

**VYSOKOŠKOLSKÉ SKRIPTÁ**

---

**Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity**



**Pavol Múdry**

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

**2. časť**

**Návody na praktické cvičenia a úlohy**

2012

© RNDr. Pavol Múdry, CSc., 2012

Recenzenti: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.

Schválené vedením Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity **dňa 23.2. 2012** ako skriptá pre Pedagogickú fakultu TU.

**ISBN 978-80-8082-559-1**

## PREDHOVOR

Sme na začiatku tretieho tisícročia, ktoré bude poznačené čoraz intenzívnejším rozvojom molekulovej biológie, biochémie a genetiky, čo sa premietne aj vo vývoji nových biotechnologických výrobných postupov. Iba pedagóg dostatočne teoreticky pripravený môže študentom vysvetliť a sprostredkovať poznanie a rozsah významu biotechnológií v národnom hospodárstve. Preto sa do študijných plánov Katedry biológie, Pedagogickej fakulty, Trnavskej univerzity zaviedol predmet biotechnológia, ktorý sa stal pre stupeň magisterského štúdia povinne voliteľným predmetom. Naši študenti magisterského aj bakalárskeho stupňa štúdia, študenti doktorandského štúdia a vedeckí pracovníci z fakúlt iných univerzít a vedeckých pracovísk už pätnásť rokov prejavujú aktívny záujem o výskum a aplikáciu polymorfizmu enzýmov v praxi. Impulzom pre napísanie vysokoškolských učebných textov bola hlavne absencia dostupnej literatúry v slovenskom jazyku, ktorá by riešila analytickú, interpretačnú i praktickú stránku využitia polymorfizmu enzýmov.

Učebné texty sú organickou súčasťou už vydaných skrípt (Múdry 2011). Sú v nich uvedené metodologické postupy analýzy polymorfizmu enzýmov rôznych rastlinných druhov, ktoré sa využívajú v laboratóriách po celom svete a príklady a úlohy na najčastejšie výpočty používané pri interpretácii výsledkov získaných analýzou polymorfizmu. Rozsah, ktorý je vymedzený pre napísanie učebných textov, neumožňuje riešiť polymorfizmus všetkých aktuálnych druhov rastlín a enzýmov známych z vedeckej literatúry, preto je riešený polymorfizmus enzýmov najčastejšie študovaných druhov rastlín a enzýmov, s ktorými máme aj v našom laboratóriu bohaté experimentálne skúsenosti a výsledky. Pri výbere rozhodovala aj možnosť a aktuálnosť praktického využitia analýz.

Pevne verím, že učebné texty prispejú k rozšíreniu teoretického poznaniu študentov, ale hlavne k získaniu manuálnych zručností a návykov nie len pri analýze polymorfizmu enzýmov, ale aj pre prácu v laboratóriu všeobecne. Vedeckým pracovníkom, ktorí majú záujem o analýzy polymorfizmu enzýmov niektorého z uvedených rastlinných druhov uľahčí prácu uvedenie overenej metodiky v skriptách. Učebné texty sú určené hlavne pre študentov biológie, biochémie, genetiky a biotechnológií, ale aj vhodné pre vedeckých pracovníkov, ktorí budú chcieť obohatiť metodológiu svojej vedeckej práce o túto vo vedeckej literatúre pomerne frekventovane prezentovanú oblasť.

RNDr. Pavol Múdry, CSc.

autor

# 1 ÚVOD

Podstatnou súčasťou štúdia polymorfizmu enzýmov je zvládnutie metodológie analýz pre jednotlivé rastlinné druhy, resp. poľnohospodárske plodiny. Bez dostatočnej kvality separácie izoforiem nie je možné podať kvalitnú interpretáciu polymorfizmu enzýmov pre analyzovanú vzorku. Je množstvo faktorov, ktoré môžu ovplyvniť výsledok analýz, a tak nie je nič výnimočné, že aj publikované výsledky rôznych autorov za odlišných analytických podmienok sa od seba odlišujú kompletnosťou zobrazenia izoforiem na izozymogramoch. Zvlášť je to v prípadoch, ak je analyzovaný druh nový, málo riešený s nedostatkom publikovaných výsledkov. Odlišná je situácia, ak plodina je takého ekonomického významu, že poznanie polymorfizmu enzýmov vyústilo do štandardizácie metodologického postupu analýz, a následne k poznaniu globálnej informácie pre genetickú interpretáciu polymorfizmu analyzovaných druhov enzýmov. Štandardizované metodologické postupy sú využívané laboratóriami a testovacími pracoviskami po celom svete, čo garantuje zhodu získaných výsledkov. Izozymogramy (fingerprinty) v týchto prípadoch slúžia k hodnoteniu pôvodnosti, originality, genetickej stálosti a čistoty odrody hospodársky cenného druhu. Izozymogramy sa teda dajú a aj využívajú mnohými významnými producentmi na právnu ochranu novej odrody, keďže prejav polymorfizmu enzýmov je geneticky podmienený. Druhú veľkú aplikačnú oblasť nachádza polymorfizmus enzýmov v štúdiu vplyvu faktorov na ich prejav a ekologický význam jednotlivých izoforiem.

V kapitole dva pod názvom „Metodológie analýz polymorfizmu enzýmov niektorých hospodársky významných druhov rastlín – praktická časť“ sú uvedené metodologické postupy a návody na uskutočnenie analýz rastlinných druhov, ktoré sú výsledkami získanými prostredníctvom riešenia grantov, štátnych úloh a projektov pracovníkmi nášho laboratória za uplynulých dvadsať rokov a stručne charakterizovaný význam konkrétneho rastlinného druhu.

Súčasťou analýz polymorfizmu enzýmov je aj štatistické vyhodnotenie výsledkov. Najčastejšie výpočty s príkladmi a cvičeniami sú uvedené v tretej kapitole „Príklady využitia polymorfizmu enzýmov v biológii“. Napokon v štvrtej kapitole „Príklady využitia polymorfizmu enzýmov v biotechnológii“ sú zhodnotené súčasný stav a možnosti jeho využitia v biotechnológii.

I keď polymorfizmus enzýmov sa rieši už viac, ako päťdesiat rokov, ešte stále je nedostatok informácií o ekofyziologickom význame jednotlivých izoforiem a ich podiele na tvorbe kvantitatívnych a kvalitatívnych znakov pri jednotlivých, ekonomicky významných rastlinných druhoch.

## 2 METODOLÓGIE ANALÝZ POLYMORFIZMU ENZÝMOV NIEKTORÝCH HOSPODÁRSKY VÝZNAMNÝCH DRUHOV RASTLÍN – PRAKTICKÁ ČASŤ

### 2.1 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV KUKURICE SIATEJ (*Zea mays* L.)

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 (1983) vykonali analýzu polymorfizmu enzýmov 406 samoopelivých línií kukurice na základe 23 izoenzýmových lokusov. Chevallier a Dattee (1984) popisujú izoenzýmy ôsmich enzymových 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 *et al.* (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 *et al.* (1985).

Zistili veľmi slabé alebo žiadne vzájomné vzťahy medzi zárodočnými plazmami jednotlivých skupín líní. Na základe štúdia izoenzýmov 23 lokusov stanovili Frei *et al.* (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) odpublikoval 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 (1988a) 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 šľachtenia, registráciu a právnu ochranu líní 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). 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 18 pre prax povolených hybridov a ich rodičovských komponentov. V etape rokov 1999-2002 bolo zmapovaných 62 krajových populácií, 41 samoopelivých líní 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 líní 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 odpublikované aj v práci autorov Múdry a Kraic (2007).

V súčasnosti možno povedať, že analýzy polymorfizmu enzýmov kukurice a mapovanie jej genofondov bolo a je aktuálne pre všetkých významných producentov tejto poľnohospodárskej plodiny. 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.

### **Kukurica siata (*Zea mays* L.)**

Extrakcia: - pri 4 °C

- zhomogenizované koleoptily dlhé asi 12 mm (kultivácia zŕn na mokrom filtračnom papieri v Petriho miskách za konštantných podmienok v termostate, za tmy, 25 °C, relatívna vlhkosť vzduchu 97 %) – Stuber *et al.* (1988),
- extrakčný tlmivý roztok: 5,0 ml H<sub>2</sub>O, 0,84 g sacharóza, 0,42 g askorbát sodný (Stuber *et al.* 1988),
- na jednu koleoptilu 30 µl extrakčného činidla (Stuber *et al.* 1988).

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde,
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Stuber *et al.* 1988, Bourgoïn–Greneche a Lallemand 1993) zloženia:

77,31 g hydrolyzovaný škrob,  
15,00 g sacharóza,  
600 ml gélový tlmivý roztok.

Jednotlivé zloženia elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému, použitý výkon, pracovný čas pre jednotlivé gélové systémy a enzýmy, zloženie farbiacich médií v gélových systémoch B, C, D a F sú uvedené v Tab. 1 – 6. Pracovné postupy sa začínajú kultiváciou biologického materiálu a odberom vzoriek, potom nasleduje homogenizácia a extrakcia vzoriek v extrakčnom činidle, príprava a varenie škrobových gélov, príprava elektródových tlmivých roztokov, ukladanie knôtov so vzorkami do gélu, samotná elektroforéza, rezanie škrobových gélov, príprava tlmivých roztokov a farbičiek na vyfarbovanie gélov. Postupnosť jednotlivých krokov je prakticky rovnaká pre všetky analýzy.

Tab. 1: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému (Stuber *et al.* 1988)

Systém	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
<b>B</b> pH=5,7	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,88 g/dm <sup>3</sup> ) 0,02 mol dm <sup>-3</sup> kys.citrónová H <sub>2</sub> O (4,125 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:6 roztok elektródového tlmivého roztoku)
<b>C</b> pH=8,3	0,19 mol dm <sup>-3</sup> kys. boritá (11,875 g/dm <sup>3</sup> ) 0,04 mol dm <sup>-3</sup> hydroxid lítny (1,60 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť LiOH	9 dielov Tris – kys. citrónová tlmivý roztok [0,05 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza (6,20 g/dm <sup>3</sup> ); 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,50 g/dm <sup>3</sup> )] 1 diel elektródový C tlmivý roztok
<b>D</b> pH=6,5	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ) 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,5 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kys. citrónovou	0,016 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,002 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:3 roztok tlmivého roztoku)
<b>F</b> pH=7,0	0,135 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza 0,04 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (9,0 g /dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:4 elektródový tlmivý roztok zriedený)

Tab. 2: Výkon, pracovný čas pre jednotlivé gélové systémy a enzýmy  
(Stuber *et al.* 1988)

Gélový systém	Výkon	Pracovný čas	Enzýmy
<b>B</b>	17,0 W	7 hodín 15 minút	MDH, ACP, GLU
<b>C</b>	12,0 W	6 hodín	ADH, CAT, GOT
<b>D</b>	16,0 W	6 hodín 30 minút	IDH, PGM, PGD, PGI
<b>F</b>	15,0 W	6 hodín 30 minút	DIA

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, ADH – alkoholdehydrogenáza, CAT – kataláza, DIA – diaforáza, GLU –  $\beta$ -glukozidáza, GOT – glutamátaloacetáttransamináza, IDH – izocitrátdehydrogenáza, MDH – malátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglucoizomeráza, PGM - fosfoglukomutáza



Tab. 3: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme B  
(Stuber *et al.* 1988)

ACP	GLU	MDH
50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: octan sodný – kys. octová (pH = 5,0) 50 mg soľ Fast Garnet GBC 50 mg MgCl <sub>2</sub> 50 mg sodná soľ kys. α-naftyl fosforečnej	Roztok 1: 50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: fosforečnan draselný (pH = 6,5) 1 g polyvinylpyrolidon 40, 100 mg soľ Fast blue BB  Roztok 2: 50 mg 6-bromo-2-naftyl-β-D-glukozid v 5 ml N,N-dimetylformamid	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH = 9,1) 100 mg neutralizovaná kys. DL-jablčná 20 mg redukovanej formy β-nikotínamidadenín - dinukleotid, 10 mg nitro blue tetrazolium 1,25 mg fenazín metosulfát

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, GLU – β-glukozidáza, MDH – malátdehydrogenáza

Tab. 4: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme C  
(Stuber *et al.* 1988)

ADH	CAT	GOT
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8), 1 ml 95 % etanol, 20 mg β-nikotínamidadenín – dinukleotid, 20 mg tetrazolium tiazolyl modrá 5 mg fenazín metosulfát	500 mg ferikyanid draselný 500 mg chlorid železitý 50 ml H <sub>2</sub> O 0,01 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 ml substrátový roztok 50 mg soľ Fast blue BB substrátový roztok (pH=7,4) 400 ml H <sub>2</sub> O 146,1 mg kys. α-ketoglutárová 532,4 mg kys. L-asparágová 2 g polyvinylpyrolidon 40 200 mg dvojsodná soľ kys. etyléndiamín tetraoctovej 5,68 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

**LEGENDA:** ADH– alkoholdehydrogenáza, CAT – kataláza, GOT – glutamát - oxaloacetáttransamináza

Tab. 5: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme D  
(Stuber *et al.* 1988)

IDH	PGD
<p>50 ml 0,05 mol dm<sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0) 50 mg MgCl<sub>2</sub> 150 mg trojsodná soľ kyseliny DL-izocitrónovej 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1 mg fenazín metosulfát</p>	<p>50 ml 0,05 mol dm<sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0) 20 mg trojsodná soľ kyseliny 6-fosfoglukónovej 50 mg MgCl<sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát</p>
PGI	PGM
<p>50 ml 0,05 mol dm<sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8) 50 mg dvojsodná soľ D-fruktóza-6-fosfát 50 mg MgCl<sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát 10 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfát dehydrogenázy</p>	<p>50 ml 0,1 mol dm<sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,5) 100 mg MgCl<sub>2</sub> 250 mg dvojsodná soľ α-D-glukóza-1-fosfát, 10 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 7,5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1 mg fenazín metosulfát 37,5 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfát dehydrogenázy</p>

**LEGENDA:** IDH – izocitrátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglucoizomeráza, PGM - fosfoglukomutáza

Tab. 6: Zloženie farbiaceho média pre diaforázu (DIA) v gélovom systéme F (Stuber *et al.* 1988)

<b>DIA</b>
50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=9,1) 0,5 g polyvinylpyrolidon 40 5 mg redukovaná forma β-nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát 40 mg tetrazolium tiazolyl modrá 4 mg 2,6-dichlófenol indofenol

#### Postup počas vyfarbovania gélov

ACP (kyslá fosfatáza) - Roztok nalejeme na plát škrobového gélu a inkubujeme pri 36°C. Po vyfarbení vypláchneme vodou. Zreteľné vyfarbenie pásov dosiahneme, keď plát inkubujeme asi 1 hod., potom odsajeme časť farbiaceho roztoku, dolejeme vodu a necháme cez noc pri izbovej teplote.

ADH (alkoholdehydrogenáza) - Roztok sa naleje na plát a gél sa inkubuje asi 1 hod. pri 36 °C. Potom sa gél opláchnu vodou.

CAT (kataláza) - Na škrobový plát nalejeme 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, roztok zamiešame a necháme pôsobiť 5 min., potom vypláchneme destilovanou vodou. Na škrobový plát nalejeme vyfarbovací roztok, necháme pôsobiť 5 minút a vypláchneme destilovanou vodou. Aktivita katalázy sa prejaví bielymi škvrkami na tmavom pozadí. Gély je možné uskladňovať vo vode niekoľko dní, fotografovať by sa mali bezprostredne po vyfarbení.

DIA (diaforáza) – Roztok nalejeme na plát a inkubujeme najmenej 2 hodiny, aj dlhšie pri 36 °C. Cez noc chladíme v chladničke.

GLU (β – glukozidáza) – Roztok nalejeme na plát a inkubujeme 60 minút. Vyberieme z termostatu a cez noc necháme pri laboratórnej teplote. Na ďalší deň vypláchneme destilovanou vodou.

GOT (AAT - aminoacetáttransamináza, glutamátaloacetáttransamináza) - Roztok nalejeme na plát a necháme v tme na 1 až 2 hod pri izbovej teplote. Tento enzým je citlivý na jemné

výkyvy pH, roztok by mal mať  $\text{pH}=7,4 \pm 0,2$ .

IDH (izocitrátdehydrogenáza) - Roztok sa naleje na plát a gél sa inkubuje pri 36 °C asi 1 hodinu. Po vyfarbení sa vypláchne vodou.

MDH (malátdehydrogenáza) - Roztok nalejeme na plát a pri 36 °C inkubujeme asi 1 hod. Po vypláchnutí uchovávané vo vode.

PGI/PGD (fosfoglucoizomeráza/6-fosfogluconátdehydrogenáza) - Roztok nalejeme na plát a inkubujeme pri 36 °C asi 1 hod. Potom vypláchneme vodou. Pozn.: Pri vyfarbovaní len samotnej PGI nepridáme do roztoku trojsodnú soľ kyseliny 6-fosfogluconovej a pri vyfarbovaní len samotnej PGD nepridáme do roztoku dvojsodnú soľ D-fruktóza-6-fosfát a NADP-závislú glukóza-6-fosfát dehydrogenázu.

PGM (fosfoglucomutáza) - Roztok nalejeme na plát a inkubujeme pri 36 °C asi 1 hod. Potom vypláchneme vodou.

## **2.2 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV SLNEČNICE ROČNEJ (*Helianthus annuus* L.)**

Slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.) je z celosvetového hľadiska jedna z najdôležitejších olejnin. Olej získaný zo semien sa využíva v humánnej výžive, ale aj ako surovina v chémii tukov. Môže nahrádzať minerálny olej v rozličných aplikáciách, napr. ako sú palivá, mazadlá alebo oleje pre hydraulické systémy (Friedt 1995). Rod slnečnica (*Helianthus*) obsahuje veľký počet druhov, z ktorých pre poľnohospodárstvo sú najznámejšie dva druhy: slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.) a topinambur (*Helianthus tuberosus* L.). Druh slnečnica útla (*Helianthus debilis* Nutt.) sa pestuje ako okrasná rastlina.

Štúdium polymorfizmu enzýmov slnečnice sa začalo pred viac ako tromi desaťročiami. Je vhodnou plodinou pre štúdium polymorfizmu, pretože malý úsek z kľúčnych listov stačí na uskutočnenie analýzy. Vo svete sa výskum polymorfizmu enzýmov slnečnice metódou horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle najintenzívnejšie študoval v USA, Francúzsku, Rusku, Argentíne, Nemecku, Mexiku a Španielsku. Vo Francúzsku sa analýzy využívajú na popis genotypov slnečnice a kontrolu zachovania si ich genotypových vlastností (Múdry a Juráček 1994). Štúdium polymorfizmu enzýmov slnečnice intenzívne pokračuje v ďalších prácach autorov Carrera *et al.* (2002), Sharypina *et al.* (2006 a 2007) a Nikolič *et al.* (2008).

### **Slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.)**

Extrakcia: - pri 4 °C , rozdrvené olúpané semeno (achéna),

Zloženie extrakčného tlmivého roztoku: 0,1 mol dm<sup>-3</sup> Tris HCl (pH=7,2),  
0,2 % β-merkaptoetanol =  
= β-sulfanyletanol (v/v)  
(Bourgoin-Greeneche a  
Lallemand 1993), použiť 50 μl.

