HOMOGENITA A HETEROGENITA ODRŮD SLADOVNICKÉHO JEČMENE NA ÚROVNI BIOCHEMICKÝCH MARKERŮ VYUŽÍVANÝCH PRO ODRŮDOVOU IDENTIFIKACI

HOMOGENEITY AND HETEROGENEITY OF MALTING BARLEY VARIETIES ON THE LEVEL OF BIOCHEMICAL MARKERS USED FOR VARIETY IDENTIFICATION

RNDr. IGOR KRAUS, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha/*Research Institute of Brewing and Malting, Praha*
Ing. MARIE ŠPUNAROVÁ, CSc., Zemědělský výzkumný ústav s. r. o., Kroměříž/*Agricultural Research Institute, Kroměříž*

Klíčová slova: *ječmen, identifikace odrůd*

Key words: *barley, variety identification*

1 ÚVOD

Při tvorbě, udržování a pěstování odrůd sladovnického ječmene je kladen důraz na to, aby měly své specifické vlastnosti, kterými se odlišují od odrůd ostatních, aby byly ve sledovaných znacích homogenní a aby tyto znaky byly stálé. Jestliže jsou rozhodující kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chápány jako výslednice složitých biochemických procesů odehrávajících se v buňkách, pletivech a orgánech rostliny, dal by se očekávat i vysoký stupeň homogenity na úrovni biochemických markerů.

Jako biochemické markery se označují nejčastěji molekuly bílkovin, enzymů a nukleových kyselin, které jsou specifické tím, že indikují určitou kvalitativní vlastnost, ale i např. odrůdovou příslušnost, dále působením vnějšího prostředí nejsou ovlivňovány, jsou „dostatečně" polymorfní, tzn. že jsou ve více formách známy molekuly stejných nebo obdobných vlastností a jsou reprodukovatelně analyticky stanovitelné. Jako biochemické markery se nejčastěji u sladovnického ječmene využívají frakce zásobních bílkovin obilky extrahovatelné alkoholy, jako jsou například hordeiny, deoxyribonukleová kyselina (DNA) a případně izoenzymy jako esterasa [2, 3, 5]. U jednotlivé odrůdy lze hovořit o homogenitě biochemických markerů v případě, že se u této odrůdy vyskytuje pouze jeden typ sledovaných markerů. Pokud se u odrůdy vyskytují dva nebo více typů, hovoříme o odrůdě heterogenní v biochemických markerech. V tomto smyslu jsou tedy termíny homogenita a heterogenita markerů chápány jako charakteristika odrůdové příslušnosti. Znamená to tedy, že i odrůda heterogenní v biochemických markerech může vykazovat homogenitu ve smyslu jakostního sladařského ukazatele nebo odrůdovou jednotnost například zpracovávané suroviny. Současně se posuzuje, zda jsou tyto markery odrůdově specifické, resp. nespecifické. Zda je tedy sledovaný typ markerů charakteristický pouze pro jednu odrůdu, nebo sledované markery charakterizují určitou skupinu odrůd v některém regionálním odrůdovém souboru, uvedeném například v České republice ve Státní odrůdové knize ČR [7]. To znamená, že v prvním případě je odrůda v daném souboru nezaměnitelná, a v druhém jsou odrůdy vzájemně neodlišitelné.

1 INTRODUCTION

For breeding, maintaining and cultivation of malting barley varietites, it is laid emphasis on that the varieties have their specific properties that differ them from other ones and are homogeneous in the parametres followed and these are constant. If the decisive qualitative and quantitative characteristics are understood as the resultants of complex biochemical processes taking place in the cells, tissues and organs of a plant, a high grade of homogeneity on the level of biochemical markers could be expected.

As biochemical markers are most often indicated protein, enzyme and nucleic acid molecules that are specific by indicating certain qualitative property but even e.g. variety appurtenance. Further to this, they are not influenced by ambient effects, but they are „enough" polymorphic, i.e. the molecules with the same or simillar properties in more forms are known and they can be reproducibly analytically determined. As biochemical markers for malting barley are most often used the fractions of grain storage proteins extractable by alcohols, such as hordeins, DNA and optionally isoenzymes, such as esterase [2, 3, 5].

