



# NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠĽACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKÝCH RASTLÍN

PIEŠŤANY, 2005

Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany  
Sekcia genetiky, šľachtenia a semenárstva Odboru rastlinnej  
výroby Slovenskej akadémie pôdohospodárskych vied

**NOVÉ POZNATKY  
Z GENETIKY A ŠĽACHTENIA  
POĽNOHOSPODÁRSKÝCH RASTLÍN**

Zborník z 12. odborného seminára  
23.-24. november 2005

**Názov: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.**

**Editor: Martin Užík**

**Recenzent: doc. Ing. Ján Brindza, CSc., SPU Nitra  
doc. Ing. Miroslav Zima, CSc., UKF Nitra**

**Autorský kolektív:**

Adam Michal	Hudec Jozef	Ondrušíková Eva
Bauer Miroslav	Hunková Elena	Ondřej Michal
Bednář Jan	Chňapek Milan	Pastirčák Martin
Benediková Daniela	Jakábová Anna	Patzak Jozef
Benková Michaela	Jakešová Hana	Pavelek Martin
Bežo Milan	Jandurová Olga M.	Perečko Dušan
Bobák Milan	Ježíšková Ivana	Piaková Zuzana
Boček Stanislav	Jungmanová Barbara	Pittnerová Soňa
Bojnanská Katarína	Kádasi-Horáková Miriam	Porubová Marie
Brestič Marián	Kováčová Zuzana	Preťová Anna
Burešová Iva	Kovár Marek	Rafay Ján
Čiváň Peter	Kraic Ján	Rückschloss Lubomír
Červená Viera	Krivosudská Eleonóra	Řepková Jana
Čurn Vladislav	Križan Břetislav	Řezníček Vojtěch
Debreová Katarína	Krofta Karel	Salaj Ján
Dobrodenka Miroslav	Kučerová Anna	Siekel Peter
Dokupil Tibor	Kúdela Otakar	Smýkal Petr
Dostálová Radmila	Kuchta Tomáš	Svitáčková Běla
Dragůň Marián	Kutarňová Zuzana	Šajgalík Michal
Dragůňová Marta	Libantová Jana	Štefanka Jozef
Dreiseitl Antonín	Libiaková Gabriela	Štefúnová Veronika
Drobná Jarmila	Lichtnerová Helena	Švec Miroslav
Dunca Juraj	Lízal Pavel	Švec Ondřej
Duncová Alena	Martinek Petr	Tejklová Eva
Fejér Jozef	Masár Štefan	Teturová Kateřina
Ferencová Jana	Masárová Kvetoslava	Trčková Kamila
Filová Angelika	Matušíková Ildikó	Trojan Rudolf
Forišeková Kvetoslava	Matysová Bohumila	Tyller Roman
Gajdošová Alena	Mihálik Daniel	Uher Jiří
Galliková Andrea	Michalík Ivan	Urminská Dana
Gálová Zdenka	Miklášová Katarína	Užík Martin
Glasa Miroslav	Mikulíková Daniela	Vaculková Eva
Gregáňová Želmíra	Mikulová Katarína	Vajcíková Viera
Gubiš Jozef	Mlynárová Ľudmila	Vančo Bernard
Hájková Petra	Moravčíková Jana	Varga Ladislav
Hasalová Ivana	Múdry Pavol	Vinklárková Petra
Heldák Ján	Muchová Darina	Žofajová Alžbeta
Hellebrandová Lenka	Nesvadba Vladimír	
Hlinková Elena	Nesvadba Zdeněk	
Hoblík Ján	Neugebauerová Jarmila	
Horáček Jiří	Obert Bohuš	
Hornáková Oľga	Odstrčilová Lenka	
Hrubý Jan	Olšovská Katarína	
Hudcovicová Martina	Ondrejčák František	

© Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 80-88790-43-3

## Obsah

### Prednášky

UŽÍK, M.: Modelovanie a predikcia v šľachtení rastlín.....	8
MICHALÍK, I. – URMINSKÁ, D.: Nové poznatky v oblasti štúdia molekulárnych mechanizmov klíčenia a prerastania zrna pšenice.....	12
GÁLOVÁ, Z. - MICHALÍK, I. - HOBLÍK, J. - CHŇAPEK, M. - GREGEŇOVÁ, Ž.: Celiakálne aktívne bielkoviny v cereáliách a pseudocereáliách.....	17
MÚDRY, P. - DRAGŮŇ, M.: Proteomická klasifikácia samoopelivých línii a ich dvojlíniových hybridov kukurice siatej ( <i>Zea mays</i> L.) izoenzymovými markermi – realita a perspektívy využitia.....	19
ŽOFAJOVÁ, A. - UŽÍK, M. - MIHÁLIK, D. - ŠAJGALÍK, M.: Vplyv a využitie génov krátkosteblovosti v šľachtení pšenice.....	23
HELDÁK, J. – BEŽO, M. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – DEBŘEOVÁ, K. – FORIŠEKOVÁ, K. – GALLIKOVÁ, A.: Dedičnosť génov rezistencie proti víru Y zemiaka (PVY) v hybridoch z vybraných genetických zdrojov ľuľka zemiakového ( <i>Solanum tuberosum</i> L.).....	27
JANDUROVÁ, O.: Klonová selekce u révy vinné.....	31
HÁJKOVÁ, P. - PORUBOVÁ, M.: Využití molekulárního fingerprinteru pro identifikaci a odlišení hybridů kukuřice ( <i>Zea mays</i> L.).....	34
HORÁČEK, J. - SMÝKAL, P. - PAVELEK, M.: Využití molekulárních markerů pro odlišování odrůd lnu.....	38
TETUROVÁ, K. – ŘEPKOVÁ, J. – LÍZAL, P. – DREISEITL, A.: Lokalizace nového genu odolnosti k padlí travnímu u <i>Hordeum vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i> pomocí DNA markerů.....	42
KÚDELA, O. - GLASA, M.: Diagnostika fytopatogénov v šľachtiteľských programoch.....	46
HLINKOVÁ, E. – PEREČKO, D. – RAFAY, J. – KOVÁČOVÁ, Z. – BOBÁK, M. – KUTARŇOVÁ, Z.: Exochitinázy a exo $\beta$ -1,3-glukanázy syntetizované v primárnych listoch jačmeňa po infekcii múčnatkou v období sporulácie patogénov.....	49
MASÁR, Š. - MASÁROVÁ, K.; - UŽÍK, M. - MUCHOVÁ, D. - ONDREJČÁK, F. - PASTIRČÁK, M. - VANČO, B.: Rezistencia a tolerancia populácií pšenice proti septórii plevovej a <i>Fusarium culmorum</i> .....	53
NESVADBA, V. - PATZAK, J. - KROFTA, K.: Problematika šľachtění chmele ( <i>Humulus lupulus</i> L.) na odolnosť k houbovým chorobám.....	57
BOČEK, S.: Porovnaní vybraných klonů jabloní vyšlechtěných na rezistenci vůči <i>Venturia inaequalis</i> (Cke.) Wint., původci strupovitosti jabloně.....	61
CIVÁŇ, P. - ŠVEC, M. - MIKULOVÁ, K. - KUČHTA, T. - SIEKEL, P.: Využitie metódy RAPD pri štúdiu evolúcie pšenice dvojrzrovej [ <i>Triticum turgidum</i> sbsp. <i>dicoccum</i> (Schränk)].....	65
MIKULÍKOVÁ, D. - KRAIC, J. - HORŇÁKOVÁ, O. - BENKOVÁ, M.: Strukoviny ako zdroj zdraviu prospešného škrobu.....	69
ŠAJGALÍK, M. - HORŇÁKOVÁ, O.: Rozšírenie charakterizácie genetických zdrojov fazule pomocou mikrosatelitov.....	73
SVITÁČKOVÁ, B. - KUČEROVÁ, A.: Současný stav v udržování tzv. starých růží pro potřeby šlechtění.....	76
UHER, J.: Hodnocení a šlechtění světlíce barvířské ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) na MZLU v Brně.....	79
TEJKLOVÁ, E. - MATYSOVÁ, B. - HORÁČEK, J. - ONDŘEJ, M. - ODSTRČILOVÁ, L. – PAVELEK, M.: Genové zdroje pro výzkum a šlechtění olejného lnu.....	84
NEUGEBAUEROVÁ, J.: Hodnocení genofondu lékořice ( <i>Glycyrrhiza</i> L., <i>fabaceae</i> ) z hlediska obsahu glycyrrhizinu.....	89
ŘEZNÍČEK, V.: Evidence výskutu starých a krajových odrůd ve vybraných lokalitách ČR.....	91

**Postery**

JAKEŠOVÁ, H. - JUNGMANOVÁ, B. - ŘEPKOVÁ, J.: Využití průtokové cytometrie pro identifikaci mezidruhových hybridů rodu <i>Trifolium</i> .....	95
MASÁROVÁ, K. - MASÁR, Š.: Možnosti použitia tritordea pre rozšírenie genetickej variability pšenice.....	97
VYHNÁNEK, T. - BEDNÁŘ, J.: Výsledky detekce polymorfizmu DNA tritikale pomocí RAPD a SSR markerů.....	99
JEŽÍŠKOVÁ, I. - NESVADBA, Z. - VYHNÁNEK, T. - HELLEBRANDOVÁ, L.: Využití RAPD a SCAR markerů pro predikci odolnosti vůči FHP u vybraných genotypů ječmene jarního.....	101
GAJDOŠOVÁ, A. - LIBIAKOVÁ, G. - FEJÉR, J.: Aplikácia radiačnej mutagenézy v šľachtení láskavca.....	103
BUREŠOVÁ, I. - MARTINEK, P.: Pekařská kvalita tritikale s HMW podjednotkami <i>Glu-D1 5+10</i> .....	105
DOSTÁLOVÁ, R. – ONDŘEJ, M. – TROJAN, R. – HASALOVÁ, I. – TYLLER, R.: Šlechtění hrachu proti hubovým patogénům.....	109
GREGÁŇOVÁ, Ž. - GÁLOVÁ, Z. - CHŇAPEK, M.: Detekcia technologickej kvality pšenice pomocou multiplexnej PCR metódy.....	111
UŽÍK, M. - RŮCKSCHLOSS, E. – ŽOFAJOVÁ, A.: Model analýzy úrody zrna ozimnej pšenice v generácii V1.....	113
ŽOFAJOVÁ, A.: Produktivita a kvalita dihaploidných línií jačmeňa siateho jarného.....	115
FILOVÁ, A. - MIKLÁŠOVÁ, K. - VARGA, L.: Kalogenéza a regenerácia vybraných chemotypov tisu v <i>in vitro</i> .....	117
LIBANTOVÁ, J. – MORAVČÍKOVÁ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I.: Izolácia fragmentu génu glukonázy z rosičky okrúhloľistej ( <i>Drosera rotundifolia</i> ).....	119
MORAVČÍKOVÁ, J. - LIBANTOVÁ, J. – HELDÁK, J. – GREGÁŇOVÁ, Ž. – GÁLOVÁ, Z. – MATUŠÍKOVÁ, I. – SALAJ, J.: Vplyv indukovateľnej expresie PR génov v transgénnych zemiakoch na zvýšenie odolnosti k hubovým ochoreniam.....	121
VACULKOVÁ, E. - LIBANTOVÁ, J. – MORAVČÍKOVÁ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – BAUER, M. – MLYNÁROVÁ, E.: Molekulárno-biochemické analýzy transgénnych rastlín tabaku obsahujúcich Cre/lox rekombinačný systém.....	123
LICHTNEROVÁ, H. - DRAGŮŇOVÁ, M. - DOKUPIL, T. - JAKÁBOVÁ, A.: Mikrorozmnožovanie rodu <i>Hibiscus</i> .....	125
HÁJKOVÁ, P. - HRUBÝ, J. - ČURN, V. - ŽALUDOVÁ, J.: Výskyt, prenos a detekce genetiky modifikované řepky olejné ( <i>Brassica napus</i> L. var. <i>Napus</i> ).....	127
KOVÁČOVÁ, Z. - OBERT, B. - PREŤOVÁ, A.: Vplyv 2,4-D na morfogénnu reakciu rôznych častí hypokotylu ľanu <i>in vitro</i> .....	129
KŘÍŽAN, B. - ONDRUŠÍKOVÁ, E. - TRČKOVÁ, K.: Produkce bezvirozních rostlin révy v české republice....	131
BARTOŠOVÁ, Z. - PREŤOVÁ, A.: Perspektivy peľnicovej kultúry ľanu siateho.....	133
GLASA, M. - PITTNEROVÁ, S. - KÚDELA, O.: Potential role of tolerant plums in the spread of Plum pox virus in Slovakia.....	135
KÚDELA, O. - VAJCÍKOVÁ, V. - PITTNEROVÁ, S. - GLASA, M.: Vírusové ochorenia obilnín.....	137
ADAM, M.: Stanovení korelace mezi relativní koncentrací viru <i>Plum pox virus</i> a teplotou za vegetace.....	139
GUBIŠ, J. - HUDCOVICOVÁ, M. - ČERVENÁ, V. - BOJNANSKÁ, K. - PASTIRČÁK, M.: Kvantitatívna analýza patogénov obilnín pomocou real-time PCR.....	143
MASÁROVÁ, K. – ČERVENÁ, V. – GUBIŠ, J. – MASÁR, Š.: Testovanie mezidruhových hybridov jačmeňa	145

na rezistenciu proti <i>B. graminis</i> a <i>P. teres</i> v F <sub>2</sub> a BC <sub>1</sub> generácii.....	
BOJNANSKÁ, K.: Odolnosť novošľachtencov pšenice letnej voči múčnatke trávovej na pšenici.....	147
ČERVENÁ, V.: Ktoré gény rezistencie jačmeňa dokážu zabezpečiť ochranu pred múčnatkou trávovou na jačmeni?.....	149
VANČO, B.: Zhodnotenie reakcie registrovaných odrôd pšenice letnej f. ozimnej na infekciu hubou <i>Stagonospora nodorum</i> Berk. v rokoch 2001-2004.....	151
VANČO, B.: Vplyv odrody pšenice ozimnej na produkciu pyknidiospór huby <i>Stagonospora nodorum</i> BERK....	153
PIÁKOVÁ, Z. - HÁJKOVÁ, P. - PORUBOVÁ, M.: Využití metody mikrosatelitů (SSRs) pro studium rezistence kukuřice ( <i>Zea mays</i> L.) k viru mozaiky cukrové třtiny (SCMV).....	155
FORIŠEKOVÁ, K. - HELDÁK, J.: Zmeny vo výskyte rás v populácii plesne zemiakovej na Slovensku v rokoch 1996-2005.....	157
BENEDIKOVÁ, D.: Súčasný potenciál genetických zdrojov ovocných druhov využiteľný v šľachtení.....	159
DUNCA, J. - DUNCOVÁ, A. - ŠVEC, D.: Využitie niektorých matematických metód pri štúdiu fyzikálnych vlastností stebiel obilnín.....	161
MATYSOVÁ, B. - PAVELEK, M. - VINKLÁRKOVÁ, P.: Postupy směřující k získání dat pro tvorbu core-kolekce lnu ( <i>Linum usitatissimum</i> ).....	164
DROBNÁ, J.: Štúdium a využitie divorastúcich príbuzných druhov rastlín.....	166
ŽÁKOVÁ, M. - BENKOVÁ, M.: Podmienky použitia analýzy rozptylu v hodnotení genetických zdrojov rastlín jačmeňa.....	168
BENKOVÁ, M. - ŽÁKOVÁ, M.: Charakterizácia genotypov jačmeňa viacrozmernou analýzou.....	170
FILOVÁ, A. – BRESTIČ, M. – DOBRODENKA, M. – ŠTEFANKA, J.: Účinok osmotického stresu na rast a vývin klíčiacych semien vybraných kultivarov sóje fazuľovej ( <i>Glycine max.</i> (L.) Merr.).....	172
KOVÁR, M. - KÁDASI-HORÁKOVÁ, M.: Úloha prolínu v ochrane biologických procesov rastlín počas stresu.....	174
KOVÁR, M. – KÁDASI-HORÁKOVÁ, - HUDEC, J.: Regulácia gazometrickej výmeny plynov foliárnou aplikáciou potenciálnych antistresových látok.....	176
KADÁSI-HORÁKOVÁ, M. - KOVÁR, M.: Existujú rozdiely v antioxidantnej aktivite genotypov jarného jačmeňa s rôznou kapacitou pre osmotické prispôsobenie?.....	178
ŽIVČÁK, M. - BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K. – HUNKOVÁ, E. – FERENCOVÁ, J.: Determinácia citlivosti fotosyntetického aparátu genotypov pšenice na sucho a vysokú teplotu.....	180
KRIVOSUDSKÁ, E. – BRESTIČ, M. – DOBRODENKA, M. – ŠTEFANKA, J.: Charakteristika vybraných genotypov hrachu siateho v podmienkach vodného stresu.....	182
KRIVOSUDSKÁ, E. - BRESTIČ, M.: Charakteristika vybraných genotypov cícera baranieho v podmienkach vodného stresu.....	184

## DETEKCIA TECHNOLOGICKEJ KVALITY PŠENICE POMOCOU MULTIPLEXNEJ PCR METÓDY DETECTION OF WHEAT TECHNOLOGICAL QUALITY BY MULTIPLEX PCR METHOD

Želmíra GREGÁŇOVÁ - Zdenka GÁLOVÁ - Milan CHŇAPEK

*The aim of our work was to analyse a set of 33 new wheat genotypes and wheat cultivars for the presence of DNA markers linked with genes encoding major HMW glutenin subunits at *GluA1*, *GluB1* and *GluD1* loci by multiplex PCR method by using three allele specific primer pairs in a single PCR reaction and agarose gel assay. PCR analysis were compared with protein analysis done by SDS-PAGE. Multiplex PCR analysis for genes controlling bread-making quality confirmed that primers used in the present study are specific for the studied alleles and can be used for the detection of the wheat technological quality.*

*Key words: Triticum aestivum L., HMW glutenin subunits, multiplex PCR, DNA marker, bread-making quality*

### Úvod

HMW glutenínové podjednotky sú markermi technologickej kvality pšenice. Gény, ktoré ich kódujú je možné detekovať pomocou tesne viazaných vyvinutých DNA markerov. Vyvinuté DNA markery umožňujú rýchlu a spoľahlivú detekciu týchto génov, pričom nie je potrebné čakať na ich fenotypovú expresiu. Cieľom práce bolo pomocou PCR reakcie analyzovať súbor 33 novošľachtencov a odrôd pšenice letnej na prítomnosť DNA markerov pomocou multiplexnej PCR reakcie na prítomnosť hlavných HMW glutenínových génov na *Glu-A1*, *Glu-B1* a *Glu-D1* lokusoch v jednej reakcii. Na základe detekovaných DNA markerov predikovať technologickú kvalitu pšenice.

### Materiál a metódy

Analyzovaných bolo 33 novošľachtencov a odrôd pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum L.*), pričom vzorky boli poskytnuté odborom skúšobníctva UKSÚP v Bratislave zo skúšobnej stanice Želiezovce. Izoláciu DNA pšenice sme uskutočnili podľa DELLAPORTU et al. (1983) a GRANERA (1990). Multiplexné PCR reakcie boli uskutočnené pomocou už publikovaných párov oligonukleotidových primerov (MA et al., 2003) v 20 µl reakčnej zmesi v termocykleri MJ Research PTC-200. Elektroforetická separácia DNA amplifikovaných fragmentov bola realizovaná v 1,2 % agarózových géloch v prítomnosti etídiumbromidu. Detekcia fragmentov bola uskutočnená pod UV lampou. Ako štandard veľkosti DNA fragmentov bol použitý 100-bp DNA marker.

### Výsledky a diskusia

Na analýzy detekcie hlavných génov, ktoré kódujú podjednotky na *GluA1*, *GluB1* a *GluD1* lokuse v 33 odrodách a novošľachtencoch pšenice boli použité tri páry alelovo špecifických PCR primerov, ktoré vyvinul a popísal MA et al. (2003). Tieto tri páry primerov umožňujú v jednej reakcii odlišiť najvýznamnejšie podjednotky zo všetkých troch genómov. Prvý marker naznačuje Ax2\* gén z *GluA1* lokusu na základe získaného fragmentu o veľkosti 344bp (Obrázok 1), ktorý sme detekovali pri 6 genotypoch z celého súboru 33 genotypov pšenice. Na *Glu-B1* lokuse sme pomocou alelovo špecifického páru primerov detekovali gén kódujúci HMW podjednotku 1Bx7 pri 29 genotypoch pšenice ako dva fragmenty o veľkosti 630 bp a 766 bp, alelický pár 1Bx17+1By18 sme pozorovali pri dvoch odrodách pšenice letnej s veľkosťou fragmentu 669 bp a 1Bx6+1By8 pár HMW podjednotiek sme detekovali pri troch genotypoch pšenice.

