostech - mnohočetné formy takovýchto bílkovin jsou nazývány isobílkovinami. Jako příklad isobílkovin lze uvést isoenzymy (VODRÁŽKA 1996). Variabilita bílkovin je dána změnami v jejich primární struktuře, počtem prostetických skupin, velikostí a celkovým uspořádáním molekuly, změnami ve velikosti elektrického náboje. Tyto změny způsobují při klasické analýze polymorfismu bílkovin, kterou je elektroforéza na škrobovém, agarózovém nebo akrylamidovém gelu různou rychlost migrace jednotlivých variant, které se vyskytují v rámci téhož systému (ŘEHOUT 2001).

Biochemická variabilita, tj. jak se jednotlivé polymorfní varianty chovají v organismu závisí na míře a charakteru odlišností (ŘEHOUT 2001). Mezi základní typy biochemické variability patří:

1) Variabilita bez detekovatelné změny aktivity – dojde ke změně struktury bílkoviny, avšak její funkčnost v organismu není narušena. Nastává tehdy, když mutace způsobí změnu ve struktuře bílkoviny mimo její aktivní centrum (místo, které determinuje prostorovou strukturu např. vznikem disulfidických můstků, upíná se na něj prostetická skupina apod.)

2) Syntéza strukturálně odlišné bílkoviny s odlišnými vlastnostmi (snížená aktivita). Tento typ biochemické variability je relativně velmi častý. Příčinou je záměna aminokyseliny v aktivním centru nebo jeho blízkosti.

3) Syntéza strukturálně odlišné bílkoviny se stejnými vlastnostmi, ale s nižší stabilitou. Důsledkem je nižší množství bílkoviny.

4) Změna kvantity syntetizovaného genového produktu, způsobená mutací na regulačním signálu příslušného genu, struktura bílkoviny není změněna.

5) Mutace jiného genu, který modifikuje aktivitu bílkoviny.

6) Nepřítomnost bílkoviny – došlo k mutaci, která blokuje tvorbu bílkoviny.

Zajímavým případem polymorfismu bílkovin je vznik tzv. hybridních bílkovin. Může k němu docházet tehdy, je-li bílkovina dimerem nebo polymerem (ŘEHOUT 2001).

2.4.2. Základní charakteristika biochemických bílkovinných markerů (BBM)

Bílkoviny mohou velmi dobře splňovat kritéria pro BBM, neboť se vyznačují vysokým stupněm geneticky fixovaného polymorfismu, kodominantní dědičností, rozlišitelností alel v individuích, jistou mírou nezávislosti na vnějších podmínkách. Vhodné tak mohou být zásobní bílkoviny a isoenzymy (molekulární formy enzymů). V principu všechny bílkoviny vykazující genetický polymorfismus, mohou být využity jako diferenční markery u odrůd, a to s větším efektem než klasické morfologické markery (SÝKOROVÁ, HADAČOVÁ 1992).

2.4.3. Možnosti charakterizace odrůd brambor pomocí bílkovinných markerů

Zásobní bílkoviny nebo různé molekulární formy enzymů – isoenzymy, se mohou také uplatnit jako markery. Vykazují genetický polymorfismus, kodominantní dědičnost, rozlišitelnost alel v individuích, nezávislost na vnějších podmínkách. Proto mohou být využity jako diferenční markery a to s mnohem větším efektem než klasické morfologické znaky (NIELSEN 1985).

Možnosti rychlé identifikace odrůd brambor jsou zkoumány již několik desetiletí. Mezi prvními, kteří se zabývali rychlou identifikací odrůd brambor pomocí elektroforetických technik byli v 60. letech Desborough a Peloquin (SÝKOROVÁ, HADAČOVÁ 1992). Jako genetické markery využili rozpustné bílkoviny hlíz brambor (DESBOROUGH, PELOQUIN 1966), dále enzymové systémy, např. EST (DESBOROUGH, PELOQUIN 1967) a kombinace

bílkovin EST a PER (DESBOROUGH, PELOQUIN 1968). V další práci OLIVER, MARTÍNEZ – ZAPATER (1985) ze zkoušených 25 isoenzymových systémů vybrali vhodné sedm (EST, PER, PGI, GOT, ADH, PGM, 6-PGD), které umožnily na základě analýzy klusterů isoenzymů rozlišit 74 severoamerických odrůd brambor. NIETO et al. (1990) vypracovali identifikační test 50 odrůd brambor obchodovaných ve Španělsku založený na spektrech isoenzymů peroxidáz po separaci PAGE a IEF. Techniku SDS-PAGE pro analýzu bílkovinných spekter 119 linií bramborových mikrohlízek použili RAJAPAKSE et al. (1991).

V České republice se studiem variability odrůd brambor pomocí biochemických bílkovinných markerů zabývalo hned několik autorů. BÁRTA et al. (2003) se zabývali studiem biochemické variability 13 zahraničních a 5 českých odrůd brambor pomocí elektroforetických spekter rozpustných bílkovin izoesteráz a izoperoxidáz. Využitím bílkovin a enzymů brambor jako genetických markerů pro genetické analýzy, šlechtění, identifikaci odrůd a kontrolu odrůdové pravosti v obchodu se zabývala SÝKOROVÁ (1999). Metodiku použití polyakrylamidové gelové elektroforézy hlízových bílkovin a enzymů za účelem charakterizace odrůd brambor rovněž obsahuje směrnice organizace UPOV z roku 2002 – TG/23/6 (PROJ.1).

2. 5. Charakteristika hlízových bílkovin

Hlízové bílkoviny tvoří spolu s aminokyselinami, amidy, různými bázemi a anorganickými sloučeninami komplex dusíkatých látek bramborových hlíz (JŮZL et al. 2000). Obsah dusíkatých látek včetně bílkovin v hlízách brambor závisí především na odrůdě, hnojení, agrotechnických a klimatických podmínkách (SHEWRY 2003). Podíl čisté bílkoviny v obsahu dusíkatých látek může kolísat pod vlivem výše zmíněných faktorů v rozpětí od 34 do 70% (SHEWRY 2003).

2.5.1. Klasifikace hlízových bílkovin

V minulosti se upřednostňovala klasifikace hlízových bílkovin podle rozpustnosti – rozdělení na albuminovou, globulinovou, prolaminovou a glutelinovou frakci. S rozvojem elektroforetických a chromatografických technik koncem 60. let začala být preferována a v současné době převažuje klasifikace bílkovin podle molekulové hmotnosti. Na jejím základě se hlízové bílkoviny dělí na tři hlavní skupiny (POTS et al. 1999a):

1. patatin (též patatinový komplex, rodina patatinových bílkovin);
2. bramborové inhibitory proteas;
3. ostatní bílkoviny (hlavně bílkoviny s enzymovou účastí na syntéze škrobu).

2.6. Rodina patatinových bílkovin

Glykoprotein patatin tvoří 20–40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz, ale byl uveden ještě vyšší podíl – až 60 %. Patatin je v nativní formě považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 80 kDa, resp. 88 kDa (BÁRTA, ČURN 2004). Patatinový komplex představuje skupinu imunologicky identických glykoproteinů s původně zjištěnou molekulovou hmotností 40 000 Da (SHEWRY 2003). Později bylo zjištěno, že patatin je pravděpodobně in vivo syntetizován jako „větší“ prekurzor s molekulovou hmotností 43 kDa a následně je upravován odštěpením signálního peptidu, který je tvořen 23 aminokyselinami (MIGNERY et al. 1984). V novějších publikacích je uváděna molekulová hmotnost těchto bílkovin v rozmezí 40 – 43 kDa (POTS et al. 1999a).

2.6.1. Fyziologické vlastnosti a genová exprese

Patatin je zřejmě přítomný ve vakuolách parenchymu ve všech odrůdách brambor (BÁRTA, ČURN 2004). Vzhledem k vysoké akumulaci v hlízách je považován za zásobní bílkovinu (TONÓN et al. 2001). Potvrzuje to i skutečnost, že v průběhu skladování hlíz a při jejich klíčení dochází k postupnému snižování obsahu této bílkoviny (POTS et al. 1999a). V listech, stoncích a kořenech se vyskytuje pouze ve stopových množstvích, což je charakteristické pro zásobní bílkoviny (SHEWRY 2003). Z hlediska genové exprese existují dvě třídy genů kódující patatinové bílkoviny (BÁRTA, ČURN 2004). Multigenová rodina třídy I je exprimována výhradně v hlízách (v 50 – 100 krát vyšších hladinách), zatímco multigenová genová třídy II je exprimována v nízkých hladinách v celé rostlině. V práci (TWELL, OOMS 1988) se uvádí, že počet kopií „patatinového“ genu na haploidní genom je 10 – 18 v závislosti na odrůdě (BÁRTA 2002).

2.6.2. Rozdíly v molekulové hmotnosti patatinu

Pomocí vysoce přesné analytické techniky k určování molekulové hmotnosti bílkovin (MALDI-TOF MS) bylo zjištěno, že patatin u odrůdy Bintje (40,4 a 41,7 kDa) a Desiree (41,9 a 42,9 kDa) se skládá ze dvou isomerů o různé hmotnosti. Rozdíly mezi hmotnostmi jsou přibližně 1,3 kDa (Bintje) a 1 kDa (Desiree). Patatin může mít jedno, dvě nebo tři glykosylační místa. Navázání sacharidové části na bílkovinnou část makromolekuly je uskutečněno prostřednictvím dvou zbytků asparaginu v pozicích 60. a 90. aminokyseliny od *N*-konce řetězce. Navázání sacharidové části na jedno glykosylační místo může změnit relativní hmotnost patatinu o 1,2 kDa (viz. Tab. 2). Podíl sacharidové části patatinu tak může činit od 2,9% do 5,5% z relativní hmotnosti makromolekuly (POTS 1999b). Rozdíly v molekulové hmotnosti patatinu způsobené navázáním sacharidové části na bílkovinu ukazuje Tabulka č. 2.

2.6.3. Biochemické vlastnosti

Přestože jsou jednotlivé isoformy patatinu imunologicky identické, byla mezi nimi na úrovni odrůd zjištěna nábojová heterogenita (BÁRTA, ČURN 2004). Při elektroforetické separaci bílkovin hlíz (SDS-PAGE) může být v patatinové oblasti zjišťován rozdílný počet pruhů. Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových isoform s podobnou

hodnotou *pI* a přibližnou molekulovou hmotností monomeru 40 kDa (BÁRTA, ČURN 2004). Isoformy patatinu, detailně studované u odrůdy Bintje (Tab. 3.), byly rozděleny do čtyř skupin A, B, C, D, přičemž isoforma A zaujímala 62 %, isoforma B 26 % a isoformy C a D zaujímaly 5 % a 7 % (POTS et al. 1999c). Biochemické vlastnosti rodiny patatinových bílkovin a isoformem A, B a D u odrůdy Bintje jsou uvedeny v Tabulce č.3.

Tab. 2: Molekulová hmotnost (kDa) vypočtená z primární sekvence patatinu (Mingnery et al., 1984; Stiekama et al., 1988) bez sacharidového řetězce a s 1, 2 nebo 3 sacharidovými řetězci o přibližné hmotnosti 1,2 kDa.

	Molekulová hmotnost patatinu (kDa)			
	bez sacharidového řetězce	s 1. sacharidovým řetězcem	se 2. sacharidovými řetězci	se 3. sacharidovými řetězci
Stiekama et al., 1988	39,8	40,9	42,1	43,3
Mingnery et al., 1984	39,5 39,6	40,7 40,8	41,9 42,0	43,0 43,2

Převzato a upraveno dle (POTS 1999b).

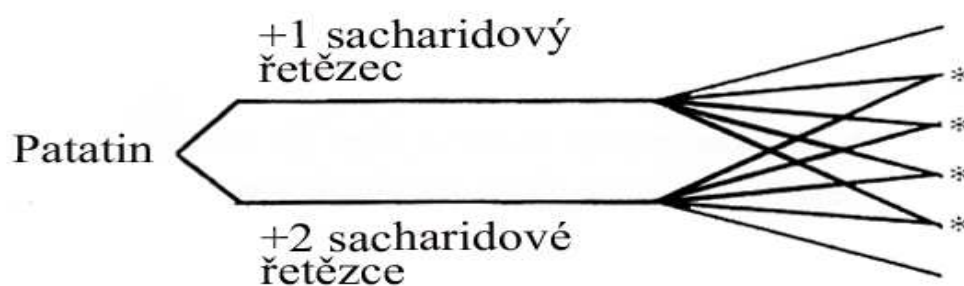
Tab 3: Biochemické vlastnosti rodiny patatinových bílkovin a isoformem A, B a D u odrůdy Bintje

Analytická technika	Rodina patatinových bílkovin	Isoforma		
		A	B	D
SDS – PAGE	43 kDa	43 kDa	43 kDa	43 kDa
IEF	6 pruhů, pH 4,6 - 5,2	2 pruhy, pH 5,0 - 5,2	2 pruhy, pH 4,6 – 4,7	1 pruh, pH 4,7
PAGE (nativní elektroforéza)	2 pruhy	1 pruh (horní)	1 pruh (dolní)	1 pruh (dolní)
MALDI TOF -MS ^a	40 354 Da	40 405 Da	40 330 Da	40 473 Da
	41 590 Da	41 631 Da	41 599 Da	41 703 Da
LAH - aktivita ^b	3,72 ± 0,14	3,66 ± 0,08	3,55 ± 0,12	3,80 ± 0,14

^a MALDI TOF – MS měření bylo provedeno ve třech opakováních; ^b specifická aktivita v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ bílkoviny ± standardní odchylka. Převzato od (BÁRTA, ČURN 2004)

Závěrem lze tedy konstatovat, že patatin se skládá ze dvou hmotnostních isomerů, jež mohou být dále rozděleny dle různých isoform, nepatrně se lišících primární sekvencí (obr. 1). Je velice pravděpodobné, že tyto isoformy mají podobné bodové mutace (POTS 1999b).

Obr. 1 Symbolické znázornění rodiny patatinových bílkovin



* Isoformy vykazující podobnosti v úrovni náboje. Převzato a upraveno dle (POTS 1999b)

2.7. Inhibitory proteas

Kvantitativně neméně významnou skupinou bílkovin bramborových hlíz jsou inhibitory proteas. Inhibitory proteas jsou termostabilní bílkoviny o molekulové hmotnosti od 3 do 23 kDa (vyjma inhibitorů proteas o molekulové hmotnosti od 36 do 85 kDa), bohaté na cystein, jež hrají významnou roli v obraných mechanismech brambor. Inhibitory proteas představují 20 – 30 % extrahovatelných bílkovin hlíz brambor a jsou děleny do tří podtříd (POVREAU et al. 2001). Podtřída I. mimo jiné obsahuje bílkovinu s molekulovou hmotností 8,1 kDa, podtřída II. obsahuje bílkovinu s molekulovou hmotností 12,3 kDa a III. podtřída obsahuje inhibitory proteas o různé molekulové hmotnosti (BÁRTA, ČURN 2004). POVREAU et al. (2001) analyzovali inhibitory proteas u odrůdy Elkana a došli k překvapujícímu závěru, že reprezentují asi 50% celkových rozpustných bílkovin hlízové šťávy. Po provedené purifikaci klasifikovali proteasové inhibitory hlíz do sedmi odlišných skupin (POVREAU et al. 2001; KONINGSVELD 2001):

- bramborový inhibitor I (PI-1),
- bramborový inhibitor II (PI-2),
- cystein proteasový inhibitor (PCPI)
- asparátový proteasový inhibitor (PAPI)
- proteasový inhibitor typu Kunitz (PKPI)
- ostatní serinové inhibitory (OSPI)
- bramborové inhibitory karboxypeptidáz (PCPI)

Oproti rodině patatinových bílkovin jsou inhibitory proteas více různorodou skupinou bílkovin. Nejpočetnější skupinu tvoří inhibitory Kunitzova typu, které představují přibližně 44% ze všech bramborových inhibitorů proteas (POVREAU 2004). Přehled hlavních typů inhibitorů proteas ukazuje Tabulka č.4.