When considering a particular variety, it can be spoken about the homogenity of biochemical markers in such case that only one type of the markers followed is present. If two or more types of markers are present, the variety is heterogeneous in biochemical markers. In this sense, the terms homogeneity and heterogeneity are understood as the characteristics of variety appurtenance. So, it means that also a variety that is heterogeneous in biochemical markers, can show the homogeneity in the sense of a qualitative malting index or variety uniformity of the raw material which is processed, as an example. At the same time it is evaluated whether these markers are specific or nonspecific for the particular variety.

Whether the marker type followed is characteristic of one variety only, or the marker followed characterize a certain variety group in some region variety file as entered e.g. in the Czech Republic in State variety book of the Czech Republic [7]. That means the variety is incommutable in the first case, and, in the second case the varieties are mutually undifferentiable.

Na příkladech některých významných odrůd sladovnického ječmene českého a slovenského původu jsou v příspěvku uvedeny odrůdy, které vykazují odrůdově specifickou homogenitu, resp. heterogenitu hordeinových a DNA markerů.

2 MATERIÁL A METODY

Pro sledování homogenity, resp. heterogenity biochemických markerů byly zvoleny kvalitní a ve své době velmi pěstované odrůdy sladovnického ječmene Akcent (rok povolení 1992), Forum (1993) a Kompakt (1995). Vzorky odrůd pocházely z odrůdových zkoušek ÚKZÚZ v roce 1997.

K detekci hordeinových markerů bylo použito modifikované metody EBC [1]. Hordeiny byly extrahovány z jednotlivých rozetřených suchých zralých obilek v 500 µl 50% vodného roztoku 2-chlorethanolu po dobu 3 hodin. Extrakt byl oddělen od drtě centrifugací při 12 000 min^{-1} (15 min). Separace hordeinů byla provedena vertikální elektroforézou na 8% polyakrylamidovém gelu (formát 18 x 15 cm) v 1 M roztoku močoviny. Separační roztok byl připraven jako 0,04% roztok glycinu v 0,4% roztoku kyseliny octové. Doba separace za kontinuálního chlazení elektroforetické jednotky na teplotu 8 °C odpovídala času dosažení 10 000 Vh s konstantním proudem 40 mA, tj. přibližně 18 hodin s počátečním režimem 10 mA po dobu 20 minut. Následně byl gel barven za stálého třepání 1 až 3 hodiny v 0,1% roztoku Serva Blue R v 12% roztoku kyseliny trichloroctové. Gely byly bezprostředně po barvení opláchnuty destilovanou vodou a vizuálně hodnoceny na transiluminátoru v bílém světle. Pro účely dokumentace byly gely zataveny mezi celofánové fólie sušením v horkovzdušné sušárně při teplotě do 60 °C. Od každé odrůdy bylo hodnoceno 15 obilek.

