

VYSOKOŠKOLSKÉ SKRIPTÁ

Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity



Pavol Múdry

**POLYMORFIZMUS ENZÝMOV RASTLÍN
V BIOLÓGII A V BIOTECHNOLÓGII**

3. časť

Izozymogramy, ich genetická interpretácia a rozsah diverzity polymorfizmu enzýmov

2015

© RNDr. Pavol Múdry, CSc., 2015

Recenzenti: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

prof. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.
Schválené vedením Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity **dňa 11. 11. 2015** ako skriptá
pre Pedagogickú fakultu TU.

ISBN 978-80-8082-871-4

PREDHOVOR

Základnou črtou súčasného biologického bádania je aplikácia poznatkov základného výskumu získaných v rovine intenzívneho rozvoja molekulovej biológie, biochémie a genetiky vo výrobnjej, ale aj v spoločenskej praxi. Zatiaľ nie sú známe indície, že by tento trend v blízkej, ani vo vzdialenej budúcnosti, významne ovplyvnila iná alternatívna rovina základného a aplikovaného biologického výskumu. Každý ďalší rok vo výskume uvedených vedných disciplín čoraz nástojčivejšie dokazuje, že je pravdepodobná transformácia metód získavania poznatkov, ich vyhodnocovanie a systematizácia aj v klasických biologických vedných odboroch. Často riešenie mnohých výskumných cieľov nastoľuje množstvo otázok, ktoré prekračujú rovinu biologického poznania a dotýkajú sa roviny spoločenskej, a to etických, morálnych a právnych noriem. Výskum a vývoj nových biotechnologických výrobných postupov a metodologických prístupov skvalitnenia života každého človeka nás priviedol zaradiť do študijných plánov Katedry biológie, Pedagogickej fakulty, Trnavskej univerzity predmet biotechnológia, ktorý sa stal pre stupeň magisterského štúdia povinne voliteľným predmetom. Stáva sa nevyhnutnosťou, aby nová generácia učiteľov mala základné poznatky z oblasti biotechnologického výskumu a názory na spoločenské dopady aplikácie jeho výsledkov. Dôležitým aspektom je, aby učiteľ biológie hlavne na stredných školách využil tieto poznatky na zdôraznenie významu biotechnológii a aplikovanej biológie v národnom hospodárstve a bol pripravený výchovne pôsobiť aj pri ich profesionálnej orientácii v rámci výberu adekvátneho odboru vysokoškolského štúdia. Študenti bakalárskeho a magisterského stupňa štúdia na našej fakulte, študenti doktorandského štúdia a vedeckí pracovníci z fakúlt iných univerzít a vedeckých pracovísk už sedemnášť rokov prejavujú aktívny záujem o výskum a aplikáciu polymorfizmu enzýmov rastlín v praxi. Hlavným dôvodom pre napísanie aj týchto tretích vysokoškolských učebných textov bola absencia dostupnej literatúry v slovenskom jazyku, ktorá by riešila analytickú a interpretačnú stránku polymorfizmu enzýmov.

Učebné texty sú neoddeliteľnou súčasťou predošlých dvoch učebných textov (Múdry, 2011, 2012), pretože zvládnutie metodológie analýzy a zdokumentovanie polymorfizmu konkrétneho rastlinného druhu bez odborného čítania zymogramov na úrovni jeho genetickej interpretácie nie je úplné. V učebných textoch sú uvedené základné pojmy, princípy, všeobecné schémy a diagramy izozymogramov, fotografické snímky a príklady genetickej interpretácie ich zymogramov hlavne pre modelovú plodinu, na ktorej sa najintenzívnejšie študovala diverzita zárodočnej plazmy na báze polymorfizmu enzýmov, a kde sa analýzy aj

v súčasnosti využívajú v genetike, v šľachtení a v semenárstve. Modelovou plodinou je kukurica siata – jej krajové odrody, línie a hybridy.

Učebné texty majú vymedzený rozsah, a preto v nich nie je možné uviesť izozymogramy a ich genetickú interpretáciu všetkých rastlinných druhov známych z vedeckej literatúry. Nie je možné sa venovať ani všetkým hospodársky cenným druhom rastlín, ktoré boli riešené počas dvadsaťdva ročnej histórie a súčasného riešenia polymorfizmu enzýmov v našom laboratóriu.

Som pevne presvedčený, že aj tieto učebné texty prispievajú k hlbšiemu pochopeniu kauzality prejavu polymorfizmu enzýmov, bez ktorej nie je možné vyhodnocovať kompletnosť izozymogramov a poskytnúť ich genetickú interpretáciu na úrovni lokusov a konkrétnych alel. Význam exaktnejšieho a adekvátnejšieho popisu polymorfizmu enzýmov je aj väčšou garanciou publikovateľnosti a využiteľnosti dosiahnutých analytických výsledkov.

Tretia časť učebných textov je podobne určená, ako prvá a druhá, predovšetkým študentom biológie, biochémie, genetiky a biotechnológií, ale aj pre študentov aplikovaných vedných odborov, v ktorých má poznanie polymorfizmu enzýmov využitie. Sú vhodné pre vedeckých pracovníkov, ktorí budú chcieť obohatiť svoje poznanie o genetickú interpretáciu polymorfizmu enzýmov, ale aj pre laickú verejnosť, ktorá si chce rozšíriť pohľad na funkciu a využitie enzýmov a ich izoforiem v živom rastlinnom organizme.

RNDr. Pavol Múdry, CSc.

autor

1 ÚVOD

Elektroforéza je frekventovane využívanou chromatografickou metódou separácie látok zo zmesi látok nesúcich náboj. Zonálna alebo gélová elektroforéza pri ich separácii využíva rozdiely v ich nábojoch v spojení s rozdielnou veľkosťou ich molekúl. Nevyhnutnou podmienkou teoretickej i praktickej aplikácie výsledkov aj elektroforetickej separácie izoforiem enzýmov je zvládnutie všetkých postupných metodologických krokov analýz pre jednotlivé rastlinné druhy so zreteľom na charakter analyzovanej vzorky (časť alebo celé pletivo, orgán, rastlina). Existuje veľa faktorov, ktoré môžu mať vplyv na výsledok analýz. O najdôležitejších z nich pojednávajú prvé učebné texty, v ktorých sú riešené aj jednotlivé metodologické kroky analýz polymorfizmu a spôsoby a príklady vyhodnocovania izozymogramov (Múdry, 2011). Nie je nič výnimočné, že aj publikované výsledky rôznych autorov za odlišných analytických podmienok sa od seba odlišujú kompletnosťou zobrazenia izoforiem na izozymogramoch. Ak ide o rastlinný druh značného ekonomického významu a poznanie jeho polymorfizmu enzýmov sa dostalo až na úroveň štandardizácie metodologického postupu analýz a súčasne dosiahlo úrovne poznania štruktúry a genetickej podmienenosti, v tom prípade je situácia diametrálne odlišná. Štandardizované metodologické postupy analýzy polymorfizmu enzýmov na konkrétnom biologickom materiáli získanom za konštantných a stálych kultivačných podmienok, poznanie štruktúry analyzovaných enzýmov a genetickej podmienenosti expresie polymorfizmu vedie k poznaniu rozsahu diverzity zárodočnej plazmy a ku zhodnej genetickej interpretácii polymorfizmu enzýmov vo vzorkách analyzovaných rôznymi laboratóriami a testovacími pracoviskami. Štandardizované metodologické postupy sú využívané po celom svete, čo garantuje zhodu získaných výsledkov. Najprecíznejšie je v tomto smere prepracovaná štandardizovaná metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov v koleoptile kukurice siatej (*Zea mays* L.) horizontálnou elektroforézou na šrobovom géle, až po poznanie rozsahu diverzity zárodočnej plazmy a genetickú interpretáciu polymorfizmu tohto druhu. Z poľnohospodárskych plodín v praxi ďalej našli uplatnenie metodológie analýzy polymorfizmu enzýmov v suchých semenách hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), cícera baranieho (*Cicer arietinum* L.), hrachora siateho (*Lathyrus sativus* L.), sóje fazuľovej (*Glycine max.* [L.] Merr.), v listoch kostravy trsteníkovitej (*Festuca arundinacea* Schreb.) a mätonoha trváceho (*Lolium perenne* L.). Jednotlivé metodologické postupy sú uvedené v druhých skriptách aj s príkladmi výpočtov a možnosťami využitia polymorfizmu enzýmov v základnom výskume a v aplikovanej rovine (Múdry, 2012). Máme metodologické skúsenosti aj s analýzou polymorfizmu enzýmov v suchých semenách ovsa siateho (*Avena sativa* L.), mrlíka čílskeho (*Chenopodium quinoa* Wild.), šošovice jedlej (*Lens culinaris* Medik.), v trojdňových klíčencoch ďateliny plazivej

(*Trifolium repens* L.) a v semenách, listoch a v troj- a šesťdňových klíčencoch láskavca metlinatého (*Amaranthus cruentus* L.). Posledné tri roky, vďaka projektu Grantovej agentúry VEGA, projekt č. 1/0513/13: “Detekcia genetickej variability obilnín molekulárnymi markermi“, sa analyzuje a študuje rozsah diverzity zárodočnej plazmy genofondu druhov rodu láskavec (*Amaranthus* L.), ovsu siateho a mrlíka čílskeho z depozitu Génovej banky, Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra, Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch. I keď v súčasnosti sa tak intenzívne neštuduje polymorfizmus enzýmov poľnohospodársky cenných rastlinných druhov, je dostatok každoročne publikovaných prác riešiacich polymorfizmus enzýmov dosiaľ neprebádaných druhov rastúcich vo voľnej prírode. Ďalšiu skupinu publikovaných prác tvoria tie, ktoré riešia význam polymorfizmu enzýmov pre rastliny v podmienkach pôsobenia konkrétnych stresových faktorov.

História štúdia polymorfizmu enzýmov má päťdesiatšesť ročnú tradíciu. Poznanie genetickej interpretácie polymorfizmu jednotlivých druhov enzýmov trvalo niekoľko desaťročí a pre niektoré druhy nie je úplne známa ani v súčasnosti. V prípade kukurice siatej, ako modelovej plodiny, poznanie genetickej interpretácie polymorfizmu študovaných enzýmov trvalo temer tri desaťročia. Tento proces zahŕňal poznanie kvartérnych štruktúr jednotlivých enzýmov a ich reálnej diverzity v globálnej zárodočnej plazme kukurice, až po poznanie miest výskytu lokusov na chromozómoch zodpovedných za expresiu ich izoforiem (tvorba chromozómovej mapy). Celý poznatkový potenciál sa skladal ako mozaika a je výsledkom precíznej experimentálnej práce mnohých pracovných tímov významných svetových vedeckých centier, pracovísk a laboratórií, s ktorými sa zoznámime v jednotlivých kapitolách učebného textu vrátane výsledkov, ktoré sme získali v našom laboratóriu dlhoročnou experimentálnou prácou.

2 VŠEOBECNÉ ZÁSADY GENETICKEJ INTERPRETÁCIE POLYMORFIZMU ENZÝMOV RASTLÍN

Genetickej interpretácii polymorfizmu enzýmov rastlín je čiastočne venovaná pozornosť už v prvých učebných textoch (Múdry, 2011), pretože globálna informácia je podstatne zložitejšia je potrebné sa s ňou znovu oboznámiť v ucelenejšej podobe. Nevyhnutnou súčasťou genetickej interpretácie polymorfizmu enzýmov je predovšetkým úspešná elektroforetická separácia enzýmov, ktorej výsledkom po dôkladnej vizualizácii zón enzýmovej aktivity je izozymogram (fingerprint) s kvalitne oddelenými jednotlivými škvrnami (pásmi) reprezentujúcimi konkrétne izoformy. Pretože čitateľnosť izozymogramov

sa ich dočasným odložením alebo trvalým konzervovaním môže zhoršiť, je dôležité po detekcii izoforiem na škrobovom géle zaznamenať polohu škvŕn na milimetrovej sieti a izozymogramy sfotografovať. Tento postup je zvlášť dôležitý v prípadoch tých druhov enzýmov, ktoré i pri kvalitnej elektroforéze nie sú excelentne čitateľné. Pre pochopenie a odstránenie chýb v separácii izoforiem musí byť k dispozícii protokol k analýze, v ktorom sú zaznamenané podstatné údaje o jej podmienkach, priebehu a uchovaní izozymogramov. Prvým krokom interpretácie je poznanie nomenklatúry enzýmov, systému a spôsobov značenia ich izoforiem. Bez tohto kroku je prakticky nemožné kvalitné štatistické vyhodnotenie výsledkov analýz. Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov konkrétneho rastlinného druhu vychádza z poznania rozsahu diverzity polymorfizmu jeho zárodočnej plazmy, kvartérnej štruktúry enzýmov, spôsobu genetickej expresie lokusov pre polymorfizmus enzýmov, inter- a intralokusových interakcií a poznania výskytu artefaktových zón.

Po farbení a inkubácii škrobových gélov sa na géle objaví viditeľný vzor, ktorý je charakteristický (fingerprint – odtlačok prstov) pre konkrétny enzým (pre ktorý bol vyfarbený) rastlinného pletiva alebo jeho časti, daného veku a etapy vývinu. Zreteľne odlišné vzory zymogramov sa v literatúre uvádzajú, ako **zymotypy**, elektroforetické varianty alebo **elektromorfy**. Tieto vzory sú **fenotypmi** im prislúchajúcich enzýmových lokusov.

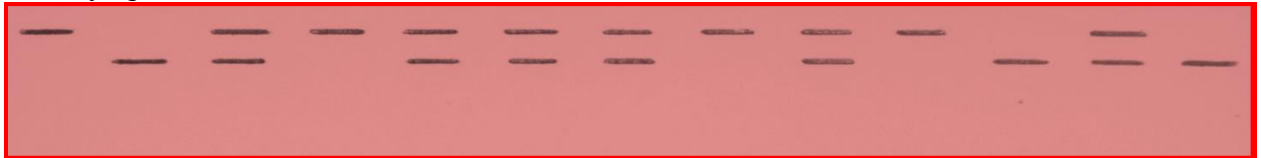
Vzory polymorfizmu enzýmov sa môžu odlišovať rozdielnou pohyblivosťou jedného alebo viacerých izoenzýmov alebo chýbaním jedného alebo viacerých izoenzýmov (napr. nulové varianty). Nulové varianty sú často pod kontrolou jednotlivého génu a v heterozygotnom stave to vedie k absencii pásu (škvŕny) simulujúc dominantný prejav génu (Pierce a Brewbaker, 1973). Nulový variant je výsledkom zmien v polypeptidovom reťazci, ktoré ovplyvňujú aktivitu enzýmu (Gorman a Kiang, 1978). Skôr, ako je urobený záver z analýzy polymorfizmu enzýmov, v ktorom sa konštatuje výskyt nulovej alely, je potrebné sa dôkladne presvedčiť zopakovaním analýz. V niektorých prípadoch aktivita enzýmu môže byť tak slabá, že je za konkrétnych podmienok nedetekovateľná.

Ak elektroforéza bola zrealizovaná správne, farbenie gélov bude viesť k zjednodušeným vzorom pásov, resp. škvŕn (fingerprintom). Odlišnosť vzorov fingerprintov medzi jedincami je možné geneticky vyhodnotiť spôsobom, ako každý iný fenotyp (Obr. 1a – g).

P1 **P2** **F1** _____ **F2** _____



a) Schémy izozymogramov viazanosti enzýmov na jadro alebo cytoplazmu alebo na jadro a cytoplazmu súčasne



b) Schémy izozymogramov dimorfného lokusu a monoméneho enzýmu



c) Schémy izozymogramov podobnej situácie, ako je uvedená vyššie



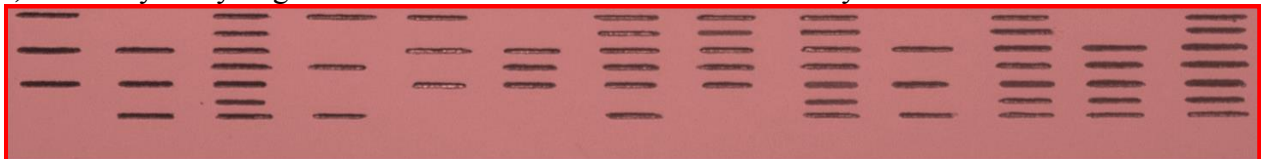
d) Schémy izozymogramov pri cytoplazmatickej dedičnosti



e) Schémy izozymogramov dimorfného lokusu a nulovej alely



f) Schémy izozymogramov dimorfného lokusu a diméneho enzýmu



g) Schémy izozymogramov dvoch dimérnych lokusov a ich inter- a intragénych heterodimérov

Obr. 1a – g: Genetická interpretácia elektroforetickej variability izozymogramov (prepracované podľa Shields, Orton a Stuber, 1983)

Vysvetlivky: P1, P2 – rodičovské (parentálne) generácie; F1, F2 – prvá a druhá dcérska (filiálna) generácia

Genetickú interpretáciu izoenzymových vzorov (izozymogramov) uľahčuje poznanie ich genetickej podmienenosti. Identifikácia izoenzymov je nevyhnutná, pretože:

- pás alebo škvrna na zymograme nemusí nevyhnutne patriť len jednej izoforme,
- určitý izoenzym môže byť molekulárnym hybridom, ktorý je produktom dvoch alebo viacerých lokusov,
- nie často, ale niektoré proteíny môžu reagovať s tlmivými roztokmi za prejavu falošných pásov; k vzniku artefaktových pásov môže prispieť molekulová nestabilita proteínov, ktorá môže byť výsledkom toho, že vzorka je stará, alebo tým, že analýza sa neuskutočnila dostatočne rýchlo po príprave vzorky,
- nové pásy môžu vzniknúť aj zásahmi do metodiky (zmena tlmivých roztokov, pH atď.).

2.1 Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov (štruktúra a rozsah variability polymorfizmu, inter- a intralokusové interakcie)

Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov je najnáročnejšia časť vyhodnocovania analýz. Prevažná časť aj publikovaných prác obchádza genetickú interpretáciu výsledkov, pretože autori nepoznajú všetky práce, ktoré k nej vedú alebo nie je predmetom ich výskumného zámeru. V takomto prípade práce dokumentujú polymorfizmus enzýmov študovaných genotypov izozymogramami alebo ich diagramami, R_m faktorom alebo označením druhu fenotypového prejavu vzorky. Ideálnou situáciou je, ak rastlinný druh je tak intenzívne študovaný, že je genetická interpretácia polymorfizmu analyzovaných enzýmov známa vrátane ich biochemickej štruktúry. Aj v takomto prípade je potrebné preštudovať všetky práce vedúce k poznaniu genetickej interpretácie. Často ide o práce publikované v priebehu posledných 40 – 50 rokov vedeckými kolektívami konkrétnych svetových laboratórií.

Ak je študovaný druh z pohľadu poznania genetickej interpretácie polymorfizmu enzýmov takmer neznámy, je potrebné sa zamerať na:

- a) vývoj, výber a adaptáciu vhodného metodologického postupu analýzy polymorfizmu pre analyzované vzorky,
- b) poznanie rozsahu diverzity zárodočnej plazmy analyzovaného druhu – analýza 50 – 400 odrôd v závislosti od distribúcie diverzity v súbore,
- c) v nejasných prípadoch využiť možnosti overenia genetickej analýzou krížení vhodných rodičovských genotypov,

- d) stanovenie typu fenotypového prejavu polymorfizmu (väčšinou je to kodominancia),
- e) určenie kvartérnej štruktúry enzýmu, ktorého polymorfizmus analyzujeme,
- f) určenie alebo vylúčenie prejavu jedného lokusu, dvoch alebo viacerých lokusov pri polymorfizme enzýmu,
- g) na prípadnú rozdielnu silu prejavu jednotlivých alel a na výskyt nulovej alely,
- h) výskyt artefaktových pásov vo fingerprintoch.

Polymérne alebo oligomérne enzýmy majú mnohotné štrukturálne gény kódujúce odlišné podjednotky holoenzýmu. Kombináciou týchto podjednotiek sa tvoria rôzne izoenzýmy. Izoenzýmy vznikajú náhodnou kombináciou podjednotiek a počet izoenzýmov, ktorý môže vzniknúť pri diploidnom organizme možno vypočítať podľa vzťahu:

$$i = (s + p - 1)! / [p! (s - 1)!]$$

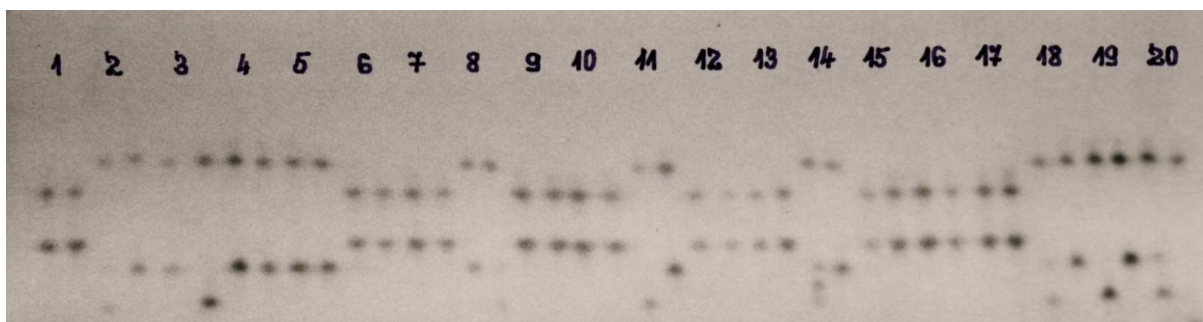
kde i – je počet izoenzýmov (škvŕn alebo pásov na zymograme), p – je počet polymérov (ktoré sa podieľajú na stavbe polymérneho holoenzýmu) a s – je počet odlišných podjednotiek alebo variantov polymérov. Je potrebné však spomenúť, že nie vždy všetky vypočítané varianty izoenzýmov sa reálne aj v študovanom druhu syntetizujú. Určité kombinácie nie sú možné pre náboj podjednotiek, a preto sa v živých systémoch ani nevyskytujú. V mnohých prípadoch sú izozymogramy podstatne zložitejšie s väčším počtom izoforiem prítomných vo vzorke a s komplikovanejšou interpretáciou, ako je uvedená v kap. 2.1. Hlavne ak ide o polymorfizmus, za ktorý zodpovedá viac génov ako jeden pri diploidnom organizme, alebo ak ide náhodou o iný spôsob fenotypového prejavu, ako je kodominantný alebo, ak je organizmus polyploidný. V týchto prípadoch je potrebné siahnuť po vhodnej literatúre, v ktorej sú publikované príklady fingerprintov alebo ich diagramy (originály prác, katalógy fingerprintov, knižné publikácie). Z publikácií sú to napr. práce publikované autormi – Tanksley a Orton (1983a, b), Soltis a Soltis (1989) a Acquaah (1992).

2.2 Nomenklatúra izoenzýmov

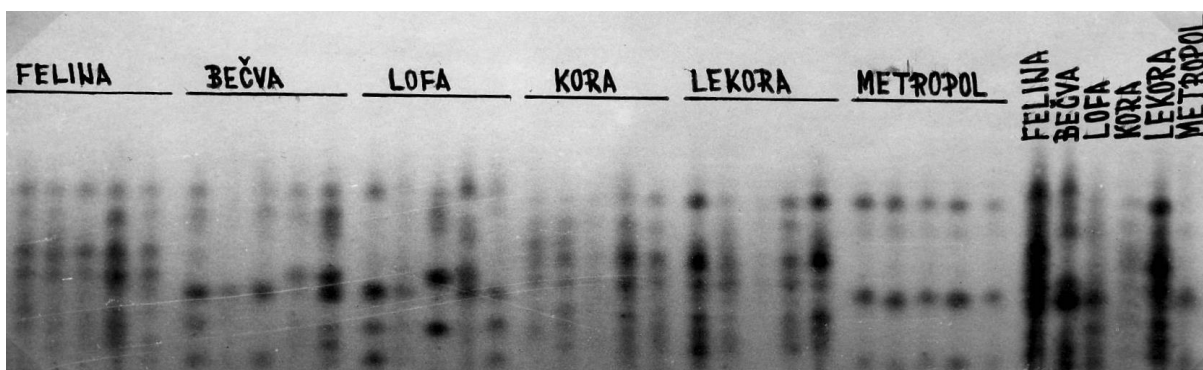
Pre interpretáciu výsledkov analýz polymorfizmu enzýmov je veľmi dôležité poznať spôsoby označovania enzýmov, alel a lokusov. Pre označovanie enzýmu sa namiesto často zložitého vedeckého názvu používa skratka používaného názvu enzýmu. Ako príklad možno uviesť vedecký názov podľa Medzinárodnej komisie pre biochemickú nomenklatúru enzýmu L-aspartát: 2-oxoglutarát aminotransferáza, najčastejšie požívaný názov je glutamát oxaloacetáttransamináza, novšie používaný názov je aspartátaminotransferáza a potom skratky, ktoré sa používajú na vyjadrenie enzýmu sú **GOT** a **AAT**. Pre väčšinu

enzýmov sa používa jedna skratka. Pri publikovaní výsledkov je zaužívané používať okrem názvu enzýmu aj katalógové číslo enzýmu (kód enzýmu), napr. glutamátaloacetáttransamináza (**E.C. 2.6.1.1**).

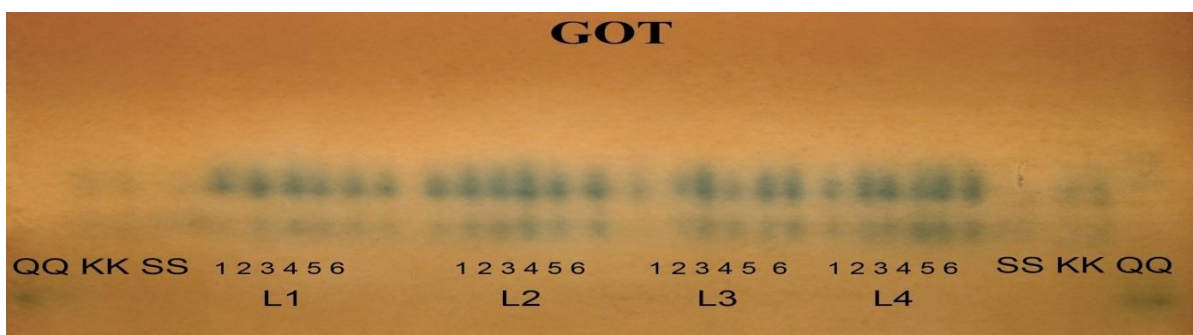
V priebehu päťdesiatročnej histórie výskumu polymorfizmu enzýmov sa objavilo niekoľko spôsobov označovania alel v lokuse. Jedným bol na základe absolútnej mobility v konkrétnych prácach, pričom číslo vyjadrovalo vzdialenosť izoformy na géle – **5, 5.9, 12.7** atď. Alely sa označovali aj na základe pohyblivosti ako rýchla **F (fast)** a pomalá **S (slow)**. Tento spôsob bol vhodný len v prípadoch, ak v lokuse sa vyskytovali iba dve alely. Vyjadrenie alel môže byť aj na základe mobility izoformy, ktorá sa použije ako marker. V takýchto analýzach však vždy musí byť štandardný genotyp, ktorý obsahuje konkrétnu izoformu. Ak sa vo vzorkách s veľmi vysokou frekvenciou vyskytuje spoločná alela, tak ju možno použiť ako marker. Marker bude mať hodnotu 100 mm a ostatné alely podľa aktuálnej vzdialenosti v mm od markera (90 alebo 110). Najjednoduchším spôsobom prezentácie polymorfizmu enzýmov je, že sa ku konkrétnemu zymogramu priradí číslo analyzovanej vzorky (Obr. 2), názov analyzovaného genotypu (populácie, odrody, línie, hybridy) resp. analyzovaného orgánu (Obr. 3 a 4). Samozrejme, že veľmi častým vyjadrením je aj pomocou faktora relatívnej mobility (Obr. 5). Pre označenie izoenzymových lokusov sa používalo tiež niekoľko spôsobov. V označení však nikdy nechýba skratka označenia enzýmu, za ktorou je číslo lokusu, napr. *Acp1* (lokus kyslej fosfatázy číslo jeden). Ak má genotyp viac lokusov, tak sa analogicky označujú *Acp1*, *Acp2* atď. V prípade výskytu viacerých možných alel v jednom lokuse označujú sa malým písmenom abecedy alebo číslom – *Acp1-a*, *-b*, *-c* atď. alebo *Acp1: 1, 2, 3* atď. Lokus s homozygotnou konštitúciou možno vyjadriť napr. *Acp1-a/a* alebo *Acp1:1/1* a s heterozygotnou konštitúciou *Acp1-a/b, -a/c, -b/c* alebo *Acp1: 1/2, 1/3, 2/3* (Obr. 6) atď. Podľa určitej konvencie lokus s najnižšou numerickou hodnotou kódoval najmenej pohyblivé izoformy voči anódovému pólu, čiže najbližšie ku štartu. Na základe rozhodnutia Medzinárodnej komisie pre biochemickú nomenklatúru sa lokusy označujú na základe pohyblivosti izoformami. Lokus s najpohyblivejšími izoformami je označený 1, s menej pohyblivými 2 atď. Rovnako je to aj s označovaním alel. Alela konkrétneho lokusu najpohyblivejšia smerom k anóde bude označená a, menej pohyblivá b atď. V prípade analýz polymorfizmu enzýmov kukurice, kde je známy rozsah diverzity polymorfizmu zárodočnej plazmy tejto plodiny, sú aj alely lokusov označované číselne. Ale aj v tomto prípade najmobilnejšia alela v lokuse sa označuje 1 až na enzým malátdehydrogenáza, kde číslovanie je opačné.



Obr. 2: Cícer baraní (*Cicer arietinum* L.) – izozymogramy PGD semien dvadsiatich genotypov (jeden genotyp reprezentovaný dvomi vzorkami) – (Múdry, 2010)

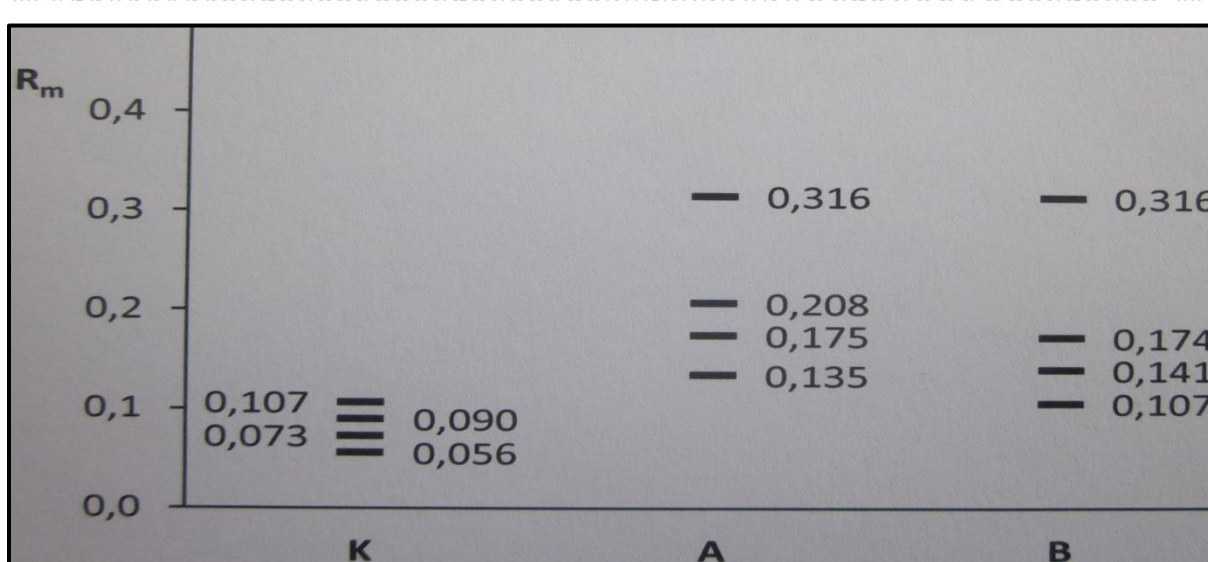
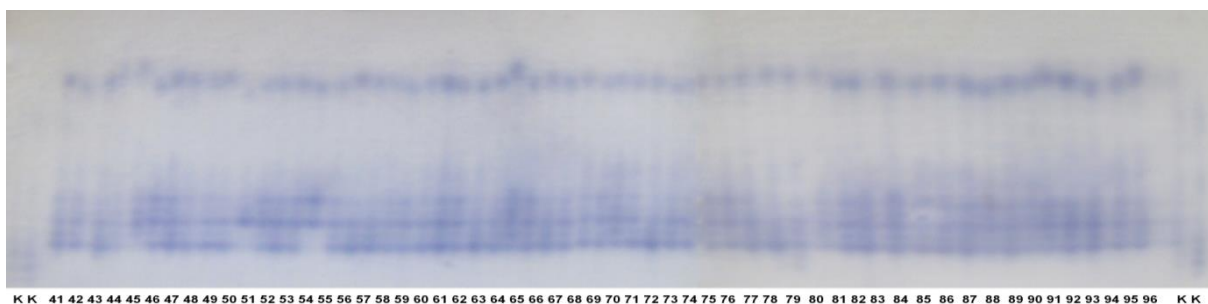


Obr. 3: Kostrava trsteníkovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.) a mätonoh trváci (*Lolium perenne* L.) – izozymogramy MDH listov kostravy, matonohu a ich krížencov (Múdry, 2010)



Obr. 4: Izozymogramy a diagramy enzýmu glutamát oxaloacetáttransamináza (GOT) v listoch láskavca metlinatého (*Amaranthus cruentus* L.) – Múdry a Gajdošová (2010)

Vysvetlivky: **Q** – kontrolná vzorka kukurice siatej Quintal, **K** – kontrolná vzorka klíčencov láskavca metlinatého, **S** – kontrolná vzorka semien láskavca metlinatého, **L1, L2, L3, L4** – izozymogramy vzoriek listov láskavca metlinatého kultivovaného na živnom médiu, **1, 2, 3, 4, 5, 6** – čísla konkrétnych vzoriek listov láskavca metlinatého



Obr. 5: Izozymogramy enzýmu PGI analyzovaných klíčiacych semien 56 odrôd láskavca (*Amaranthus sp. L.*) s diagramami (Múdry a kol., 2013)

Vysvetlivky: **K** – kontrolná vzorka hybridu kukurice (Sc 3098 x 3150); **41 – 96:** čísla analyzovaných vzoriek láskavca; **A:** fenotypový prejav enzýmu vo vzorke č. 45 – odroda K 266/1 (*Amaranthus cruentus L.*), č. 51 – odroda A29 (*Amaranthus graecizans L.*) a vzorke č. 55 – odroda A 75 (*Amaranthus hypochondriacus L.*); **B** – fenotypový prejav enzýmu v ostatných vzorkách; **R_m** – faktor relatívnej mobility.