Tab.4 Přehled hlavních typů inhibitorů proteas v hlízách brambor

Typy inhibitorů proteas	molekulová hmotnost (kDa)	počet podjednotek	podtřída inhibitoru poteáz
<u>Serinové inhibitory proteas</u>			
Kunitz typ	21 - 23	1	III.
Bramborový inhibitor I (PI-1)	40	4-5	I.
Bramborový inhibitor II (PI-2)	20 - 21	2	II.
<u>Cysteinové inhibitory proteas</u>			
Multicystatins	85	1	
Kunitz typ	20 - 21	1	II.
<u>Asparátové inhibitory proteas</u>			
Kunitz typ	19,9 - 22	1	III.
<u>Metaloproteasové inhibitory</u>			
Bramborový inhibitor karboxypeptidáz	4	1	III.

Převazato a upraveno dle (POVREAU 2004)

2.7.1. Genová exprese

Jak již bylo uvedeno, jedním z nejznámějších inhibitorů proteas brambor je inhibitor typu Kunitz o $M_r = 22$ kDa, který se syntetizuje jako preprotein o $M_r = 27$ kDa. Přítomnost preproteinové formy byla nejpočetnější v poraněných listech (lokální odpověď) a dále také v neporaněných listech (systemická odpověď) – tzn. zřejmě v místě poranění ve smyslu lokální odpovědi rostlin, ale i ve neporaněných tkáních rostliny ve smyslu systémové odpovědi rostliny. S využitím protilátky proti zralé formě byly v hlízové bílkovině detekovány bílkoviny v rozmezí 22 – 24 kDa, zatímco v listech poraněných listů byly detekovány bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností (27 – 28 kDa). Z uvedeného vyplývá, že genová exprese rodiny inhibitorů brambor o $M_r = 22$ kDa (Kunitz typ) je pod diferencovanou posttranslační kontrolou v závislosti na místě výskytu (listy, hlízy) (BÁRTA, ČURN 2004)

2.8. Ostatní bílkoviny

Do této skupiny hlízových bílkovin jsou zařazovány všechny bílkoviny, jež nepatří do patatinové rodiny nebo nevykazují aktivitu inhibitorů proteas. POVREAU et al. (2001) rovněž analyzovali tyto bílkoviny u odrůdy Elkana a došli k závěru, že reprezentují asi 12% celkových rozpustných bílkovin hlízové šťávy. Do této skupiny patří především bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností, např.: lektin (65,5 kDa), enzymy účastnící na syntézy škrobu (140 kDa), isoenzymy fosforyláz (180 – 600 kDa), protein kinázy a další (POVREAU et al. 2004).

2.9. Elektroforetické metody

Elektroforetické separační metody jsou založeny na nestejně pohyblivosti elektricky nabitých částic v jednosměrném elektrickém poli. Míra pohyblivosti (mobility) částice závisí na gradientu napětí, na velikosti „čistého“ náboje částice, velikosti částice, jejím tvaru, na iontové síle, viskozitě a teplotě média, ve kterém se molekuly pohybují a v případě gelové elektroforézy i na případných interakcích mezi nosičem a částicí (ANDREWS 1993; ANONYM 3. 1994).

2.9.1. SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pokud chceme porovnávat molekuly výlučně jen podle jejich velikosti, můžeme použít elektroforézu na polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS) k dělené směsi. SDS – PAGE je jedna z nejkompexnějších a nejpoužívanějších metod pro analýzu bílkovin, protože může být použita k separaci různých typů bílkovin, včetně těch, které jsou nerozpustné ve vodě (ALBERTS et al. 2004). Tato technika je založena na přítomnosti aniontového detergentu (SDS), který se v dělicím systému SDS-PAGE pevně váže k bílkovinám, vytváří komplex SDS-protein. Touto interakcí dochází jednak k denaturaci kvartérní struktury na jednotlivé podjednotky a jednak k překrytí vlastních nábojů proteinů negativním nábojem detergentu. Vazbou SDS na bílkovinu získává celý komplex válcovitou podobu. Většina bílkovin váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4g SDS/g bílkoviny, což odpovídá zhruba jedné molekule na dva aminokyselinové zbytky. Z výše uvedeného vyplývá, že proteiny pokryté SDS mají shodné poměry nábojů ke své hmotnosti (délce) a podobný tvar

(BÁRTA 1997). Následkem toho se při elektroforéze v gelech obsahujících SDS dělí bílkoviny působením gelové filtrace na základě své molekulové hmotnosti (ANDREWS 1993; WESTERMEIER 1993). Porovnání SDS-PAGE s ostatními elektroforetickými technikami a možnostmi aplikace poskytuje (Tab. č. 5) na následující straně.

Tabulka. 5 Přehled nejčastěji používaných elektroforetických technik a jejich aplikace

aplikace	PAGE HB	PAGE MPB	SDS- PAGE	PGGE	2D- PAGE	IEF	Acetyl Cel.	SGE
analýza neznámé směsi	•	•	•	•	•	•		•
porovnání známého a neznámého vzorku	•	•	•	•		•		
membránové bílkoviny	•	•	•	•				
Testování čistoty (homogenity) vzorku	•	•	•	•				
určení molekulové hmotnosti	•		•	•				
isoenzymová analýza	•	•		•			•	•

Převzato od BÁRTA (2002)

2.10. Vyhodnocování genetických markerů

Významný je také způsob vyhodnocování získaných elektroforetických dat a způsob jejich interpretace. Výsledné spektrum proužků na gelu se nazývá elektroforetický fenotyp. Tento fenotyp je značně proměnlivý ve své komplexitě, závisí na řadě faktorů, např. druhu organismu, tkáni, analyzovaného enzymu nebo bílkoviny. V některých případech je tvořen pouze jedním nebo několika nevariabilními proužky, totožnými ve všech vzorcích. Naopak některé enzymy mohou být kódovány více geny a zobrazují se pak jako komplexní fenotyp s 15 – 20 i více proužky u jednoho jedince. Následující faktory se považují za primární determinanty počtu pozorovaných proužků: počet kódujících genů, jejich alelický stav (homozygotní nebo heterozygotní), (WENDEL, WEEDEN 1989).

2.10.1. Vyhodnocování získaných elektroforeogramů

Pro vyhodnocování výsledků po elektroforéze je používána řada metod. Mezi jednodušší metody vhodné při malém množství analyzovaných vzorků a malém množství proužků je ruční proměření gelů a stanovení relativní pohyblivosti jednotlivých isoenzymů nebo bílkovinných pruhů. R_f (relativní pohyblivost) se zjistí jako poměr vzdálenosti sledovaného pruhu a čela elektroforézy od startu. Pozici proužků lze i graficky znázornit (GRAMAN et al. 1995). Získané R_f jsou uváděny ve formě tabulek nebo grafů, ve většině případů je při vyhodnocování výsledků používáno jen kvalitativní kritérium (přítomnost, resp. nepřítomnost pruhu). Získaná data je možné dále statisticky zpracovat. Výsledkem je pak výpočet podobností (dle různých algoritmů, závislých na použité metodě výpočtu), uspořádání koeficientů podobnosti matice a pomocí clusterové analýzy uspořádání dat do formy dendogramu (ČURN, SÁKOVÁ 1999).

2.10.2. Digitální obrazová analýza gelů

Poměrně dokonalých výsledků lze dosáhnout po důkladnější obrazové analýze gelů. Pro počítačové zpracování elektroforeogramů, bílkovinných a isoenzymových spekter získaných po elektroforéze, je používán barevný stolní scanner s vysokou rozlišovací schopností a speciální software - např. GelManager nebo BioProfil 1D++.

Tyto programy jsou určeny zejména pro analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňuje konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány. Využití má zejména v epidemiologických studiích, identifikaci genotypů, systematice, ekologii, populační genetice, klinické biochemii a biotechnologických aplikacích (ČURN, SÁKOVÁ 1999). Digitální obrazovou analýzu s využitím programu BioProfil 1D++ použili DVOŘÁČEK a ČURN (2003) při hodnocení bílkovinných frakcí jako biochemických markerů pro identifikaci odrůd pšenice špaldy.

2.10.3. Clusterová analýza

Celkem přehledným a ilustrativním výsledkem analýzy spekter je možnost seskupení (sgrupování) podobných spekter na základě výpočtu podobnostní matice – koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice jsou pak podrobeny clusterové analýze a výsledky zobrazeny jako dendrogram (GRAMAN et al.

1995). Dendrogramy pak vyjadřují míru podobnosti mezi jednotlivými analyzovanými spektry, resp. skupinami spekter. Na ose x je udávána míra podobnosti nebo korelace (od 0,0 do 1,0). Spektra s korelací nad 0,9 jsou obecně nerozlišitelná v případě, že vzorky budou separovány na jednom gelu (ČURN, SÁKOVÁ 1999). Vyhodnocování gelů s využitím UPGMA clusterové analýzy je rovněž často využívanou metodou pro studium biochemické variability odrůd brambor. Tento způsob vyhodnocování brambor využili např. KORMUŤÁK et al. (1999) a BÁRTA et al.(2003).

3. Cíl práce

Cílem práce bylo posoudit vhodnost techniky SDS-PAGE bílkovinných profilů hlíz pro její potencionální využití při charakterizaci odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.). Hlavní úkoly práce byly zaměřeny na:

- zhodnocení použitých analytických technik
- vyhodnocování variability obou skupin zásobních bílkovin hlíz
- porovnání metod vyhodnocování gelů

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál pro charakterizaci spekter hlízových bílkovin technikou SDS - PAGE

Jako výchozí materiál byly pro uvedený cíl získány hlízy brambor s deklarovanou odrůdovou příslušností z ÚKZÚZ v Brně, pracoviště Hlavní odrůdové zkušebny brambor Lípa u Havlíčkova Brodu. Přehled s charakteristikou vybraných odrůd poskytuje Tabulka č.6:

Tab. 6: Základní charakteristika hodnocených odrůd brambor

Jméno odrůdy	Kódové označení	Rodičovská kombinace	Rannost	Držitel šlechtitelských práv, země původu	Užitkový směr
Rebel	2 / L2	ROESLAU x G 33/75	Raná	Vesa Velhartice, šlechtění a množení brambor, a.s., Kolinec, ČR	Škrobnaté
Agria	3 / L3	QUARTA x SEMLO	Poloraná	AGRICO B.A., Emeloord, NL	Smažené + konzumní
Bettina	4 / L4	NEUVEDENO	Poloraná	EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH, Lüneburg, D	Smažené + konzumní
Bolesta	5 / L5	BM 1345-77 x AGRIA	Poloraná	AGRICO B.A., Emeloord, NL	Konzumní
Filea	6 / L6	CINJA x STAMM 77/300	Poloraná	Nordkartoffel-Zuchtges.mbH, Lüneburg, D	Konzumní
Granola	7 / L7	3333/60 x 267.04	Poloraná	SAKA-RAGIS Pflanzenzucht GbR, Hamburg, D	Konzumní
Lenka (Ditta)	8 / L8	BINTJE x QUARTA	Poloraná	N.Ö. Saatbaugenossenschaft reg. Gen.m.bH., Windigsteig, A	Konzumní
Milva	9 / L9	DUNJA x NENA	Poloraná	Nordkartoffel-Zuchtges.mbH, Lüneburg, D	Konzumní
Provento	10 / L10	ELVIRA x ESCORT	Poloraná	AGRICO B.A., Emeloord, NL	Konzumní
Quarta	11 / L11	114/67 x Off.65/42	Poloraná	Kartoffelzucht Böhm, KG, Lüneburg, D	Smažené + konzumní
Redstar	12 / L12	BILDSTAR x VDW 76-30	Poloraná	HZPC Holland B.V., Joure, NL	Smažené + konzumní
Remarka	13 / L13	EDZINA x SVP AM 66-42	Poloraná	HZPC Holland B.V., Joure, NL	Smažené + konzumní
Amylex	14 / L14	ZVÍKOV x 126/11-67	Polopozdní	Selekta Pacov, a.s, Pasov	Škrobnaté
Apolena	15 / L15	NORA x SIRA	Polopozdní	Vysočina Vyklantice, a.s., Vyklantice, ČR	Lupínky
Asterix	16 / L16	CARDINAL x Svp. VE 70-9	Polopozdní	HZPC Holland B.V., Joure, NL	Smažené + Konzumní
Bionta	17 / L17	FRANZI x GRANOLA	Pozdní	N.Ö. Saatbaugenossenschaft reg. Gen.m.bH., Windigsteig, A	Konzumní
Kuras	18 / L18	PG 285 x AR 69-491	Velmi pozdní	AGRICO B.A., Emeloord, NL	Škrobnaté
Lady Rosetta	19 / L19	CARDINAL x VTN 62-63-3	Polopozdní	Meijer Seedpotatoes and Research B.V., Kruiningen, NL	Škrobnaté
Marena	20 / L20	1325/77/2620 x AGRIA	Pozdní	Kartoffelzucht Böhm, KG, Lüneburg, D	Konzumní
Markies	21 / L21	FIANNA x AGRIA	Pozdní	AGRICO B.A., Emeloord, NL	Konzumní

Převzato a upraveno dle (MED 2005; ANONYM 1. 2002; ANONYM 2. 2004)

4.2. Metodika charakterizace hlízových bílkovin pomocí elektroforetické techniky SDS - PAGE

4.2.1. Příprava vzorků

Hlízy byly důkladně omyty, usušeny, zmraženy a po jejich opětovném rozmrazení z nich byla získána šťáva z celého jejich profilu. K 5 ml šťávy bylo přidáno 100 µl konzervantu ($\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a poté byla provedena centrifugace (5 minut, při 6 000 ot./min, při 4°C), supernatant byl použit k denaturační extrakci bílkovin. Od každé odrůdy byla provedena extrakce ze 4 hlíz.

4.2.2. Extrakce bílkovin

200 µl centrifugované hlízové šťávy, bylo promícháno v mikrocentrifugační tubě (1,5 ml) spolu s 200 µl extrakčního pufru (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5 % 2-merkapt ethanol, 2 % SDS). Směs byla ponechána po dobu 4 hodin při teplotě 4°C. Po centrifugaci (3 min. při 14 000 g) byl čirý supernatant (200 µl) přenesen do nové mikrocentrifugační zkumavky s 50 µl 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 µl pufru se těsně před použitím přidá 170 µl 2-merkapt ethanolu). Před nanesením na gel v množství 10 µl byly vzorky 2 minuty vařeny ve vodní lázni.

4.2.3. Elektroforetická separace (SDS-PAGE)

Pro vlastní elektroforetickou separaci byla použita 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. 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. 7: Složení roztoků pro diskontinuální SDS-PAGE (denaturační systém).

komponenta	jednotka	SEPARAČNÍ GEL (10 %)	ZAOSTŘOVACÍ 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		
elektrodový pufr:	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 pufry	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		
elektrodový pufr	připravovat jako 10 x koncentrovaný roztok, uchovávat ve tmě a v chladnu		

Převzato od BÁRTA 2005 (nepubl.)

4.2.4. Detekce separovaných bílkovin na gelu

Detekce bílkovin byla provedena barvením roztokem Coomassie Brilliant 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 nesespecifické 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.

4.2.5. Zpracování elektroforetických dat

Elektroforetická spektra (profily) bílkovin byla zpracována prostřednictvím digitální obrazové analýzy. Proces probíhal v následujících krocích:

1) Transformace dat - z gelu do elektronické podoby prostřednictvím stolního scanneru (při 200 dpi).

2) Úprava primárního záznamu - úprava pozadí, volba vhodné velikosti obrazu, volba formátu (TIFF), transformace do stupňů šedi a následná inverze (úprava pro software BIO 1D++ (BioProfil) - pomocí programu Adobe Photoshop ver. 7).