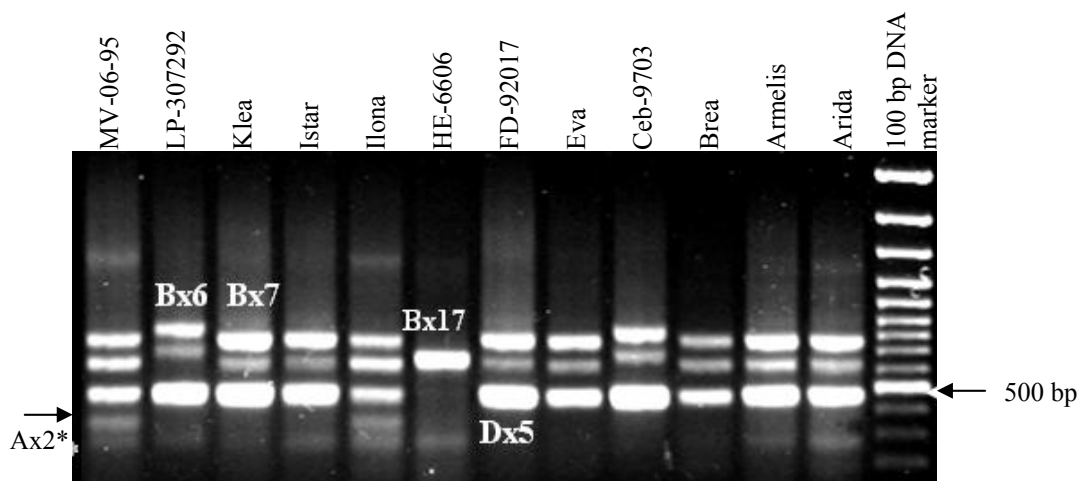
Získané výsledky sme porovnali s analýzami zásobných bielkovín na detekciu HMW podjednotiek na *GluA1*, *GluB1* a *GluD1* lokuse uskutočnených pomocou SDS-PAGE (GÁLOVÁ et al., 2003). Výsledky sa zhodovali čo nám naznačilo možnosť ich ďalšieho využitia hlavne v šľachtení pri zabudovávaní HMW génov na zlepšenie technologickej kvality pšenice v šľachtiteľských programoch, pretože v priebehu jedného dňa je možné analyzovať veľké množstvo vzoriek.

Dané DNA markery sú alternatívnou cestou detekcie technologickej kvality pšenice, pričom analýzy detekcie HMW génov sú založené na PCR reakcii, sú rýchlo a jednoducho uskutočniteľné už z malého množstva DNA, pričom analýzu glutenínov pomocou SDS-PAGE je možné uskutočniť len zo zrna.

### Záver

Rýchla identifikácia molekulárnych markerov *Glu-1* génov multiplexnou PCR môže byť alternatívou k štandardnému postupu separácie pre skorý výber genotypov pšenice pre účely markerovo - asistovanej selekcie. Multiplexná PCR je tiež omnoho jednoduchšia a využiteľnejšia než SDS-PAGE, pretože DNA na PCR reakciu sa môže získať z ktorejkoľvek časti rastliny a v ľubovoľnom vývinovom štádiu pšenice, oproti SDS-PAGE, kde sa na analýzu môžu použiť len pšeničné zrná (MOCZULSKI a SALMANOWICZ, 2003). Použitie DNA markery detekujúce zloženie HMW glutenínov pšeničných línií sú mimoriadne dôležité na

determináciu funkčných vlastností pšeničného gluténu, no tieto DNA markery môžu byť tiež využiteľné pre účely identifikácie odrôd pšenice.



**Obrázok 1:** Detekcia amplifikačných produktov multiplexnej PCR reakcie v 1,2 % agarózovom géli. Šípka vpravo označuje fragment o veľkosti 500bp v 100 bp DNA dĺžkovom markere. Šípka vľavo fragment o veľkosti 344 bp.

#### Literatúra

1. DELLAPORTA, S. L. – WOOD, J. – HICKS, J. B.: Plant DNA minipreparation: version II. In: Plant Mol Biol Rep, vol. 1, 1983, p.19-21.
2. GÁLOVÁ, Z. – STAROVIČOVÁ, M. – KNOBLOCHOVÁ, H. – GREGÁŇOVÁ, Ž.: Biochemical and molecular characterization of new wheat genotypes. In: Biologia, vol. 58, 2003, p. 1061-1066.
3. GRANER, A. - SIEDLER, H. - JAHOR, A. et al.: Assessment of the degree and the type of restriction fragment length polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). In: Theor Appl Genet, vol. 80, 1990, p. 826-832.
4. MA, W. - ZHANG, W. - GALE, KR. : Multiplex –PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. In: Euphytica, vol. 134, 2003, p. 51-60.
5. MOCZULSKI, M. – SALMANOWICZ, B. P.: Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers. In : J. Appl. Genet., vol. 44, 2003, p. 459-471.

*Podakovanie:* Autori si dovoľujú poďakovať vedeniu ÚKSUP v Bratislave za poskytnutie vzoriek zrna pšenice na analýzu. Táto práca bola vypracovaná v rámci VEGA projektu No. 1/0599/03.

Adresa autorov:

Želmíra GREGÁŇOVÁ, Zdenka GÁLOVÁ, Milan CHŇAPEK, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, e-mail: Zelmira.Greganova@uniag.sk



## MODEL ANALÝZY ÚRODY ZRNA PŠENICE V GENERÁCII V1 MODEL OF GRAIN YIELD ANALYSIS OF WHEAT IN V1 GENERATION

Martin UŽÍK - Ľubomír RŮCKSCHLOSS – Alžbeta ŽOFAJOVÁ

*Experimental model for estimation experimental error for statistical evaluation of reliability is presented. Model is based on elimination of field heterogeneity in the linear direction and adjusting of traits depending on field heterogeneity to control varieties.*

*Key words: experimental model, augmented model, early generation of selection, wheat*

### Úvod

V každej etape šľachtenia rastlín vzniká objektívna potreba štatisticky overiť získané výsledky, najmä spoľahlivosť rozdielu novošľachtencov od rodičov, prípadne od kontrolných odrôd. V prvej etape šľachtenia, keď sa selektuje rastlina, spoľahlivosť selekcie nie je možné overiť. Ani v ďalšej etape šľachtenia nie sú podmienky pre opakovanie členov v experimente. Počet členov je vysoký a množstvo osiva nedostatočné, takže línie, alebo kmene sa skúšajú v pokusoch bez opakovania. Ani zaradenie kontrolnej odrody a lineárna korekcia výsledkov podľa najbližších kontrol neumožňuje štatistické posúdenie získaných výsledkov. Východiskom sú tzv. augmented modely - široké modely, ktoré umožňujú elimináciu pôdnej heterogenity v jednom smere (FEDERER, 1961; FEDERER, RAGAVARAO, 1975; PETERSEN, 1994).

Cieľom práce bolo vypracovať taký model pre generáciu V1, ktorý umožní objektívne posúdenie získaných výsledkov, napriek tomu, že každý genotyp až na kontrolné odrody je zaradený neopakovane. Pri návrhu modelu sme vychádzali z overeného predpokladu, že experimentálna chyba nie je závislá od genotypu, ale od variability pozemku na ktorom je pokus založený a od náhodných vplyvov, ktoré nie je možné eliminovať. Pôdnu heterogenitu je možné odmerať pravidelne rozmiestnenými kontrolnými odrodami na experimentálnom pozemku a tak eliminovať jej vplyv na znaky, ktoré sú podmienené pôdnou variabilitou.

### Materiál a metódy

Základný experimentálny modul pozostáva z troch radov a troch podstĺpcov. Každý rad má 33 parciel, z toho 30 V1 genotypov a 3 rôzne kontrolné odrody K1, K2 a K3. V základnom module sa nad sebou nachádzajú 3 rady, pričom prvých 1 až 11 parciel zo všetkých troch radov nad sebou tvorí prvý podstĺpec, ďalšie parcely 12-22 druhý podstĺpec a od 23 –33 tretí podstĺpec. V podstĺpci je v každom rade iná kontrolná odroda. Vznikol tak modul, ktorý by sme mohli charakterizovať ako 3 rady, 3 podstĺpce a 3 kontrolné odrody. Rozmiestnenie kontrolných odrôd umožnilo spoľahlivo merať pôdnu variabilitu a odhadnúť experimentálnu chybu, ktorú sme použili na výpočet minimálnej diferencie. Modul, ktorý obsahuje 99 parciel sa môže ľubovoľne krát opakovať. Podstĺpce nachádzajúce sa nad sebou vytvárajú stĺpec. Z analýzy variancie kontrolných odrôd sa môžu vypočítať štandardné chyby (SE) pre rôzne porovnanie - V1 v tom istom bloku, V1 medzi rôznymi blokmi, ale pre selekciu je najzaujímavejšie porovnanie V1 voči kontrolným odrodám. Experimentálny model umožňuje adjustovať hodnoty V1 podľa kontrolných odrôd, a to podľa adjustačných koeficientov pre stĺpce, alebo pre rady (tab. 1).

### Výsledky a diskusia

Experimentálnu chybu kontrolných odrôd sme získali analýzou GLM (tab. 1). Analýza ukazuje, že v úrode zrna bez adjustácie boli významné rozdiely medzi radmi a stĺpcami a kontrolnými odrodami. Adjustácia podľa stĺpcov alebo podľa radov bola teda odôvodnená. Adjustácia nemenila variabilitu medzi kontrolnými odrodami, priemerné štvorce boli pre odrody tie isté po adjustácii ako pred adjustáciou. Adjustácia podľa radov odstránila rozdiely medzi radmi, ale významné rozdiely boli medzi stĺpcami a naopak adjustácia podľa stĺpcov neodstránila rozdiely medzi radmi. Výsledky sú výzvou vypracovať model priestorovej adjustácie.

Model experimentu umožňuje okrem výpočtu minimálnej diferencie aj adjustovať, korigovať úrody V1 podľa kontrolných odrôd a tak eliminovať vplyv pôdnej variability na výšku úrod jednotlivých V1. V tabuľke 2a, 2b uvádzame frekvenciu genotypov V1 podľa hodnoty adjustácie v percentách ku pozorovanej úrode V1. Korekcia pozorovanej úrody - adjustácia podľa riadkov sa pohybovala od 74 do 119 %, pričom najvyšší podiel V1 - 136 a 165, trieda 6, 7 malo korigovanú úrodu od 96 do 105 %. Korekcia, adjustácia podľa stĺpca (tab. 2b), zdá sa, že nie je korektná, lebo distribučná krivka adjustovaných hodnôt má dva vrcholy, čo opäť naznačuje, že použiť priestorový model na elimináciu pôdnej variability bolo by žiaduce.

**Selekcia z V1 do generácie V2.** Z celkového počtu V1 približne 10 % t.j. 52 V1 bolo vybrané do V2 generácie. Priemerná úroda vybraných V1 bola nižšia oproti kontrolným odrodám, keď dosahovala len 96,7 % ich úrovne. Z podsúboru 75 V1 s nadpriemernou úrodou, len 7 bolo vybraných do V2. Ako je vidieť, pri selekcii do ďalšej generácie rozhodujú podstatne väčšou mierou ďalšie kritéria ako úroda zrna.

## Záver

Vypracovaný experimentálny model umožňuje odhadnúť experimentálnu chybu pre štatistické posúdenie spoľahlivosti získaných výsledkov, eliminovať pôdnu heterogenitu v lineárnom smere a adjustovať hodnoty znakov závislých od pôdnej heterogenity ku kontrolným odrodám. Overenie efektívnosti uvedeného postupu umožní až generácia V2.

## Literatúra

1. FEDERER, W.T.: Augmented designs with one-way elimination of heterogeneity. *Biometrics*, 17, 1961, s. 447-473
2. FEDERER, W. T. – RAGAVARAO: On augmented designs. *Biometrics*, 31, 1975, s. 29-35
3. PETERSEN, R. G.: *Agricultural field experiments. Design and analysis.* New York – Basel – Hong Kong, 1994, p.409

**Tabuľka 1: Priemerné štvorce z AV (GLM) úrody zrna pozorovanej a adjustovanej (kontrolné odrody)**

Zdroj premenlivosti	Stupne voľnosti	MS		
		Pozorovaná úroda	Adjustovaná – riadky	Adjustovaná - stĺpce
Riadky	17	0,668 <sup>+</sup>	0,072	0,631 <sup>++</sup>
Stĺpce	2	1,789 <sup>++</sup>	1,789 <sup>++</sup>	0,000
Kontroly	2	0,963 <sup>+</sup>	0,963 <sup>+</sup>	0,963 <sup>+</sup>
Chyba	31	0,290	0,290	0,204
Spolu	52			
SE <sub>C</sub> (1)		0,179	0,179	0,150
SE <sub>vi</sub> (2)		0,410	0,410	0,288
SE <sub>vij</sub> (3)		0,879	0,879	0,737
SE <sub>v-c</sub> (4)		0,638	0,638	0,535
LSI = t <sub>q</sub> · SE <sub>v-c</sub>		1,071	1,071	0,898

(1) – medzi dvoma kontrolnými odrodami, (2) – medzi 2 V1 v tom istom bloku,  
(3) – medzi 2 V1 v rozdielnych blokoch, (4) – medzi V1 a priemerom kontrol

**Tabuľka 2a: Frekvencia línií V1 podľa úrody zrna – riadková adjustácia**

Trieda	Dolná hranica	Horná hranica	$\bar{x}$	Frekvencia	Relatívna frekvencia
1	74,0	78,5	76,3	1	17,0
2	78,5	83,1	80,8	0	0,0
3	83,1	87,6	85,4	0	0,0
4	87,6	92,2	89,9	95	16,3
5	92,2	96,7	94,5	98	16,8
6	96,7	101,3	99,0	136	23,3
7	101,3	105,8	103,5	165	28,3
8	105,8	110,4	108,1	58	9,9
9	110,4	114,9	112,6	29	4,9
10	114,9	119,5	117,2	1	17,0
11	119,5	124,0	121,7	0	0,0

**Tabuľka 2b: Frekvencia línií V1 podľa úrody zrna – stĺpcová adjustácia**

Trieda	Dolná hranica	Horná hranica	$\bar{x}$	Frekvencia	Relatívna frekvencia
1	87,0	89,2	88,1	1	17,0
2	89,3	91,5	90,4	0	0,0
3	91,5	93,8	92,6	30	5,2
4	93,8	96,1	94,9	144	24,7
5	96,1	98,4	97,2	89	15,3
6	98,4	100,6	99,5	22	3,8
7	100,6	102,9	101,8	96	16,5
8	102,9	105,2	104,0	132	22,6
9	105,2	107,5	106,3	36	6,2
10	107,5	109,7	108,6	26	4,5
11	109,7	112,0	110,9	7	1,2

Práca bola realizovaná v rámci Úlohy výskumu a vývoja 2003 SP 27/028 OD 01/028 OD 01 - 03-04-05.

## PRODUKTIVITA A KVALITA DIHAPLOIDNÝCH LÍNIÍ JAČMEŇA SIATEHO JARNÉHO PRODUCTIVITY AND QUALITY OF SPRING BARLEY DIHAPLOID LINES

Alžbeta ŽOFAJOVÁ

*In the years 2004 and 2005 productivity and grain yield quality of 5 spring barley dihaploid lines were evaluated and compared to control varieties originated from classical breeding. 4 DH lines had higher grain yield as control variety, however differences were not significant. Comparison productivity and quality of DH lines indicated their agronomical equivalence to control varieties.*

*Key words: spring barley, DH lines, productivity, quality*

### Úvod

Na zvýšenie podielu homozygotných jedincov v populácii po hybridizácii pri samopelivých plodinách, alebo na skrátenie procesu homozygotizácie po hybridizácii sa používajú rôzne metódy. Už od 60. rokov minulého storočia je za veľký prínos pre šľachtiteľské programy považovaný efektívny systém tvorby zdvojených haploidov (DH), kedy v priebehu jednej generácie sa získa homozygotná línia. Vytvorením populácií rekombinantných zdvojených haploidov sa minimálne o 2 roky skráti šľachtiteľský proces. Optimalizáciu techniky peľnicových kultúr pre šľachtenie jačmeňa uviedol MANNINEN (1997). Pretože sa jedná o drahé technológie v porovnaní s konvenčnými metódami, je potrebné venovať pozornosť aj výberu optimálnej generácie pre tvorbu dihaploidov (ŽOFAJOVÁ, UŽÍK, 2003).

Prehľad o počte registrovaných odrôd vo svete, pri šľachtení ktorých bola využitá niektorá z techník tvorby dihaploidov uviedli THOMAS et al. (2003). Z obilnín najviac registrovaných odrôd je pri jačmeni 95, pri pšenici 21 a pri 3 odrodách tritikale bola použitá jedna z metód tvorby dihaploidov (peľnicové kultúry, mikrosporové kultúry, vzdialená hybridizácia).

Cieľom práce bolo z hľadiska produktivity a kvality zhodnotiť súbor 5 DH línií jačmeňa siateho jarného a posúdiť ich využitie v programe šľachtenia.

### Materiál a metódy

Dihaploidné línie jačmeňa siateho jarného boli vytvorené technikou peľnicových kultúr. Klasy boli odoberané v strednom až neskorom jednojadrovom štádiu vývinu mikrospóry. Po chladovom predošetrení (sedem dní pri 4° C) boli peľnice kultivované na modifikovanom, pevnom MN6 médiu (OHNOUTKOVÁ, VAGERÁ, 1998). Ako regeneračné médium sme použili modifikované médium 190-2. Po získaní dostatočného množstva osiva, v rokoch 2004 a 2005 bol v záhrade VÚRV Piešťany metódou znáhodnených blokov založený poľný pokus (2 opakovania, parcela 0,675 m<sup>2</sup>). Súbor 5 DH línií bol hodnotený na obligátne znaky v priebehu vegetácie a porovnávaný s kontrolnými odrodami (Progres, Nitran). Pôvod DH línií je uvedený v tab. 1. Pomocou NIRS prístroja boli hodnotené znaky kvality zrna. Výsledky boli vyhodnotené pomocou štatistického balíka programov Statgrafics 5.0.

### Výsledky a diskusia

Medzi rokmi, okrem výšky porastu, úrody zrna a Kolbachovho čísla, boli štatisticky vysoko významné rozdiely pri ostatných hodnotených znakoch (tab. 1). Rok bol významným zdrojom premenlivosti hlavne pre znaky kvality. Podobne ako rok aj odrody boli významným zdrojom premenlivosti pri tých istých znakoch okrem diastatickej mohutnosti. Interakcia rok x odroda nebola významná ani pri jednom z hodnotených znakov. Napriek významnému vplyvu ročníka na niektoré znaky uvádzame jednotne priemerné hodnoty DH línií a kontrol za oba roky (tab. 2). Najvyššiu úrodu zrna mala línia 4 pochádzajúca z kríženia Amos x Galan, pričom prevýšila úrodnejšiu kontrolu Nitran o 4 %. V porovnaní s odrodou Progres vyššiu úrodu zrna mali 3 DH línie (2, 4, 5). Vyššia úroda zrna však bola spojená s nadpriemernou výškou porastu, okrem línie 2, kde došlo ku kombinácii podpriemernej výšky porastu s úrodou zrna porovnateľnou s kontrolami. Variačné rozpätie v obsahu bielkovín bolo od 13,3 (línia 2) po 14,7 (línia 5). Odroda Nitran, kontrola pre kvalitu dosiahla priemerný obsah bielkovín (13,9). Nadpriemerné hodnoty v tomto znaku mali DH línie pochádzajúce z kríženia Amos x Galan a naopak podpriemerné hodnoty v obsahu škrobu a extraktu. Odroda Nitran potvrdila svoju kategorizáciu v obsahu škrobu, ktorý mala z hodnotených odrôd najvyšší. Nadpriemerné hodnoty v obsahu škrobu a v obsahu extraktu okrem kontrol mali tiež línie 1, 2, 3. Hodnoty Kolbachovho čísla sa pohybovali od 35,4 (línia 5) po 37,9 (odroda Progres). V hmotnosti 1000 zrn DH línie dosiahli priemerné až podpriemerné hodnoty.

### Záver

Porovnanie produktivity a kvality 5 DH línií jačmeňa s odrodami získanými klasickým šľachtením (kontroly) naznačilo ich agronomickú rovnocennosť a reálnu využiteľnosť v šľachtení.

**Tabuľka 1: Priemerné štvorce z analýzy rozptylu znakov DH línií jačmeňa siateho jarného**

Zdroj premenlivosti	Stupne voľnosti	Výška porastu (cm)	Úroda zrna (g.m <sup>-2</sup> )	NIRS					Hmotnosť 1000 zrn (g)
				Obsah bielkovín	Obsah škrobu	Obsah extraktu	Kolb. číslo	Diastatická mohutnosť	
Rok (A)	1	39,2	3546	8,81 <sup>++</sup>	9,32 <sup>++</sup>	72,73 <sup>++</sup>	1,22	2584 <sup>+</sup>	402 <sup>++</sup>
Odrody (B)	6	26,8	1445	1,26 <sup>+</sup>	2,21 <sup>++</sup>	0,86 <sup>+</sup>	12,50 <sup>++</sup>	173	4,7 <sup>+</sup>
Opakovanie	1	11,5	2208	0,41	0,34	0,28	0,01	60	6,5
AB	6	5,4	2323	0,27	0,40	0,61	0,63	924	0,2
Chyba	13	12,6	4166	0,32	0,32	0,27	0,39	366	1,5
Celkom	27								

**Tabuľka 2: Priemerné hodnoty znakov DH línií jačmeňa siateho jarného skúšaných v poľnom pokuse v rokoch 2004 a 2005**

Oz n.	Pôvod	Výška porastu (cm)	Úroda zrna (g.m <sup>-2</sup> )	NIRS					Hmotnosť 1000 zrn (g)
				Obsah bielkovín	Obsah škrobu	Obsah extraktu	Kolb. číslo	Diastatická mohutnosť	
K <sub>1</sub>	Progres	73,0	694,6	13,4	59,7	77,8	39,7	371,8	50,0
K <sub>2</sub>	Nitran	74,1	696,5	13,9	60,6	77,6	36,5	363,0	49,6
1	SK 4548 x HE 5237	69,5	666,8	13,7	60,3	77,4	39,0	369,8	47,8
2	SK 4548 x HE 5237	69,5	694,7	13,3	60,3	77,8	39,2	365,0	47,2
3	HE 5237 x SK 4548	75,3	673,3	13,5	60,1	77,7	38,8	375,8	47,2
4	Amos x Galan	77,5	724,5	14,6	59,0	76,8	36,0	368,0	48,2
5	Amos x Galan	79,0	681,2	14,7	58,6	76,7	35,4	355,5	48,3
$\bar{x}$		74,0	690,2	13,9	59,8	77,4	37,8	367,0	48,3
SE		0,950	12,197	0,106	0,107	0,098	0,118	3,618	0,227

### Literatúra

- MANNINEN, O.: Optimizing anther culture for barley breeding. *Agricultural and food science in Finland*, 6, 1997, s. 389–398
- OHNOUŠKOVÁ, L. – VAGERÁ, J.: Indukce haploidního a polyhaploidního materiálu u obilnín. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín: Zborník zo 4. odborného seminára, Piešťany: VÚRV, 1998, s. 9–12*
- THOMAS, W.T.B. et al. 2003. Doubled haploids in breeding. In: MALUSZYNSKI et al.: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dundee : Scottish Crop Research Institute, 2003, s. 337-349.
- ŽOFAJOVÁ, A. – UŽÍK, M.: Hodnotenie F<sub>2</sub> populácií jačmeňa siateho jarného pre tvorbu dihaploidných línií. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín: Zborník z 10. odborného seminára 26. – 27. novembra 2003 /Ed. M. Užík – Piešťany: VÚRV, 2003, s.39-41*

Práca bola realizovaná v rámci Úlohy výskumu a vývoja 2003 SP 27/028 OD 01/028 OD 01 - 03-03-01.