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde,
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Stuber *et al.* 1988).

Podmienky pre elektroforetickú separáciu slnečnice ročnej sú v Tab. 7.

Zloženie farbiacich médií pre analyzované enzýmy v slnečnici ročnej  
(*Helianthus annuus* L.) podľa Stuber *et al.* (1988)

Zloženie farbiacich médií pre analýzu polymorfizmu enzýmov ACP, GOT, MDH, PGI, PGD  
a PGM je uvedené pri kukurici siatej.

ME - jablčný enzým (E.C. 1.1.1.40)

50 ml 0,1 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, tlmivý roztok (pH= 8,5)  
50 mg neutralizovaná kys. DL-jablčná  
50 mg MgCl<sub>2</sub>  
15 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát  
10 mg nitro blue tetrazolium  
1 mg fenazín metosulfát

SKD - šikimátdehydrogenáza (E.C. 1.1.1.25)

60 ml 0,1 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, tlmivý roztok (pH= 9,1)  
60 mg (-) – kyselina šikimová  
10 mg NADP sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát  
5 mg nitro blue tetrazolium  
1,33 mg fenazín metosulfát

Tab. 7: Podmienky pre elektroforetickú separáciu vzoriek slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) pri rôznych systémoch tlmivých roztokov

En- zým	Sys- tém pH	Elektródový tlmivý roztok (autor)	Gélový tlmivý roztok (autor)	Napätie	Čas separácie (autor)
<b>PGI</b> <b>PGD</b> <b>ACP</b> <b>MDH</b> <b>ME</b>	<b>B</b>    <b>pH=5,7</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ), 0,02 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (cca. 4,125 g/dm <sup>3</sup> ), pH sa upraví kys. citrónovou (Stuber <i>et al.</i> 1988)	0,009 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (elektrodový tlmivý roztok zriedený 1:6) (Stuber <i>et al.</i> 1988)	Konštantné 286 V (20 min.), potom 319 V	5 h (BioGEVES 1998)
<b>SKD</b> <b>PGM</b>	<b>D</b>    <b>pH=6,5</b>	0,065 mol m <sup>-3</sup> L-histidín (10,088g/dm <sup>3</sup> ), 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (cca. 1,50 g/dm <sup>3</sup> ), pH sa upraví kys. citrónovou (Stuber <i>et al.</i> 1988)	0,016 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,002 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (elektrodový tlmivý roztok zriedený 1:3) (Stuber <i>et al.</i> 1988)	Konštantné 264 V (20 min.), potom 308 V	5 h (BioGEVES, 1998)
<b>GOT</b>	<b>C</b>    <b>pH=8,6</b>	0,19 mol dm <sup>-3</sup> kys. boritá (11,875 g/dm <sup>3</sup> ), 0,04 mol dm <sup>-3</sup> LiOH (asi 1,60 g/dm <sup>3</sup> ), pH upravíť s LiOH (Stuber <i>et al.</i> 1988)	9 dielov Tris-kyselina citrónová (0,05 mol dm <sup>-3</sup> Tris, 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová, pH= 8,3) 1 diel elektrodového tlmivého roztoku	Konštantné 319 V	5 h (Bourgoin- - Greneche a Lallemand, 1993)

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, GOT – glutamát oxaloacetáttransamináza, MDH – malátdehydrogenáza, ME – jablčný enzým, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglucoizomeráza, PGM – fosfoglukomutáza, SKD - šikimátdehydrogenáza

## Postup počas vyfarbovania gélov

Postup vyfarbovania zón aktivity ACP, GOT, MDH, PGI, PGD a PGM je uvedený pri kukurici siatej.

ME - Roztok nalejeme na plát. Inkubujeme cez noc pri izbovej teplote po dobu 60 min. pri 36 °C. Po vypláchnutí uchovávame vo vode.

SKD - Roztok nalejeme na plát. Inkubujeme dve hodiny. Cez noc chladíme. Vypláchneme a uskladníme v chladničke.

### **2.3 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV SÓJE FAZUĽOVEJ**

**(*Glycine max.* [L.] Merr.)**

Sója fazuľová (*Glycine max.* [L.] Merr.) je jednoročná strukovina, ktorej pravdepodobný pôvod je v severnej Číne. Jurášek (1997) uvádza, že patrí medzi najprevratnejšie plodiny 20. storočia. V rozvinutých krajinách je sója zložkou ľudskej výživy a efektívnym jadrovým krmivom. Z pohľadu analýzy polymorfizmu enzýmov je dôležité, že kvety sóje sú vysoko samoopelivé (nad 99 %) i napriek tomu, že kvety sú navštevované včelami kvôli nektáru. Na základe štúdií izoenzýmov uvádzajú Kiang a Gorman (1983) veľmi vysokú čistotu študovaných genotypov. Z historického pohľadu sa pri sóji najprv študoval polymorfizmus bielkovín (Larsen 1967), ale už v roku 1968 publikovali úsilie o klasifikáciu odrôd sóje na báze polymorfizmu enzýmov na polyakrylamidovom géle peroxidázy semien Buttery a Buzzell (1968) a v rokoch 1969 a 1970 Larsen a Benson (1969, 1970). Avšak už v roku 1969 bola publikovaná práca o polymorfizme peroxidázy vo vzťahu k štyrom odrodám a rôznym orgánom klíčiacich semien sóje na báze elektroforetickej separácie na škrobovom géle (Brim et al. 1969). Tieto práce potom naštartovali pomerne intenzívny výskum polymorfizmu enzýmov sóje. Výskum polymorfizmu enzýmov sóje je riešený aj v novej práci v súvislosti s výskumom vplyvu rôznych dávok kadmia na antioxidačné enzýmy (Ferreira et al. 2002).

#### **Sója fazuľová (*Glycine max.* [L.] Merr.)**

Extrakcia: - pri 4 °C

- suché semeno (Bourgoin-Greeneche a Lallemand 1993). Extrakčný tlmivý roztok: 0,1 mol dm<sup>-3</sup> Tris - HCl (pH=7,2),

0,2 %  $\beta$  -merkptoetanol =  $\beta$  -sulfanyletanol (Bourgoin-Greneche a Lallemand 1993), 50  $\mu$ l na semeno alebo jeho zhomogenizovanú časť.

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde,
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Cardy a Beversdorf 1984, Stuber *et al.* 1988).

Podmienky pre elektroforetickú separáciu vzoriek sóje fazuľovej (*Glycine max.* [L.] Merr.) pri rôznych systémoch tlmivých roztokov sú uvedené v Tab. 8.

Tab. 8: Podmienky pre elektroforetickú separáciu vzoriek sóje fazuľovej (*Glycine max.* [L.] Merr.) pri rôznych systémoch tlmivých roztokov

Enzým	Systém	Elektrodový tlmivý roztok (autor)	Gélový tlmivý roztok (autor)	Výkon (autor)	Čas separácie (autor)
PGM		0,065 mol dm <sup>-3</sup>	0,016 mol dm <sup>-3</sup>	Konštantný	5h
PGD		L-histidín	L-histidín	16 W	(Bourgoin-
IDH		(10,088 g/dm <sup>3</sup> )	0,002 mol dm <sup>-3</sup>	(Stuber <i>et</i>	Greneche a
PRX	D	0,007 mol dm <sup>-3</sup>	kyselina citrónová	<i>al.</i> 1988)	Lallemand
DIA		kyselina citrónová	H <sub>2</sub> O		1993)
MPI	pH= 6,5	H <sub>2</sub> O	(elektrodový tlmivý		
ACP		(cca. 1,50 g/dm <sup>3</sup> ; pH sa upraví kyselinou citrónovou), (Stuber <i>et al.</i> 1988)	roztok zriedený 1:3) (Stuber <i>et al.</i> 1988)		

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, DIA – diaforáza, IDH – izocitrátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGM – fosfoglukomutáza, PRX – peroxidáza, MPI – manóza-6-fosfátizomeráza



Zloženie farbiacich médií pre analyzované enzýmy v sóji fazuľovej (*Glycine max.* [L.] Merr.) podľa Stuber *et al.* (1988)

Zloženie farbiacich médií pre analýzu polymorfizmu enzýmov ACP, PGD a PGM je uvedené pri kukurici siatej.

DIA - diaforáza (E.C. 1.6.4.3)

50 ml 0,2 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH=8,0)  
10 mg redukovaná forma β-nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát  
10 mg tetrazolium tiazolyl modrá  
3 mg 2,6-dichlórfenol indofenol  
(Cardy a Beversdorf 1984)

IDH - izocitrátdehydrogenáza (E.C. 1.1.1.42)

50 ml 0,05 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH=8,0)  
150 mg trojsodná soľ kyseliny DL-izocitrónovej  
50 mg MgCl<sub>2</sub>  
5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát  
5 mg tetrazolium tiazolyl modrá  
1 mg fenazín metosulfát  
(Stuber *et al.* 1988; avšak bez krycej agarovej vrstvy a tetrazolium tiazolyl modrú nahrádza nitro blue tetrazolium z pôvodnej metodiky)

MPI – manóza-6-fosfátizomeráza (E.C. 5.3.1.8)

50 ml 0,2 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, tlmivý roztok (pH=8,0)  
20 mg manóza-6-fosfát  
10 mg β-nikotínamidadenín-dinukleotid  
5 mg tetrazolium tiazolyl modrá  
1 mg fenazín metosulfát  
25 jednotiek NAD-závislá glukóza-6-fosfátdehydrogenáza  
100 jednotiek fosfohexózoizomeráza

PRX - peroxidáza (E.C. 1.11.1.7)

50 ml 50 mmol dm<sup>-3</sup> Na-octanový tlmivý roztok (pH=5,0)

50 mg CaCl<sub>2</sub>

0,25 ml peroxid vodíka, 3 %

25 mg 3-amino-9-etylkarbazol

2 ml N, N-dimetylformamid.

#### Postup počas vyfarbovania gélov

Postup vyfarbovania zón aktivity ACP, PGD a PGM je uvedený pri kukurici siatej.

DIA - Roztok nalejeme na plát škrobového gélu a inkubujeme pri 36 °C a po vyfarbení vypláchneme vodou.

IDH - Roztok nalejeme na plát škrobového gélu a inkubujeme pri 36 °C, po vyfarbení vypláchneme vodou. Pozn.: IDH je možné farbiť na tom istom pláte tak, že vo farbiacom médiu budú prítomné oba substráty.

MPI - Roztok nalejeme na plát škrobového gélu a inkubujeme pri 38 °C 60 - 90 min. Potom odsajeme časť farbiaceho roztoku, dolejeme vodou a necháme cez noc pri izbovej teplote.

PRX – Rozpustíme 3-amino-9-etylkarbazol v N, N-dimetylformamide. Pridáme spolu so zostávajúcimi ingredienciami do tlmivého roztoku a vylejeme na gél. Je potrebné inkubovať pri izbovej teplote, kým sa neobjavia červené pásy.

## **2.4 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV HRACHU SIATEHO**

### ***(Pisum sativum L.)***

Hrach siaty (*Pisum sativum* L.) sa zaraďuje do čeľade bôbovité (*Fabaceae*). Šinský *et al.* (1985) uvádzajú, že botanicky hrach siaty (*Pisum sativum* L.) sa delí na dva poddruhy: 1. hrach siaty pravý (*Pisum sativum* L. subsp. *sativum* [Neilr.] Aschers. *et* Graebn.), ktorý sa na základe hospodárskeho využitia delí na: - hrach poľný, ktorý sa pestuje na suché semeno, alebo zelenú hmotu a hrach záhradný, ktorý sa delí na semenný, stržňový, cukrový a 2. peluška (*Pisum sativum* subsp. *arvense* [L.] Čelak.), ktorý má farebné kvety a červené (antokyánové) sfarbenie v pazuchách prílistkov.

Prvá práca týkajúca sa štúdia polymorfizmu enzýmov na škrobovom géle bola realizovaná už v roku 1969 a týkala sa polymorfizmu aminopeptidázy v orgánoch rastlín hrachu pestovaných za kontrolovaných podmienok osvetlenia, teploty a relatívnej vlhkosti. Potom nasledovalo tridsať rokov intenzívneho výskumu. Polymorfizmus enzýmov hrachu sa študoval v USA, Poľsku, Austrálii, ČR a vo Francúzsku. Významná je práca autorov Šwiecický a Wolkow (1987), v ktorej popisujú polymorfizmus enzýmov 56 genotypov hrachu. Analýza polymorfizmu enzýmov hrachu a jeho genetická interpretácia sa v praxi využíva vo francúzsku na popis odrôd, testovanie kvality osív a udržania si odrodových vlastností, ako je to aj pri iných poľnohospodárskych plodinách uvedených v práci Bourgoin-Greeneche a Lallemand (1993) a Múdry a Juráček (1994). V Českej republike analýzu polymorfizmu enzýmov hrachu uskutočnili Smýkal *et al.* (2008).

### **Hrach siaty (*Pisum sativum* L.)**

Extrakcia: - pri 4 °C

- zhomogenizované suché semeno (Parzysz a Przybylska 1984 Bourgoin-Greeneche a Lallemand 1993),
- extrakčný tlmivý roztok: 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris (pH=7,4), 25 mmol dm<sup>-3</sup> KCl, 0,05 mol dm<sup>-3</sup> sacharóza ( Bourgoin-Greeneche a Lallemand 1993),
- 50 µl extrakčného činidla na zhomogenizované semeno alebo jeho časť.

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Stuber *et al.* 1988, Bourgoin–Greeneche a Lallemand 1993).

Podmienky pre elektroforetickú separáciu vzoriek hrachu pri rôznych systémoch tlmivých roztokov sú uvedené v Tab. 9.

Zloženie farbiacich médií pre analyzované enzýmy v hrachu siatom (*Pisum sativum* L.) sú podľa Stuber *et al.* (1988)

IDH - izocitrátdehydrogenáza - podľa Stuber *et al.* (1988) - vid' sója (Juráček a Múdry 1999).

PGD - 6-fosfoglukonátdehydrogenáza - podľa Stuber *et al.* (1988) vid' slnečnica a sója (Múdry a Juráček 1998, Juráček a Múdry 1999).

#### Postup počas vyfarbovania gélov

IDH - Roztok nalejeme na plát škrobového gélu a inkubujeme pri 36 °C, po vyfarbení vypláchneme vodou. Pozn.: IDH je možné farbiť na tom istom pláte tak, že vo farbiacom médiu budú prítomné oba substráty.

Podmienky pre elektroforetickú separáciu vzoriek hrachu pri rôznych systémoch tlmivých roztokov sú uvedené v Tab. 9.

Tab. 9: Podmienky pre elektroforetickú separáciu vzoriek hrachu pri rôznych systémoch tlmivých roztokov

<b>En- zým</b>	<b>Systém (autor)</b>	<b>Elektródový tlmivý roztok (autor)</b>	<b>Gélový tlmivý roztok (autor)</b>	<b>Výkon (autor)</b>	<b>Čas separácie (autor)</b>
<b>PGD IDH</b>	<b>B pH=5,7</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ), 0,02 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O, (cca. 4,125 g/dm <sup>3</sup> ; pH sa upraví kyselinou citrónovou) (Stuber <i>et al.</i> 1988)	0,009 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín, 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O, (elektrodový tlmivý roztok zriedený 1:6) (Stuber <i>et al.</i> 1988)	Konšt. 17 W (Stuber <i>et al.</i> 1988)	4 h 30 min. (Parzysz a Przybylska 1984)

**LEGENDA:** IDH – izocitrátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza

PGD - 6-fosfoglukonátdehydrogenáza - podľa Stuber *et al.* (1988) vid' slnečnica a sója (Juráček a Múdry 1999, Múdry a Juráček 1998).

PGD – Roztok nalejeme na plát a inkubujeme pri 36 °C asi 1 hod. Potom vypláchneme vodou. Pozn.: Pri vyfarbovaní len samotnej PGD nepridáme do roztoku dvojsodnú soľ D-fruktóza-6-fosfát a NADP-závislú glukóza-6-fosfátdehydrogenázu.

## 2.5 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV CÍCERA BARANIEHO (*Cicer arietinum* L.) A HRACHORA SIATEHO (*Lathyrus sativus* L.)

Posledné dve desaťročia je zaznamenaný zvýšený záujem o výskum a pestovanie cícera baranieho, ktorý je z hľadiska racionálnej ľudskej výživy dôležitou strukovinou. Cícer baraní (*Cicer arietinum* L.) sa taxonomicky zaraďuje do rodu cícer (tribus *Cicereae* ALEF.), ktorý zahŕňa deväť jednoročných a tridsaťjeden trvácich druhov. Všetky druhy sú samoopelivé a majú  $2n = 2x = 16$  chromozómov. V pestovateľskej praxi sa využíva iba cícer baraní. Bližšie taxonomické údaje a pôvod jednotlivých druhov sú uvedené v prácach Ladizinsky a Adler (1976a, b) a van der Maesen (1987).

Prvou prácou, ktorá pojednáva o analýze polymorfizmu niektorých druhov enzýmov, je práca autorov Tuwafé *et al.* (1988). Polymorfizmom enzýmov sa neskôr zaoberajú aj práce autorov Gaur a Slinkard (1990a, 1991b), Kazan a Muehlbauer (1991), Kazan *et al.* (1991), Ahmad *et al.* (1992), Kusmenoglu *et al.* (1992), Kazan *et al.* (1993), a Múdry *et al.* (1996, 1998). Najintenzívnejšie sa polymorfizmus enzýmov študoval v Kanade, USA, Izraeli a v Indii. Postavenie hrachora siateho (*Lathyrus sativus* L.) ako strukoviny je na Slovensku oproti cíceru podstatne horšie. Táto plodina blízka cíceru by v budúcnosti mohla obohatiť sortiment strukovín, a tak zvýšiť aj ich spotrebu (Múdry *et al.* 1998).

### Cícer baraní (*Cicer arietinum* L.) a hrachor siaty (*Lathyrus sativus* L.)

Extrakcia: - suché semeno rozdrvené v porcelánovej miske,  
- zhomogenizované semeno extrahované pri 4 °C,  
- extrakčný tlmivý roztok: 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris (pH=7,4), 25 mmol dm<sup>-3</sup> KCl, 0,05 mol dm<sup>-3</sup> sacharóza (Bourgoin-Greeneche a Lallemand 1993),  
- na jedno semeno 50 µl extrakčného činidla.

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Stuber *et al.* 1988, Bourgoin–Greeneche a Lallemand 1993) zloženia:
  - 77,31 g hydrolyzovaný škrob,
  - 15,00 g sacharóza,
  - 600 ml gélový tlmivý roztok.

Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov, výkon, pracovný čas, gélový systém D a zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme D sú uvedené v Tab. 10 – 12.