3) Vlastní hodnocení bylo provedeno:

a) pomocí speciálního software Bio 1D++ (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; konfidenční interval 3%), výstupem je matice podobnostních koeficientů nebo dendrogram (VILBER LOURMAT, 1999).

b) Vizuálním vyhodnocením jednotlivých spekter založeném na stejném principu jako v bodě a) – hodnotí se přítomnost (1) či nepřítomnost (0) pruhu v konkrétní pozici na gelu a výstupem je matice. Takto získaná matice je dále statisticky zpracována clusterovou analýzou pomocí software: STATISTICA (verze. 6) - (Algoritmus: unweighted pair-group average; percent disagreement – procenta nepodobnosti), nebo MVSP (verze 3.1) - (Algoritmus:

unweighted pair-group average; percent similarity – procenta podobnosti). Výstupem je matice podobnostních koeficientů a dendrogram. Při vyhodnocování programem STATISTICA je tabulka statistických koeficientů procent nepodobnosti za účelem lepšího porovnání transformována. Transformování se provede odečtením čísla 1 od hodnoty koeficientů vypočtených statistickým algoritmem UPGMA - percent disagreement. Výsledky se poté vynásobí hodnotou -100 .

5. Výsledky

5.1. Charakterizace bílkovinných profilů hlíz programem Bio 1D++(BioProfil)

5.1.1. Základní údaje k pokusu

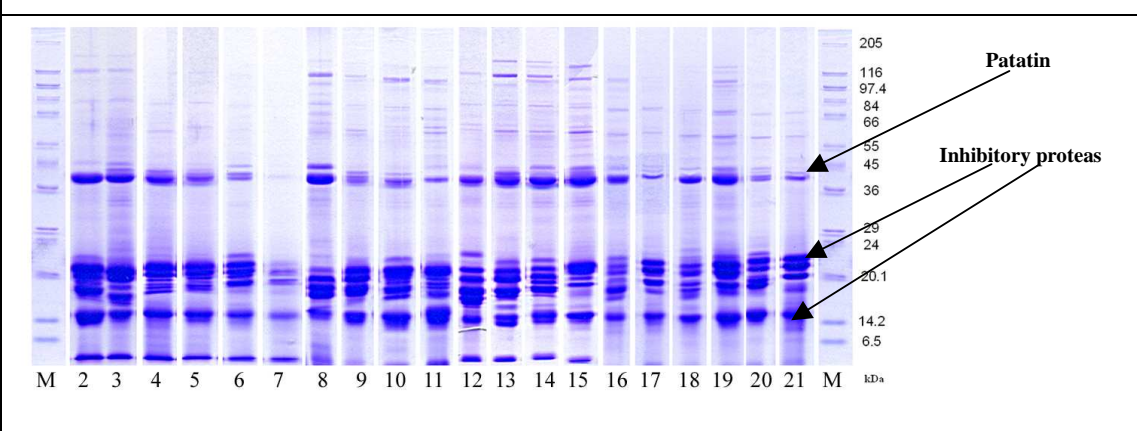
- **První krok** – nejprve se vyhodnotí variabilita obou skupin hlízových bílkovin (patatinový komplex; inhibitory proteas) dohromady pomocí programu BIO 1D++ (BioProfil). Stanoví se molekulové hmotnosti hlízových bílkovin a jejich relativní elektroforetická mobilita. Dále se vytvoří tabulka podobnostních koeficientů a dendrogram odrůd.
- **Druhý krok** – v dalším kroku se vyhodnotí variabilita hlízových bílkovin pro oblast inhibitorů proteas (6 – 24 kDa). Vytvoří se tabulka podobnostních koeficientů mezi odrůdami a dendrogram odrůd.
- **Třetí krok** – nakonec se vyhodnotí variabilita hlízových bílkovin v oblasti patatinového komplexu (39 – 44 kDa). Vytvoří se tabulka podobnostních koeficientů mezi odrůdami a dendrogram odrůd.

5.1.2. Zhodnocení variability bílkovinných profilů hlíz programem BIO 1D++ (BioProfil)

Výsledek elektroforetické separace pomocí SDS – PAGE u zvolených odrůd znázorňuje (Obr.3). Na obrázku je patrné spektrum zásobních bílkovin v obou sledovaných oblastech. Horní šipka označuje patatin, který se u zvolených odrůd nachází přibližně v oblasti 40 – 43 kDa. Inhibitory proteas (zbývající šipky) se u testovaných odrůd nacházejí v oblasti o přibližné hmotnosti 10 – 24 kDa. Ze získaných bílkovinných profilů (Obr. 4) byla pomocí softwaru BIO 1D++ (BioProfil) vypočtena molekulová hmotnost a relativní elektroforetická mobilita zásobních bílkovin hlíz v obou sledovaných oblastech (Tab.8, Tab.9).

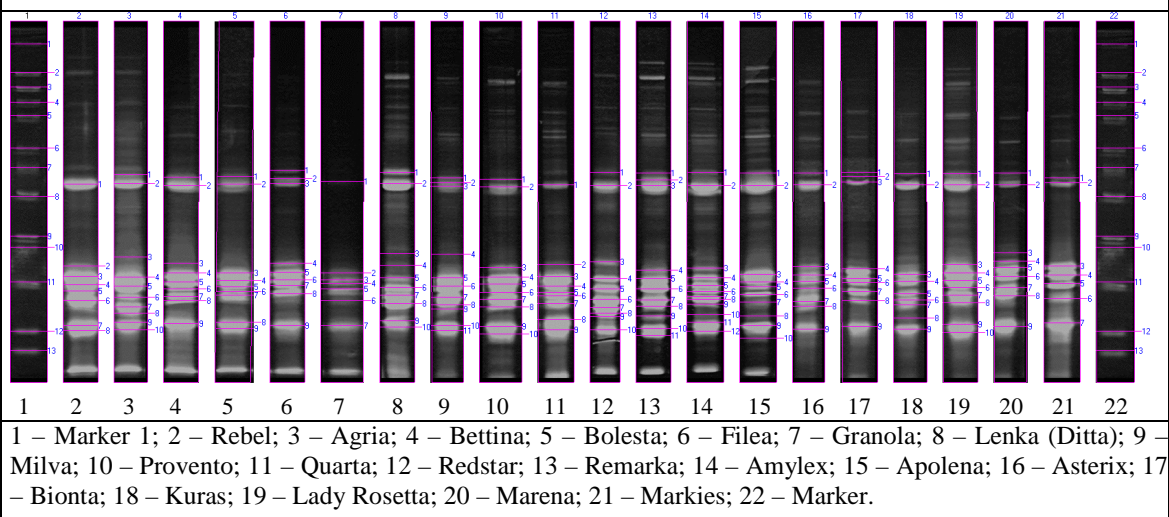
Při společném vyhodnocování obou oblastí měla nejnižší počet pruhů odrůda Granola a Markies (6). Naopak nevyšší počet pruhů byl zaznamenán u odrůdy Amylex (12). Genetickou podobnost mezi hodnocenými odrůdami na úrovni obou sledovaných oblastí vyjadřuje matice s koeficienty podobnosti (Tab. 10) a dendrogram (Obr. 5). Míra genetické podobnosti se mezi jednotlivými odrůdami pohybuje přibližně kolem 80 %. Nevyšší míra genetické podobnosti činila 100% (Agria – Redstar; Bettina – Asterix). Žádná z dvojice odrůd, vykazující stoprocentní míru vzájemné genetické podobnosti neměla společného rodiče a zároveň nepocházela od stejné šlechtitelské firmy (Tab.6, Obr.8, Obr.9). Nejnižší míra genetické podobnosti mezi odrůdami činila 59% (odrůdy Agria – Granola), (Tab.10).

Obr. 3: Výsledek elektroforetické separace hlízových bílkovin technikou SDS-PAGE



M - hmotnostní marker; 2 – Rebel; 3 – Agria; 4 – Bettina; 5 – Bolesta; 6 – Filea; 7 – Granola; 8 – Lenka (Ditta); 9 – Milva; 10 – Provento; 11 – Quarta; 12 – Redstar; 13 – Remarka; 14 – Amylex; 15 – Apolena; 16 – Asterix; 17 – Bionta; 18 – Kuras; 19 – Lady Rosetta; 20 – Marena; 21 – Markies. M- hmotnostní marker.

Obr. 4: Bio profil získaných spekter hlízových bílkovin – slouží k výpočtu molekulových hmotností



Tab. 8: Molekulové hmotnosti hlízových bílkovin dle sledovaných oblastí; první skupina - patatinový komplex (39 – 44 kDa); druhá skupina - inhibitory proteas (6 – 24 kDa).

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
1	205.000	39.218	42.484	41.508	41.749	43.986	40.102	43.231	41.268	40.795	39.004	43.231	42.981	43.231	42.981	42.981	43.231	42.732	42.732	42.981	41.268	205.000
2	116.000	21.613	39.434	38.794	39.218	41.030	20.868	39.434	39.654	38.385	21.774	38.794	40.562	38.794	38.794	39.004	41.749	39.004	39.004	39.004	39.654	116.000
3	97.400	20.542	22.718	21.939	20.868	39.434	20.254	23.170	38.588	21.455	20.542	22.108	38.794	21.378	20.733	21.533	39.877	20.733	21.774	23.261	21.613	97.400
4	84.000	19.919	20.481	20.868	20.201	21.939	20.006	21.693	23.079	20.481	19.836	20.364	21.152	20.422	20.100	20.668	21.301	20.149	20.868	22.193	20.668	84.000
5	66.000	19.575	19.836	20.100	19.797	20.337	19.683	20.422	20.422	19.962	19.505	19.683	20.364	19.877	19.797	20.149	20.364	19.435	20.201	21.455	20.006	66.000
6	55.000	19.052	19.253	19.683	19.540	20.254	19.052	19.758	19.836	19.505	19.327	19.136	19.683	19.540	19.399	19.720	20.052	19.095	19.758	20.542	19.176	55.000
7	45.000	15.722	18.596	19.291	19.363	19.877	15.722	19.363	19.253	19.136	18.868	18.534	19.095	19.291	18.963	19.009	19.540	18.765	19.363	19.758	16.347	45.000
8	36.000	14.412	17.945	19.052	16.490	19.435		18.868	18.765	18.596	17.015	17.945	18.654	19.136	17.571	18.654	19.052	17.250	18.917	19.327		36.000
9	29.000		16.490	16.199	15.009	15.722		16.762	18.404	15.552	14.617	17.468	17.571	18.818	15.722	14.816	15.552	14.816	16.045	15.552		29.000
10	24.000		14.617					15.377	15.722	13.292		14.617	15.009	17.765	11.768				13.758			24.000
11	20.100								14.412				12.803	16.490								20.100
12	14.200													14.200								14.200
13	6.500																					6.500

L1 – Marker 1; L2 – Rebel; L3 – Agria; L4 – Bettina; L5 – Bolesta; L6 – Filea; L7 – Granola; L8 – Lenka (Ditta); L9 – Milva; L10 – Provento; L11 – Quarta; L12 – Redstar; L13 – Remarka; L14 – Amylex; L15 – Apolena; L16 – Asterix; L17 – Bionta; L18 – Kuras; L19 – Lady Rosetta; L 20 – Marena; L21 – Markies; L22 – Marker 2.

Tab. 9: Relativní elektroforetická mobilita hmotnosti hlízových bílkovin dle sledovaných oblastí; první skupina - patatinový komplex (39 – 44 kDa); druhá skupina - inhibitory proteas (6 – 24 kDa).

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
11	0.060	0.451	0.424	0.431	0.429	0.412	0.443	0.418	0.433	0.437	0.453	0.418	0.420	0.418	0.420	0.418	0.422	0.422	0.420	0.433	0.060	
12	0.139	0.679	0.449	0.455	0.451	0.435	0.690	0.449	0.447	0.458	0.675	0.455	0.439	0.455	0.455	0.453	0.429	0.453	0.453	0.453	0.447	0.139
13	0.180	0.708	0.654	0.671	0.698	0.449	0.718	0.644	0.456	0.683	0.708	0.667	0.455	0.685	0.702	0.681	0.445	0.702	0.675	0.642	0.679	0.180
14	0.222	0.731	0.710	0.698	0.720	0.671	0.727	0.677	0.646	0.710	0.735	0.714	0.691	0.712	0.723	0.704	0.687	0.721	0.698	0.665	0.704	0.222
15	0.259	0.749	0.735	0.723	0.737	0.696	0.743	0.712	0.712	0.729	0.752	0.743	0.714	0.733	0.737	0.721	0.714	0.756	0.720	0.683	0.727	0.259
16	0.350	0.776	0.766	0.743	0.750	0.718	0.776	0.739	0.735	0.752	0.762	0.772	0.743	0.750	0.758	0.741	0.725	0.774	0.739	0.708	0.770	0.350
17	0.404	0.845	0.793	0.764	0.760	0.733	0.845	0.760	0.766	0.772	0.783	0.795	0.774	0.764	0.779	0.778	0.750	0.787	0.760	0.739	0.838	0.404
18	0.485	0.859	0.810	0.776	0.836	0.756		0.783	0.787	0.793	0.828	0.810	0.791	0.772	0.818	0.791	0.776	0.824	0.781	0.762		0.485
19	0.596		0.836	0.839	0.853	0.845		0.832	0.799	0.847	0.857	0.820	0.818	0.785	0.845	0.855	0.847	0.855	0.841	0.847		0.596
10	0.627		0.857					0.849	0.845	0.868		0.857	0.853	0.814	0.880				0.865			0.627
11	0.723								0.859				0.872	0.836								0.723
12	0.861													0.861								0.861
13	0.915																					0.915

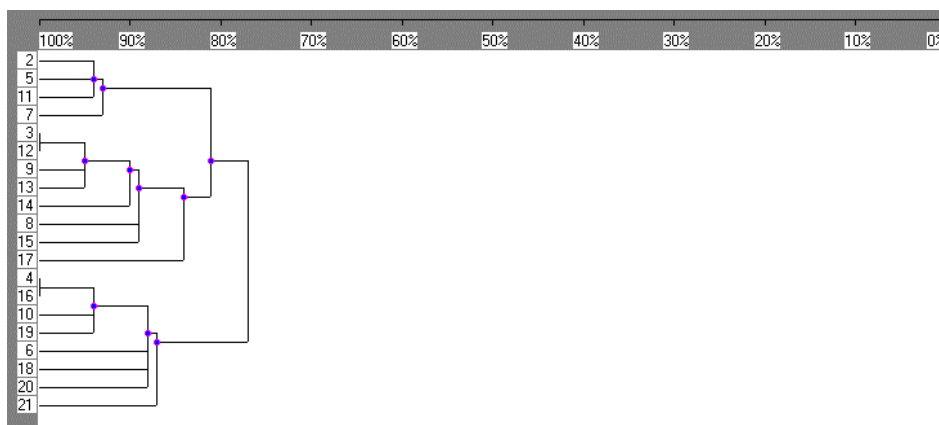
L1 – Marker 1; L2 – Rebel; L3 – Agria; L4 – Bettina; L5 – Bolesta; L6 – Filea; L7 – Granola; L8 – Lenka (Ditta); L9 – Milva; L10 – Provento; L11 – Quarta; L12 – Redstar; L13 – Remarka; L14 – Amylex; L15 – Apolena; L16 – Asterix; L17 – Bionta; L18 – Kuras; L19 – Lady Rosetta; L 20 – Marena; L21 – Markies; L22 – Marker 2.

Tab. 10: Koefficienty podobnosti v obou sledovaných oblastech.