Adresa autora:

Ing. Alžbeta Žofajová, PhD. Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 01 Piešťany, zofajova@vurv.sk

## KALOGENÉZA A REGENERÁCIA VYBRANÝCH CHEMOTYPOV TISU V *IN VITRO* CALLOGENESIS AND REGENERATION OF SELECTED CHEMOTYPES OF TAXUS *IN VITRO*

Angelika FILOVÁ – Katarína MIKLÁŠOVÁ - Ladislav VARGA

By two selected chemotypes of *Taxus* sp. (*Taxus baccata* a *Taxus cuspidata*) we watched intensity of callogenesis and *in vitro* regeneration. To induce callogenesis we used segments of one year old shoots of selected chemotypes and two variants Westvaco WV 1 and 2 medium (Coke, 1996). Dedifferentiation worked more intensive on variant WV2 enriched by 2.4 D + kinetin, but from the point of differentiation second variant WV1 (IAA +BAP) was preferable. On variant WV1 (IAA +BAP) regenerated 48.5% cali. The best reaction on cultivation condition in regeneration process had *Taxus baccata*. The fresh mass of cali was two times higher than by *Taxus cuspidata* chemotype.

Key words: *in vitro* methods, callogenesis, differentiation, regeneration, *Taxus baccata*, *Taxus cuspidata*

### Úvod

Progresívny vstup taxolu a jeho analógov do procesu tvorby antileukemických a protinádorových preparátov, podmienil rozpracovanie selekčných, pestovateľských a technologických podmienok využitia rastlinného druhu *Taxus baccata* L. Slovenská republika má v rámci Európy, ako jediná krajina, ucelenejšie a rozsiahlejšie pôvodné enklávy tohto druhu, čo predstavuje originálny selekčný súbor pre chemotypy s vysokým obsahom DEBAC (10-deacetylbaecatinu).

V tomto zmysle sú významným prínosom metódy *in vitro*, ktoré sú originálnym prostredím pre štúdium pôsobenia rôznych faktorov na rast, diferenciáciu, regeneráciu, či morfogézu. Systém umožňuje vytvoriť modelové prostredie pre jednotlivé stupne rastového a vývinového procesu, diferencovane sledovať vplyv jednotlivých faktorov a hľadať možnosti ich využitia v praxi.

Konkrétnym cieľom bolo zistiť kapacitu kalogenézy a regeneráciu rastlín v závislosti od chemotypu a kombinácie rastových regulátorov v kultivačnom médiu. Vyústením takýchto experimentov je evidovanie chemotypov tisu vhodných pre tvorbu biomasy s vysokým obsahom DEBACu v prostredí *in vitro*. Možnosti využitia techník *in vitro* na navodenie procesu kalogenézy a následnej diferenciácie popísal VANCE et al. (1994).

### Materiál a metódy

Pre našu prácu sme použili dva chemotypy tisú *Taxus baccata* a *Taxus cuspidata* pochádzajúce z Arboréta Mlyňany, na ktoré sa vzťahujú nasledovné charakteristiky (PAULE, 1993). Domovom *Taxus baccata* L. je Európa, Severná Afrika, Malá Ázia. Ako strom dorastá do výšky 12-20 m. Má vajcovitú, alebo z časti guľovitú korunu. Borka je červenohnedá, ihlice čiarkovité, 1-3 cm dlhé, krátko zašpicatené. Semená sú olivovo hnedej farby, obalené červeným, sladkastým mieškom. Známych je asi 90 kultivarov, významných v sadovníckej tvorbe.

Domovom *Taxus cuspidata* S. et Z. je Japonsko, kde rastie ako 20 m vysoký strom. U nás rastie väčšinou ako ker. Má červenohnedú kôru, červenasté letorasty, čiarkovité ihlice, ktoré sú náhle zašpicatené, 15-25 mm dlhé, žlté zelené. Semeno je vajcovité, mäkké s červeným mieškom. Známych je asi 20 foriem a kultivarov (HRUBÍK, 2005).

V máji sme odobrali z týchto dospelých jedincov mladé, nedrevnaté, jednoročné výhonky, pre založenie aseptickú kultúru v *in vitro*, v počte 150 explantátov z každého druhu. Samotná kultivácia prebiehala na dvoch variantoch živného média Westvaco: WV 1 obohatené o 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IAA+ 2,0 mg .l<sup>-1</sup> BAP

WV2 obohatené o 0,1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4D+ 0,5 mg .l<sup>-1</sup>kinetín

Podmienky kultivácie pre kalogenézu a samotnú regeneráciu explantátov boli rozdielne. Tvorba kalusov prebiehala v tme pri teplote 24 °C a dediferenciácia pri 16-hodinovej fotoperióde s intenzitou osvetlenia 500 μmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> a teplote 24 °C. Indukcia kalogenézy trvala 45 dní počas, ktorej sme previedli 3 subkultivácie s meraniami čerstvej hmoty kalusov. Po ukončení procesu kalogenézy sme kalusy premiestnili na nové kultivačné médium WV3 obohatené o 2,29 g .l<sup>-1</sup> L-Glutaminu, 30 g .l<sup>-1</sup> sacharózy, 3,0 mg .l<sup>-1</sup> 2,4D a 0,5mg.l<sup>-1</sup> BA s cieľom indukcie výhonov. Regenerácia explantátov trvala 35 dní.

### Výsledky a diskusia

Indukcia kalusov pri oboch chemotypoch bola úspešná na kultivačnom médiu WV2 (2,4D+kinetín). Na WV1 médiu (IAA+BAP) kalogenéza *Taxus cuspidata* neprebehla. Teda z hľadiska navodenia bunkového delenia špecializovaných pletív jednoročných výhonkov bolo univerzálnejšie médium WV2.

#### Tabuľka 1: Dediferenciácia vo vzťahu chemotyp-varianty kultivačného média

Variant kultivačného média	<i>Taxus baccata</i>	<i>Taxus cuspidata</i>
WV1 médium (IAA+BAP)	+	-
WV2 médium (2,4D+kinetín)	+	+

**Tabuľka 2: Intenzita kalogenézy a následnej diferenciácie v závislosti od variantu kultivačného média**

Variant kultivačného média	% kalogenézy	% regenerujúcich kalusov
WV1 médiu (IAA+BAP)	15,6	48,5
WV2 médium (2,4D+kinetín)	39,4	10,8

Z údajov v tabuľke môžeme konštatovať, že pri metodickom postupe explantát-kalus-regenerant nemusí byť tento postup kvantitatívne v kladnej korelácii. Keď sme nebrali do úvahy chemotyp, tak pri variante WV1 s nižšou intenzitou kalogenézy bola diferenciácia úspešnejšia, keďže sme získali viac kompletných regenerantov. V prípade kultivačného média WV2 bola síce intenzita kalogenézy vyššia, avšak nasledujúca diferenciácia nebola uspokojivá s ohľadom na frekvenciu.

**Tabuľka 3: Frekvencia diferenciácie kalusov v závislosti od chemotypu**

	<i>Taxus baccata</i>	<i>Taxus cuspidata</i>
Čerstvá hmotnosť kalusov v g na 1 explantát	2,56	1,09
% regenerujúcich kalusov	47,4	35,8
Dĺžka trvania regenerácie v dňoch	35	47

Kompletných regenerantov sme získali pri oboch chemotypov tisu kultivovaných na WV1 (IAA+BAP) na ktorom regenerovalo 48,5% kalusov, ale doba trvania regenerácie bola diferencovaná. Z chemotypov tisu na podmienky kultivácie v procese regenerácie najlepšie reagoval *Taxus baccata*, ktorého čerstvá hmotnosť kalusov bola 2 krát vyššia ako pri chemotype *Taxus cuspidata*.

### Záver

Štúdiom kalogenézy a diferenciácie segmentov jednoročných výhonkov dvoch chemotypov tisu v *in vitro* sme zistili:

1. proces dediferenciácie (kalogenézy) bol intenzívnejší na variante média WV2 (2,4D+kinetín). Kalusy sme získali pri oboch druhoch tisu.
2. Pre diferenciáciu bol však vhodnejší variant média WV1 (IAA+BAP), pri ktorom sme zistili 48,5%-nú intenzitu diferenciácie kalusov na kompletné explantáty *in vitro*.
3. Ako v procese kalogenézy tak i diferenciácie bol najúspešnejší chemotyp *Taxus baccata*, ktorého dynamika tvorby čerstvej hmoty bola 2x vyššia ako pri *Taxus cuspidata*.

### Literatúra

1. HRUBÍK, P. - MIKLÁŠOVÁ, K. - RAČEK, M.: Ihličnaté a vřdyzelené dreviny v sadovníckej tvorbe. VES SPU v Nitre, 2005, s.96. ISBN 80-7137-587-X.
2. PAULE, L. et al.: Present Distribution and Ecological Conditions of the European Yew (*Taxus baccata* L.) with Special Reference to the Carpathian Mountains. In: Yew (*Taxus*) Conservation Biology and Interactions. Berkeley: NYCC, 1993, s. 26.
3. VANCE, N. C. et al.: Seasonal and Tissue Variation in Taxane Concentrations of *Taxus brevifolia*. In: Phytochemistry – Oxford, 36 (5), 1994, s. 1241-1244.

Experimentálne riešenie bolo podporované grantovou agentúrou VEGA 1/2431/05 od ktorej získali autori finančné prostriedky.

Adresy autorov:

**Ing. Angelika Filová, PhD.**, Katedra fyziológie rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A Hlinku 2, Nitra 949 01, Slovensko, [ANGELA.FILOVA@UNIAG.SK](mailto:ANGELA.FILOVA@UNIAG.SK)

**Ing. Katarína Miklášová, PhD.**, Katedra biotechniky zelene, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tulipánová 7, Nitra 949 01, Slovensko, [KATARINA.MIKLASOVA@UNIAG.SK](mailto:KATARINA.MIKLASOVA@UNIAG.SK)

**Ing. Ladislav Varga, PhD.**, Katedra agrochémie a výživy rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A Hlinku 2, Nitra 949 01, Slovensko, [LADISLAV.VARGA@UNIAG.SK](mailto:LADISLAV.VARGA@UNIAG.SK)

**IZOLÁCIA FRAGMENTU GÉNU GLUKANÁZY Z ROSIČKY  
OKRÚHLOLISTEJ (*DROSERA ROTUNDIFOLIA* L.)  
THE ISOLATION OF GLUCANASE GENE FRAGMENT FROM SUNDEW  
(*DROSERA ROTUNDIFOLIA* L.)**

Jana LIBANTOVÁ - Jana MORAVČÍKOVÁ - Ildikó MATUŠÍKOVÁ

*Glucanases are enzymes belonging to pathogenesis-related (PR) proteins that are attractive for biotechnology due to their inhibitory activities against different phytopathogens. Here the isolation of a partial glucanase gene from the insectivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.) is presented. Degenerated primers were designed in highly conserved areas of 9 representatives of the glucanase gene family. In PCR reaction on genomic DNA there was obtained a 500 bp long genomic fragment, the neighbouring sequences of which were subsequently isolated and cloned by genome walking. A 1.5 kb long DrGlu1 revealed very low nucleotide but quite high protein sequence similarity to other plant glucanases. The sundew glucanase gene is one of the first nucleic sequences from this particular plant that in addition encodes for a putative plant defense gene.*

*Keywords: gene isolation, glucanase, primary structure, sundew*

### Úvod

Patogénne huby, ich adaptabilita na chemické fungicidy a zvýšený záujem verejnosti o účinok týchto zlúčenín na životné prostredie a ľudské zdravie podmieňujú rastúci dopyt pre bezpečnejšie, a teda prijateľnejšie alternatívne riešenia z hľadiska životného prostredia. Tieto zahŕňujú hľadanie nových prírodných látok toxických pre fytopatogénne huby, ako aj identifikáciu a izoláciu génov, ktoré takéto biologicky aktívne látky kódujú. Atraktívnymi pre biotechnológie a techniky génového inžinierstva sa ukazujú byť obranné gény zohrávajúce úlohu v rastlinnej patogenéze, ako napríklad gény kódujúce špecifické PR proteíny (SELA-BUURLAGE a kol., 1993). Niektoré rastlinné patogény sú však tolerantné k (toxickým) metabolitom svojho hostiteľa, ale senzitívne k štruktúrne podobným metabolitom iných nehostiteľských rastlín (JOOSTEN a kol., 1995). Rastlinné druhy, ktoré sú geneticky vzdialené od kultúrnych plodín, sa preto stávajú stredobodom záujmu pre izoláciu génov so špecifickými vlastnosťami. Naša pozornosť v tejto práci je zameraná na mäsožravú rastlinu rosičku okrúhlolistú (*Drosera rotundifolia* L.) z čeľade *Droseraceae*. Existuje predpoklad, že táto rastlina je novým zdrojom látok s antifungálnou aktivitou, ktoré sú aplikovateľné v biotechnologických programoch. Naším cieľom je izolovať sekvencie génu pre enzým glukanázu zo skupiny PR proteínov a porovnať jej štruktúru a potenciálne biologické vlastnosti s glukanázami iných rastlinných druhov.

### Materiály a metódy

Parciálnu glukanázovú génovú sekvenciu sme izolovali z rastlín rosičky okrúhlolistej metódou PCR. Rastliny rosičky okrúhlolistej sme kultivovali v podmienkach *in vitro* na MS médiu pH 4,5 s 2% agarom. Degenerované primery situované v príslušných sekvenciách konzervatívnych domén glukanáz RYIAVGNE a ETYIFAMF sme navrhli na základe analýzy génov deviatich geneticky vzdialených rastlinných druhov:

GlucFOR5' ATGGATCCTC(A/C)(A/G)ITA(T/C)AT(A/C/T)GCIGTIGGIAA(C/T)G

Gluc REV5' ATGGTACCAACA(T/G)(G/A)GC(G/A)(A/G)AIAIGT(A/T)IGTCTC

PCR program na genómovej DNA z rosičky zahŕňoval 1 cyklus 94°C 1 min; 35 cyklov [94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 2 min;] 1 cyklus 72°C 7 min. Produkt PCR reakcie bol izolovaný a klonovaný do pGem-T vektorového Systému II (Promega), a sekvenovaný pomocou M13 primerov na DNA sekvenačnom prístroji Perkin Elmer 377. Susedné sekvencie získaného fragmentu DrGlu1 do veľkosti 1,5 kb sme izolovali pomocou Genome Walking™ Kitu (Clontech), klonovali a sekvenovali vyššie uvedeným spôsobom. Sekvenciu genómoveho fragmentu z rosičky sme porovnávali s homologickými génmi získanými z Génovej banky pomocou programu CLUSTAL W (THOMPSON a kol., 1994).

### Výsledky a diskusia

Glukanázy patria do skupiny PR proteínov zohrávajúcich významnú úlohu v obrane rastlín. Mnohé z nich sú toxické pre fytopatogénne huby *in vitro* (SELA-BUURLAGE a kol., 1993), pričom ich účinky sa úspešne preukázali aj v niektorých transgénnych rastlinách *in vivo* (JONGEDIJK a kol. 1995). V tejto práci sme sa zamerali na identifikáciu a izoláciu génu pre glukanázu v rosičke okrúhlolistej. Prítomnosť glukanáz v sekréte tráviacich žliaz tejto mäsožravej rastliny predpokladá prítomnosť a aktivitu týchto enzýmov tak pri procesoch trávenia hmyzu ako aj pri obrane rastliny voči fytopatogénnym hubám či baktériám (JUNIPER a kol., 1989).

Degenerované primery pre glukanázy použité v tejto práci sme situovali do oblasti konzervatívnych domén génov pre glukanázy z deviatich geneticky vzdialených rastlinných druhov. PCR amplifikáciou na genómovej DNA sme získali 500 bp fragment, ktorý sme následne klonovali a sekvenovali. Pomocou Genome Walking™ Kitu sme sekvenciu predĺžili na 1,5 kb, klonovali do pGemT vektorového systému a sekvenovali. Program GENSCANW odhalil v analyzovanej sekvencii, ktorú sme označili DrGlu1, výskyt

jedného exónu so začiatkom 203 pb od začiatku sekvencie, STOP kodón a sekvenciu polyA. Porovnaním sekvenčnej homológie s inými glukánázami z Génovevej banky sme zistili, že výlučne oblasť 32 nukleotidov z klonu DrGlu1 bola identická so sekvenciou  $\beta$ -glukanázy At3g57260 z *Arabidopsis thaliana*, a pravdepodobnosť, že ide o glukánázový homológ bola veľmi nízka. Napriek tomu, na úrovni proteínov vykazovala sekvencie DrGlu1 značnú podobnosť ku  $\beta$ -1,3- glukánázam z iných rastlinných druhov. Najväčšia podobnosť v predpokladanej primárnej štruktúre bola v prípade bázičkej glukánázy z kávy (*Coffea arabica*, AAQ90286.1), kde bolo nájdených 56% indentických a 72% analogických aminokyselín. Takýto kontrast medzi výsledkami BLAST analýz na nukleotidovej a proteínovej úrovni môže byť dôsledkom často sa vyskytujúcich synonymických kodónov. Podobný jav bol pozorovaný aj pri iných génoch mäsožravých rastlín.

### Záver

1.5 kb fragment kódujúci časť sekvencie glukánázy sme získali PCR amplifikáciou na genómovej DNA s využitím degenerovaných primerov pre glukánázy a pomocou metódy „Genome Walking“. Sekvenčnou analýzou sme zistili, že na 1,5 kb fragmente sa vyskytuje kompletná 3' sekvencia génu. Na 5' konci izolovaného fragmentu, približne po 203 bp od začiatku, sa vyskytuje sekvencia intrónu. V ďalšej práci sa sústreďme na izoláciu kompletnej sekvencie glukánázového génu a na štúdium jeho expzie resp. produktu.

### Literatúra

1. JOOSTEN, M.H.A.J. – VERBAKEL, H.M. – NETTEKOVEN, M.E. – Van LEUWEN, J. - Van Den VOSSSEN, R.T.M. – De WIT, P.J.G.M.: The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase defence proteins of its host, tomato. In: *Physiol.Mol. Plant Pathol.* 46, 1995, 45-49.
2. JONGEDIJK, E. – TIGELAAR, H. – Van ROEKEL, J.S.C. – BRES-VLOEMANS, A. – DEKKER, I. - Van Den ELZEN, P.J.M. - CORNELISSEN, B.J.C. - MELCHERS, L.S.: Synergistic activity of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. In: *Euphytica* 85, 1995, 173-180.
3. JUNIPER, B.E. – ROBINS, R.J. – JOEL, D.M.: The carnivorous plants. Academic Press, London, 1989, 1-392
4. SELA-BUURLAGE, M.B. – PONSTEIN, A.S. – BRES-VLOEMANS, S.A. – MELCHERS, L.S. – Van Den ELZEN, P.J.M. – CORNELISSEN, B.J.C.: Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase exhibit antifungal activity. In: *Plant Physiology* 101,1993, 857-63.
5. THOMSON, J.D. - HIGGINS, D.G. – GIBSON, T. J.: Clustal W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic Acids Res.* 22, 1994, 4673-4680.

Práca bola vypracovaná v rámci projektu VEGA 2/5034/25 Identifikácia a izolácia génov kódujúcich proteíny s možnou antifungálnou aktivitou z rosičky (*Drosera rotundifolia* L.).



## VPLYV INDUKOVATEĽNEJ EXPRESIE PR GÉNOV V TRANSGÉNNÝCH ZEMIAKOK NA ZVÝŠENIE ODOLNOSTI K HUBOVÝM OCHORENIAM THE INFLUENCE OF INDUCIBLE EXPRESSION OF PR GENES IN TRANSGENIC POTATOES ON INCREASING RESISTANCE TO FUNGAL DISEASES.

