

Využití bílkovinných markerů v genetice a šlechtění rostlin

Izoenzymy měly od svého objevu na konci 50. let významnou úlohu v řadě biologických disciplín. Byly definovány jako odlišné varianty téhož enzymu, mající identické nebo podobné funkce, a přítomné u téhož jedince. Významný přelom v použití izoenzymů jako biochemických markerů byl zaznamenán v polovině 60. let min. století, kdy byly prováděny studie týkající se genetického polymorfizmu v populacích. Populační genetika záhy využila izoenzymů jako prostředku odhadu genetické variability v populaci a zjišťování genetické struktury populací. Od počátku 70. let jsou izoenzymy využívány i v oblasti rostlinné genetiky a populační biologie rostlin. Elektroforetická separace izoenzymů, dostupnost této metody a její možnosti, významně ovlivnila řadu biologických oborů včetně systematiky a populační genetiky.

Významný pokrok v oblasti biochemie a molekulární biologie umožnil využití dalších typů genetických markerů – markerů založených na polymorfismu DNA, umožňujících zjišťovat variabilitu přímo na úrovni DNA.

Biochemické a molekulární markery jsou využívány v taxonomických, fylogenetických a populačně genetických studiích, v genetickém mapování a studiu organizace genomu a v neposlední řadě mají aplikace v oblasti charakterizování, popisu a identifikace odrůd zemědělských plodin. Zejména tyto šlechtitelské aplikace nabývají v současné době stále více na významu, mnohé šlechtitelské a semenářské firmy využívají biochemické a molekulární markery ve svých šlechtitelských programech, ke kontrole čistoty osiva (F_1 hybridů a klasických odrůd), k identifikaci odrůd a v posledních letech i jako genetické markery v systémech „molekulárního šlechtění“ a „marker assisted selection“, které výrazným způsobem ovlivňují charakter šlechtění a tvorbu nových genotypů kulturních plodin.

Aplikace analýzy biochemických markerů v genetice a šlechtění rostlin

Přibližně před 30 až 35 lety nová a poměrně jednoduchá technika, elektroforéza alozymových bílkovin na škrobovém gelu, velmi výrazně změnila možnosti studia evoluce. Dostupnost této metodologie vzápětí významně zasáhla do studia fylogenetických, taxonomických, sociobiologických a populačně-genetických otázek.

Biochemické markery nacházejí uplatnění především ve šlechtění a semenářství, protože mnoho ekonomicky významných druhů zahrnuje velký počet odrůd, z nichž mnohé jsou blízce příbuzné. V případě agronomicky ceněných druhů může mít značný ekonomický význam možnost rozlišení odrůd. V mnoha zemích platí v různé úpravě tzv. „šlechtitelská práva“ a omezení pro povolení nové odrůdy na trhu. Jedno z těchto omezení je jasná charakteristika, která může odlišit odrůdu ode všech ostatních povolených odrůd.

Neméně významné jsou ale i aplikace populačně-genetické, evoluční a taxonomické, kdy jsou biochemické markery poměrně široce využívány v řadě studií u planých druhů dřevin a bylin – pro řešení fylogenetických, taxonomických otázek, otázek genetické skladby a stability populací, jako prostředek doplňující morfologické znaky a charakteristiky taxonu.

Tvorba vhodného biochemického markerovacího systému (na úrovni proteinu nebo enzymu) je založena na následujících požadavcích:

1. dostatečná frekvence genetických variant u daného druhu,
2. exprese nezávislá na podmínkách prostředí,
3. vhodná elektroforetická a detekční technika.

Významný je také způsob vyhodnocování získaných elektroforetických dat a způsob jejich interpretace. Výsledné spektrum proužků proteinů a enzymů na gelu je nazýváno elektroforetickým fenotypem.

Genetický marker (signální gen) se používá pro označení jasně se fenotypově projevujícího znaku s jednoduchou dědičností. Označení marker pak předpokládá spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními či kvalitativními znaky. Genetické a biochemické markery se musí vyznačovat dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrací a rovněž vysokou heritabilitou, to je nezávislostí na podmínkách prostředí. Další výhodou biochemických a molekulárních markerů bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu. Tento proces je nedestruktivní, pro analýzu se používá jen malá část rostlinného pletiva. Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým klasickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků. Navíc velmi často je možné testovat rostliny v klíčovém stavu a dále si ponechat jen rostliny vhodného genotypu. Tento fakt je příznivý zejména pro aplikace ve šlechtění.

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

Jako biochemické markery se v roli izoenzymů používají i neenzymatické bílkoviny (např. zásobní proteiny). Podstatně méně se využívá polymorfismu jiných biologických molekul, jako jsou mastné kyseliny, sekundární metabolity a pigmenty. I tyto biologické makromolekuly v různé míře splňují požadavky biochemických markerů, to je nezávislost na podmínkách prostředí, genetický polymorfismus, přítomnost vhodné separační a detekční techniky.