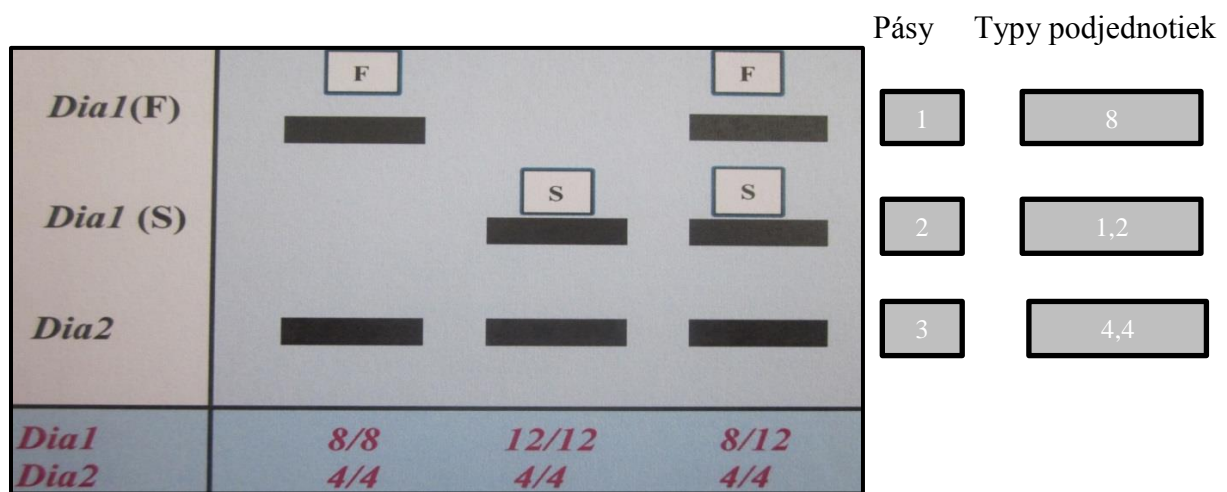
2.3 Príklady predpokladaných modelov izozymogramov

Na základe teoretických poznatkov z kapitol 2.1 a 2.2 je možné dopredu predpokladať typy schém izozymogramov (fingerprintov). V nasledujúcich kapitolách sú uvedené príklady praktických ukážok s vysvetlivkami predpokladaných (očakávaných) schém izozymogramov najčastejšie sa objavujúcich pri štúdiu polymorfizmu enzýmov rastlín. Znalosť a teoretické chápanie uvedených schém pomáhajú pri určovaní kvartérnej štruktúry analyzovaného enzýmu, ak nie je z vedeckej literatúry známa jeho štruktúra v analyzovaných vzorkách konkrétneho rastlinného druhu a pre posúdenie kompletnosti izozymogramu. Pri nejasných prejavoch polymorfizmu enzýmov a pri podozrení na nekompletnosť izozymogramov je

nevyhnutné analýzy zopakovať. V nevyhnutných prípadoch je potrebné uskutočniť genetickú analýzu medzi analyzovanými biologickým materiálmi a následne uskutočniť analýzy polymorfizmu na získaných genetických materiáloch a až potom urobiť závery.

2.3.1 Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu kódovaného jedným génom a dvoma alelami

Najjednoduchšie vzory izozymogramov tvoria enzýmy, na stavbe ktorých sa podieľa iba jeden polypeptidový reťazec. Enzýmy majú stavbu monoméru. Jedinca, ktorí majú homozygotnú stavbu lokusu pre daný enzým tvoria iba jeden pás (škvrtu), ale jedinca s heterozygotnou stavbou tvoria dva polypeptidové reťazce, a teda dva pásy. Jeden pás reprezentuje pohyblivejšiu izoformu enzýmu a často sa označuje písmenom F (fast = rýchly) a pás reprezentujúci menej pohyblivú izoformu písmenom S (slow = pomalý). Monomérený enzým heterozygotného jedinca tvorí dva pásy F a S (Obr. 6). Štruktúru monoméru majú napr. izoformy lokusu *Dia1* ale lokus *Dia2* kóduje izoformy štruktúry diméra. Všetky izoformy enzýmu PGM (fosfátglukomutáza) kukurice siatej majú štruktúru monoméru.



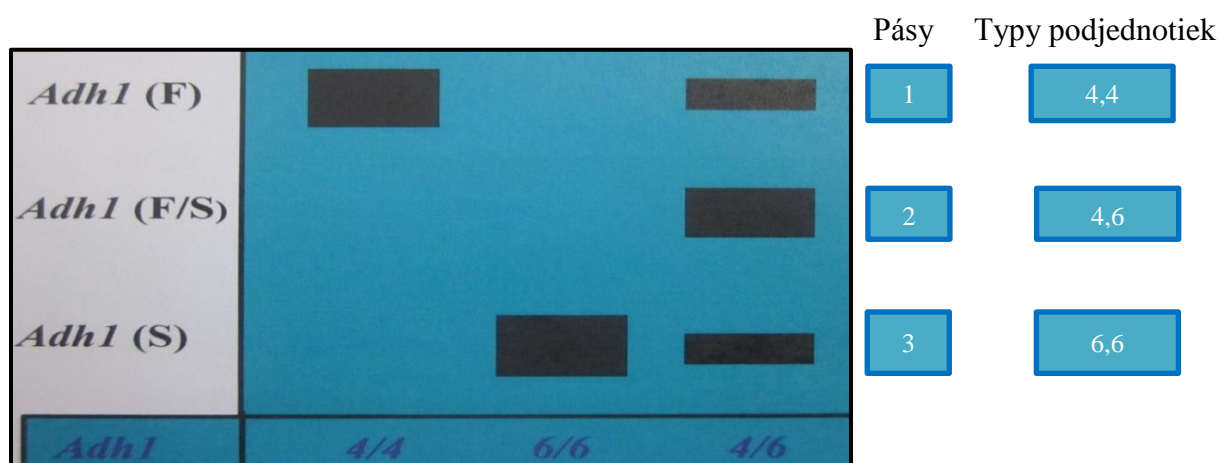
Obr. 6: Schémy izozymogramov diaforázy (DIA) kukurice siatej – Múdry (2002)

Vysvetlivky: 1, 2 a 3 označujú poradie a súčasne počet pásov; 4, 8 a 12 je označenie podjednotiek, ktoré sú kódované alelami 4, 8 a 12, pričom alely 8 a 12 sa vyskytujú v lokuse *Dia1* (lokus kóduje monoméne izoformy) a alela 4 sa vyskytujú v lokuse *Dia2* (lokus kóduje dimérne izoformy). V prípade lokusu (*Dia1*) sú genotypy – *aa* (8/8), *a`a`* (12/12) a ich krížením *aa`* (8/12). Pomer intenzít pásov (škvrt) pre zodpovedajúce genotypy je nasledovný 1, 1 a 1:1. Počet odlišných spolupôsobiacich podjednotiek je 2.

2.3.2 Vzory izozymogramov dimérneho enzýmu kódovaného jedným génom

a dvoma alelami

Iné enzýmy môžu mať zložitejšiu kvartérnu štruktúru pozostávajúcu z dvoch alebo viacerých polypeptidových reťazcov. Enzým, na stavbe molekuly ktorého sa podieľajú dva polypeptidové reťazce, sa nazývajú dimérne enzýmy alebo diméry, tri polypeptidové reťazce – triméry, štyri – tetraméry. Enzým, ktorý má štruktúru diméra sa skladá z dvoch polypeptidových reťazcov, ktoré môžu mať rovnakú stavbu alebo odlišnú. Ak polypeptidové reťazce majú rovnakú stavbu, ide o enzým, syntéza ktorého je podmienená homozygotným lokusom alebo lokusom s homozygotnou konštitúciou. Ak nemajú rovnakú stavbu a polypeptidové reťazce sa odlišujú, ide o enzým, syntéza ktorého je podmienená lokusom s heterozygotnou konštitúciou. Je logické, že v prípade, keď bude mať lokus heterozygotnú konštitúciu, bude podmieňovať syntézu oboch polypeptidových reťazcov, a teda dvoch homodimérnych enzýmov, ktoré sa zobrazia na izozymograme ako dva pásy (škvry). Pohyblivejší pás zodpovedá pohyblivejšej forme enzýmu s homodimérom stavbou (homodimér) a často sa označuje **FF** a menej pohyblivejší pás menej pohyblivému homodiméru, ktorý sa označuje **SS**. Súčasne sa však bude tvoriť aj tretí pás – heterodimér (**FS**), ktorý sa bude nachádzať uprostred vzdialenosti medzi škvrymi homodimérov FF a SS. Tento tretí pás (škvry) sa vyfarbuje oveľa intenzívnejšie a býva aj oveľa väčší (Obr. 7). Štruktúru diméra majú napr. ADH a ACP kukurice satej.



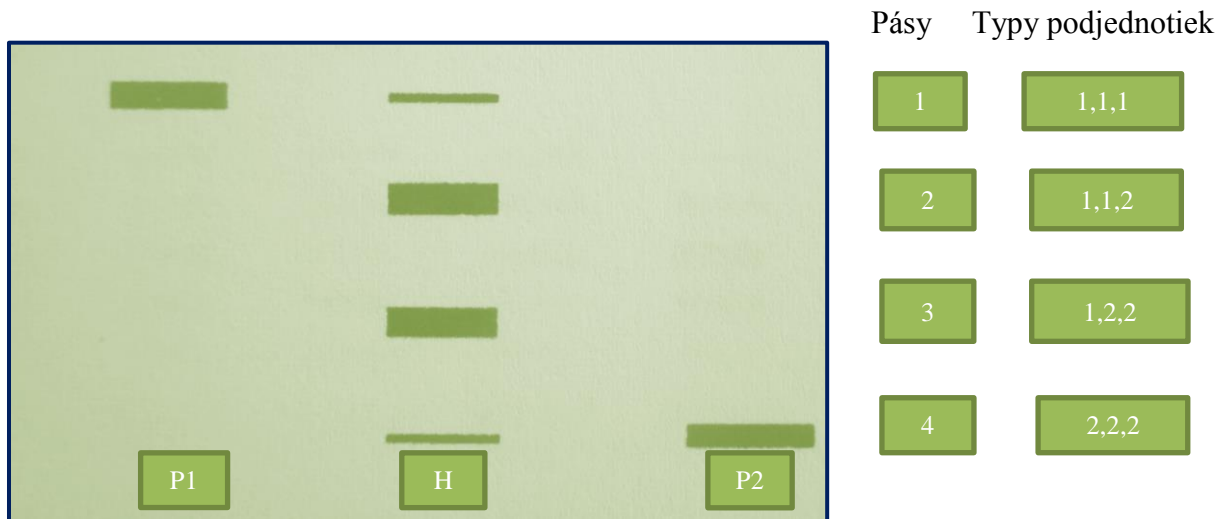
Obr. 7: Schémy izozymogramov alkoholdehydrogenázy kukurice satej – Múdry (2002)

Vysvetlivky: 1, 2 a 3 označujú poradie a súčasne počet pásov; 4 a 6 je označenie podjednotiek, ktoré sú kódované alelami 4 a 6. V prípade lokusu (*Adh1*), ktorý kóduje syntézu dimérnych izoform enzýmu ADH sú genotypy – *aa* (4/4), *a`a`* (6/6) a ich krížením *aa`* (4/6). Pomer intenzít pásov (škvry) pre zodpovedajúce genotypy je nasledovný 1, 1 a 1:2:1. Počet odlišných spolupôsobiacich podjednotiek je 2.

2.3.3 Vzory izozymogramov trimérneho enzýmu kódovaného jedným génom

s dvoma alelami

Enzýmy s trimérou kvartérou štruktúrou (enzýmy s tromi polypeptidovými podjednotkami) sa vyskytujú v literatúre ojedinele, ako pri analýzach živočíchov, tak aj pri analýzach rastlín. Vzory izozymogramov pre prípad dvoch alel v lokuse sú na Obr. 8.



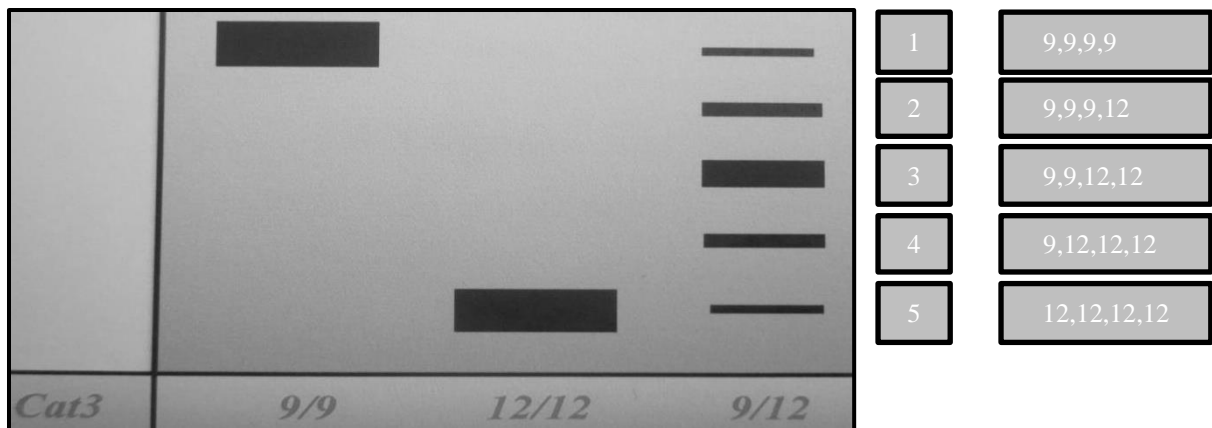
Obr. 8: Schémy izozymogramov trimérneho enzýmu kódovaného jedným génom a dvoma alelami (prepracované podľa Acquaah, 1992)

Vysvetlivky: P1, P2 – rodičovské (parentálne) generácie, H – hybrid (kríženec), 1 a 2 sú podjednotky kódované alelami 1 a 2.

2.3.4 Vzory izozymogramov tetramérneho enzýmu kódovaného jedným génom s dvoma alelami

Niektoré enzýmy majú štruktúru tetraméra, ktorú tvoria štyri polypeptidové reťazce. Nie však vždy sa tvoria všetky heterozygotné fenotypy tak, ako by sme teoreticky očakávali. Príčinou je nezlučiteľnosť symetrií odlišných podjednotiek. Tak prítomnosť troch pásov v zymograme nemožno definitívne prisúdiť enzýmu, ktorý má stavbu diméra, ale že enzým má stavbu polyméra s najmenej dvoma polypeptidovými reťazcami. Rozmazaná zóna enzymatickej aktivity na zymograme je často znakom, že enzým je polymerický, preto je pre úspešnú genetickú interpretáciu zymogramov potrebné overiť genetickú identitu pásov, stanoviť submolekulovú štruktúru enzýmu a zabezpečiť, aby porovnávané vzorky boli z rovnakého pletiva z rovnakej etapy vývinu (rovnakého veku). Zymogramy enzýmu, ktorý má stavbu tetraméra sú uvedené na Obr. 9. Štruktúru tetraméra má napr. CAT kukurice siatej.

Pásky Typy podjednotiek



Obr. 9: Schéma izozymogramov katalázy (CAT) kukurice sietej – (prepracované podľa Múdry, 2002)

Vysvetlivky: 1, 2, 3, 4 a 5 označujú poradie a súčasne počet pásov; 9 a 12 je označenie podjednotiek, ktoré sú kódované alelami 9 a 12. V prípade lokusu (*Cat3*), ktorý kóduje syntézu tetramérnych izoforiem enzýmu CAT sú genotypy – *aa* (9/9), *a`a`* (12/12) a ich krížením *aa`* (9/12). Pomer intenzít pásov (škvŕn) pre zodpovedajúce genotypy je nasledovný 1, 1, 1:4:6:4:1. Počet odlišných spolupôsobiacich podjednotiek je 2. Predpokladaný počet pásov pre heterozygota je päť.

2.3.5 Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu kódovaného dvoma génmi a dvoma alelami

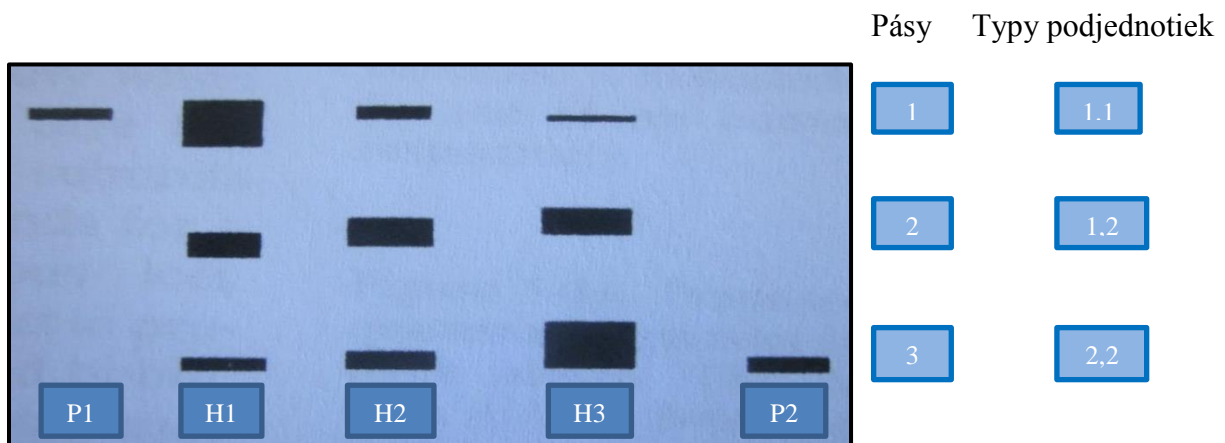


Obr. 10: Schéma izozymogramov enzýmu, ktorého kvartérna štruktúra je monoména a je kontrolovaná dvoma lokusmi s dvoma alelami (prepracované podľa Acquah, 1992)

Vysvetlivky: P1, P2 – rodičovské (parentálne) generácie, H1 – 3 – hybridy (križence). Genotypy – *aaaa*, *aaaa`*, *aaa`a`*, *aa`a`a`*, *a`a`a`a`*. Pomer intenzít pásov (škvŕn) pre zodpovedajúce genotypy je nasledovný 1, 3:1, 1:1, 1:3, 1. Počet odlišných spolupôsobiacich podjednotiek je 2. Predpokladaný počet pásov pre heterozygotov je päť.

2.3.6 Vzory izozymogramov dimérneho enzýmu kódovaného dvoma génmi

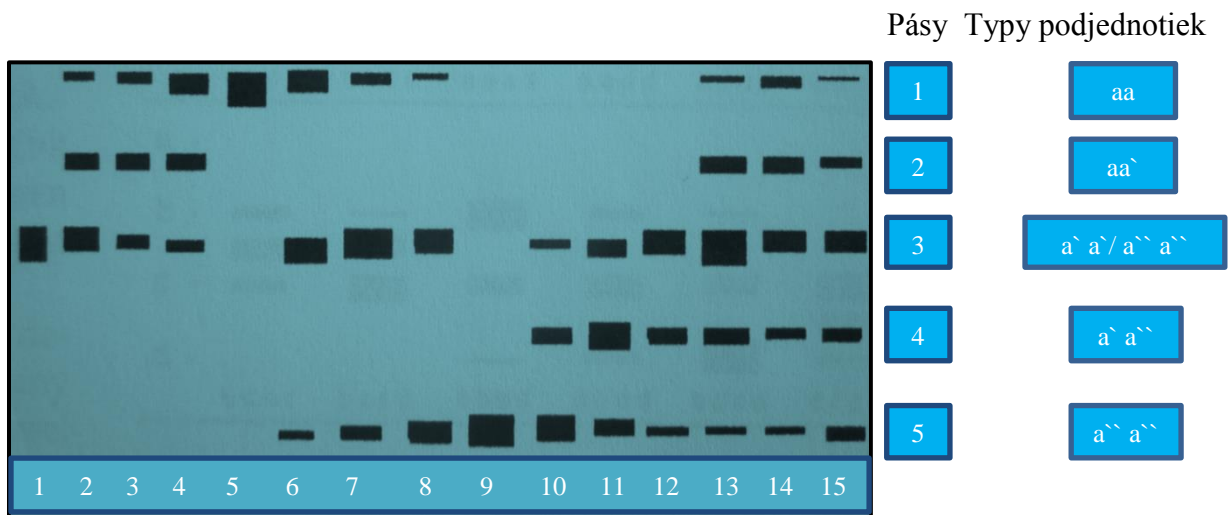
s dvoma alelami



Obr. 11: Schéma izozymogramov enzýmu, ktorého kvartérna štruktúra je dimérna a je kontrolovaná dvoma lokusmi s dvoma alelami (prepracované podľa Acquaah, 1992)

Vysvetlivky: P1, P2 – rodičovské (parentálne) generácie, H1 – 3 – hybridy (križence). Genotypy – $aaaa$, $aaaa'$, $aaa'a'$, $aa'a'a'$, $a'a'a'a'$. Pomer intenzít pásov (škvŕn) pre zodpovedajúce genotypy je nasledovný 1, 9:6:1, 1:2:1, 1:6:9, 1. Počet odlišných spolupôsobiacich podjednotiek je 2. Predpokladaný počet pásov pre heterozygotov je päť.

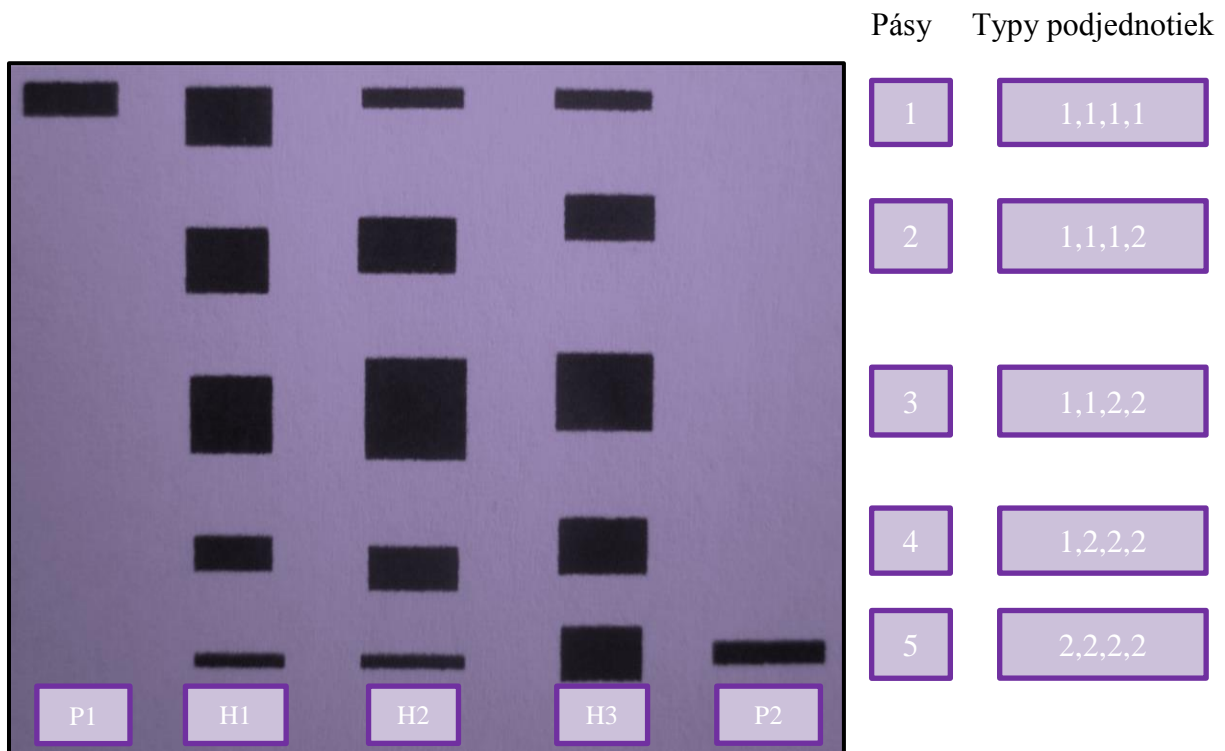
2.3.7 Vzory izozymogramov dimérneho enzýmu kódovaného jedným génom s tromi alelami



Obr. 12: Schéma izozymogramov enzýmu, ktorého kvartérna štruktúra je dimérna a je kontrolovaná dvoma lokusmi s tromi alelami (prepracované podľa Acquaah, 1992)

Vysvetlivky: Genotypy: 1= $a'a'a'$, 2= $a'a'a'$, 3= $a'a'aa$, 4= $a'aaa$, 5= $aaaa$, 6= $aaaa''$, 7= $aaa''a''$, 8= $aa''a''a''$, 9= $a''a''a''a''$, 10= $a'a'a'a''$, 11= $a'a'a'a''$, 12= $a'a'a'a''$, 13= $a'a'aa''$, 14= $a'aaa''$, 15= $a'aa''a''$.

2.3.8 Vzory izozymogramov tetramérneho enzýmu kódovaného dvoma génmi s dvoma alelami



Obr. 13: Schémy izozymogramov enzýmu, ktorého kvartérna štruktúra je tetramérna a je kontrolovaná dvoma lokusmi s dvoma alelami (prepracované podľa Acquaah, 1992)

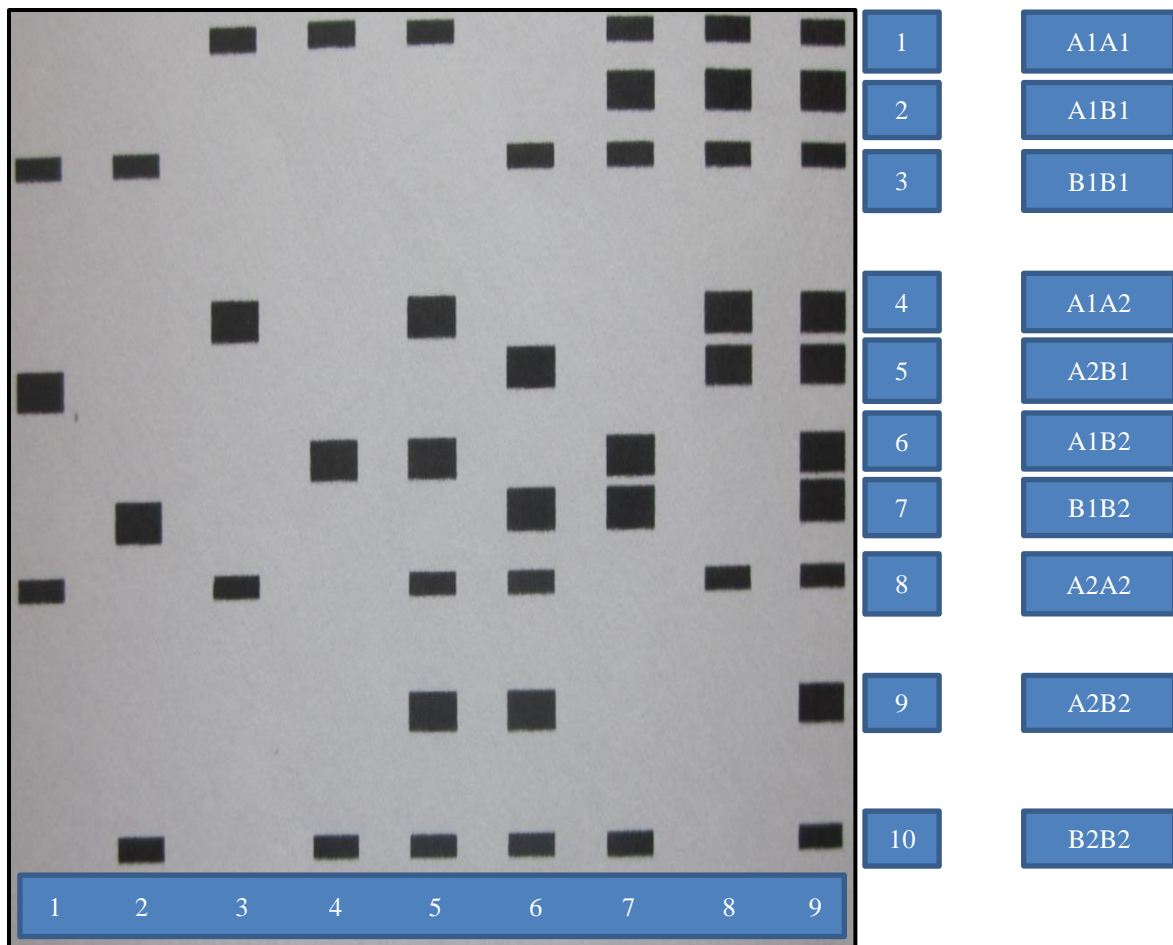
Vysvetlivky: P1, P2 – rodičovské (parentálne) generácie, H1 – 3 – hybridy (križence). Genotypy – *aaaa*, *aaaa*’, *aaa*’*a*’, *aa*’*a*’*a*’, *a*’*a*’*a*’*a*’. Pomer intenzít pásov (škvŕn) pre zodpovedajúce genotypy je nasledovný 1, 4:4:5:2:1, 1:4:6:4:1, 1:2:5:4:4, 1. Počet odlišných spolupôsobiacich podjednotiek je 2. Predpokladaný počet pásov pre heterozygotov je päť.

2.3.9 Vzory izozymogramov dimérneho enzýmu kódovaného dvoma génmi so štyrmi alelami

V nasledujúcej schéme sú zobrazené izozymogramy dimérneho enzýmu kódovaného dvoma génmi. Každý gén má dve alely (*a1* a *b1*, *a2* a *b2*). Alely *a1* a *a2* kódujú podjednotky A1 a A2 a alely *b1* a *b2* kódujú podjednotky B1 a B2. Stavba izoenzýmov je výsledkom náhodného spojenia foriem každej z dvoch podjednotiek.

Ak má enzým kvartérnu stavbu diméra, pásky (škvŕny) A1A1, B1B2, A2A2, B2B2 zodpovedajú homodimérom. Pásky A1A2, A2B1, A1B2 a B1B2 sú intergénové heterodiméry a pásky A1B1 a A2B2 sú vnútrgénové heterodiméry. Jednotlivé typy izozymogramov sú zobrazené na Obr. 14.