Tab. 10: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa Cardy *et al.* (1980) a Stuber *et al.* (1988)

Systém	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
<b>D</b> <b>pH=6,5</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ) 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,5 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kys. citrónovou	0,016 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,002 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:3 roztok tlmivého roztoku)

Tab. 11: Výkon, pracovný čas pre gélový systém D a analyzované enzýmy (Stuber *et al.* 1988)

Gélový systém	Výkon	Pracovný čas	Enzýmy
<b>D</b>	16,0 W	6 hodín 30 minút	ADH, MDH, PGD, PGM

**LEGENDA:** ADH – alkoholdehydrogenáza, MDH – malátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGM – fosfoglukomutáza

Tab. 12: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme D (Stuber *et al.* 1988)

ADH	MDH
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8) 1 ml 95 % etanol 20 mg β-nikotínamidadenínindinukleotid, 20 mg tetrazolium tiazolyl modrá 5 mg fenazín metosulfát	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=9,1) 100 mg neutralizovaná kys. DL-jablčná 20 mg redukovanej formy β-nikotínamidadenínindinukleotid, 10 mg nitro blue tetrazolium 1,25 mg fenazín metosulfát

PGD	PGM
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0) 20 mg trojsodná soľ kyseliny 6-fosfoglukónovej 50 mg MgCl <sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,5) 100 mg MgCl <sub>2</sub> 250 mg dvojsodná soľ α-D-glukóza-1-fosfát 10 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 7,5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1 mg fenazín metosulfát 37,5 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfátdehydrogenázy

**LEGENDA:** ADH – alkoholdehydrogenáza, MDH – malátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGM – fosfoglukomutáza

#### Postup počas vyfarbovania gélov

Postup vyfarbovania zón aktivity ADH, MDH, PGD a PGM je uvedený pri kukurici siatej a v publikovaných prácach autorov Múdry a Juráček (1996) a Múdry *et al.* (1998).

## 2.6 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV LÁSKAVCA METLINATÉHO (*Amaranthus cruentus* L.)

Intenzívnejší výskum a snaha o využívanie láskavcov sa v Európe začal v osemdesiatych rokoch minulého storočia a konkrétne na Slovensku v roku 1987. Väčšiu tradíciu výskumu, pestovania a využívania láskavcov majú USA, Mexiko, Peru, India, Pakistan, Čína a i. Zvýšený záujem o láskavce vyplýva z hľadania prírodných látok, ktoré by mali dietologický a terapeutický účinok, biologicky aktívnych látok a látok zaujímavých z nutričného hľadiska. Významným zdrojom takýchto látok sú aj niektoré druhy a ich odrody nedoceneného láskavca. Láskavce zaraďujeme medzi pseudocereálie, o ktoré je v posledných desaťročiach medzi pestovateľmi veľký záujem. Aj na Slovensku je záujem o láskavce zo strany pestovateľov, výrobcov potravín, kozmetického a farmaceutického priemyslu.

Záujem o druhy rodu *Amaranthus* vyplýva z ich rezistencie k mnohým chorobám, z tolerancie k suchu, vysokým teplotám a zasoleniu. Sú dôležitou alternatívnou plodinou

alternatívneho poľnohospodárstva. Vzhľadom na C<sub>4</sub> typ fixácie oxidu uhličitého laskavca patria do skupiny vysokoproduktívnych druhov a sú významné vzhľadom na súčasné globálne otepľovanie klímy. Biologicky aktívne látky laskavca majú pozitívny vplyv na ľudský organizmus v prevencii niektorých civilizačných ochorení. Okrem iného sú aj vhodné na konzum pri bezlepkovej diéte.

Riešenie polymorfizmu enzýmov laskavcov je skromné v porovnaní s ekonomicky významnými plodinami, ako sú kukurica, slnečnica alebo sója. K metodologicky významným prácam týkajúcich sa laskavca patria práce autorov Jain *et al.* (1980), Sawhney *et al.* (1981), Hauptli a Jain (1984), Warwick a Black (1986), Kirkpatrick (1995), Chan a Sun (1997), Pratt a Clark (2001), Jacobsen a Mujica (2003), Yudina *et al.* (2005), Goptsiy *et al.* (2008), Múdry a Gajdošová (2009) a Múdry *et al.* (2010).

Názory na možnosti praktického využitia polymorfizmu enzýmov laskavca su nejednotné. Pre štúdium polymorfizmu nie je vyvinutá jednotná štandardizovaná metodika, preto výsledky analýz (fingerprinty) nie sú v publikovaných prácach zhodné pri jednotlivých druhoch enzýmov. Je to pravdepodobne spôsobené rôznou citlivosťou analýz. Aj v súčasnosti je študovaný polymorfizmus enzýmov laskavcov hlavne v Ruskej federácii, Ukrajine, Českej republike a na Slovensku. Hlavným cieľom týchto prác je poznanie rozsahu diverzity zárodočnej plazmy laskavcov v sledovanom polymorfizme a preskúmať možnosť jeho využitia k právnej ochrane genetických zdrojov v národných šľachtiteľských programoch. Zatiaľ je otázka rozsahu diverzity polymorfizmu enzýmov laskavcov otvorená.

### **Laskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.)**

Extrakcia: - pri 4 °C

- zhomogenizované suché semená, troj- alebo šesťdňové klíčence, vyvinutý list,
- extrakčný tlmivý roztok: 5,0 ml H<sub>2</sub>O, 0,84 g sacharóza, 0,42 g askorbát sodný (Stuber *et al.* 1988),
- na 100 mg zhomogenizovaného listu 50 µl extrakčného činidla, alebo vyššia hmotnosť vzorky so zachovaním pomeru 1 µl : 2 mg a menším (Múdry *et al.* 2010, 2011),
- na 200 mg troj- alebo šesťdňových klíčencov, resp. vyvinutého listu 100 µl extrakčného činidla (Múdry a Gajdošová 2009).



Tab. 13: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému (Stuber *et al.* 1988)

Systém	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
<b>B</b> <b>pH=5,7</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,88 g/dm <sup>3</sup> ) 0,02 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (4,125 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kyselinou citrónovou	0,009 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (1:6 roztok elektródového tlmivého roztoku)
<b>C</b> <b>pH=8,3</b>	0,19 mol dm <sup>-3</sup> kyselina boritá (11,875 g/dm <sup>3</sup> ) 0,04 mol dm <sup>-3</sup> hydroxid lítny (1,60 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť LiOH	9 dielov Tris–kyselina citrónová tlmivý roztok [0,05 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza (6,20 g/dm <sup>3</sup> ); 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (1,50 g)] 1 diel elektródový C tlmivý roztok
<b>D</b> <b>pH=6,5</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ) 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (1,5 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kyselinou citrónovou	0,016 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,002 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (1:3 roztok tlmivého roztoku)
<b>F</b> <b>pH=7,0</b>	0,135 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza 0,04 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (9,0 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kyselinou citrónovou	0,009 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kyselina citrónová H <sub>2</sub> O (1:4 elektródový tlmivý roztok zriedený)

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde,
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Stuber *et al.* 1988, Bourgoin–Greneche a Lallemand 1993).

Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému, výkon

a pracovný čas pre jednotlivé systémy a zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme B, C, D a F sú uvedené v Tab. 13 – 18.

Tab. 14: Výkon a pracovný čas pre jednotlivé gélové systémy (Stu ber *et al.* 1988)

Gélový systém	Výkon	Pracovný čas	Enzýmy
B	17,0 W	7 hodín a 15 minút	MDH, ACP, GLU
C	12,0 W	6 hodín	ADH, CAT, GOT
D	16,0 W	6 hodín a 30 minút	IDH, PGM, PGD, PGI
F	15,0 W	6 hodín a 30 minút	DIA

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, ADH – alkoholdehydrogenáza, CAT – kataláza, DIA – diaforáza, GLU –  $\beta$ -glukozidáza, GOT – glutamátaloacetáttransamináza, IDH – izocitrátdehydrogenáza, MDH – malátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglucoizomeráza, PGM – fosfoglukomutáza

Tab. 15: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme B (Stuber *et al.* 1988)

ACP	GLU	MDH
50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: octan sodný – kyselina octová (pH=5,0) 50 mg soľ Fast Garnet GBC 50 mg MgCl <sub>2</sub> 50 mg sodná soľ kyseliny $\alpha$ -naftyl fosforečnej	Roztok 1: 50 ml 0,05 mol.dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: fosforečnan draselný (pH=6,5) 1 g polyvinylpyrolidon 40, 100 mg soľ Fast blue BB  Roztok 2: 50 mg 6-bromo-2-naftyl- $\beta$ -D-glukozid v 5 ml N,N-dimetylformamid	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=9,1) 100 mg neutralizovaná kyselina DL-jablčná 20 mg redukovanej formy $\beta$ -nikotínamidadenín - dinukleotid, 10 mg nitro blue tetrazolium 1,25 mg fenazín metosulfát

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, GLU –  $\beta$ -glukozidáza, MDH – malátdehydrogenáza

Tab. 16: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme C  
(Stuber *et al.* 1988)

ADH	CAT	GOT
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8) 1 ml 95% etanol 20 mg β- nikotínamidadenín - dinukleotid 20 mg tetrazolium tiazolyl modrá 5 mg fenazín metosulfát	500 mg ferikyanid draselný 500 mg chlorid železitý 50 ml H <sub>2</sub> O 0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 ml substrátový roztok 50 mg soľ Fast blue BB Substrátový roztok (pH=7,4) 400 ml H <sub>2</sub> O 146,1 mg kyselina α-ketoglutárová 532,4 mg kyselina L-asparágová 2 g polyvinylpyrolidon 40 200 mg dvojsodná soľ kyseliny etyléndiamín tetraoctovej 5,68 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

**LEGENDA:** ADH – alkoholdehydrogenáza, CAT – kataláza, GOT – glutamát oxaloacetáttransamináza

Tab. 17: Zloženie farbiaceho média pre diaforázu (DIA) v gélovom systéme F  
(Stuber *et al.* 1988)

DIA
50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=9,1) 0,5 g polyvinylpyrolidon 40 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadeníndinukleotidfosfát 40 mg tetrazolium tiazolyl modrá 4 mg 2,6-dichlorofenol

Tab. 18: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme D (Stuber *et al.* 1988)

<b>IDH</b>	<b>PGD</b>
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0) 50 mg MgCl <sub>2</sub> 150 mg trojsodná soľ kyseliny DL-izocitrónovej 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1mg fenazín metosulfát	50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0) 20 mg trojsodná soľ kyseliny 6-fosfoglukónovej 50 mg MgCl <sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát
<b>PGI</b>	<b>PGM</b>
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8) 50 mg trojsodná soľ D-fruktóza-6-fosfát 50 mg MgCl <sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleofidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát 10 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfátdehydrogenázy	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,5) 100 mg MgCl <sub>2</sub> 250 mg dvojsodná soľ α-D-glukóza-1-fosfát 10 mg sodná soľ β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfát 7,5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1 mg fenazín metosulfát 37,5 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfátdehydrogenázy

**LEGENDA:** IDH – izocitrátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglucoizomeráza, PGM – fosfoglukomutáza

## 2.7 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV KOSTRAVY TRSTENÍKOVITEJ (*Festuca arundinacea* Schreb.) A MÄTONOHU TRVÁČEHO (*Lolium perenne* L.)

Z poľnohospodárskeho hľadiska sa kostrava trsteníkovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.)

zarad'uje medzi trávy. Rod *Festuca* zahŕňa širokú škálu foriem od drobnolistých (*Festuca capilata* Lam.) po vysokého vzrastu (*Festuca arundinacea* Schreb.). Hospodársky najdôležitejšie sú kostrava lúčna (*Festuca pratensis* Huds.) a kostrava červená (*Festuca rubra* L.). Kostrava je trávou mierneho až chladnejšieho pásma s pravdepodobným pôvodom v Stredomorí a v Prednej Ázii. Jej hospodársky význam je značný s univerzálnym využitím pre poľné dvojročné i dočasné kultúry, lúky a do istej miery i pasienky a ihriskové, parkové a okrasné plochy. Obe formy sú cudzoopelivé, vykazujú depresiu po nútenom samoopelení. Obe sú dobre klonovateľné s chromozómovými súbormi  $2n = 28$  pri kostrave lúčnej,  $2n = 56$  pri kostrave červenej (Rod *et al.* 1982). Výskum polymorfizmu enzýmov druhov rodu kostrava spadá do 90-tych rokov minulého storočia.

Mätonohy patria k najpestovanejším trávam na ornej pôde a pasienkoch, ale aj na parkových, letiskových a športových plochách. Domovinou druhov rodu *Lolium* je Stredozemie a Blízky východ. Tento rod zahŕňa štyridsať prevažne diploidných druhov ( $2n = 14$ ). Kríženie predovšetkým kultúrnych druhov je úplne možné. Dochádza spontánne i ku kríženiu medzi druhmi rodov *Lolium* a *Festuca*. Šľachtiteľsky sa využívajú medzidruhovú aj medzirodovú krížence. Ďalším zdrojom premenlivosti je polyploidizácia. Mätonohy sú cudzoopelivé a vetrom opelivé. Samoopelenie je nízke predovšetkým pri mätonohu mnohokvetom. Nútené opakované samoopelenie vedie k depresii a diferenciacii foriem, čo sa v šľachtení využíva (Rod *et al.* 1982). Analýza polymorfizmu enzýmov rodu mätonoh sa realizovala ešte v 70-tych rokoch. Už v roku 1977 boli publikované prvé výsledky (Hayward a Mc Adam 1977). V súčasnosti patrí k najpreskúmanejším trávam na báze polymorfizmu enzýmov. Polymorfizmus enzýmov mätonohu sa využíva vo Francúzsku na biochemický popis schvaľovaných nových genotypov (odrôd) tejto poľnohospodárskej plodiny (Múdry a Juráček 1994).

### **Kostrava trsteníkovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.) a mätonoh trváci (*Lolium perenne* L.)**

#### Kultivácia a príprava vzorky:

- klíčenie a kultivácia klíčiacych semien na mokrom filtračnom papieri v Petriho miske za konštantných podmienok osvetlenia, teploty (22 - 25 °C) a dĺžky osvetlenia po dobu 15 dní (Greeneche *et al.* 1991, Bourgoin-Greeneche a Lallemand 1993).

Extrakcia: - pri 4 °C,

- listové čepele dĺžky 7-10 cm (Hayward a Mc Adam 1977, Nielsen 1980, Ostergaard *et al.* 1985) homogenizované jednotlivo, iba pre špeciálne experimentálne účely každý genotyp reprezentuje zmesná vzorka z 5-tich listov (t.j. z 5 rastlín),
- 20 µl extrakčného činidla na 1 vzorku zloženia 0,1 mol dm<sup>-3</sup> tris-HCl (pH=7,2), 0,02 % (v/v) - β-sulfanyletanol (Greeneche *et al.* 1991) s niekoľkými zrnami kremičitého piesku (Ostergaard *et al.* 1985).

Tab. 19: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému (Stuber *et al.* 1988)

System	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
<b>B</b> pH=5,7	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,88 g/dm <sup>3</sup> ) 0,02 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (4,125 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:6 roztok elektródového tlmivého roztoku)
<b>C</b> pH=8,3	0,19 mol dm <sup>-3</sup> kys. boritá (11,875 g/dm <sup>-3</sup> ) 0,04 mol dm <sup>-3</sup> hydroxid lítny (1,60 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť LiOH	9 dielov Tris – kys. citrónová tlmivý roztok [0,05 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza (6,20 g/dm <sup>3</sup> ); 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,50 g/dm <sup>3</sup> )] 1 diel elektródový C tlmivý roztok
<b>D</b> pH=6,5	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ) 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,5 g/l) pH upraviť kys. citrónovou	0,016 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,002 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:3 roztok tlmivého roztoku)

Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde,
- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle, knôty z Whatman 2 (11 x 2 mm),

- zloženie škrobového gélu:

77,31 g hydrolyzovaný zemiakový škrob pre elektroforézu (Sigma),

15,00 g sacharóza,

600 ml gélový tlmivý roztok.

- režim konštantného výkonu (Stuber *et al.* 1988),

- po 20-tich minútach sa preruší elektroforéza a vyberú sa knôty z gélu, elektroforéza potom pokračuje ďalej (Hayward a Mc Adam 1977, Nielsen 1980).

Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému, výkon, pracovný čas, zloženie farbiacich médií v gélovom systéme B, C a D sú uvedené v Tab. 19 – 22.

Tab. 20: Výkon, pracovný čas pre jednotlivé gélové systémy a enzýmy (Stuber *et al.* 1988)

Gélový systém	Výkon	Pracovný čas	Enzýmy
<b>B</b>	17,0 W	7 hodín 15 minút	MDH, ACP
<b>C</b>	12,0 W	6 hodín	ADH
<b>D</b>	16,0 W	6 hodín 30 minút	PGI

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, ADH – alkoholdehydrogenáza, MDH – malátdehydrogenáza, PGI – fosfoglukoizomeráza

Tab. 21: Zloženie farbiacich médií v gélovom systéme B (Stuber *et al.* 1988)

ACP	MDH
50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: octan sodný – kys. octová (pH = 5,0) 50 mg soľ Fast Garnet GBC 50 mg MgCl <sub>2</sub> 50 mg sodná soľ kys. α-naftyl fosforečnej	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH = 9,1) 100 mg neutralizovaná kys. DL-jablčná 20 mg redukovanej formy β-nikotínamidadenín - dinukleotid, 10 mg nitro blue tetrazolium 1,25 mg fenazín metosulfát

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, MDH – malátdehydrogenáza

Tab. 22: Zloženie farbiacich médií pre ADH v gélovom systéme C a PGI v gélovom systéme D (Stuber *et al.* 1988)

ADH	PGI
<p>50 ml 0,05 mol dm<sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia:</p> <p>Tris-HCl (pH=8),            1 ml 95 % etanol,            20 mg β-nikotínamidadenín – dinukleotid,            20 mg tetrazolium tiazolyl modrá            5 mg fenazín metosulfát</p>	<p>50 ml 0,05 mol dm<sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia:</p> <p>Tris-HCl (pH=8)            50 mg dvojsodná soľ D-fruktóza-6-fosfát            50 mg MgCl<sub>2</sub>            5 mg sodná soľ            β-nikotínamidadeníndinukleofidfosfát            5 mg tetrazolium tiazolyl modrá            1,5 mg fenazín metosulfát            10 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfátdehydrogenázy</p>

**LEGENDA:** ADH – alkoholdehydrogenáza, PGI – fosfoglučkoizomeráza

#### Postup počas vyfarbovania gélov

ACP - Roztok nalejeme na plát škrobového gélu a inkubujeme pri 36°C. Po vyfarbení vypláchneme vodou. Zreteľné vyfarbenie pásov dosiahneme, keď plát inkubujeme asi 1 hod., potom odsajeme časť farbiaceho roztoku, dolejeme vodu a necháme cez noc pri izbovej teplote.

ADH - Roztok sa naleje na plát a gél sa inkubuje asi 1 hod. pri 36 °C. Potom sa gél opláčne vodou.

MDH - Roztok nalejeme na plát a pri 36 °C inkubujeme asi 1 hod. Po vypláchnutí uchovávané vo vode.

PGI - Roztok nalejeme na plát a inkubujeme pri 36 °C asi 1 hod. Potom vypláchneme vodou.