Jana MORAVČÍKOVÁ - Jana LIBANTOVÁ - Ján HELDÁK - Želmíra GREGÁŇOVÁ - Zdenka GÁLOVÁ - Ildiko MATUŠÍKOVÁ - Ján SALAJ

*Tobacco  $\beta$ -1, 3-glucanase from Nicotiana plumbaginifolia and cucumber chitinase were introduced via Agrobacterium mediated transformation into the genome of potato (Solanum tuberosum L.) cultivar ETA with aim to increase fungal resistance. Plant transformation vector contained both genes fused to the tissue specific inducible polyubiquitin promoter and selection neomycin phosphotransferase II gene. Expression pattern of introduced chitinase and glucanase genes was observed beneath the periderm in the cortex of transgenic potato microtubers. In vitro antifungal assays did not show a clear increasing of tolerance of transgenic microtubers to selected fungal pathogens.*

*Key words: Agrobacterium tumefaciens, glucanase, chitinase, polyubiquitin promoter, antifungal assay*

### Úvod

Jednou z možností ako zvýšiť odolnosť poľnohospodársky významných rastlín k hubovým ochoreniam, je využiť nové poznatky z genetického inžinierstva a genetickou transformáciou preniesť do genómu rastlín gény, ktoré kódujú antifungálne proteíny. Vo väčšine prípadov vysoká expresia transgénov bola dosiahnutá pomocou konštitutívneho *CaMV* 35S promótoru. Avšak zvýšená expresia antifungálnych proteínov sa nemusí vždy prejavíť vo zvýšenej rezistencii k patogénnym hubám (NEUHAUS a kol., 1991). V prípade, že sú rastúce hýfy nepretržite vystavené styku s hydrolytickými enzýmami, môže dôjsť k adaptácii a stávajú sa rezistentnými k normálne letálnej koncentrácii enzýmu (BOLLER, 1993). Spôsob, akým je možné zabrániť takejto adaptácii je vytvorenie špecifického kontaktu medzi atakovanou hubou a antifungálnym proteínom a to použitím pletivovo špecifického, patogén indukovateľného promótoru, fúzaného s génom pre antifungálny proteín. Expresia riadená takýmto promótorom by zabezpečila náhle zvýšenie koncentrácie antifungálneho proteínu v blízkosti prenikajúcej hýfy. Za týmto účelom bol z novošľachtenca 116/86 izolovaný polyubiquitínový promótor, ktorý je aktívny v šupke zemiaka. Naším cieľom bolo indukovateľnou expresiou PR génov kódujúcich tabakovú glukánázu a uhorkovú chitinázu, zvýšiť odolnosť zemiaka voči hubovým patogénom.

### Materiál a metódy

Internodálne segmenty *in vitro* rastlín zemiaka (*Solanum tuberosum* L.) odrody ETA boli transformované pomocou *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404/pJL06 podľa MORAVČÍKOVEJ a kol. (2003). Rastlinný transformačný vektor pJL06 obsahoval v T-DNA oblasti gény kódujúce tabakovú  $\beta$ -1,3-glukanázu z *Nicotiana plumbaginifolia* a uhorkovú chitinázu, oba fúzané s indukovateľným polyubiquitínovým promótorom a selekčný markerový *nptII* gén kódujúci rezistenciu ku kanamycínu. Na hraniciach T-DNA boli klonované MAR sekvencie za účelom minimalizovania variability expresie transgénov. Polyubiquitínový promótor bol izolovaný z novošľachtenca 116/86 pomocou PCR na základe opublikovaných sekvencií (GARBARINO a kol., 1995). Získané transgénne rastliny boli prenesené na médium navodzujúce tvorbu mikrohlúz. Mikrohlúzy analyzovaných rastlín boli narezané na 1 mm časti a inkubované na sterilnom filtračnom papieri navlhčenom s 50  $\mu$ M metyljasmonátom v tme počas 48 hodín. Expresiu oboch transgénov (chitinázy a glukánázy) v šupke zemiaka sme dokázali metódou *in situ* hybridizácie podľa SALAJA a kol. (2001). Antifungálny potenciál transgénnych rastlín sme testovali na rezoch indukovaných mikrohlúz a na proteínových extraktoch izolovaných z indukovaných mikrohlúz. Fytopatogénne huby (*Fusarium solani*, *Fusarium heterosporum* a *Trichoderma*) sme naočkovali do stredu Petriho misky a inkubovali niekoľko dní v tme pri teplote 22°C. Približne 2 mm od okraja hubového mycélia sme poukladali rezy indukovaných mikrohlúz a inkubovali 16 hod. v tme pri teplote 22°C. Antifungálny potenciál proteínových extraktov izolovaných z indukovaných sme sledovali spektrofotometricky na Elisa readeri ELx800 pri 630 nm s použitím mikrotitračných platničiek. Každá mikrotitračná jamka obsahovala 50  $\mu$ l (200  $\mu$ g) proteínového extraktu v 50 mmol/l octane sodnom pH 5.0 a 50  $\mu$ l suspenzie spór  $1 \times 10^3$  v PDB médiu (Ducheva). Platničky sme inkubovali 24 hod. v tme pri teplote 22°C. Inhibičný účinok sme vyjadrili percentuálne vzhľadom na netransformovanú kontrolu.

### Výsledky a diskusia

Transformáciou internodálnych segmentov pomocou *A. tumefaciens* sme zregenerovali viac ako 15 individuálnych transgénnych rastlín kultivaru zemiaka odrody ETA. Výhonky, ktoré zakorenili na médiu s obsahom kanamycínu 100 mg/l sme považovali za transgénne a podrobili molekulárno-biochemickým analýzám. V podmienkach *in vitro* sme u vybraných klonov navodili tvorbu mikrohlúz, ktoré sme použili na

d'alsie analýzy. Vzhľadom na to, že gény kódujúce  $\beta$ -1,3-glukanázu a chitinázu boli pod kontrolou polyubiquitínového promotora, expresiu oboch transgénov sme indukovali s 50  $\mu$ M metyljasmonátom (Mejas). GARBARINO a kol. (1995) dokázal, že aplikáciou exogénneho Mejasu došlo k zvýšenej akumulácii mRNA reportérového *gus* génu fúzovaného s polyubiquitínovým promotorom. *In situ* hybridizáciou sme dokázali indukovateľnú expresiu oboch transgénov v šupke zemiaka. Ako prípravu, ktorá bola značená digoxigenínom sme použili mRNA fragmentu génu uhorkovej chitinázy a mRNA fragmentu génu tabakovej glukanázy. V ďalšej časti sme sa zamerali na analýzu antifungálnych vlastností hlúz transgénnych rastlín transformovaných vektorovým konštruktom JL06. Hlúzy jednotlivých klonov sme testovali na ich schopnosť inhibovať rast testovaných húb (*Fusarium heterosporum*, *Fusarium solani* a *Trichoderma*) v *in vitro* podmienkach. Ako kontrolu sme použili hlúzy netransformovaného zemiaka a hlúzy transgénnych klonov, ktoré neboli ošetrované 50  $\mu$ M metyljasmonátom (Mejas). V prípade, keď transgénné hlúzy neboli vystavené pôsobeniu 50  $\mu$ M Mejasu, proteíny uvoľnené z narezaných hlúz iba minimálne spomalili rast príslušných húb v mieste aplikácie hlúzy. V prípade, keď došlo k výraznejšej expresii transgénnnej glukanázy a chitinázy v transgénnych hlúzách ošetrovaných 50  $\mu$ M Mejasom, ich inhibičný efekt na testovaných hubách sa ukázal byť výraznejší. V druhej časti antifungálnych testov sme percentuálne vyhodnocovali schopnosť hrubých proteínových extraktov izolovaných z indukovaných hlúz transgénnych zemiakov inhibovať klíčenie spór. Inhibičný účinok proteínových extraktov sa pri jednotlivých klonoch líšil, pričom v priemere inhibícia pri hube *Fusarium solani* bola 12%, pri *Fusarium heterosporum* 14% pri *Trichoderma* 19%.

### Záver

Metódou genetickej transformácie pomocou *A. tumefaciens* LBA 4404 sme do genómu zemiaka (*Solanum tuberosum* L.) simultánne vniesli gény kódujúce uhorkovú chitinázu a tabakovú glukanázu, oba pod kontrolou pletivovo špecifického poranením indukovateľného promotora. *In vitro* antifungálne testy nepreukázali výrazné zvýšenie tolerancie transgénnych mikrohlúz k vybraným fytopatogénnym hubám.

Práca bola vypracovaná v rámci APVT projektu 51-005602.

### Literatúra

1. GARBARINO, J.E. – OOSUMI, T.- BELKNAP, W.R.: Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants. In: *Plant Physiol* 109, 1995, s. 1371-1378.
2. MORAVČÍKOVÁ, J. - LIBANTOVÁ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. - LIBIAKOVÁ G. – NAP, J.P. - MLYNÁROVÁ, L.: Genetic transformation of Slovak cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.): efficiency and the behaviour of the transgene. In: *Biologia* 6, 2003, s. 1075-1080.
3. SALAJ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – MORAVČÍKOVÁ, J. – SALAJ, T.: Imunochémia a *in situ* hybridizácia - účinné metódy sledovania génov v geneticky modifikovaných rastlinách. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, Zborník zo 6. odborného seminára, VÚRV, 10. máj, Piešťany, 2001, s. 44
4. BOLLER, T.: Antimicrobial functions of the plant hydrolases, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. In: FRITIG, B., LEGRAND, M. (eds.): Mechanisms of Plant Defense Responses, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, s. 391-400
5. NEUHAUS, J. M. - AHL-GOY, P. - HINZ, U. - FLORES, S. - MEINS, F. Jr.: High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. In: *Plant Molecular Biology* 16, 1991, s. 141-151.

Adresa autorov:

Ing. Jana Moravčíková PhD., Ing. Jana Libantová CSc., Mgr. Ildiko Matušiková, PhD., RNDr. Ján Salaj CSc., Ústav genetiky a biotechnológie rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 95007 Nitra, e-mail: nrgrmora@savba.sk

Ing. Ján Heldák PhD. Výskumný ústav zemiakársky, 059 50 Veľká Lomnica

Ing. Želmíra Gregáňová, RNDr. Zdenka Gálová, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra

## MOLEKULÁRNO-BIOCHEMICKÉ ANALÝZY TRANSGÉNNÝCH RASTLÍN TABAKU OBSAHUJÚCICH CRE/LOX REKOMBINAČNÝ SYSTÉM MOLECULAR-BIOCHEMICAL ANALYSES OF THE TRANSGENIC TOBACCO PLANTS CONTAINING CRE/LOX RECOMBINATION SYSTEM

Eva VACULKOVÁ - Jana LIBANTOVÁ - Jana MORAVČÍKOVÁ - Ildikó  
MATUŠÍKOVÁ - Miroslav BAUER - Ľudmila MLYNÁROVÁ

*The Cre/lox recombination system is one of the widely used systems for precise deletion of selectable marker genes from transgenic plant chromosomes. This system increases the potential of plant biotechnology for commercial applications and basic research. In an autoexcision strategy the cre gene is a part of the same T-DNA as the selectable marker gene and both are flanked by a single pair of loxP sites in relative direct orientation. A CRE-mediated intramolecular recombination between loxP sites will result in the excision of the intervening DNA (cre gene and selectable gene). When the expression of the cre gene is controlled by tissue-specific promoter the autoexcision will occur at fixed stage in plant development.*

*Keywords: Cre/lox system, tobacco, Southern hybridisation*

### Úvod

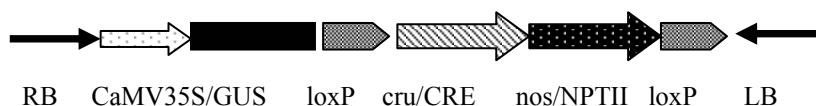
Cre/lox rekombinačný systém predstavuje sľubný prínos do technológie prípravy transgénnych rastlín. Tento systém pozostáva z cre rekombinázového génu a 34 pb lox sekvencií. Enzým CRE rekombináza katalyzuje rekombináciu medzi dvoma lox miestami. V prípade výskytu týchto lox sekvencií v DNA ako priamych repetícií dochádza k rekombinácii, výsledkom ktorej je vystrihnutie sekvencie vyskytujúcej sa medzi danými lox miestami. Pri použití semeno-špecifického promotora sa expresia rekombinázy cre spúšťa vo vyvíjajúcom sa semene a následne dochádza k rekombinácii. Ak sa na jednej T-DNA binárneho vektora medzi lox sekvencie umiestni gén rezistencie k antibiotiku a zároveň gén kódujúci CRE rekombinázu pod kontrolou semeno-špecifického promotora, dôjde v semene účinkom enzýmu CRE k vyštiepeniu génu rezistencie ako aj samotného génu pre rekombinázu.

### Materiál a metódy

Listové explantáty tabaku (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) boli transformované pomocou *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 nesúceho binárny vektor pEV2 metódou podľa HORSCH a kol. (1985). Rastlinný transformačný vektor pEV2 obsahuje medzi hranicami T-DNA  $\beta$ -glukuronidázový (*gus*) gén pod kontrolou dvojitého *CaMV* 35S promotora a samovystrihujúcu sa kazetu ohraničenú *loxP* sekvenciami a obsahujúcu selekčný neomycínofototransferázový (*nptII*) gén riadený *nos* promótorom a *cre* gén fúzovaný za semeno-špecifickým kruciferínovým promótorom. Hladinu exprese *gus* génu sme kvantifikovali fluorimetricky podľa MLYNÁROVÁ a kol. (1994). Genómovú DNA sme izolovali z tabakových rastlinných pletív metódou podľa CHEN a kol. (1992). Prítomnosť a počet kópií *gus* a *nptII* génov sme detekovali metódou Southern hybridizácie pomocou rádioaktívne ( $^{32}\text{P}$ ) značenej próby (2 kb fragment *gus* génu a 1,46 kb fragment *nptII* génu).

### Výsledky a diskusia

Genetickú transformáciu tabaku sme uskutočnili pomocou *A. tumefaciens* LBA 4404, ktorý niesol rastlinný binárny vektor pEV2 (schéma 1). Celkovo sme regeneráciou získali 97 transformantov, pričom pri 74 rastlinách sme potvrdili prítomnosť *gus* génu a pri 34 z nich sme detekovali prítomnosť aj *nptII* génu. Pomocou Southern hybridizácie sme potvrdili integráciu oboch transgénov v genóme analyzovaných rastlín a určili počet integrovaných T-DNA kópií. Počet kópií *gus* génu sa pohyboval od 1 po 5, pričom 14 rastlín obsahovalo 1 kópiu *gus* génu. V prípade *nptII* génu sa počet kópií pohyboval od 1 po 6, pričom 12 rastlín malo integrovanú 1 kópiu *nptII* génu. Variabilita v počte T-DNA kópií bola pozorovaná aj inými (POTRYKUS a kol., 1985; MLYNÁROVÁ a kol., 1994; MORAVČÍKOVÁ a kol., 2003). Transgénne rastliny, pri ktorých sme detekovali prítomnosť *nptII* génu sme preniesli z *in vitro* podmienok do *in vivo* za účelom získania ich semenného materiálu a dokončenia analýz parentálnej a jej F1 generácie. Kvantitatívne sme stanovili GUS aktivitu transgénnych rastlín rastúcich v *in vivo* podmienkach a porovnali s hodnotami GUS aktivity transgénnych rastlín v *in vitro* podmienkach. Korelačný koeficient (0,88) ukázal veľmi dobrú koreláciu medzi GUS aktivitami *in vitro* a *in vivo*. Southern hybridizáciou s *nptII* prôbami sme opätovne potvrdili prítomnosť a počet kópií *nptII* génu v genóme rastlín rastúcich v podmienkach *in vivo*. Z porovnania výsledkov Southern hybridizácie s rádioaktívne označenými fragmentmi *gus* a *nptII* génu vyplynulo, že 11 zo 17 transgénnych rastlín, ktoré boli testované na prítomnosť *nptII* génu pomocou Southern hybridizácie, malo 1 kompletnú T-DNA integráciu (RB=LB) a teda tieto rastliny obsahovali 1 integrovanú kópiu *gus* génu a 1 kópiu *nptII* génu. Semená týchto 11 transgénnych rastlín budú použité na test klíčivosti v prítomnosti antibiotika kanamycínu.



**Schéma 1: T-DNA rastlinného transformačného vektora**

### Záver

Genetickou transformáciou sme získali sadu transgénnych rastlín s inkorporovaným Cre/lox systémom. Tieto rastliny sme podrobili viacerým molekulárno-biochemickým analýzám. Vybrané transgénne rastliny s jednou kompletne integrovanou T-DNA kópiou sme preniesli do *in vivo* podmienok za účelom získania semenného materiálu a následne vyhodnotenia funkčnosti Cre/lox systému. V súčasnosti uskutočňujeme prvé testy klíčivosti semien vybraných transgénnych rastlín.

### Literatúra

1. HORSCH, R.B. - FRY, J.E. - HOFFMANN, N.L. - EICHHOLTZ, D. - ROGERS, S.G. - FRALEY, R.T.: A simple and general method for transferring genes into plants. In: *Science* 227, 1985, s. 1229-1231.
2. CHEN, Z. - GREENBLATT, I.M. - DELLAPORTA, S.L.: Molecular analysis of *Ac.* transposition and DNA replication. In: *Genetics* 130, 1992, s. 665-676 .
3. MLYNÁROVÁ, L. - LOONEN, A. - HELDENS, J. - JANSEN, R.C. - KEIZER, P. - STIEKEMA, W.J. - NAP, J.P.: Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix associated region. In: *Plant Cell* 6, 1994, s. 417-426
4. MORAVČIKOVÁ, J. - LIBANTOVÁ, J. - MATUŠÍKOVÁ, I. - LIBIAKOVÁ, G. - NAP, J.P. - MLYNÁROVÁ, L.: Genetic transformation of Slovak cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.): efficiency and the behaviour of the transgene. In: *Biologia* 58, 2003, s. 1075-1080
5. POTRYKUS, I. - PASZKOWSKI, J. - SAUL, M.W. - PETRUSKA, J. - SHILLITO, R.D.: Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. In: *Mol. Gen. Genet.* 199, 1985, s. 169-177.

Práca bola vypracovaná v rámci Výskumnej úlohy 2003 SP 27/028 OD 01/028 OD01.

### Adresa autorov:

Ing. Eva Vaculková, Ing. Jana Libantová, CSc., Ing. Jana Moravčíková, PhD., Mgr. Ildikó Matušíková, PhD.: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: eva.vaculkova@savba.sk  
RNDr. Ludmila Mlynárová, CSc.: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra  
Plant Research International, Wageningen University and Research Centre, P.O.Box 16, 6700 Wageningen, The Netherlands  
RNDr. Miroslav Bauer, CSc.: Výskumný ústav živočíšnej výroby, Hlohovská 2, 949 92 Nitra

## MIKROROZMNOŽOVANIE RODU *HIBISCUS* MICROPROPAGATION OF *HIBISCUS* GENUS

Helena LICHTNEROVÁ - Marta DRAGÚŇOVÁ - Tibor DOKUPIL - Anna JAKÁBOVÁ

*In our work we had focused to find of efficient regeneration and reproduction of selected cultivars Hibiscus moscheutos in vitro. We can state that the suitable medium for initiation of meristems regeneration and shoots proliferation is modified MS medium with BAP and NAA. After the shoot multiplication they have been transplanted to MS medium, where they successfully took roots. After the plants became rooted they were acclimated in vivo.*

*Key words : micropropagation, in vitro, meristem, Hibiscus moscheutos, in vivo.*

### Úvod

V súčasnosti sa metódam explantátových kultúr venuje veľká pozornosť, pretože tieto metódy rozmnožovania v porovnaní s tradičnými spôsobmi umožňujú zlepšenie mnohých kvalitatívnych a kvantitatívnych ukazovateľov v produkcii okrasných rastlín (ako sú napr. aj ibišteky).

Najdôležitejšie ukazovatele:

- dopestovanie zdravého materiálu zbaveného vírusov, hubových ochorení a patogénnych mikroorganizmov,
- rýchle rozmnožovanie jednotlivých druhov,
- šetrenie priestorov – na malej ploche je možné dopestovať veľký počet regenerantov,
- rozmnožovanie ťažko množiteľných druhov (napr. *Hibiscus schizopetalus* Hook.),
- zvýšenie koeficientu rozmnožovania.

Ibištek patriaci do čelade *Malvaceae*, zahŕňa byliny aj dreviny s približne 300 druhmi, ktoré predstavujú v okrasnom záhradníctve významné postavenie. V súčasnosti sa dostávajú na záhradnícky trh druhy, ktoré sú u nás menej známe, avšak veľmi atraktívne, s obtiažnejším rozmnožovaním. Ide o *Hibiscus schizopetalus* Hook., *Hibiscus moscheutos* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L.

V našej práci sme sa zamerali na Ibištek bahenný (*Hibiscus moscheutos* L.). Je to trvalka, dorastajúca do výšky 1 m s vajcovitými na rube plstnatými listami. Hybridné formy kvitnú bielymi, ružovými kvetmi veľkosti až 25 cm.

### Materiál a metóda

#### Rastlinný materiál:

Vzorky na kultiváciu v podmienkach *in vitro* boli odoberané z materských rastlín ibišteka bahenného.

#### Príprava a založenie explantátovej kultúry:

I. etapa – orgánová kultúra (MURASHIGE, 1974): primárnym explantátom boli apikálne a axilárne púčiky aktívne rastúcich výhonkov ibišteka. Odobraté časti boli sterilizované v 20 % roztoku dezinfekčného prípravku Savo s detergent Tween 20 (0,03-0,05 %), následne 3-krát premyté v sterilnej destilovanej vode a rozdelené na 5 mm dlhé segmenty, ktoré boli uložené na základné médium podľa MURASHIGE – SKOOG (1962).

II. etapa – multiplikácia výhonkov: stimulovali sme tvorbu axilárnych výhonkov z nódusov stoniek ibišteka, ktoré boli odobraté zo sterilnej kultúry.

III. etapa – rizogenéza: sledovali sme stimuláciu tvorby koreňov z nódusových explantátov po multiplikácii axilárnych výhonkov.