Pásky Typy podjednotiek



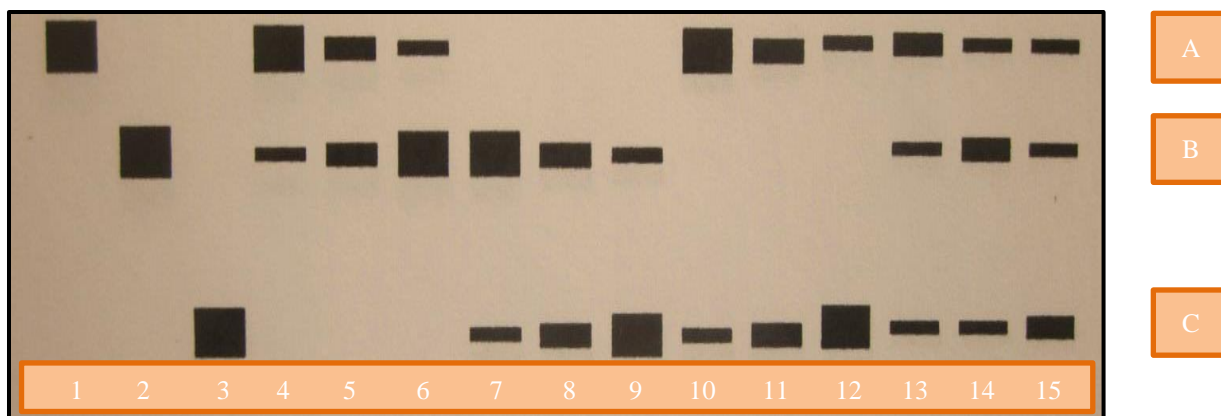
Obr. 14: Schéma izozymogramov enzýmu, ktorého kvartérna štruktúra je dimérna a je kontrolovaná dvoma lokusmi so štyrmi alelami (prepracované podľa Bourgoin-Greeneche a Lallemand, 1993)

Vysvetlivky: Podľa tejto schémy možno očakávať v zymograme až 10 pásov (škvrn) a deväť genotypov a ich deväť fenotypových prejavov (typov izozymogramov). Genotypy: 1 (*b1b1a2a2*), 2 (*b1b1b2b2*), 3 (*a1a1a2a2*), 4 (*a1a1b2b2*), 5 (*a1a1a2b2*), 6 (*b1b1a2b2*), 7 (*a1b1b2b2*), 8 (*a1b1a2a2*) a 9 (*a1b1a2b2*).

2.3.10 Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu tetraploidnej rastliny

Predpokladajme, že enzým je kódovaný génom s tromi alelami *a*, *b* a *c*. Alela *a* kóduje podjednotku (peptidový reťazec) A, alela *b* podjednotku B a alela *c* podjednotku C. Ak má enzým kvartérnu štruktúru monoméru zymogramy digenických rastlín (s dvoma odlišnými alelami napr. *aaab* a *aabb*) obsahujú dva pásy (škvrny); zymogramy trigenických rastlín (napr. *aabc* alebo *abbc*) majú tri pásy (Obr. 15).

Pásy

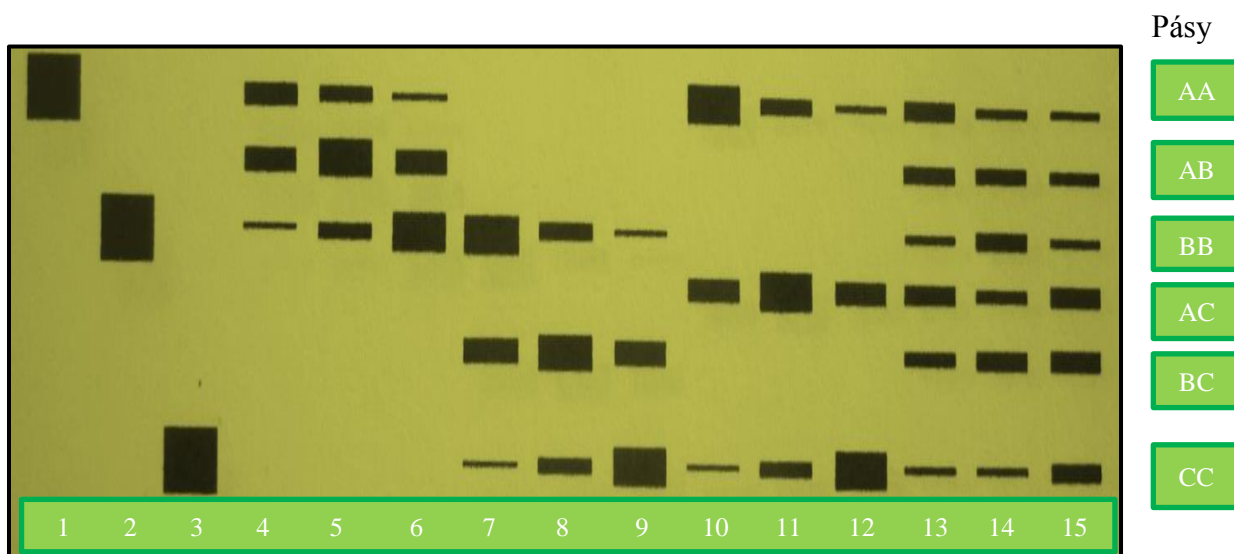


Obr. 15: Schémy izozymogramov tetraploidov, ktorých enzýmy majú kvartérnu štruktúru monoméru (prepracované podľa Bourgoin-Greneche, Lallemand, 1993)

Vysvetlivky: Izozymogramy obsahujú 2 – 3 pásy (škvrny) a pätnásť genotypov a ich fenotypov. Genotypy: 1 (*aaaa*), 2 (*bbbb*), 3 (*cccc*), 4 (*aaab*), 5 (*aabb*), 6 (*abbb*), 7 (*bbbc*), 8 (*bbcc*), 9 (*bccc*), 10 (*aaac*), 11 (*aacc*), 12 (*acc*), 13 (*abc*), 14 (*bbc*) a 15 (*bcc*).

2.3.11 Vzory izozymogramov dimérneho enzýmu tetraploidnej rastliny

Enzýmy so štruktúrou diméra, kódované tromi možnými alelami u tetraploidov majú u monogenických jedín, digenických tri a u trigenických jedincov šesť pásov (Obr. 16).



Obr. 16: Schémy izozymogramov tetraploidov, ktorých enzýmy majú kvartérnu štruktúru diméra a v lokuse sa môžu vyskytovať alely *a*, *b* alebo *c* (prepracované podľa Bourgoin-Greneche, Lallemand, 1993)

Vysvetlivky: Izozymogramy obsahujú 1 – 6 pásov (škvrny) a pätnásť genotypov a ich fenotypov. Genotypy: 1 (*aaaa*), 2 (*bbbb*), 3 (*cccc*), 4 (*aaab*), 5 (*aabb*), 6 (*abbb*), 7 (*bbbc*), 8 (*bbcc*), 9 (*bccc*), 10 (*aaac*), 11 (*aacc*), 12 (*acc*), 13 (*abc*), 14 (*bbc*) a 15 (*bcc*).

3 GENETICKÁ INTERPRETÁCIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV

MODELOVÉHO DRUHU – KUKURICA SIATA (*Zea mays* L.)

Stručná história analýz, štúdiá a praktického využívania polymorfizmu enzýmov je uvedená aj v učebných textoch z roku 2012, a to v kapitole 2.1 (Múdry, 2012). Kvôli ucelenosti a komplexnosti témy kapitoly 3 a poznania stavu riešenia a využívania polymorfizmu enzýmov v zahraničí a na Slovensku je uvedená aj v tejto kapitole.

Kukurica siata (*Zea mays* L.) patrí k najvýznamnejším poľnohospodárskym plodinám nie len na Slovensku, ale aj z celosvetového pohľadu. Je plodinou všestranného využitia. Využíva sa ako potravina, ďalej v krmovinárstve a ako surovina pre rôzne odvetvia priemyselnej výroby. Práve kukurica bola prvou plodinou, na ktorej sa v roku 1960 demonštrovalo praktické využitie polymorfizmu enzýmov pri jej šľachtení a v semenárstve (Schwartz, 1960). Nasledujúce dve desaťročia boli venované analýzam, poznaniu terciárnej štruktúry enzýmov a genetickej interpretácii ich polymorfizmu. Metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov viedla až k vytvoreniu štandardného metodologického postupu, ktorý je garanciou zhody dosiahnutých výsledkov všetkými výskumnými a testovacími laboratóriami na celom svete. Ďalšie desaťročia viedli k mapovaniu genetických zdrojov kukurice, čo bolo významné pre poznanie diverzity zárodočnej plazmy pre polymorfizmus enzýmov a následné využívanie v praxi. Potenciálne možnosti identifikácie genotypov kukurice (samoopelivé línie a komerčné hybridy) v Kanade študovali Cardy a Kannenberg (1982). Skúmali variabilitu 12 enzýmových systémov, ktoré zahŕňali 22 lokusov medzi 110 samoopelivými líniami (public inbred lines) a 155 komerčnými hybridmi používanými v Kanade. Výsledky potvrdili postačujúcu variabilitu izoenzýmov medzi kultivarmi kukurice pre ich identifikáciu. Biochemický popis rastlín postupne ďalej nadobúdala stále väčší rozsah vo svetovom šľachtení. Stuber a Goodman (1983a) vykonali analýzu polymorfizmu enzýmov 406 samoopelivých línií kukurice na základe 23 izoenzýmových lokusov. Chevallier a Dattee (1984) popisujú izoenzýmy ôsmich enzýmových systémov v 22 genotypoch kukurice z Južnej Ameriky a v 27 genotypoch z Afriky. Urobili analýzu ich príbuzenských vzťahov a diskutovali o možnosti predikcie heterózneho efektu v úrode hybridu vo vzťahu k enzymatickým odlišnostiam rodičovských komponentov. Smith a kol. (1984) zrealizovali analýzu frekvencie alelických izoenzýmov 19 lokusov pre 77 genotypov teosinte, 1 genotyp (diploid) *Zea diploperennis* Iltis Doebley a Guzman a 1 genotyp (tetraploid) *Zea perennis* (Hitche) Reeves a Mangelsdorf. Analýzu izoenzýmových spektier pre 21 lokusov, 72 historicky dôležitých amerických línií a južných línií kukurice uskutočnili Smith a kol. (1985). Zistili veľmi slabé alebo žiadne vzájomné vzťahy medzi zárodočnými plazmami

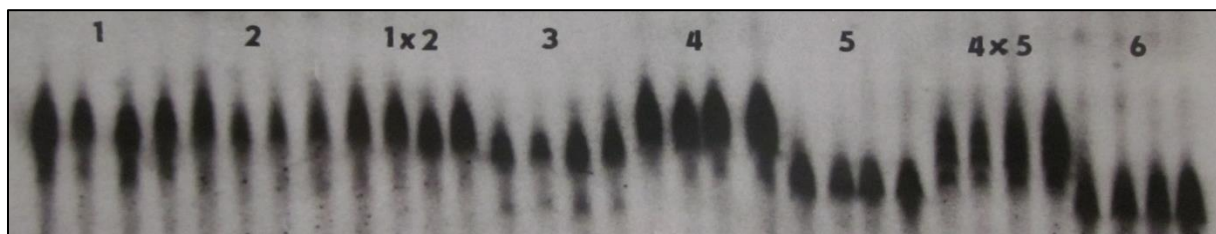
jednotlivých skupín línií. Na základe štúdia izoenzýmov 23 lokusov stanovili Frei a kol. (1986), že 8 izoenzýmov z nich má väzbu s úrodou. Urobili záver, že existuje spojenie medzi izoenzýmami a úrodou, ale ich vplyv na úrodu v tomto experimente a sledovanú populáciu bol malý. Smith (1986) publikoval prácu zameranú na analýzu polymorfizmu enzýmov 21 izoenzýmových lokusov. Popísal príbuzenské vzťahy medzi jednotlivými skupinami voľne opelených populácií typu "Dent" a typu "Flint" a ich vhodnosť a perspektívy v šľachtení. Elektroforetickú analýzu izoenzýmov 21 lokusov použil Smith (1988) pre fingerprinting 138 hybridov, aby získal zymogramy v praxi najrozšírenejších hybridov a vyslovil tendencie v šľachtení tejto poľnohospodárskej plodiny. Bolo uskutočnené mapovanie na báze polymorfizmu enzýmov 61 hybridov kukurice s najväčším podielom pestovania vo Francúzsku, 88 hybridov najčastejšie pestovaných v USA a porovnaná ich genetická príbuznosť. V práci sa uvádza možnosť využívania fingerprintov na skvalitnenie šľachtienia, registráciu a právnu ochranu línií a hybridov a v marketingu tejto plodiny (Smith, 1989). Elektroforetickú analýzu polymorfizmu enzýmov (izoenzýmový fingerprinting) zrealizovalo na vlastných genetických zdrojoch kukurice (línie, hybridy) aj Francúzsko, ktoré je druhou krajinou s rozsiahlym výskumom, ale aj s praktickou aplikáciou výsledkov týchto analýz hlavne pri uznávaní nového genotypu (odrody), jej registrácii, stanovovaní biologickej čistoty, certifikácii a právnej ochrane. Metodologické aspekty analýz jednotlivých druhov enzýmov, ukážky fingerprintov a vyhodnotenie frekvencie alel vo francúzskych genetických zdrojoch sú uvedené v práci Greneche a Giraud (1989).

3.1 Genetická interpretácia polymorfizmu kyslej fosfatázy (E. C. 3. 1. 3. 2), príklady izozymogramov a ich diagramy

Kyslá fosfatáza (ACP), E. C. 3. 1. 3. 2, pôsobí pri hydrolýze fosfomonoesterov dôležitých pre rôzne biochemické reakcie zahŕňajúce tvorbu sacharózy v procese fotosyntézy (Goodman a Stuber, 1983a). El-Metainy a Omar (1981) identifikovali tri odlišné skupiny ACP v extrakte štítka rôznych samoopelivých línií kukurice. Boli to AP-1, AP-2 a AP-3. Skupina AP-2 zahŕňa tri elektroforetické varianty: rýchly (F), intermediárny (I) a pomalý (S). To isté platí pre lokus AP-1 (Efron, 1970). Izoenzýmy lokusov *Acp1* a *Acp2* (t.j. AP-1 a AP-2) sú diméry. Z výsledkov vyplynulo, že v lokuse AP-2 je syntéza izoenzýmu kontrolovaná jediným génom s tromi kodominantnými alelami. Kahler (1983) uvádza štvrtú skupinu izoenzýmov ACP determinovaných lokusom *Acp4*. Bola prítomná v extrakte zmesi koreňov a listov (rastliny 6 – 7 dní staré). *Acp4* je monomerický lokus s najmenej šiestimi kodominantnými alelami (a teda

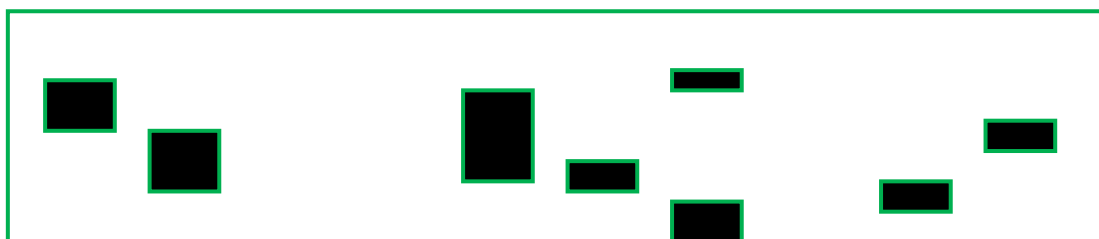
aj izoenzýmami). *Acp4* je lokalizovaný na chromozóme 1 (Stuber a kol., 1988). Variabilita spojená s lokusom *Acp1* je najštudovanejšia. Gén *Acp1* kóduje expresiu cytoplazmatických enzýmov aktívnych vo všetkých pletivách kukurice (korene, listy, koleoptila, scutellum a peľ). *Acp1* je lokalizovaný na chromozóme 9 (Stuber a kol., 1980a). *Acp1* a *Acp2* segregujú nezávisle (El-Metainy a Omar, 1981). V lokuse *Acp1* bolo identifikovaných 13 alel (kukurica a teosinta). Analýzou kolekcie odrôd kukurice sa zistilo, že najfrekventovanejšie sú alely *Acp1 - 2*, *Acp1 - 3*, *Acp1 - 4* a *Acp1 - 6*. Tieto štyri alely boli s najväčšou frekvenciou zastúpené v kolekcii 406 samoopelivých línií. 52,7 % línií bolo homozygotných pre *Acp1 - 4*; 32,3 % pre *Acp1-2*; 12,3 % pre *Acp1 - 3* a 1,5 % pre *Acp1-6* (Stuber a Goodman, 1983a). Autori udávajú ešte dve alely (*Acp1 - 2⁺* a *Acp1 - 2L*), ktorých frekvencia bola veľmi malá.

Pre praktickú aplikáciu sú najdôležitejšie (najfrekventovanejšie) alely *Acp1 - 2*; *Acp1 - 3* a *Acp1-4* (vyššie číslo označenia alely = pomalšia mobilita izoenzýmu). Produkty lokusu *Acp1* sú relatívne slabo pohyblivé. Keďže po chemickej stránke sú dimérmi, platí, že homozygotný lokus sa na zymograme prejaví ako jeden pás (škvrna) so slabšími pásmi nad a pod hlavným. Heterozygotný lokus sa prejaví intermediárnym “hybridným“ pásom medzi dvoma alelickými produktmi lokusu. Optimálne gélové systémy pre separáciu izozýmů sú B a D (Stuber a kol., 1988). Podľa autorov Greneche a Giraud (1989), ale aj podľa našich experimentálnych výsledkov, izoenzýmy lokusu *Acp1* sú charakteristické menšou pohyblivosťou (migrujú do vzdialenosti prvých dvoch cm gélu). Pásky (škvrnky) na zymograme sú hnedopurpurové. Všetky homozygotné genotypy a väčšina heterozygotných sú ľahko odlišiteľné. Zymogram genotypu *Acp1 - 2/3* býva nezreteľný a je možné ho zameniť so zymogramami genotypov *Acp1 - 2/2* a *Acp1 - 3/3*. Zriedkavo sa vyskytujúci genotyp *Acp1 - 4/6* sa môže zameniť s genotypom *Acp1 - 4/4*. Preto je potrebné používať kontroly, najmä kvôli správne určenie alel *Acp1 - 2* a *Acp1 - 3*. Izozymogramy ACP sú na Obr. 17 a 18.



Obr. 17 : Izozymogramy kyslej fosfatázy (ACP) rôznych genotypov kukurice (jeden genotyp reprezentujú štyri vzorky – štyri koleoptily) v gélovom systéme “B“ (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Acp1- 2/2*, 2: *Acp1- 2/2*, 1 x 2: *Acp1- 2/2*, 3: *Acp1- 3/3*, 4: *Acp1- 2/2*, 5: *Acp1- 4/4*, 4 x 5: *Acp1- 2/4*, 6: *Acp1- 6/6*



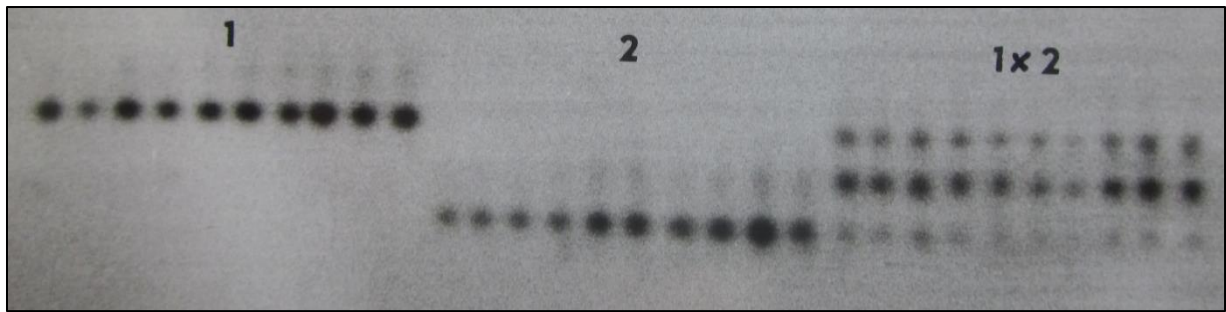
Obr. 18: Diagramy izozymogramov kyslej fosfatázy (ACP) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice siatej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Acp1- 2/2*, *Acp1- 3/3*, *Acp1- 4/4*, *Acp1- 6/6*, *Acp1- 2/3*, *Acp1- 3/4*, *Acp1- 2/4*, *Acp1- 4/6*, *Acp1- 3/6*, *Acp1- 2/6*

3.2 Genetická interpretácia polymorfizmu alkoholdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 1), príklady izozymogramov a ich diagramy

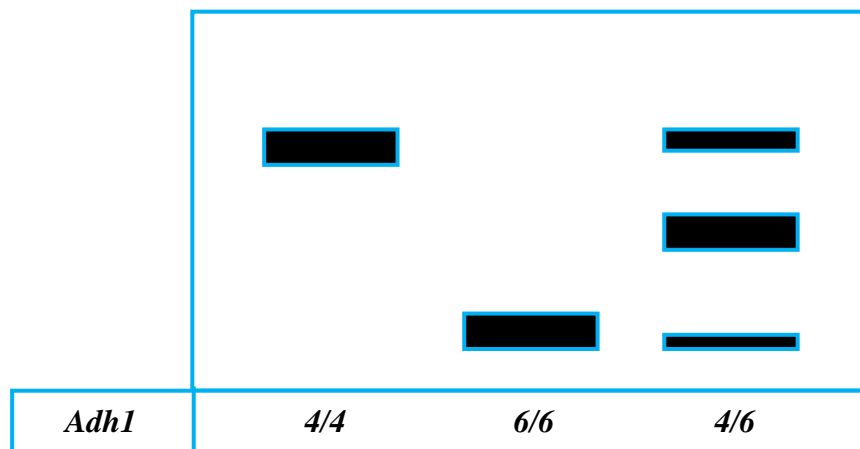
Alkoholdehydrogenázu (ADH), E. C. 1. 1. 1. 1 kódujú dva lokusy *Adh1* a *Adh2*. Štruktúra enzýmu je dimerická (Schwartz a Endo, 1966; Scandalios, 1967; Schwartz, 1969; Freeling a Schwartz, 1973). Gén *Adh1* je lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 1 (1L) a gén *Adh2* na chromozóme 4 (Goodman a Stuber, 1983a).

Lokus *Adh2* nie je v koleoptile veľmi aktívny (Stuber a kol., 1988), resp. sa v koleoptile neprejavuje (Greeneche a Giraud, 1989). Goodman a Stuber (1983b) udávajú pre analyzované vzorky kukurice prítomnosť týchto alel v lokuse *Adh1*: *Adh1 - n*, *Adh1 - 2*, *Adh1 - 4* a *Adh1 - 6*. V kultivovanej kukurici boli najčastejšie identifikované alely *Adh1 - 4* a *Adh1 - 6*. Alela *Adh1 - 4* má vyššiu frekvenciu. Greeneche a Giraud (1989) udávajú pre 526 francúzskych línií frekvenciu alel *Adh1 - 4* a *Adh1 - 6* v pomere 83,4 % ku 16,6 %. Nulovú alelu nezaznamenali ani pri jednej analýze. Tieto enzýmy sú diméry. Pri heterozygotných genotypoch sa prejaví heterodimérna zóna v strede vzdialenosti medzi dvoma homodimérnymi zónami. Izozymogramy ADH a ich diagramy sú zobrazené na Obr. 19 a 20.



Obr. 19: Izozymogramy alkoholdehydrogenázy (ADH) troch genotypov kukurice (jeden genotyp reprezentuje desať vzoriek – desať koleoptíl) v systéme “C“ (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Adh1*- 4/4, 2: *Adh1*- 6/6, 1 x 2: *Adh1* – 4/6



Obr. 20: Diagramy izozymogramov alkoholdehydrogenázy prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice sietej

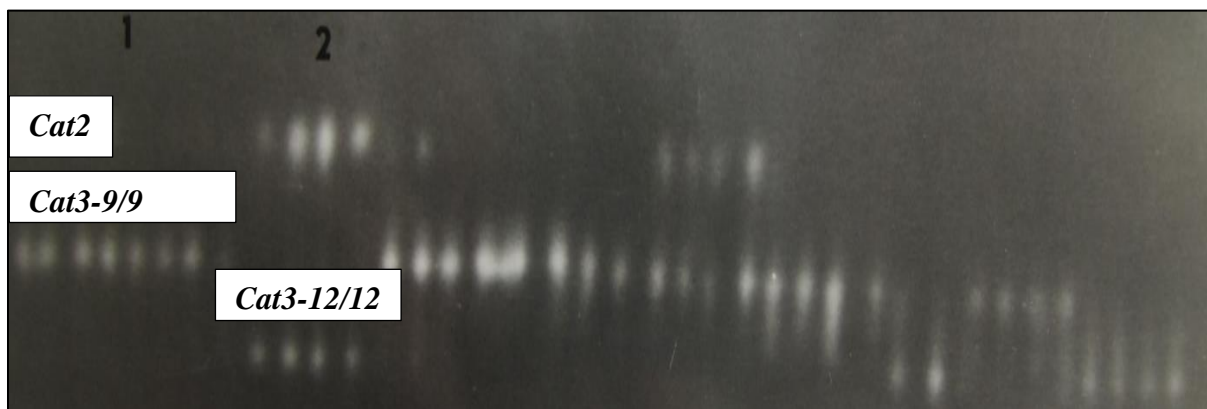
Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Adh1* – 4/4, *Adh1* – 6/6 a *Adh1* – 4/6

3.3 Genetická interpretácia polymorfizmu katalázy (E. C. 1. 11. 1. 6), príklady izozymogramov a ich diagramy

Kataláza (CAT), E. C. 1. 11. 1. 6 – jej štúdiom pri kukurici sa zistili tri lokusy kódujúce odlišné izoenzýmy. Lokalizácia *Cat1* je na chromozóme 5S a *Cat2* na chromozóme 1S. Kódujú izoenzýmy, ktoré sa tvoria počas vývinu zrna a klíčiacej rastliny. Oba lokusy kódujú enzýmy štruktúry tetraméru. *Cat1* je aktívny vo vyvíjajúcich sa zrnách, hlavne v endosperme a v štítke (scutellum), kým *Cat2* je aktívny v štítke klíčiacych rastlín (Roupakias a kol., 1980). *Cat3* je aktívny v hypokotyle a výhonku klíčiacej rastliny (Goodman a Stuber, 1983a). Kóduje enzým, ktorý má štruktúru tetraméru a jeho lokalizácia, resp. jeho izoforiem je v mitochondriách, kým *Cat1* a *Cat2* sú v cytosole, hoci katalázy kódované *Cat1* a *Cat2* sú prechodne spojené s glyoxyzómami od 3. do 6. dňa klíčenia klíčiacej rastliny. *Cat3* (in vitro)

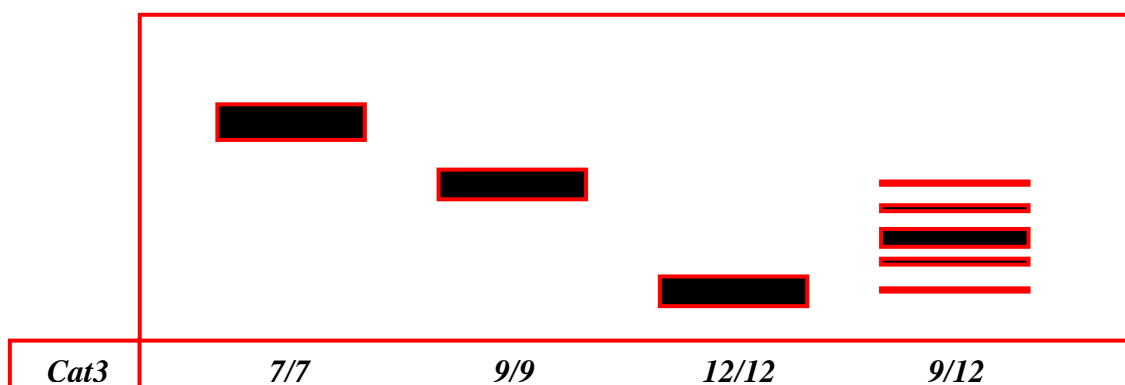
neinteraguje s *Cat1* a *Cat2* tak, aby tvorili hybridné enzýmy. Bolo popísaných 6 alel pre *Cat1* a 3 pre *Cat2*. Goodman a Stuber (1983a) uvádzajú štyri varianty *Cat3* vrátane nulového.

Pri analýzach koleoptily sa vyhodnocujú izoenzýmy kódované lokusom *Cat3* (na chromozóme 4S), ktorý môže kódovať alely *Cat3 - 7*, *Cat3 - 9*, *Cat3 - 12* a *Cat3 - n*. Pretože štruktúra enzýmu je tetramérna, heterozygotné rastliny budú mať v izozymograme 5 pásov, ktoré sa často javia skôr ako jeden pás, ako diskkrétne pásy na géle (Roupakias a kol., 1980). Stuber a Goodman (1983a), Goodman a Stuber (1983b) a Greneche a Giraud (1989) uvádzajú ako najfrekventovanejšiu alelu *Cat3 - 9*. Frekvencia alel podľa analýz samoopelivých línií je: *Cat3 - 7* (0,005), *Cat3 - 9* (0,879), *Cat3 - 12* (0,084) a *Cat3 - n* (0,032) – Stuber, Goodman (1983a). Analýzou 31 rás kukurice z Bolívie Goodman a Stuber (1983b) uvádzajú tieto alely a frekvencie: *Cat3 - n* (0,31), *Cat3 - 7* (0,04), *Cat3 - 8* (0,0), *Cat3 - 8.5* (0,0), *Cat3 - 9* (0,65), *Cat3 - 10.3* (0,0), *Cat3 - 11* (0,0) a *Cat3 - 12* (0,0). Vid' Obr. 21 a 22.



Obr. 21: Izozymogramy katalázy (CAT) samoopelivých línií kukurice v gélovom systéme “C” (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Cat3 - 9/9*, 2: *Cat3 - 12/12*

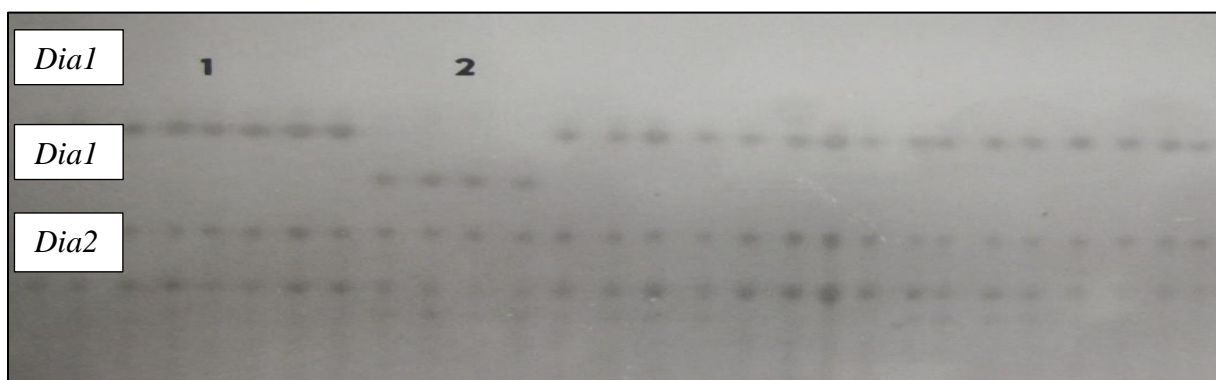


Obr. 22: Diagramy izozymogramov katalázy (CAT) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice sietej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Cat3 - 7/7*, *Cat3 - 9/9*, *Cat3 - 12/12*, *Cat3 - 9/12*

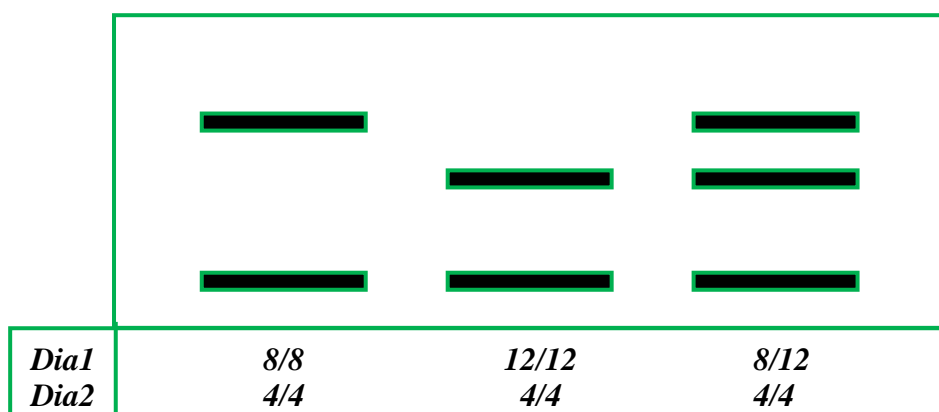
3.4 Genetická interpretácia polymorfizmu diaforázy (E. C. 1. 6. 99. -), príklady izozymogramov a ich diagramy

Diaforáza (DIA) E. C. 1. 6. 99. – izoenzymy diaforázy v koleoptile kukurice kódujú dva lokusy *Dia1* a *Dia2*. Lokus *Dia1* kóduje izoformy so štruktúrou diméra. Umiestnenie lokusu *Dia1* je na chromozóme 2S a *Dia2* na chromozóme 1L. V pestovaných genotypoch analýzami boli zistené v lokuse *Dia1* možné tri alely, *Dia1* – *n*, *Dia1* – 8 a *Dia1* – 12. V lokuse *Dia2* sú popísané tri alely *Dia2* – 2, *Dia2* – 4 a *Dia2* – 6. Väčšina genotypov má alelu *Dia2* – 4 (Stuber et al., 1988, Greneche a Giraud, 1989 a Bourgoin-Greneche a Lallemand, 1993). Izozymogramy DIA a ich diagramy sú zobrazené na Obr. 23 a 24.