K detekci DNA markerů byla použita PCR (Polymerase Chain Reaction) s využitím upravené aplikace metody RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [6]. DNA byla izolována z jednotlivých rozetřených suchých zralých obilek použitím kitu Plant Dneasy Isolation Kit (Qiagen). Od každé odrůdy bylo hodnoceno 10 obilek. PCR byla provedena v termocykléru s vyhřívaným víkem (PTC 200, MJ Research) v 25 µl reakční směsi s 30-35 ng templátu DNA, 1,5 mM roztoku $MgCl_2$, 0,1 mM roztoku dNTPs, 0,5 µmolu primeru AB 5.17 se sekvencí nukleotidových bazí 5`CCAACGTCGT3` a 1,6 U Taq DNA polymerasy v 1x reakčním tlumivém roztoku (Promega) s reakčním profilem: 45 cyklů při teplotě 38 °C po dobu 1 minuty, při teplotě 72 °C po dobu 2 minut, při teplotě 94 °C po dobu 1 minuty s počáteční denaturací při teplotě 94 °C po dobu 5 minut a konečnou extenzí při teplotě 72 °C po dobu 7 minut. PCR produkty byly separovány horizontální elektroforézou na 2% agarózovém gelu (NuSieve 3:1) v 1x TBE (tlumivý roztok TRIS borát – EDTA) s ethidium bromidem (0,1 µg/1 ml gelu) a hmotnostním markerem (standardem).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Analýzou elektroforeticky separovaných hordeinů u odrůdy Akcent a Kompakt bylo zjištěno po dvou typech (A a B) spekter, u odrůdy Forum jeden typ (*obr. 1*). Zatímco v případě odrůdy Forum se jedná o specifickou homogenitu hordeinových markerů, u odrůd Akcent a Kompakt jde o nespecifickou heterogenitu. Hordeinový typ Akcent A je identický s jediným známým typem u odrůdy Sladko a typ Kompakt A je identický s jediným známým typem u odrůdy Tolar. Identita hordeinového typu u odrůd Akcent (Akcent A) a Sladko může vyplývat z vysokého stupně příbuznosti (50% přes společného rodiče – odrůda Salome /=HVS 827/). Naopak specifickému charakteru hordeinů u odrůdy Forum může přispívat projev ve šlechtění sladovnického ječmene nepříliš často používané polodivoké erektoidní formy Hortpádsi Kétsoras [4]. Poměr hordeinových typů Akcent A a Akcent B nebyl stanoven. (V analyzovaném souboru 100 obilek vzorku odrůdy Akcent

On the examples of some important malting barley varieties of Czech and Slovak origin, in this paper are mentioned the varieties that show variety-specific homogeneity, or hordein and DNA marker homogeneity as the case may be.

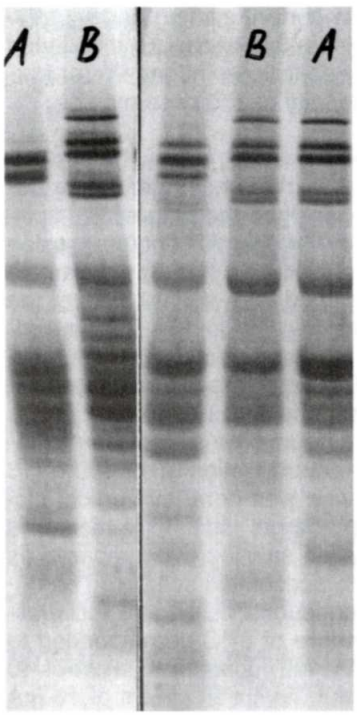
2 MATERIAL AND METHODS

For studying of biochemical markers homogeneity or heterogeneity as the case may be, since the time widely cultivated high quality malting barley varieties Akcent (permission year 1992), Forum (1993) and Kompakt (1995) were used. The variety samples were obtained from variety trials of the CISTA (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture) in 1997. For hordein marker detection, an EBC modified method was used [1]. Hordeins were extracted from individual powdered mature seeds in 500 l of 50% aqueous solution of 2-chlorethanol for 3 hours. The extract was separated from the seed debris by centrifugation at 12 000 g (15 minutes). The hordein separation was done by vertical elctrophoresis on 8% polyacrylamide gel (size 18 x 15 cm) in 1 M urea solution. The separation solution was prepared as 0,04% glycine solution in 0,4% acetic acid solution. The duration of separation under continuous cooling of the electrophoretic unit to the temperature of 8 °C corresponded to the time reaching of 10 000 Vh with constant current of 40 mA, i.e. approximately 18 hours with initial current of 10 mA for 20 minutes. Consequently, the gel was stained under permanent shaking for 1 to 3 hours in 0,1% Serva Blue R solution in 12% trichloracetic acid solution. Immediately after staining, the gels were rinsed by distilled water and visually evaluated on the transilluminator in the white light. For documentation purposes, the gels were sealed between cellophane foils by drying in a hot-air dryer at 60 °C. From each variety, 15 seeds were evaluated.