	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	
L2	1.00																				
L3	0.89	1.00																			
L4	0.82	0.84	1.00																		
L5	0.94	0.84	0.89	1.00																	
L6	0.71	0.74	0.89	0.78	1.00																
L7	0.93	0.59	0.75	0.88	0.75	1.00															
L8	0.89	0.90	0.84	0.95	0.74	0.82	1.00														
L9	0.84	0.95	0.80	0.80	0.70	0.67	0.86	1.00													
L10	0.89	0.90	0.95	0.95	0.74	0.82	0.90	0.95	1.00												
L11	0.94	0.84	0.89	0.78	0.67	0.75	0.84	0.90	0.95	1.00											
L12	0.78	1.00	0.84	0.95	0.74	0.71	0.90	0.95	0.90	0.84	1.00										
L13	0.74	0.95	0.80	0.90	0.80	0.67	0.86	0.82	0.86	0.80	0.86	1.00									
L14	0.80	0.91	0.86	0.86	0.67	0.74	0.82	0.87	0.91	0.86	0.91	0.87	1.00								
L15	0.78	0.90	0.84	0.95	0.74	0.82	0.80	0.85	0.90	0.84	0.90	0.95	0.91	1.00							
L16	0.82	0.84	1.00	0.89	0.89	0.75	0.84	0.80	0.95	0.89	0.84	0.80	0.86	0.84	1.00						
L17	0.82	0.84	0.78	0.89	0.89	0.88	0.84	0.70	0.84	0.78	0.74	0.80	0.76	0.74	0.89	1.00					
L18	0.82	0.84	0.89	0.89	0.78	0.75	0.84	0.90	0.95	0.89	0.95	0.90	0.86	0.84	0.89	0.78	1.00				
L19	0.89	0.90	0.95	0.95	0.84	0.82	0.90	0.86	0.90	0.95	0.90	0.86	0.82	0.90	0.95	0.84	0.95	1.00			
L20	0.71	0.74	0.89	0.78	0.89	0.75	0.84	0.70	0.74	0.67	0.74	0.70	0.67	0.74	0.78	0.78	0.67	0.74	1.00		
L21	0.80	0.82	0.88	0.75	0.88	0.86	0.82	0.78	0.82	0.75	0.82	0.78	0.74	0.71	0.88	0.88	0.75	0.82	0.88	1.00	

L1 – Marker 1; L2 – Rebel; L3 – Agria; L4 – Bettina; L5 – Bolesta; L6 – Filea; L7 – Granola; L8 – Lenka (Ditta); L9 – Milva; L10 – Provento; L11 – Quarta; L12 – Redstar; L13 – Remarka; L14 – Amylex; L15 – Apolena; L16 – Asterix; L17 – Bionta; L18 – Kuras; L19 – Lady Rosetta; L 20 – Marena; L21 – Markies; L22 – Marker 2.

Obr. 5: Dendrogram odrůd pro obě sledované oblasti.



2 – Rebel; 3 – Agria; 4 – Bettina; 5 – Bolesta; 6 – Filea; 7 – Granola; 8 – Lenka (Ditta); 9 – Milva; 10 – Provento; 11 – Quarta; 12 – Redstar; 13 – Remarka; 14 – Amylex; 15 – Apolena; 16 – Asterix; 17 – Bionta; 18 – Kuras; 19 – Lady Rosetta; 20 – Marena; 21 – Markies.

5.1.3. Zhodnocení variability bílkovin inhibitorů proteas programem BIO 1D++ (BioProfil)

V oblasti inhibitorů proteas byl nejvyšší počet pruhů (10) nalezen u odrůdy Amylex. Naopak nejmenší počet pruhů (5) byl zaznamenán u odrůd Markies (Tab. 11). Nejčastěji naměřené hodnoty molekulových hmotností se pohybovaly v rozmezí od 19 do 23 kDa. Nejnižší molekulová hmotnost byla zaznamenána u odrůdy Apolena (11.768 kDa) a nejvyšší u odrůdy Marena (23.261 kDa), (Tab.11). Míra genetické podobnosti se mezi jednotlivými odrůdami pohybuje od 57 do 100% (Tab. 12). Z dendrogramu (Obr.6) je patrné, že celkem 7 vykazovalo určitou míru odlišnosti od všech ostatních odrůd.

Tab. 11: Molekulové hmotnosti hlízových bílkovin v oblasti inhibitorů proteas.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
11	205.000	21.613	22.718	21.939	20.868	21.939	20.868	23.170	23.079	21.455	21.774	22.108	21.152	21.378	20.733	21.533	21.301	20.733	21.774	23.261	21.613	205.000
12	116.000	20.542	20.481	20.868	20.201	20.937	20.254	21.693	20.422	20.481	20.542	20.364	20.364	20.422	20.100	20.668	20.364	20.149	20.868	22.193	20.668	116.000
13	97.400	19.919	19.836	20.100	19.797	20.254	20.006	20.422	19.836	19.362	19.836	19.683	19.683	19.877	19.797	20.149	20.052	19.435	20.201	21.455	20.006	97.400
14	84.000	19.575	19.253	19.683	19.540	19.877	19.683	19.758	19.253	19.505	19.505	19.136	19.095	19.540	19.399	19.720	19.540	19.095	19.758	20.542	19.176	84.000
15	66.000	19.052	18.596	19.291	19.363	19.435	19.052	19.363	18.765	19.136	19.327	18.534	18.654	19.291	18.963	19.009	19.052	18.765	19.363	19.758	16.347	66.000
16	55.000	15.722	17.945	19.052	16.490	15.722	15.722	18.868	18.404	18.596	18.868	17.945	17.571	19.136	17.571	18.654	15.552	17.250	18.917	19.327		55.000
17	45.000	14.412	16.490	16.199	15.009			16.762	15.722	15.552	17.015	17.468	15.009	18.818	15.722	14.816		14.816	16.045	15.552		45.000
18	36.000		14.617					15.377	14.412	13.292	14.617	14.617	12.803	17.765	11.768				13.758			36.000
19	29.000													16.490								29.000
20	24.000													14.200								24.000
21	20.100																					20.100
22	14.200																					14.200
23	6.500																					6.500

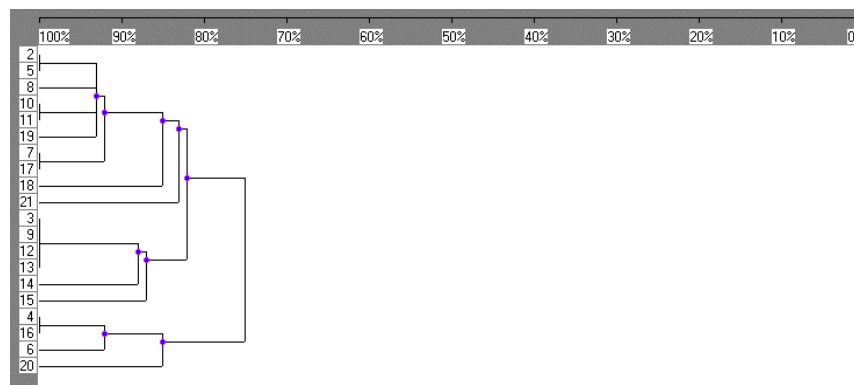
L1 – Marker 1; L2 – Rebel; L3 – Agria; L4 – Bettina; L5 – Bolesta; L6 – Filea; L7 – Granola; L8 – Lenka (Ditta); L9 – Milva; L10 – Provento; L11 – Quarta; L12 – Redstar; L13 – Remarka; L14 – Amylex; L15 – Apolena; L16 – Asterix; L17 – Bionta; L18 – Kuras; L19 – Lady Rosetta; L 20 – Marena; L21 – Markies; L22 – Marker 2.

Tab. 12: Koefficienty podobnosti mezi odrůdami v oblasti inhibitorů proteas.

	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
L2	1.00																			
L3	0.93	1.00																		
L4	0.86	0.80	1.00																	
L5	1.00	0.80	0.86	1.00																
L6	0.77	0.71	0.92	0.77	1.00															
L7	0.92	0.57	0.77	0.92	0.83	1.00														
L8	0.93	0.88	0.80	0.93	0.71	0.86	1.00													
L9	0.93	1.00	0.80	0.80	0.71	0.71	0.88	1.00												
L10	0.93	0.88	0.93	0.93	0.71	0.86	0.88	1.00	1.00											
L11	0.93	0.88	0.93	0.80	0.71	0.71	0.88	1.00	1.00	1.00										
L12	0.80	1.00	0.80	0.93	0.71	0.71	0.88	1.00	0.88	0.88	1.00									
L13	0.80	1.00	0.80	0.93	0.71	0.71	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	1.00								
L14	0.82	0.89	0.82	0.82	0.63	0.75	0.78	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	1.00							
L15	0.80	0.88	0.80	0.93	0.71	0.86	0.75	0.88	0.88	0.88	0.88	1.00	0.89	1.00						
L16	0.86	0.80	1.00	0.86	0.92	0.77	0.80	0.80	0.93	0.93	0.80	0.80	0.82	0.80	1.00					
L17	0.92	0.86	0.77	0.92	0.83	1.00	0.86	0.71	0.86	0.86	0.71	0.71	0.75	0.71	0.92	1.00				
L18	0.86	0.80	0.86	0.86	0.77	0.77	0.80	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.82	0.80	0.86	0.77	1.00			
L19	0.93	0.88	0.93	0.93	0.86	0.86	0.88	0.88	0.88	1.00	0.88	0.88	0.78	0.88	0.93	0.86	0.93	1.00		
L20	0.71	0.67	0.86	0.71	0.92	0.77	0.80	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.59	0.67	0.71	0.77	0.57	0.67	1.00	
L21	0.83	0.77	0.83	0.67	0.91	0.91	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.67	0.62	0.83	0.91	0.67	0.77	0.83	1.00

L2 – Rebel; L3 – Agria; L4 – Bettina; L5 – Bolesta; L6 – Filea; L7 – Granola; L8 – Lenka (Ditta); L9 – Milva; L10 – Provento; L11 – Quarta; L12 – Redstar; L13 – Remarka; L14 – Amylex; L15 – Apolena; L16 – Asterix, L17 – Bionta; L18 – Kuras; L19 – Lady Rosetta; L 20 – Marena; L21 – Markies

Obr. 6: Dendrogram odrůd pro oblast inhibitorů proteas.



2 – Rebel; 3 – Agria; 4 – Bettina; 5 – Bolesta; 6 – Filea; 7 – Granola; 8 – Lenka (Ditta); 9 – Milva; 10 – Provento; 11 – Quarta; 12 – Redstar; 13 – Remarka; 14 – Amylex; 15 – Apolena; 16 – Asterix; 17 – Bionta; 18 – Kuras; 19 – Lady Rosetta; 20 – Marena; 21 – Markies.

5.1.4. Zhodnocení variability patatinových bílkovin programem BIO 1D++ (BioProfil)

V této oblasti byly zaznamenány maximálně 3 hmotnostní izomery patatinu (u odrůd Filea, Milva, Remarka a Bionta), (Tab.13). U ostatních odrůd bylo zaznamenáno od jedné do dvou hmotnostních frakcí. Nejnižší molekulová hmotnost byla zaznamenána u odrůdy Milva (38.588 kDa) a nejvyšší u odrůdy Filea (43.986 kDa), (Tab.13). Hmotnostní variabilita je oproti inhibitorům proteas velmi nízká a hodnoty jednotlivých hmotnostních izomerů se nejčastěji pohybují kolem hodnot 39, 41 a 43 kDa. Míra genetické podobnosti se mezi jednotlivými odrůdami pohybuje od 50 do 100% (Tab. 14). Dle dendrogramu (Obr.7), pouze jedna odrůda vykazovala nepodobnost se všemi ostatními (Milva). Zbývající odrůdy byly programem rozděleny do 3 skupin vzájemně si podobných odrůd.

Tab. 13: Molekulové hmotnosti hlízových bílkovin v patatinové oblasti.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
11	205.000	39.218	42.484	41.508	41.749	43.986	40.102	43.231	41.268	40.795	39.004	43.231	42.981	43.231	42.981	42.981	43.231	42.732	42.732	42.981	41.268	205.000
2	116.000		39.434	38.794	39.218	41.030		39.434	39.654	38.385		38.794	40.562	38.794	38.794	39.004	41.749	39.004	39.004	39.004	39.654	116.000
3	97.400					39.434			38.588				38.794				39.877					97.400
4	84.000																					84.000
5	66.000																					66.000
6	55.000																					55.000
7	45.000																					45.000
8	36.000																					36.000
9	29.000																					29.000
10	24.000																					24.000
11	20.100																					20.100
12	14.200																					14.200
13	6.500																					6.500

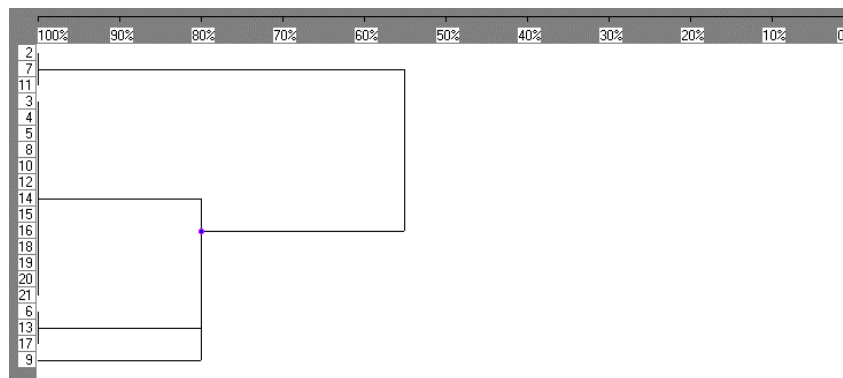
L1 – Marker 1; L2 – Rebel; L3 – Agria; L4 – Bettina; L5 – Bolesta; L6 – Filea; L7 – Granola; L8 – Lenka (Ditta); L9 – Milva; L10 – Provento; L11 – Quarta; L12 – Redstar; L13 – Remarka; L14 – Amylex; L15 – Apolena; L16 – Asterix; L17 – Bionta; L18 – Kuras; L19 – Lady Rosetta; L 20 – Marena; L21 – Markies; L22 – Marker 2.

Tab. 14: Koeficienty podobnosti mezi odrůdami pro oblast patatinového komplexu.

	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
L2	1.00																			
L3	0.67	1.00																		
L4	0.67	1.00	1.00																	
L5	0.67	1.00	1.00	1.00																
L6	0.50	0.80	0.80	0.80	1.00															
L7	1.00	0.67	0.67	0.67	0.50	1.00														
L8	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00													
L9	0.50	0.80	0.80	0.80	0.67	0.50	0.80	1.00												
L10	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00											
L11	1.00	0.67	0.67	0.67	0.50	1.00	0.67	0.50	0.67	1.00										
L12	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00									
L13	0.50	0.80	0.80	0.80	1.00	0.50	0.80	0.67	0.80	0.50	0.80	1.00								
L14	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00							
L15	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00	1.00						
L16	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00					
L17	0.50	0.80	0.80	0.80	1.00	0.50	0.80	0.67	0.80	0.50	0.80	1.00	0.80	0.80	0.80	1.00				
L18	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00			
L19	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00	1.00		
L20	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	
L21	0.67	1.00	1.00	1.00	0.80	0.67	1.00	0.80	1.00	0.67	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	1.00

L2 – Rebel, L3 – Agria, L4 – Bettina, L5 – Bolesta, L6 – Filea, L7 – Granola, L8 – Lenka (Ditta), L9 – Milva, L10 – Provento, L11 – Quarta, L12 – Redstar, L13 – Remarka, L14 – Amylex, L15 – Apolena, L16 – Asterix, L17 – Bionta, L18 – Kuras, L19 – Lady Rosetta, L 20 – Marena, L21 – Markies

Obr. 7 : Dendrogram odrůd pro oblast patatinového komplexu.



2 – Rebel; 3 – Agria; 4 – Bettina; 5 – Bolesta; 6 – Filea; 7 – Granola; 8 – Lenka (Ditta); 9 – Milva; 10 – Provento; 11 – Quarta; 12 – Redstar; 13 – Remarka; 14 – Amylex; 15 – Apolena; 16 – Asterix; 17 – Bionta; 18 – Kuras; 19 – Lady Rosetta; 20 – Marena; 21 – Markies.