## **2.8 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV ĎATELINY PLAZIVEJ (*Trifolium repens* L.)**

Ďatelina plazivá (*Trifolium repens* L.) patrí medzi významné poľnohospodárske plodiny a zaraďuje sa medzi ďatelinoviny. Ďatelina plazivá zahŕňa množstvo foriem s množstvom



prechodných foriem: drobnolisté (var. *alpinum*), s malými až strednými listami (var. *sylvestre* a *typicum*), ktoré sa najviac využívajú, a veľkolisté (forma *giganteum*). Pochádza z horného Talianska a rozšírila sa do celého sveta. Pre analýzy a genetickú interpretáciu polymorfizmu enzýmov je dôležitá informácia, že je to druh amfidiploidný ( $2n=32$ ), cudzoopelivá a opelujú ju včely a čmeliaky (Rod *et al.* 1982). Z ďateľinovín sa výskum polymorfizmu enzýmov realizoval na lucerne siatej (*Medicago sativa* L.). Výsledky analýz publikoval Quiros (1983). Začiatky výskumu polymorfizmu enzýmov druhov rodu ďateľina (*Trifolium* L.) spadajú do 80-tych rokov minulého storočia a väčšina prác bola publikovaná v nasledujúcom desaťročí. Výskum sa sústredil na komplexnejšie poznanie agrobiodiverzity genetických zdrojov tohto druhu vďaka zvýšeným aktivitám smerom k poznaniu a uchovaniu genofondu pre ďalšie generácie. Z príbuzných druhov boli analyzované napr. *Trifolium subterraneum* L. (Collins *et al.* 1984), *Trifolium hirtum* L. (Molina-Freaner a Jain 1992) a *Trifolium campestre* L., *Trifolium fragiferum* L. a *Trifolium montanum* L. (Bulińska-Radomska 1996). Polymorfizmus enzýmov ďateľiny je riešený aj v neskorších prácach (Bulińska-Radomska 2000 a Malaviya *et al.* 2005).

### **Ďateľina plazivá (*Trifolium repens* L.)**

#### Kultivácia a príprava vzorky:

- klíčenie skarifikovaných semien na mokrom filtračnom papieri v Petriho miskách počas troch dní v termostate (za tmy),
- semená po 24 hodinovom nabobtnávaní sú enzymaticky aktívne (Collins *et al.* 1984), ale oveľa ľahšie sa osemenie zo semien odstraňuje po troch dňoch klíčenia.

#### Extrakcia: - pri 4 °C

- homogenizácia 3-dňových naklíčených semien po odstránení osemenia (Molina-Freaner a Jain 1992),
- klíčiace semená sa homogenizujú jednotlivo,
- extrakčný tlmivý roztok: 5,0 ml H<sub>2</sub>O, 0,84 g sacharóza, 0,42 g askorbát sodný (Stuber *et al.* 1988)
- 20 µl extrakčného činidla na jedno klíčiace semeno (Stuber *et al.* 1988).

#### Podmienky pohybu (separácie) na géle:

- pri 4 °C; vzorky migrujú smerom k anóde

- v 13 % hydrolyzovanom škrobovom géle (Cardy *et al.* 1980, Stuber *et al.* 1988, Bourgoïn–Greneche a Lallemand 1993) zloženia:

77,31 g hydrolyzovaný škrob,  
15,00 g sacharóza,  
600 ml gélový tlmivý roztok.

- režim konštantného výkonu (Stuber *et al.* 1988),
- po 20-tich minútach sa preruší elektroforéza a vyberú sa knôty z gélu, elektroforeza potom pokračuje ďalej (Collins *et al.* 1984).

Tab. 23: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému (Stuber *et al.* 1988)

Systém	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
<b>B</b> <b>pH=5,7</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,88 g/dm <sup>3</sup> ) 0,02 mol dm <sup>-3</sup> kys.citrónová H <sub>2</sub> O (4,125 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,003 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:6 roztok elektródového tlmivého roztoku)
<b>C</b> <b>pH=8,3</b>	0,19 mol dm <sup>-3</sup> kys. boritá (11,875 g/dm <sup>-3</sup> ) 0,04 mol dm <sup>-3</sup> hydroxid lítny (1,60 g/dm <sup>3</sup> ) pH upraviť LiOH	9 dielov Tris – kys. citrónová tlmivý roztok [0,05 mol dm <sup>-3</sup> Trizma báza (6,20 g/dm <sup>3</sup> ); 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,50 g/dm <sup>3</sup> )] 1 diel elektródový C tlmivý roztok
<b>D</b> <b>pH=6,5</b>	0,065 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín (10,088 g/dm <sup>3</sup> ) 0,007 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1,5 g/l) pH upraviť kys. citrónovou	0,016 mol dm <sup>-3</sup> L-histidín 0,002 mol dm <sup>-3</sup> kys. citrónová H <sub>2</sub> O (1:3 roztok tlmivého roztoku)

Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému, výkon, pracovný čas, zloženie farbiacich médií pre systém B, C a D sú uvedené v Tab. 23 – 27.

Tab. 24: Výkon, pracovný čas pre jednotlivé gélové systémy a enzýmy  
(Stuber *et al.* 1988)

Gélový systém	Výkon	Pracovný čas	Enzýmy
<b>B</b>	17,0 W	7 hodín 15 minút	MDH, PGI
<b>C</b>	12,0 W	6 hodín	ADH, CAT
<b>D</b>	16,0 W	6 hodín 30 minút	PGD, (PGI), PGM,

**LEGENDA:** ADH – alkoholdehydrogenáza, CAT – kataláza, MDH – malátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglucoizomeráza, PGM – fosfoglukomutáza

Tab. 25: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy  
v gélovom systéme B (Stuber *et al.* 1988)

PGI	MDH
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8) 50 mg dvojsodná soľ D- fruktóza-6-fosfát 50 mg MgCl <sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β- nikotínamidadeníndinukle ofidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát 10 jednotiek NADP- závislej glukóza-6- fosfátdehydrogenázy	50 ml 0,1 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH = 9,1) 100 mg neutralizovaná kys. DL-jablčná 20 mg redukovanej formy β-nikotínamidadenín - dinukleotid, 10 mg nitro blue tetrazolium 1,25 mg fenazín metosulfát

**LEGENDA:** MDH –  
malátdehydrogenáza, PGI –  
fosfoglucoizomeráza

Tab. 26: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme C  
(Stuber *et al.* 1988)

ADH	CAT
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8), 1 ml 95 % etanol, 20 mg β-nikotínamidadenín – dinukleotid, 20 mg tetrazolium tiazolyl modrá 5 mg fenazín metosulfát	500 mg ferikyanid draselný 500 mg chlorid železitý 50 ml H <sub>2</sub> O 0,01 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**LEGENDA:** ADH – alkoholdehydrogenáza, CAT – kataláza

Tab. 27: Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé enzýmy v gélovom systéme D  
(Stuber *et al.* 1988)

PGD	PGM
50 ml 0,05 mol dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0) 20 mg trojsodná soľ kyseliny 6-fosfoglukónovej 50 mg MgCl <sub>2</sub> 5 mg sodná soľ β-nikotínamidadeníndinukleotidfosfát 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1,5 mg fenazín metosulfát	50 ml 0,1 mol.dm <sup>-3</sup> tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,5) 100 mg MgCl <sub>2</sub> 250 mg dvojsodná soľ α-D-glukóza-1-fosfát, 10 mg sodná soľ β-nikotínamidadeníndinukleotidfosfát 7,5 mg tetrazolium tiazolyl modrá 1 mg fenazín metosulfát 37,5 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfátdehydrogenázy

**LEGENDA:** PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGM – fosfoglukomutáza

## Postup počas vyfarbovania gélov

ADH - Roztok sa naleje na plát a gél sa inkubuje asi 1 hod. pri 36 °C. Potom sa gél opláchnie vodou.

CAT - Na škrobový plát nalejeme 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, roztok zamiešame a necháme pôsobiť 5 min. Potom vypláchneme destilovanou vodou. Na škrobový plát nalejeme farbiaci roztok, necháme pôsobiť 5 minút a vypláchneme destilovanou vodou. Aktivita katalázy sa prejaví bielymi škvrnami na tmavom pozadí. Gély je možné uskladňovať vo vode niekoľko dní, fotografovať by sa mali bezprostredne po vyfarbení.

MDH - Roztok nalejeme na plát a pri 36 °C inkubujeme asi 1 hod. Po vypláchnutí uchovávané vo vode.

PGI/PGD - Roztok nalejeme na plát a inkubujeme pri 36 °C asi 1 hod. Potom vypláchneme vodou. Pozn.: Pri vyfarbovaní len samotnej PGI nepridáme do roztoku trojsodnú soľ kyseliny 6-fosfoglukónovej a pri vyfarbovaní len samotnej PGD nepridáme do roztoku dvojsodnú soľ D-fruktóza-6-fosfát a NADP-závislú glukóza-6-fosfátdehydrogenázu.

PGM - Roztok nalejeme na plát a inkubujeme pri 36 °C asi 1 hod. Potom vypláchneme vodou.

### **3 NIEKTORÉ NAJČASTEJŠIE VÝPOČTY A PRÍKLADY PRI VYHODNOCOVANÍ ANALÝZ POLYMORFIZMU ENZÝMOV**

#### **3.1 VÝPOČET POČTU IZOENZÝMOV POLYMÉRNEHO ENZÝMU**

Polymérne a oligomérne enzýmy majú mnoho štruktúrnych génov, ktoré kódujú odlišné podjednotky holoenzýmu. Kombináciou týchto podjednotiek sa tvoria rozdielne izoenzýmy. Počet izoenzýmov, ktoré sa môžu vytvoriť v diploidnom organizme, v ktorom sa podjednotky náhodne kombinujú bez obmedzenia subcelulárnej kompartmentácii možno predpovedať podľa matematickej rovnice (Shaw1964):

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

kde **i** je počet izoenzýmov (škvrny alebo pásy na zymograme), **p** je počet polymérov (ktoré sa podieľajú na stavbe polymérneho holoenzýmu), **s** je počet odlišných podjednotiek alebo variantov polymérov (ktoré môžu interagovať a tvoriť holoenzým).

Typy diagramov izozymogramov skonštruované pre predpovedaný počet izoenzýmov, ktorých kvartérna štruktúra je monomérna, dimérna, trimérna a tetramérna, pre diploidné

a tetraploidné organizmy sú publikované napr. v prácach autorov Acquaah (1992), Bourgoin-Grenéche, Lallemand (1993) a Múdry (2011).

### 3.2 ANALÝZA IZOENZÝMOV V POPULÁCIÍ

Veľké množstvo analýz polymorfizmu enzýmov sa týka jeho variability v populáciách organizmov. Práce sú zamerané na poznanie rozsahu variability polymorfizmu v rámci populácie a na jednoduché porovnávanie odlišných genotypov. Pre využitie týchto analýz je dôležité, aby variabilita bola konzistentná a stabilná vo vzťahu k podmienkam prostredia. Nie je podstatné, že sa nepozná ihneď genetický základ izoenzýmových fenotypov. Príklady využitia sú v identifikácii odrôd a v stanovení diverzity zárodočnej plazmy v analyzovanom súbore. Mnohé práce a praktické využitie analýz sa týkajú určenia podstaty genetickej variability, ako sú stanovenie hybridnosti, somaklonálnej variability a na mnoholokusovej úrovni takých, ako sú heteróza a heterozygotnosť, určenie úrovne ploídie, lokusov kvantitatívnych znakov atď. Pre mnohé aplikácie sú potrebné výpočty frekvencií alel. Z elektroforetických údajov sa dajú získať frekvencie genotypov pre rôzne lokusy izoenzýmov. Frekvencie alel sa dajú vypočítať na základe kodominantného prejavu izoenzýmových lokusov. Hodnoty frekvencií alel sa dosadzujú do rôznych rovníc, ktoré sa používajú na stanovenie parametrov na rozlíšenie populácií a určenie ich štruktúry.

### 3.3 VÝPOČET FREKVENCIE ALEL

Vhodným kvantitatívnym meraním kvantitatívnej variability populácie je frekvencia alel. Je definovaná, ako podiel jednotlivých druhov alel vyskytujúcich sa v lokuse v celom analyzovanom súbore. Čím je analyzovaný súbor väčší, tým je určená frekvencia alel v populácií presnejšia. Zvyčajne sa požaduje veľkosť súboru 100 a viac analyzovaných jedincov (vzoriek). Frekvencia alely v lokuse môže byť maximálne 100-percentná a vtedy sa v analyzovanom súbore vyskytuje ako jediná a má hodnotu 1,0. Ak sa však v lokuse analyzovaného súboru vyskytujú dve alebo viac odlišných alel, hodnota ich frekvencií je menšia ako 1,0. Súčet ich frekvencií je 1,0.

#### 3.3.1 Výpočet frekvencií alel podľa Hardy – Weinbergovho zákona

Väčšina izoenzýmových systémov má kodominantné alely – homozygotné a heterozygotné konštitúcie lokusov sú fenotypovo rozlíšiteľné (odlišné). Podľa **Hardy – Weinbergovho**

**zákona (H-W)** platí :  $N = X + Y + H$ , kde  $N$  je počet analyzovaných jedincov,  $X$  je počet homozygotných jedincov pre jednu alelu (**FF**),  $Y$  je počet homozygotov pre druhú alelu (**SS**) a  $H$  je počet heterozygotov. Diploid má v lokuse dve alely, a teda celá populácia bude mať celkový počet alel  $2N$ . Homozygotný jedinec pre nejakú alelu bude mať v lokuse jej dve kópie (**FF**, **SS**), ale len jednu kópiu, ak je jedinec v lokuse heterozygotný (**FS**). Frekvenciu alel v populácii potom možno vypočítať – pre alelu **F**:

$$p = (2X + H) / 2N = (X + \frac{1}{2} H) / N$$

a podobne pre alelu **S**,

$$q = (2Y + H) / 2N = (Y + \frac{1}{2} H) / N,$$

kde  $p$  je frekvencia alel **F** a  $q$  je frekvencia alel **S**.

Iný prípad je, ak jedna alela je dominantná (**FF**) a druhá je recesívna (**ff**). Systémy izoenzymov, ktoré majú nulové alely majú nerozlišiteľné homozygotné dominantné genotypy (**FF**) od heterozygotných (**Ff**). Na identifikáciu je potrebné uskutočniť testovacie kríženie. Homozygotná recesívna konštitúcia (**ff**) je identifikovateľná, potom podľa H-W zákona frekvencia **ff** je  $q^2$  a frekvencia **f** je  $\sqrt{q^2} = q$ . Pretože  $p + q = 1$ , frekvencia ( $p$ ) dominantnej alely (**F**) je daná rovnicou  $p = 1 - q$ .

Ak je lokus autosomálny s výskytom troch kodominantných alel v šiestich genotypoch je možný výskyt šiestich fenotypov. Bude platiť  $a_1 + a_2 + a_3 = 1$  a frekvencia alely  $a_1 = (2A + \frac{1}{2} H) / 2N$ .

Ak je v lokuse **B** možný výskyt dvoch kodominantných alel **B<sub>1</sub>** a **B<sub>2</sub>** (**B<sub>1</sub>** a **B<sub>2</sub>**) a jednej recesívnej (nulová, **b**), frekvencie možno označiť  $p$ ,  $q$  a  $r$ . Podľa H-W zákona platí:

$$(p + q + r)^2 = 1$$

$$p^2 + 2pr + 2pq + q^2 + 2qr + r^2 = 1,$$

pre genotypy **B<sub>1</sub>B<sub>1</sub>**, **B<sub>1</sub>b**, **B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>**, **B<sub>2</sub>B<sub>2</sub>**, **B<sub>2</sub>b**, **bb**, a fenotypy **B<sub>1</sub>** (**B<sub>1</sub>B<sub>1</sub>** + **B<sub>1</sub>b**), **B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>**, **B<sub>2</sub>** (**B<sub>2</sub>B<sub>2</sub>** + **B<sub>2</sub>b**) a **b**.

Ako príklad môže slúžiť určenie frekvencií alel v analyzovanom súbore koleoptíl kukurice siatej.

**Príklad:** V rokoch 2006-2007 sa uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov (ACP, ADH, IDH, MDH, PGD, PGM a PGI) krajových populácií (ekotypov 21, 22, 23 a 27). V Tab. 28–31 sú uvedené výsledky analýz. Malými písmenami abecedy (a, b, c..., **4 a** znamená, že štyri vzorky mali rovnaký morfortyp **a**) je označený druh a počet morfortypu, *Acp1* je príklad lokusu, označenie alely v lokuse, napr.: 2 – znamená, že lokus má homozygotnú konštitúciu

(2/2) a 2/4, že má heterozygotnú konštitúciu. Analogicky to platí aj pre ostatné lokusy. Celkový počet analyzovaných vzoriek (koleoptíl) v krajovej populácii bol 20.