For DNA marker detection, the PCR (Polymerase Chain Reaction) technology was used, using modified application of the RAPD method (Random Amplified Polymorphic DNA) [6]. DNA was isolated from individual powdered mature seeds, using Plant Dneasy Isolation kit (Qiagen). From each variety, 10 seeds were evaluated. The PCR was done in a thermocycler with a heated-up cover (PTC 200, MJ Research) in 25 l of reaction mixture with 30-35 ng of DNA template, 1,5 mM of $MgCl_2$ solution, 0,1 mM of dNTPs solution, 0,5 µmol of AB 5.17 primer with nucleotide base sequention 5 'CCAACGTCGT3' and 1,6 U of Taq DNA polymerase in 1x in reaction buffer solution (Promega) with the following reaction profile: 45 cycles at 38 °C for 1 minute, at 72 °C for 2 minutes, at 94 °C for 1 minute with initial denaturation at 94 °C for 5 minutes and final extension at 72 °C for 7 minutes. The PCR products were separated by horizontal electrophoresis on 2% agarose gel (NuSieve 3:1) in 1x TBE (buffer solution TRIS borate – EDTA) with ethidium bromide (0,1 g / 1 ml of gel) with molecular marker (standard).

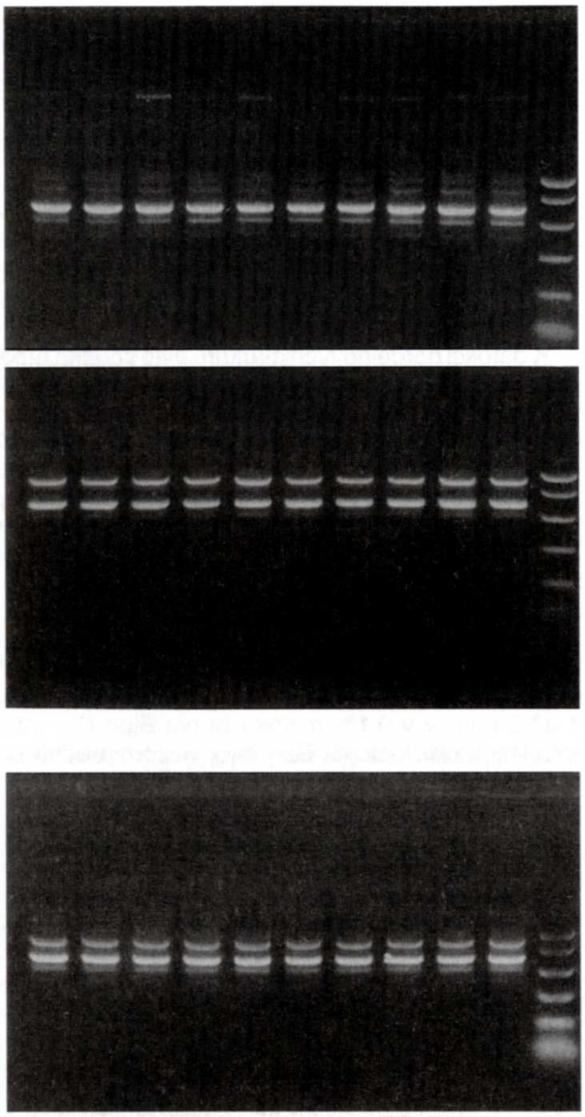
3 RESULTS AND DISCUSSION

By means of the analysis of electrophoresed hordeins in Akcent and Kompakt varieties, two types (A and B) of spectra were found, in case of Forum variety one type (*see fig. 1*) of spectra was found. While the Forum variety has the specific homogeneity of hordein markers, the varieties Akcent and Kompakt have non-specific heterogeneity. The Akcent A hordein type is identical with one known type in Sladko variety and, the Kompakt A type is identical with the only known type in the Tolar variety. The identity of the hordein type of Akcent (Akcent A) and Sladko varieties can result from a high affinity grade (50% of the Salome variety ancestor / =HVS 827/). On the other hand, the specific hordein character of the Forum variety can be influenced during the breeding of malting barley by using of not so much frequent half-wildly grown erectoid form Hortpádsi Kétsoras [4]. The ratio of Akcent A and Akcent B hordein types was not determined. (In the analysed



Obr. 1 - Hordeinové typy: zleva Akcent A, Akcent B, Forum, Kompakt B a Kompakt A

Fig. 1 - Hordein types: From left: Akcent A, Akcent B, Forum, Kompakt B a Kompakt A