Obr. 23: Izozymogramy diaforázy (DIA) samoopelivých línií kukurice v gélovom systéme “F” (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Dia1* – 8/8, *Dia2* – 4/4, 2: *Dia1* – 12/12, *Dia2* – 4/4 *Dia2* – 4/4, ostatné ako 1



Obr. 24: Diagramy izozymogramov katalázy (CAT) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice sietej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) – *Dia1* – 8/8, *Dia2* – 4/4; *Dia1* – 12/12, *Dia2* – 4/4; *Dia1* – 8/12, *Dia2* – 4/4

3.5 Genetická interpretácia polymorfizmu β - glukozidázy (E. C. 3. 2. 1. 21), príklady izozymogramov a ich diagramy

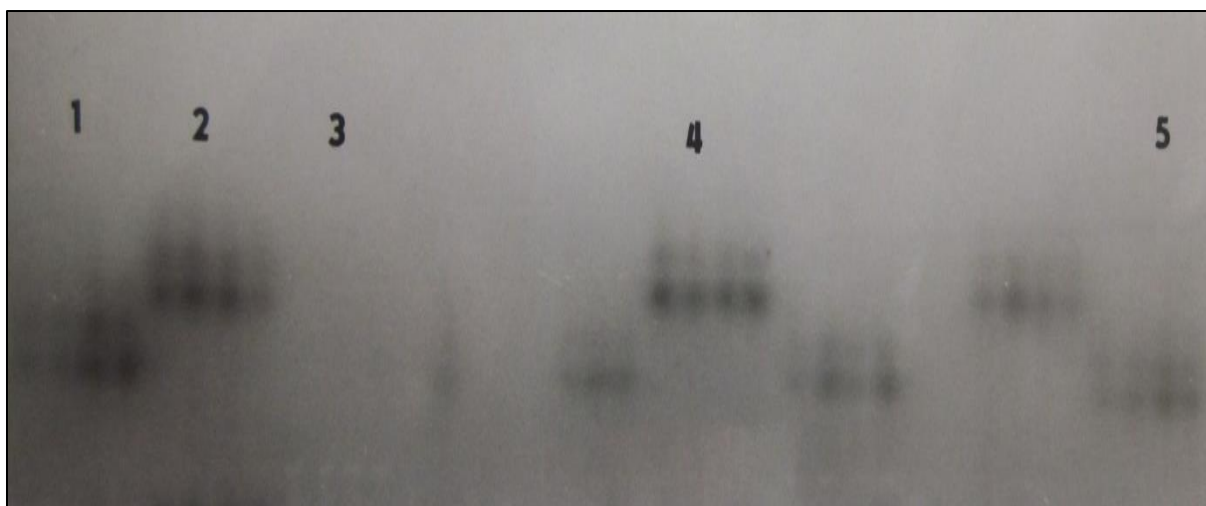
β -glukozidáza (GLU) E. C. 3. 2. 1. 21 a jej varianty sú pod kontrolou génu v jadre. Je to enzým často identifikovaný v rastlinných pletivách a v živočíšnych tkanivách. Z analýz klíčiacych rastlín vyplýva, že korene, mezokotyly a koleoptily tvoria identické izoformy. Intenzita vyfarbovania zón enzymatickej aktivity boli podobné pri mezokotyle a koleoptile, avšak úroveň aktivity enzýmov v častiach koreňa bola všeobecne celkom nízka a pásy (škvrny) na zymograme boli slabé a ťažko sa určovali. Všetky izoformy GLU v tlmivých roztokoch v rozpätí hodnôt pH = 5,5 – 7,4 migrujú k anóde. Každá alela v lokuse *Glu1* určuje jediný pás enzymatickej aktivity. Intralokusové heterodiméry migrujú do strednej polohy medzi dva zodpovedajúce homodiméry. Niektoré populácie kukurice majú určitý počet rastlín so zreteľnou aktivitou nulovej alely GLU. V tomto prípade heterozygotné genotypy s nulovou alelou tvoria iba jeden pás enzymatickej aktivity. Izoenzýmy GLU v kukurici majú štruktúru diméra. Stuber a kol. (1977) uvádzajú 22 alelických foriem v jednom lokuse – *Glu1*.

Lokus *Glu1* je lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 10 (10L) – Pryor (1978) a Stuber a kol. (1980a). 31 alel bolo identifikovaných v kukurici a v teosinte. Dve boli zistené len v teosinte a päť iba v kukurici (Stuber a Goodman, 1983a). V súbore 406 samoopelivých línií bolo prítomných 9 odlišných homozygotných genotypov (zahŕňajúc nulový). 47% línií bolo homozygotných pre *Glu1* – 7 a 26% pre *Glu1* – 6.

Goodman a Stuber (1983b) uvádzajú pre analyzované rasy kukurice z Bolívie tieto alely GLU a ich frekvencie: *Glu1* – *n* (0,019), *Glu1* – 1 (0,0113), *Glu1* – 2 (0,0929), *Glu1* – 2.5 (0,0097), *Glu1* – 3 (0,0103), *Glu1* – 3.2 (0,0026), *Glu1* – 4 (0,0013), *Glu1* – 5 (0,0016), *Glu1* – 6 (0,0997), *Glu1* – 7 (0,7084), *Glu1* – 9 (0, 001), *Glu1* – 10 (0,0177), *Glu1* – 10.5 (0,0148), *Glu1* – 13.5 (0,0006), *Glu1* – 14 (0,0045) a *Glu1* – 16 (0,0032).

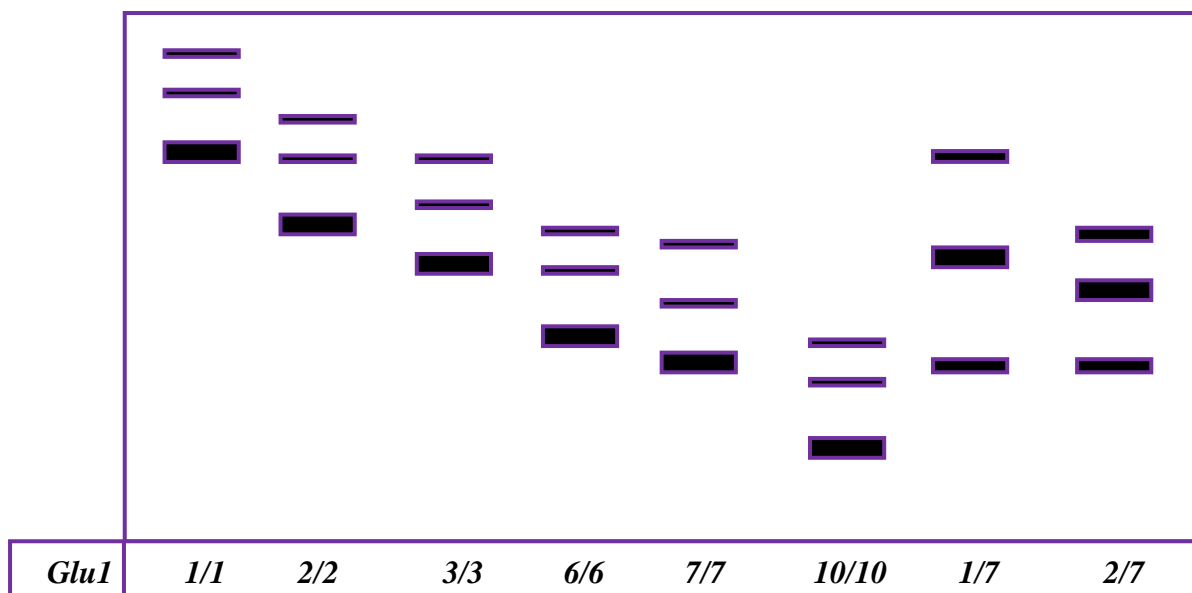
Analýzou súboru francúzskych línií kukurice Greneche a Giraud (1989) zistili prítomnosť týchto alel a ich frekvencie: *Glu1* – 1 (0,01), *Glu1* – 2 – 2.5 (0,363), *Glu1* – 3 (0,019), *Glu1* – 6 (0,198), *Glu1* – 7 (0,385), *Glu1* – 10 (0,016) a *Glu1* – *n* (0,003).

Pre interpretáciu polymorfizmu GLU je dôležité vedieť, že rozdiel migračných vzdialeností izoforiem *Glu1* – 6 a *Glu1* – 7 je malý, preto sa môže stať, že zóny enzymatickej aktivity môžu komigrovať (Greneche a Giraud, 1989). Izozymogramy GLU a ich diagramy sú zobrazené na Obr. 25 a 26.



Obr. 25: Izozymogramy β -glukozidázy (GLU) samoopelivých línií kukurice v gélovom systéme "B" (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Glu1* - 6/6, 2: *Glu1* - 3/3, 3: *Glu1* - n/n, 4: *Glu1* - 2/2, 5: *Glu1* - 7/7



Obr. 26: Diagramy izozymogramov β -glukozidázy (GLU) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice sietej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Glu1* - 1/1; *Glu1* - 2/2; *Glu1* - 3/3; *Glu1* - 6/6; *Glu1* - 7/7; *Glu1* - 10/10; *Glu1* - 1/7; *Glu1* - 2/7

3.6 Genetická interpretácia polymorfizmu glutamát – oxaloacetáttransaminázy (E. C. 2. 6. 1. 1), príklady izozymogramov a ich diagramy

Glutamát – oxaloacetáttransamináza (GOT) E. C. 2. 6. 1. 1 – má významnú úlohu pri transaminačných reakciách vedúcich k eliminácii dusíka z aminokyselín a k tvorbe

ketokyselín do Krebsovho cyklu a pre glukoneogézu. Preferovanejším názvom pre tento enzým je aspartátaminotransferáza (AAT), avšak v prácach týkajúcich sa kukurice sa najčastejšie uvádza GOT (Goodman a Stuber, 1983a). Izoenzýmy GOT študované v kukurici majú všetky stavbu diméra a sú kódované tromi lokusmi, a to sú *Got1*, *Got2* a *Got3* (Scandalios a kol., 1975 a Stuber a Goodman, 1979). *Got1* je lokalizovaný na chromozóme 3L, *Got2* na chromozóme 5L a *Got3* na chromozóme 5 (Goodman a kol., 1980b).

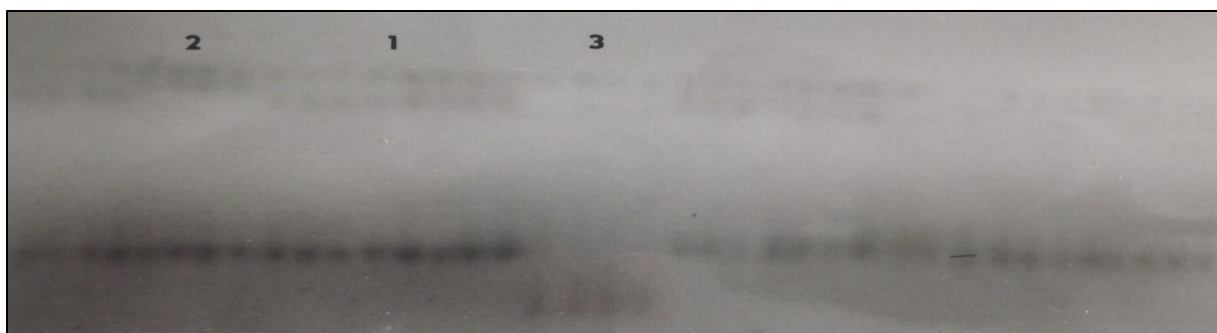
Scandalios a kol. (1975) uvádzajú, že produkty lokusu *Got1* sú v glyoxyzómoch, *Got2* v cytosole a *Got3* v mitochondriách. Stuber a Goodman (nepubl.) uvádzajú, že izoformy lokusu *Got2* boli prítomné aj vo frakcii plastidov. Izoenzýmy všetkých troch lokusov sú aktívne v pletivách po celej rastline zahŕňajúc korene, listy, štítok, endosperm, perikarp, aleurón, koleoptily a peľ (Scandalios a kol., 1975).

V kukurici a v teosinte v lokuse *Got1* bolo identifikovaných 9 alel (dve boli zistené iba v teosinte). V lokuse *Got2* bolo nájdených 8 alel a 6 alel v lokuse *Got3* (Stuber a Goodman, 1983a).

Analýza kolekcie 700 latinsko – amerických rás kukurice potvrdila, že najfrekvencovanejšími alelami v lokuse *Got1* sú alely 4 a 6 (frekvencovanejšou bola alela 4). Polymorfizmus enzýmov v lokuse *Got2* má malú variabilitu s prevahou *Got2* – 4. Nebola potvrdená variabilita v lokuse *Got3*. Prakticky vo všetkých genotypoch bola zastúpená alela *Got3* – 4. V kolekcii 406 samoopelivých línií kukurice (US) 92% línií bolo homozygotných v lokuse *Got1* – 4, 92% v lokuse *Got2* – 4 a všetky línie mali v lokuse *Got3* konštitúciu *Got3* – 4 (Stuber a Goodman, 1983a).

Goodman a Stuber (1983b) udávajú pre 31 rás kukurice z Bolívie nasledovné alely a ich frekvencie v percentách: *Got1* – *n* (0,97), *Got1* – 2 (0,03), *Got1* – 4 (30,81), *Got1* – 6 (68,19), *Got2* – 2 (2,26), *Got2* – 4 (97,74), *Got2* – 6 (0,06), *Got3* – 4 (99,42) a *Got3* – 7 (0,58) a Greneche a Giraud (1989) pre 526 francúzskych línií udávajú frekvencie: *Got1* – 4 (99,3), *Got1* – 5 (0,0), *Got1* – 6 (0,7), *Got2* – 2 (5,4), *Got2* – 4 (94,6) a *Got3* – 4 (100).

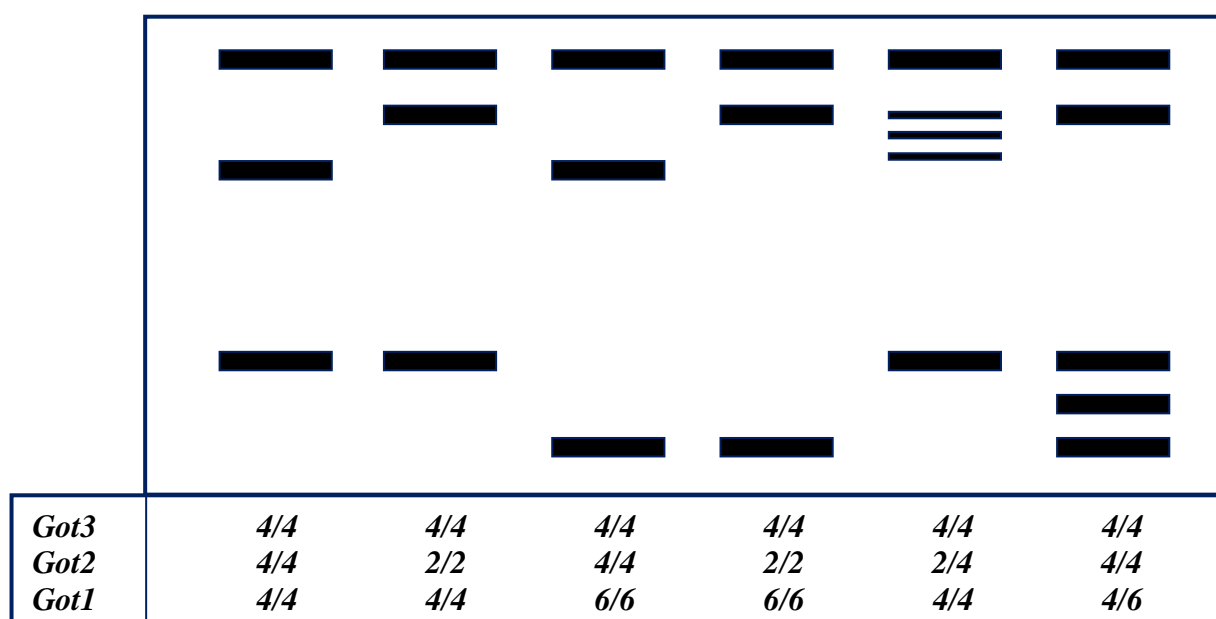
Všetky izoformy GOT migrujú smerom k anóde. Izoenzýmy spojené s lokusom *Got3* sa zvyčajne rýchlejšie pohybujú ako izoenzýmy spojené s lokusom *Got2*. Avšak niekedy sa môžu zóny enzymatickej aktivity prekrývať a komigrovať. Izoenzýmy v lokuse *Got1* sa pohybujú oveľa pomalšie ako v lokusoch *Got2* a *Got3*. Každá alela v každom lokuse presne určuje jednu škvrnu (pás). Intralokusové heterodiméry migrujú do strednej pozície medzi dva zodpovedajúce homodiméry. Neboli popísané žiadne interlokusové interakcie (Goodman a Stuber, 1983a). Izozymogramy GLU a ich diagramy sú zobrazené na Obr. 27 a 28.



Obr. 27: Izozymogramy glutamát-oxaloacetáttransaminázy (GOT) samoopelivých línií kukurice v gélovom systéme “C“ (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Got1* - 4/4, *Got2* - 4/4, *Got3* - 4/4, 2: *Got1* - 4/4, *Got2* - 2/2, *Got3* - 4/4,

3: *Got1* - 6/6, *Got2* - 4/4, *Got3* - 4/4



Obr. 28: Diagramy izozymogramov glutamát-oxaloacetáttransaminázy (GOT) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice sietej

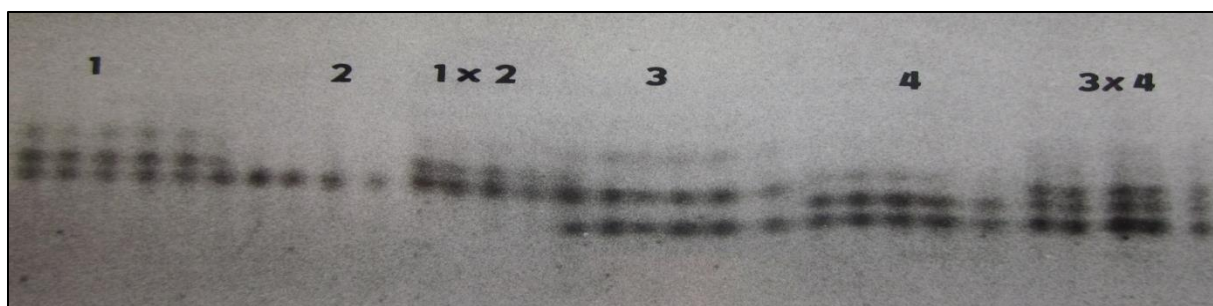
Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Got1* – 4/4, *Got2* – 4/4, *Got3* – 4/4; *Got1* – 4/4, *Got2* – 2/2, *Got3* – 4/4; *Got1* – 6/6, *Got2* – 4/4, *Got3* – 4/4; *Got1* – 6/6, *Got2* – 2/2, *Got3* – 4/4; *Got1* – 4/4, *Got2* – 2/4, *Got3* – 4/4; *Got1* – 4/6, *Got2* – 4/4, *Got3* – 4/4

3.7 Genetická interpretácia polymorfizmu izocitrátdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 42), príklady izozymogramov a ich diagramy

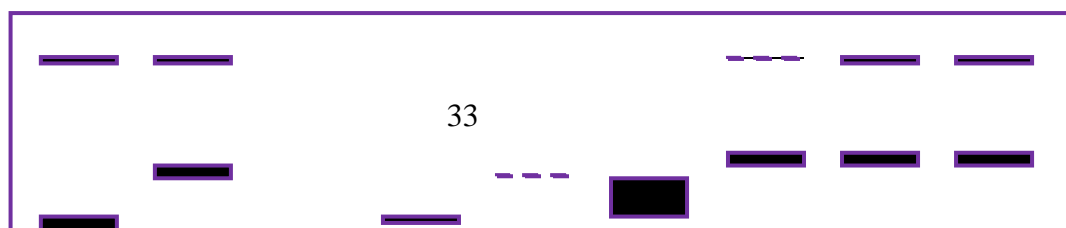
Izocitrátdehydrogenáza (IDH), E. C. 1. 1. 1. 42 a jej izoformy, ktoré sú dimérmami, sú v kukurici kódované dvomi lokusmi, *Idh1* a *Idh2*. Izoenzýmy lokusu *Idh1* všeobecne migrujú rýchlejšie, ale sa vyfarbujú menej tmavo ako izoenzýmy lokusu *Idh2*. Intralokusové heterodiméry migrujú do strednej pozície medzi dva zodpovedajúce homodiméry. Interakcie

medzi alelami odlišných lokusov tvoria tiež intermediárne heterodiméry. Z toho vyplýva, že sa prejavujú pri syntéze IDH interlokusové a intralokusové interakcie. Enzýmy sú cytoplazmatické a sú prítomné vo väčšine pletív. Gény *Idh1* a *Idh2* sú geneticky nezávislo lokalizované. *Idh1* je lokalizovaný na chromozóme 8 a viaže sa na gén *Mdh1* a *Idh2* sa tesne viaže na gén *Mdh2* na chromozóme 6L (Stuber a Goodman, 1980b; Goodman a Stuber, 1983a). V kukurici bolo v lokuse *Idh1* identifikovaných 5 alel a 8 alel v lokuse *Idh2*. Goodman a Stuber (1983b) potvrdzujú pre *Idh1* alely: *Idh1 - n*, *Idh1 - 4*, *Idh1 - 6*, *Idh1 - 8* a pre *Idh2* alely: *Idh2 - 4*, *Idh2 - 4.2*, *Idh2 - 6*, *Idh2 - 7* a *Idh2 - 7.5*. Za najbežnejšie alely v samoopelivých líniiach považujú Stuber a kol. (1988) *Idh1 - 4*, *Idh1 - 6*, *Idh1 - 8*, *Idh2 - 4*, *Idh2 - 4.2* a *Idh2 - 6*. Analýzou 406 samoopelivých línii (USA, Kanada, Európa) zistili Stuber a Goodman (1983a) nasledovnú frekvenciu alel: *Idh1 - 4* (96,8 %), *Idh1 - 6* (3,0 %), *Idh1 - 8* (0,2 %), *Idh2 - 4* (48,0 %), *Idh2 - 4.2* (0,2 %) a *Idh2 - 6* (51,7 %).

V 5 - dňovej koleoptile je aktivita génu *Idh2* asi 5 - krát väčšia ako pri *Idh1*. Tento pomer je obrátený v dvojdňovom štítku (scutellum). V kultivovanom materiáli sa najčastejšie identifikujú pre *Idh1* tri alely (4, 6 a 8) a pre *Idh2* dve alely (4 a 6). Alela *Idh1 - 4* prevláda a alela *Idh1 - 8* je veľmi vzácna. Väčšina homozygotných a heterozygotných genotypov sa dá ľahko identifikovať. Genotyp (*Idh1 - 6/6*, *Idh2 - 4/6*, inak veľmi vzácny) sa líši od genotypu (*Idh1 - 6/6*, *Idh2 - 6/6*) opačným gradientom relatívnej intenzity zón. Nie je však možné odlišovať genotypy (*Idh1 - 4/4*, *Idh2 - 4/4*) a (*Idh1 - 4/6*, *Idh2 - 4/4*), ktorých zymogramy vykazujú slabý rozdiel v relatívnej intenzite. Rovnako genotyp (*Idh1 - 4/6*, *Idh2 - 4/6*) sa nelíši od genotypu (*Idh1 - 4/4*, *Idh2 - 4/6*). Genotyp (*Idh1 - 4/6*, *Idh2 - 6/6*) sa ťažko odlišuje od genotypu (*Idh1 - 6/6*, *Idh2 - 6/6*). Oba zymogramy sa odlišujú relatívnou intenzitou svojich pásov (Greeneche a Giraud, 1989). Izozymogramy IDH sú na Obr. 29 a 30.



Obr. 29: Izozymogramy izocitrátdehydrogenázy (IDH) rôznych genotypov kukurice (jeden genotyp reprezentuje päť vzoriek – päť koleoptíl) v gélovom systéme “D“ (foto autor)
Vysvetlivky: 1: *Idh1 - 4/4*, *Idh2 - 4/4*, 2: *Idh1 - 6/6*, *Idh2 - 4/4*, 1 x 2: *Idh1 - 4/6*, *Idh2 - 4/4*, 3: *Idh1 - 4/4*, *Idh2 - 6/6*, 4: *Idh1 - 6/6*, *Idh2 - 6/6*, 3 x 4: *Idh1 - 4/6*, *Idh2 - 6/6*



Obr. 30: Diagramy izozymogramov izocitrátdehydrogenázy (IDH) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice siatej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Idh1* – 4/4, *Idh2* – 6/6; *Idh1* – 4/4, *Idh2* – 4/4; *Idh1* – 6/6, *Idh2* – 4/4; *Idh1* – 6/6, *Idh2* – 6/6; *Idh1* – 4/6, *Idh2* – 6/6; *Idh1* – 6/6, *Idh2* – 4/6; *Idh1* – 4/6, *Idh2* – 4/4; *Idh1* – 4/4, *Idh2* – 4/6; *Idh1* – 4/6, *Idh2* – 4/6

3.8 Genetická interpretácia polymorfizmu malátdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 37), príklady izozymogramov a ich diagramy

Malátdehydrogenáza (MDH), E. C. 1. 1. 1. 37, a jej multiplicitné molekulárne formy sa vyskytujú v mitochondriách, glyoxyzómoch, peroxizómoch a cytoplazme *Zea mays* L. Cytoplazmatické a mitochondriálne formy sú aktívne v koreňoch, stebľoch, endosperme, v štitku, hypokotyle, koleoptile, v dospelých listoch a v peli (Goodman a kol., 1980a; Newton a Schwartz, 1980; Goodman a kol., 1981). Nepodarilo sa dokázať rozdiely medzi formami MDH v glyoxyzómoch a v peroxizómoch, ale rozdiely boli výrazné pri porovnávaní uvedených foriem (tzv. cytoplazmatické) s mitochondriálnymi (Goodman a kol., 1980a). V kukurici sú cytoplazmatické formy MDH kódované dvomi jadrovými génmi umiestnenými na dlhom ramene chromozómu 1 (1L) a krátkom ramene chromozómu 5 (5S), kým mitochondriálne formy sú kódované tromi jadrovými génmi umiestnenými na dlhých ramenách chromozómov 3 (3L) a 6 (6L) a na chromozóme 8 (Newton a Schwartz, 1980). Cytoplazmatické formy MDH selektívne inhibuje kyselina askorbová (ale nie jej sodná soľ), zatiaľ čo na mitochondriálne formy má malý vplyv.

V koleoptile 5 – dňovej kukurice kóduje syntézu MDH 6 jadrových génov. Gény *Mdh1*, *Mdh2* a *Mdh3* sú umiestnené na chromozómoch 3L, 6L a 8 a kódujú mitochondriálne izoenzýmy. Gén *Mmm*, ktorý je umiestnený na dlhom ramene chromozómu 1 (1L), je zodpovedný za posttranslačnú modifikáciu mitochondriálnych peptidov. V kultivovanej kukurici existujú dve alelické formy: dominantná alela *M* a recesívna alela *m*, ktorá zvyšuje elektroforetickú mobilitu izoenzýmov kódovaných tromi génmi *Mdh1*, *Mdh2* a *Mdh3*. Gény *Mdh4* a *Mdh5* kódujú cytoplazmatické enzýmy. *Mdh4* a *Mdh5* sa nachádzajú na chromozómoch 1L a 5S (Newton a Schwartz, 1980; Goodman a kol., 1980a; Goodman a Stuber, 1982).

V každom lokuse, i keď s veľmi slabou frekvenciou, sa nachádzajú nulové alely, ktoré netvorí aktívne homodiméry, ani aktívne heterodiméry. Pre lokusy *Mdh1* a *Mdh2* boli identifikované nulové alely, vedúce k produkcii aktívnych heterodimérov s inými alelami z toho istého lokusu, alebo z lokusu kódujúceho mitochondriálne MDH. Na zabezpečenie normálneho vývinu rastliny stačí jediná normálne aktívna alela na jeden z troch lokusov kódujúcich mitochondriálne MDH. Rastliny bez cytoplazmatickej aktivity MDH (dvojité homozygoty pre nulovú alelu na génoch *Mdh4* a *Mdh5*) sú životaschopné (Goodman a kol., 1981 a Goodman a Stuber, 1983a).

Podľa Stubera a Goodmana (1983a) sa v kultivovanej kukurici môžu nachádzať tieto alely s frekvenciou:

<i>Mdh1</i>	4 alely	1 (9,6 %), 6 (86,0 %), 10.5 (3,9 %), n (0,5 %)
<i>Mdh2</i>	6 alel	3 (26,1 %), 3.5 (22,7 %), 4.5 (0,7 %), 5.6 (0,2 %), 6 (49,5 %), n (0,7 %)
<i>Mdh3</i>	2 alely	16 (91,4 %), 18 (8,6 %)
<i>Mdh4</i>	2 alely	12 (99,5 %), 14.5 (0,5 %)
<i>Mdh5</i>	4 alely	12 (97,5 %), 15 (1,5 %), 16.4 (0,2 %) n (0,7 %)
<i>Mmm</i>	2 alely	<i>M</i> (99,0 %), <i>m</i> (1,0 %).

Izoenzýmy kódované alelami 3 a 3.5 majú veľmi blízku mobilitu. Alelu 4.5 v koleoptile kukurice popísali Goodman a Stuber (1979).

Popisovanie alel číslami zodpovedá pre tento enzým relatívnym migračným vzdialenostiam izoenzýmov v systéme "D". MDH je aktívna v dimerickej forme. Produkuje sa intergennými interakciami (medzi *Mdh1*, *Mdh2* a *Mdh3* na jednej strane a *Mdh4* a *Mdh5* na

strane druhej). Vytvorené heterodiméry migrujú do polovičnej vzdialenosti medzi rodičovské homodiméry.

Elektroforetická separácia v systéme “D“ neumožňuje často zdetekovať pásy (škvrnny) s vyššou mobilitou ako 15, niekedy aj 12. Na analýzu rýchlej zóny je preto v takých prípadoch nevyhnutné používať systémy “A“ alebo “B“. Pri čítaní zymogramu sa berie do úvahy mobilita pásov, ako aj ich relatívna intenzita, podmienená dimerickou štruktúrou MDH a rozdielnou aktivitou génov. Väčšina genotypov sa číta jednoznačne. Predsa však čítanie vyžaduje bežnú prax pozorovania zymogramov a znalosť veľkého počtu zymogramov. Čítanie je súčasne založené na znalosti genetickej kontroly.