Tab. 28: Variabilita genotypov krajovej populácie 21

Populácia 21	Počet zrn	Enzým	ACP	ADH	IDH		MDH					PGD		PGM		PGI	
		Lokus	<i>Acp1</i>	<i>Adh1</i>	<i>Idh1</i>	<i>Idh2</i>	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh2</i>	<i>Mdh3</i>	<i>Mdh4</i>	<i>Mdh5</i>	<i>Mmm</i>	<i>Pgd1</i>	<i>Pgd2</i>	<i>Pgm1</i>	<i>Pgm2</i>	<i>Pgi1</i>
		Genotyp															
4	a	2	4	4	6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
4	b	2/4	4	4	4	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
1	c	4	4	4	4	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
2	d	2/4	4	4	6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	4	4	
1	e	3	4	4	6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
1	f	3	4	4	4	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
2	g	4	4	4	4/6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
1	h	2	4	4	4/6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
4	ch	2/4	4	4	6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	

**LEGENDA:** ACP – kyslá fosfatáza, ADH – alkoholdehydrogenáza, IDH – izocitrátdehydrogenáza, MDH – malátdehydrogenáza, PGD – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfogluoizomeráza, PGM – fosfoglukomutáza

Tab. 29: Variabilita genotypov krajovej populácie 22

Populácia 22	počet zrn	Enzým	ACP	ADH	IDH		MDH					PGD		PGM		PGI	
		Lokus	<i>Acp1</i>	<i>Adh1</i>	<i>Idh1</i>	<i>Idh2</i>	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh2</i>	<i>Mdh3</i>	<i>Mdh4</i>	<i>Mdh5</i>	<i>Mmm</i>	<i>Pgd1</i>	<i>Pgd2</i>	<i>Pgm1</i>	<i>Pgm2</i>	<i>Pgi1</i>
		Genotyp															
1	a	3	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
1	b	2/4	4	4	6	6	3/6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
1	c	4	4	4	4/6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
3	d	2/4	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	4	4	
1	e	3	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	4	4	
1	f	4	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	4	4	
2	g	3	4/6	4	4	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	4	4	
2	h	4	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	4	4	
3	ch	2	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
3	i	2	4	4	4/6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	
2	j	2	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	2	5	9	4	4	

**LEGENDA:** vid' Tab. 28

Tab. 30: Variabilita genotypov krajovej populácie 23

Populácia 23	Počet zrn	Enzým	ACP	ADH	IDH		MDH					PGD		PGM		PGI	
		Lokus	<i>Acp1</i>	<i>Adh1</i>	<i>Idh1</i>	<i>Idh2</i>	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh2</i>	<i>Mdh3</i>	<i>Mdh4</i>	<i>Mdh5</i>	<i>Mmm</i>	<i>Pgd1</i>	<i>Pgd2</i>	<i>Pgm1</i>	<i>Pgm2</i>	<i>Pgi1</i>
		Genotyp															
5	a	2/4	6	4	6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
1	b	2/4	6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
2	c	2/4	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
1	d	2	6	4	4/6	6	3/6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
1	e	2	6	4	4	6	3	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
2	f	2	6	4	6	6	6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
5	g	4	6	4	4/6	6	3/6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
1	h	4	6	4	4	6	3/6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	
2	ch	2/4	6	4	4/6	6	3/6	16	12	12	M	3.8	5	9	1	4	

**LEGENDA:** vid' Tab. 28



Tab. 31: Variabilita genotypov krajovej populácie 27

Populácia 27	Počet zrn	Enzým	ACP	ADH	IDH		MDH					PGD		PGM		PGI	
		Lokus	<i>Acp1</i>	<i>Adh1</i>	<i>Idh1</i>	<i>Idh2</i>	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh2</i>	<i>Mdh3</i>	<i>Mdh4</i>	<i>Mdh5</i>	<i>Mmm</i>	<i>Pgd1</i>	<i>Pgd2</i>	<i>Pgm1</i>	<i>Pgm2</i>	<i>Pgi1</i>
		Genotyp															
	2	a	4	6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	3	4
	2	b	2/4	6	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	2	c	2	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	2	d	2	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	1	e	2/4	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	1	f	4	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	4	g	4	6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	2	h	4	6	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	1	ch	2/4	4/6	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	4	4
	2	i	2/4	4/6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	1	4
	1	j	4	6	4	4/6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	9	4	4

LEGENDA: vid' Tab. 28

Správne riešenie je uvedené v Tab. 32:

Tab. 32: Frekvencia alel v analyzovaných lokusoch polymorfizmu enzýmov krajoových populácií 21, 22, 23 a 27 kukurice siatej

	Populácia	21	22	23	27	Aritmetický priemer
Enzýmy	Alela	Frekvencia	Frekvencia	Frekvencia	Frekvencia	Frekvencia
ACP	<i>Acp1</i> : 2	0,500	0,500	0,450	0,350	0,450
	<i>Acp1</i> : 3	0,100	0,200	0,000	0,000	0,075
	<i>Acp1</i> : 4	0,400	0,300	0,550	0,650	0,475
ADH	<i>Adh1</i> : 4	1,000	0,625	0,050	0,225	0,475
	<i>Adh1</i> : 6	0,000	0,375	0,950	0,775	0,525
IDH	<i>Idh1</i> : 4	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	<i>Idh2</i> : 4	0,375	0,375	0,325	0,300	0,344
	<i>Idh2</i> : 6	0,625	0,625	0,675	0,700	0,656
MDH	<i>Mdh1</i> : 6	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	<i>Mdh2</i> : 3- 3.5	0,000	0,025	0,275	0,000	0,075
	<i>Mdh2</i> : 6	1,000	0,975	0,725	1,000	0,925
	<i>Mdh3</i> : 16	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	<i>Mdh4</i> : 12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	<i>Mdh5</i> : 12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	<i>Mmm</i> : M	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PGM	<i>Pgm1</i> : 9	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	<i>Pgm2</i> : 1	0,000	0,000	1,000	0,800	0,450
	<i>Pgm2</i> : 3	0,000	0,000	0,000	0,100	0,025
	<i>Pgm2</i> : 4	1,000	1,000	0,000	0,100	0,525
PGD	<i>Pgd1</i> : 2	0,900	0,550	0,000	0,000	0,363
	<i>Pgd1</i> : 3.8	0,100	0,450	1,000	1,000	0,637
	<i>Pgd2</i> : 5	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PGI	<i>Pgi1</i> : 4	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

LEGENDA: vid' Tab. 28

### 3.4 VÝPOČET PRIEMERNÉHO POČTU ALEL V LOKUSE

Priemerný počet alel v lokuse je daný ako podiel celkového počtu alel vo všetkých skúmaných izoenzymových lokusoch a celkového počtu lokusov. Ak v prvom analyzovanom súbore bolo v desiatich lokusoch 22 rôznych alel a v druhom súbore 26 alel, ich priemerné počty alel sú pre prvý súbor  $22 : 10 = 2,2$  a pre druhý súbor  $26 : 10 = 2,6$ . Z výsledkov vyplýva, že druhá populácia je rozmanitejšia, rôznorodejšia, resp. variabilnejšia.

**Príklad:** Z hodnôt uvedených v Tab. 28-31 vypočítajte priemerný počet alel v lokuse a priemerný polymorfizmus.

**Správne riešenie je uvedené v Tab. 33-34:**

Tab. 33 Hodnotenie priemerného počtu alel v enzýmovom lokuse krajových populácií 21, 22, 23 a 27

Populácia	Celkový počet analyz. lokusov	Počet odlišných alel	Priemerný počet alel v lokuse
21	15	19	1,27
22	15	21	1,40
23	15	19	1,27
27	15	20	1,33
<b>Priemer</b>			<b>1,32</b>

Tab. 34 Hodnotenie polymorfizmu 15 enzýmových lokusov krajových populácií 21, 22, 23 a 27

Populácia	Celkový počet analalyz. lokusov	Počet odlišných alel	Priemerný polymorfizmus	Polymorfizmus (%)
21	15	19	0,789	78,9
22	15	21	0,714	71,4
23	15	19	0,789	78,9
27	15	20	0,750	75,0
<b>Priemer</b>			<b>0,761</b>	<b>76,1</b>

### 3.5 VÝPOČET HETEROZYGOTNÉHO STAVU POPULÁCIE

Podľa Ayala a Kigera (1980) heterozygotnosť vyjadruje pravdepodobnosť, že dve alely dôležitého náhodne vybraného lokusu z populácie sa odlišujú formou. Určenie heterozygotnosti (**H**) sa týka iba enzýmov s kodominantným prejavom, a teda nedoceňuje heterozygotnosť, pretože niektoré enzýmy môžu mať iný spôsob dedičnosti.

**Príklad:** Z hodnôt uvedených v Tab. 28 pre kraiovú populáciu 21 vypočítajte pre každý izoenzymový lokus heterozygotnosť (**H**).

**Správne riešenie je uvedené v Tab. 35:**

Tab. 35 Hodnotenie heterozygotnosti enzýmových lokusov kraiovej populácie 21

Enzymový Lokus	Počet heterozygotných jedincov	Celkový počet analyzovaných jedincov populácie	Heterozygotnosť (H)
<i>Acp1</i>	10	20	0,50
<i>Adh1</i>	0	20	0,00
<i>Idh1</i>	0	20	0,00
<i>Idh2</i>	3	20	0,15
<i>Mdh1</i>	0	20	0,00
<i>Mdh2</i>	0	20	0,00
<i>Mdh3</i>	0	20	0,00
<i>Mdh4</i>	0	20	0,00
<i>Mdh5</i>	0	20	0,00
<i>Mmm</i>	0	20	0,00
<i>Pgi1</i>	0	20	0,00
<i>Pgd1</i>	2	20	0,10
<i>Pgd2</i>	0	20	0,00
<i>Pgm1</i>	0	20	0,00
<i>Pgm2</i>	0	20	0,00

Priemerná heterozygotnosť kraiovej populácie kukurice satej **H = 5 %**.

V prípadoch, kedy náhodné kríženie nie je možné, vypočítava sa predpokladaná (očkávaná) heterozygotnosť ( $H_e$ ).

**Príklad:** V Tab. 36 sú uvedené údaje a vypočítané hodnoty pre vybrané lokusy v analyzovanej populácii sóje. Rovnica pre výpočet  $H_e$  je:  $H_e = 1 - \sum f_i^2$ . Napr. výpočet pre *Idh1* je:

$$H_e = 1 - (f_1^2 + f_2^2) = 1 - (0,723^2 + 0,276^2) = 0,401$$

**Správne riešenie je uvedené v Tab. 36:**

Tab. 36 Určenie predpokladanej heterozygotnosti pre päť enzýmových lokusov populácie sóje (Acquaah 1992)

Lokus	Frekvencia alely		$H_e$
	F (rýchla alela) = ( $f_1$ )	S (pomalá alela) = ( $f_2$ )	
<i>Idh1</i>	0,723	0,276	0,401
<i>Idh2</i>	0,533	0,466	0,499
<i>Aco4</i>	0,564	0,435	0,493
<i>Pgm1</i>	0,253	0,746	0,379
<i>Sod1</i>	0,923	0,076	0,142
<b>Priemer</b>			<b>0,382</b>

Vysvetlivky: *Aco4* = lokus aconitázy 4, *Sod1* = lokus superoxiddismutázy 1

### 3.6 VÝPOČET PERCENTA POLYMORFNÝCH LOKUSOV V POPULÁCI

Všeobecne sa uvádza, že lokus, ktorý má najčastejšie vyskytujúcu sa alelu s frekvenciou menšou ako 0,99 sa považuje za polymorfný. Percentuálne vyjadrenie polymorfných lokusov je veľmi hrubé stanovenie úrovne genetickej diverzity, pretože zahŕňa dva základné pojmy diverzity (vzácnosť alel a vyváženosť). Aj v týchto výpočtoch ich efektívnosť je ovplyvnená veľkosťou vzorky a počtom druhov enzýmov, ktoré výskumník zahrnie do výskumu.

### 3.7 SEGREGÁCIA (ŠTIEPENIE) V LOKUSE

Ako príklad môže slúžiť výsledok kríženia repy cukrovej, ktoré viedlo k  $F_2$  populácii uvedenej v Tab. 37. Analyzovaný bol lokus *Idh1* na štiepny pomer (Mendelov štiepny pomer

1:2:1), a teda na kodominantný spôsob prejavu dedičnosti. Zistený štiepny pomer podľa uvedených výsledkov sa preukazne neodlišoval od predpokladaného pomeru 1:2:1. Dedičnosť alel v lokuse *Idh1* je teda kodominantná.

Tab. 37 Analýza segregácie v lokuse *Idh1* pre repu cukrovú

Križenie		Genotypy križenia			n	$\chi^2$	P
		<i>Idh1:a/Idh1:a</i>	<i>Idh1:a/Idh1:b</i>	<i>Idh1:b/Idh1:b</i>			
138D	x AP-1	26	56	22	104	0,923	0,630

*Idh1:a* x *Idh1:b* = genotyp križenia  
*Idh1:a*      *Idh1:b*

**LEGENDA:** n – počet analyzovaných jedincov (počet prípadov), P – preukaznosť,  $\chi^2$  – index rozptylu

### 3.8 ANALÝZA VÄZBY

V mnohých prípadoch je potrebné určiť väzbový vzťah medzi študovanými enzýmovými lokusmi. V literatúre sú často riešené väzby medzi enzýmovými lokusmi a sledovanými kvantitatívnymi znakmi. Mapovanie kvantitatívnych znakov vyžaduje najdenie génov – markerov viazaných na tieto znaky. Záujem využívať izoenzýmové markery na mapovanie lokusov kvantitatívnych znakov vedie k detekcii väzby medzi izoenzýmovými lokusmi a lokusmi kvantitatívnych znakov.

### 3.9 URČENIE GENETICKEJ REKOMBINÁCIE

Na určenie genetickej rekombinácie Allard (1956) vytvoril rovnicu, ktorá by uľahčila stanovenie rekombinácií prostredníctvom metódy maximálnej pravdepodobnosti. Na určenie rekombinácie boli vyvinuté programy pre počítače a iné analýzy segregácie.

### 3.10 URČENIE GENETICKEJ DIVERGENCIE POPULÁCIÍ

Genetická vzdialenosť medzi populáciami sa môže vypočítať rôznymi spôsobmi.

#### 3.10.1 Rogersova vzdialenosť

Rogersovou vzdialenosťou ( $\mathbf{R}$ ) sa meria biologická vzdialenosť medzi oddelenými skupinami.  $\mathbf{R} = 0$  je, ak dve populácie sú geneticky identické;  $\mathbf{R} = 1$ , ak populácie sú viazané na odlišné alely (Rogers 1972). Niektorí by mohli počítať  $\mathbf{R}$  pre väčší počet lokusov aj prostredníctvom jednoduchých výpočtov aritmetických priemerov v každom lokuse.

#### 3.10.2 Mahalanobisova $\mathbf{D}^2$ štatistická metóda

Používa sa na výpočet biologickej vzdialenosti medzi skupinami. Mahalanobis (1936) túto metódu použil v spojitosti s kvantitatívnymi morfológickými znakmi. Principiálne  $\mathbf{D}^2$  výpočet je podobný s výpočtom Rogersovej vzdialenosti, ale s použitím údajov frekvencie alel.

#### 3.10.3 Neiova štatistická metóda

Nei (1972, 1973) vyvinul najčastejšie používanú štatistickú metódu určenia genetickej diverzity populácií. Táto štatistika genetickej diverzity umožňuje rozdelenie variácie vo vnútri aj medzi odlišnými populáciami. Metóda umožňuje stanoviť celkovú genetickú diverzitu – genetickú diverzitu spôsobenú variabilitou medzi dvoma a viacerými populáciami – a priemernú genetickú vzdialenosť medzi populáciami. Základom určenia genetickej identity je pravdepodobnosť, že dve alely vybrané pri porovnaní populácií sú tie isté. Táto pravdepodobnosť je funkciou frekvencie alel v pozorovaných populáciách. Ak dve populácie nemajú spoločnú žiadnu alelu ich genetická identita je 0,0; ak majú tie isté alely s tou istou frekvenciou, hodnota ich identity je 1,0.

#### 3.10.4 Wrightova štatistická metóda

Wright (1951) vyvinul štatistiku ( $\mathbf{F}$ ) na meranie odchýlky od Hardy – Weinbergovho výpočtu. Hodnota  $\mathbf{F}$  blízka  $-1$  (podľa tejto štatistiky) znamená, že prevládajú heterozygoti,

zatiaľ čo hodnota blízka **0** znamená, že populácia je v Hardy – Weinbergovej rovnováhe. Zistenie hodnoty **F** blízkej **1** znamená, že populácia je viac inbredná.

### 3.10.5 Iné štatistické výpočty

V počiatkoch štúdia polymorfizmu enzýmov práce boli úplne kvalitatívneho a opisného zamerania. Posledných dvadsať rokov výskumu polymorfizmu enzýmov však poukazuje na štatistickú analýzu polymorfizmu enzýmov pomerne rozsiahlych súborov populácií, respektíve celých genofondov hlavne hospodársky významných plodín. V zahraničných vedeckých prácach sú použité aj iné menej časté štatistické prístupy vyhodnocovania analýz polymorfizmu enzýmov, čo tiež prispieva k poznaniu rozsahu celkovej diverzity zárodočnej plazmy jednotlivých plodín. Všetky tieto štatistické výpočty prispievajú k obohateniu a úspešnosti šľachtenia.

## 3.11 STANOVENIE VÄZBY MEDZI LOKUSMI

V Tab. 38 sú uvedené štiepne pomery dihybridného kríženia alel nezávislých lokusov *Idh1* a *Pgm1*.

Tab. 38 Tabuľka štiepných pomerov lokusov *Idh1* a *Pgm1* dihybridného kríženia repy Cukrovej

	<i>Idh1: a/</i> <i>Idh1: a</i>	<i>Idh1: a/</i> <i>Idh1: b</i>	<i>Idh1: b/</i> <i>Idh1: b</i>
<i>Pgm1: a</i> ----- <i>Pgm1: a</i>	5	12	6
<i>Pgm1: a</i> ----- <i>Pgm1: b</i>	14	26	11
<i>Pgm1: b</i> ----- <i>Pgm1: b</i>	6	15	4

$X^2$  (Chi<sup>2</sup>) – (df = 4) = 0,071, P = 0,898, r = 0,468 ± 0,049.

## **4 NIEKTORÉ PRÍKLADY VYUŽITIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV V BIOLÓGII A V PRAXI**

V predošlých kapitolách sú uvedené metodologické postupy analýzy polymorfizmu tých enzýmov, ktoré sa najčastejšie analyzujú v súvislosti s danými hospodársky významnými druhmi rastlín. Metodologické postupy sú štandardizované, určené a používané v rutinnom testovaní uvedených plodín. To však neznamená, že nejestvujú aj práce s viac alebo menej odlišnými metodológiami analyzujúce polymorfizmus aj iných druhov enzýmov. Veľmi dôležitú úlohu pri výbere enzýmov pre analýzu ich polymorfizmu zohráva zameranie výskumu. Veľmi dobrým príkladom sú práce riešiace vplyv stresových faktorov na polymorfizmus enzýmov, kedy sú uprednostňované enzýmy, ktoré majú vplyv na znižovanie aktivity reaktívnych oxidačných skupín alebo radikálov, ktoré sú pre živý organizmus veľmi nebezpečné. Je prakticky nemožné sa venovať všetkým publikovaným námetom praktického využitia polymorfizmu enzýmov v rovine základného a aplikovaného výskumu. V tejto časti učebných textov budú uvedené iba niektoré a najčastejšie príklady využívania polymorfizmu enzýmov v praxi. To isté platí aj pre kapitoly riešiace vyhodnocovanie a štatistické výpočty súvisiace s analýzami polymorfizmu enzýmov. Je však dôležité uviesť, že i napriek možnému matematickému vyhodnocovaniu výsledkov analýz je mnoho publikovaných prác zameraných iba na porovnanie získaných izozymogramov študovaných variantov.

### **4.1 VYUŽITIE ANALÝZ POLYMORFIZMU ENZÝMOV AKO GENETICKÝCH MARKEROV**

Analýzou uplynulých päťdesiatich rokov výskumu polymorfizmu enzýmov jednoznačne vyplýva, že jeho štúdium sa dotýkalo všetkých skupín živých systémov, schopných ich syntézy. V prvých dvoch až troch desaťročiach v biologickom výskume dôležitú úlohu zohrávali práce zamerané na štúdium výskytu izoforiem až na subbunkovej úrovni. Samozrejme intenzívne na úrovni morfológie rastlín (histológia a organológia) bol študovaný výskyt izoenzýmov v jednotlivých pletivách a orgánoch. Pre praktické ciele bolo dôležité poznať interogánovú a na úrovni organizmu a populácie rastlinných organizmov vnútrodruhovou a medzidruhovou variabilitu. Toto obdobie bolo zaujímavé aj z hľadiska molekulárno–genetického výskumu. Mnohé vedecké a výskumné tímy riešili spôsob dedenia, a teda expresie polymorfizmu enzýmov jednotlivých rastlinných druhov. Výskum sa zamerával aj na poznanie polymorfných lokusov a ich miesta na chromozómových mapách kľúčových



plodín. Molekulárno-biochemický výskum riešil spolu s genetickým výskumom molekulovú štruktúru izoforiem (kvartérna štruktúra apoenzýmovej časti enzýmu) jednotlivých druhov enzýmov, bez čoho by nemohla existovať genetická interpretácia polymorfizmu. Boli študované a popísané aj intra- a interlokusové interakcie, ktoré sa uplatňovali pri syntéze izoforiem. Táto perióda vo výskume polymorfizmu enzýmov je charakteristická poznávaním rozsahu jeho variability na úrovni globálnej zárodočnej plazmy konkrétnych rastlinných druhov.