#### Kultivačné médium:

Vo všetkých troch etapách mikropropagácie boli použité kultivačné médiá podľa autorov MURASHIGE – SKOOG (1962), ktoré sa od seba líšili v množstve cytokinínov a auxínov. Kultúru tvoriacu axilárne výhonky sme pestovali na multiplikačnom médiu obohatenom o cytokinín 6-benzylaminopurín (BAP) v koncentráciách 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg.l<sup>-1</sup> a o auxinoid kyselinu naftyl octovú (NAA) v koncentrácii 0,1 mg.l<sup>-1</sup>.

V médiu pre podporu tvorby koreňov sme znížili dávku makroelementov na polovičnú dávku a obohatili sme ho o stimulačnú látku NAA v koncentrácii 0,1 mg.l<sup>-1</sup> a o 0,3% aktívneho uhlia.

#### Podmienky kultivácie:

Kultivačné nádoby s explantátmi boli umiestnené v kultivačnej miestnosti s nasledovnými regulovateľnými parametrami:

- teplota 21°C,
- hustota ožiarenia pri tvorbe axilárnych výhonkov 35 – 40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> so 16 hod. fotoperiódou, biele svetlo,
- hustota ožiarenia pri stimulácii rizogenézy 15 – 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> so 16 hod. fotoperiódou,
- relatívna vlhkosť vzduchu 20 – 98 %.

## **Výsledky**

Výsledky poukazujú na významný účinok testovaných koncentrácií regulátorov rastu na počet axilárnych výhonkov.

Najlepšie výsledky sa dosiahli aplikáciou 2,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP, kedy sme zaznamenali najvyššiu multiplikáciu výhonkov.

Pôsobenie vyšších koncentrácií cytokinínov spôsobilo tvorbu kalusu na báze výhonkov, miernu chlorózu listov a zmeny v habituse listov.

Oddelené výhonky, dlhé 1 – 2 cm, boli preložené na živné médium MS s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA a 0,3 % aktívneho uhlia, kde počas 10 – 14 –tich dní zakorenili.

## **Záver**

Výsledky dokazujú, že rozmnožovanie pomocou orgánových kultúr možno považovať za veľmi výhodné, nielen z hľadiska genetickej stability, ale aj zabezpečenia dostatočne vysokého koeficientu rozmnožovaných výhonkov.

## **Literatúra**

1. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-497.
2. MURASHIGE, T.: Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. In: Plant Physiol.*, 25, 1974, p. 135-166

Autori riešili projekt s finančnou podporou grantovej agentúry VEGA v rámci projektu VEGA 1/0627/03 „Množiteľské metódy okrasných rastlín.“

---

Adresa autorov

Ing. Helena Lichtnerová, Ing. Marta Dragúňová, Ing. Tibor Dokupil, prof. Ing. Anna Jakábová, CSc. Katedra biotechniky parkových a krajinných úprav, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tulipánová 7, 949 01 Nitra, tel.: 037/6522745

## VÝSKYT, PŘENOS A DETEKCE GENETIKY MODIFIKOVANÉ ŘEPKY OLEJNÉ (*BRASSICA NAPUS L. VAR. NAPUS*) APPEARANCE, TRANSFERENCE AND DETECTION GENETICALLY MODIFIED RAPE (*BRASSICA NAPUS L. VAR. NAPUS*)

Petra HÁJKOVÁ – Jan HRUBÝ - Vladislav ČURN - Jana ŽALUDOVÁ

*The registration tests of genetically modified rape realized by the Aventis company (currently Bayer Crop Science) were proceeding by the year 2001. The occurrence of GM rape plants grown from shedding and the presence of transgene in the related species of Brassicaceae on the tested localities were examined in the next years. The Research institute for fodder plants and breeding in Troubsko proceeded similar research of six selected localities in the year 2005. The presence of transgene (bar gene) was detected by PCR method. The bar transgene was found in 26,2 % from total 221 samples of rape plants. The transgene was not detected in the rape related species.*

*Key words: monitoring, genetically modified rape, weed species of Brassicaceae, transgene bar, PCR analysis, crossing*

### Úvod

Do roku 2001 probíhaly v ČR předregistrační a registrační zkoušky genetiky modifikované řepky olejky (*Brassica napus L. var. napus*) zajišťované firmou Aventis (nyní Bayer Crop Science). Jednalo se o řepku olejnou ozimou, hybridní, s tolerancí k herbicidu fosfinotricinu (glufosinátu ammonnému, obchodní název Liberty), s geny pro samčí sterilitu a obnovení plodnosti - insert MS8RF3 a s genem pro samčí sterilitu - insert MS8. V následných letech byl na pokusných lokalitách prováděn monitoring výskytu geneticky modifikované řepky (transgen *bar*), který byl rovněž sledován u vybraných plevelných druhů čeledi *Brassicaceae*.

Nutnost monitoringu daných lokalit vyplynula z potencionálního předpokladu možnosti hybridizace řepky (*Brassica napus L. var. napus*) i s blízkými příbuznými plevelnými druhy (*Brassica rapa L.*, *Raphanus raphanistrum L.*, *Sinapis arvensis L.*). V této studii byl zjišťován výskyt transgenů v řepce olejce a jí blízké příbuzných plevelných druhů čeledi *Brassicaceae*. Vlastní monitoring byl prováděn nejen na dané lokalitě, ale i v její těsné blízkosti (do cca 50 m) od hranic pokusných pozemků.

KUČERA (2005) uvádí, že nezaznamenal výskyt spontánních hybridů řepky s planými plevelnými druhy, které by mohly umožnit vyhodnocení horizontálního přenosu genů. Avšak skutečnost, že nebyly zaznamenány případy hybridů, nelze chápat jako absolutní potvrzení nemožnosti horizontálního přenosu genů z *B. napus* do příbuzných planých druhů.

### Materiál a metody

Monitoring zahrnoval sběr vzorků na vybraných lokalitách a analýzy vzorků rostlinného materiálu na přítomnost genu *bar* a vyhodnocení analýz. Monitoring byl realizován v roce 2005 a navazuje na analogicky realizovaný monitoring ploch v letech 2002 až 2004.

Monitorovány byly následující lokality:

- a) Zkušební stanice Domanínek
- b) Agritec Šumperk - katastr Bludov
- c) Agritec Šumperk - katastr Vikýřovice – lokalita 2000/2001 (2x)
- d) Agritec Šumperk - katastr Vikýřovice – lokalita 1999/2000 (2x)
- e) Zkušební stanice Trutnov
- f) Pracoviště AF ČZU Červený Újezd

Na konkrétní lokalitě byly vyhledány rostliny řepky olejky a planých příbuzných druhů čeledi *Brassicaceae*. Do alobalu byly uloženy odebrané celé rostliny (ve velikosti semenáčku) nebo tři nejmladší listy, vzorky byly označeny a uskladněny do suchého ledu v chladicím boxu.

Přítomnost transgenů (*bar*) byla zjišťována na molekulární úrovni prostřednictvím PCR reakce.

DNA z listů byla izolována metodou CTAB podle WILLIAMS a kol. (1992)

Protokol PCR detekce transgenů: PCR reakce byla prováděna ve 20 µl reakční směsi, která obsahovala reakční pufr (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3), 200 µM každého dNTP, 0,16 µM každého primeru (BarHyg1, HygPat4, SGT1 a SGT2), 1U Taq polymerázy (Top-Bio, s.r.o.) a přibližně 50 ng templátové DNA.

Reakční cyklus byl následující: počáteční denaturace 94 °C 3 min., (denaturace 94 °C – 45s, annealing 60 °C – 30 s, elongace 72 °C – 1 min.) x 35 cyklů, dokončení elongace při 72 °C po dobu 10 min.

### Výsledky a diskuse

Z výsledků PCR analýz vyplývá, že pozitivní rostliny řepky nesoucí sledovaný transgen *bar* byly nalezeny na 3 lokalitách (Domanínek, Vikýřovice 1999/2000 (2x) a Vikýřovice 2000/2001). Z celkového počtu 221 rostlin řepky olejky neslo transgen *bar* 58 rostlin, což odpovídá 26,2 % . Tento výsledek koresponduje s výsledkem monitoringu z r. 2004 (BŘÍZA *et al.* 2004), kdy z celkového počtu 281 testovaných řepok, byl transgen detekován u 74 rostlin, což znamená, že 27% rostlin řepky olejky neslo transgen *bar*.

Na základě získaných výsledků molekulárních analýz limitovaných souborů planých příbuzných druhů řepky olejky (hořčice rolní, penízek rolní, kokoška pastušů tobolka, barborka obecná, huseníček rolní) rostoucích

přímo na lokalitách nebo v jejich těsné blízkosti, nebyly nalezeny žádné rostliny nesoucí sledovaný transgen, což znamená, že nedošlo k případnému cizosprašení genetiky modifikované řepky olejky s těmito planými druhy z čeledi *Brassicaceae*. Potvrdilo se, že k hybridizaci planých plevelných druhů s řepkou olejkou může přímo v porostu docházet jen velmi zřídka, a to především z důvodu překrývání doby kvetení řepky olejky a jí příbuzných druhů.

**Tabulka 1: % výskytu transgenů *bar* z celkového počtu rostlin konkrétních rostlinných druhů**

Rostlinný druh	Celkem odebráno	Celkem GMO rostlin	% výskyt transgenů <i>bar</i>
Řepka olejka ( <i>Brassica napus</i> L.)	221	58	26,2
Hořčice rolní ( <i>Sinapis arvensis</i> L.)	22	0	0
Penízek rolní ( <i>Thlaspi arvense</i> L.)	15	0	0
Kokoška pastuší tobolka ( <i>Capsela bursa pastoris</i> L.)	7	0	0
Barborka obecná ( <i>Barbarea vulgaris</i> R. Br.)	11	0	0
Huseníček rolní ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	1	0	0

### Závěr

Výsledky molekulárních analýz limitovaných souborů planých příbuzných druhů řepky olejky (hořčice rolní, penízek rolní, kokoška pastuší tobolka, barborka obecná, huseníček rolní) rostoucích přímo na lokalitách nebo v jejich těsné blízkosti potvrdily, že žádné rostliny blízkce příbuzných druhů nenesly transgen *bar*. Lze tedy konstatovat, že nedošlo k případnému cizosprašení genetiky modifikované řepky olejky s těmito planými druhy z čeledi *Brassicaceae*. Z celkového počtu 221 rostlin řepky olejky neslo transgen *bar* 58 rostlin, což odpovídá 26,2 %.

Vhodně zvolenými agrotechnickými postupy (osevní postup, zpracování půdy, chemická ochrana proti plevelům) lze nežádoucí výskyt rostlin vzešlých především z výdrolu genetiky modifikované řepky olejky v maximální míře eliminovat. Potvrdilo se, že cílená, precizní agrotechnika je schopna postupně snížit nežádoucí výskyt semen z výdrolu v půdní zásobě na minimum.

### Literatura

1. BRÍZA, J. - NIEDERMEIEROVÁ, H. - PAVINGEROVÁ, D. - MILOŠ, O. - RAKOUSKÝ, S.: Výsledky monitoringu ploch po pěstování GM řepky. In Sb.: Biologická bezpečnost a genetiky modifikované organismy v ČR po vstupu do Evropské unie, Praha, 2004, s. 49 -54.
2. KUČERA, L.: Proč se pěstují genetiky modifikované plodiny – výsledky polních pokusů. In Sb.: Pěstování genetiky modifikovaných plodin v ČR, Praha, 2005, s. 14 – 24.

### Zdroje financování:

Projekt „Monitoring pěstebních ploch, přenos a detekce transgenů genetiky modifikované řepky olejky“ byl financován ze zdrojů MŽP.

Kontaktní adresa:

Ing. Petra Hájková, Ing. Jan Hrubý, CSc., Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o., Zahradní 1, 664 41 Troubsko, e-mail: [hajkova@vupt.cz](mailto:hajkova@vupt.cz), [hruby@vupt.cz](mailto:hruby@vupt.cz)

Doc. Ing. Vladislav Čurn PhD., Ing. Jana Žaludová, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum, Studentská 13, 370 05, e-mail: [curn@zf.jcu.cz](mailto:curn@zf.jcu.cz)



## VPLYV 2,4-D NA MORFOGÉNNU REAKCIU RÔZNYCH ČASTÍ HYPOKOTYLU ĽANU *IN VITRO* EFFECT OF 2,4-D ON MORPHOGENIC RESPONSE OF FLAX HYPOCOTYL SEGMENTS CULTIVATED *IN VITRO*

Zuzana KOVÁČOVÁ - Bohuš OBERT - Anna PREŤOVÁ

*Morphogenic response (shoot regeneration, root regeneration and callus induction) of two flax cultivars PRFGL 62 and Super were tested with 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP and hormone-free MS and MO media. We applied 2,4-D pretreatment in 4 concentrations (1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D, 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D, 5 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D and 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D) on hypocotyl segments of flax. Orientation of hypocotyl segments was maintained to recognise different responses of apical, root or central regions of hypocotyl. Differences have been found in morphogenic response among different media, different concentrations of 2,4-D, different parts of the hypocotyl and different flax genotypes.*

*Key words: flax, morphogenic response, regions of hypocotyl, 2,4-D*

### Úvod

Ľan patrí do čeľade Linacea s viac ako 200 druhmi, pričom praktické využitie má iba jeden z nich - *Linum usitatissimum* L. (PREŤOVÁ et al., 2000). Ľan ako dôležitá ekonomická a perspektívna plodina sa využíva na produkciu vlákna a oleja. Tento rastlinný druh je široko využívaný pri mnohých biotechnologických výskumoch. Je prístupný regenerácii *in vitro* a to nám dáva možnosť porozumieť základným vývinovým a biochemickým procesom v rastlinách (MILLAM et al., 2005).

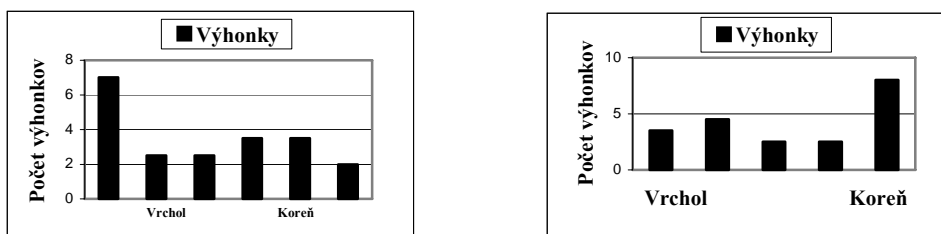
### Materiál a metódy

V našich pokusoch sme použili dva kultivary ľanu (*Linum usitatissimum* L.) Super (priadny typ) a PRFGL 62 (novošľachtenec). Semená ľanu boli ponorené na 5 min. do 96 %-ného etanolu, povrchovo sterilizované v 25%-nom roztoku Sava (2.36 g. l<sup>-1</sup> NaClO) a premyté 3-krát sterilnou vodou. Semená sme pestovali v kultivačnej komore pri teplote 19°C na médiu ½ MS s 2%-ným prídavkom sacharózy a 0,8%-ným prídavkom agaru. Pred autoklavovaním bolo upravené pH média na hodnotu 5,8. Hypokotyly 7-dňových ľanových klíčencov sme narezali na 2 mm segmenty a kultivovali na MS a MO médiách s prídavkom 0,1mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP a bez prídavku rastových regulátorov, pričom sme na ne predpôsobili 24 a 72 hodín štyrmi koncentraciami 2,4-D.

### Výsledky a diskusia

Najväčší počet výhonkov bol regenerovaný z hypokotylových segmentov na MS a MO médiách s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP po 24 hodinovom predpôsobení 5 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D a 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D pri genotype PRFGL 62 (100 %). Regenerácia výhonkov v prípade genotypu PRFGL 62 bola vyššia pri použití MS a MO médií s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP ako pri použití médií bez rastových regulátorov, a to po predpôsobení všetkých použitých koncentrácií 2,4-D počas 24 a 72 hodín. Keď porovnáme médiá MS a MO: celkovo sa viac výhonkov vytvorilo na MS médiu bez ohľadu na použité koncentrácie rastových regulátorov pridaných do média. Najvyššia regenerácia koreňov bola pri genotype PRFGL 62 po 24 hod. predpôsobení 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu pri použití MS média bez rastových regulátorov a po 24 hod. predpôsobení 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D pri použití MO média s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Po 72 hodinovom predpôsobení 2,4-D na hypokotylové segmenty genotypu PRFGL 62 sa pri všetkých koncentráciách 2,4-D vytvorilo viac koreňov na médiu MS. V prípade genotypu Super bola vysoká regenerácia výhonkov po 72 hod. predpôsobení 1 mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup> a 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu na MO médiu s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Nižšia prítomnosť výhonkov a koreňov bola na hypokotylových segmentoch pri použití MS média bez rastových regulátorov po 72 hod. predpôsobení 1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D a najvyššia na MS médiu s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Regenerácia koreňov bola pri genotype Super najvyššia na MS médiu s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP (50 %) po 24 hod. predpôsobení 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu. Po 72 hod. predpôsobení 2 mg.l<sup>-1</sup> a 5 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu bola regenerácia koreňov nižšia pri použití MO média bez rastových regulátorov. Morfogénna odpoveď hypokotylových segmentov z hľadiska ich umiestnenia na hypokotyle od koreňa po vrchol sa líši. Pri genotype PRFGL 62 po 24 hod. predpôsobení 1 mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup> a 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu bez ohľadu na rastové regulátory pridané do média MS vykazovali väčšie množstvo regenerovaných výhonkov hypokotylové segmenty z vrcholovej časti hypokotyly (graf č. 1). Naopak, pri použití koncentrácie 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D bolo najviac výhonkov prítomných na koreňovej časti hypokotyly (graf č. 2) a najviac koreňov sa pri týchto podmienkach vyvinulo zo strednej časti hypokotyly. V prípade použitia MO média po 24 hod. predpôsobení 1 mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup> a 10 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D na hypokotylové segmenty bola prítomnosť regenerovaných výhonkov vyššia v strednej časti hypokotyly a po predpôsobení 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D vo vrcholovej časti hypokotyly. Po 72 hod. predpôsobení všetkých koncentrácií 2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu na MO médiu s 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP a bez rastových regulátorov bolo najviac výhonkov regenerovaných z vrcholovej časti hypokotyly. Najviac

koreňov regenerovalo taktiež z vrcholovej časti hypokotylu, ale iba po predpôsobení  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D na hypokotylové segmenty ľanu. Pri genotype Super regenerovali výhonky po predpôsobení  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D na hypokotylové segmenty pri všetkých použitých médiách a koncentráciách rastových regulátorov prevažne z vrcholovej časti hypokotylu, pričom korene naopak z koreňovej časti hypokotylu.



**Graf 1: Regenerácia výhonkov pri genotype PRFGL 62 po 24 hod. predôšetrení  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D na MS médiu bez rastových regulátorov**

**Graf 2: Regenerácia výhonkov pri genotype PRFGL 62 po 24 hod. predôšetrení  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D na MS médiu s  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA +  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP**

### Záver

Z našich pokusov vyplýva, že morfogénna reakcia hypokotylových segmentov ľanu na pôsobenie rastových regulátorov pridaných do MS a MO média je rôzna, je závislá od použitého druhu média a líši sa pri jednotlivých genotypoch. Takisto sme pri našich pokusoch zaznamenali rozdiel v morfogénnej odpovedi vrcholovej, centrálnej a koreňovej oblasti hypokotylu ľanu na vplyv použitých koncentrácií 2,4-D.

### Literatúra

- MILLAM, S. – OBERT, B. – PREŤOVÁ, A.: Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* L – a review. In: Plant Cell Tissue and Organ Culture, 82, 2005, s. 93-103.
- PREŤOVÁ, A. – HAJDUCH, M. – OBERT, B.: Some Characteristics of Flax Embryo Development In Situ and In Vitro. In: ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIS Series Botanica 42/2, 2000, s. 45-53.

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov APVT-51-0286 a VEGA 2/5079/5.

## PRODUKCE BEZVIROZNÍCH ROSTLIN RÉVY V ČESKÉ REPUBLICĚ THE PRODUCTION OF VIRUS-FREE PLANTS FROM GENUS VITIS L. IN CZECH REPUBLIC

Břetislav KRÍŽAN - Eva ONDRUŠIKOVÁ - Kamila TRČKOVÁ

*The presented work deals with in vitro thermotherapy of woody indicators and varieties from genus Vitis L. Plants were cultivated on MS media, and were treated with photoperiod 12/12 (light/ dark), during which time temperature 37° C was used. This thermotherapy obtained 45 days. During therapy every plant in separate test tube was placed. The results show high influence of genotype to grow ability during the therapy, and also to plant survival. Virus elimination also depended of variety used for sanitation.*

*Keywords: virus elimination, grapevine, rootstocks, thermotherapy, ArMV, GFLV*

### Úvod

Množení rozmnožovacího materiálu révy v České republice vychází z certifikačního schématu (EPPO, 1997) a podléhá vyhlášce 147/2004 zákona 219/2003sb. V následujících letech bude množení a udávání do oběhu podléhat směrnici EU (směrnice Rady 68/193/EEC), z nichž plynou mimo jiné i požadavky na zdravotní stav množeního materiálu. Odrůdy révy byly z tohoto důvodu v České republice soustředěny do technické izolace v Lednici při ZF MZLU, kde bylo umístěno přes 120 odrůd a klonů českého udržovacího šlechtění. Po tříletém testování bylo na základě negativních testů na 5–7 virů vybráno pouze 33 perspektivních rostlin šestnácti odrůd (HOLLEINOVÁ, KRÍŽAN, 2005). K vyřešení této situace jsou nasnadě dvě možné cesty, a to: hledání dalších zdravých jedinců z rostlin udržovacího šlechtění, či ozdravování již na viry pozitivního materiálu. Rostliny udržovacího šlechtění jsou nyní testovány.