5.2. Charakterizace bílkovinných profilů statistickými programy MVSP a STATISTICA po vizuální detekci

5.2.1. Základní údaje k pokusu

- **První krok** – vizuální detekce jednotlivých pruhů v obou sledovaných oblastech – hodnotí se přítomnost (1) či nepřítomnost (0) pruhu u zkoumaných odrůd v konkrétní pozici dle molekulové hmotnosti markerů. Výstupem je matice. Pro patatinový komplex byly zvoleny 3 oblasti o přibližné molekulové hmotnosti 43, 41 a 39 kDa. Pro oblast inhibitorů proteas bylo zvoleno 8 oblastí o přibližné molekulové hmotnosti 23, 22, 21, 20, 19, 18, 16 a 14 kDa.
- **Druhý krok** – celá matice se podrobí clusterové analýze pomocí dvou způsobů statistických hodnocení. První způsob vyhodnocování se provede v programu MVSP (Algoritmus: Unweighted pair-group average; percent similarity). Druhý způsob vyhodnocování se provede pomocí programu STATISTICA (Algoritmus: Unweighted pair-group average, percent disagreement). Výstupem je dendrogram a tabulka podobnostních koeficientů. V případě vyhodnocování programu STATISTICA je navíc tabulka statistických koeficientů algoritmu percent disagreement za účelem lepšího porovnání transformována, viz. kapitola (4.2.5, 3b).
- **Třetí krok** – výsledky matice pro oblast inhibitorů proteas se podrobí clusterové analýze stejnými způsoby statistického vyhodnocování, jaké jsou uvedeny v druhém kroku.
- **Čtvrtý krok** – výsledky matice pro oblast patatinových bílkovin se podrobí clusterové analýze stejnými způsoby statistického vyhodnocování, jaké jsou uvedeny v druhém kroku.

5.2.2. Charakterizace bílkovinných profilů hlíz po vizuální detekci

Výsledkem vizuální detekce gelu v obou sledovaných oblastech je matice uvedená v (Tab. 15). Pro patatinový komplex byly zvoleny 3 oblasti o přibližné molekulové hmotnosti 43, 41 a 39 kDa. Pro oblast inhibitorů proteas bylo zvoleno 8 oblastí o přibližné molekulové hmotnosti 23, 22, 21, 20, 19, 18, 16 a 14 kDa.

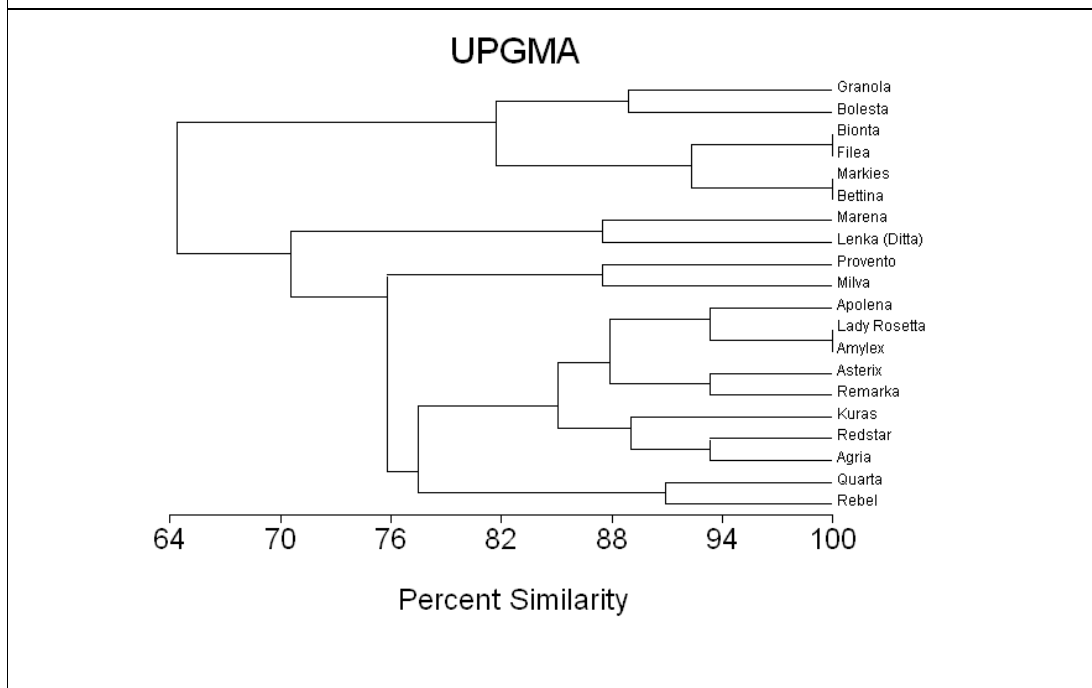
Tab.15: Výchozí matice pro clusterovou analýzu

Název odrůdy	Kód	Přítomnost/nepřítomnost pruhů v konkrétní pozici na gelu (kDa)										
		Patatin			Inhibitory proteas							
		43	41	39	23	22	21	20	19	18	16	14
Rebel	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Agria	2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
Bettina	3	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0
Bolesta	4	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
Filea	5	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0
Granola	6	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Lenka (Ditta)	7	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
Milva	8	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
Provento	9	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Quarta	10	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
Redstar	11	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
Remarka	12	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
Amylex	13	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Apolena	14	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
Asterix	15	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
Bionta	16	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0
Kuras	17	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
Lady Rosetta	18	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Marena	19	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Markies	20	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0

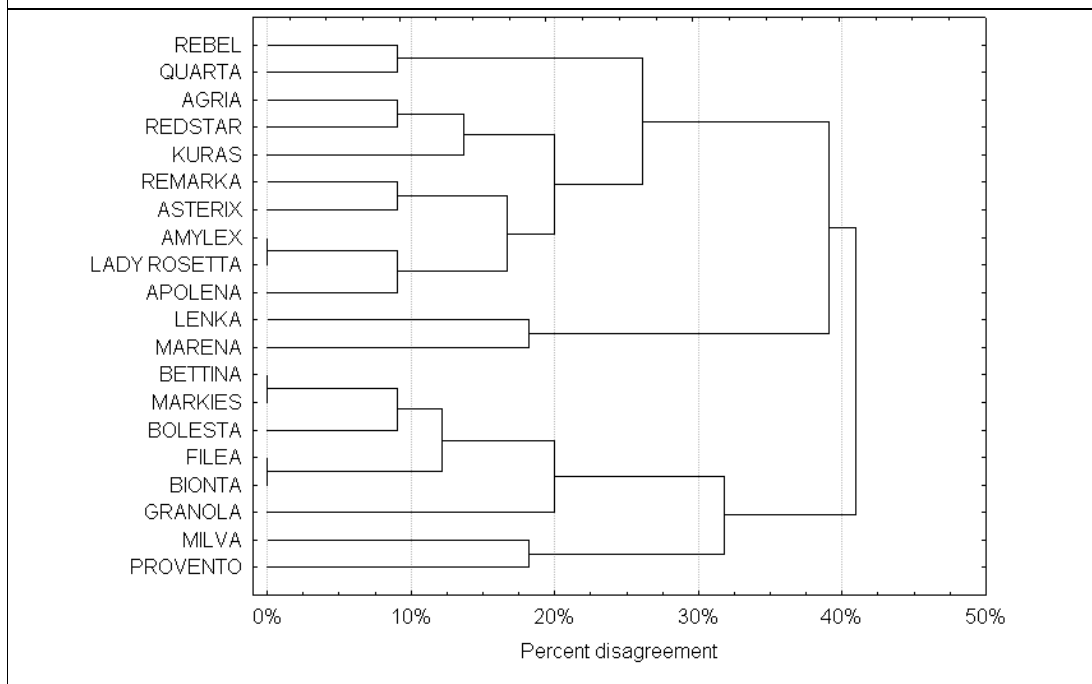
5.2.3. Clusterová analýza bílkovinných profilů hlíz

Při vyhodnocování celkové matice měla v obou sledovaných oblastech nejnižší zastoupení proužků odrůda Granola (4). Naopak nejvíce proužků (8), mělo celkem sedm odrůd (Agria, Lenka, Milva, Provento, Remarka, Amylex, Lady Rosetta). Pomocí programu MVSP byla zjištěna 100% míra genetické podobnosti mezi třemi dvojicemi odrůd (Amylex - Lady Rosetta; Bettina - Markies; Filea - Bionta). Stejný výsledek byl dosažen i programem STATISTICA (Obr. 8, Obr. 9). Na základě výpočtu podobnostní matice koeficientů byla programem MVSP stanovena nejnižší míra genetické podobnosti mezi odrůdami na 36,36 % celkem ve dvou případech (Granola - Asterix; Granola - Redstar), (Tab.16). Stejněho výsledku nejnižší míry genetické podobnosti (36,36 %) bylo dosaženo i programem STATISTICA, celkem u 4 dvojic odrůd (Bettina - Redstar; Redstar - Markies; Granola - Asterix; Granola - Redstar), (Tab.17). Žádná z dvojic odrůd, které vykazovaly stoprocentní míru vzájemné genetické podobnosti, neměla společného rodiče a zároveň nepocházela od stejné šlechtitelské firmy (Tab.6, Obr.8, Obr.9).

Obr. 8: Dendrogram výchozí matice odrůd vytvořený programem MVSP.



Obr. 9: Dendrogram výchozí matice vytvořený programem STATISTICA.



Tab. 16: Podobnostní matice odrůd vypočtená programem MVSP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	100.00																			
2	61.54	100.00																		
3	72.73	57.14	100.00																	
4	60.00	61.54	90.91	100.00																
5	66.67	66.67	92.31	83.33	100.00															
6	44.44	50.00	80.00	88.89	72.73	100.00														
7	61.54	75.00	71.43	61.54	80.00	50.00	100.00													
8	61.54	75.00	71.43	76.92	66.67	66.67	75.00	100.00												
9	76.92	75.00	85.71	76.92	80.00	66.67	75.00	87.50	100.00											
10	90.91	71.43	66.67	54.55	61.54	40.00	71.43	71.43	85.71	100.00										
11	66.67	93.33	46.15	50.00	57.14	36.36	66.67	66.67	66.67	76.92	100.00									
12	76.92	75.00	71.43	61.54	80.00	50.00	75.00	75.00	87.50	85.71	80.00	100.00								
13	76.92	87.50	71.43	61.54	80.00	50.00	87.50	75.00	87.50	85.71	80.00	87.50	100.00							
14	66.67	93.33	61.54	66.67	71.43	54.55	80.00	80.00	80.00	76.92	85.71	80.00	93.33	100.00						
15	83.33	80.00	61.54	50.00	71.43	36.36	80.00	66.67	80.00	92.31	85.71	93.33	93.33	85.71	100.00					
16	66.67	66.67	92.31	83.33	100.00	72.73	80.00	66.67	80.00	61.54	57.14	80.00	80.00	71.43	71.43	100.00				
17	72.73	85.71	50.00	54.55	61.54	40.00	71.43	71.43	71.43	83.33	92.31	85.71	85.71	92.31	92.31	61.54	100.00			
18	76.92	87.50	71.43	61.54	80.00	50.00	87.50	75.00	87.50	85.71	80.00	87.50	100.00	93.33	93.33	80.00	85.71	100.00		
19	61.54	75.00	71.43	61.54	80.00	50.00	87.50	62.50	62.50	57.14	66.67	62.50	75.00	66.67	66.67	80.00	57.14	75.00	100.00	
20	72.73	57.14	100.00	90.91	92.31	80.00	71.43	71.43	85.71	66.67	46.15	71.43	71.43	61.54	61.54	92.31	50.00	71.43	71.43	100.00

1 – Rebel; 2 – Agria; 3 – Bettina; 4 – Bolesta; 5 – Filea; 6 – Granola; 7 – Lenka (Ditta); 8 – Milva; 9 – Provento; 10 – Quarta; 11 – Redstar; 12 – Remarka; 13 – Amylex; 14 – Apolena; 15 – Asterix; 16 – Bionta; 17 – Kuras; 18 – Lady Rosetta; 19 – Marena; 20 – Markies.a

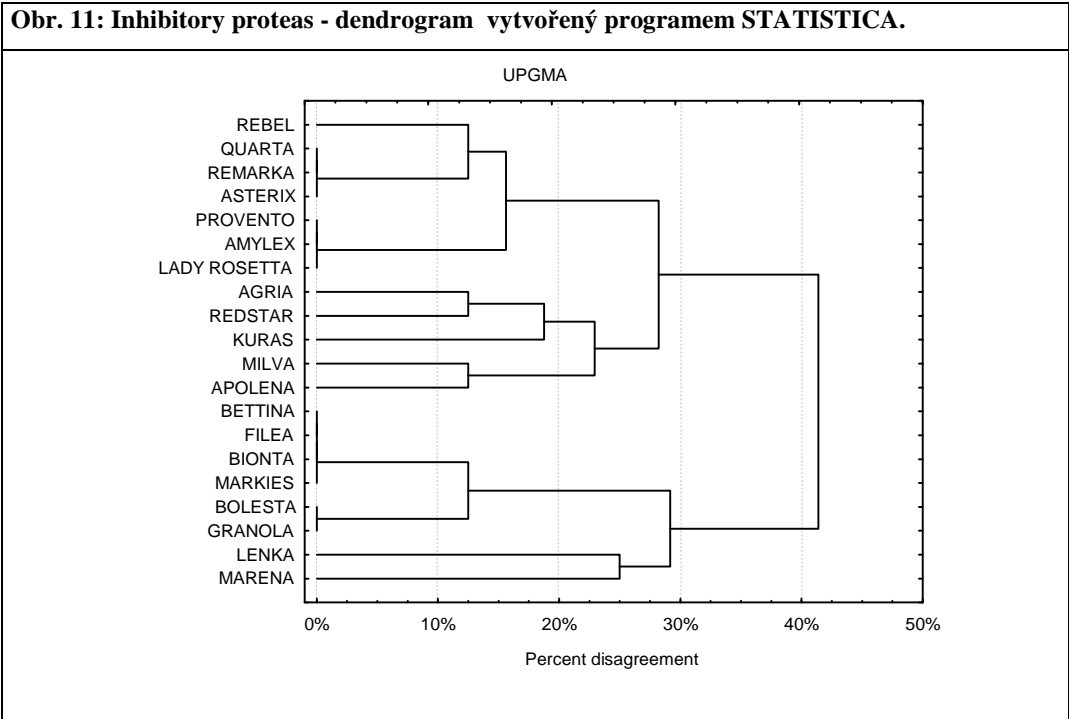
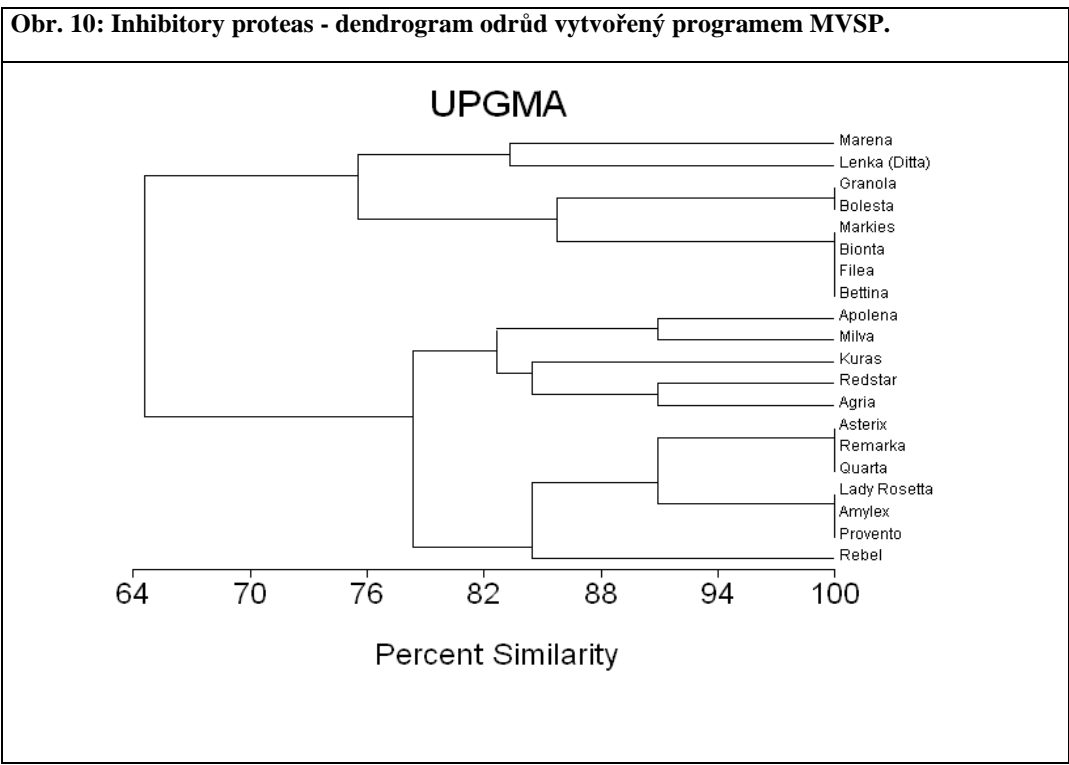
Tab. 17: Podobnostní matice odrůd vypočtená programem STATISTICA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	100.00																			
2	54.55	100.00																		
3	72.73	45.45	100.00																	
4	63.64	54.55	90.91	100.00																
5	63.64	54.55	90.91	81.82	100.00															
6	54.55	45.45	81.82	90.91	72.73	100.00														
7	54.55	63.64	63.64	54.55	72.73	45.45	100.00													
8	54.55	63.64	63.64	72.73	54.55	63.64	63.64	100.00												
9	72.73	63.64	81.82	72.73	72.73	63.64	63.64	81.82	100.00											
10	90.91	63.64	63.64	54.55	54.55	45.45	63.64	63.64	81.82	100.00										
11	63.64	90.91	36.36	45.45	45.45	36.36	54.55	54.55	54.55	72.73	100.00									
12	72.73	63.64	63.64	54.55	72.73	45.45	63.64	63.64	81.82	81.82	72.73	100.00								
13	72.73	81.82	63.64	54.55	72.73	45.45	81.82	63.64	81.82	81.82	72.73	81.82	100.00							
14	63.64	90.91	54.55	63.64	63.64	54.55	72.73	72.73	72.73	72.73	81.82	72.73	90.91	100.00						
15	81.82	72.73	54.55	45.45	63.64	36.36	72.73	54.55	72.73	90.91	81.82	90.91	90.91	81.82	100.00					
16	63.64	54.55	90.91	81.82	100.00	72.73	72.73	54.55	72.73	54.55	45.45	72.73	72.73	63.64	63.64	100.00				
17	72.73	81.82	45.45	54.55	54.55	45.45	63.64	63.64	63.64	81.82	90.91	81.82	81.82	90.91	90.91	54.55	100.00			
18	72.73	81.82	63.64	54.55	72.73	45.45	81.82	63.64	81.82	81.82	72.73	81.82	100.00	90.91	90.91	72.73	81.82	100.00		
19	54.55	63.64	63.64	54.55	72.73	45.45	81.82	45.45	45.45	45.45	54.55	45.45	63.64	54.55	54.55	72.73	45.45	63.64	100.00	
20	72.73	45.45	100.00	90.91	90.91	81.82	63.64	63.64	81.82	63.64	36.36	63.64	63.64	54.55	54.55	90.91	45.45	63.64	63.64	100.00