Na základe poznania dostatočného množstva informácií o polymorfizme enzýmov mohlo dôjsť k štúdiu vnútrodruhových a medzidruhových príbuzenských vzťahov a k jeho bezprostrednému využívaniu vo výrobných praxi.

Všetky tieto poznatky o polymorfizme enzýmov smerovali k ich praktickému využívaniu. Prvá práca, ktorá uvádza možnosť praktického využitia polymorfizmu enzýmov v šľachtení bola publikovaná pomerne skoro. Schwartz (1960) poukazuje na možnosť využitia polymorfizmu enzýmov v šľachtení kukurice a navrhuje riešenie kontroly kríženia kukurice využitím izoenzýmov ako markerov genotypovej identity.

I keď enzýmová multiplicita bola pozorovaná a popísaná dávnejšie, jej biologická interpretácia a praktická aplikácia nasledovali podstatne neskôr. Na základe výsledkov vedeckých prác z 2. polovice 60-tych a 70-tych rokov mohli vzniknúť kompletne metodologické postupy umožňujúce separáciu izoenzýmov dostatočného súboru enzýmov pre aplikáciu výsledkov analýz až na úroveň výroby najvýznamnejších hospodárskych druhov.

#### 4.1.1 Izoenzýmy ako genetické markery – genetika, ekonomika, praktickosť, efektívnosť a nevýhody

Význam využívania izoenzýmov ako genetických markerov spočíva v prednostiach oproti tradičným spôsobom adekvátneho výskumu. Z pohľadu genetického je veľmi dôležité, že prevažná väčšina génov, ktoré sú zodpovedné za ich prejav, má **kodominantnú** expresiu. Výhodou kodominantného prejavu génu je možnosť výskumníkom detekovať heterozygotné genotypy, pretože pri kodominantnej expresii génov nedochádza k maskovaniu prejavu žiadnej alely (prejaví sa otcovská i materská alela rovnocenne). Tradičný spôsob identifikácie heterozygota spočíva v hodnotení fenotypových znakov dedených z homozygotných rodičov. Takéto hodnotenie nie je vždy jednoduché a hlavne jednoznačné, pretože hodnotené znaky sú väčšinou pod vplyvom dominantnej alebo recesívnej expresii. Dôležitou vlastnosťou je **expresivita génov** zodpovedných za syntézu izoenzýmov. Ak používaný znak má byť

efektívne používaný ako genetický marker musí mať **vysokú dedivosť**. Mnohé znaky používané pri hodnotení identity genotypu, ako sú mnohé kvantitatívne a kvalitatívne morfológické znaky, túto podmienku často nespĺňajú. Ich využitie je často zdĺhavé a vyžaduje značnú pozornosť hodnotiteľa. Molekulárne markery (v tomto prípade izoenzýmy) sú úplne dedivé, a to umožňuje predísť chybám pri identifikácii hodnoteného genotypu.

**Ekonomický** pohľad na využívanie izoenzýmov a morfológických znakov ako markerov závisí od viacerých faktorov. Pri využívaní izoenzýmov je potrebné biologické laboratórium, ktoré bežne má väčšinu vybavenia, ktoré je potrebné pre ich analýzu, okrem stabilizátorov elektrického prúdu, elektroforetických jednotiek a potrebných chemikálií. Na uskutočnenie a vyhodnotenie analýz sú potrební aspoň dvaja kvalifikovaní výskumní pracovníci.

**Spol'ahlivosť** markerov je tiež veľmi dôležitá. Pri využívaní izoenzýmov ako markerov je veľmi významná rozlišovacia schopnosť izoforiem na izozymograme. Podstata spol'ahlivosti interpretácie izozymogramu spočíva na kvalite separácie izoforiem na nosiči. Kvalitne uskutočnená analýza umožňuje rozlíšiť izoformy, ktoré sa líšia od seba odlišnosťou pohybu na separačnom médiu iba jeden milimeter. Analýzy polymorfizmu enzýmov predchádzajú mnohým vplyvom prostredia, ktoré často spôsobujú chyby v identifikácii a klasifikácii použitím klasických morfológických markerov.

**Praktickosť** izoenzýmov ako markerov spočíva na **univerzálnosti, flexibilita a ochrane autorských práv šľachtiteľa**. Univerzálnosť alebo pružnosť analýz spočíva na použití temer všetkých odobratých pletív. Najčastejšie sa odoberajú k analýzám konvenčne používané pletivá (list, koreň, semeno, kalus atď.). Flexibilita alebo pružnosť analýz spočíva v práci v laboratóriu, a teda nezávislosti od ročného obdobia – sezóny. Konvenčne používané morfológické markery vyžadujú pole alebo skleníky, pestovanie až do určitej fázy ontogenézy, často celú vegetačnú dobu a manuálnu prácu (príprava pôdy, hnojenie, sejba alebo výsadba, ošetrovanie porastu a zber). Výsledky analýz polymorfizmu enzýmov sú často známe v priebehu týždňa. Šľachtením šľachtiteľ vnáša do novej odrody nové markery, ktoré umožňujú jej identifikáciu. Izoenzýmy sú tiež spôsobom na skvalitnenie garancie a potvrdenie odrodovej odlišnosti od iných odrôd. Preto sa využívajú okrem štandardných markerov aj izoenzýmy pri ich právnej ochrane, a teda aj pri ochrane autorských práv. Detailnejšie informácie sú uvedené v prácach Juráček a Múdry (1994) a Múdry a Juráček (1998b).

**Efektívnosť** spočíva v tom, že odoberanie vzorky často nepoškodzuje celú rastlinu pretože odobraná vzorka na analýzu je malá (do 200 – 300 mg). Rastliny, z ktorých boli odobrané vzorky sa ďalej môžu pestovať a využiť na iné výskumné ciele. Významným kritériom efektívnosti metódy je aj čas, priestor, manuálna a personálna náročnosť získania

požadovaných výsledkov. Už z hora uvedeného vyplýva, že rýchly a presný výber požadovaného genotypu z populácie šetrí často roky šľachtiteľského úsilia a vedie ku skvalitneniu semenárskej práce. Smith a Wych (1986) svojou experimentálnou prácou potvrdili, že metóda elektroforézy izoenzýmov bola pri stanovovaní samoopelenia šesťkrát presnejšia ako určovanie samoopelenia vegetačnou metódou v štádiu 6. - 7. vyvinutého listu a v čase kvitnutia metlín a dvakrát presnejšia, ako v čase dospelosti. Ako podstatne presnejšiu na stanovenie miery biologického znečistenia kultivaru kukurice potvrdili metódu analýzy izoenzýmových spektier oproti vegetačnej metóde tiež Orman *et al.* (1991).

**Nevýhodou** použitia analýz polymorfizmu enzýmov môže byť limitovaný počet biochemických markerov. Ešte aj v súčasnosti je nedostatok štandardizovaných metodologických postupov analýzy polymorfizmu enzýmov, ktoré by boli využiteľné a záväzné pri testovaní genotypov pre zahraničné laboratóriá. Pre mnohé druhy rastlín by bolo žiaduce rozšíriť analýzy o analýzy polymorfizmu väčšieho počtu druhov enzýmov. Niektorí vedci riešia tento nedostatok spojením analýz polymorfizmu enzýmov s inými molekulárnymi technikami umožňujúcimi štúdium polymorfizmu na úrovni porovnávania analogických segmentov DNA. Tieto techniky majú väčšiu šancu na detekciu polymorfných lokusov v populácii organizmov. Určitou nevýhodou je aj skutočnosť, že niektoré chemikálie používané pri analýzach polymorfizmu enzýmov sú zdravie ohrozujúce pri ich neodbornom používaní. Je preto nevyhnutné dodržiavať všetky bezpečnostné predpisy týkajúce sa práce s chemikáliami.

## **4.2 NIEKTORÉ PRÍKLADY VYUŽITIA IZOENZÝMOV VO VÝSKUME RASTLÍN**

Poskytnúť zoznam všetkých námetov, ktoré sa realizovali vo výskume polymorfizmu enzýmov počas histórie je prakticky nemožné. Výskum bol vždy spojený s nápaditosťou a invenčnosťou výskumníkov. Všetky výskumné práce však stavajú hlavne na porovnávaní vzoriek odlišných genotypov s cieľom nájsť podobnosti a odlišnosti v polymorfizme analyzovaných enzýmov. Acquaaah (1992) uvádza nasmerovanie výskumu polymorfizmu enzýmov v tomto duchu do troch oblastí výskumu:

1. Práce zamerané na progresívne zmeny v genetickej štruktúre alebo úrovniach prejavu génov.

2. Práce študujúce divergenciu analyzovaných subjektov na základe ich podobnosti a odlišnosti využitím analýzy zhlukov.
3. Práce študujúce import a export génov z jedného zdroja do druhého.

Systémy izoenzýmov, ktoré sú veľmi dobre definované možno využiť v rôznych smeroch, ako sú:

1. Výskum mechanizmov vývojových procesov charakterizovaných odlišnosťami prejavov génov.
2. Výskum zahŕňajúci indukované odpovede vyvolané pôsobením odlišných biotických a abiotických faktorov prostredia.
3. Systematický výskum.
4. Výskum polymorfizmu enzýmov zameraný na kontrolu kvality práce a odhaľovanie trestnej činnosti.
5. Štúdie štruktúry a dynamiky populácií.
6. Nasledujúce prenosy génov.

V súčasnosti možno výskumné práce týkajúce sa polymorfizmu enzýmov za celú históriu ich výskumu zaradiť hlavne do nasledovných oblastí, o výsledkoch ktorých pojednávajú celé monografie. Sú to nasledovné oblasti:

- izoenzýmy v evolúcii rastlín,
- izoenzýmy v populačnej genetike,
- izoenzýmy a systematika organizmov,
- izoenzýmy v pletivových kultúrach,
- izoenzýmy vo výrobe osív,
- izoenzýmy markery lokusov kvantitatívnych znakov,
- izoenzýmy vo vzťahu k fytopatogénom.

#### 4.2.1 Izoenzýmy v populačnej genetike

Medzi kľúčové práce, ktoré nasledovali v 80-tych rokoch, patria tie, ktoré na veľkých súborech genetických zdrojov riešili polymorfizmus enzýmov a vzájomné príbuzenské vzťahy medzi ekotypmi. Štúdium príbuzenských vzťahov na úrovni populácie konkrétneho druhu pozostáva z uskutočnených analýz, následného vyhodnotenia izozymogramov, podania genetickej interpretácie analyzovaných lokusov a samotného

Populácia	Č.	0	5	10	15	20	25
Pezinok	8	-+					
Kazimír	30	-+					
Kazimír	31	-+					
Pezinok	16	-+++					
Kazimír	46	-+ +-----+					
Kazimír	33	-+++	I				
Kazimír	34	-+ I	I				
Pezinok	9	-+++	++				
Kazimír	36	-+	I I				
Pezinok	6	-+-----	I I				
Pezinok	7	-+ I	I I				
Pezinok	2	-+++ +-----	I				
Pezinok	3	-+ ++	I				
Pezinok	5	-+++	I I				
Pezinok	11	-+ I	I				
Pezinok	1	-+++	I I				
Pezinok	4	-+ I I	+-----+				
Pezinok	18	-+ ++	I	I			
Pezinok	19	-+++	I	I			
Pezinok	13	-+ I	I	I			
Pezinok	17	----	I	I			
Kazimír	39	-+	I	I			
Kazimír	40	-+-----	I	I			
M.Lieskové	25	-+ I	I	I			
M.Lieskové	26	-+ I	I	I			
M.Lieskové	23	-+ +-----	I				
M.Lieskové	27	-+ I		I			
M.Lieskové	21	-+++	I	I			
Pezinok	15	-+ ++		I			
Pezinok	10	-+ I		I			
M.Lieskové	24	-+++	+-----+				
M.Lieskové	20	-+		I			I
M.Lieskové	22	-+		I			I
Pezinok	14	-+		I			I
Malá Třňa	58	-+++		I			I
Malá Třňa	62	-+ ++		I			I
Pezinok	12	-+++	I	I			I
Malá Třňa	63	-+ I		I			I
Malá Třňa	50	-+ +-----		I			I
Malá Třňa	52	-+++	I	I			I
Kazimír	48	-+ I I	I	I			I
Malá Třňa	56	-+ I I	I	I			I
Kazimír	44	-+ ++	I	I			I
Kazimír	41	-+ I	I	I			I
Kazimír	45	-+++	I	I			I
Kazimír	32	-+ I	+-----				I
M.Lieskové	29	----	I				I
Malá Třňa	59	-+	I				I
Malá Třňa	61	-+++	I				I
Kazimír	42	-+ +-----	I				I
Kazimír	47	-+ I I	I	I			I
Malá Třňa	54	-+++	I I	I			I
Kazimír	43	-+ I	I	I			I
Malá Třňa	55	-+ +-----		I			I
Malá Třňa	53	-+ I		I			I
Malá Třňa	60	-+-----	I				I
Malá Třňa	49	-+ I I		I			I
Malá Třňa	57	-+ ++		I			I
Kazimír	38	-+ I		I			I
Malá Třňa	51	-+++	I				I
M.Lieskové	28	-+ ++		I			I
Kazimír	37	-+ I		I			I
Kazimír	35	----		I			I
Breznica	66	-+		I			I
Breznica	72	-+++		I			I
Breznica	68	-+ I		I			I
Breznica	70	-+ +-----		I			I
Malá Třňa	64	-+++	I				I
Malá Třňa	65	-+ I I		I			I
Breznica	67	-+ I	+-----				I
Breznica	80	-+++	I				I
Breznica	71	-+	I				I
Breznica	75	-+-----	I				I
Breznica	76	-+ ++					I
Breznica	69	-+++	I				I
Breznica	73	-+ ++					I
Breznica	78	-+ I					I
Breznica	79	-+++					I
Breznica	74	-+					I
Breznica	77	-+					I

Obr. 28 Zhlukovanie a relatívna genetická vzdialenosť na báze polymorfizmu enzýmov krajových populácií kukurice (Pezinok, Moravské Lieskové, Kazimír, Malá Třňa, Breznice) – Múdry a Kraic (2007)

grafického vyjadrenia príbuzenských vzťahov. V tomto smere najčastejšie riešenou plodinou bola kukurica siata, pretože bola z pohľadu polymorfizmu enzýmov najlepšie preštudovaná a vo vedeckej literatúre opísaná kvartérna štruktúra izoenzýmov, prítomnosť izoforiem v pletivách jej orgánov, genetická interpretácia polymorfizmu, ktorá zahŕňa poznanie polymorfných lokusov s rozsahom ich diverzity (prítomnosť možných alel), umiestnenie alel na chromozómoch, poznanie inter- a intragékových interakcií a artefaktových škvŕn (pásov). Pri vyhodnocovaní príbuzenských vzťahov sa používa analýza zhlukov a na grafické vyjadrenie príbuzenských vzťahov sa využívajú dendrogramy. Analýza príbuzenských vzťahov krajových populácií českej a slovenskej proveniencie je publikovaná v práci Múdry a Kraic (2007). Príklad dendrogramu je na Obr. 28.

#### 4.2.2 Izoenzýmy v genetike a v šľachtení

Najintenzívnejšie sa prakticky využíva polymorfizmus enzýmov v genetike a v šľachtení. Možnosť a rozsah jeho využitia sú do veľkej miery závislé od rozsahu a rozmiestnenia diverzity enzýmov v analyzovaných vzorkách. Sem možno zahrnúť výskumy súvisiace s mapovaním párov génov prostredníctvom izoenzýmov, pričom ide o hľadanie väzby medzi aspoň dvomi párami lokusov na tom istom úseku chromozómu (jeden lokus je enzýmový). Z pohľadu šľachtenia je veľmi dôležité nájsť silnú väzbu izoenzýmových lokusov (markery) s konkrétnymi sledovanými znakmi šľachtením.

Poznanie rozsahu diverzity zárodočnej plazmy konkrétneho druhu pre polymorfizmus enzýmov našlo uplatnenie nielen pri mapovaní génov sledovaných znakov a ich sily väzby ale aj v kontrole ploidie, spätného kríženia a hodnotenia identity  $F_1$  hybridov. V šľachtení a v semenárskom priemysle sa najčastejšie polymorfizmus enzýmov využíva pri hodnotení identity konkrétnej odrody – línia, hybrid a populácia. Určenie a potvrdenie identity odrody má význam pri hodnotení kvality šľachtenia a semenárskej práce. Je potvrdením udržiavania si odrodových vlastností. Tieto analýzy sú dôležité a využívané aj v prípade potvrdenia alebo vyvrátenia trestnej činnosti v súvislosti s krádežami osív, poškodzovaním autorských a licenčných práv ale aj s násilnou trestnou činnosťou, kde rastlinný materiál je dôkazovým materiálom. Hodnotenie identity neznámej biologickej vzorky na báze analýzy polymorfizmu enzýmov je založený na porovnaní získaných izozymogramov so zymogramami deklarovaného genotypu uvedených v katalógu izozymogramov určených pre testovacie účely alebo porovnaním s izozymogramami originálnej vzorky deklarovaného genotypu. Hodnotenie identity a odrodovej čistoty osiva komponentov a finálu ( $F_1$  na úrovni

dvojlíniového hybridu Sc) je možné na základe zistenia nejednotnosti alelickej konštitúcie materského a otcovského komponenta, čo sa na zymograme prejaví počtom, poradím a niekedy aj intenzitou sfarbenia škvŕn (pásov aktivity izoenzýmov). Použitím jednoduchého modelu podľa Arusa (1983), v ktorom **O** znamená otcovský líniový materiál, **M** materský komponent, **F<sub>1</sub>** hybrid (**Sc**) a dostatočne veľké vzorky zŕn oboch rodičovských komponentov nesú odlišnú alelu v lokuse **A** (**A1** alebo **A2**), potom platí:

$$\mathbf{O (A1A1)} \times \mathbf{M (A2A2)} = \mathbf{F_1 (A1A2)}.$$

Hybrid bude mať vždy fenotyp (izozymogram) **A1A2**. Analyzované zrná vo vzorke s iným fenotypovým prejavom budú biologickými nečistotami. Pri rozšírení schémy o ďalšie možné alely v lokuse **A** možno demonštrovať možné nedostatky v šľachtiteľskej a osivárskej práci, a to na testovanej vzorke z osiva finálu známeho hybridu. Podľa katalógu izozymogramov očakávame fenotyp finálu **A1A2** podľa schémy:

$$\begin{array}{ccc} \mathbf{O} & \times & \mathbf{M} & = & \mathbf{F_1} \\ \mathbf{A1A1} & & \mathbf{A2A2} & & \mathbf{A1A2} \\ \text{(stály fenotyp)} & & \text{(stály fenotyp)} & & \text{(stály fenotyp)}. \end{array}$$

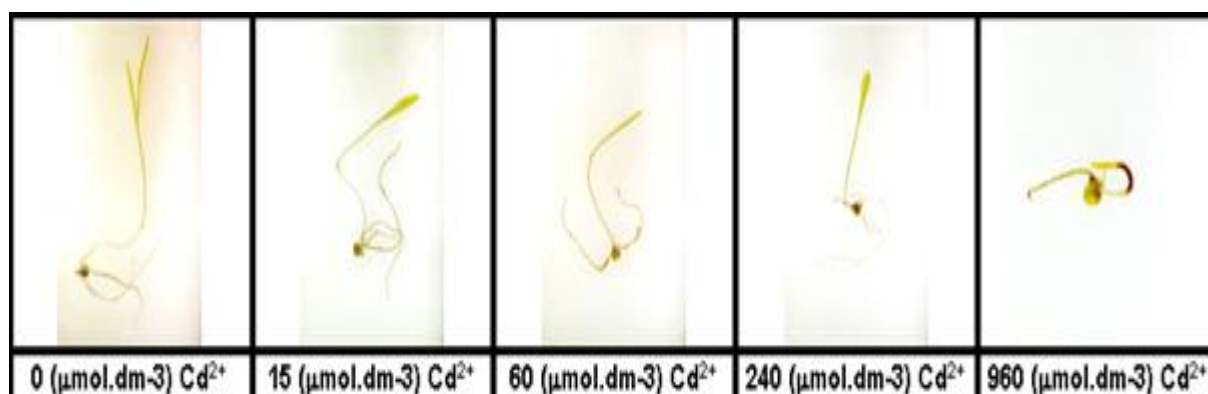
Analyzovaná vzorka však môže mať iný fenotyp, čo znamená, že ide o konkrétny nedostatok v osivárskej práci. Napríklad veľmi zjednodušene, ak je fenotyp **F<sub>1</sub>**:

- A1A1** - otcovský komponent - pozbierané šúľky otcovského komponenta,
- A2A2** - materský komponent - samoopelenie materského komponenta,
- A1A2** - **F<sub>1</sub>** finál – dvojlíniový hybrid - správny a očakávaný fenotyp,
- A1A3** - zámena materského komponenta - vysiatie iného materského komponenta,
- A4A2** - nežiaduce opelenie (cudzie opelenie) - nedodržanie izolačnej vzdialenosti alebo zámena otcovského komponenta ešte pred sejbou,
- A4A3** - úplne nový genotyp (žiadny z rodičovských komponentov) - oba komponenty zamenené pred sejbou (Múdry a Juráček 1994).