Ozdravování rostlin probíhá v laboratoři *in vitro*, která byla uvedena do provozu v roce 2003 za finanční podpory Ministerstva zemědělství a Jihomoravského kraje. Zde jsou již ozdravovány odrůdy merunek, broskvoní a podnoží pro révu, a to v rámci grantového projektu Mze NAZV- 1B44051 - Výzkum a vývoj standardních metod ozdravení pomocí termoterapie a *in vitro* kultur odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů, fytoplazem a karantenních patogenů pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu. Na tomto projektu spolupracuje MZLU s VÚRV Praha-Ruzyně a VSÚO Holovousy. V letošním roce je snaha ozdravit alespoň část odrůd, u nichž sklizeň v ČR představuje více než 50 tis. kg hroznů za rok.

### Materiál a metoda

K ozdravování rostlin od virových chorob v kultuře *in vitro* je na pracovišti využívána metoda spočívající v kombinaci termoterapie s následným odběrem růstového vrcholu (část větší než meristém, čímž lze eliminovat vznik somaklonální variability). LEONHARDT et al. (1998) doporučuje po tepelném ošetření odbírat vrcholové části velikosti 5 mm a tím se vyhnout možnému výskytu somaklonální variability. Při odběru části menší než 1mm, popřípadě izolaci meristému se riziko výskytu variability zvyšuje.

Metoda využívá efektu klesající koncentrace virů směrem k vegetačnímu vrcholu a inhibice reprodukce a šíření viru v důsledku zvýšených teplot (VALERO et al., 2003). Při ozdravování révy je používána fotoperioda 12/12 (světlo/tma), při stálé teplotě 37° C, po dobu 45 dní (EPPO, 1997).

Do pokusu byly zahrnuty rostliny révy (dřevinné indikátory) a to: Gamay (*Vitis vinifera* L.), St. George (*Vitis rupestris* Scheele) a LN 33 (Couderc 1613 x *Vitis berlandieri* Planch.). Odrůdy Gamay a LN 33 byly pozitivní na ArMV a rostliny odrůdy St. George byly pozitivní na GFLV při testování metodou ELISA. Dále byly podrobeny termoterapii tři odrůdy révy vinné: Cabernet Sauvignon, Sauvignon a Pola. Rostliny odrůdy Cabernet Sauvignon byly pozitivní na ArMV, rostliny odrůdy Pola byly pozitivní na ArMV, GFLV a GLRaV-3 a odrůda Sauvignon (kontrolní) byla negativní při testování metodou ELISA. Analyzovány byly vzorky listů.

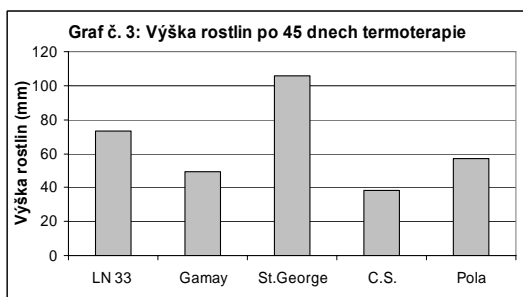
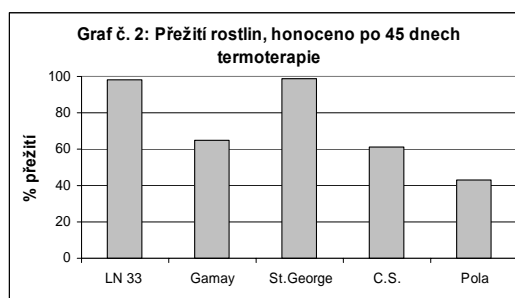
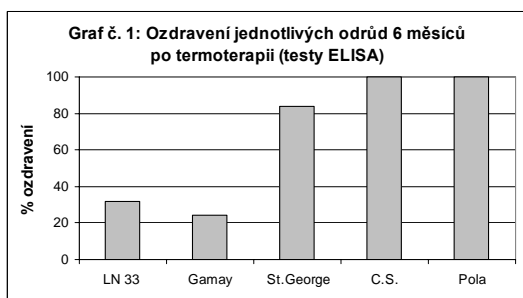
Z rostlin byly odebrány nodální segmenty velikosti cca 25 mm, které byly sterilizovány (HgCl<sub>2</sub>) a kultivovány na médiu MS (MURASHIGE SKOOG, 1962) s 0,7 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IAA. Vždy po měsíci byly rostliny přeneseny na čerstvé médium. Doba kultivace na médiu byla 12 měsíců u indikátorů a 5 měsíců u odrůd. Následně byly rostliny velikosti 3 cm podrobeny terapii. Relativní vzdušná vlhkost nebyla upravována. Z rostlin byly po termoterapii odebrány vrcholové části o velikosti 2-3 mm a kultivovány na médiu v celistvé rostliny, které byly po zakořenění převedeny do nesterilních podmínek. Testování na přítomnost virů bylo provedeno metodou ELISA po 4 měsících od převodu rostlin. Rostlin LN 33 bylo ozdraveno 32% (ArMV), Gamay 24% (ArMV) a St. George 84% (GFLV).

### Výsledky a diskuse

Z rostlin dřevinných indikátorů bylo dosaženo procenta zdravých rostlin: LN 33 32% (ArMV), Gamay 24% (ArMV) a St. George 84% (GFLV). U rostlin odrůd Cabernet Sauvignon a Pola nebyly detekovány dříve přítomné viry (graf č.1)

Rostliny dřevinných indikátorů St. George a LN 33 měly větší přírůstky během termoterapie než odrůdy pocházející z *Vitis vinifera* L. (graf č. 3). Procento přežití rostlin po termoterapii činilo 97 % (St. George a LN 33) a průměrně 56 % u odrůd pocházejících z *Vitis vinifera* L viz graf č. 2.

O procesu termoterapie *in vitro* je dosud málo informací. Úplného ozdravení termoterapií dosáhli autoři VALERO et al. (2003) u klonu 39-32 odrůdy Napoleon (GFLV a GLRaV-3). V naší práci rovněž odrůda Pola byla těchto virů zbavena (negativní testy 6 měsíců po převodu). Rovněž zajímavý je vliv použitého rostlinného materiálu na ozdravení, neboť různé odrůdy pozitivní na stejný vir vykazují odlišné procento ozdravení. K podobným závěrům dospěli také autoři LEONHARDT et al. (1998). Na použitém genotypu pravděpodobně také záleží, zdali procento ozdravení je ve vztahu s množstvím přítomných virů (u odrůdy Pola: ArMV, GFLV a GLRaV-3). Testování rostlin po termoterapii bylo provedeno metodou ELISA a je nutné považovat výsledky za orientační. Testování metodou RT – PCR bude provedeno, stejně jako přetestování rostlin po dvou letech od převodu do nesterilních podmínek.



### Poděkování

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu financovaného NAZV č. 1B44051- Výzkum a vývoj standardních metod ozdravení pomocí termoterapie a *in vitro* kultur odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů, fytoplazem a karanténních patogenů pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu. Za množství provedených ELISA testů patří zvláštní poděkování Ing. Holleinové.

### Literatura

1. EPPO Standards, Certification schemes, Pathogen – tested material of grapevine varieties and rootstocks. 1997, PM 4/8 (1)
2. HOLLEINOVÁ, V. - KŘÍŽAN, B.: Činnost technického izolátu révy v Lednici v roce 2004. In: *Vinařský obzor*. 2005, č. 4, s. 191-192, ISSN: 1212-7884.
3. LEONHARDT, W. – WAWROSCH, CH. – AUER, A. - KOPP B.: Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using *in vitro* thermotherapy. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1998, č. 52, s. 71-74.
4. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. In: *Physiol. Plant.*, 1962, č. 15, s. 473 – 497.
5. VALERO, M. – IBANEZ, A. - MORTE A.: Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. In: *Scientia Horticulturae*. 2003, č. 97, s. 289-296.

Adresa autora:

Ing. Břetislav Křížan, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zahradnická fakulta, Mendeleum – Ústav genetiky, Valtická 337, Lednice 691 44, e-mail: bretislav.krizan@seznam.cz

## PERSPEKTÍVY PEĽNICOVEJ KULTÚRY ĽANU SIATEHO FLAX ANTHHER CULTURE PROSPECTS

Zuzana BARTOŠOVÁ - Anna PREŤOVÁ

*Anther culture is the most successful way for doubled haploid production in flax. There is available a lot of information about the androgenesis, but the efficiency of its induction in flax is low. However a lot of effort and the work have been done in this field, apart from some questions which are still not solved, concerning the cultivation of released microspores in vitro and defining the sporophytic development in flax anther culture.*

*Key words: flax, anther culture*

### Úvod

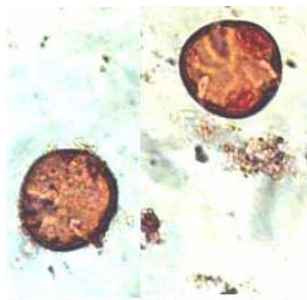
Otázka produkcie (di)haploidného materiálu ľanu cestou peľnicovej a mikrospórovej kultúry je stále veľmi aktuálna kvôli aplikáciám pre poľnohospodárske a šľachtiteľské ciele a taktiež pre štúdium molekulárnych markerov. Ľan je zaujímavý objekt výskumu z hľadiska jeho využitia pre základný výskum v prospech ľudstva (MILLAM et al., 2005). Základným predpokladom pre peľnicovú kultúru ľanu je zdravý materiál pestovaný v poľných, alebo v kontrolovaných (rastová komora) podmienkach.

### Materiál a metódy

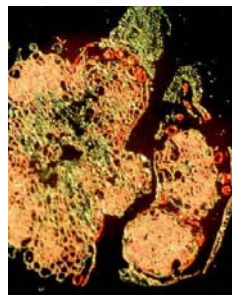
V našich experimentoch sme rastliny olejného genotypu AC Emerson pestovali v poľných podmienkach na experimentálnom poličku Ústavu genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre. Peľnicové kultúry a regeneráciu rastlín z kalusov sme realizovali ako uviedli BARTOŠOVÁ a PREŤOVÁ (2003), OBERT et al. (2004), BARTOŠOVÁ et al. (2005). Presmerovanie gametofytického vývinu na sporofytický pri mikrospórach sme pozorovali pomocou rýchlych roztlačkových preparátov. Indukované peľnice s kalusmi sme analyzovali histologicky, ako aj regenerujúce kalusy (BARTOŠOVÁ et al., 2005).

### Výsledky a diskusia

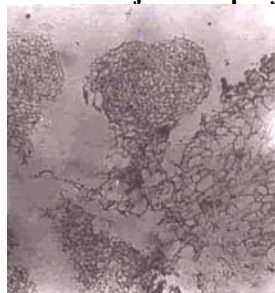
Kalusy sa tvorili na 2,6% kultivovaných peľníc. Delenie jadra indukovaných mikrospór bolo v niektorých prípadoch symetrické ako vidieť na materiáli zafarbenom acetokarmínom (obr. 1). V responzívnych peľniciach sa tvoril kalus z viacerých mikrospór, pletivo stien pravdepodobne odumieralo (obr. 2). Kalusy na regeneračnom médiu mali farbu svetlo zelenú, ale pri ďalších prenosoch sa farba menila na tmavo zelenú. Ich povrch bol granulárny. Po 6 mesiacoch subkultivácií sme pozorovali diferenciaciu organogénnych výhonkov (obr. 4) s frekvenciou 27,3%. Okrem výhonkov sme na kalusoch identifikovali štruktúry v srdcovitom štádiu (obr. 3), ktoré však nereagovali na podmienky regenerácie.



Obr. 1: Symetrické delenie jadra indukovanej mikrospóry



Obr. 2: Kalogenéza mikrospór v responzívnej peľnici



Obr. 3: Srdcovité štádium na regenerujúcom kaluse



Obr. 4: Regenerácia výhonkov na kaluse odvodeného z mikrospór

## Záver

Peľnicová kultúra je technicky oveľa jednoduchšia a často preferovanejšia ako mikrospórová kultúra. Z viacerých pozorovaní sme zistili, že frekvencia indukcie androgénneho potenciálu v peľnicovej kultúre nie je vysoká, ale pri indukcii pravepodobne viac mikrospór v peľnici reaguje na stresové podmienky a delí sa. Je teda možné kultivovať mikrospóry samotné v kultúre. Hoci v tomto smere výsledky našich experimentov neboli úspešné, ich počet nebol taký, aby sme boli dosť objektívni. Pri kultivácii mikrospór je treba dbať o presné zloženie indukčného média, o jeho hodnotu pH, zvolené osmotické činidlo, rozpustené aminokyseliny. Možno práve na úrovni mikrospór môžeme pochopiť nízku responzivnosť peľnicovej kultúry.

## Literatúra

1. BARTOŠOVÁ, Z. – OBERT, B. – TAKÁČ, T. – KORMUŤÁK, A. - PREŤOVÁ, A.: Using enzyme polymorphism to identify the gametic origin of flax regenerants. In: Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, vol.47/1, 2005, p. 173-178
2. BARTOŠOVÁ, Z. – PREŤOVÁ, A.: Indukcia kalogenézy v kultúre izolovaných semenníkov a peľníc vybraných odrôd ľanu siateho. In Zb. z 10. odb. sem. Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohosp. rastlín, 26.-27. nov. 2003, Piešťany, Slovak Republic, str. 25-28
3. BARTOŠOVÁ, Z. – TAKÁČ, T. – PREŤOVÁ, A.: Plant regeneration pathway in flax anther culture. In Book of abstracts. COST 843 Final Conf. June 28- July 3 2005, Stará Lesná, Slovak Rep., p. 186-188
4. MILLAM, S. – OBERT, B. – PREŤOVÁ, A.: Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* L. – a review. In Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 82, 2005, p. 93-103
5. OBERT, B. – BARTOŠOVÁ, Z. – PREŤOVÁ, A.: Dihaploid production in flax by anther and ovary cultures. In Journal of Natural Fibres, vol. 1, no. 3, 2004, p. 1-14

---

Adresa autorov:

RNDr. Zuzana Bartošová, Katolícka univerzita, Nám. A. Hlinku 56, 034 01 Ružomberok, e-mail: bartosova@fedu.ku.sk, RNDr. Anna Preťová, DrSc., Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra

## POTENTIAL ROLE OF TOLERANT PLUMS IN THE SPREAD OF PLUM POX VIRUS IN SLOVAKIA

### POTENCIÁLNA ÚLOHA TOLERANTNÝCH SLIVIEK PRI ROZŠIROVANÍ VÍRUSU ŠARKY SLIVKY NA SLOVENSKU

Miroslav GLASA - Soňa PITTNEROVÁ - Otakar KÚDELA

*Plum pox virus (PPV) is the causal agent of sharka, the most detrimental disease of stone-fruit trees world-wide. Since late 1980's, a new generation of plum cultivars (so-called tolerant cvs.) dominated in commercial plum orchards in Slovakia. During our study, frequent infection of orchards, planted with tolerant cvs., could be noted. More sensitive molecular-based diagnosis revealed also asymptomatic PPV infection. We conclude that the high incidence of PPV in stone-fruit orchards in Slovakia could be involved through uncontrolled biological material propagated in the past, when health regulations were not enforced as strictly due to an absence of available detection techniques. Moreover, based on our research, tolerant plums could be an initial source of spread of recombinant PPV isolates, assigned recently to the new subgroup PPV-Rec.*

*Key words: detection, epidemiology, PPV, Prunus, isolate*

#### Introduction

The Sharka disease poses an important threat to stone-fruit cultivation worldwide. Plum pox virus (PPV), the causal agent of the disease, is a member of the genus Potyvirus within the Potyviridae family, transmitted by aphids in the non-persistent manner. PPV has a single-stranded plus-sense RNA genome.

The main strategy to control the disease is either (a) quarantine measures for unaffected areas or (b) a mix of prophylactic approaches in regions where the disease is present but under control. These include the use of virus-free propagation material (rootstock, budwood), the eradication of infected plants and, if required, the control of aphid populations. Such a mixed strategy has been shown to slow virus progress but complete eradication is notoriously difficult to achieve. In regions where the spread of the disease is no longer under control (central and southeastern Europe), the cultivation of less susceptible or tolerant varieties is used to allow the continuation of production. This practice, however, further contributes to viral spread.

#### Material and Methods

Natural field PPV isolates were collected from different plum orchards in Slovakia. DAS-ELISA using commercial antisera (Loewe) and RT-PCR targeting the CP gene were performed as described previously (GLASA et al., 2002a). An improved typing strategy, based on the comparison of RT-PCR/RFLP typing results obtained from three genomic regions, i.e. CP, CI and P3-6K1, of each PPV isolate were used (GLASA et al., 2002b, 2004).

#### Results and Discussion

Survey of PPV infection in different orchards of tolerant plums (Krajné, Podkylava, Dvory nad Žitavou, Dolné Plachtince, Lozorno) showed a high virus incidence. All tested cultivars (i.e. Čačanská rodná, Č. leptotica, Č. raná, Č. najbolea, Stanley) were infected.

In a special test, 19 trees of tolerant plums from 3 distinct orchards were simultaneously tested by DAS-ELISA and RT-PCR. The PPV presence was detected in 12 trees by DAS-ELISA. More sensitive RT-PCR test revealed the presence of PPV additionally also in three symptomless trees (Table 1), confirming the higher sensitivity of RT-PCR in comparison with ELISA, and also the possibility of symptomless reaction of infected trees (due to the early stage of infection or specific host response).

Until recently, the vast majority of the currently identified PPV isolates was assigned to either one of two major subgroups, PPV-M and PPV-D (CANDRESSE et al., 1998). Recently, a third major subgroup of PPV isolates has been identified and named PPV-Rec (GLASA et al., 2004). It corresponds to an ensemble of closely related isolates characterised by a homologous ancestral recombination event between PPV-M and PPV-D. Close molecular relationships of Slovak recombinant isolates support the hypothesis that these could have a common ancestor and unique dissemination focus. From the epidemiological point of view, a clear linkage of PPV recombinants to plum orchards planted with sharka-tolerant plum cultivars bred in Serbia (the former Yugoslavia) could be established and might indicate a possible initial source of PPV recombinants in Slovakia. As any compulsory eradication programme of diseased trees exists in Slovakia, consequently, infected trees of tolerant plums remain in the field. PPV could accumulate in tolerant *Prunus* cultivars in comparable level as in susceptible cultivars. Hence, trees of tolerant cultivars may provide an important reservoir from which PPV could emerge to other *Prunus* hosts.

**Table 1: Comparison of sensitivity of DAS-ELISA and RT-PCR when testing the tree of tolerant plums from the localities Krajné, Dvory nad Žitavou and Dolné Plachtince**

no.	tree <sup>1</sup> (cultivar/number)	leaf symptoms <sup>2</sup>	DAS-ELISA		RT-PCR
			A <sub>405</sub>	results	
1	NA (3/1)	0	0.003	-	-
2	NA (3/3)	0	0.013	-	-
3	LE (3/10)	3	0.964	++	+
4	RO (3/4)	3	0.460	++	+
5	RO (3/5)	3	0.019	-	+
6	RO (3/7)	2	0.491	++	+
7	RO (3/9)	3	0.172	+	+
8	RA (14/6)	2	1.629	++	+
9	RA (14/7)	3	0.652	++	+
10	RA (14/9)	2	0.451	++	+
11	RA (14/10)	2	0.320	++	+
12	ST (3/3)	0	0.012	-	-
13	ST (3/6)	0	0.014	-	+
14	LE (6/4)	2	1.429	++	+
15	LE (6/5)	2	1.423	++	+
16	LE (6/6)	3	0.001	-	+
17	NA (1)	2	0.222	++	+
18	RA (2)	2	0.389	++	+
19	ST (3)	0	0.009	-	+
20	healthy control	0	0.018	-	-

Legend:

<sup>1</sup> Čacanska najbolea (NA), Č. lepotica (LE), Č. rodná (RO), Č. raná (RA), Stanley (ST)

<sup>2</sup> 0 - symptomless, 1 - symptoms on less than 30 % of leaf area, 2 - symptoms on 30 - 60 % of leaf area, 3 - symptoms on more than 60 % of leaf area

ELISA, RT-PCR: - negative, + positive

## Conclusion

The rapid detection of viruses and accurate identification of their specific isolate groups and the determination of their genetic variability are the first steps in designing effective disease control strategies. Eradication of PPV infected trees of tolerant plum cultivars has been neglected for a long time due to the fact that their yields were only slightly affected and/or the infection could remain asymptomatic. This fact, however, contributed largely to the effective PPV spread in Slovakia.

## Literature

- CANDRESSE, T. – CAMBRA, M. – DALLOT, S. – LANNEAU, M. – ASENSIO, M. – GORRIS, MT. – REVERS, F. – MACQUAIRE, G. – OLMOS, A. – BOSCIA, D. – QUIOT, J.B. – DUNEZ, J.: Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the M and D serotypes of plum pox potyvirus. In: *Phytopathology*, 88, 1998, 198-204.
- GLASA, M. - MARIE-JEANNE, V. – MOURY, B. – KÚDELA, O. – QUIOT, JB. (2002a): Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of Plum pox virus. In: *Archives of Virology*, 147, 2002a, 563-575.
- GLASA, M. - MARIE-JEANNE, V. – LABONNE, G. – ŠUBR, Z. – KÚDELA, O. – QUIOT, JB.: A natural population of recombinant Plum pox virus is stable and competitive under field conditions. In: *European Journal of Plant Pathology*, 108, 2002b, 843-853
- GLASA, M. – PALKOVICS, L. – KOMÍNEK, P. – LABONNE, G. – PITTNEROVÁ, S. – KÚDELA, O. – CANDRESSE, T. – ŠUBR, Z.: Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85, 2004, 2671-2681

## Acknowledgements

This work was supported by the grant APVT-51-001305 and partially by the grant 2/3080/25 (VEGA).