1 – Rebel; 2 – Agria; 3 – Bettina; 4 – Bolesta; 5 – Filea; 6 – Granola; 7 – Lenka (Ditta); 8 – Milva; 9 – Provento; 10 – Quarta; 11 – Redstar; 12 – Remarka; 13 – Amylex; 14 – Apolena; 15 – Asterix; 16 – Bionta; 17 – Kuras; 18 – Lady Rosetta; 19 – Marena; 20 – Markies.a

5.2.4. Clusterová analýza odrůd v oblasti inhibitorů proteas

Při vyhodnocování matice v oblasti inhibitorů proteas měla nejnižší zastoupení proužků odrůda Granola (4). Naopak nejvíce proužků (6), mělo celkem sedm odrůd (Agria, Lenka, Milva, Provento, Amylex, Lady Rosetta, Marena), (Tab.15). Pomocí programu MVSP bylo zjištěno, že celkem 12 odrůd vykazuje 100% míru vzájemné genetické podobnosti s některou z ostatních odrůd. Identický výsledek byl dosažen programem STATISTICA (Obr. 10, Obr. 11). Na základě výpočtu podobnostní matice koeficientů byla programem MVSP stanovena nejnižší míra genetické podobnosti mezi odrůdami na 0 % (Tab.18). Stejný výsledek nejnižší míry genetické podobnosti byl zjištěn programem STATISTICA (Tab.19).



Tab. 18: Podobnostní matice odrůd pro oblast inhibitorů proteas vypočtená programem MVSP																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	100.00																			
2	60.00	100.00																		
3	75.00	60.00	100.00																	
4	57.14	66.67	85.71	100.00																
5	75.00	60.00	100.00	85.71	100.00															
6	57.14	66.67	85.71	100.00	85.71	100.00														
7	60.00	66.67	80.00	66.67	80.00	66.67	100.00													
8	60.00	83.33	60.00	66.67	60.00	66.67	83.33	100.00												
9	80.00	83.33	80.00	66.67	80.00	66.67	83.33	83.33	100.00											
10	88.89	72.73	66.67	50.00	66.67	50.00	72.73	72.73	90.91	100.00										
11	66.67	90.91	44.44	50.00	44.44	50.00	54.55	72.73	72.73	80.00	100.00									
12	88.89	72.73	66.67	50.00	66.67	50.00	72.73	72.73	90.91	100.00	80.00	100.00								
13	80.00	83.33	80.00	66.67	80.00	66.67	83.33	83.33	100.00	90.91	72.73	90.91	100.00							
14	66.67	90.91	66.67	75.00	66.67	75.00	72.73	90.91	90.91	80.00	80.00	80.00	90.91	100.00						
15	88.89	72.73	66.67	50.00	66.67	50.00	72.73	72.73	90.91	100.00	80.00	100.00	90.91	80.00	100.00					
16	75.00	60.00	100.00	85.71	100.00	85.71	80.00	60.00	80.00	66.67	44.44	66.67	80.00	66.67	66.67	100.00				
17	75.00	80.00	50.00	57.14	50.00	57.14	60.00	80.00	80.00	88.89	88.89	88.89	80.00	88.89	88.89	50.00	100.00			
18	80.00	83.33	80.00	66.67	80.00	66.67	83.33	83.33	100.00	90.91	72.73	90.91	100.00	90.91	90.91	80.00	80.00	100.00		
19	60.00	66.67	80.00	66.67	80.00	66.67	83.33	66.67	66.67	54.55	54.55	54.55	66.67	54.55	54.55	80.00	40.00	66.67	100.00	
20	75.00	60.00	100.00	85.71	100.00	85.71	80.00	60.00	80.00	66.67	44.44	66.67	80.00	66.67	66.67	100.00	50.00	80.00	80.00	100.00

1 – Rebel; 2 – Agria; 3 – Bettina; 4 – Bolesta; 5 – Filea; 6 – Granola; 7 – Lenka (Ditta); 8 – Milva; 9 – Provento; 10 – Quarta; 11 – Redstar; 12 – Remarka; 13 – Amylex; 14 – Apolena; 15 – Asterix; 16 – Bionta; 17 – Kuras; 18 – Lady Rosetta; 19 – Marena; 20 – Markies.a

Tab. 19: Podobnostní matice odrůd pro oblast inhibitorů proteas vypočtená programem STATISTICA

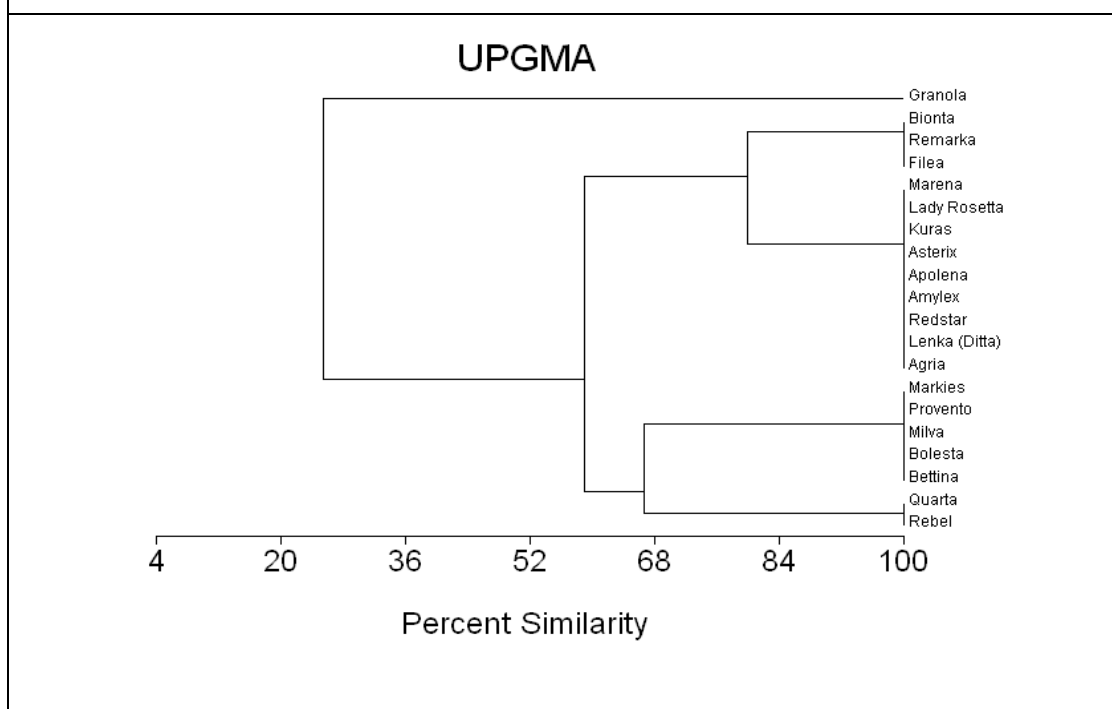
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	100.00																			
2	50.00	100.00																		
3	75.00	50.00	100.00																	
4	62.50	62.50	87.50	100.00																
5	75.00	50.00	100.00	87.50	100.00															
6	62.50	62.50	87.50	100.00	87.50	100.00														
7	50.00	50.00	75.00	62.50	75.00	62.50	100.00													
8	50.00	75.00	50.00	62.50	50.00	62.50	75.00	100.00												
9	75.00	75.00	75.00	62.50	75.00	62.50	75.00	75.00	100.00											
10	87.50	62.50	62.50	50.00	62.50	50.00	62.50	62.50	87.50	100.00										
11	62.50	87.50	37.50	50.00	37.50	50.00	37.50	62.50	62.50	75.00	100.00									
12	87.50	62.50	62.50	50.00	62.50	50.00	62.50	62.50	87.50	100.00	75.00	100.00								
13	75.00	75.00	75.00	62.50	75.00	62.50	75.00	75.00	100.00	87.50	62.50	87.50	100.00							
14	62.50	87.50	62.50	75.00	62.50	75.00	62.50	87.50	87.50	75.00	75.00	75.00	87.50	100.00						
15	87.50	62.50	62.50	50.00	62.50	50.00	62.50	62.50	87.50	100.00	75.00	100.00	87.50	75.00	100.00					
16	75.00	50.00	100.00	87.50	100.00	87.50	75.00	50.00	75.00	62.50	37.50	62.50	75.00	62.50	62.50	100.00				
17	75.00	75.00	50.00	62.50	50.00	62.50	50.00	75.00	75.00	87.50	87.50	87.50	75.00	87.50	87.50	50.00	100.00			
18	75.00	75.00	75.00	62.50	75.00	62.50	75.00	75.00	100.00	87.50	62.50	87.50	100.00	87.50	87.50	75.00	75.00	100.00		
19	50.00	50.00	75.00	62.50	75.00	62.50	75.00	50.00	50.00	37.50	37.50	37.50	50.00	37.50	37.50	75.00	25.00	50.00	100.00	
20	75.00	50.00	100.00	87.50	100.00	87.50	75.00	50.00	75.00	62.50	37.50	62.50	75.00	62.50	62.50	100.00	50.00	75.00	75.00	100.00

1 – Rebel; 2 – Agria; 3 – Bettina; 4 – Bolesta; 5 – Filea; 6 – Granola; 7 – Lenka (Ditta); 8 – Milva; 9 – Provento; 10 – Quarta; 11 – Redstar; 12 – Remarka; 13 – Amylex; 14 – Apolena; 15 – Asterix; 16 – Bionta; 17 – Kuras; 18 – Lady Rosetta; 19 – Marena; 20 – Markies.a

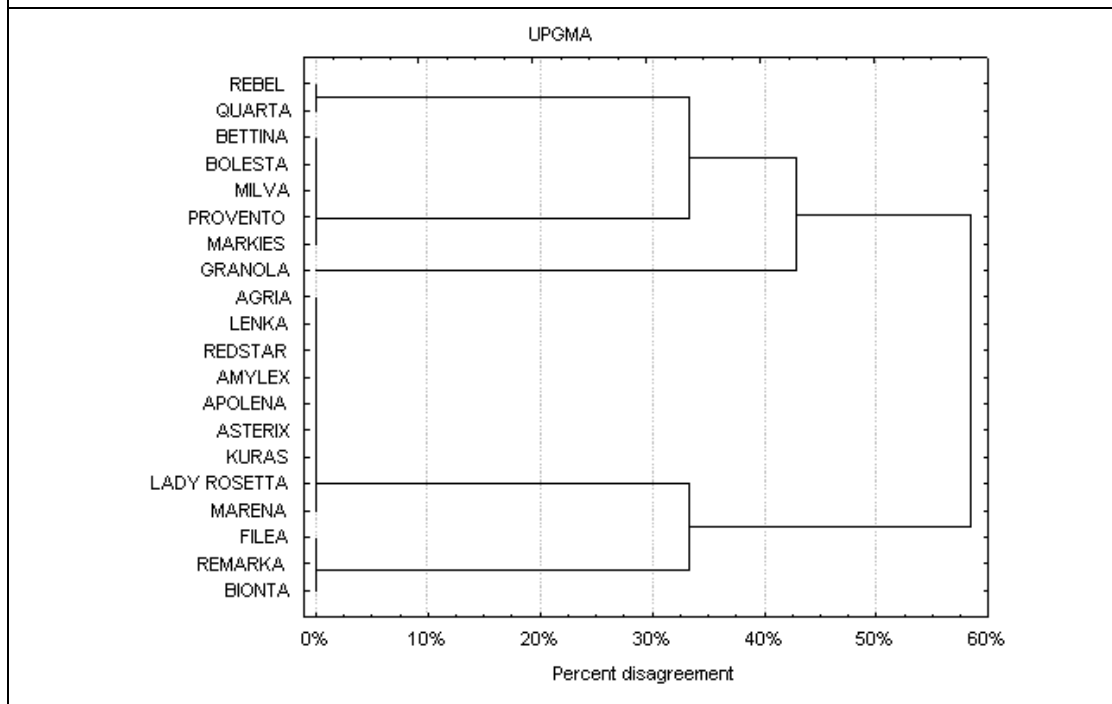
5.2.5. Clusterová analýza odrůd v oblasti patatinového komplexu

Při vizuálním vyhodnocování gelu v oblasti patatinového komplexu se pohyboval počet proužků od 1 do 3 (Tab.15). Pomocí programu MVSP bylo zjištěno, že všechny odrůdy kromě odrůdy Granola vykazují 100% míru vzájemné genetické podobnosti s některou z ostatních odrůd. Identického výsledku bylo dosaženo i pomocí programu STATISTICA (Obr. 12, Obr. 13). Na základě výpočtu podobnostní matice koeficientů byla programem MVSP stanovena nejnižší míra genetické podobnosti mezi odrůdami na 0 %, celkem v 11 případech (Tab.20). Podobné výsledky byly zjištěny i programem STATISTICA. Nejnižší míra genetické podobnosti činila 0 %, celkem v 9 případech (Tab.21).

Obr. 12: Patatinový komplex - dendrogram odrůd vytvořený programem MVSP.



Obr. 13: Patatinový komplex - dendrogram vytvořený programem STATISTICA.