V tlmivom roztoku “D“ nie je na géloch viditeľný pás 16, ale prítomnosť heterodimérnych pásov *Mdh1 – Mdh3* a *Mdh2 – Mdh3* umožňuje stanoviť gén *Mdh3 – 16*.

Pás 6 – 6 je zložený z dvoch homodimérov (gény *Mdh1* a *Mdh2*) a jedného intergénneho heterodiméru kódovaného alelami *Mdh1 – 6* a *Mdh2 – 6*. Heterodimérny pás 3 – 6 je výsledkom dvoch typov interakcií, intragénnej a intergénnej: jednu kóduje gén *Mdh2* (*Mdh2 – 3 – Mdh2 – 6*) a druhú kódujú gény *Mdh1* a *Mdh2* (*Mdh2 – 3 – Mdh1 – 6*).

Pásy 12 a 6 sú veľmi časté a slúžia na fingerprintoch ako orientačné. Pásy 3 a 3.5 z *Mdh2* sa zoskupujú, lebo majú veľmi blízku mobilitu a na istých géloch sa môžu zamieňať. Naopak, kombinácia alel 3 alebo 3.5 s alelou 1 z *Mdh1* umožňuje rozlíšenie.

Existujú aj artefaktové pásy. Pred pásom 6 – 6 sa niekedy nachádza pás, tzv. dekompozícia slabšej intenzity. Pás 12 – 12 takmer vždy sprevádza pomalší pás (na úrovni 11).

Nie je možné odlíšiť genotypy (*Mdh1 – 1/1*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 16/16* ...) od (*Mdh1 – 1/6*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 16/16* ...).

Genotypy (*Mdh1 – 6/6*, *Mdh2 – 3/3*, *Mdh3 – 16/16* ...) a (*Mdh1 – 6/6*, *Mdh2 – 3/4.5*, *Mdh3 – 16/16* ...) majú zhodné fenotypy, rovnako ako genotypy (*Mdh1 – 1/6*, *Mdh2 – 3/3*, *Mdh3 – 16/16* ...) a (*Mdh1 – 1/6*, *Mdh2 – 3/4.5*, *Mdh3 – 16/16* ...).

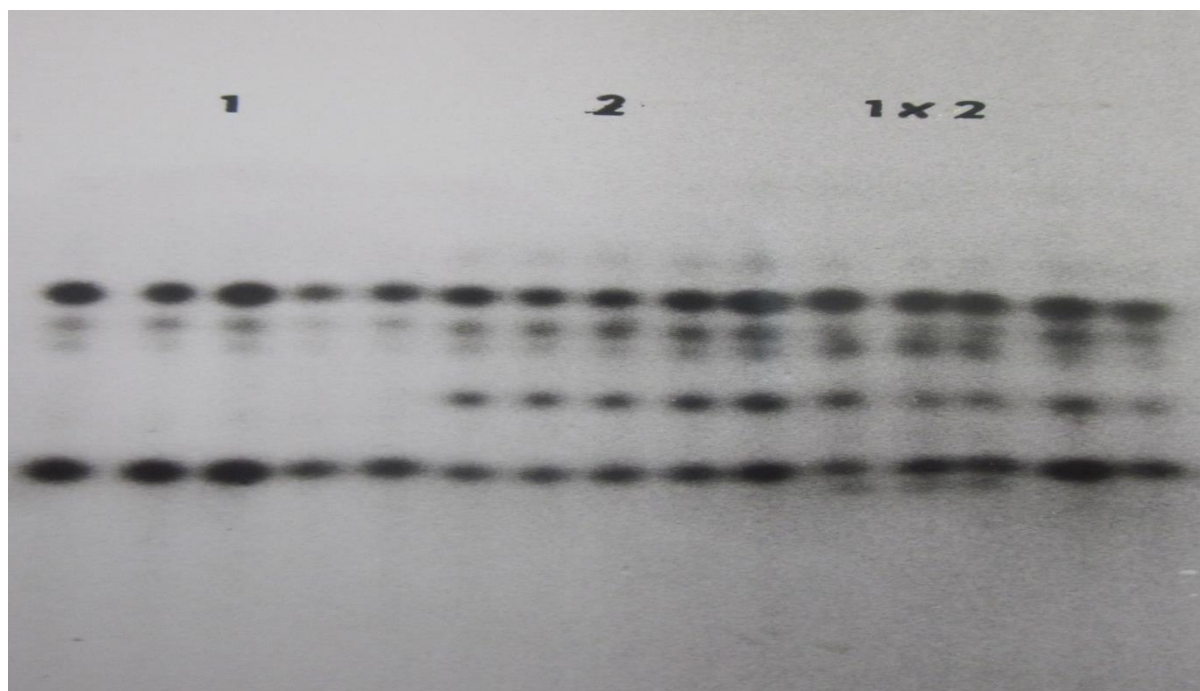
V dôsledku prítomnosti artefaktového pásu na úrovni 11 by sa mohli zamieňať genotypy (*Mdh1 – 6/6*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 16/16*) a (*Mdh1 – 6/6*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 18/18* ...). V prípade pochybností je možné potvrdiť čítanie genotypu migráciou v tlmivom roztoku “B“. Z rovnakých príčin by sa mohli zamieňať genotypy (*Mdh1 – 1/1*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 16/16*...) a (*Mdh1 – 1/1*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 18/18* ...).

Pri jedinej separácii MDH v tlmivom roztoku “D“ existuje riziko zámény medzi genotypmi: (*Mdh1 – 6/6*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 16/16*, *Mdh4 – 12/12*, *Mdh5 – 15/15*) a (*Mdh1 – 6/6*, *Mdh2 – 6/6*, *Mdh3 – 18/18*, *Mdh4 – 12/12*, *Mdh5 – 12/12*) v dôsledku superpozície pásov 6 – 18 (gény *Mdh1* alebo *Mdh2 – Mdh3*) a 12 – 15 (gény *Mdh4 – Mdh5*). Na rozlíšenie

týchto dvoch genotypov je potrebné urobiť tlmivý roztok "A" alebo "B". To isté platí pre dva genotypy ($Mdh1 - 1/1$, $Mdh2 - 6/6$, $Mdh3 - 16/16$, $Mdh4 - 12/12$, $Mdh5 - 15/15$) a ($Mdh1 - 1/1$, $Mdh2 - 6/6$, $Mdh3 - 18/18$, $Mdh4 - 12/12$, $Mdh5 - 12/12$).

Nie je možné rozlišovať medzi $Mdh5 - 12/15$ a $Mdh5 - 15/15$. Prítomnosť alely $Mdh1 - 1$ v genotypy sa prejavuje škvrnou v pomalejšej zóne zymogramu.

Zdá sa, že alela $Mdh2 - 4.5$ vytvára s alelou $Mdh1 - 6$ alebo $Mdh2 - 6$ na úrovni 4.5 heterodimér, a nie homodimér (Greeneche a Giraud, 1989). Izozymogramy MDH a ich diagramy sú na Obr. 31, 32, 33, 34, 35a, b.



Obr. 31: Izozymogramy malátdehydrogenázy (MDH) dvoch línií kukurice a ich hybrida (jeden genotyp reprezentuje päť vzoriek – päť koleoptíl) v gélovom systéme "B" (foto autor)

Vysvetlivky: 1: $Mdh1 - 6/6$, $Mdh2 - 6/6$, $Mdh3 - 16/16$, $Mdh4 - 12/12$, $Mdh5 - 12/12$,

$Mmm - M/M$,

2: $Mdh1 - 10.5/10.5$, $Mdh2 - 6/6$, $Mdh3 - 16/16$, $Mdh4 - 12/12$, $Mdh5 - 12/12$,

$Mmm - M/M$,

1x2: $Mdh1 - 6/10.5$, $Mdh2 - 6/6$, $Mdh3 - 16/16$, $Mdh4 - 12/12$, $Mdh5 - 12/12$,

$Mmm - M/M$

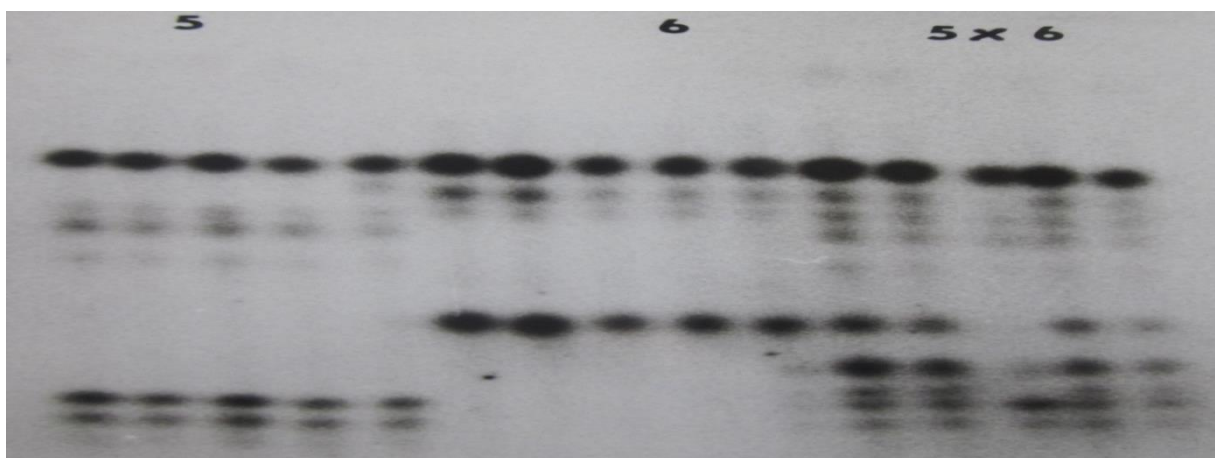


Obr. 32: Izozymogramy malátdehydrogenázy (MDH) dvoch línii kukurice a ich hybrida (jeden genotyp reprezentuje päť vzoriek – päť koleoptíl) v systéme “B“ (foto autor)

Vysvetlivky: 3: *Mdh1* - 6/6, *Mdh2* - 6/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 15/15,
Mmm - M/M,

4: *Mdh1* - 6/6, *Mdh2* - 3/3, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12,
Mmm - M/M

3x4: *Mdh1* - 6/6, *Mdh2* - 3/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/15,
Mmm - M/M (v hybride 3 x 4 má 5. vzorka zľava – koleoptila -
izozymogram ako línia 3 - ide teda o samoopelenie materského komponenta)

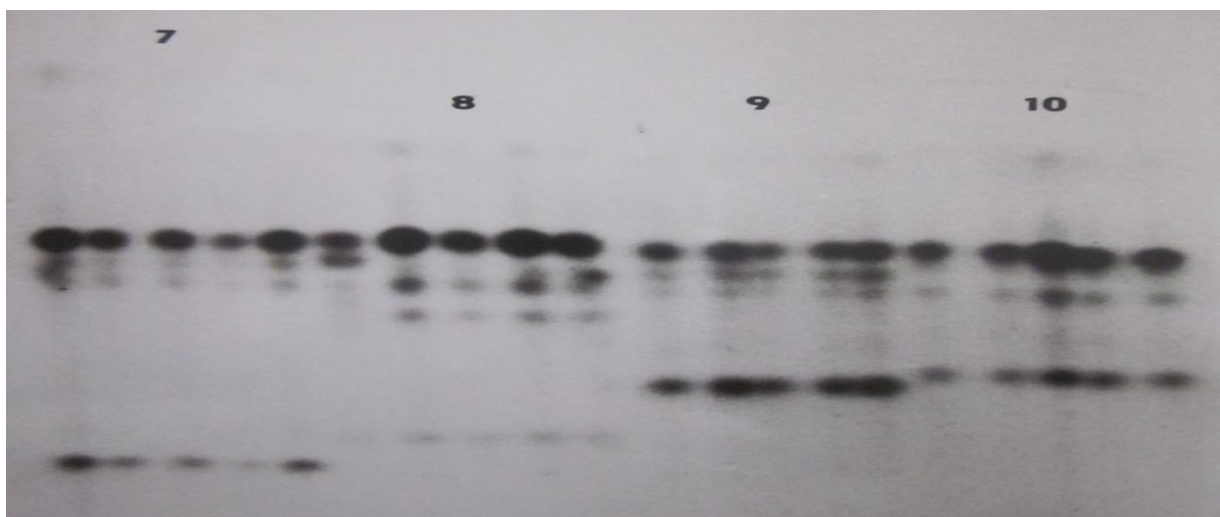


Obr. 33: Izozymogramy malátdehydrogenázy (MDH) dvoch línii kukurice a ich hybrida (jeden genotyp reprezentuje päť vzoriek) v systéme “B“ (foto autor)

Vysvetlivky: 5: *Mdh1* - 1/1, *Mdh2* - 3/3, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12,
Mmm - M/M,

6: *Mdh1* - 6/6, *Mdh2* - 6/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12,
Mmm - M/M,

5 x 6: *Mdh1* - 1/6, *Mdh2* - 3/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12,
Mmm - M/M, (v hybride 5 x 6 má 3. vzorka zľava – koleoptila izozymogram
ako línia 5 – ide teda o samoopelenie materského komponenta)



Obr. 34: Izozymogramy malátdehydrogenázy (MDH) štyroch línií kukurice (jeden genotyp reprezentuje päť vzoriek – päť koleoptíl) v gélovom systéme "B" (foto autor)

Vysvetlivky: 7: *Mdh1* - *n/n*, *Mdh2* - *3/3*, *Mdh3* - *18/18*, *Mdh4* - *12/12*,

Mdh5 - *12/12*, *Mmm* - *M/M*

8: *Mdh1* - *6/6*, *Mdh2* - *4.5/4.5*, *Mdh3* - *16/16*, *Mdh4* - *12/12*,

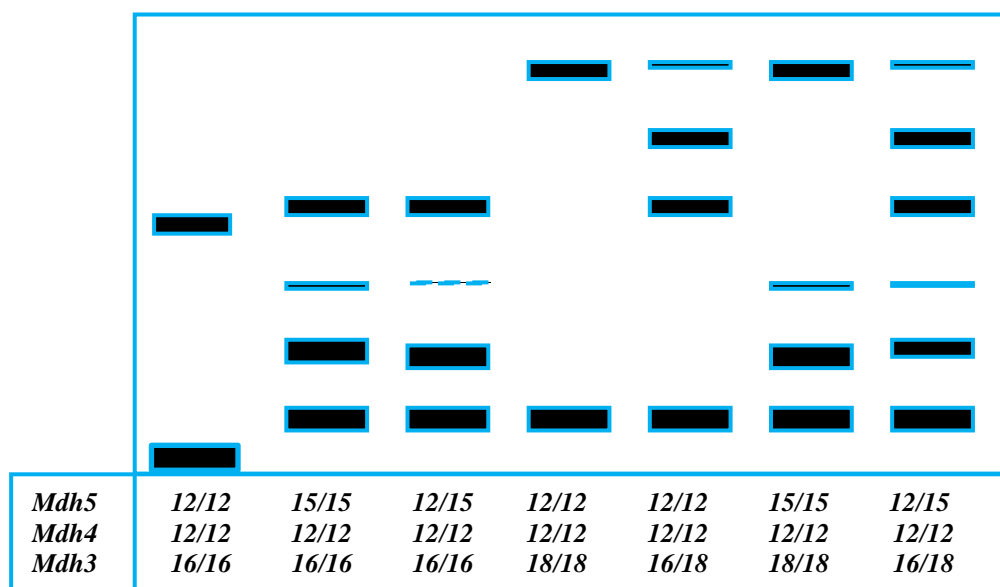
Mdh5 - *12/12*, *Mmm* - *M/M*

9: *Mdh1* - *6/6*, *Mdh2* - *n/n*, *Mdh3* - *16/16*, *Mdh4* - *12/12*,

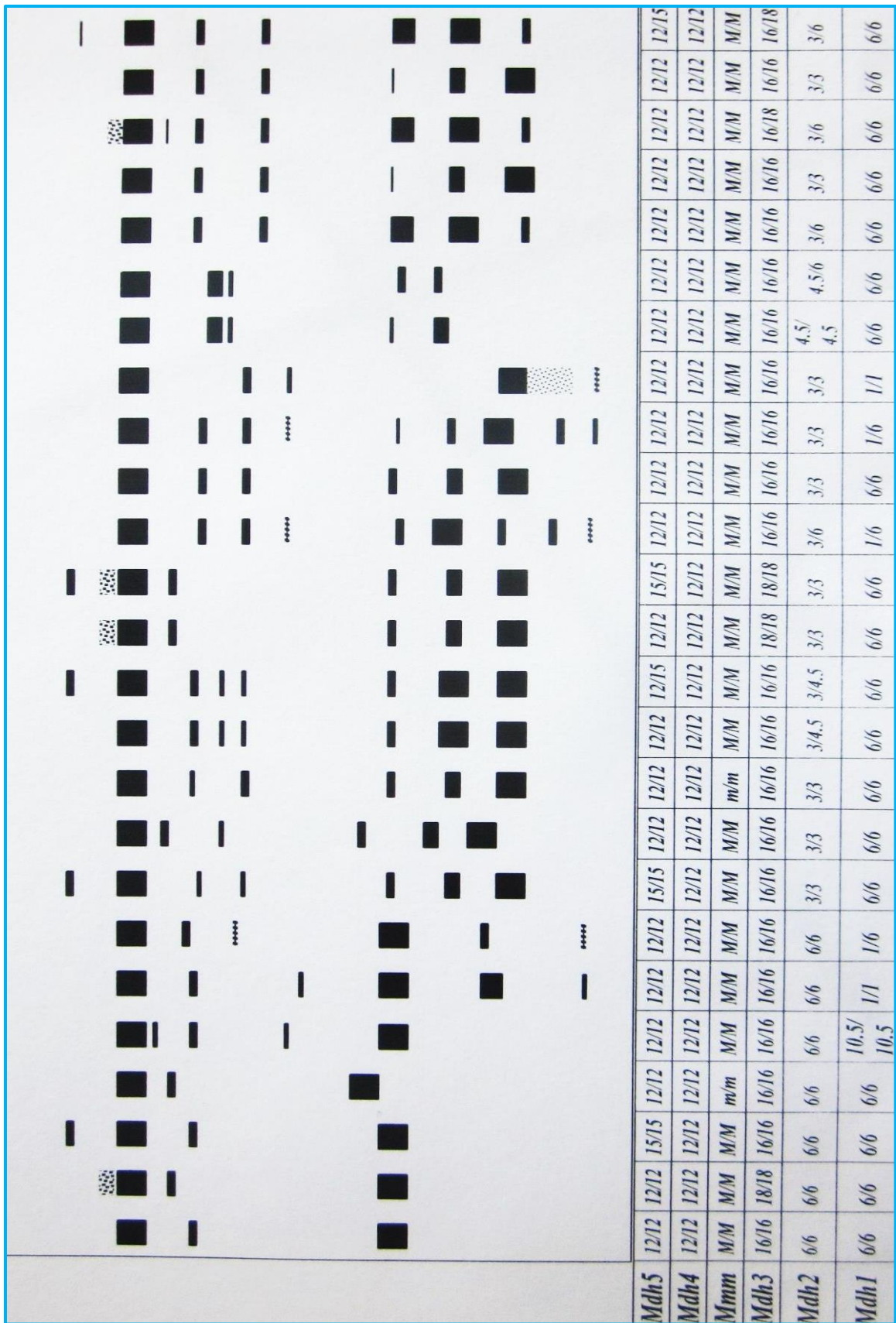
Mdh5 - *12/12*, *Mmm* - *M/M*

10: *Mdh1* - *6/6*, *Mdh2* - *6/6*, *Mdh3* - *16/16*, *Mdh4* - *12/12*,

Mdh5 - *12/12*, *Mmm* - *m/m*



Obr. 35a: Diagramy izozymogramov malátdehydrogenázy (MDH) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice satej – pokračovanie na ďalšej strane (Obr. 35b)



Obr. 35b: Diagramy izozymogramov malátdehydrogenázy (MDH) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice siatej - vysvetlivky sú na nasledujúcej strane

Vysvetlivky k Obr. 35a: Genotypový a fenotypový prejav lokusov MDH, a to sú: *Mdh3*, *Mdh4* a *Mdh5*. Spoločný pás (škvrna) vyskytujúca sa vo všetkých izozymogramoch je kódovaná alelou *I2* (marker). So vzrastajúcou mobilitou izoformy v prípade enzýmu MDH vracia aj číselné označenie alely zodpovednej za jej syntézy v danom lokuse.

Vysvetlivky k Obr. 35b: Genotypový a fenotypový prejav lokusov MDH, a to sú: *Mdh1*, *Mdh2*, *Mdh3*, *Mmm*, *Mdh4* a *Mdh5*. Spoločný pás (škvrna) vyskytujúca sa vo všetkých izozymogramoch je kódovaná alelou *I2* (marker). So vzrastajúcou mobilitou izoformy v prípade enzýmu MDH vracia aj číselné označenie alely zodpovednej za jej syntézy v danom lokuse.

3.9 Genetická interpretácia polymorfizmu 6 – fosfoglukonátdehydrogenázy (E. C.

1. 1. 1. 44), príklady izozymogramov a ich diagramy

6 – fosfoglukonátdehydrogenáza (PGD), E. C. 1. 1. 1. 44 je enzýmom pentózového cyklu. Izoenzýmy PGD, ktoré sa zistili v kukurici, sú tiež dimérmí kódovanými dvomi lokusmi, a to *Pgd1* a *Pgd2* (Stuber a Goodman, 1980c). Izoenzýmy PGD sú kódované nukleárnymi génmi. Lokus *Pgd1* je na chromozóme 6L a lokus *Pgd2* na chromozóme 3L. Izoenzýmy PGD boli prítomné vo všetkých analyzovaných pletivách kukurice (koreň, koleoptila, štítok – scutellum, peľové zrná a listy). Aktivita enzýmov kódovaných *Pgd1* a *Pgd2* bola lokalizovaná v cytoplazme. Delenie izoenzýmov PGD prebieha v tlmivom roztoku zloženom z L – histidínu a kyseliny citrónovej pri pH = 6,5 (systém “D”). Dobrá separácia izoenzýmov PGD vyžaduje precíznejšie kontrolované podmienky ako mnoho iných frekventovane študovaných enzýmov. Napr., relatívna ostrosť izoenzýmových zón môže značne variovať i na škrobe vyrobenom tým istým výrobcom. Enzým je dimérom. Každá alela (okrem nulovej) v každom z uvedených dvoch lokusov (*Pgd1*, *Pgd2*) určuje jednu zónu izoenzýmu. Pri tomto enzýme sa prejavujú interlokusové a intralokusové interakcie. Preto rastliny heterozygotné v oboch lokusoch budú tvoriť 10 izoenzýmových zón, z ktorých niektoré môžu komigrovať. Nulová alela, ktorá sa vyskytuje s malou frekvenciou v lokuse *Pgd1*, netvorí aktívny homodimér ani heterodiméry so žiadnymi inými alelami (Stuber a Goodman, 1984).

V lokuse *Pgd1* bolo identifikovaných 12 alel (vrátane nulovej) a v lokuse *Pgd2* ich bolo 8 (Stuber a Goodman, 1984). V skupine 406 samoopelivých línií (public lines), hlavne z USA a Kanady, boli prítomné iba 3 alely v lokuse *Pgd1* a 2 alely v lokuse *Pgd2*. 30 % línií bolo

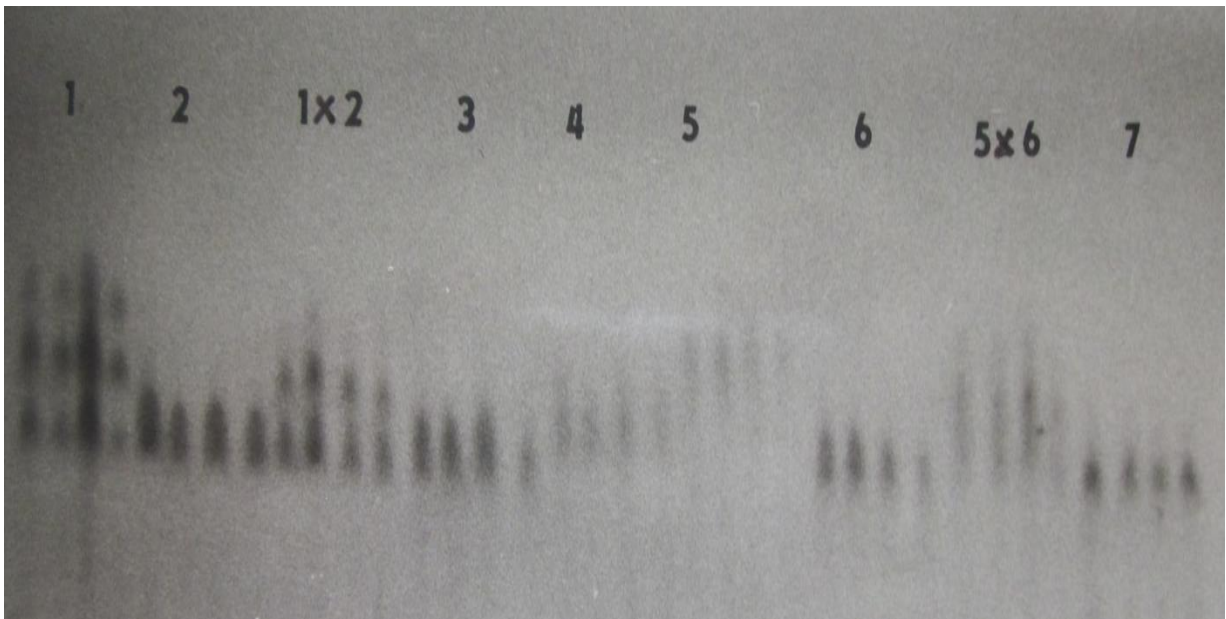
homozygotných pre *Pgd1* – 2; 68 % pre *Pgd1* – 3.8; 1,7 % pre *Pgd1* – *n*; 7 % pre *Pgd2* – 2.8 a 93 % pre *Pgd2* – 5 (Stuber a Goodman, 1983a).

Homodiméry 3.8 – 3.8 a 2.8 – 2.8 na jednej strane a 3.8 – 3.8 a 5 – 5 na strane druhej majú veľmi blízku mobilitu, ktorá navyše s intergennými interakciami vedie k zymogramom, ktorých zóny sú spojené. Tento problém vedie k istým nejasnostiam pri čítaní:

- genotyp (*Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 2.8/5) sa niekedy číta ako (*Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 2.8/2.8) alebo (*Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 5/5),
- genotyp (*Pgd1* – 2/3.8, *Pgd2* – 2.8/5) dáva neurčitý zymogram,
- genotyp (*Pgd1* – *n/n*, *Pgd2* – 5/5) má fenotyp zhodný s fenotypom (*Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 5/5).

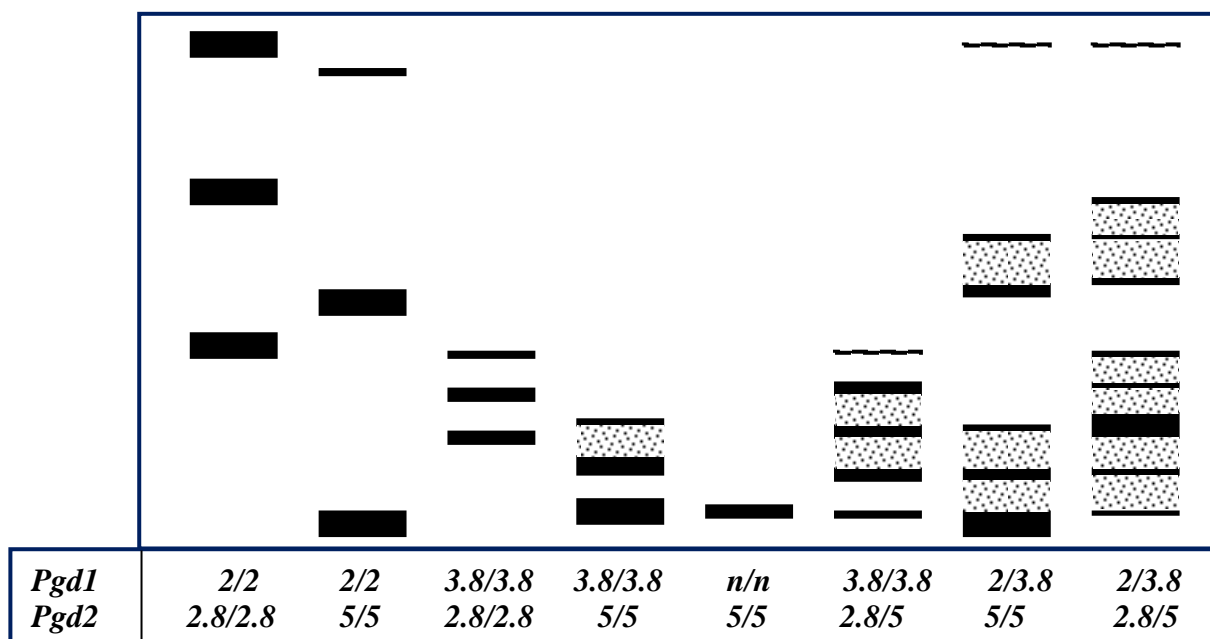
Použitie kontrol je nevyhnutné (Greeneche a Giraud, 1989).

Izozymogramy PGD a ich diagramy sú zobrazené na Obr. 36 a 37.



Obr. 36: Izozymogramy 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD) rôznych genotypov kukurice (jeden genotyp reprezentujú štyri vzorky – štyri koleoptily) v gélovom systéme “D“ (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Pgd1* – 2/2, *Pgd2* – 5/5, 2: *Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 5/5, 1 x 2: *Pgd1* – 2/3.8, *Pgd2* – 5/5, 3: *Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 5/5, 4: *Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 2.8/2.8, 5: *Pgd1* – 2/2, *Pgd2* – *n/n*, 6: *Pgd1* – 3.8/3.8, *Pgd2* – 5/5, 5 x 6: *Pgd1* – 2/3.8, *Pgd2* – *n/5*, 7: *Pgd1* – *n/n*, *Pgd2* – 5/5



Obr. 37: Diagramy izozymogramov 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice siatej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Pgd1* - 2/2, *Pgd2* - 2.8/2.8; *Pgd1* - 2/2, *Pgd2* - 5/5; *Pgd1* - 3.8/3.8, *Pgd2* - 2.8/2.8; *Pgd1* - 3.8/3.8, *Pgd2* - 5/5; *Pgd1* - *n/n*, *Pgd2* - 5/5; *Pgd1* - 3.8/3.8, *Pgd2* - 2.8/5; *Pgd1* - 2/3.8, *Pgd2* - 5/5; *Pgd1* - 2/3.8, *Pgd2* - 2.8/5

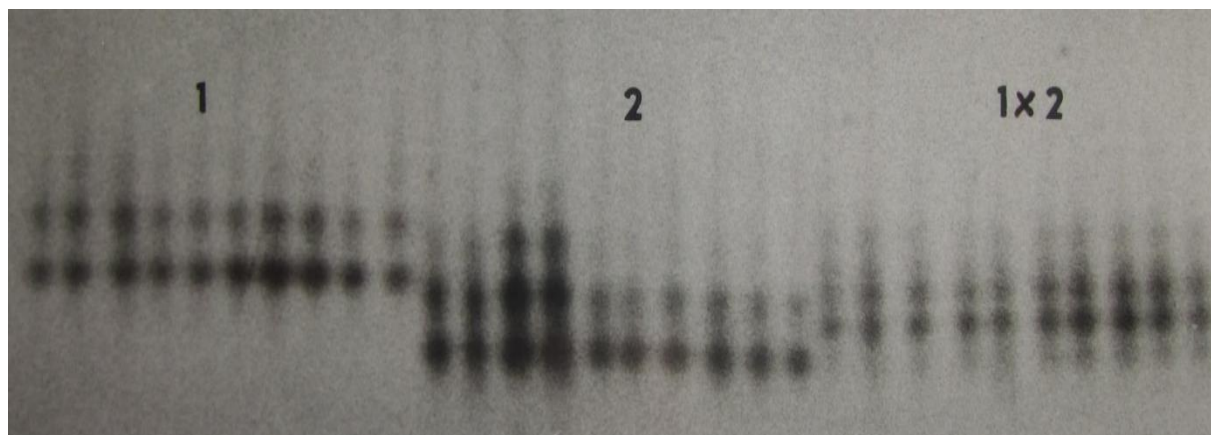
3.10 Genetická interpretácia polymorfizmu fosfogluoizomerázy (E. C. 5. 3. 1. 9), príklady izozymogramov a ich diagramy

Fosfogluoizomeráza (PGI), E. C. 5. 3. 1. 9 (často označovaná ako fosfohexózoizomeráza PHI, alebo glukózofosfátizomeráza, GPI), je jedným z glykolytických enzýmov (Goodman a Stuber, 1983a). Separácia enzýmov PGI prebieha na gélovom systéme "D" podobne ako separácia PGD. PGI má stavbu diméra. Syntézu PGI kóduje gén *Pgil* na chromozóme 1L. Aktivita génu sa prejavuje v cytoplazme mnohých pletív rastliny. Každá alela v lokuse *Pgil* poskytuje sériu 3 – 4 zón, často s klesajúcou intenzitou smerom k rýchlejším zónam (Goodman a Stuber, 1983a).