Author's address:

Miroslav Glasa, Soňa Pittnerová, Otakar Kúdela, Oddelenie rastlinnej virológie, Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, tel. +421-2-59302447, fax. +421-2-54774284, virumig@savba.sk



## VÍRUSOVÉ OCHORENIA OBILNÍN VIRAL DISEASES OF CEREAL CROPS

Otakar KÚDELA - Viera VAJCÍKOVÁ - Soňa PITTNEROVÁ - Miroslav GLASA

*Using ELISA and PCR techniques the incidence of economically important viral species infecting wheat, barley, triticale and oat was investigated. In the samples of winter barley and wheat the BYDV-PAV, BYDV-MAV, CYDV-RPV, and WDV were identified. The occurrence of BYDV-RMV, SBCMV, BaMMV, BSMV, BaYMV, WSSMV and WSMV was not demonstrated. In the oat and triticale samples no WDV infection was detected.*

*Key words: viruses, cereal crops, ELISA, PCR*

### Úvod

V súčasnosti je známych viac ako 30 vírusových druhov, kmeňov a izolátov infikujúcich obilniny. Z epidemiologického hľadiska sú najvýznamnejšie vírus žltej zakrpatenosti jačmeňa-barley yellow dwarf virus (BYDV) a vírus zakrpatenosti pšenice-wheat dwarf virus (WDV). Na základe vektorovej špecificity, účinnosti prenosu voškami, serologických a molekulárno-biologických vlastností sa identifikovalo sedem BYDV kmeňov. BYDV-PAV a MAV reprezentujú rod Luteovirus, CYDV-RPV (cereal yellow dwarf virus) rod Polerovirus a BYDV-RMV, SGV a GPV sú súčasťou čeľade *Luteoviridae* bez rodovej príslušnosti. Nedávno sa od kmeňov BYDV-PAV odčlenil BYDV-PAS (1). Tiež u WDV izolátov sa identifikovali na základe hostiteľského spektra a sekvenčných odlišností dve formy – pšeničná a jačmenná (2).

Na území SR sa v minulosti výskyt vyššie uvedených vírusov sledoval len sporadicky (3). BYDV a WDV je od roku 2001 monitorovaný imunochemicky v diagnostických laboratóriách ÚKSÚPu. Prítomnosť ďalších vírusových druhov sa nesledovala.

### Materiál a metódy

#### Zber vzoriek.

Vzorky listov ozimnej pšenice, ozimného jačmeňa, tritikale a ovsu boli zozbierané z rôznych oblastí SR (prevažne z územia západného Slovenska) v rokoch 2003 – 2005 a po roztriedení uchovávané pri  $-20^{\circ}\text{C}$  (krátkodobu) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Imunochemická analýza.

Vzorky obilnín sa testovali komerčnými (Loewe, Neogen, Agdia) protilátkami v usporiadaní DAS a TAS ELISA na nasledujúce vírusy:

- BYDV-PAV, BYDV-PAV/MAV, CYDV-RPV, BYDV-RMV
- WDV
- BSMV – vírus prúžkovej mozaiky jačmeňa
- BaMMV – vírus ľahkej mozaiky jačmeňa
- BaYMV – vírus žltej mozaiky jačmeňa
- WSSMV – vírus vretenovito čiarkovitej mozaiky pšenice
- WSMV – vírus čiarkovitej mozaiky pšenice
- SBMV – vírus pôdou prenosnej mozaiky obilnín

#### Izolácia nukleových kyselín a príprava cDNA.

Nukleové kyseliny sa väčšinou izolovali štandardnou fenol-chloroformovou technikou. V menšom rozsahu sa použili komerčné súpravy Promega a Qiagen. cDNA sa syntetizovala použitím špecifických reverzných primerov (1) a AMV (Promega) reverznej transkriptázy.

#### PCR

Vybrané vzorky pšenice, jačmeňa a ovsu sa testovali v PCR, resp. RT-PCR na prítomnosť BYDV-PAV a MAV, WDV a OMV (vírus mozaiky ovsu) podľa publikovaných postupov (1,2,4). PCR produkty sa analyzovali v agarózových géloch.

### Výsledky a diskusia

ELISA technikami sa celkovo vyšetřilo 108 vzoriek rôznych odrôd ozimnej pšenice, 63 vzoriek ozimného jačmeňa, 4 vzorky tritikale a 5 vzoriek ovsu. Vo vzorkách pšenice sa identifikoval WDV (10 vzoriek), BYDV-PAV/MAV (3 vzorky), CYDV-RPV (1 vzorka) a BYDV-PAV (12 pozitívnych vzoriek). 8 vzoriek jačmeňa bolo pozitívnych na WDV, 6 na BYDV-PAV/MAV a 16 na BYDV-PAV. BYDV-PAV bol zistený na jednej vzorke tritikale. ELISA testy na ovse boli negatívne. Iné vírusové druhy sa nezistili. Výskyt identifikovaných vírusov nebol epidemický a mal lokálny charakter.

Časť vzoriek so silným a slabým ELISA signálom sa vyšetřila v PCR, resp. RT/PCR. Testami sa identifikoval WDV, BYDV-PAV a BYDV-MAV. Pozitivita PCR testov korešpondovala so silným ELISA signálom. Prítomnosť OMV sa vo vzorkách ovsu nedokázala. PCR testy sa ešte nerealizovali na reprezentatívnom počte vzoriek, ale predbežné výsledky naznačujú vyššiu diagnostickú citlivosť a špecificitu PCR a výskyt oboch foriem WDV.

### Záver

ELISA a PCR technikami sa vyšetrili vzorky ozimnej pšenice, ozimného jačmeňa, tritikale a ovsa na prítomnosť viacerých vírusových druhov a kmeňov infikujúcich obilniny. Vo vzorkách sa identifikoval, BYDV-PAV (ELISA a RT-PCR), BYDV-PAV/MAV (ELISA), BYDV-MAV (RT-PCR), CYDV-RPV (ELISA) a WDV (ELISA, PCR).

### Literatúra

1. BISNIEKIS, M. et al.: Molecular diversity of the coat protein coding region of BYDV-PAV and BYDV-MAV from Latvia and Sweden. In: Archives of Virology 149/2004, s. 843-853.
2. SCHUBERT, J. et al. : Investigation of differences between wheat and barley forms of WDV and their distribution in host plants In: Plant Protection Science 38/2002, s. 43-48.
3. VACKE, J.: Occurrence of barley yellow dwarf virus in winter cereals in Czechoslovakia. In: Proc.XI. Czechoslovak Plant Protec. Conf., Nitra, September 6-8, 1988, s. 203-204.
4. CLOVER, G.R.G. et al. : Detection of European isolates of *Oat mosaic virus*. In. European Journal of Plant Pathology 108/2002, s. 87-91.

---

Adresa autorov:

RNDR. Otakar Kúdela, CSc, Ing. Miroslav Glasa, PH.D, Mgr. Soňa Pittnerová  
Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, viruotku@savba.sk

Ing. Viera Vajčíková

Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky, Hanulova9/A, 84101 Bratislava

## STANOVENÍ KORELACE MEZI RELATIVNÍ KONCENTRACÍ VIRU *PLUM POX VIRUS* A TEPLOTOU ZA VEGETACE DETERMINATION OF CORRELATION BETWEEN RELATIVE CONCENTRATION OF *PLUM POX VIRUS* AND TEMPERATURE IN THE GROWING SEASON

Michal ADAM

*At four Apricot trees with positive tests by DAS-ELISA with symptoms Plum pox virus on the leaves and fruits were made in the period from April to October 14 samplings (in the year 2003) and 15 samplings (in the year 2004). The relative concentration of virus dilution of samples has been assigned in the rate from 1:20 to 1:320. Rated concentrations were correlated to the temperature. The year was segmented into several successive time periods in accordance to the average ten-day temperature. The first period in the beginning of growing season involves all measurements when average temperature did not exceed 15.0°C in the two successive measurements. The second period of the growing season includes days with average temperature oscillating between 15.1 – 21 °C. The average temperature above 21.1°C determines the third period and the last one includes average temperatures below 21°C in the end of growing season. In every tested correlation samples the value of significant level reached 99%, except calculated value for the temperature and concentration of virus in samples from the tree No. 89 in the period between 1<sup>st</sup> April and 30<sup>th</sup> May 2004. In that case the calculated number corresponds to critical values of significant level 98%. As a critical period, when the virus presence is reduced, might be considered the period from second decade of August with average ten-day temperature higher than 18°C.*

*Key words: Plum pox virus, DAS-ELISA, koncentrace, teplota, korelace, concentration, temperature, correlation*

### Úvod

Rozložení viru *Plum pox virus* (PPV) není v rostlině rozmístěn rovnoměrně, rovněž koncentrace virových částic se mění v průběhu roku. Pro správnou detekci viru, je třeba vybrat optimální termín odběru vzorků. V pokusech bylo stanoveno období, kdy je možné spolehlivě detekovat virus PPV v rostlině v korelaci s teplotou.

Stanovení relativní koncentrace viru v rostlině je zástupnou metodou, za přesné stanovení koncentrace virových částic pomocí elektronového mikroskopu, kdy je přesně počítán počet virových částic ve vzorku (CORBETT, 1974). Ke stejnému účelu lze použít real-time PCR, kdy je možné porovnáním počtu cyklů, potřebných pro dosažení určité úrovně fluorescence u neznámého vzoru a vzorku se známým počtem virových částic, stanovit koncentraci viru (SCHNEIDER et al., 2004).

Při stanovení relativní koncentrace ředěním vzorku pro testování metodou DAS-ELISA nedochází k přesnému stanovení koncentrace virových částic v rostlině, ale vychází se z předpokladu, že citlivost standardního ELISA testu je asi 10 – 50 ng viru v 1 ml roztoku (HILGERT et al., 1993). Pokud dochází i po zředění vzorku k pozitivní reakci musí být koncentrace virových částic vyšší než je citlivost testu. Postupuje-li se v ředění až je dosaženo negativního výsledku, pak je možné stanovit relativní koncentrace viru (MARCO, COHEN, 1979; KOMÍNEK, 1999).

Je známo, že koncentrace viru je snižována vysokými letními teplotami a také nízkými teplotami. Nebylo tedy možné korelovat spolu teplotu a koncentraci během celého roku, ale bylo nutné rok rozdělit do několika vhodných částí.

### Materiál a metodika

Byli vybráni čtyři jedinci (*Armeniaca vulgaris* L.) s pozitivním testem na PPV z předchozích let a ti byli v průběhu roku 2003 a 2004 testováni metodou DAS-ELISA (CLARK, ADAMS, 1977) na přítomnost viru PPV a byla u nich stanovena relativní koncentrace viru. Vzorky byly připraveny z listů, květů s příznaky, rostoucí ve střední části výhonů, bylo odebíráno 10 – 15 listů, květů podle velikosti rostliny. Odebrané části rostlin byly ukládány do jednorázových igelitových sáčků. V laboratoři se z odebraných částí připravil směsný vzorek o hmotnosti 0,25 g (KAREŠOVÁ, 1993).

Byl odebírán 1 ml homogenátu, který se ředil v předem připravené zkumavce obsahující 1 ml extrakčního pufru, roztok se důkladně promíchal. Z prvního ředění bylo odebráno 1 ml roztoku a ten byl dán do další zkumavky opět s jedním mililitrem extrakčního pufru. Základním ředěním pro ELISA test je 1:20, tento extrakt se dále ředil pufrům, vždy dvojnásobně. Dostala se tedy ředící řada 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 (KOMÍNEK, 1999). Maximální ředění, které bylo testováno, bylo 1:320. Korelace byla vypočítána programem Excel, částí analytické nástroje, funkcí korelace.

V roce 2003 byl první odběr proveden 16. dubna, vzorky byly připraveny z plně rozkvetlých květů v počtu 8 – 10 kusů. Další vzorky od 30. dubna do 15. října byly připraveny z listů s příznaky, rostoucí ve střední části výhonů. Z natrhaných listů se připravovaly navážky 0,25 g pro prvotní ředění 1:20. V roce 2004 byly provedeny dva testy květů, a to 9. a 14. dubna, od 29. dubna do 21. října bylo odebráno dalších 13 vzorků.

Celkem bylo provedeno 14, respektive 15 odběrů vzorků ze čtyř stromů meruněk.

## Výsledky diskuze

Stanovení relativní koncentrace viru v pletivech stanovením titru v DAS – ELISA bylo prováděno postupným ředěním šťávy zkoumaného jedince pro stanovení posledního zředění, kdy ještě byla reakce pozitivní.

**Tabulka 1: Zjištěné hodnoty koncentrace viru PPV v roce 2003**

datum	1604	3004	1405	2805	0606	1906	0807	2207	0508	1908	0309	1709	0110	1510
Strom 17	320	20	80	80	320	160	320	40	320	160	160	320	320	20
Strom 21	160	0	40	80	320	320	160	20	320	80	160	320	320	20
Strom 40	160	20	80	320	80	160	40	0	20	0	80	320	320	0
Strom 89	80	0	320	320	160	320	80	20	160	20	160	320	160	0
průměr	180	10	130	200	220	240	150	20	205	65	140	320	280	10

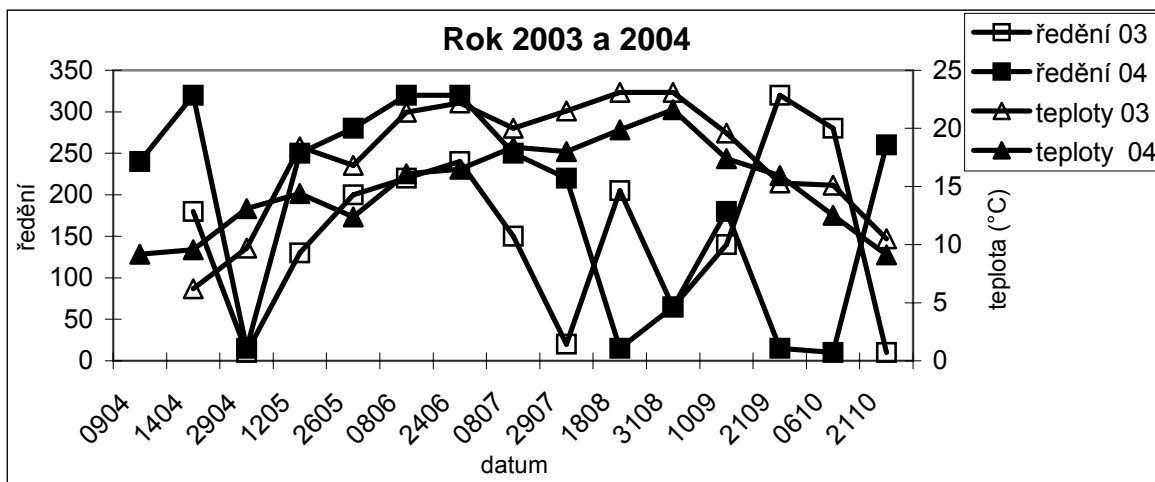
První stanovování relativní koncentrace z květů v roce 2003 ukázalo hodnoty od 1:80 do 1:320, další měření již z mladých listů o 14 dní později dávalo částečně koncentrace pod prahem citlivosti a částečně v základní koncentraci. Zhruba od poloviny května do poloviny srpna se koncentrace držela na úrovni od 1:40 do 1:320. Ve druhé polovině července se projevil vliv letních teplot s následnou sníženou koncentrací virových částic v rostlinných pletivech. Ochlazení v průběhu září přineslo zvýšení relativní koncentrace viru. Na závěr dochází opět k poklesu koncentrace vlivem nízkých teplot a ranních mrazíků.

**Tabulka 2: Zjištěné hodnoty koncentrace viru PPV v roce 2004**

datum	0904	1404	2904	1205	2605	0806	2406	0807	2907	1808	3108	1009	2109	0610	2110
Strom 17	320	320	20	320	320	320	320	320	80	40	160	320	20	40	320
Strom 21	320	320	40	320	320	320	320	320	320	20	20	40	20	0	320
Strom 40	320	320	0	320	320	320	320	40	320	0	80	320	20	0	320
Strom 89	0	320	0	40	160	320	320	320	160	0	0	40	0	0	80
průměr	240	320	15	250	280	320	320	250	220	15	65	180	15	10	260

V roce 2004 začalo testování o týden dříve, tak jako v roce 2003 byly první testy provedeny na vzorcích připravených z květů, pro zajímavost byl o pět dní později proveden druhý odběr z více nakvetlých (téměř opadaných) květů a znovu stanovena relativní koncentrace viru. U třech ze čtyř vzorků byla koncentrace stejná, čtvrtý vzorek (89) oproti předchozímu testu ukázal koncentraci 320 krát vyšší. Další vzorek ukázal prudký pokles koncentrace u dvou vzorků až pod hladinu citlivosti testu, tento vzorek byl připraven z velmi mladých listů. Poté následuje vzestup koncentrace viru v pletivech spolu s rostoucí teplotou zhruba do začátku července, kdy již průměrné denní teploty dosahují 18°C a koncentrace viru začíná klesat až do konce srpna. Kdy byl detekován krátkodobý nárůst koncentrace, který však ukončilo několikadenní chladnější období a nezvykle časně mrazíky. Na závěr měření těsně před opadem listu dosáhla koncentrace viru ještě jednou maximální zjišťované hodnoty.

**Graf 1: Průměrné koncentrace viru PPV a průměrné teploty**



V průběhu celého roku byl vždy alespoň jeden vzorek pozitivně detekován na přítomnost viru PPV. Úskalím pro testování se zdají být tři období. První je zhruba koncem dubna, kdy jsou již květy odkvetlé a listy příliš mladé. Druhým problematickým obdobím jsou druhá polovina července až první polovina srpna, kdy v návaznosti na vysoké letní teploty dochází k poklesu koncentrace viru v pletivech. Třetím rizikovým

obdobím se ukazuje konec září a začátek října, kdy vlivem nízkých nočních teplot dochází k poklesu koncentrace viru.

Rok byl rozdělen podle průběhu teplot na čtyři období: první část, kdy průměrné teploty za deset dní nepřesáhnou hodnotu 15,1°C ve dvou po sobě jdoucích sledováních, druhé období, kdy se teploty pohybují v rozmezí 15,1 – 21°C, třetí období - teploty jsou vyšší než 21,1°C, a poslední období, kdy jsou teploty nižší než 21°C. Rok 2003 byl rozdělen podle daných teplotních kritérií na období od 1.4. do 21.5., od 22.5. do 30.8. a poslední období od 1.9. do 30.10. Rok 2004 byl rozdělen na období od 1.4. do 30.5., od 1.6. do 21.7., od 22.7. do 31.8. a 1.9. až 30.10.

Byly spočítány korelační koeficienty pro daná období z pohledu vztahu mezi průměrnou denní teplotou a hodnotami zředění.

**Tabulka 3: Zjištěné korelační koeficienty pro rok 2003**

	<i>teplota 1.4.- 21.5.</i>	<i>teplota 22.5.- 30.8.</i>	<i>teplota 1.9. - 30.10.</i>
strom 17	-1	0,0551	0,9767
strom 21	-1	0,3539	0,9767
strom 40	-1	-0,193	0,9206
strom 89	-1	0,0376	0,9231

Vypočtené korelační koeficienty ukázaly pevnou závislost koncentrace viru na teplotě v prvním a posledním sledovaném období. V prvním období jde o negativní závislost, kdy s rostoucí teplotou klesá koncentrace. V posledním období jde o pozitivní závislost, kdy s klesající teplotou koncentrace rovněž klesá. Druhé období od 22.5. do 30.8. tak, jak bylo vytyčeno jen s přihlédnutím na průměrné denní teploty, se ukázalo jako nedokonalé. Rozdělili jsme proto toto období na tři menší: od 22.5. do 30.6., od 1.7. do 31.7. a 1.8. až 31.8.

**Tabulka 4: Zjištěné korelační koeficienty pro rok 2003 - upravené rozdělení**

	<i>teplota 22.5 - 30.6.</i>	<i>teplota 1.7.- 31.7.</i>	<i>teplota 1.8. - 31.8.</i>
strom 17	0,9778	-1	1
strom 21	0,6021	-1	1
strom 40	-0,83	-1	1
strom 89	-0,993	-1	1

Při tomto upraveném rozdělení byly získány v prvním období hodnoty charakteristické pro velmi vysokou těsnost závislosti, pro velkou a význačnou těsnost závislosti. Zajímavé však je, že se u dvou zkoumaných jedinců jedná o negativní a u dvou o pozitivní závislost - tyto rozdíly lze již snad vysvětlit jen jako vliv odrůdy. V období od 1.7. do 31.7. je pevná negativní závislost koncentrace na teplotě: s rostoucí teplotou klesá koncentrace. Hodnoty pro třetí období 1.8.- 31.8. jsou charakteristické pro pevnou pozitivní závislost.

Kromě hodnocení stupňů volnosti byly pro vypočtená čísla stanoveny kritické hodnoty výběrového korelačního koeficientu.

U všech zkoumaných korelací dosáhly hodnoty hladiny významnosti 99%.