Obr. 2 - DNA markery detegované primerem AB 5.17 (zleva linie 1. – 10. – PCR z extraktů DNA jednotlivých obilek, linie 11. – hmotnostní standard 1000, 750, 500, 300, 150 a 50 bp.). Nahoře Akcent, uprostřed Forum, dole Kompakt

Fig. 2 - DNA markers detected by AB 5.17 primer (from left: lines 1. – 10. – PCR from DNA extracts of the individual seeds, line 11. – molecular standard 1000, 750, 500, 300, 150 a 50 bp.). Above: Akcent, in the middle: Forum, below: Kompakt

pocházejícího z odrůdových zkoušek ÚKZÚZ v roce 1998 byl detegován pouze hordeinový typ A). Poměr hordeinových typů Kompakt A a Kompakt B byl u vzorku odrůdy Kompakt pocházejícího z odrůdových zkoušek ÚKZÚZ v roce 1998 stanoven na 89 % + 11 % (nepublikovaná data). Relativně nízké zastoupení minoritního typu B u odrůdy Kompakt může v reálných analyzovaných vzorcích (zejména při nízkém počtu hodnocení) vést k záměně s odrůdou Tolar, případně u obchodních vzorků odrůdy Tolar, které by měly i minimální zastoupení příměsi Kompaktu, může dojít hodnotitel k chybnému závěru (při zaznamenání typu Kompakt B), že se jedná o odrůdově čistý vzorek odrůdy Kompakt.

Při hodnocení DNA markerů detegovaných primerem AB 5.17 bylo zjištěno, že tento primer vykazuje homogenitu (v rozsahu povedených analýz) u všech tří sledovaných odrůd. DNA marker u odrůdy Akcent má velikost přibližně 600 párů bazí (bp) a umožňuje odlišení této odrůdy od odrůd Forum a Kompakt. Naproti tomu Kompakt není odlišitelný při použití tohoto primeru od odrůdy Forum (*obr. 2*). U obou odrůd byly detegovány shodné DNA markery o velikosti přibližně 900 a 600 bp. DNA markery detegované prostřednictvím primeru AB 5.17 u odrůd Forum a Kompakt není možné považovat za specifické. Vzhledem k nízkému počtu sledovaných odrůd je obtížné se vyjádřit ke specifičnosti DNA markeru detegovaného použitým primerem u odrůdy Akcent. Pro vzájemné odlišení uvedených odrůd je třeba použít jiné vhodné primery.

Vlastnost homogenity biochemických markerů je možné v případech předpokládané vysoké odrůdové čistoty vzorků využít pro zvýšení výpovědní hodnoty analýz při zachování

collection of 100 seeds of the Akcent variety sample from the variety trials of the CISTA in 1998, only the hordein type A was detected). The ratio of Kompakt and Kompakt B hordein types of the Kompakt variety sample from variety trials of the CISTA in 1998 was 89% + 11% (non-published data). A relatively low abundance of the B minor type of the Kompakt variety can, in case of factual analyzed samples (especially at a low number of evaluations), result in a faulty commutation with the Tolar variety. Or, in case of the Tolar variety commercial samples, that would have even a minimum Kompakt admixture, an evaluator can come to a wrong conclusion (when Kompakt B type determined) that it is the Kompakt variety samples without the above mentioned admixtures.

When evaluating the DNA markers detected by the AB 5.17 primer, it was found that this marker shows homogeneity (within the scope of analysis done) in case of all three varieties followed. The DNA marker of the Akcent variety has a size of approximately 600 base pairs (bp) and enables to differentiate this variety from the Forum and Kompakt varieties. On the other hand, the Kompakt variety is not differentiable when using this primes with the Forum variety (*see fig. 2*). In case of both varieties, identical DNA markers of a size of about 900 and 600 bp were detected. The DNA markers detected by the AB 5.17 primer at Forum and Kompakt varieties cannot be considered as specific ones. With regard to a low number of the varieties followed it is difficult to indicate the specificity of the DNA marker detected by used marker at the Akcent variety. For the mutual differentiation of the varieties mentioned it other appropriate markers are necessary to be used.

stejných materiálních nákladů tím způsobem, že analýzy jsou prováděny z extraktů dvou či více obilek.