V lokuse *Pgil* bolo identifikovaných 9 alel. V kultivovanej kukurici boli popísané 4 alely s nasledovnou frekvenciou: *Pgil* - 2 (1,2 %), *Pgil* - 3 (0,2 %), *Pgil* - 4 (83,7 %) a *Pgil*-5 (14,8 %). Z uvedeného vyplýva, že alela 4 prevláda (Stuber a Goodman, 1983).

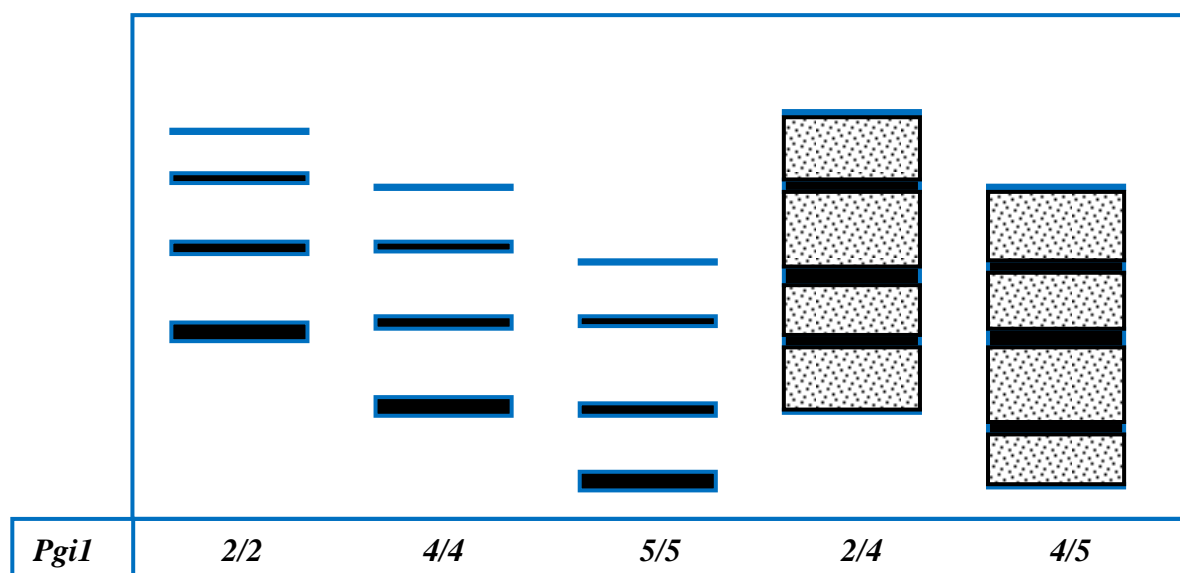
V prípade heterozygotných genotypov (*Pgi1* – 2/4) a (*Pgi1* – 4/5) zymogramy predstavujú spojitú zónu (škvrnu) medzi pásmi, spôsobenú prekryvaním syntetizovaných izoenzýmov. Genotypy sú však úplne identifikovateľné. Izozymogramy PGI a diagramy sú na Obr. 38 a 39.

Umiestnenie študovaných lokusov (na chromozómoch) zodpovedných za expresiu izoenzýmov je zobrazené na Obr. 42 podľa autorov Stuber a kol. (1988), ktorí uvádzajú že poloha *Aco2*, *Aco3* a *Aco4* (ACO – enzým aconitáza) nie je známa.



Obr. 38: Izozymogramy fosfoglukózoizomerázy (PGI) dvoch línií kukurice a ich hybrida (jeden genotyp reprezentuje desať vzoriek – desať koleoptíl) v gélovom systéme “D“ (foto autor)

Vysvetlivky: 1: *Pgi1* - 4/4, 2: *Pgi1* - 5/5, 1 x 2: *Pgi1* - 4/5



Obr. 39: Diagramy izozymogramov fosfoglukózoizomerázy (PGI) prítomných v koleoptílách svetového sortimentu kukurice sietej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Pgi1* - 2/2; *Pgi1* - 4/4; *Pgi1* - 5/5; *Pgi1* – 2/4; *Pgi1* – 4/5. Pásky posledných dvoch izozymogramov často medzi sebou tvoria tieň.

3.11 Genetická interpretácia polymorfizmu fosfoglukomutázy (E. C. 2. 7. 5. 1), príklady izozymogramov a ich diagramy

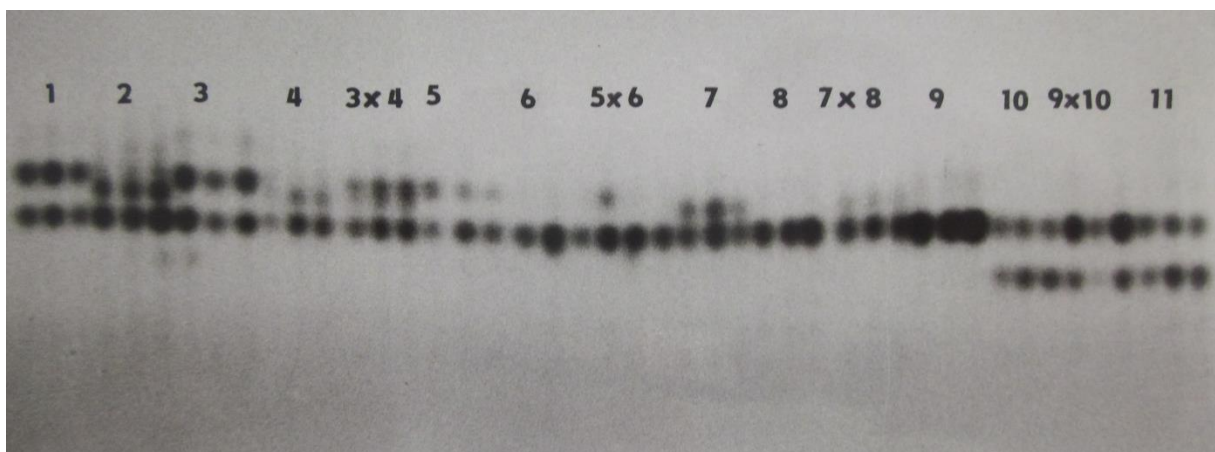
Fosfoglukomutáza (PGM), E. C. 2. 7. 5. 1, je jedným z glykolytických enzýmov študovaných v rastlinných druhoch. Izoenzýmy PGM v kukurici sú monomérmí, ktoré sú kódované dvomi lokusmi, a to sú *Pgm1* a *Pgm2*. Aktivitu PGM sa nepodarilo dokázať ani v plastidoch ani v mitochondriách. Vzhľadom na to, že izoenzymy PGM boli prítomné vo všetkých častiach rastliny vyplýva, že aktivita oboch lokusov má miesto v cytoplazme. *Pgm1* je lokalizovaný blízko *Mdh4* na chromozóme 1L a *Pgm2* blízko *Mdh5* na chromozóme 5S. *Mdh4* a *Mdh5* kódujú enzýmy pôsobiace v cytoplazme podobne, ako oba lokusy PGM, ktorých enzýmy tiež pôsobia v cytoplazme. V lokuse *Pgm1* bolo identifikovaných 19 alel a v lokuse *Pgm2* 21 alel. Enzýmy sú monomerické a nejestvujú intergénne a intragénne interakčné zóny (Stuber a Goodman, 1983b).

Na elektroforetické delenie PGM sa používa systém tlmivého roztoku s pH = 6,5 (systém "D"). Tento systém stačí na zistenie obmedzeného polymorfizmu kultivovanej kukurice. Systém tlmivého roztoku s pH = 5,0 (systém "A") poskytuje lepšiu separáciu (Stuber a Goodman, 1979; Stuber a Goodman, 1983b). V systéme "D" zóny *Pgm1* – 9 a *Pgm2* – 4 komigrujú. Možno pozorovať artefaktovú zónu slabšej intenzity, nachádzajúcu sa na úrovni zóny *Pgm2* – 1 (Greeneche a Giraud, 1989). Je preto potrebné použiť i systém "A".

V kultivovanej kukurici je obmedzený výskyt alel v daných dvoch lokusoch. Na základe analýzy 406 samoopelivých línií (prevažne USA, Kanada) sa uvádzajú tieto alely: *Pgm1* – 9, *Pgm1* – 16, *Pgm2* – 1, *Pgm2* – 3, *Pgm2* – 4 a *Pgm2* – 8. 97,8 % bolo homozygotných pre *Pgm1* – 9; 75,4 % pre *Pgm2* – 4; 17,7 % pre *Pgm2* – 3 a 6,7 % pre *Pgm2* – 8 (Stuber a Goodman, 1983a).

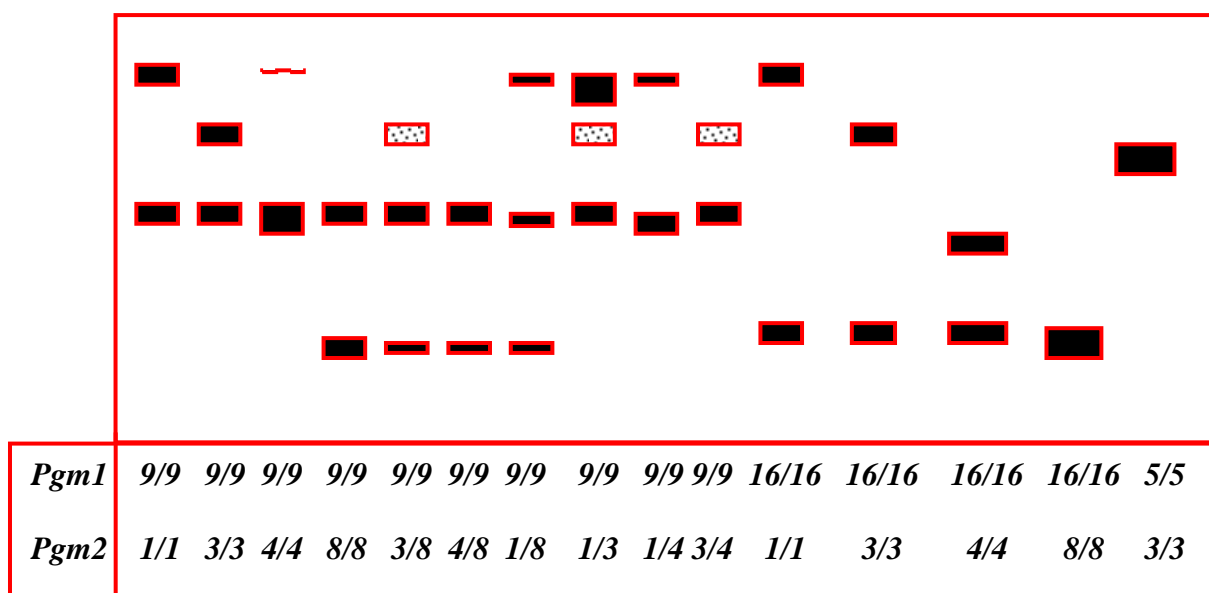
PGM sa môže používať na popis línií, avšak oveľa ťažšie sa čítajú zymogramy heterozygotných genotypov (s výnimkou alely *Pgm2* – 8). Genotyp *Pgm2* – 4/8 sa často dobre identifikuje, ale niekedy sa zamieňa s genotypom *Pgm2* – 8/8. Genotyp *Pgm2* – 3/8 sa neodlišuje od genotypu *Pgm2* – 4/8. Genotyp *Pgm2* – 1/4, sa zamieňa s genotypom *Pgm2* – 4/4. Genotyp *Pgm2* – 1/3 sa zriedkavo číta správne a zamieňa sa s *Pgm2* – 1/4 a s *Pgm2* – 1/1. Genotyp *Pgm2* – 3/4 poskytuje zymogram veľmi blízky zymogramu genotypu *Pgm2* – 4/4 (Greeneche a Giraud, 1989).

Izozymogramy PGI a ich diagramy sú zobrazené na Obr. 40 a 41.



Obr. 40: Izozymogramy fosfoglukomutázy (PGM) rôznych genotypov kukurice (jeden genotyp reprezentujú tri vzorky – tri koleoptily) v gélom systéme “D“ (foto autor)

Vsvetlivky: 1: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/1, 2: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/3, 3: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/1, 4: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/3, 3 x 4: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/3, 5: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/1, 6: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 4/4, 5 x 6: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/4, 7: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/3, 8: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 4/4, 7 x 8: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/4, 9: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 4/4, 10: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 8/8, 9 x 10: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 4/8, 11: *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 8/8



Obr. 41: Diagramy izozymogramov fosfoglukomutázy (PGM) prítomných v koleoptilách svetového sortimentu kukurice sietej

Vysvetlivky: Genotypy (fenotypy) - *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/1; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/3; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 4/4; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 8/8; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/8; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 4/8; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/8; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/3; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 1/4; *Pgm1* - 9/9, *Pgm2* - 3/4; *Pgm1* - 16/16, *Pgm2* - 1/1; *Pgm1* - 16/16, *Pgm2* - 3/3; *Pgm1* - 16/16, *Pgm2* - 4/4; *Pgm1* - 16/16, *Pgm2* - 8/8; *Pgm1* - 5/5, *Pgm2* - 3/3

4 POUŽITIE KONTROLNÝCH BIOLOGICKÝCH VZORIEK (MARKEROV) PRI IDENTIFIKÁCI KONKRÉTNÝCH LOKUSOV, ALEL A NIMI KÓDOVANÝCH IZOENZÝMOV

Ako bolo uvedené v predošlých kapitolách, nie vždy je identifikácia izoenzýmov jednoduchá a jednoznačná. Pri analýzach vzoriek rastlinného druhu, ktorý ešte nebol z hľadiska polymorfizmu enzýmov analyzovaný a študovaný, je potrebné nejasný prejav polymorfizmu podrobiť genetickej analýze. Podstatne jednoduchšie je to v prípade analýz vzoriek druhov už známych z pohľadu štruktúry a prejavu ich polymorfizmu. I v týchto prípadoch sa však môžu objaviť v určitých prípadoch a vzájomných interakciách podobné alebo blízke prejavy polymorfizmu. Sporné, resp. komplikované prípady interpretácie polymorfizmu enzýmov v prípade kukurice siatej sú uvedené v kapitole 3. Ubezpečiť sa, že identifikovaná alela a jej izoforma sú skutočné sa dá nanosením vzorky s výskytom garantovanej alely. Ak je identifikácia alely v neznámej vzorke správna, jej fenotypový prejav sa musí zhodovať s fenotypovým prejavom nanesej vzorky s výskytom garantovanej alely. Niektoré vybrané a dostupné líniové materiály kukurice kódujúce konkrétne gény a v nich konkrétne alely z renomovaných šľachtiteľských pracovísk sú uvedené v Tab. 1 a na Obr. 42 sú uvedené miesta výskytu lokusov jednotlivých enzýmov na chromozómoch. Kompletnejší prehľad fingerprintov analyzovaných genotypov kukurice uvádzajú vedecké práce uvedené v 3. kapitole skript, ďalej katalógy a semenárske príručky (Henderson, 1968; 1972; 1984; Stuber a kol., 1988; Greneche a Giraud, 1989; Seedsman's Handbook 16th Edition CORN, 1989; Bourgoïn-Greneche a Lallemand, 1993; Bourgoïn-Grenéche, Giraud a Pouget, 1998). Zahraničné pracoviská, ktoré uchovávajú a udržujú vzorky semien týchto genetických zdrojov sú uvedené v uvedených prácach. Na žiadosť pracoviska o zaslanie kontrolnej vzorky množiteľské pracovisko poskytne zdarma alebo za vopred dohodnutý poplatok. Pri väčšine publikovaných prác týkajúcich sa iných, menej frekventovane riešených rastlinných druhoch je takýto postup, buď ťažký alebo nemožný, a to hlavne z týchto dôvodov:

- a) práca neuvádza názvy alebo kódy analyzovaných vzoriek (genotypov, odrôd, populácií, línií, hybridov),
- b) nie je uvedené pracovisko pôvodu vzorky alebo celého súboru vzoriek,
- c) práca nedokumentuje dosiahnuté výsledky originálnymi, analýzou dosiahnutými fingerprintami na použítom separačnom médiu, dokonca ani diagramami fingerprintov.

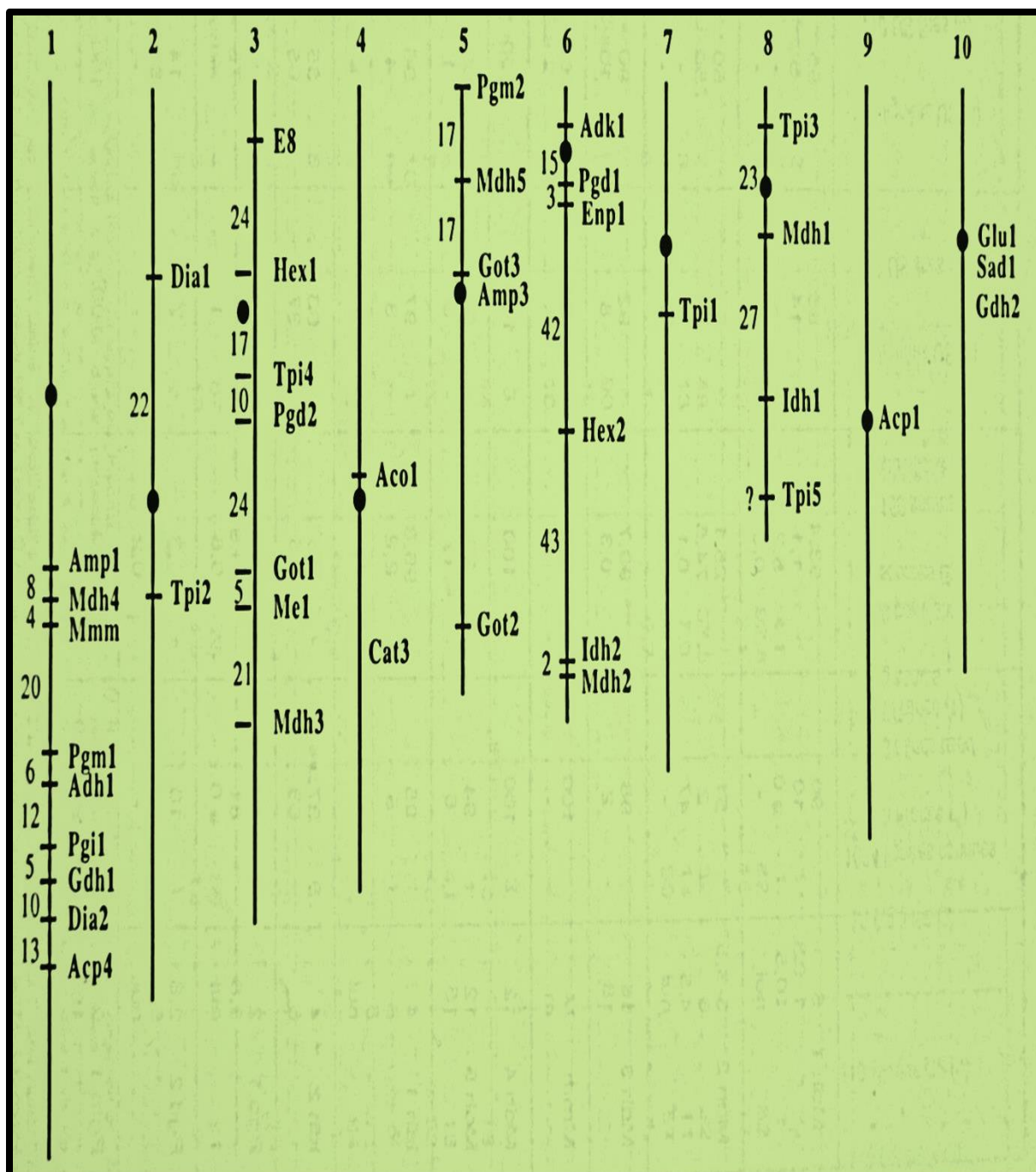
Tab. 1: Prehľad pokrytia najfrekvencovanejších alel v genetických zdrojoch kukurice kontrolami (USA línie kukurice – public lines)

Názov enzýmu	Názov génu (lokusu)	Označenie alely	Označenie kontroly (public line)
ACP	Acp1	2	B 37, B 73, Mo 17 H 25 A 619, A 632 W 153 RHt
		3	
		4	
		6	
ADH	Adh1	4	A 632, A 619 A 659, H 25
		6	
CAT	Cat3	7	CK 52 A 632, B 37, Mo 17 A 188, H 21, T 220 H 5505, Ky 201,
		9	
		12	
		n	
DIA	Dia1	8 12 n	A 632, CM 37 Ky 216, Oh 43, T 232 NC 7, T 220A
	Dia2	4 6	
GLU	Glu1	1	Mo 20W, N 132, Oh 7B A 654, H 25, IL 11A CO 220 A 632, A 635, A 188 CO 266, Oh 514 F 252
		2 - 2.5	
		3	
		6 - 7	
		10 n	
GOT	Got1	4 6	A 632, B 73, Mo 17 A 554, H 49, Mo 12 A 656, CO 109, Va 26 A 632, B 73, Mo 17 A 632, B 73, Mo 17
	Got2	2 4	
	Got3	4	
IDH	Idh1	4	A 619, A 635 T 232 B 64
		6	
		8	
	Idh2	4 4.2 6	B 73, Mo 17 A 3G-3-1-3 B 37, A 619, A 632

Tab. 1:

pokračovanie

MDH	Mdh1	n	H 25, Mo 505W
		1	A 188, T 232
	Mdh2	6	A 632, Mo 17, B 73
		10.5	W 703
		n	K 64
		3	H 619, H 25
		3.5	Wf 9, A 188, B 73
4.5	W 401		
5.6	Va 85		
6	A 632, Mo 17, B 37		
Mdh3	16	A 619, Mo 17, B 73	
	18	H 25	
	Mdh4	12	A 619, B 73, Mo 17
		14.5	-
	Mdh5	12	A 619, B 73, Mo 17
		15	F 2, T 232
Mmm	M	A 619, Mo 17, B 73	
	m	W 629 A	
PGM	Pgm1	9	A 632, B 14 A, Mo 17
		16	Mo 18 W
	Pgm2	1	F 2
		3	B 84
4		A 632, B 14 A, B 73	
8	A 659, Mo 17		
PGD	Pgd1	n	H 99
		2	B 37
		3.8	A 632, Mo 17, B 73
Pgd2	2.8	A 632, B 14 A	
	5	B 37, B 73, Mo 17	
PGI	Pgi1	2	-
		3	-
		4	A 619, B 37, Mo 17
		5	A 632, B 14 A, H 91



Obr. 42: Chromozómová mapa enzýmových lokusov kukurice siatej (prepracované podľa Stuber a kol., 1988)

Vysvetlivky: Lokusy *Acp* (kyslá fosfatáza), *Aco* (akonitáza), *Adh* (alkoholdehydrogenáza), *Adk* (adenylát kináza), *Amp* (argenín aminopeptidáza), *Cat* (kataláza), *Dia* (diaforáza), *E* (esteráza), *Enp* (endopeptidáza), *Gdh* (γ-glutamyldehydrogenáza), *Glu* (β-glukozidáza), *Got* (glutamyl oxalacetát transamináza), *Hex* (hexokináza), *Idh* (izocitrátdehydrogenáza), *Mdh* a *Mmm* (malátdehydrogenáza), *Me* (malátdehydrogenáza), *Pgd* (6-fosfoglukonátdehydrogenáza), *Pgi* (fosfoglukózoizomeráza), *Pgm* (fosfoglukomutáza), *Sad* (šikimátdehydrogenáza), *Tpi* (triózofosfátizomeráza)

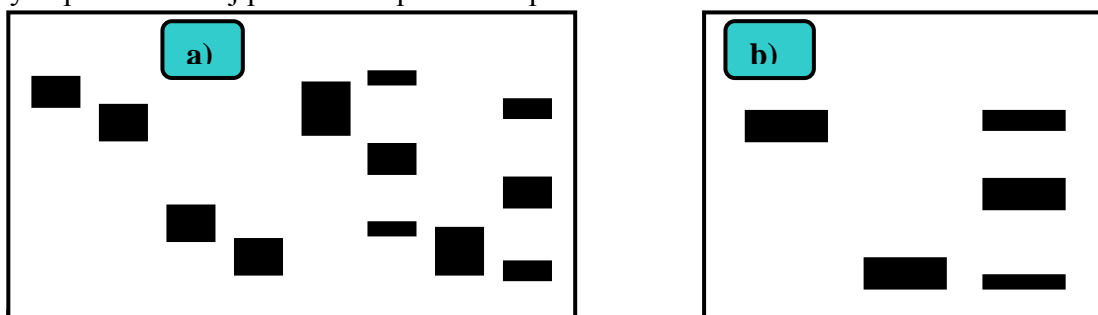
5 STAV RIEŠENIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV GENETICKÝCH ZDROJOV

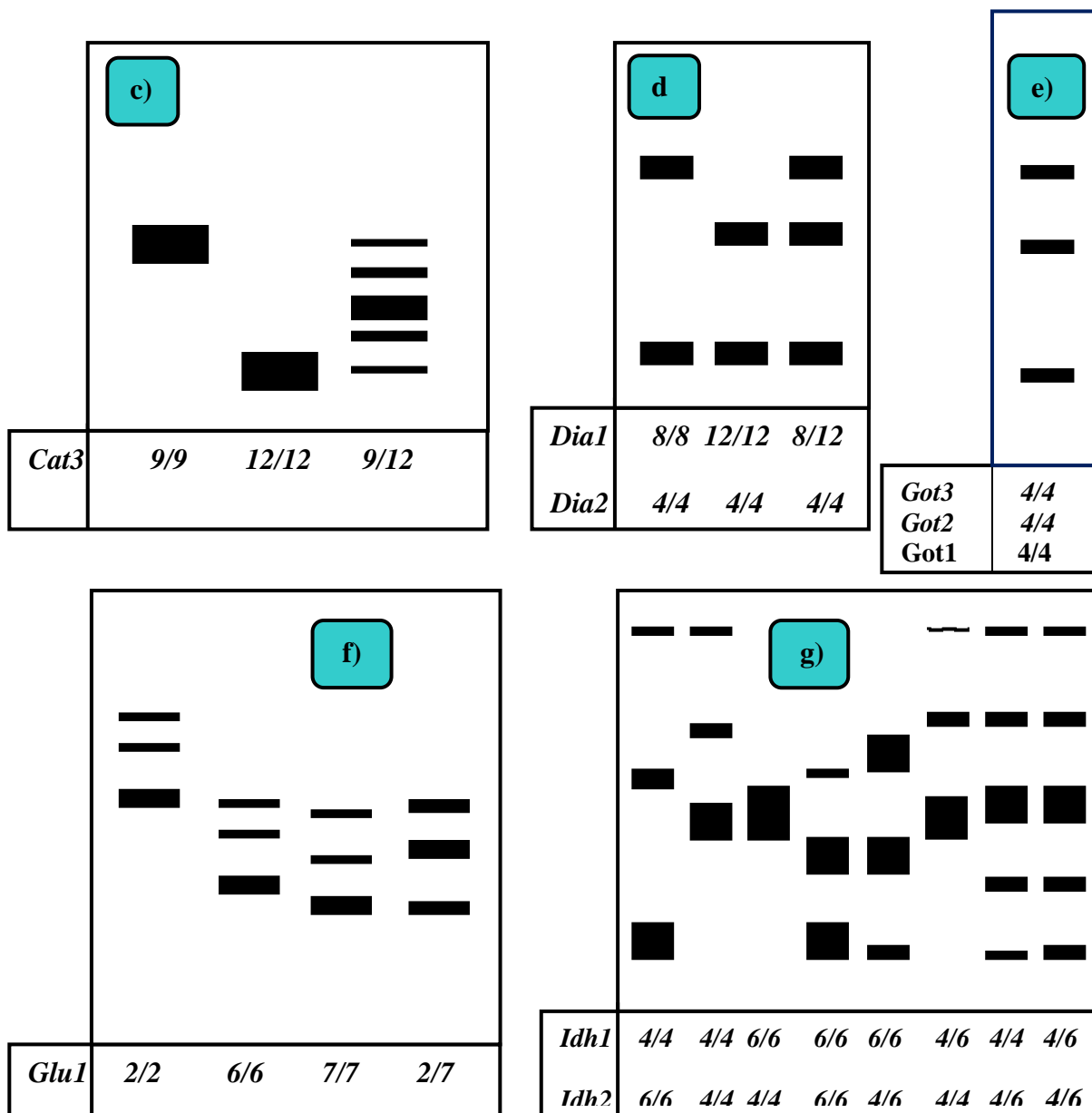
KUKURICE NA SLOVENSKU A DIAGRAMY ICH FINGERPRINTOV

Výskum polymorfizmu enzýmov na Slovensku a mapovanie genetických zdrojov kukurice sa začalo v roku 1990 ešte v rámci Československa. V rokoch 1990-1994 boli poskytnuté fingerprinty pre prax povolených 18 hybridov a ich rodičovských komponentov. V rokoch 1999-2002 bolo zmapovaných 62 krajových populácií, 41 samoopelivých línií a 24 dvojlíniových hybridov. Bola zrealizovaná elektronická databáza ich fingerprintov na báze polymorfizmu enzýmov (Múdry, 2002). Mapovanie pokračovalo aj v rokoch 2003-2005 – 31 krajových populácií, 18 samoopelivých línií a 13 dvojlíniových hybridov (Múdry, 2005; 2010). Vyhodnotenie polymorfizmu enzýmov krajových populácií (ekotypov) kukurice z Čiech, Moravy a Slovenska a vyhodnotenie ich príbuzenských vzťahov a vyjadrených dendrogramami boli opublikované aj v práci autorov Múdry a Kraic (2007). Diagramy izozymogramov analyzovaných genetických zdrojov, ktorých vzorky sú aj v depozite Génovej banky Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra, Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch, sú zobrazené na Obr. 43a-k a 44a-k.