Základní aplikace biochemických markerů u kulturních rostlin:

1. taxonomické a populačně-genetické studie,
2. hodnocení biodiverzity z pohledu molekulárně biologických markerů,
3. využití biochemických markerů ke studiu interakcí patogen-hostitel (mikroorganismus -rostlina),
4. genetická analýza somatických a vzdálených hybridů,
5. markerování morfologických a fyziologických znaků, konstrukce genetických map,
6. šlechtění a semenářství, hodnocení šlechtitelského materiálu, selekce prostřednictvím markerů, hodnocení čistoty a pravosti odrůd a osiva.

Taxonomické a populačně-genetické studie

Izoenzymů a proteinů bez enzymatické aktivity (zásobních proteinů a dalších neenzymatických bílkovin) se stále poměrně často využívá v taxonomických, fylogenetických a populačně-genetických studiích u celé řady plodin – obiloviny, luskoviny, brambor, zelenina, květiny a zahradní plodiny, dřeviny.

Genetická analýza somatických a vzdálených hybridů

Molekulární markery na úrovni izoenzymů se používají i pro charakterizování a potvrzení somatických hybridů na úrovni rostlin nebo kalusů, či buněčných linií. Použití nacházejí i při kontrole úspěšnosti křížení a potvrzení hybridního charakteru potomstva vzniklého na základě vzdálené hybridizace.

Markerování morfologických a fyziologických znaků, konstrukce genetických map

U pšenice jsou využívány glyadinové a gluteninové markery pro markerování pekařské jakosti, mrazuvzdornosti a odolnosti vůči chorobám. Zásobní bílkoviny jsou pro tyto účely využívány i u dalších plodin. Izoenzymové markery PER lze využít k markerování rezistence k padlí u prosa a případně u dalších obilovin. Marker PGM je v silné vazbě s genem rezistence vůči BYMV (virus žluté mozaiky fazolu) u hrachu. U rajčete byla zjištěna silná vazba mezi enzymovým markerem a jaderným genem pylové sterility. Byly zjištěny i závislosti mezi spektrem izoenzymů a morfogenní aktivitou kalusu v kulturách *in vitro*, enzymové markery je pak možné použít jako biochemické markery somatické embryogeneze. Mnohé studie se zabývají vztahy mezi izoenzymovými a DNA markery a sestavováním genetických map.

Využití biochemických markerů ve studiu interakcí patogen-hostitel v populační genetice fytopatogenních organismů

Technika gelové elektroforézy proteinů a enzymů našla aplikaci i v oblasti fytopatologie jako technika pro taxonomické studie u patogenních hub, později i pro studium interakcí patogen-hostitel a studium populační genetiky patogenních organismů. U brambor infekce virovými chorobami (virus Y) způsobila změny v intenzitě zón proteinových proužků hlíz. Izoenzymy se používají např. jako markery pro rozlišení fyziologických ras a izolátů patogenních mikroorganismů. Pomocí změn izoenzymového spektra esteráz lze usuzovat na stupeň napadení zrn ječmene pilousem.

Využití izoenzymů a proteinů ve šlechtění a semenářství, a pro účely identifikace odrůd

- Izoenzymové a proteinové markery se využívají v semenářské kontrole – pro **hodnocení čistoty a pravosti osiva**, šlechtitelských programech u řady plodin. Biochemické markery nejsou používány jen k charakterizování a identifikaci odrůd, ale i k popisu a rozlišení genových zdrojů.
- Analýza izoenzymového spektra je v některých případech používána i k predikci **heterózního efektu hybridů F₁**.
- **Obiloviny** – řada aplikací u pšenice využívá glyadinových a gluteninových markerů pro charakterizování i identifikaci odrůd. Byla použita technika izoelektrické fokuzace k identifikaci odrůd ječmene pomocí izoenzymových a proteinových markerů. U kukuřice se používají izoenzymové markery pro účely testování čistoty a pravosti šlechtitelských inzuchtních linií, u rýže se pro účely rozlišení odrůd využívá 2-D elektroforéza proteinů nebo je doporučována technika SDS-PAGE albuminů a globulinů.
- **Olejniny** – u slunečnice byla používána SGE pro charakterizování komerčních hybridů a planých druhů.
- **Luskoviny** – identifikaci odrůd hrachu je používána technika SDS-PAGE zásobních proteinů nebo elektroforéza izoenzymů používaná i k identifikaci odrůd sóji.
- **Brambory** – pro rychlé a spolehlivé rozlišení odrůd brambor je možné použít IEF esteráz a proteinů, proteiny a izoenzymy esteráz byly používány i k identifikaci sbírkových klonů.
- **Trávy a jeteloviny** – u většiny agronomicky významných druhů trav není možné rozlišení odrůd na základě pouze morfologických znaků. Vhodnou metodou napomáhající rozlišení odrůd je izoenzymová a proteinová analýza, kdy je možné v populaci zjistit frekvenci různých fenotypů. Odlišnosti mezi odrůdami mohou být určeny odlišnostmi alelických frekvencí. K identifikaci odrůd trav se využívají proteinové markery, např. techniky SDS-PAGE zásobních bílkovin, izoenzymy ACP, EST, PGI, PGM. Další aplikace analýzy izoenzymů u pícních trav je určení změn u