4 ZÁVĚR

Na příkladech významných odrůd sladovnického ječmene českého a slovenského původu Akcent, Forum a Kompakt je v příspěvku uvedena odrůdová homogenita a heterogenita hordeinových a DNA markerů a jejich specifičnost pro soubor odrůd uvedených v Seznamu doporučených odrůd. Uvedené příklady dokumentují vhodnost využití hordeinových i DNA markerů pro identifikaci odrůd sladovnického ječmene, avšak jejich samostatné a oddělené použití neposkytuje možnost zcela univerzálního a jednoznačného přístupu pro soubor současných odrůd pěstovaných v ČR.

Homogenní biochemické markery je možné využít pro efektivnější zhodnocení prováděných analýz při identifikaci odrůd tím, že analýzy jsou prováděny z extraktů dvou či více obilek.

Práce byla řešena v rámci projektů Národní agentury pro zemědělský výzkum EP 960006067 (Výzkum a hodnocení kvality potravinářských obilovin) a EP 7283 [Identifikace (DNA fingerprinting) odrůd ječmene a rozpracovaného šlechtitelského materiálu pro využití ve šlechtění a sladařském průmyslu].

Literatura

[1] BASAŘOVÁ, G., et al.: Pivovarsko-sladařská analytika. Merkanta, Praha 1992
[2] BECKER, J., HEUN, M.: Plant Molecular Biology **27**, 1995, s. 835
[3] JONES, B. L., HEISEL, S.: J.Am.Soc.Brew.Chem. **49**, 1991, (3), s. 93
[4] LEKEŠ, J.: Šlechtění obilovin na území Československa. Brázda, Praha 1997
[5] ŠAŠEK, A., ČERNÝ, J., BRADOVÁ, J.: Rostlinná výroba **37**, 1991 (6-7), s. 565
[6] WILLIAMS, J. G. K., et al.: Nucleic Acids Res. **18**, 1990, s. 6531
[7] Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize České republiky k 1. 9. 1998. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, odbor odrůdového zkušebnictví, Brno 1998

Lektorovala Prof. Ing. G. Basařová, DrSc.
Do redakce došlo 21.12.1999

The property of biochemical marker homogeneity is possible (supposing the samples are of high variety purity) to be used for the increase of the information value of the analysis under the same material costs in such a way that the analysis is done from the extracts of two or more seeds.

4 CONCLUSIONS

On the examples of the significant malting barley varieties of Czech and Slovak origin Akcent, Forum and Kompakt, variety homogeneity and heterogeneity of hordein and DNA markers and their specificity for the collection of the varieties recorded in The list of recommended varieties have been described. The examples document the suitability for the use of hordein and DNA markers for the identification of malting barley varieties, but their individual and separete use does not provide the possibility of a universal and definite procedure for the varieties currently grown in the Czech Republic.

Homogeneous biochemical markers are possible to be used for a more effective evaluation of the analysis done for variety identification in such a way that the anylysis is done from the extracts of two or more seeds.

The work has been carried out within the project of the National agency for agricultural research EP 960006067 [Research and evaluation of food cerelas quality] and EP 7283 [Identification (DNA fingerprinting) of barley varieties and cultivated material in process for the use in cultivation and malting industry].

References

[1] BASAŘOVÁ, G., et al.: Pivovarsko-sladařská analytika. Merkanta, Praha 1992
[2] BECKER, J. and HEUN, M.: Plant Molecular Biology **27**, 1995, p.835
[3] JONES, B. L., HEISEL, S.: J.Am.Soc.Brew.Chem. **49**, 1991, (3), p. 93
[4] LEKEŠ, J.: Šlechtění obilovin na území Československa. Brázda, Praha 1997
[5] ŠAŠEK, A., ČERNÝ, J., BRADOVÁ, J.: Rostlinná výroba **37**, 1991 (6-7), p. 565
[6] WILLIAMS, J. G. K., et al.: Nucleic Acids Res. **18**, 1990, p. 6531
[7] Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize České republiky k 1. 9. 1998. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, odbor odrůdového zkušebnictví, Brno 1998