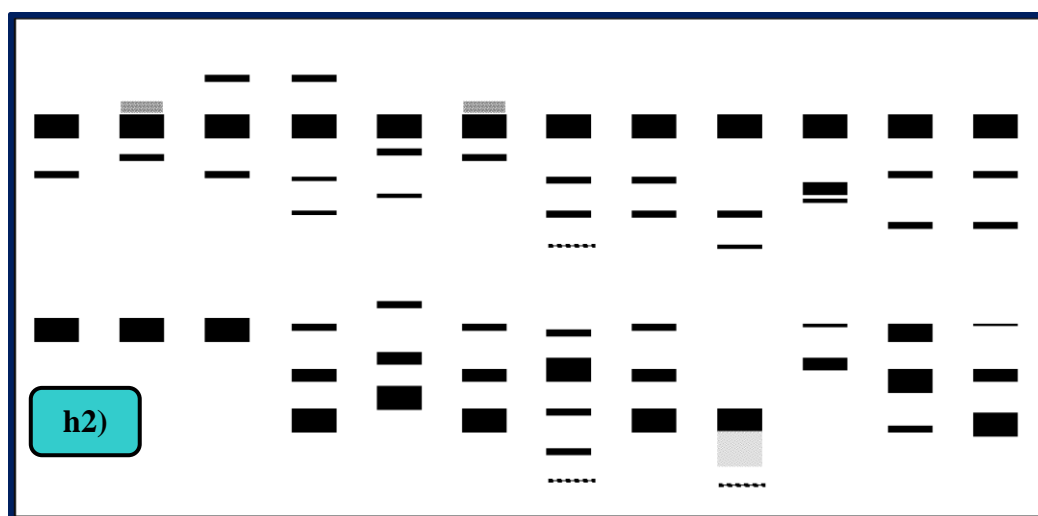
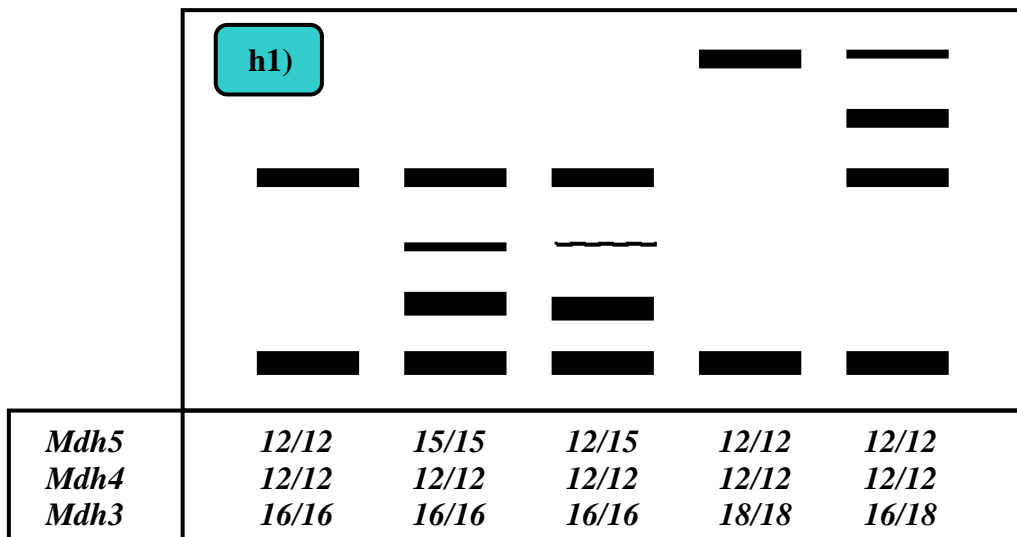
V súčasnosti možno povedať, že analýzy polymorfizmu enzýmov kukurice a mapovanie jej genofondov je aktuálne pre všetkých významných producentov tejto poľnohospodárskej plodiny aj v súčasnosti. Ku krajinám s intenzívnym výskumom polymorfizmu enzýmov kukurice patria USA, Kanada, Francúzsko, Slovinsko, Chorvátsko, Nemecko, Rakúsko, Španielsko, Argentína, Rumunsko, Maďarsko, Slovensko a Poľsko. Praktické využitie nachádzajú v rutinnom testovaní kvality produkcie osiva, zachovávaní si odrodovej stability a čistoty. Analýzy polymorfizmu enzýmov nachádzajú uplatnenie aj v rôznych rovinách základného výskumu, niektoré významnejšie boli uvedené v predošlých skriptách (Múdry, 2012).

Riešenie polymorfizmu enzýmov hospodársky využiteľných rastlinných druhov na Katedre biológie, Pedagogickej fakulty, Trnavskej univerzity pokračuje už dvanásť rokov. Publikovania dosiahnutých výsledkov by presahovalo rozsah stanovených strán určených pre napísanie týchto skript. Väčšina dosiahnutých výsledkov však bola publikovaná prostredníctvom vedeckých článkov alebo prezentovaná na domácich a medzinárodných konferenciách. V blízkej budúcnosti pripravujeme vyhodnotenie riešenia polymorfizmu enzýmov genofondu ovsia siateho, mrlíka čílskeho, skorocela kopijovitého a mäty piepornej. Výsledky experimentálnej práce budú priebežne publikované.



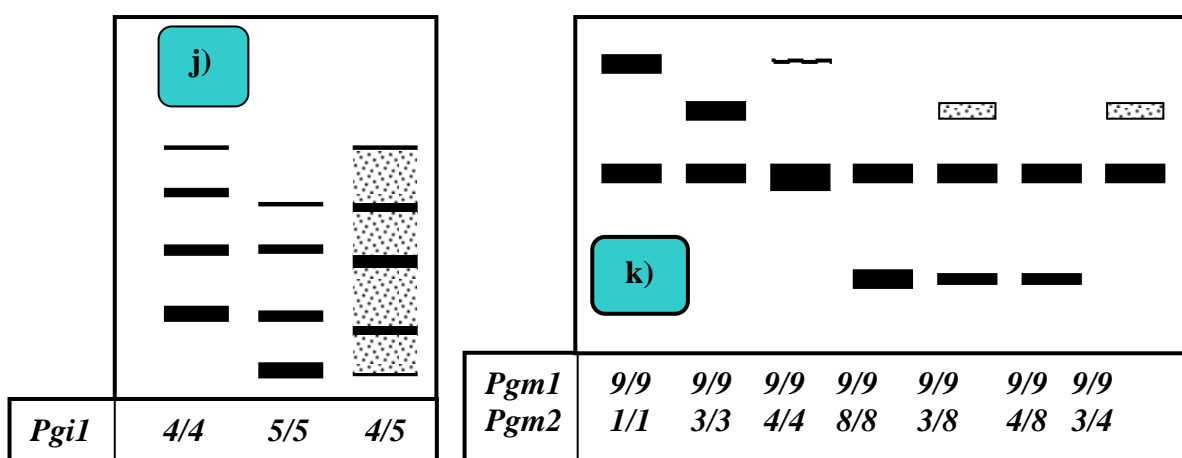
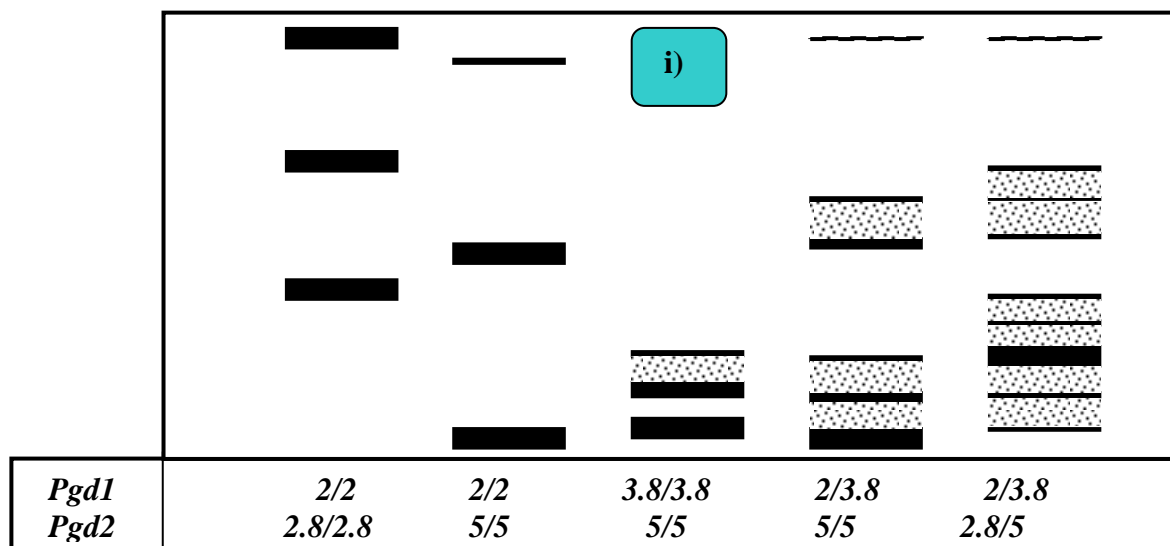


Obr. 43a-g: Diagramy izozymogramov kyslej fosfatázy (ACP), alkoholdehydrogenázy (ADH), katalázy (CAT), diaforázy (DIA), glutamát oxaloacetáttransaminázy (GOT), β -glukozidázy (GLU) a izocitrátdehydrogenázy (IDH) prítomných v koleoptilách slovenských línií a hybridov kukurice sietej

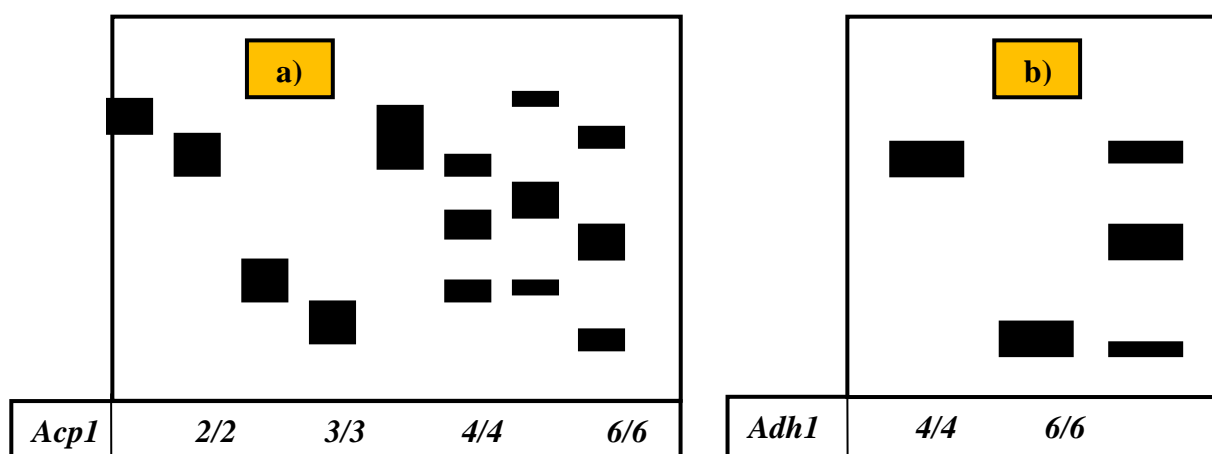


<i>Mdh5</i>	12/12	12/12	15/15	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
<i>Mdh4</i>	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
<i>Mmm</i>	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M
<i>Mdh3</i>	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
<i>Mdh2</i>	6/6	6/6	6/6	3/3	3/3	3/3	3/6	3/3	3/3	4.5/4.5	3/6	3/3
<i>Mdh1</i>	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	1/6	6/6	1/1	6/6	6/6	6/6

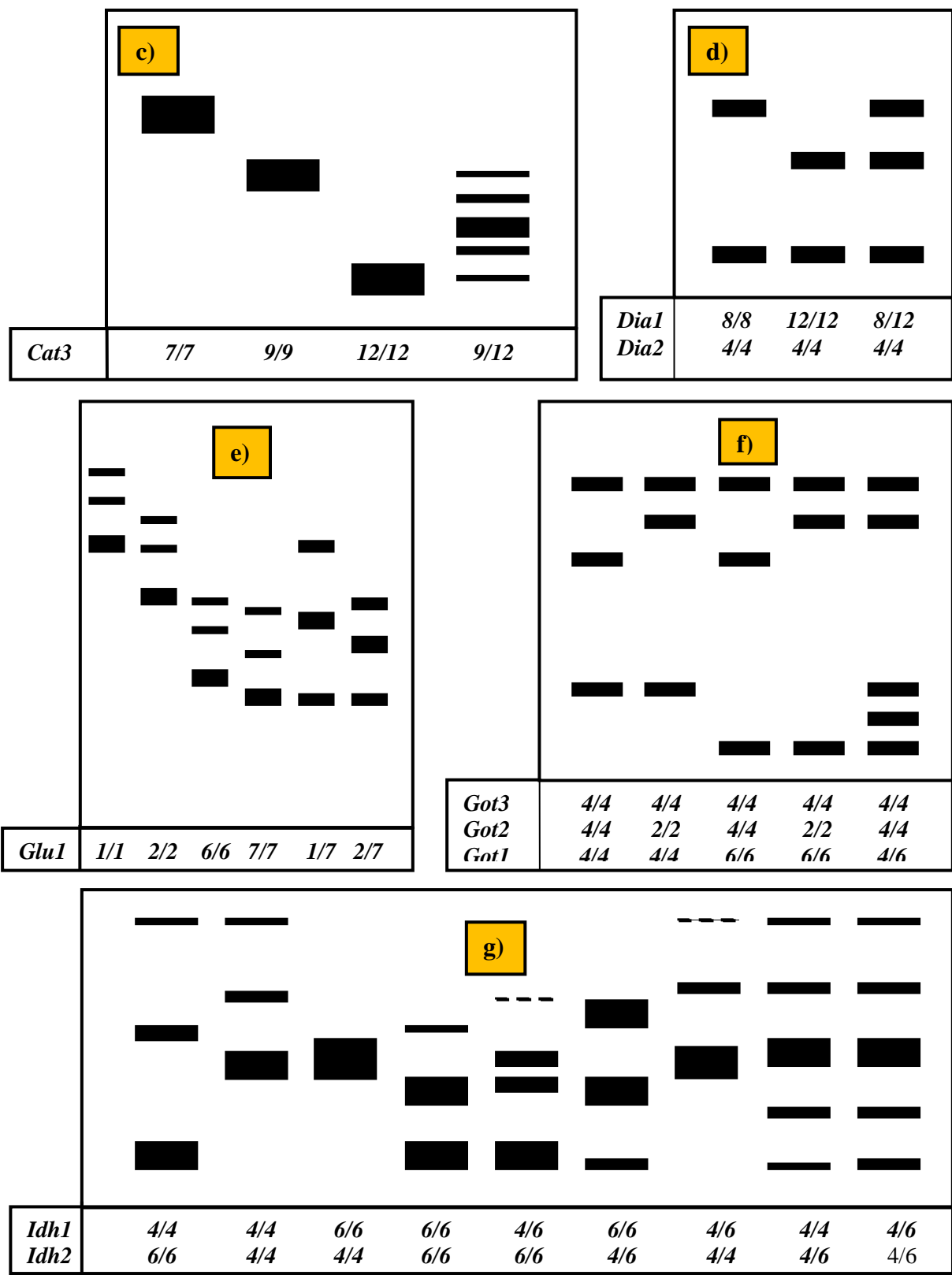
Obr. 43h1-h2: Diagramy izozymogramov malátdehydrogenázy (MDH) prítomných v koleoptilách slovenských líní a hybridov kukurice sietej



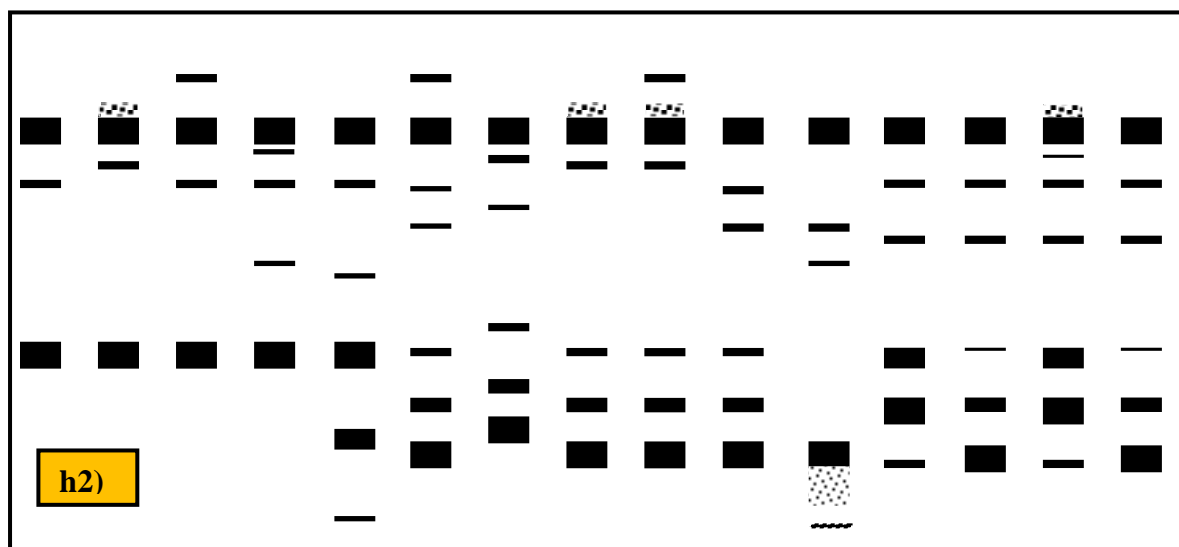
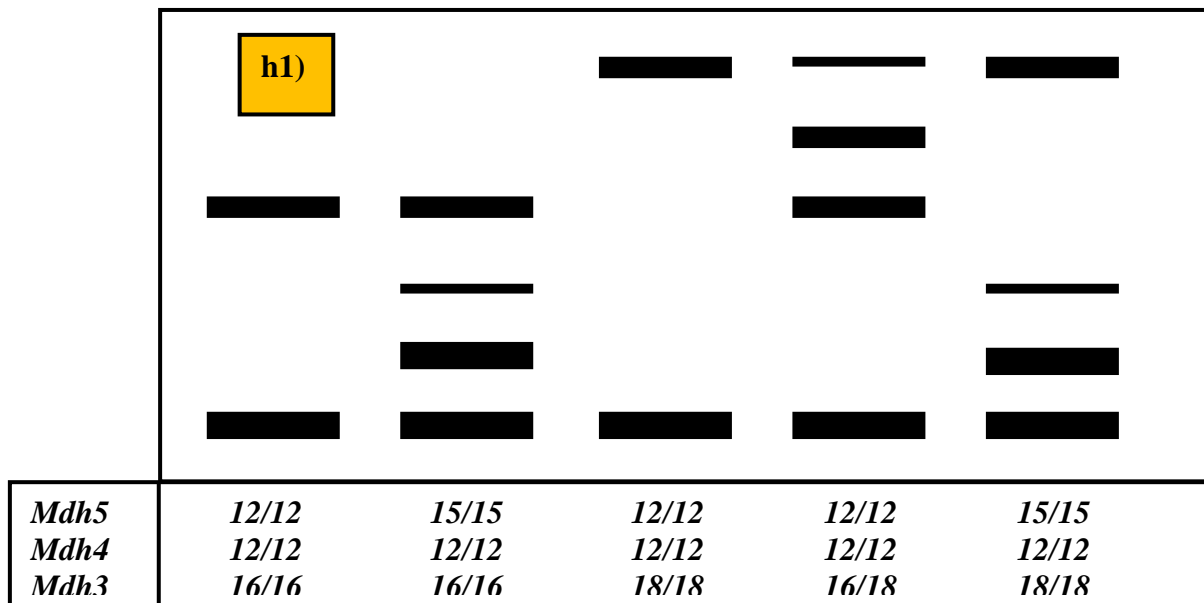
Obr. 43i-k: Diagramy izozymogramov 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD), fosfoglukózoizomerázy (PGI) a fosfoglukomutázy (PGM) prítomných v koleoptilách slovenských línii a hybridov kukurice siatej



Obr. 44a-b: Diagramy izozymogramov kyslej fosfatázy (ACP) a alkoholdehydrogenázy (ADH) prítomných v koleoptilách slovenských a českých krajových populáciách kukurice siatej

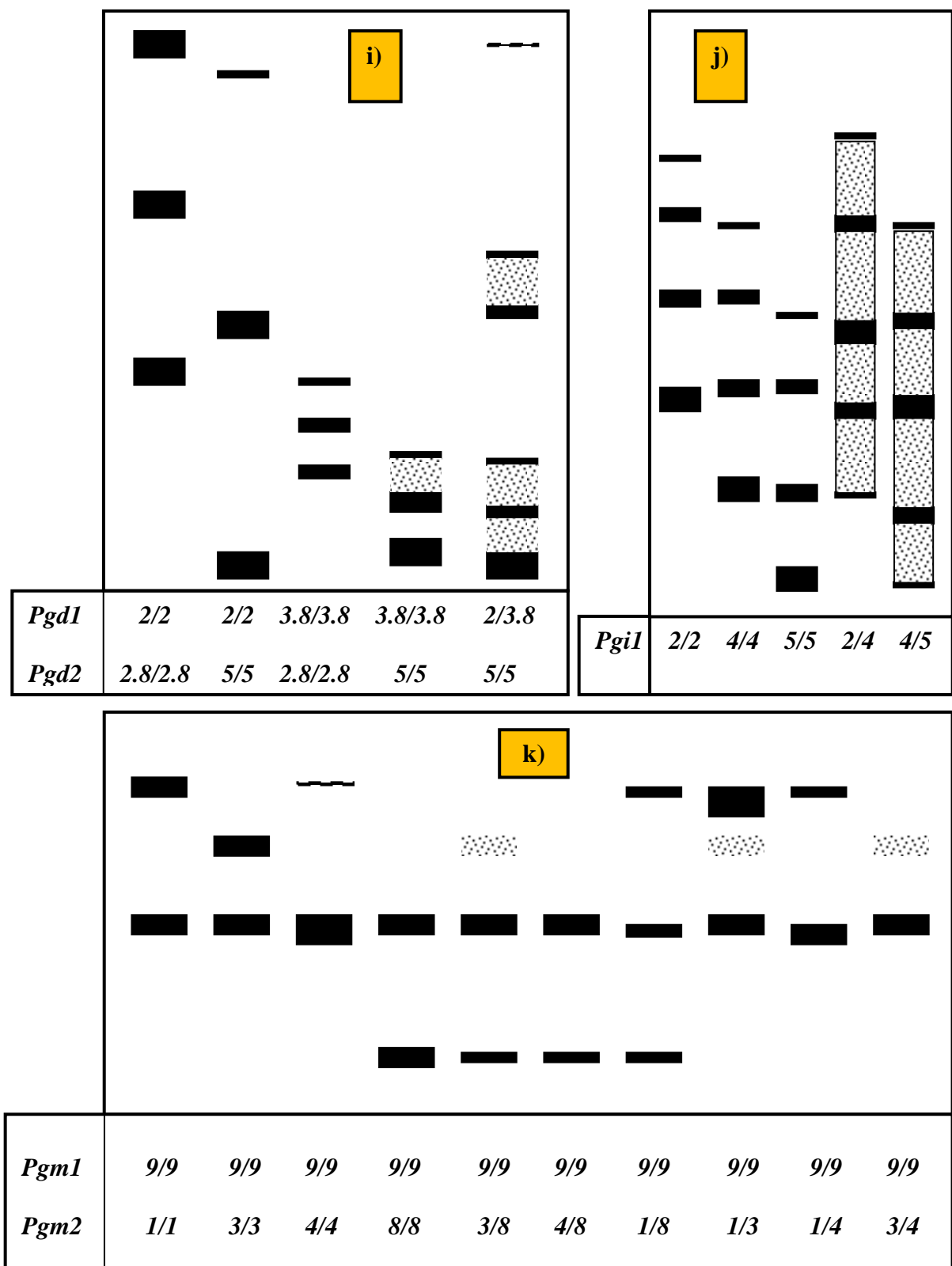


Obr. 44c-g: Diagramy izozymogramov katalázy (CAT), diaforázy (DIA), β -glukozidázy (GLU), glutamáttoxaloacetáttransaminázy (GOT) a izocitrátdehydrogenázy (IDH) prítomných v koleoptilách slovenských a českých krajových populáciách kukurice sietej



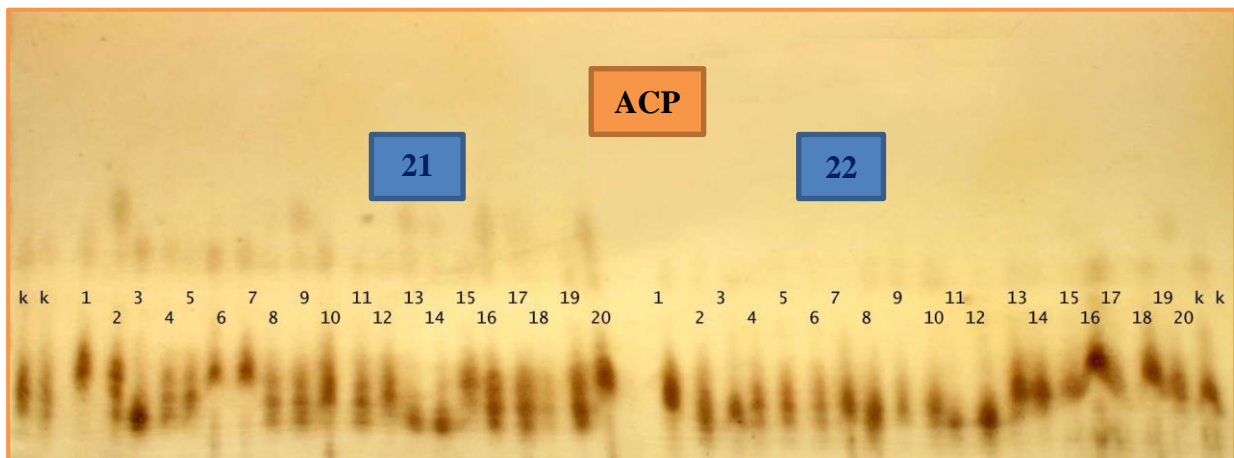
<i>Mdh5</i>	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
<i>Mdh4</i>	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
<i>Mmm</i>	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M
<i>Mdh3</i>	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	18/18	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/18	16/16
<i>Mdh2</i>	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/6	3/3	3/6	3/3
<i>Mdh1</i>	6/6	6/6	6/6	10.5/10.5	1/1	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	1/1	6/6	6/6	6/6

Obr. 44h1-h2: Diagramy izozymogramov malátdehydrogenázy (MDH) prítomných v koleoptilách slovenských a českých krajových populáciách kukurice sietej



Obr. 44i-k: Diagramy izozymogramov 6-fosfogluconátdehydrogenázy (PGD), fosfoglukózoizomerázy (PGI) a fosfoglukomutázy (PGM) prítomných v koleoptilách slovenských a českých krajoých populáciách kukurice sietej

Pre názornosť, ukážky niektorých vybraných a analyzovaných súborov vzoriek genofondu kukurice siatej, ktoré reprezentujú veľmi malú časť dlhoročnej výskumnej aktivity riešiteľov štátnych úloh, grantov a vedeckých projektov, sú na nasledujúcich obrázkoch (Obr. 45 - 54).



Obr. 45: Izozymogramy kyslej fosfatázy (ACP) dvoch krajových populácií kukurice siatej

Vysvetlivky: K (kontrola hybrid INKA 320): genotyp (fenotyp) *Acp1* – 2/4; krajová populácia 21: genotyp (fenotyp) *Acp1* – 2/2 (vzorky číslo 1, 6, 7, 15, 20); *Acp1* – 2/4 (2, 4, 5, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 19); *Acp1* – 4/4 (3, 13, 14); *Acp1* – 3/3 (10, 12)

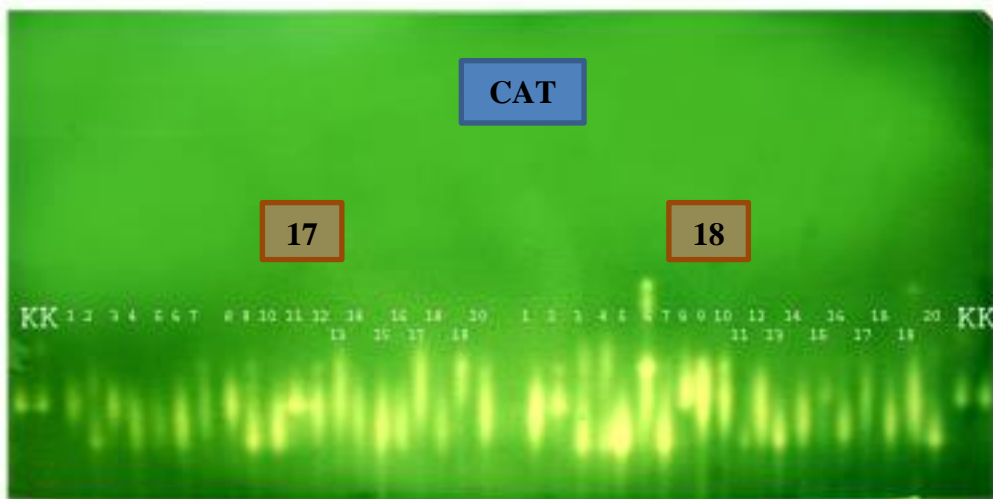
Krajová populácia 22: genotyp (fenotyp) *Acp1* – 2/2 (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20); *Acp1* – 2/4 (2, 4, 5, 6); *Acp1* – 3/3 (1, 7, 9, 10); *Acp1* – 4/4 (3, 8, 11, 12)



Obr. 46: Izozymogramy alkoholdehydrogenázy (ADH) dvoch krajových populácií kukurice siatej

Vysvetlivky: K (kontrola hybrid Qvintal, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Adh1* – 4/4; krajová populácia 43: genotyp (fenotyp) *Adh1* – 4/4 (vzorky číslo 6, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17,); *Adh1* – 4/6 (1, 2, 4, 5, 8, 9, 15, 18, 20), *Adh1* – 6/6 (3, 7, 19)

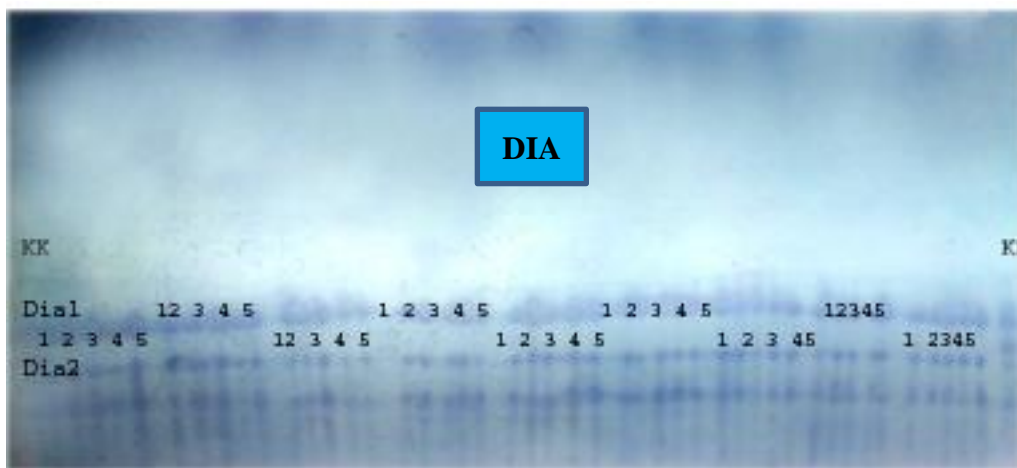
Krajová populácia 50: genotyp (fenotyp) *Adh1* – 4/6 (3, 10, 13, 15, 16, 17, 18); *Adh1* – 6/6 (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 19, 20)



Obr. 47: Izozymogramy katalázy (CAT) dvoch krajových populácií kukurice siatej

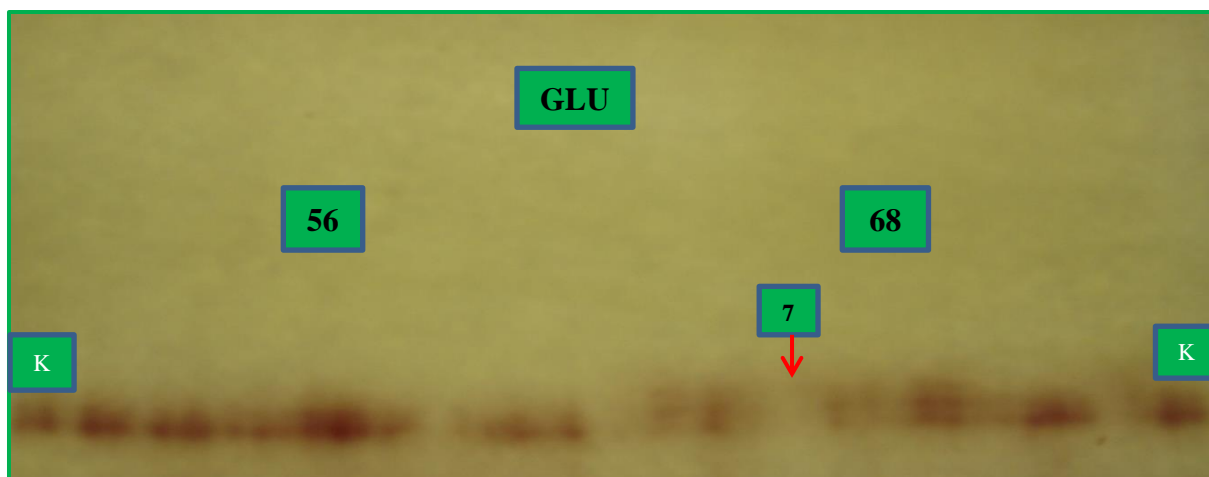
Vysvetlivky: K (kontrola hybrid INKA 320, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Cat3* – 9/9; krajová populácia **17**: genotyp (fenotyp) *Cat3* – 7/7 (vzorky číslo 13, 17, 19); *Cat3* – 9/9 (1, 3, 7, 8, 11, 12, 20), *Cat3* – 9/12 (4, 5, 6, 14, 15, 16, 18), *Cat3* – 12/12 (2, 9, 10)