syntetických odrůd (populací) během jejich generativního množení a určení stability odrůd. Zajímavou aplikací je použití izoenzymových markerů (izoenzymy PGI-2) pro zjišťování podílu daného genotypu jetele *Trifolium repens* v pastevních porostech.

- **Řepa** – identifikace odrůd se provádí pomocí enzymů semen a listů a zásobních proteinů semen, tyto biochemické markery lze použít i k testování stability a vlivu prostředí na šlechtitelský materiál.
- **Zeleniny, ovoce a okrasné rostliny a další plodiny** – u této skupiny rostlin se většinou využívají izoenzymové markery, v některých případech i markery na úrovni proteinů. Aplikace se nacházejí ve šlechtění a identifikaci odrůd u česneku, čekanky, maliníku, jabloní a jabloňových podnoží, hrušně, révy vinné, mandloně, ananasů, cukrové třtiny, jahodníků, zejména ve vztahu k meristémovému množení viruprostých rostlin, chryzantém, konvalinky, tisu, jedlých hub.

Biochemické markery u planých rostlin

Metoda biochemických (izoenzymových a proteinových) markerů a markerů na úrovni DNA je široce používána při populačně genetických studiích – pro účely molekulární genetické analýzy populace, molekulární evoluce. Poslední době se objevila řada monografií věnovaná molekulární genetice populací, molekulární evoluci a aplikaci metod molekulární biologie do řešení evolučních, taxonomických a ekologických otázek. Tento stav ukazuje na vzrůstající význam této problematiky. Molekulárně biologické metody, samozřejmě v komplexu s klasickou taxonomií a morfologií, umožňují řešit řadu složitých fylogenetických, taxonomických a populačně genetických otázek.

V systematických i populačně genetických studiích byly po dlouhé období poměrně úspěšně používány nepřímé markery pro zjišťování genetické difference – analýza a porovnávání proteinů byla tímto nepřímým měřítkem. Elektroforetické a imunologické techniky byly používány k analýzám rozsáhlých souborů vzorků vzhledem k jejich nevelké složitosti, malým nákladům a praktičnosti. Kromě základních technik analýzy proteinů a izoenzymů byla a je používána technika dvourozměrné gelové elektroforézy použitelná ke zjišťování variability u více lokusů současně.

Aplikaci metod genetické analýzy populací, využití molekulárních a biochemických markerů u planých rostlin a v řešení některých ochranných otázek lze spatřovat v:

- genetické analýze populací,
- hodnocení biodiverzity z pohledu klasických morfologických znaků a molekulárních markerů,
- řešení taxonomických a fylogenetických otázek i na úrovni molekulárních markerů a úrovni obecné charakteristiky genomu,
- charakteristice genotypů planých druhů rostlin (populací), jejich identifikaci a sledování vlivu introdukovaných genotypů na genetickou stabilitu původní populace, studium otázky genetické eroze na hlubší, molekulárně-genetické úrovni.

Taxonomické studie

Data získaná na základě analýzy enzymů pomocí elektroforetických technik se zásadně odlišují od jiných systematických dat, protože spektrum pruhů (elektroforetický fenotyp enzymů) získaný na základě specifické detekce enzymatické aktivity na gelu může být interpretován v genetickém vyjádření. Různý charakter spektra enzymových pruhů může odpovídat různým alelám lokusu příslušného genu nebo alelám odlišných lokusů. Tato charakteristika je také určující pro označení enzymového spektra, alozymy jsou pak odlišné formy jednoho enzymu, odpovídající alternativním alelám v lokusu jednoho genu, zatímco izoenzymy se používají pro označení různých forem enzymu kódovaného strukturálními geny v odlišných lokusech. Alozymy mají jednoduchou mendelistickou kodominantní dědičnost

a je možné určit alelické frekvence ve studované populaci, či druhu. Na základě těchto dat je možné určovat podobnost a odlišnost mezi populacemi, druhy.