Tab. 20: Podobnostní matice odrůd pro oblast patatinových bílkovin vypočtená programem MVSP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	100.00																			
2	66.67	100.00																		
3	66.67	50.00	100.00																	
4	66.67	50.00	100.00	100.00																
5	50.00	80.00	80.00	80.00	100.00															
6	0.00	0.00	66.67	66.67	50.00	100.00														
7	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00													
8	66.67	50.00	100.00	100.00	80.00	66.67	50.00	100.00												
9	66.67	50.00	100.00	100.00	80.00	66.67	50.00	100.00	100.00											
10	100.00	66.67	66.67	66.67	50.00	0.00	66.67	66.67	66.67	100.00										
11	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00									
12	50.00	80.00	80.00	80.00	100.00	50.00	80.00	80.00	80.00	50.00	80.00	100.00								
13	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00	80.00	100.00							
14	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00	80.00	100.00	100.00						
15	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00					
16	50.00	80.00	80.00	80.00	100.00	50.00	80.00	80.00	80.00	50.00	80.00	100.00	80.00	80.00	80.00	100.00				
17	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	80.00	100.00			
18	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	80.00	100.00	100.00		
19	66.67	100.00	50.00	50.00	80.00	0.00	100.00	50.00	50.00	66.67	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	
20	66.67	50.00	100.00	100.00	80.00	66.67	50.00	100.00	100.00	66.67	50.00	80.00	50.00	50.00	50.00	80.00	50.00	50.00	50.00	100.00

1 – Rebel; 2 – Agria; 3 – Bettina; 4 – Bolesta; 5 – Filea; 6 – Granola; 7 – Lenka (Ditta); 8 – Milva; 9 – Provento; 10 – Quarta; 11 – Redstar; 12 – Remarka;
13 – Amylex; 14 – Apolena; 15 – Asterix; 16 – Bionta; 17 – Kuras; 18 – Lady Rosetta; 19 – Marena; 20 – Markies.a

Tab. 21: Podobnostní matice odrůd pro oblast patatinových bílkovin vypočtená programem STATISTICA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	100.00																			
2	66.67	100.00																		
3	66.67	33.33	100.00																	
4	66.67	33.33	100.00	100.00																
5	33.33	66.67	66.67	66.67	100.00															
6	33.33	0.00	66.67	66.67	33.33	100.00														
7	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00													
8	66.67	33.33	100.00	100.00	66.67	66.67	33.33	100.00												
9	66.67	33.33	100.00	100.00	66.67	66.67	33.33	100.00	100.00											
10	100.00	66.67	66.67	66.67	33.33	33.33	66.67	66.67	66.67	100.00										
11	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00									
12	33.33	66.67	66.67	66.67	100.00	33.33	66.67	66.67	66.67	33.33	66.67	100.00								
13	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00	66.67	100.00							
14	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00	66.67	100.00	100.00						
15	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00	66.67	100.00	100.00	100.00					
16	33.33	66.67	66.67	66.67	100.00	33.33	66.67	66.67	66.67	33.33	66.67	100.00	66.67	66.67	66.67	100.00				
17	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00	66.67	100.00	100.00	100.00	66.67	100.00			
18	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00	66.67	100.00	100.00	100.00	66.67	100.00	100.00		
19	66.67	100.00	33.33	33.33	66.67	0.00	100.00	33.33	33.33	66.67	100.00	66.67	100.00	100.00	100.00	66.67	100.00	100.00	100.00	
20	66.67	33.33	100.00	100.00	66.67	66.67	33.33	100.00	100.00	66.67	33.33	66.67	33.33	33.33	33.33	66.67	33.33	33.33	33.33	100.00

1 – Rebel; 2 – Agria; 3 – Bettina; 4 – Bolesta; 5 – Filea; 6 – Granola; 7 – Lenka (Ditta); 8 – Milva; 9 – Provento; 10 – Quarta; 11 – Redstar; 12 – Remarka; 13 – Amylex; 14 – Apolena; 15 – Asterix; 16 – Bionta; 17 – Kuras; 18 – Lady Rosetta; 19 – Marena; 20 – Markies.a

6. Diskuse

Před vyslovením jakýchkoliv závěrů vyplývajících z charakterizace odrůd brambor technikou SDS-PAGE je nutné diskutovat o jednotlivých faktorech, které mají vliv na dosažené výsledky. Mezi tyto faktory patří především extrakční, separační a detekční metody. Mezi další faktory patří míra variability zásobních proteinů hlíz a použité metody vyhodnocování gelů.

6.1. Extrakční metody

Z důvodů zachování enzymatické aktivity je nutné všechny kroky provádět při nízké teplotě, poměrně rychle, a případně používat látky blokující proteasy (GRAMAN et al. 1995). Rovněž je nutné veškeré pracovní operace provádět co nejpečlivěji – hrozí nebezpečí kontaminace jednotlivých vzorků. Rozpracované vzorky je potřebné udržovat při pracovních operacích (i v intervalech mezi nimi) při teplotě do 4 °C (nejlépe v ledové tříšti). Nedodržení těchto podmínek by mohlo mít vliv na výsledná separovaná spektra.

6.2. Separační metody

Pro vlastní elektroforetickou separaci byla použita diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Polyakrylamidový gel má oproti jiným nosičům řadu výhod ale i nežádoucích vlastností. Mezi výhody těchto gelů patří dle ANDREWS (1993) a ANONYM 3. (1994):

- pružnost a termostabilita gelů
- přesná regulace velikosti a množství pórů
- polyakrylamidový gel je možné po vysušení trvale uchovat
- gel je průhledný, což umožňuje lepší vyhodnocení

Elektroforetické separace na polyakrylamidovém gelu mají tedy řadu předností. Jejich úskalím by mohla být rizikovost používaných chemikálií, kterou lze snížit používáním hotových komerčních roztoků akrylamidu a BIS (odpadá manipulace při navažování).

Ty jsou ale nepoměrně dražší než základní chemikálie. Finančně ještě náročnější by bylo použití hotových komerčních gelů, provedení elektroforézy je pak ale podstatně standardnější (BRADOVÁ, SÝKOROVÁ 2006). V této diplomové práci nebyly pro elektroforetickou separaci použity standardní komerční gely ani hotové komerční roztoky akrylamidu a BIS. Jednotlivé gely se tak mohou mírně lišit svým složením. To může mít za následek nerovnoměrnou velikost pórů u jednotlivých gelů, čímž se může snižovat opakovatelnost výsledků. Dále je třeba zmínit méně účinnou kvalitu separace bílkovin, jež byla zaznamenána v oblasti inhibitorů proteas, především v oblasti od 19 do 24 kDa. To je způsobeno tím, že inhibitory proteas mají v této oblasti nejpočetnější zastoupení (POVREAU 2004) a jejich jasné oddělení od sebe je nad možnosti použitého 10% separačního gelu. Lepší separace bílkovin v oblasti inhibitorů proteas by mohla být dosažena použitím hustšího, 15 – 16% separačního gelu (1 X crosslinker - AC/bis = 48/1.5 g; nebo 2 x crosslinker - AC/bis = 48/3 g), v kombinaci s tris tricininým vanovým pufrům (1 M Tris, 1 M Tricine, 1 % SDS), jež doporučuje JUDD (2002) k SDS analýze peptidů.

6.3. Detekční metody

Pro detekci spektra zásobních hlízových bílkovin byla použita technika barvení Coomassie Blue (směs methanol, ledová kyselina octová, voda v poměru 5:1:4 + 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma Co.). Určitou nevýhodou techniky odbarvování gelů pomocí Coomassie Blue je její nižší citlivost a doba odbarvování. Doba detekce separovaných bílkovin a následné vysoušení gelů trvá delší dobu (5 - 7 dní). Rychlejšího postupu však lze docílit barvením gelu po dobu 45 minut ve směsi 0,1% Coomassie Blue R-250, 0,1% síranu měďnatého v 25% isopropanolu a 10% kys. octové. Gely se poté nechají přes noc v 25% ethanolu a 10% kys. octové, následně se opláchnou v destilované vodě a ponoří do acetonu. Po přidání acetonu dochází k dehydrataci a smrštění gelu a objevuje se bílé pozadí, poměrně dobře vyniknou i slabší modré bílkovinné proužky. Obdobného výsledku lze dosáhnout i precipitací absolutním ethanolem (ČURN 2003). K rychlejšímu vysoušení gelu lze rovněž použít komerčně dostupné sušičky (ANONYM 4. 2007).

Pro identifikaci bílkovin lze také použít koloidní zlato nebo barvení stříbrem. Tyto techniky se většinou používají pro detekci bílkovin o velmi nízké molekulové hmotnosti (ALBERTS et al. 2004). GRAMAN et al. (1995) uvádějí, že techniky barvení gelu koloidním

zlatem nebo stříbrem skýtají citlivější a přesnější způsob detekce oproti technice Coomassie Blue. Barvení stříbrem je údajně až 100 krát citlivější než Coomassie Blue (GRAMAN et al. 1995). Je však nutné připomenout, že obě techniky jsou podstatně dražší než technika Coomassie Blue. Barvení pomocí Coomassie Blue rovněž použil pro analýzu bílkovinných spekter 119 linií bramborových mikrohlízek RAJAPAKSE et al. (1991).

6.4. Variabilita zásobních bílkovin

6.4.1. Variabilita zásobních bílkovin v oblasti patatinového komplexu

V oblasti patatinového komplexu byly u jedné odrůdy zaznamenány maximálně 3 hmotnostní izomery zásobních bílkovin. Hmotnostní variabilita v oblasti patatinových bílkovin je velmi nízká. Molekulové hmotnosti jednotlivých patatinových izomerů se nejčastěji pohybovaly kolem hodnot 39, 41 a 43 kDa, což odpovídá hodnotám uváděným v novějších publikacích (POTS et al. 1999a). Protože podíl sacharidové části činí asi 4% z relativní hmotnosti patatinové makromolekuly (POTS 1999b), je pravděpodobné, že příčinou variability v molekulových hmotnostech odrůd je rozdílný počet glykosylací u jednotlivých izomerů patatinových proteinů.

Mírné odchylky od těchto molekulových hmotností byly zaznamenány u odrůdy Milva (38.588 kDa) a naopak nejvyšší u odrůdy Filea (43.986 kDa). Příčinou těchto odchylek u výše uvedených odrůd může být bodová mutace, nízký, nebo naopak vysoký počet glykosylací (POTS 1999b). Je rovněž třeba zmínit, že POTS et al. (1999a) pro své měření použil vysoce citlivou analytickou techniku pro stanovení molekulové hmotnosti bílkovin (MALDI TOF – MS), a to pouze u tří odrůd. Dále je třeba uvést, že POTS (1999b) uvádí hodnoty molekulových hmotností jednotlivých patatinových izomerů vypočtené z primární sekvence patatinu, což je nad možnosti techniky SDS-PAGE, kterou jsem použil ve své diplomové práci.

6.4.2. Variabilita zásobních bílkovin v oblasti inhibitorů proteas

V případě oblasti inhibitorů proteas byl u všech sledovaných odrůd pozorován o něco vyšší počet pruhů, což je způsobeno tím, že inhibitory proteas jsou oproti rodině patatinových bílkovin více různorodou skupinou (POVREAU 2004). Inhibitory proteas se podle novějších publikací dělí do sedmi odlišných skupin podle specializace na určitý typ proteasy. Počty pruhů se u zkoumaných odrůd pohybovaly od čtyř (v případě vizuálního vyhodnocování) do deseti (v případě vyhodnocování pomocí digitální obrazové analýzy). Variabilita těchto bílkovin je tedy daleko vyšší než u patatinů, čemuž odpovídají i výsledné dendrogramy sestavené pro jednotlivé oblasti. Nejčastěji naměřené hodnoty molekulových hmotností se pohybovaly v rozmezí od 19 do 23 kDa. Pravděpodobně se jedná o inhibitory proteas typu Kunitz, které mají přibližně stejnou molekulovou hmotnost a představují nejpočetnější skupinu inhibitorů proteas (POVREAU 2004; KONINGSVELD 2001).

6.5. Metody vyhodnocování spekter zásobních bílkovin

6.5.1. Vyhodnocování gelu digitální obrazovou analýzou pomocí programu BIO 1D++ (BioProfil)

Získané elektroforegramy byly digitalizovány a pomocí Nei a Li koeficientu podobnosti byl vyhodnocen vztah mezi sledovanými genotypy odrůd. Ve své práci jsem tímto programem sledoval biochemickou variabilitu zásobních bílkovin u celkem 20 odrůd. Míra genetické podobnosti se mezi jednotlivými odrůdami pohybovala přibližně kolem 80 %. Nejnižší míra genetické podobnosti mezi odrůdami činila 59% (odrůdy Agria – Granola). Nevyšší míra genetické podobnosti činila 100% a byla nalezena celkem u dvou dvojic odrůd (Agria – Redstar; Bettina – Asterix). Žádná z dvojic odrůd, které vykazovaly stoprocentní míru vzájemné genetické podobnosti, neměla společného rodiče a zároveň nepocházela od stejné šlechtitelské firmy. U zásobních bílkovin se nepotvrdila vyšší míra genetické podobnosti mezi odrůdami pocházejícími od stejné šlechtitelské firmy, kterou zjistili BÁRTA et al. (2003) při studiu biochemické variability izoesteráz a isoperoxidáz.

Mezi výhody digitální obrazové analýzy oproti vizuálnímu hodnocení gelů patří přesnější a objektivnější vyhodnocování jednotlivých proužků na gelu a možnost volby konfidenčního intervalu. Pomocí programu BioProfil bylo ve sledovaných oblastech u jedné

odřůdy zjištěno až 12 proužků, zatímco při vizuálním hodnocení gelu činil detekovaný počet maximálně 8 proužků. Program BioProfil rovněž dokázal lépe odlišit odrůdy se 100% mírou genetické podobnosti.

Mezi nevýhody programu BioProfil patří jeho nekompatibilita s ostatními programy. Další nevýhodou může být a také to, že hodnocené proužky jsou programem hodnoceny pouze podle přítomnosti proužku v dané pozici na gelu. Není tak brána v úvahu intenzita pruhů, která může být ovlivněna rozdílnou genovou dávkou. Genová dávka může být ovlivněna funkčností nebo nefunkčností sady alel tetraploidních odrůd brambor druhu *Solanum Tuberosum* L.. Může se také lišit počtem kopií jednotlivých genů, které jsou zodpovědné za syntézu bílkovin. Např. TWELL a OOMS (1988) uvádějí, že počet kopií „patatinového“ genu na haploidní genom je 10 – 18 v závislosti na odrůdě. Díky různé míře genové dávky tak vzniká mezi jednotlivými odrůdami brambor další variabilita, která však není programem hodnocena.

Tento způsob vyhodnocování gelů rovněž použili DVORÁČEK a ČURN (2003) při hodnocení bílkovinných frakcí jako biochemických markerů pro identifikaci odrůd pšenice špaldy.

6.5.2. Vizuální vyhodnocování gelu pomocí programů MVSP a STATISTICA

Jako doplněk k digitální obrazové analýze bylo provedeno vizuální vyhodnocování gelu s využitím clusterové analýzy. Pro vyhodnocování variability zásobních bílkovin odrůd brambor jsem v tomto případě použil různé statistické programy. První způsob statistického vyhodnocování byl proveden pomocí programu MVSP (algoritmus UPGMA - percent similarity). Druhý způsob vyhodnocování byl proveden programem STATISTICA (algoritmus UPGMA - percent disagreement). Oba programy shodně odlišily odrůdy, které vykazovaly 100% podobnost pro všechny sledované oblasti bílkovinného spektra. Dosažené výsledky rozlišení odrůd se mezi programy mírně lišily ve výpočtu podobnostních koeficientů odrůd, což je způsobeno použitím rozdílných algoritmů.

Mezi nevýhody vizuálního hodnocení, oproti jiným metodám, patří silnější subjektivita při hodnocení gelů. Mezi výhody patří větší jednoduchost a rychlost provedení (ČURN, SÁKOVÁ 1999).

Vyhodnocování gelů s využitím UPGMA clusterové analýzy je rovněž často využívanou metodou pro studium biochemické variability odrůd brambor. Tento způsob vyhodnocování brambor použili např. KORMUŤÁK et al. (1999) a BÁRTA et al. (2003).