Krajová populácia **18**: genotyp (fenotyp) *Cat3* – 7/7 (6), *Cat3* – 9/9 (1, 2, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19), *Cat3* – 12/12 (4, 5, 7, 11, 13, 16, 20), *Cat3* – 7/12 (3), *Cat* – 9/12 (14, 18)



Obr. 48: Izozymogramy diaforázy (DIA) šiestich línií a troch dvojlíniiových hybridov kukurice siatej (každá línia a hybrid je reprezentovaný piatimi vzorkami)

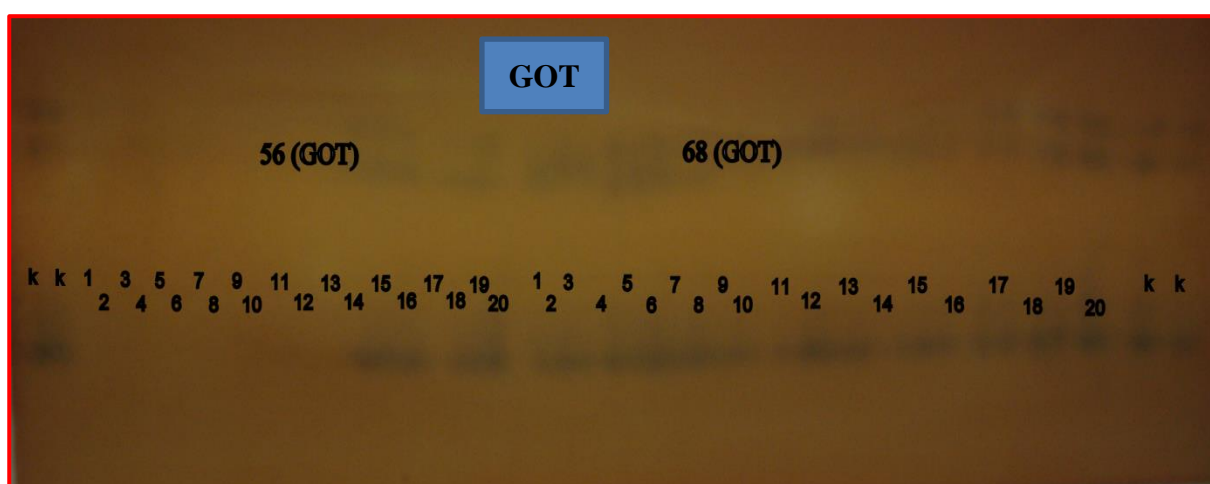
Vysvetlivky: K (kontrola hybrid INKA 320, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Dia1* – 8/8, *Dia2* – 4/4; všetky línie a hybridy majú rovnaký genotyp (fenotyp) *Dia1* – 8/8, *Dia2* – 4/4



Obr. 49: Izozymogramy β -glukozidázy (GLU) dvoch krajových populácií kukurice siatej

Vysvetlivky: K (kontrola hybrid Qvintal, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Glu1* – 6-7/6-7; krajová populácia **56**: genotyp (fenotyp) *Glu1* – 6-7/6-7 (všetky vzorky); krajová populácia **68**: genotyp (fenotyp) *Glu1* – 3/3 (vzorka 7), *Glu1* – 6-7/6-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

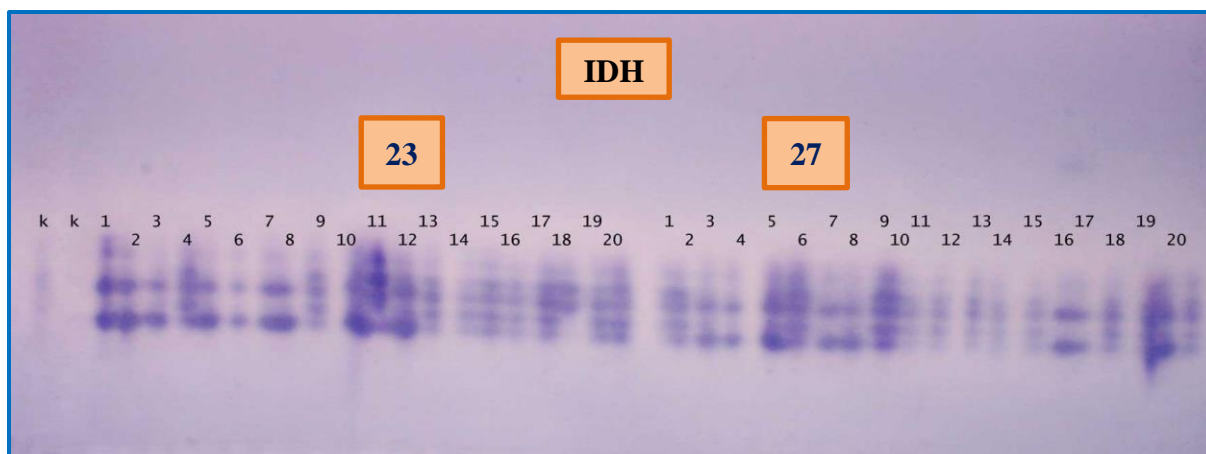
Popis lokusu *Glu* – 6-7/6-7 znamená, že je to lokus s homozygotnou konštitúciou expresiou ktorého dochádza k syntéze izoformy, pri ktorej je zvyčajne ťažké jednoznačne určiť, či ide o izoformu alely 6 alebo 7 vzhľadom na ich veľmi malý rozdiel v migračnej vzdialenosti. Toto značenie sa používa aj v zahraničných prácach.



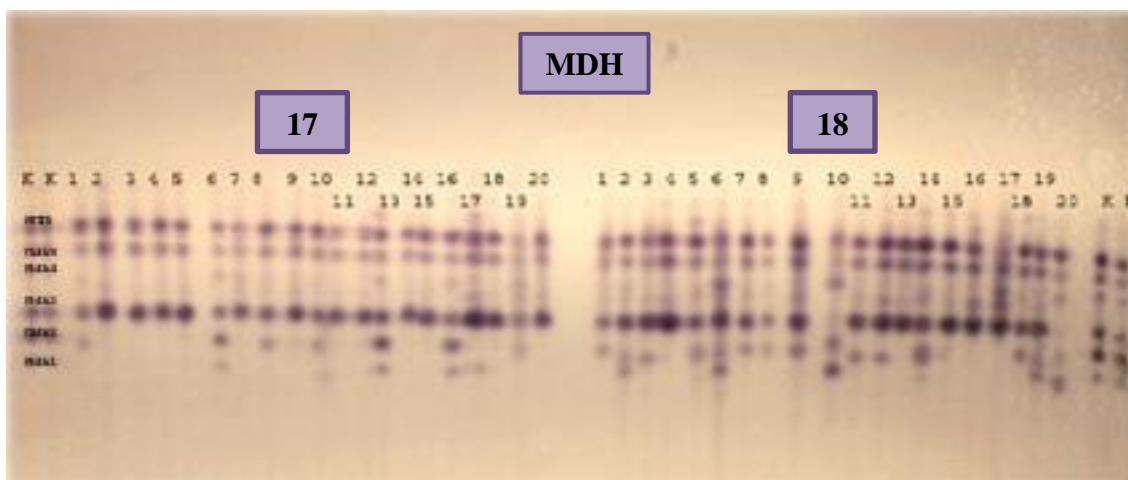
Obr. 50: Izozymogramy glutamát oxaloacetáttransaminázy (GOT) dvoch krajových populácií kukurice siatej

Vysvetlivky: K (kontrola hybrid Qvintal, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Got1* – 4/4, *Got2* – 4/4, *Got3* – 4/4 ; krajová populácia **56**: genotyp (fenotyp) *Got1* – 4/4, *Got2* – 4/4, *Got3* – 4/4 (všetky vzorky)

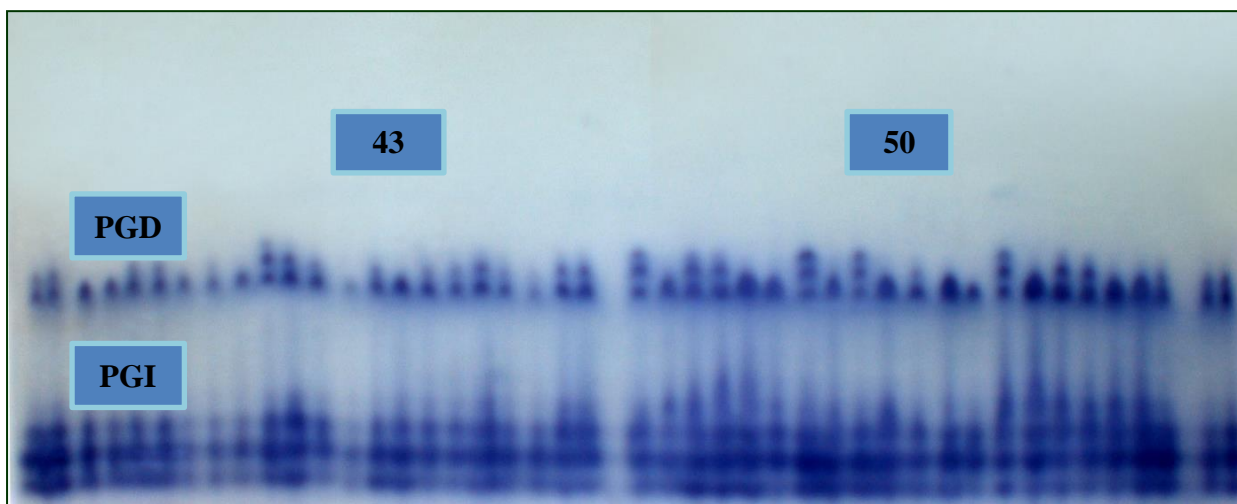
Krajová populácia **68**: genotyp (fenotyp) *Got1* – 4/4, *Got2* – 4/4, *Got3* – 4/4 (všetky vzorky)



Obr. 51: Izozymogramy izocitrátdehydrogenázy (IDH) dvoch krajových populácií kukurice
Vysvetlivky: K (kontrola hybrid INKA 320, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Idh1* - 4/4, *Idh2* - 4/6; krajová populácia **23**: genotyp (fenotyp) *Idh1* - 4/4 (všetky vzorky), *Idh2* - 4/4 (11, 18), *Idh2* - 6/6 (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12), *Idh2* - 4/6 (4, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20); Krajová populácia **27**: *Idh1* - 4/4 (všetky vzorky), *Idh2* - 6/6 ((3, 4, 5, 7, 8, 16, 17, 19), *Idh2* - 4/6 (1, 2, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20)



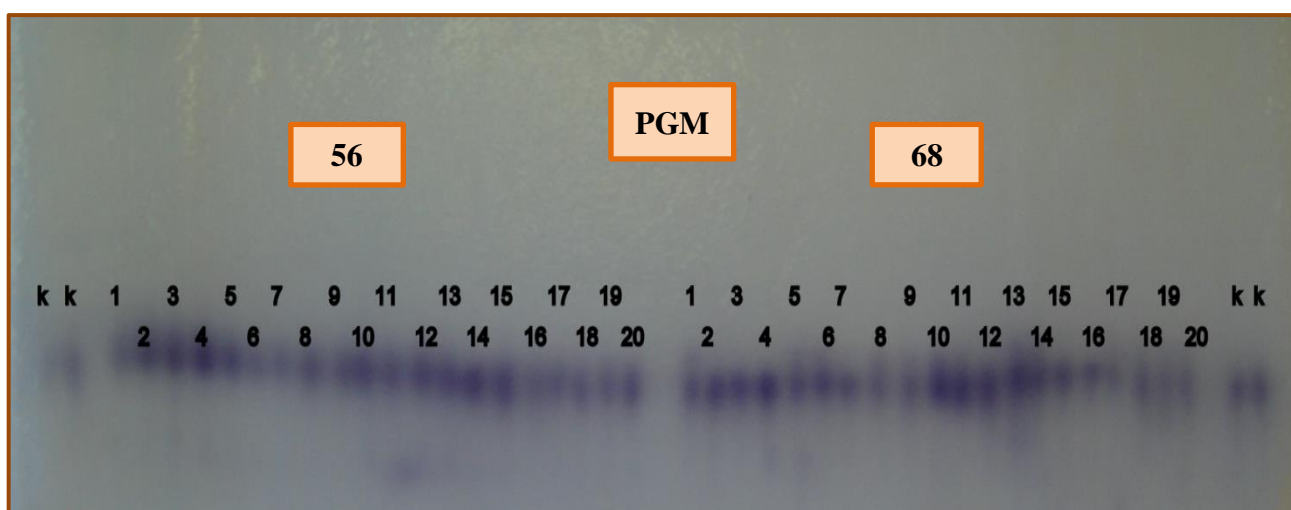
Obr. 52: Izozymogramy malátdehydrogenázy (MDH) dvoch krajových populácií kukurice
Vysvetlivky: K (kontrola hybrid INKA 320, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Mdh1*- 6/6, *Mdh2* - 3/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12, *Mmm* - M/M; krajová populácia **17**: genotyp (fenotyp) *Mdh1*- 6/6, *Mdh2* - 3/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12, *Mmm* - M/M (6, 8, 10, 13, 16, 19); *Mdh1*- 6/6, *Mdh2* - 6/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12, *Mmm* - M/M (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20); Krajová populácia **18**: *Mdh1*- 6/6, *Mdh2* - 3/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12, *Mmm* - M/M (6, 7, 8, 9); *Mdh1*- 6/6, *Mdh2* - 6/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12, *Mmm* - M/M (1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19); *Mdh1*- 6/6, *Mdh2* - 6/6, *Mdh3* - 16/16, *Mdh4* - 12/12, *Mdh5* - 12/12, *Mmm* - M/M (20)



Obr. 53: Izozymogramy 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD) a fosfoglukózoizomerázy (PGI) dvoch krajových populácií kukurice siatej

Vysvetlivky k PGD: K (kontrola hybrid Qvintal, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Pgd1* – 2/3.8, *Pgd2* – 5/5; krajová populácia **43**: genotyp (fenotyp) *Pgd1* – 3.8/3.8 (1, 2, 5, 7, 11, 13), *Pgd1* – 2/3.8 (3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20), *Pgd2* – 5/5 (všetky vzorky); krajová populácia **50**: *Pgd1* – 3.8/3.8 (2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20), *Pgd1* – 2/3.8 (4, 16, 17), *Pgd1* – 2/5 (1, 7, 9, 14), *Pgd2* – 5/5 (všetky vzorky)

Vysvetlivky k PGI: K (kontrola hybrid Qvintal, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Pgi1* – 4/4; krajová populácia **43**: genotyp (fenotyp) *Pgi1* – 4/4 (všetky vzorky); krajová populácia **50**: *Pgi1* – 4/4 (všetky vzorky)



Obr. 54: Izozymogramy fosfoglukomutázy (PGM) dvoch krajových populácií kukurice siatej
Vysvetlivky: K (kontrola hybrid Qvintal, prvé dve a posledné dve vzorky): genotyp (fenotyp) *Pgm1* – 9/9, *Pgm2* – 4/4; krajová populácia **56**: genotyp (fenotyp) *Pgm1* – 9/9, *Pgm2* – 4/4 (všetky vzorky); krajová populácia **68**: *Pgm1* – 9/9, *Pgm2* – 4/4 (všetky vzorky)

ACQUAAH, G. 1992. *Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research*. USA: Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1992, 186 s. ISBN 0-931146-22-4.

BOURGOIN-GRENECHE, M. – GIRAUD, G. – POUGET, R. 1998. Technical reference manual for the isoenzymatic analysis of maize. Ed. by: BioGEVES - La Miniere - F 78285 GUYANCOURT Cedex, 1-72. ISBN 2-910171-28-0.

BOURGOIN-GRENECHE, M. - LALLEMAND, J. 1993. Electrophoresis and its application to the description of varieties. A presentation of the techniques used by GEVES. Ed. by: GEVES - La Miniere - F 78285 GUYANCOURT Cedex, 1-63.

BOURGOIN-GRENÉCHE, M. - GIRAUD, G. - POUGET, R. 1998. Technical reference manual for the isoenzymatic analysis of maize. Ed. GEVES- La Minière – 78285 GUYANCOURT Cedex, 1998, 72 s., ISBN 2-910171-28-0.

CARDY, B. J. - KANNENBERG, L.W. 1982. Allozymic Variability among Maize Inbred Lines and Hybrids: Applications for Cultivar Identification. *Crop Sci.*, 22, 1016-1020.

CHEVALLIER, M.H. - DATTE, Y. 1984. Variabilité enzymatique chez le maïs. In *Can. J. Genet. Cytol.*, 1984, roč. 26, č. 2, s. 214-229.

EFRON, Y. 1970. Tissue specific variation in the isozyme pattern of the AP₁ acid phosphatase in maize. *Genetics*, 65, 575-583.

EL – METAINY, A.Y. - OMAR, A.A. 1981. Biochemical Genetics of *Zea mays* L. I. Isozymes and the Linkage Relationship Between AP-1 and AP-2 Loci. *Biochem Genet*, 19, 635-640.

FREELING, M. - SCHWARTZ, D. 1973. Genetic Relationships Between the Multiple Alcohol Dehydrogenases of Maize. *Biochemical Genetics*, 8, 27-36.

FREI, O.M. - STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1986. Yield Manipulation from Selection on Allozyme Genotypes in a Composite of Elite Corn Lines. In *Crop Sci.*, 1986, roč. 26, č. 5, s. 917-921.

GOODMAN, M.M. - NEWTON, K.J. - STUBER, C.W. 1981. Malate dehydrogenase: Viability of cytosolic nulls and lethality of mitochondrial nulls in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1783-1785.

GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. 1979. Further report on the genetics of MDH. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 53, 72-73.

GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. - LEE, C.N. - JOHNSON, F.M. 1980a. Genetic control of malate dehydrogenase isozymes in maize. *Genetics*, 94, 153-168.

GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. - NEWTON, K. - WEISSINGER, H.H. 1980b. Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. *Genetics*, 96, 697-710.

GOODMAN, M. M. - STUBER, C.W. 1982. Further variation encountered for Mmm. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 56, 126-127.

GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. 1983a. Maize. In: **TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. (Eds.), (1983):** Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1-30.

GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. 1983b. Races of maize. VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. *Maydica*, 28, 169-187.

GORMAN, M.B. – KIANG, Y.C. 1978. Models for the inheritance of several variant soybean electrophoretic zymograms. In *Journal of Heredity*, 1978, roč. 69, č. 4, s. 255-258.

GRENECHE, M. - GIRAUD, G. 1989. Manuel technique de référence pour l'analyse isoenzymatique du Mais. GEVES, Surgeres, 1-78.

HENDERSON, C.B. (1968): Inbreds, Breeding Stocks, Maize Investigations and Academic Research Personnel. Maize Research and Breeders Manual. Illinois Foundation Seeds, Inc., 1-37.

HENDERSON, C.B. 1972. Inbreds, Breeding Stocks, Maize Investigations and Academic Research Personnel. Maize Research and Breeders Manual. Illinois Foundation Seeds, Inc., 1-71.

HENDERSON, C.B. 1984. Inbreds, Breeding Stocks, Maize Investigations and Academic Research Personnel. Maize Research and Breeders Manual. Illinois Foundation Seeds, Inc., 1-101.

KAHLER, A.L. 1983. Inheritance and linkage of acid phosphatase locus Acp4 in maize. J. Hered., 74, 239-246.

MÚDRY, P. 2002. Analýza genetickej diverzity kukurice (záverečná správa za vecnú etapu vedecko-technického projektu). Trnava: SEMPOL Holding a. s., 2002, 92 s.

MÚDRY, P. 2005. Proteomická klasifikácia kukurice izoenzymovými markermi (Záverečná správa za subetapu). Trnava: PdF TU, 29 s. + 9 tab., 24 obr.

MÚDRY, P. 2010. Dvadsať rokov výskumu polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín na Slovensku – výsledky, ich aplikácia a perspektívy. [Twenty years of enzyme polymorphism research of agricultural crops in Slovakia – results, their applications and perspectives]. In *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo*. Zb. zo 17. vedeckej konferencie. Centrum výskumu rastlinnej výroby, Piešťany, 2010, s. 140-141. ISBN 978-80-89417-23-0.

MÚDRY, P. 2011. *Polymorfizmus enzýmov rastlín v biológii a v biotechnológii. 1. Časť Metodológia elektroforetickej separácie izoenzymov*. Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity, Trnava, [Vysokoškolské učebné texty], 2011, 71 s. ISBN 978-80-8082-502-7.

MÚDRY, P. 2012. *Polymorfizmus enzýmov rastlín v biológii a v biotechnológii. 2. Časť. Návod na praktické cvičenia a úlohy*. Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity, Trnava, [Vysokoškolské učebné texty], 2012, 74 s. ISBN 978-80-8082-559-1

MÚDRY, P. – GAJDOŠOVÁ, A. 2010. Vplyv rádiomutagénu na polymorfizmus vybraných enzýmov v dvoch druhoch láskavca. [Effect of radiomutagen on polymorphism of chosen enzymes in two amaranth species]. In: *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo*. Zb. zo 17. vedeckej konferencie. Piešťany, Centrum výskumu rastlinnej výroby, 2010, s. 142-143. ISBN 978-80-89417- 23-0

MÚDRY, P. - KRAIC, J. 2007. Inter- and Intra - Population Variation of Local Maize (*Zea mays* L.) Populations from Slovakia and Czech Republic. In *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 2007, roč. 43, č. 1, s. 7-15.

MÚDRY, P. – ŠTEFÁNIKOVÁ, M. – MARTINKOVÁ, L. – ČIČOVÁ, I. 2013. Mapovanie genetických zdrojov láskavca (*Amaranthus* sp. L.) polymorfizmom enzýmov. [The mapping of amaranth (*Amaranthus* sp. L.) gene pool by enzyme polymorphism]. In Benediková, D. (Ed.): *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo*, Zborník zo 7. Medzinárodnej vedeckej konferencie, CVRV Piešťany, 2013, s. 71-72. ISBN 978-80-89417-49-0.

NEWTON, K.J. - SCHWARTZ, D. 1980. Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozymes in maize. *Genetics*, 95, 425-442.

PEIRCE, L.C. – BREWBAKER, J.L. 1973. Application of isozyme analysis in horticultural science. In *Horticultural Science*, roč. 8, č. 1, s. 17-22.

PRYOR, A.J. 1978. Mapping of glucosidase on chromosome 10. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 52, 14.

ROUPAKIAS, D.G. - Mc MILLIN, D.E. - SCANDALIOS, J.G. 1980. Chromosomal location of the catalase structural genes in *Zea mays*, using B-A translocations. *Theor. Appl. Genet.*, 58, 211-218.

SCANDALIOS, J.G. 1967. Genetic Control of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in Maize. *Biochemical Genetics*, 1, 1-8.

SCANDALIOS, J.G. - SORENSON, J.C. - OTT, L.A. 1975. Genetic control and intracellular localization of glutamate oxaloacetic transaminase in maize. *Biochem. Genet.*, 13, 759-769.

SHIELDS, C.R. - ORTON, T.J. - STUBER, C.W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: **TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. (Eds.), 1983:** Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 443-468:

SCHWARTZ, D. 1960. Genetic studies on mutant enzymes in maize: Synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46, 1210-1215.

SCHWARTZ, D. 1969. Alcohol Dehydrogenase in Maize: Genetic Basis for Multiple Isozymes. *Science*, 164, 585-586.

SCHWARTZ, D. - ENDO, T. 1966. Alcohol dehydrogenase polymorphism in maize – symple and compound loci. *Genetics*, 53, 709-715.

SMITH, J.S.C. 1986. Genetic diversity within the cornbelt dent racial complex of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 31, 349-367.

SMITH, J.S.C. 1988. Diversity of United States Hybrid Maize Germplasm; Isozymic and Chromatographic Evidence. *Crop Sci.*, 28, 63-69.

SMITH, J.S.C. 1989. The characterization and assessment of genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) hybrids that are widely grown in France: Chromatographic data and isozymic data. *Euphytica*, 43, 73-85.

SMITH, J.S.C. - GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. 1984. Variation Within Teosinte. III. Numerical Analysis of Allozyme Data. In *Economic Botany*, 1984, roč.38, č. 2, s. 97-113.

SMITH, J.S.C. - GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. 1985. Genetic Variability Within U.S. Maize Germplasm. I. Historically Important Lines. In *Crop Sci.*, 1985, roč. 25, č. 3, s. 550-555.

SOLTIS, D.E. - SOLTIS, P.S. 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Advances in plant Sciences Series Volume 4, Dudley, T. R. (Ed.), 1989, 269 s. ISBN 0-931146-13-5.

STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1979. Genetics and linkage of PGM. Maize Genet. Coop. News. Lett., 53, 73.

STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1980b. Genetics of IDH isozymes in corn. Maize Genet. Coop. Newsl., 54, 99.

STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1980c. Genetics of 6 – PGD isozymes in corn. Maize Genet. Coop. Newsl., 54, 99.

STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1983a. Allozyme Genotypes for Popular and Historically Important Inbred Lines of Corn, *Zea mays* L. . U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Agricultural Research Results, ARR - S - 16, August 1983, 1-29.

STUBER, C. W., GOODMAN, M. M. 1983b. Inheritance, Intracellular Localization, and Genetic Variation of Phosphoglucomutase Isozymes in Maize (*Zea mays* L.). *Biochemical Genetics*, 21, 667-689.

STUBER, C.W., GOODMAN, M. M. 1984. Inheritance intracellular localization, and genetic variation of 6 – phosphogluconate dehydrogenase isozymes in maize. *Maydica*, XXIX, 453-471.

STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. - JOHNSON, F. M. 1977. Genetic control and racial variation of β - glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Biochem. Genet.*, 15, 383-394.

STUBER, C.W. - MOLL, R.H. - GOODMAN, M.M. - SCHAFFER, H.E. - WEIR, B.S. 1980a. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics*, 95, 225-236.

STUBER, C.W. - WENDEL, J.F. - GOODMAN, M.M. - SMITH, J.S.C. 1988. Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin 286, North Carolina Agricultural Research Service, North Carolina State University, Raleigh, 1-87.

TANKSLEY, S.D. - ORTON, T.J. (Eds.). 1983a. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1-516.

TANKSLEY, S.D. - ORTON, T.J. (Eds.). 1983b. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1-472.

Seedsman's Handbook 16th Edition CORN, MBS, Inc., Ames, Iowa, 1989, 1-52.

Použitá literatúra ale necitovaná v texte:

BÁRTOVÁ, E. a kol. 1982. Anglicko-slovenský pôdohospodársky slovník. Príroda Bratislava (prvé vydanie), 1982, 964 s.

BEŽO, M. – BEŽOVÁ, K. 1998. Genetický slovník. SPU Nitra a Nadácia Ochrana genofondu rastlín, 1998, 318 s. ISBN 80-7137-556-X.

KOLEKTÍV AUTOROV. 1975. ENGLISH-SLOVAK TECHNICAL DICTIONARY. ALFA BRATISLAVA, 1975, 1357 s.

6.1 Zoznam riešených projektov, výsledky ktorých sa podieľajú na tvorbe učebných textov

GÁLOVÁ, Z. - KOL. 2013-2015. Detekcia genetickej variability obilnín molekulárnymi markérmí. Projekt Grantovej agentúry VEGA, projekt č. 1/0513/13.

HRICOVÁ, A. - KOL. 2013-2015. Využitie moderných biotechnológií v šľachtiteľskom programe láskavca. Projekt Grantovej agentúry VEGA č. 2/0066/13. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra.

MÚDRY, P. 1995-1998. Biochemická identifikácia, klasifikácia a katalogizácia genotypov slnečnice, sóje a hrachu na báze elektroforetickej separácie izoenzýmov. MP SR.

MÚDRY, P. 1999-2002. Úloha RVT 27-11 ochrana genofondu kultúrnych rastlín slovenska a jeho zlepšovanie progresívnymi metódami, ČÚ 05 Rozšírenie charakterizácie a využívanie genetických zdrojov rastlín, VE 02 Analýza genetickej diverzity kukurice.

MÚDRY, P. 2003-2005. Genomická klasifikácia kukurice izoenzýmovými markermi. ŠPVV, Projekt č. 2003 SP27/0280D01/0280D01 a APVT, projekt č. 20-017002.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, I. 1990-1994. Biochemická identifikácia genotypov kukurice. N 05-529-913-01-03, MP SR.

OBSAH

- 1 ÚVOD 5
- 2 VŠEOBECNÉ ZÁSADY GENETICKEJ INTERPRETÁCIE
POLYMORFIZMU ENZÝMOV RASTLÍN 6
 - 2.1 Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov (štruktúra a rozsah variability polymorfizmu, inter- a intralokusové interakcie) 9
 - 2.2 Nomenklatúra izoenzýmov 10
 - 2.3 Príklady predpokladaných modelov izozymogramov 13
 - 2.3.1 Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu kódovaného jedným génom a dvoma alelami 14
 - 2.3.2 Vzory izozymogramov diméneho enzýmu kódovaného jedným génom a dvoma alelami 15
 - 2.3.3 Vzory izozymogramov triméneho enzýmu kódovaného jedným génom s dvoma alelami 16
 - 2.3.4 Vzory izozymogramov tetraméneho enzýmu kódovaného jedným génom s dvoma alelami 16
 - 2.3.5 Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu kódovaného dvoma génmi a dvoma alelami 17
 - 2.3.6 Vzory izozymogramov diméneho enzýmu kódovaného dvoma génmi s dvoma alelami 18
 - 2.3.7 Vzory izozymogramov diméneho enzýmu kódovaného jedným génom s tromi alelami 18
 - 2.3.8 Vzory izozymogramov tetraméneho enzýmu kódovaného dvoma génmi s dvoma alelami 19
 - 2.3.9 Vzory izozymogramov diméneho enzýmu kódovaného dvoma génmi so štyrmi alelami 19
 - 2.3.10 Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu tetraploidnej rastliny 20
 - 2.3.11 Vzory izozymogramov diméneho enzýmu tetraploidnej rastliny 21
- 3 GENETICKÁ INTERPRETÁCIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV
MODELOVÉHO DRUHU – KUKURICA SIATA (*Zea mays* L.) 22
 - 3.1 Genetická interpretácia polymorfizmu kyslej fosfatázy (E. C. 3. 1. 3. 2), príklady izozymogramov a ich diagramy 23

3.2	Genetická interpretácia polymorfizmu alkoholdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 1), príklady izozymogramov a ich diagramy	26
3.3	Genetická interpretácia polymorfizmu katalázy (E. C. 1. 11. 1. 6), príklady izozymogramov a ich diagramy	26
3.4	Genetická interpretácia polymorfizmu diaforázy (E. C. 1. 6. 99. -), príklady izozymogramov a ich diagramy	28
3.5	Genetická interpretácia polymorfizmu β - glukozidázy (E. C. 3. 2. 1. 21), príklady izozymogramov a ich diagramy	29
3.6	Genetická interpretácia polymorfizmu glutamát – oxaloacetáttransaminázy (E. C. 2. 6. 1. 1), príklady izozymogramov a ich diagramy	30
3.7	Genetická interpretácia polymorfizmu izocitrátdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 42), príklady izozymogramov a ich diagramy	32
3.8	Genetická interpretácia polymorfizmu malátdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 37), príklady izozymogramov a ich diagramy	34
3.9	Genetická interpretácia polymorfizmu 6 – fosfoglukonátdehydrogenázy (E. C. 1. 1. 1. 44), príklady izozymogramov a ich diagramy	41
3.10	Genetická interpretácia polymorfizmu fosfoglucoizomerázy (E. C. 5. 3. 1. 9), príklady izozymogramov a ich diagramy	43
3.11	Genetická interpretácia polymorfizmu fosfoglukomutázy (E. C. 2. 7. 5. 1), príklady izozymogramov a ich diagramy	45
4	POUŽITIE KONTROLNÝCH BIOLOGICKÝCH VZORIEK (MARKEROV) PRI IDENTIFIKÁCI KONKRÉTNÝCH LOKUSOV, ALEL A NIMI KÓDOVANÝCH IZOENZÝMOV	47
5	STAV RIEŠENIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV GENETICKÝCH ZDROJOVKUKURICE NA SLOVENSKU A DIAGRAMY ICH FINGERPRINTOV	
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	58
6.1	Zoznam riešených projektov, výsledky ktorých sa podieľajú na tvorbe učebných textov	
7	OBSAH	72

© RNDr. Pavol Múdry, CSc., 2015

Recenzenti: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

prof. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.
Schválené vedením Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity **dňa 11.11.2015** ako skriptá
pre Pedagogickú fakultu TU.

ISBN 978-80-8082-871-4