Přes řadu výhod a možností, které nabízely elektroforetická (enzymová) data nebylo využití enzymové elektroforézy při řešení obtížnějších taxonomických problémů příliš časté. Daleko častěji byla využívána data z analýz sekundárních metabolitů (zejména flavonoidů). Příčinou pro tento stav bylo několik – potřeba čerstvého materiálu (nebo materiálu zamraženého v krátkém časovém intervalu po odběru vzorku), jisté ne zcela správné vědomí o variabilitě enzymů v rámci druhu. S tímto konstatováním o relativně malém využití enzymových markerů v taxonomických studiích, ale příliš nekoresponduje relativně značný objem prací prováděných v posledních desetiletích na téma molekulárního přístupu k problematice systematických studií u rostlin. Příkladem využití biochemických markerů v řešení taxonomických otázek jsou studie prováděné u *Carex* sp., *Polygonum* sp., *Festuca* sp., *Ananas* sp., *Quercus* sp., *Pinus* sp. a dalších.

Hodnocení biodiverzity a populační biologie

Genetická variabilita v rostlinných populacích není rovnoměrně rozdělena, její distribuce nemá charakter normálního rozdělení. Obdobně jako intaktní rostliny i geny, resp. genotypy, mají určitou tendenci shlukování a vytváří se tak významné genetické odlišnosti na relativně krátkou vzdálenost. Tato nenáhodná a nepravidelná distribuce genetické variability je označována jako genetická struktura populace.

Studium populačně genetické struktury populace pomocí klasických morfologických charakteristik je problematické a obtížné vzhledem ke značnému vlivu prostředí na fenotypové projevy znaku. Biochemické a molekulární techniky (SGE, PAGE, i DNA fingerprinting) poskytují řadu markerů ke studiu evolučních procesů. Izoenzymové lokusy mají řadu výhod ve srovnání s jednoduše založenými morfologickými znaky: genetická dědičnost elektroforeticky detekovatelných znaků může být jednoduše zjišťována, izoenzymové markery mají většinou kodominantní charakter a alelické frekvence mohou být přímo odečítány, odhadnutá úroveň a distribuce genetické variability může být přímo pozorována mezi populacemi nebo druhy, analýza může být prováděna z velmi malého množství materiálu, řada lokusů je exprimována ve všech stádiích životního cyklu. Izoenzymy jsou velmi často používány k odhadu úrovně variability mezi populacemi. Nejčastějším měřítkem variability mezi populacemi je % polymorfních lokusů, počet alel na lokus, efektivní počet alel na lokus, průměrný podíl heterozygotních lokusů na jedince. Míra variability mezi populacemi je druhově závislá a mezi druhy existuje významná heterogenita při hodnocení mezipopulační variability. Významný vliv na tuto variabilitu má evoluční historie a ekologické charakteristiky daného druhu. Obecně lze konstatovat, že „běžné“ dlouhověké druhy, které jsou primárně cizosprašné, plodné po dlouhou dobu a typické pro pozdější sukcesní stadia, mají vyšší úroveň mezipopulační variability než druhy na opačném pólu zmiňovaných charakteristik.

Vysoká úroveň variability je detekována u nahosemenných, u druhů s velkým areálem výskytu, u dlouhověkých vytrvalých druhů a cizosprašných druhů. Nízká úroveň variability je detekována u dvouděložných, jedno až dvouletých druhů a u samosprašných druhů.

Molekulární systematika a evoluce

Vytvoření hierarchického nomenklatorického systému Linnéem (1758) položilo základy pro popsání a kategorizování biologické diverzity. Tento hierarchický systém byl zprvu nezávislý na evolučních teoriích, ale již Darwin (1859) a Haeckel (1866) rozvinuli poznání, že klasifikace by měla být položena na fylogenetické příbuznosti. Do 60. let minulého století byla systematika položena na analýze variability morfologických znaků. Se studiem mikroevolučních změn se prosazovala stále více populační genetika. V souvislosti s hlubším

poznáváním molekulárních základů dědičnosti stále významnější úlohu zastávalo studium biologických makromolekul – nukleových kyselin a proteinů.

První aplikace molekulárního přístupu k řešení taxonomických problémů byly spojeny s proteiny. Již na začátku min. století byly publikovány zásadní práce využívající imunologického přístupu k řešení problematice. S rozvojem elektroforetických technik a histochemických detekčních přístupů se stále více začala rozvíjet oblast elektroforetických markerů – proteinů a izoenzymů a jejich významné využití v molekulární systematice. Tento přístup – elektroforéza izoenzymů vytvořil rozsáhlé srovnávací databáze a je jedním z nejrozšířenějších používaných přístupů v molekulární systematice.

V posledních dvou desetiletích dochází k mohutnému rozvoji technik založených na manipulaci a analýze nukleových kyselin – hybridizaci, restrikčnímu mapování, sekvenování.

V. Čurn, L. Dolanská, V. Endrychová – Využití bílkovinných markerů v genetice a šlechtění, s. 5-13. V: Sborník přednášek, Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchování genových zdrojů rostlin, AGRITEC, listopad 2002.