7. Závěr

Z výsledků dosažených v této diplomové práci lze vyvozovat následující závěry:

V oblasti patatinových bílkovin byly zaznamenány maximálně 3 hmotnostní izomery (u odrůd Filea, Milva, Remarka a Bionta). U ostatních odrůd byly zaznamenány jeden nebo dva hmotnostní izomery. Nejnižší molekulová hmotnost byla zaznamenána u odrůdy Milva (38.588 kDa) a nejvyšší u odrůdy Filea (43.986 kDa). Hodnoty jednotlivých hmotnostních izomerů se nejčastěji pohybují kolem hodnot 39, 41 a 43 kDa. Variabilita zásobních bílkovin v oblasti patatinového komplexu je velmi nízká.

Vyšší variabilita byla zaznamenána u bílkovin v oblasti inhibitorů proteas. Nejvyšší počet pruhů (10) v této oblasti byl nalezen u odrůdy Amylex. Naopak nejmenší počet pruhů (5) byl zaznamenán u odrůdy Markies. V případě vizuálního hodnocení byl nejmenší počet pruhů (4) nalezen u odrůdy Granola. Nejčastěji naměřené hodnoty molekulových hmotností pro oblast inhibitorů proteas se pohybovaly v rozmezí od 19 do 23 kDa. Nejnižší molekulová hmotnost byla zaznamenána u odrůdy Apolena (11.768 kDa) a nejvyšší u odrůdy Marena (23.261 kDa). Vyšší variabilita inhibitorů proteas oproti patatinovým bílkovinám je patrná i z výsledných dendrogramů.

Při vyhodnocování celkového bílkovinného spektra digitální obrazovou analýzou byla 100% míra genetické podobnosti nalezena u dvou dvojic odrůd (Agria – Redstar; Bettina – Asterix). V případě vizuálního vyhodnocování gelů byla 100% míra genetické podobnosti nalezena u tří dvojic odrůd (Amylex - Lady Rosetta; Bettina - Markies; Filea - Bionta).

Vhodnějším způsobem pro vyhodnocování jednotlivých elektroforetických spekter zásobních bílkovin technikou SDS-PAGE je digitální obrazová analýza z důvodů vyšší přesnosti a objektivity získaných výsledků. Nevýhody programu BioProfil 1D++ pro účely digitální obrazové analýzy lze spatřovat v jeho nekompatibilitě s ostatními programy a také v tom, že není schopen měřit intenzitu jednotlivých proužků na gelu, čímž se ztrácí určitá část odrůdové variability využitelná k odlišení odrůd.

Na základě výsledků analýzy mezi 17 evropskými a 3 českými odrůdami brambor elektroforetickou technikou SDS - PAGE (*Solanum tuberosum* L.) se prokázala biochemická variabilita zásobních bílkovin na odrůdové úrovni. Při charakterizaci jednotlivých odrůd brambor touto technikou se mi nepodařilo od sebe odlišit všechny zvolené odrůdy. Použití techniky SDS-PAGE bílkovinných profilů hlíz na modelovém souboru dvaceti odrůd brambor tak naznačuje, že je tato metoda použitelná pro odlišování vybraných dvojic odrůd. Pro jednoznačnou identifikaci konkrétní odrůdy v rámci velkého souboru odrůd bude zřejmě potřebné komplexní použití více proteinových a isoenzymových systémů v kombinaci s DNA markery.

8. Seznam použité literatury

1. **ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.** Molecular biology of the cell (fourth edition). New York: Garland Science, 2002, 1487 p., ISBN 0-8153-4072-9.
2. **ANDREWS, A. T.** Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications (second edition). New York: Oxford Univ. Press, 1993, 452 p., ISBN 0-19-854632-7.
3. **ANONYM 1.** Katalog odrůd brambor. Havlíčkův Brod: ÚBS ČR, 2002, 250 s.
4. **ANONYM 2.** Katalog odrůd brambor. ÚBS ČR, Havlíčkův Brod, 2004, 275 s.
5. **ANONYM 3.** Protein electrophoresis – application guide. San Francisco: Hoefer Scientific Instruments, 1994, 160p.
6. **ANONYM 4.** Bio-Rad laboratories – gel drying systems, online brochure. citace dle [14.4.2007]. Dostupné na: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1965.pdf
7. **ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY, D.; HILLEL, J.; VEILLEUX, R. E.** Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. Genome, 2001, vol. 44, no. 1, p. 50-62.
8. **BÁRTA, J.** Charakteristika enzymového a bílkovinného spektra v hlízách brambor pomocí elektroforézy. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita – Zemědělská fakulta, 1997, 82 s.
9. **BÁRTA, J.** Studium vlivu dusíkatého hnojení na kvalitu konzumních brambor. Doktorská disertační práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta, 2002, 191 s.
10. **BÁRTA, J.; ČURN, V.; DIVIŠ, J.** Study of biochemical variability of potato cultivars by soluble protein, isoesterase, and isoperoxidase electrophoretic patterns. Plant Soil Environ., 2003, vol. 49, no.5, p. 230 – 236.
11. **BÁRTA, J.; ČURN, V.** Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. Chemické listy, 2004, roč. 98, s. 373 - 378.
12. **BRADOVÁ, J.; SÝKOROVÁ, S.** Optimalizace metod elektroforézy proteinů pro identifikaci odrůd ječmene (*Hordeum Vulgare* L.). Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006, 36 s., ISBN 80-86555-97-6.

13. **CERKAL, R; HRSTKOVÁ, P; STŘEDA, T.** Obilniny, 2003, citace dle [14.3.2007].
Dostupné na <http://old.mendelu.cz/~upsr/prezentace/obilniny/contents/odrada.html>
14. **ČURN, V.; SÁKOVÁ, L.** Speciální genetika (cvičení). 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta, 1999, 122 s., ISBN 80-7040-379-9.
15. **ČURN, V.; DOLANSKÁ, L.** Soubor metodik a laboratorních protokolů používaných v laboratoři Aplikované molekulární biologie, 2003, citace dle [18.9.2006].
http://www.eamos.cz/amos/kpc/modules/low/kurz_obsah.php?kod_kurzu=kpc_2466
16. **DESBOROUGH, S. L.; PELOQUIN, S. J.** Disc electrophoresis of tuber proteins from *Solanum* species and interspecific hybrids. *Phytochemistry*, 1966, vol. 5, p. 727 - 733.
17. **DESBOROUGH, S. L.; PELOQUIN, S. J.** Esterase isozymes from *Solanum* tubers. *Phytochemistry*, 1967, vol. 6, p. 989 – 994.
18. **DESBOROUGH, S. L.; PELOQUIN, S. J.** Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *American Potato Journal*, 1968, vol. 45, p. 220 – 229.
19. **DIVIŠ, J.; JŮZA, J.; MOUDRÝ, J.; VONDRYS, J.:** Pěstování rostlin. 1. vydání. České Budějovice. Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta, 2000, 258 s., ISBN 80-7040-456-6.
20. **DOUCHES, D.S.; LUDLAM, K.** Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. *American Potato Journal*, 1991, vol.68, p. 767-780.
21. **DVOŘÁČEK, V.; ČURN, V.** Evaluation of protein fractions as biochemical markers for identification of spelt wheat cultivars (*Triticum spelta* L.) *Plant Soil Environ.*, 2003, vol. 49, no.3, p. 99 – 105.
22. **GRAMAN, J.; ČURN, V.; SÁKOVÁ, L.** Elektroforéza isoenzymů a neenzymatických bílkovin - metody a aplikace v genetice a šlechtění rostlin. *Genetika a šlechtění*, 1995, roč. 31, s. 207-228.
23. **GRAMAN, J.; ČURN, V.** Šlechtění rostlin (Obecná část). 1.vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta, 1997, 133 s., ISBN 80-7040-255-5.
24. **JUDD, R. C.** SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. In: Walker J. M. (ed.). *The protein protocols – Handbook* (2nd edition). Humana Press, Totowa, New Persey, 2002, 1146 p., ISBN 0-89603-941-2.

25. **JŮZL, M.; PULKRÁBEK, J.; DIVIŠ, J.** Rostlinná výroba III – okopaniny. 1. vydání. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2000, 232 s., ISBN 80-7157-446-5.
26. **KONINGSVELD, VAN G. A.** Physico – chemical and functional properties of potato proteins. Dissertation. Wageningen: Wageningen University, 2001, 147 p., ISBN 90-5808-444-2.
27. **KORMUŤÁK, A.; HELDÁK, J.; ŠUBOVÁ, D.** Soluble proteins and isoesterases as taxonomic markers tested on nine wild *Solanum* species and eight Slovakian potato varieties. *Potato Research*, 1999, vol. 42, no.3, p. 619 – 626.
28. **McGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L.** A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000, vol. 113, no.2, p. 135-144.
29. **MED, J.** Přehledy odrůd: brambory, 1. vydání, Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2005, 115 s. ISBN 80-86548-66-X.
30. **MIGNERY, G. A.; PIKAARD, C. S.; HANNAPEL, D. J.; PARK W. D.** Isolation and sequence – analysis of cDNAs for the major potato – tuber protein, patatin. *Nucleic Acids Research*, 1984, vol. 12, p. 7987 – 8000.
31. **NIELSEN, G.** The use of isozymes as probes to identify and label plant varieties and cultivars. In: LISS, A. R.: *Isozymes. Curr. Top. Biol. Med. Res.*, 1985, vol. 12, p.1 – 32.
32. **NIETO, A. R.; SANCHO, A. CH.; BARROS, M. V.; GORGE, J. L.** Peroxidase zymograms at constant and gradient pH electrophoresis. An analytical test in the identification of potato varieties. *J. Agric. Food. Chem.*, 1990, vol. 38, p. 2184 – 2153.
33. **OLIVER, J. L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.** A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. *Theoretical and Applied Genetics* , 1985, vol. 69, no.3, p. 305-311.
34. **PAIVA, E.; LISTER, R. M.; PARK, W. D.** Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. *Plant Physiology*, 1983, vol. 71, p.161-168.
35. **PELIKÁN, M.; SÁKOVÁ, L.;** *Jakost a zpracování rostlinných produktů*. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta, 2001, 235 s., ISBN 80-7040-502-3.

36. **POPPR, J.; HOLÁ, Z.** Užití izoelektrické fokusace k identifikaci odrůd brambor. Rostlinná výroba, 1993, roč. 39, s. 1057 – 1063.
37. **POŠVEC, Z.; KRULÍČKOVÁ, K.** Isozymové markery - účinná pomoc při popisu genových zdrojů lnu. Úroda, 1999, roč. 47, č.6, s. 34-35.
38. **POTS, A. M.; GRUPPEN, H.; DIEPENBEEK, VAN R.; LEE, VAN DER J. J.; BOEKEL, VAN M. A. J. S.; WIJNGAARDS, G.; VORAGEN, A. G. J.** The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and proease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI TOF mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999a, vol. 79, p.1557 – 1564.
39. **POTS, A. M.** Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin the major potato tuber protein: Dissertation. Wagenigen: Wagenigen University, 1999b, 139 p., ISBN 90-5808-045-5.
40. **POTS, A. M.; GRUPPEN, H.; HESSING, M.; BOEKEL VAN M. A. J. S.; VORAGEN, A. G. J.** Isolation and characterization of patatin isoforms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999c, vol. 47, p. 4587-4592.
41. **POVREAU, L.; GRUPPEN, H.; PIERSMA, S. R.; BROEK, VAN DEN, L. A. M.; KONINGSVELD, VAN G. A.; VORAGEN, A. G. J.** Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, vol. 49, p. 2864 – 2874.
42. **POVREAU, L.** Occurence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber (*Solanum tuberosum*): Dissertation. Wagenigen: Wagenigen University, 2004, 157 s., ISBN 90-8504-023-X.
43. **PTÁČEK, J.; POLZEROVÁ, H.; KREUZ, L.; DĚDIČ, P.; DOMKÁŘOVÁ, J.** Současné možnosti identifikace odrůd bramboru, Bramborářství, 2004, roč. 12, č.3, s. 4-6.
44. **RAJAPAKSE, D. P.; IMAI, T.; ISHIGE, T.** Analysis of potato microtuber proteins by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Potato Research, 1991, vol. 34, no. 3, s. 285 – 293 p.
45. **RYBÁČEK, V.** Brambory. 1. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988, 360 s.

46. **ŘEHOUT, V.; ČÍTEK, J.; SÁKOVÁ, L.** Genetika I. (úvod do studia genetiky). 1 vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita – Zemědělská fakulta, 2000, 256 s., ISBN 80-7040-405-1.
47. **SÁKOVÁ L.; ČURN, V.** Speciální genetiky rostlin. 1 vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita – Zemědělská fakulta, 1996, 147 s., ISBN 80-7040-192-3.
48. **SHEWRY, P. R.** Tuber storage proteins. *Annals of Botany*, 2003, vol. 91, no.7, p. 755 – 769.
49. **STIEKEMA, W. J.; HEIDEKAMP, F.; DIRSKE, W. G.; BECKUM, VAN J. HAAN DE P.; BOSCH, TEN C.; LOUWERSE, J. D.** Molecular cloning and analysis four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 1988, vol.11, no.3, p. 255 – 269.
50. **SÝKOROVÁ, S.; HADAČOVÁ, V.** Využití isoenzymů pro určování některých hospodářsky důležitých druhů a jejich kultivarů. *Rostlinná výroba*, 1992, roč. 38, s. 861-875.
51. **SÝKOROVÁ, S.** Identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) pomocí elektroforézy proteinů a enzymů. *Rostlinná Výroba*, 1999, roč. 45, s.193 – 196.
52. **SÝKOROVÁ, S.** Kontrola odrůdové deklarace – nástroj pro ochranu spotřebitele. *Úroda*, 2002, roč. 50, č.2, s. 8 – 9.
53. **TONÓN, C.; DALEO, G.; OLIVA C.** An acidic β -1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, vol. 39, p. 849 – 854.
54. **TWELL, D.; OOMS, G.** Structural diversity of the patatin family in potato cv. Désirée. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, vol. 212, no. 2, p. 325-336.
55. **VILBER, LOURMAT.** BioProfil, BIO-1D++, Version 99. Image Analysis Software., 1999, 231 p.
56. **VODRÁŽKA, Z.** Biochemie. 1.vydání. Praha: Academia, 1996, 506 s., ISBN 80-7169-056-2.
57. **WENDEL, J. F.; WEEDEN, N. F.** Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis D. E. a Soltis P. S. (eds.): *Isozymes in plant biology*. Portland: Dioscorides press, 1989, p. 5 – 45, ISBN 0-931146-13-5.
58. **WESTERMEIER, R.** Electrophoresis in Practice. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993, 277 p., ISBN 3-527-30012-0.

59. **UPOV.** Draft test guidelines TWA 31/6 for potato document TG/23/6(PROJ.1). Rio de Janeiro: Thirty-first session. Technical working party for agricultural crops. International union for the protection of new varieties of plants, 2002, 58 p.
60. **UPOV.** Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability for potato document TG/23/6. Geneva: International union for the protection of new varieties of plants, 2004, 35 p.
61. **ZÁKON č. 110/1997 Sb.** o potravinách, ze dne 24. dubna 1997, ve znění pozdější předpisů.
62. **ZÁKON č. 408/2000 Sb.** o ochraně práv k odrůdám rostlin a o změně zákona č. 92/1996 Sb., o odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin, ze dne 25. října 2000, ve znění pozdějších předpisů .

9. Přílohy

Seznam použitých zkratk:

2D-PAGE	dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza
6-PGD	6-Fosfogukonát dehydrogenáza
AC	akrylamid
ACETYL. CEL.	elektroforéza na acetylcelulóze
ADH	alkohol dehydrogenáza
BBM	biochemické bílkovinné markery
BIS	N, N'-methylén-bis-akrylamid (bisakrylamid)
EST	esteráza
GOT	glutamát – oxalocetát transamináza
IEF	isoelektrická fokusace
PAGE HB	polyakrylamidová elektroforéza v homogenním pufovému systému
PAGE MPB	polyakrylamidová elektroforéza v multifázovém pufovému systému
PER	peroxidáza
PGGE	polyakrylamidová koncentrační gradientová elektroforéza
PGI	fosfoglucoizomeráza
PGM	fosfoglukomutáza
SDS	dodecyl sulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti detergentu SDS
SGE	škrobová elektroforéza
TEMED	N, N, N',N' -tetramethylethyléndiamin
TRIS	tris – (hydroxymethyl)-aminomethan