#### 4.2.3 Izoenzýmy v ekofyziologickom výskume

Pomerne veľmi veľký súbor prác predstavujú tie, ktoré riešia vzťah živého systému k faktorom prostredia prostredníctvom polymorfizmu enzýmov. Vzhľadom na skutočnosť, že syntéza „pravých izoenzýmov“ je geneticky podmienená a ich variabilita je aj výsledkom pôsobenia faktorov prostredia, riešenie polymorfizmu smerovalo a aj pretrváva vo vzťahu k poznaniu významu jednotlivých izoform pri ich pôsobení. Živé systémy neustále bojujú

s entropiou, aby si zachovali integritu a optimálnu genetickú, biochemickú, fyziologickú a psychosociálnu aktivitu. Faktory, ktoré vplývajú na živé organizmy možno rozdeliť na základe rôznych kritérií. V rámci rastlinnej ríše sa najčastejšie podľa povahy rozdeľujú na biotické a abiotické, podľa miesta pôsobenia vonkajšie a vnútorné. Významné je štúdium polymorfizmu enzýmov a ich úloha v stratégii prekonávania stresových faktorov. Bolo a neustále je publikovaných množstvo vedeckých prác, ktoré riešia vzťah polymorfizmu enzýmov k faktorom, ako je pôsobenie vysokej a nízkej teploty, nízkej a vysokej intenzity slnečného žiarenia, dĺžky fotoperiód, radioaktívneho žiarenia, nedostatku a nadbytku vody, nedostatku kyslíka v pôde, k zasoleniu pôdy, k obsahu jednotlivých ťažkých kovov v živnom substráte a v oblasti biotických faktorov existuje množstvo prác študujúcich a dokumentujúcich vzťah polymorfizmu enzýmov hostiteľskej rastliny ku konkrétnemu fytopatogénu. Práce sa snažia vysvetliť strategickú úlohu izoenzýmov v prekonávaní pôsobenia nepriaznivých faktorov prostredia. Prístup riešenia problematiky je vo väčšine prác realizovaný uskutočnením analýz polymorfizmu enzýmov na experimentálnych a kontrolných vzorkách, pričom sa porovnávajú izozymogramy a určí sa prítomnosť alebo absencia konkrétnych izoforiem. Práce sú zvyčajne spojené so štúdiom vplyvu stres faktora na kvantitatívne a kvalitatívne parametre morfológických, produkčných, fyziologických a biochemických znakov. Ako príklad možno uviesť pôsobenie vplyvu koncentrácií iónov kadmia na rast a vývin klíčiacych semien kukurice v Hoaglandovom živnom médiu a polymorfizmus vybranej skupiny enzýmov (Obr. 29, Tab. 39). V tomto experimente morfológické a vývinové zmeny neboli spojené so zmenou kvalitatívneho zastúpenia izoforiem.



Obr. 29 Demonštrovanie vplyvu koncentrácií iónov kadmia v úplnom Hoaglandovom roztoku na rast a vývin klíčiacych rastlín kukurice kultivovaných štrnásť dní v termostate za konštantných podmienok (Múdry a Obert 2011)



Tab. 39 Polymorfizmus ACP, ADH, IDH, MDH, PGD, PGI a PGM genotypov a orgánov kukurice (*Zea mays* L.) pestovaných za odlišných koncentrácií kadmia

Genotyp	Dni klíčenia Koncentr. Orgán iónov Cd ( $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	Počet analyz. vzor.	Enzýmy Lokusy a alely															
			ACP <i>Acp1</i>	ADH <i>Adh1</i>	IDH <i>Idh1</i>	MDH 2 3 4 5			Mmm	PGD <i>Pgd1</i>	2	PGI <i>Pgi1</i>	PGM <i>Pgm1</i>	2				
<b>3098 (♀)</b>	<b>5 dní</b>																	
koleoptila	0	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koleoptila	15	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koleoptila	60	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koleoptila	240	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koleoptila	960	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
<b>3150 (♂)</b>	<b>5 dní</b>																	
koleoptila	0	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koleoptila	15	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koleoptila	60	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koleoptila	240	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koleoptila	960	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
<b>Sc 3098 x 3150</b>	<b>5 dní</b>																	
koleoptila	0	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koleoptila	15	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koleoptila	60	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koleoptila	240	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koleoptila	960	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
<b>3098 (♀)</b>	<b>14 dní</b>																	
leaf lamina	0	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
leaf lamina	15	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
leaf lamina	60	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
leaf lamina	240	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
<b>3150 (♂)</b>	<b>14 dní</b>																	
list. čepel'	0	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
list. čepel'	15	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
list. čepel'	60	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
list. čepel'	240	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
<b>Sc 3098 x 3150</b>	<b>14 dní</b>																	
list. čepel'	0	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
list. čepel'	15	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
list. čepel'	60	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
list. čepel'	240	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
<b>3098 (♀)</b>	<b>14 dní</b>																	
koreň. syst.	0	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koreň. syst.	15	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koreň. syst.	60	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
koreň. syst.	240	1	2	4	4 6	6 3	16 12	12 12	M	3.8	5	4	9 4					
<b>3150 (♂)</b>	<b>14 dní</b>																	
koreň. syst.	0	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koreň. syst.	15	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koreň. syst.	60	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
koreň. syst.	240	1	4	4	4 4	6 3	16 12	12 12	M	2	5	4	9 4					
<b>Sc 3098 x 3150</b>	<b>14 dní</b>																	
koreň. syst.	0	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koreň. syst.	15	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koreň. syst.	60	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					
koreň. syst.	240	1	2/4	4	4 4/6	6 3	16 12	12 12	M	2/3.8	5	4	9 4					

V prácach tohto zamerania prevláda výskum polymorfizmu enzýmov s detoxikačnou a antioxidačnou aktivitou, ktoré majú schopnosť eliminovať biologicky škodlivé radikály intenzívnejšie vznikajúce v organizme za pôsobenia nepriaznivého faktora. Významné je aj štúdium evokovaných enzýmov, ktorých syntéza je naštartovaná až pôsobením konkrétneho faktora v prostredí. Najčastejšie sa sústreďuje pozornosť na výskum polymorfizmu peroxidázy (PRX), superoxiddismutázy (SOD), esterázy (EST), katalázy (CAT), glutamátaloacetáttransaminázy (GOT), diaforázy (DIA),  $\beta$ -glukozidázy (GLU), ADH (alkoholdehydrogenázy) a i.

#### 4.2.4 Izoenzýmy v biotechnologickom výskume

Štúdium polymorfizmu enzýmov zasahuje temer do všetkých biologických disciplín. I keď polymorfizmus enzýmov nespadá bezprostredne do predmetu biotechnológie, z vedeckej literatúry je evidentné, že jeho poznanie viedlo a vedie k jeho využitiu aj v biotechnológii. Experimentálny prístup k využitiu výsledkov analýz polymorfizmu v biotechnológii je väčšinou založený na poznaní rozsahu diverzity zárodočnej plazmy jednotlivých druhov organizmov od baktérií až po vyššie organizmy využiteľné v rôznych biotechnologických nasmerovaniach prostredníctvom mapovania ich polymorfných lokusov, určovania sily ich väzby na lokusy zodpovedné za prejav výnimočných morfológických, produkčných, fyziologických, genetických a biochemických znakov. Tieto poznatky možno následne využiť v rôznych biotechnologických odvetviach, v oblasti tvorby nových organizmov prostredníctvom explantátových kultúr až po techniky génových manipulácií. Ako príklad využitia polymorfizmu enzýmov možno uviesť jeho využitie pri určovaní identity dihaploidných jedincov vypestovaných z peľnicových kultúr. Pri expresii heterozygotného, diploidného a polymorfného enzýmového lokusu v prevažnej väčšine platí kodominancia. Pri analýze sa prejaví škvrna na zymograme zdedená z jedného rodičovského komponenta, ale aj škvrna zdedená z druhého rodičovského komponenta. Responzívny genotyp kukurice s heterozygotným lokusom bude tvoriť v peľniciach gaméty s jednou alelou, pretože gaméta má haploidnú konštitúciu. Z toho vyplýva, že pletivá, orgány i celé individuá dihaploidné budú pri analýzach mať len jednu škvrna, a to po jednom alebo druhom rodičovskom komponente krížením ktorých vznikol hybridný responzívny genotyp. V Tab. 40 sú uvedené výsledky dvoch responzívnych genotypov kukurice, a to sú A 18 a A19. Na základe heterozygotnej konštitúcie v dvoch lokusoch (*Idh1* a *Mdh2*) ide o hybridy. Biologický materiál získaný z ich dihaploidov, v týchto lokusoch musí byť haploidný, a teda v lokuse obsahovať jednu alebo

**Tab. 40 Izozymogramy dvoch genotypov kukurice (A 18 a A 19) a orgánov dihaploidných rastlín regenerovaných z peľnicových kultúr (Uváčková *et al.* 2008)**

Genotyp Orgán	Počet vzoriek	Analyzované lokusy																			
		Acp1	Adh1	Cat3	Dia1	Dia2	Glu1	Got1	Got2	Got3	Idh1	Idh2	Mdh1	Mdh2	Mdh3	Mdh4	Mdh5	Pgd1	Pgd2	Pgi1	
A 18																					
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	2	5	4
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	2	5	4
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	2	5	4
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	2	5	4
A 18																					
Kalus	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	-	6	6	3	16	12	12	2	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	-	6	6	3	16	12	12	2	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	-	6	6	3	16	12	12	2	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	-	6	6	6	16	12	12	2	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	-	6	6	3	16	12	12	2	5	4
A 18																					
List. čepeľ	1	2	4	+	8	4	6°	7°	-	4	4°	-	-	6	6	16	12	12	+	+	4
List. čepeľ	1	2	4	+	8	4	6°	7°	-	4	4°	-	-	6	6	16	12	12	+	+	4
A 18 koreň	1	2	4	+	8	4	6°	7°	-	-	-	-	-	6	6	16	12	12	+	+	4
A 19																					
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	3.8	5	4
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	3.8	5	4
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	3.8	5	4
Koleoptila	1	2	4	12	8	4	6	7	4	4	4	4/6	6	6	3/6	16	12	12	3.8	5	4
A 19																					
Kalus	1	2	4	12	8	4	6-7	4	4	4	4	-	-	6	6	16	12	12	3.8	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6-7	4	4	4	4	-	-	6	6	16	12	12	2	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6-7	4	4	4	4	-	-	6	3	16	12	12	2	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6-7	4	4	4	4	-	-	6	6	16	12	12	3.8	5	4
Kalus	1	2	4	12	8	4	6-7	4	4	4	4	-	-	6	3	16	12	12	2	5	4
A 19																					
List. čepeľ	1	2	4	+	8	4	6°-7°	-	4	4°	-	-	6	6	16	12	12	12	+	+	4
List. čepeľ	1	2	4	+	8	4	6°-7°	-	4	4°	-	-	6	6	16	12	12	12	+	+	4
A 19 koreň	1	2	4	+	8	4	6°-7°	-	-	-	-	-	6	6	16	12	12	12	+	+	4

druhú alelu. Lokus *Idh1* v dihaploidoch mal slabú expresiu, a tak škvrny boli ťažko identifikovateľné, ale v lokuse *Mdh2* bola potvrdená haploidná konštitúcia.

V týchto skriptách sú uvedené iba niektoré základné analytické, výpočtové a aplikačné prístupy využitia polymorfizmu enzýmov v základnom a alikovanom výskume. Pri riešení polymorfizmu enzýmov vo vzťahu k neuvádzaným rastlinným druhom a iným výskumným cieľom je potrebné siahnuť po monografiách uvádzaných v kapitole **5. Zoznam použitej literatúry**, alebo po aktuálnych vedeckých článkoch publikovaných vo vedeckých a odborných časopisoch.

## 5. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

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

**AHMAD, F. – GAUR, P.M. – SLINKARD, A.E. 1992.** Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. In *Theor. Appl. Genet.*, 1992, roč. 83, č. 5, s. 620-627.

**ALLARD, R.W. 1956.** Formulas and tables to facilitate the calculations of recombinations values in heredity. In *Hilgardia*, 1956, roč. 24, s. 235-278.

**ARUS, P. 1983.** Genetic purity of commercial seed lots. In: **TANKSLEY, S. D. - ORTON, T. J. (Eds.)**, (1983): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 516 s., ISBN 0-444-42226-9.

**AYALA, F.J. – KIGER, J.A. 1980.** *Gel electrophoresis*. In *Modern Genetics*, menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, California, 1980, 752 s.

**BioGEVES. 1998.** *Enzyme electrophoresis of sunflower*. France: Domaine du Magneraud, 17700 Surgères, France, s. 1-14.

**BOURGOIN - GRENÉCHE, M. - LALLEMAND, J. 1993:** *Electrophoresis and its application to the description of varieties. A presentation of the techniques used by GEVES*. France: GEVES – La Minière - F 78285 GUYANCOURT Cedex, 1993, 63 s.

**BRIM, CH.A. - USANIS, S.A. - TESTER, C.F. 1969.** Organ specificity and genotypic differences in isoperoxidases of soybeans. In *Crop Sci.*, 1969, roč. 9, č. 6, s. 843-845.

**BUTTERY, B.R. - BUZZELL, R.I. 1968.** Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. In *Crop Sci.*, roč. 8, č. 6, s. 727-735.

**BULIŇSKA - RADOMSKA, Z. 1996.** Genetic variation and population structure of three *Trifolium* species. In *J. Appl. Genet.*, 1996, roč. 37, č. 2, s. 153-160.

**BULIŇSKA - RADOMSKA, Z. 2000.** Enzyme polymorphism and adaptation in strawberry clover (*Trifolium fragiferum* L.). In *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, roĉ. 47, ĉ. 2, s. 197-205.

**CARDY, B.J. - BEVERSDORF, W.D. 1984.** Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. In *Seed Science and Technology*, 1984, roĉ. 12, ĉ. 3, s. 943-954.

**CARDY, B.J. - KANNENBERG, L.W. 1982.** Allozymic Variability among Maize Inbred Lines and Hybrids: Applications for Cultivar Identification. In *Crop Sci.*, 1982, roĉ. 22, ĉ. 5, s. 1016-1020.

**CARDY, B.J. - STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1980.** *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.)*. Institute of Statistics Mimeograph Series No. 1317, North Carolina State University, Raleigh, USA, 1980, 87 s.

**CARRERA, A.D. – PIZARRO, G. – POVERENE, M. – FEINGOLD, S. – LEÓN, A.J. – BERRY, S.T. 2002.** Variability among inbred lines and RFLP mapping of sunflower isoenzymes. In *Genetics and Molecular Biology*, 2002, roĉ. 25, ĉ. 1, s. 65-71.

**COLLINS, W.J. - ROSSITER, R.C. - HAYNES, Y. - BROWN, A.H.D. - MARSHALL, D.R. 1984.** Identification of subterranean clover cultivars and their genetic relationships by isozyme analysis. In *Aust. J. Agric. Res.*, 1984, roĉ. 35, ĉ. 3, s. 399-411.

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

**FEREIRA, R.R. – FORNAZIER, R.F. – VITÓRIA, A.P. – LEA, P.J. – AZEVEDO, R.A. 2002.** Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. In *Journal of Plant Nutrition*, 2002, roĉ. 25, ĉ. 2, s. 327-342.

**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, roĉ. 26, ĉ. 5, s. 917-921.

**FRIEDT 1995.** Recent progress and actual state of biotechnology for sunflower breeding. In The FAO European research network on sunflower, Bucharest 25-28 July 1995, s. 1-17.

**GAUR, P.M. - SLINKARD, A.E. 1990.** Inheritance and linkage of isozyme coding genes in chickpea. In *Journal of Heredity*, 1990, roč. 81, č. 6, s. 455-461.

**GAUR, P.M. - SLINKARD, A.E. 1991.** Duplication of the structural gene for the plastid-specific isozyme of aldolase in *Cicer*. In *Genome*, 1991, roč. 34, č. 1, s. 151-155.

**GOODMAN, M.M. - STUBER, C.W. 1980.** Genetic Identification Of Lines And Crosses Using Isoenzyme Electrophoresis. In *Annu. Corn and Sorghum Ind. Res. Conf. Proc.*, 1980, roč. 35, s. 10-31.

**GOPTSIY, T. - VORONCOV, N. - POPOV, V. - ZHYRAVEL, D. - GROMENKO, S. 2008.** Grain varieties of amaranth developed by selection at Kharkiv National Agrarian University and the perspectives of their use. In **LIBIAKOVÁ, G. - GAJDOŠOVÁ, A. (ED.) 2008.** *Amaranth – plant for the future. 5<sup>th</sup> International Symposium of the European Amaranth Association*, Book of abstracts, Institute of plant Genetics and Biotechnology SAS, Nitra, Slovak Republic, 2008, s. 97-100. ISBN 978-80-89088-70-6.

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

**GRENECHE, M. - LALLEMAND, J. - MICHAUD, O. 1991.** Comparison of different enzyme loci as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. In *Seed Sci. and Technol.*, 1991, roč. 19, s. 147-158.

**HAUPTLI, H. - JAIN, S. 1984.** Allozyme variation and evolutionary relationships of grain amaranths (*Amaranthus* spp.). In *Theor Appl Genet*, 1984, roč. 69, č. 2, s. 153-165.

**HAYWARD, M.D. - Mc ADAM, N.J. 1977.** Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. In *Z. Pflanzenzuchtg.*, 1977, roč. 79, č. 1, s. 59-68.

**CHAN, K.F. - SUN, M. 1997.** Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. In *Theor Appl Genet*, 1997, roč. 95, č. 5-6, s. 865-873.

**JACOBSEN, S.E. - MUJICA, A. 2003.** The genetic resources of Andean grain amaranths (*Amaranthus caudatus* L., *A. cruentus* L. and *A. hypochondriacus* L.) in America. In *Plant Genetic resources Newsletter*, 2003, č. 133, s. 41-44.

**JAIN, S.K. - WU, L. - VAIDYA, K.R. 1980.** Levels of morphological and allozyme variation in Indian amaranths: a striking contrast. In *The Journal of Heredity*, 1980, roč. 71, č. 4, s. 283-285.

**JURÁČEK, E. - MÚDRY, P. 1994.** Význam a systém testovania odrôd kultúrnych rastlín vo Francúzsku. In *Polnohospodárske skúšobníctvo*, 1994, roč. 2, č. 4, s. 17-18.

**JURÁČEK, E. - MÚDRY, P. 1999:** Metodologické postupy separácie izoenzýmov ACP, DIA, IDH, PMI, PGD, PGM a PRX druhu sója fazuľová (*Glycine max.* [L.] Merr.). In *Polnohospodárska výroba a skúšobníctvo*, 1999, roč. 7, č. 2, s. 26-29.

**JURÁŠEK, P. 1997.** Svetové poľnohospodárstvo. I. Diel. AT Publishing, Bratislava, 1997, 263s.

**KAZAN, K. – MUEHLBAUER, F.J. 1991.** Allozyme variation and phylogeny in annual species of *Cicer* (*Leguminosae*). In *Pl. Syst. Evol.*, 1991, roč. 175, s. 11-21.

**KAZAN, K. – KUSMENOGLU, I. - MUEHLBAUER, F.J. – WEEDEN, N.F. 1991.** Duplication of aldolase and esterase loci in *Cicer* (*Cicereae* Alef.). In *Journal of Heredity*, 1991, roč. 82, č. 1, s. 58-63.

**KAZAN, K. - MUEHLBAUER, F.J. – WEEDEN, N.F. – LADIZINSKY, G. 1993.** Inheritance and linkage relationships of morphological and isozyme loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). In *Theor. Appl. Genet.*, 1993, roč. 86, s. 417-426.



**KIANG, Y.T. - GORMAN, M.B. 1983.** Soybean. - In: **TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. (Eds.), 1983.** *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part B, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1983, s. 295-328.

**KIRKPATRICK, B.A. 1995.** Interspecific relationships within the genus *Amaranthus* (*Amaranthaceae*), Ph.D. diss. Texas A & M Univ., College Station, TX (Diss. Abstr. 9539240).

**KUSMENOGLU, I. - MUEHLBAUER, F.J. – KAZAN, K. 1992.** Inheritance of isozyme variation in ascochyta blight-resistant chickpea lines. In *Crop. Sci.*, 1992, roč. 32, č. 1, s. 121-127.

**LADIZINSKY, G. - ADLER, A. 1976a.** Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. In *Theor. Appl. Genet.*, 1976, roč. 48, č. 4, s. 197-203.

**LADIZINSKY, G. – ADLER, A. 1976b.** The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. In *Euphytica*, 1976, roč. 25, č. 1, s. 211-217.

**LARSEN, A.L. 1967.** Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill., In *Crop Sci.*, 1967, roč. 7, č. 4, 311-313.

**LARSEN, A.L.- BENSON, W.C. 1970.** Variety-specific variants of oxidative enzymes from soybean seed. In *Crop Sci.*, 1970, roč. 10, č. 5, s. 493-495.

**MAHALONOBIS, P.C. 1936.** On the generalized distance statistics. In *Proc. Natl. Inst. Sci.*, India, 1936, roč. 2, č. 2, s. 49-55.

**MALAVIYA, D.R. – KUMAR, B. – ROY, A.K. – KAUSHAL, P. – TIWARI, A. 2005.** Estimation of variability of five enzyme systems among wild and cultivated species of *Trifolium*. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005, roč. 52, č. 7, s. 967-976.

**MOLINA-FREANER, F. - JAIN, S.K. 1992.** Isozyme variation in Californian and Turkish populations of the colonizing species *Trifolium hirtum*. In *Journal of Heredity*, 1992, roč. 83, č. 6, s. 423-430.

**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 izoenzýmovými 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 izoenzýmov*. Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity, Trnava, [Vysokoškolské učebné texty], 2011, 71 s. ISBN 978-80-8082-502-7.

**MÚDRY, P. - GAJDOŠOVÁ, A. 2009.** Metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov druhov rodu láskavec (*Amaranthus* sp. L.) pre účely genetiky, šľachtenia a semenárstva. In *Zb. zo 16. vedeckej konferencie*. Piešťany: Centrum výskumu rastlinnej výroby - Výskumný ústav rastlinnej výroby, 2009, s. 27-30. ISBN 978-80-89417-04-09.

**MÚDRY, P. - HRICOVÁ, A. - CHALÁNYOVÁ, M. 2010.** Adaptácia metodologických postupov analýzy polymorfizmu enzýmov v listoch láskavca (*Amaranthus* sp. L.) pre štúdium vnútrodruhovej variability a interorgánových vzťahov. In *Zb. zo 6. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. Piešťany: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany - Výskumný ústav rastlinnej výroby, 2010, s. 158-159. ISBN 978-80-89417-13-1.

**MÚDRY, P. – HRICOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. - GAJDOŠOVÁ, A. 2011.** Methodological approaches to simple enzyme polymorphism analyses of amaranth species (*Amaranthus* sp.). In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 2011, roč. 57, č. 1, s. 1-11.

**MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 1994.** Analýza izoenzýmového fingerprintingu profilingu v kontrole úrovne šľachtenia a semenárstva kukurice. In *Poľnohospodárske skúšobníctvo*,

1994, roč. 2 (II), č. 2-3, s. 8-9.

**MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 1996.** Analýza polymorfizmu enzýmov vybraných genotypov druhu cícer baraní (*Cicer arietinum* L.). Správa o priebehu a výsledkoch riešenia zmluvy o diele, Trnava, 27 s. + obrazová príloha

**MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 1998a.** Popis a rozlíšenie odrôd slnečnice. Metodické postupy separácie izoenzýmov ACP, GOT, MDH, ME, PGD, PGI, PGM a SKD druhu slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.). In *Pol'nohospodárska výroba a skúšobníctvo*, 1998, roč. 6, č. 4, s. 32-36.

**MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 1998b.** Biochemická identifikácia osiva kukurice. In *Zb. z vedeckej konferencie Manažment a marketing výroby, spracovania a predaja kukurice*. SPU Nitra, 1998, s. 25-27.

**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. – OBERT, B. 2011.** The bioindicative role of enzyme polymorphism of seven enzyme systems as reaction on high cadmium ions concentration in maize (*Zea mays* L.). In *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)*, 2011, roč. 57, č. 3, s. 96-104.

**NEGUT, E.L. - SARCA, V. 1994.** Relationship between electrophoresis and growouts in identification of self pollinated plants and outcrosses in maize hybrid seed. In *Romanian Agricultural Research*, 1994, roč. 1, s. 23-26.

**NEI, M. 1972.** Genetic distance between populations. In *Amer. Nat.*, 1972, roč. 106, č. 949, s. 283-292.

**NEI, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. In *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 1973, roč. 70, č. 12, s. 3321-3323.

**NIELSEN, G. 1980.** Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.)

segregating for four alleles in a Pgi - enzyme locus. In *Hereditas*, 1980, roč. 92, č. 1, s. 49-52.

**NIKOLIČ, Z. – VUJAKOVIČ, M. – JEVTIČ, A. 2008.** Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins. In *HELIA*, 2008, roč. 31, č. 48, s. 47-54.

**ORMAN, B.A. - LAWRENCE, G.D. - DOWNES, P.M. - PHILLIPS, D.S. - RIPBERGER, C.J. 1991.** Assessment of maize inbred genetic purity by isozyme electrophoresis. In *Seed Science and Technology*, 1991, roč. 19, č. 3, s. 527-535.

**OSTERGAARD, H. - NIELSEN, G. - JOHANSEN, H. 1985.** Genetic variation in cultivars of diploid ryegrass, *Lolium perenne* and *L. multiflorum*, at five enzyme systems. In *Theor Appl Genet*, 1985, roč. 69, č. 4, s. 409-421.

**PARZYSZ, H. - PRZYBYLSKA, J. 1984.** Isoenzyme variation in the genus *Pisum* II. Electrophoretic patterns of alcohol dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase from cotyledons of ungerminated seeds. In *Genetica Polonica*, 1984, roč. 25, č. 2, s. 255-260.

**PRATT, D.B. - CLARK, L.G. 2001.** *Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus* – one species or two? In *Journal of the Torrey Botanical Society*, 2001, roč. 128, č. 3, s. 282-296.

**QUIROS, C.F. 1983.** Alfalfa, luzerne. In *Isozyme in Plant Genetics and Breeding*, Part B, eds. **TANKSLEY, S.D. – ORTON, T.J.**, Amsterdam: Elsevier, 1983, s. 253-294. ISBN 444-42226-9.

**ROD, J. a kol. 1982.** Šlechtění rostlin. SZN, Praha, 1982, 368 s.

**ROGERS 1972.** Measures of genetic similarity and genetic distance. In *Studies in Genetics VII*. Univ. Texas Publ. 7213, 1972, s. 283-292.

**SAWHNEY, S. - BASRA, A.S. - KOHLI, R.K. 1981.** Enzyme activity and electrophoretic pattern of isoenzymes of peroxidase, esterase and alkaline and acid phosphatase in relation to flowering in *Amaranthus viridis* L. – a quantitative SD plant. In *BIOLOGIA PLANTARUM* (Praha), 1981, roč. 23, č. 5, s. 335-341.

**SHARYPINA, I.I. – POPOV, V.N. – KIRICHENKO, V.V. 2006.** Polymorphism and genetic control of some isozyme systems in mutant sunflower lines. In *Tsitologia i genetika*, 2006, roč. 40, č. 2, s. 27-33.

**SHARYPINA, I.I. – POPOV, V.N. – KIRICHENKO, V.V. 2007.** Analysis of linkage between genes controlling enzymes in sunflower. In *Russian Journal of Genetics*, 2007, roč. 43, č. 11, s. 1243-1247.

**SHAW, C.R. 1964.** The use of genetic variation in the analysis of isozyme structure of proteins: Biochemical and genetic aspects. In *Brookhaven Symp. Biol.*, 1964, č. 17, s. 117-129.

**SCHWARTZ, D. 1960.** Genetic studies on mutant enzymes in maize: Synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1960, roč. 46, č. 9, s. 1210-1215.

**SMITH, J.S.C. 1986.** Genetic diversity within the cornbelt dent racial complex of maize (*Zea mays* L.). In *Maydica*, 1986, roč. 31, č. 1, s. 349-367.

**SMITH, J.S.C. 1988.** Diversity of United States Hybrid Maize Germplasm. Isozymic and Chromatographic Evidence. In *Crop Sci.*, 1988, roč. 28, č. 1, s. 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. In *Euphytica*, 1989, roč. 43, č. 1-2, s. 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.

**SMITH, J.S.C. - WYCH, R.D. 1986.** The identification of female selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. In *Seed Science and Technology*, 1986, roč. 14, č. 1, s. 1-8.

**SMÝKAL, P. – HORÁČEK, J. – DOSTÁLOVÁ, R. – HÝBL, M. 2008.** Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. In *J Appl Genet*, 2008, roč. 49, č. 2, s. 155-166.

**STUBER, C.W. - GOODMAN, M.M. 1983.** 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, s. 1-29.

**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, USA: North Carolina Agricultural Research Service, North Carolina State University, Raleigh, 1988, s. 1-87.

**TUWAFE, S. – KAHLER, A.L. – BOE, A. – FERGUSON, M. 1988.** Inheritance and geographical distribution of allozyme polymorphisms in chickpea (*Cicer arietinum* L.). In *Journal of Heredity*, 1988, roč. 79, č. 3, s. 170-174.

**UVÁČKOVÁ, E. - MÚDRY, P. - OBERT, B. - PREŤOVÁ, A. 2008.** Enzyme fingerprint analyses in tissue regenerated from anther culture of maize. In *Acta Physiol Plant*, 2008, roč. 30, č. , s. 779-785.

**VAN DER MAESEN, L.J.G. 1987.** Origin, history and taxonomy of chickpea. In **SAXENA, M.J. – SINGH, K.B. (Eds.). 1987.** *The chickpea*, Canbridge: CAB International, 1987, s. 11-34.

**WARWICK, S.I. - BLACK, L.D. 1986.** Electrophoretic variation in triazine – resistant and susceptible populations of *Amaranthus retroflexus* L. In *New Phytol.*, 1986, roč. 104, č. 4, s. 661-670.

**WRIGHT, S. 1951.** The genetical structure of populations. In *Ann. Eugen.*, 1951, roč. 15, č. 4, s. 323-354.

**YUDINA, R.S. - ZHELEZNOVA, N.B. - ZAKHAROVA, O.V. - ZHELEZNOV, A.V. - SHUMNY, V.K. 2005.** Isozyme analysis in a genetic collection of amaranths (*Amaranthus L.*). In *Russian Journal of Genetics*, 2005, roč. 41, č. 12, s. 1395-1400.

## **5.1 ZOZNAM RIEŠENÝCH PROJEKTOV, VÝSLEDKY KTORÝCH SA PODIEĽAJÚ NA TVORBE SKRÍPT**

**HRICOVÁ, A. - KOL. 2008-2011.** Využitie genomických a proteomických prístupov na charakterizáciu mutantných línií amarantu. Grant VEGA č. 2/0109/09. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra.

**KRÁĽOVÁ, K. - KOL. 2006-2008.** Vplyv kovov na rastliny z aspektu potravinovej bezpečnosti a fytofortifikácie. Grant VEGA č. 1/3489/06. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta.

**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, E. 1990-1994.** Biochemická identifikácia genotypov kukurice. N 05-529-913-01-03, MP SR.

**PREŤOVÁ, A. – KOL. 2002-2005.** Príprava haploidov niektorých poľnohospodárskych plodín (kukurica, jačmeň, pšenica, ľan) v in vitro podmienkach. Číslo projektu APVT-51-002302, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra.

## OBSAH

- 1 ÚVOD 4
- 2 METODOLÓGIE ANALÝZ POLYMORFIZMU ENZÝMOV  
NIEKTORÝCH HOSPODÁRSKY VÝZNAMNÝCH DRUHOV  
RASTLÍN – PRAKTICKÁ ČASŤ 5
  - 2.1 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV KUKURICI SIATEJ  
(*Zea mays* L.) 5
  - 2.2 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV SLNEČNICE ROČNEJ  
(*Helianthus annuus* L.) 12
  - 2.3 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV SÓJE FAZUĽOVEJ  
(*Glycine max.* [L.] Merr.) 15
  - 2.4 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV HRACHU SIATEHO  
(*Pisum sativum* L.) 18
  - 2.5 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV CÍCERA BARANIEHO  
(*Cicer arietinum* L.) A HRACHORA SIATEHO (*Lathyrus sativus* L.) 21
  - 2.6 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV LÁSKAVCA METLINATÉHO  
(*Amaranthus cruentus* L.) 23
  - 2.7 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV KOSTRAVY TRSTENÍKOVITEJ  
(*Festuca arundinacea* Schreb.) A MÄTONOHU TRVÁČEHO (*Lolium  
perenne* L.) 28
  - 2.8 ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV ĎATELINY PLAZIVEJ  
(*Trifolium repens* L.) 32
- 3 NIEKTORÉ PRÍKLADY VYUŽITIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV  
V BIOLÓGII 37
  - 3.1 VÝPOČET POČTU IZOENZÝMOV POLYMÉRNEHO ENZÝMU 37
  - 3.2 ANALÝZA IZOENZÝMOV V POPULÁCI 38
  - 3.3 VÝPOČET FREKVENCIE ALEL 38
    - 3.3.1 Výpočet frekvencií alel podľa Hardy – Weinbergovho zákona 38
  - 3.4 VÝPOČET PRIEMERNÉHO POČTU ALEL V LOKUSE 42
  - 3.5 VÝPOČET HETEROZYGOTNÉHO STAVU POPULÁCIE 43
  - 3.6 VÝPOČET PERCENTA POLYMORFNÝCH LOKUSOV V POPULÁCI 44
  - 3.7 SEGREGÁCIA (ŠTIEPENIE) V LOKUSE 44
  - 3.8 ANALÝZA VÄZBY 45



<b>3.9</b>	<b>URČENIE GENETICKEJ REKOMBINÁCIE</b>	<b>45</b>
<b>3.10</b>	<b>URČENIE GENETICKEJ DIVERGENCIE POPULÁCIÍ</b>	<b>46</b>
3.10.1	Rogersova vzdialenosť	46
3.10.2	Mahalonobisova $D^2$ štatistická metóda	46
3.10.3	Neiova štatistická metóda	46
3.10.4	Wrightova štatistická metóda	46
3.10.5	Iné štatistické výpočty	47
<b>3.11</b>	<b>STANOVENIE VÄZBY MEDZI LOKUSMI</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>PRÍKLADY VYUŽITIA POLYMORFIZMU ENZÝMOV V BIOTECHNOLÓGII</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>VÝUŽITIE ANALÝZ POLYMORFIZMU ENZÝMOV AKO GENETICKÝCH MARKEROV</b>	<b>48</b>
4.1.1	Izoenzýmy ako genetické markery – genetika, ekonomika, praktickosť, efektívnosť a nevýhody	49
<b>4.2</b>	<b>NIEKTORÉ PRÍKLADY VYUŽITIA IZOENZÝMOV VO VÝSKUME RASTLÍN</b>	<b>51</b>
4.2.1	Izoenzýmy v populačnej genetike	52
4.2.2	Izoenzýmy v genetike a v šľachtení	54
4.2.3	Izoenzýmy v ekofyziologickom výskume	55
4.2.4	Izoenzýmy v biotechnologickom výskume	58
<b>5.</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>ZOZNAM RIEŠENÝCH PROJEKTOV VÝSLEDKY, KTORÝCH SA PODIEĽAJÚ NA TVORBE SKRÍPT</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>OBSAH</b>	<b>72</b>

© RNDr. Pavol Múdry, CSc., 2012

Recenzenti: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.  
Schválené vedením Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity **dňa 23.2.2012** ako skriptá pre  
Pedagogickú fakultu TU.

**ISBN 978-80-8082-559-1**