**Tabulka 5: Zjištěné korelační koeficienty pro rok 2004**

	<i>teplota 1.4 - 30.5.</i>	<i>teplota 1.6.- 21.7.</i>	<i>teplota 22.7. - 31.8.</i>	<i>teplota 1.9. - 30.10</i>
strom 17	-0,768	0,9917	-1	-0,99
strom 21	-0,768	0,9917	-1	-0,749
strom 40	-0,768	-0,992	-1	-0,988
strom 89	-0,29	0,9917	-1	-0,955

V roce 2004 bylo rozdělení na čtyři období podle průměrných teplot dostačující, co se průběhu teplot týče, lze ho označit za normálnější než nadprůměrně teplý rok 2003. V prvním sledovaném období dosáhly vypočtené hodnoty ve třech případech na hodnoty velké těsnosti negativní závislosti, v jednom případě na interval nízké těsnosti závislosti. V druhém období dosáhly vypočtené korelační koeficienty hodnot pro velmi vysokou těsnost závislost, ale ve třech případech pozitivní, v jednom negativní. Třetí období lze charakterizovat pevnou negativní závislostí teploty na koncentraci viru.

Vypočtené hodnoty v posledním sledovaném období se nacházejí v intervalu pro velmi vysokou těsnost závislosti ve třech případech a v jednom případě v intervalu velké těsnosti závislosti.

U všech zkoumaných korelací dosáhly hodnoty hladiny významnosti 99%, kromě vypočtené hodnoty pro teplotu a koncentraci viru ve vzorcích z jedince označeného číslem 89 v období od 1.4. do 30.5. 2004, kdy vypočtené číslo odpovídá kritickým hodnotám hladiny významnosti 98%.

V tomto pokusu bylo cílem stanovit obecnější kritéria pro odběr vzorků pro detekci viru PPV obvykle je stanovena nevhodná doba pro odběr vzorků kategoričným výčtem měsíců, tedy termín od do. V našich pokusech bylo stanoveno toto období pomocí jiného kritéria, a to průměrné teploty za posledních deset dní, což je hodnota, která je k dispozici na meteorologických stanicích. Použitím desetidenních průměrů byly do jisté míry otupeny ostré hrany extrémních teplot.

V práci LEBEURIER, HIRTL (1966) se uvádí, že při teplotě 24°C roste koncentrace viru a při 28°C již množství viru klesá, k obdobnému výsledku došel GLASA et al. (2003), kteří zkoušeli inkubaci inokulovaných rostlin při teplotě 17, 30 a 32°C - při 32°C se neobjevovaly symptomy a naměřené hodnoty absorbance byly 17 krát nižší než při teplotě 17°C. Podobné hodnoty uvádí i SUZKIW (2004) - podle něho: když teplota roste od 84 °F (28,8°C) do 90°F (32,2°C), pak výrazně klesá virová koncentrace. Z toho jasně vyplývá závislost viru na teplotě. Z našich výsledků vyplývají podobné závěry. Relativní koncentrace viru je závislá na teplotě, ale jak je vidět z grafu 1., virová koncentrace má určitou „pufrovací“ schopnost a je možné detekovat relativní virovou koncentraci na úrovni 1:320 i po určité, byť krátké, době působení průměrných denních teplot nad 20°C.

### Závěr

Pro termín testování rostlinného materiálu z polních podmínek je obtížné stanovit obecnější pravidla z dvouletých pokusů. Za kritické období, kdy je přítomnost viru redukována, můžeme považovat období od druhé dekády srpna, kdy zároveň průměrné desetidenní teploty překročily hodnotu 18°C.

### Literatura

1. CLARK, M.F. - ADAMS, A.N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* . 1977, no. 34, s. 475-483.
2. CORBETT, M.K.: Detection of Viruses and Diagnosis of Plant Viral Diseases by Electron Microscopy. *Acta Hort. (ISHS)* 1974 no.36:141-188
3. GLASA, M. - LABONNE, G. - QUIOT, J. -B. :Effect of temperature on *Plum pox virus* infection. *Acta virologica*. 2003, no. 47, s. 49-52.
4. HILGERT, I., et al.: Monoclonal Antibodies Suitable for Plum Pox Virus Determination. *Hybridoma*. 1993, no. 12, s. 215-220.
5. KAREŠOVÁ, R.: Stanovitelnost viru šarky švestky (*Plum pox virus* - PPV) v pozitivních stromech slivoní metodou ELISA: Determinability of PPV in the positive plum trees by ELISA method. *Vědecké práce ovocnářské*. 1993, č. 13, s. 33-49.
6. KOMÍNEK P.: Diferenciace kmenů viru šarky švestky a využití ELISA při šlechtění meruněk na rezistenci k tomuto viru. ; Doktorská disertační práce, ČZU Praha, 1999, s. 105
7. LEBEURIER, G. - HIRTH, L.: Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus. *Virology*. 1966, no. 29, s. 385-389.
8. MARCO, S. - COHEN, S.: Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*. 1979, no. 69, s. 1259-1262.
9. SCHNEIDER, W. et al.: Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2004, no. 120, s. 97-105.
10. SUZKIW, J.: *Monitoring Plum Po : American Fruit Grower* [online]. 2004 [cit. 2005-03-19].

### Poděkování

Tento projekt byl podpořen z grantu NAZV QC 1359.

## KVANTITATÍVNA ANALÝZA PATOGENOV OBILNÍN POMOCOU REAL-TIME PCR

### QUANTITATIVE ANALYSIS OF PATHOGEN OF CEREALS BY REAL-TIME PCR

Jozef GUBIŠ - Martina HUDCOVICOVÁ - Viera ČERVENÁ - Katarína BOJNANSKÁ - Martin PASTIRČÁK

*The objective of this paper was quantification of chosen pathogen cereals in plant material. A real-time quantitative PCR technique has been used as a rapid and sensitive seed health test for *P. teres*, *R. secalis* and *S. tritici* from artificially and field infected seeds. Using the fluorescent reporter dye SYBR Green I for real-time detection of PCR amplification, pathogen DNA extracted from infected seeds can be quantified to the picogram level. In these experiments pathogen-specific primers for *R. secalis* and *S. tritici* were developed too. Specific primer set for *R. secalis* (RS17F and RS17R) was derived from ITS regions of rDNA of this pathogen and primer set for *S. tritici* (STRT1F and STRT1R) was derived from  $\beta$ -tubuline gene of this pathogen. It has been proved that primers specific to *P. teres*, *R. secalis* and *S. tritici* can reliably diagnose pathogen DNA as well as its presence in the mixture with barley or wheat DNA.*

*Key words: real-time PCR, molecular detection, plant pathogens*

#### Úvod

Na detekciu patogénov je okrem klasických fytopatologických testov možné využiť PCR techniky. PCR metódy sú oproti klasickým testom veľmi vysoko citlivé a špecifické, rýchle a interpretácia výsledkov je jednoznačná. Pri obilninách sa techniky PCR využili pri detekcii viacerých patogénov: *Pyrenophora graminea* (THOMAS a kol., 1998), *Pyrenophora teres* (STEVENS a kol., 1998), *Rhynchosporium secalis* (LEE a kol., 2001), *Ustilago hordei* (WILLITS a SHERWOOD, 1999), *Septoria tritici* a *Stagonospora nodorum* (FRAAIJE a kol., 2001), ale aj ďalších patogénov pšenice (McCARTNEY a kol., 2003). Zavedenie novej techniky real-time PCR (RT-PCR) zlepšilo a zjednodušilo metódy kvantifikácie patogénnej DNA. Kvantifikácia DNA patogéna môže byť uskutočnená 2 spôsobmi, a to pomocou SYBR Green I systému alebo pomocou TaqMan™ sondy. Systémom SYBR Green I boli diagnostikované *P. graminea* (THOMAS a kol., 1998) a *P. teres* (STEVENS a kol., 1998). Cieľom našej práce bola kvantifikácia vybraných patogénov obilnín v rastlinnom materiále.

#### Materiál a metódy

Kultúra *P. teres* bola uchovávaná na Czapek-Doxovom agare a kultúry *R. secalis* a *S. tritici* na zemiakoglukózovom agare pri 20 °C. Semená odrody pšenice Brea boli umelo inukolované kultúrou patogéna *S. tritici* a semená odrody jačmeňa Dukos kultúrami *P. teres* a *R. secalis* samostatne (blokmi agaru o veľkosti 0,5x0,5 cm prerastenými patogénmi).

Celková genomická DNA *S. tritici* a *R. secalis* bola extrahovaná z 8-týždňových jednospórových kultúr a *P. teres* z 3-týždňových jednospórových kultúr patogéna rastúcich na agarových pôdach. Mycélium patogénov bolo zoškriabané z agarových platiní a DNA bola extrahovaná podľa DELLAPORTA a kol. (1983). Celková DNA z 1 g múky semien zomletých na ultracentrifugačnom mlyne ZM 100 (Germany) bola extrahovaná použitím Adgen DNA extrakčného systému (Adgen Ltd.) a Wizard DNA Clen-Up systému (Promega). Umelo infikovaná múka semien obsahovala 1, 2, 5, 10 a 20 % infekciu s patogénmi infikovanou múkou.

PCR analýzy pre diagnostiku *P. teres* špecifických DNA sekvencií boli použité špecifické primery podľa BATES a kol. (2001) a pre patogény *S. tritici* a *R. secalis* boli navrhnuté špecifické primery. Real-time PCR kvantifikácia patogénov prebiehala na prístroji ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) pomocou „SYBR® Green“ farbičky (SYBR® Green I Master Mix). Amplifikačné podmienky reakcie boli nastavené podľa inštrukcií výrobcu (Applied Biosystems). Elektroforetická detekcia PCR produktov bola uskutočnená v 1,4 % agarózovom géle farbenom etídium bromidom.

#### Výsledky a diskusia

Na kvantifikáciu *P. teres* boli použité ITSFF a ITSr primery podľa BATES a kol. (2001) s veľkosťou amplifikovaného produktu 94 bp. Na kvantifikáciu *R. secalis* boli navrhnuté a vytvorené patogén-spezifické primery RS17F a RS17R s veľkosťou amplifikovaného produktu 67 bp, ktoré boli odvodené z ITS oblasti rDNA *R. secalis*. Podobne aj na kvantifikáciu *S. tritici* boli navrhnuté primery STRT1F a STRT1R s veľkosťou amplifikovaného produktu 51 bp odvodených z  $\beta$ -tubulínového génu. Špecifickosť primerov pre daný patogén bola overená použitím DNA rôznych patogénov (*R. secalis*, *P. teres* f. *teres*, *P. teres* f. *maculata*, *P. graminea*, *Drechslera tritici-repentis*, *S. nodorum*, *S. tritici*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poe* a *F. avenaceum*) v PCR reakcii.

Na kvantifikáciu *P. teres* bola použitá koncentrácia primeru 1000 nM, *R. secalis* 500 nM a pri *S. tritici* primeru 250 nM na reakciu. Koncentrácie primerov boli skúšané na kalibračnej krivke pri použití rozdielneho množstva vstupnej DNA patogéna (2,5; 25; 250; 2500 a 25000 pg). Pri všetkých patogénoch bol

dosiahnutý vysoký determinačný koeficient (*P. teres*  $R^2=0,99$ , *R. secalis*  $R^2=0,98$  a *S. tritici*  $R^2=0,99$ ). Amplifikácia rôzneho množstva vstupnej patogénnej DNA bola kontrolovaná v polyakrylamidovom resp. agarózovom géle. Na kvantifikáciu neznámych vzoriek boli použité vzorky, ktoré boli prirodzene napadnuté patogénom, ale aj vzorky po umelej infekcii. Pri sledovaných patogénoch boli opäť dosiahnuté vysoké korelačné koeficienty kalibračných kriviek (*P. teres*  $R^2=0,97$ , *R. secalis* a *S. tritici*  $R^2=0,99$ ), pričom takmer pri všetkých testovaných vzorkách bola dokázaná prítomnosť patogénov. Koncentrácia patogénnej DNA v testovaných vzorkách sa pohybovala vo veľkom rozmedzí, a to pri *P. teres* 1,58-251 pg/ $\mu$ l, *R. secalis* 13,65-85,28 pg/ $\mu$ l a *S. tritici* 39-3608,17 pg/ $\mu$ l.

Real-time kvantitatívna PCR, ktorej základom detekcie je fluorescenčný signál produkovaný úmerne počas amplifikácie PCR produktu, poskytuje rýchlu a presnú metódu pre determináciu špecifických DNA a RNA sekvencií (ZHANG a kol. 1999; TAYLOR a kol. 2001). Hoci je táto technológia relatívne nákladná, v blízkej budúcnosti by mala poskytovať lepšiu alternatívu pre rutinné testovanie zdravotného stavu semien a rastlín.

## Záver

Real-time PCR kvantifikáciou patogénov na prístroji ABI PRISM® 7000 použitím primerov ITSFF-ITSR, RS17F-RS17R a STRT1F-STRT1R bola spoľahlivo detegovaná prítomnosť *P. teres*, *R. secalis* a *S. tritici* v extraktoch z jačmenných a pšeničných semien. V experimente boli navrhnuté a vyvinuté patogénšpecifické primery pre *R. secalis* a *S. tritici*, ktorých špecifickosť bola overená a potvrdená na viacerých druhoch patogénov v agarózovom géle.

## Literatúra

1. BATES, J.A. – TAYLOR, E.J.A. – KENYON, D.M. – THOMAS, J.E. 2001. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora species* in barley seed. In: Molec. Plant Pathol., 2, 2001, s. 49-57.
2. FRAAIJE, B.A. – LOVELL, D.J. – COELHO, J.M. – BALDWIN, S. – HOLLIMON, D.W. 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. In: European J. Plant Pathol., 107, 2001, s. 905-917.
3. LEE, H.K. – TEWARI, J.P. – TURKINGTON, T.K. 2001. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. In: Plant Disease, 85, 2001, s. 220-225.
4. McCARTNEY, H.A. – FOSTER, S.J. – FRAAIJE, B.A. – WARD, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. In: Pest Manag. Sci., 59, 2003, s. 129-142.
5. STEVENS, E.A. – BLAKEMORE, E.J.A. – REEVES, J.C. 1998. Relationships amongst isolates of *Pyrenophora* spp. based on the sequences of the ribosomal DNA spacer regions. In: Mol. Plant Pathol. on-line: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1111stevens>.
6. TAYLOR, E.J.A. – STEVENS, E.A. – BATES, J.A. – MORREALE, G. – LEE, D. – KENYON, D.M. – THOMA, J.E. 2001. Rapid cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. In: Plant Pathology, 50, 2001, s. 347-355.
7. THOMAS, J.E. – REEVES, J.C. – TAYLOR, E.J.A. – KENYON, D.M. 1998. The development of new diagnostic techniques and their role in improving treatment strategies for seed-borne diseases. In: Brighton Crop Protection Conference: Pest and Diseases, 3, 1998, s. 787-792.
8. WILLITS, D.A. – SHERWOOD, J.E. 1999. Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties. In: Phytopathology, 89, 1999, s. 212-217.
9. ZHANG, A.W. – HARTMAN, G.L. – CURIO-PENNY, B. – PEDERSEN, W.L. – BECKER, K.B. 1999. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. In: Phytopathology, 89, s. 796-804.

## Pod'akovanie

Autori ďakujú prof. W. Bockusovi (Kansas State University, USA) za poskytnutie izolátu *S. tritici*. Táto práca bola vypracovaná v rámci Výskumnej úlohy VaV 2003 SP 27/028 0E 02/028 0E 02 a Výskumnej úlohy VaV 2003 SP 51/028 09 00/028 09 05.

---

## Adresa autorov

Ing. J. Gubiš; Mgr. M. Hudcovicová; RNDr. V. Červená; Ing. K. Bojnanská; Mgr. M. Pastirčák, PhD., Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722311, e-mail: gubis@vurv.sk



## TESTOVANIE MEDZIDRUHOVÝCH HYBRIDOV JAČMEŇA NA REZISTENCIU PROTI *B. GRAMINIS* A *P. TERES* V F<sub>2</sub> A BC<sub>1</sub> GENERÁCII THE TESTING OF INTERSPECIFIC HYBRIDS ON RESISTANCE TO *B.* *GRAMINIS* AND *P. TERES* IN F<sub>2</sub> AND BC<sub>1</sub> GENERATION

Kvetoslava MASÁROVÁ - Viera ČERVENÁ - Jozef GUBIŠ - Štefan MASÁR

*Resistance of interspecific hybrids to Blumeria graminis and Pyrenophora teres in F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> was evaluated. The spring barley SK-5451, SK-5526, Sk-5104, SK-5184, variety Ezer (SK-4970) and the wild barley Hordeum vulgare ssp. agriocrithon (Aberg.) were employed for hybridisation. 10 fragments of leaves from each spring barley and of the hybrid combination for testing against B. graminis and P. teres were used. The leaves were inoculated with three cultures of B. graminis (total virulent against all specific genes of resistance) and with P. teres mixture isolates from various geographical regions in the Slovak Republic. The reaction to different cultures of B. graminis was evaluated by percentage of attacked leaf area. In the F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> generation of hybrids, the different level of resistance was detected. Higher resistance against B. graminis than maternal genotypes in of 3 hybrid combinations F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> generation was determined. The reaction to mixture isolates P. teres by pointwise scale 1-4 (1- high resistance, 4- susceptible) was evaluated. The hybrids they had lower percentage of attack leaf area against P. teres than the maternal genotypes.*  
*Key words: interspecific hybridisation, wild barley, spring barley, Blumeria graminis, Pyrenophora teres, resistance*

### Úvod

Rozsahom škodlivosti a pravidelnosťou výskytu patrí múčnatka trávová na jačmeni (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) a hnedá škvrnitosť jačmeňa (*Pyrenophora teres* Drechs.) medzi významné patogény na jačmeni siatom jarnom. Redukujú úrodu a sladovnícku kvalitu jačmeňa, preto je opodstatnené zámerné šľachtenie rezistentných odrôd. Tvorbu rezistentného materiálu sťažuje vysoká genetická variabilita patogéna a nedostatok efektívnych zdrojov rezistencie v rámci kultúrneho jačmeňa. Využívajú sa nové zdroje odolnosti úplne účinné k európskej populácii múčnatky trávovej pochádzajúce z divorastúcich druhov jačmeňa (MASTEBROEK et al., 1988; SATO a TAKEDA, 1997). Je efektívne kombinovať rezistenciu proti viacerým chorobám do jednej odrody, čo sa aj v niektorých prípadoch podarilo s dobrým výsledkom (DREISEITL a STEFFENSON, 2000).

V práci boli testované medzidruhovú hybridy jačmeňa pozostávajúce z novošľachtienia jarného jačmeňa a divorastúceho jačmeňa *H. agriocrithon* na rezistenciu proti múčnatke trávovej a hnedej škvrnitosti jačmeňa v F<sub>2</sub> a BC<sub>1</sub> generácii.

### Materiál a metódy

Novošľachtenie jarného jačmeňa z *Hordeum s.r.o.* Sládkovičovo: SK-5526, Sk-5104, SK-5184, odroda Ezer (SK-4970) a ich hybridy s divorastúcim jačmeňom *H. vulgare* ssp. *agriocrithon* v F<sub>2</sub> a BC<sub>1</sub> generácii boli testované na rezistenciu proti múčnatke trávovej na jačmeni (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) a hnedej škvrnitosti jačmeňa (*Pyrenophora teres* Drechs.). Na testovanie rezistencie proti obom patogénom bolo použitých 10 listových segmentov /genotyp. Listové segmenty boli inokulované 3 patotypmi múčnatky trávovej na jačmeni, ktoré sú virulentné proti takmer všetkým špecifickým génom rezistencie. Po 7-8 dňoch kultivácie bola vyhodnotená reakcia na jednotlivé patotypy v % napadnutia listovej plochy. Listová plocha bola hodnotená kvantitatívne v % pokrytia patogénom v porovnaní s náchylnou odrodou Diamant (100%).

Na hodnotenie rezistencie proti hnedej škvrnitosti jačmeňa boli listové segmenty inokulované zmesou izolátov zo 6 lokalít Slovenska (Borovce, Levice, Lučenec, Rimavská Sobota, Košice, Malý Šariš). Reakcia rastlín bola hodnotená po 4-5 dňoch kultivácie 4-bodovou stupnicou podľa AFANASENKO et al. (1995), pričom za rezistentnú sa považuje reakcia 1-2.

### Výsledky a diskusia

Medzidruhovú hybridy vyselektované na úplnú poľnú rezistenciu proti múčnatke trávovej (bez príznakov napadnutia), boli následne testované patotypmi múčnatky trávovej a izolátmi hnedej škvrnitosti jačmeňa. Reakcia na patotypy múčnatky trávovej pri troch kombináciách kríženia s genotypmi Sk 5451, Sk 5526 a Sk 5104 v generáciách F<sub>2</sub> a BC<sub>1</sub> bola podstatne nižšia ako pri materských genotypoch (graf 1). Pri ostatných kombináciách bolo napadnutie vyššie pri hybridoch ako pri materských genotypoch. Pri všetkých 5 kombináciách bolo % napadnutia nižšie v F<sub>2</sub> generácii. V generácii prvého spätného kríženia pri všetkých piatich kombináciách kríženia % pokrytia listových segmentov patogénom bolo podstatne vyššie ako pri generácii F<sub>2</sub> a tak sa zúžil výber rezistentných rastlín. V grafe sú uvedené priemerné hodnoty napadnutia z niekoľkých rastlín. V skutočnosti pri jednotlivých rastlinách sa % pokrytia listového segmentu pohybovalo od 0-100%.

Všetky hybridné kombinácie boli proti hnedej škvrnitosti jačmeňa vysoko rezistentné (stupeň 1) až relatívne rezistentné (stupeň 2), pritom materské genotypy boli relatívne rezistentné až náchylné.

Divorastúci jačmeň *H. vulgare* ssp. *agriocrithon* bol v poľných podmienkach aj po testovaní proti obom patogénom vysoko rezistentný s 0% pokrytia listovej plochy múčnatkou trávovou. Do ďalšej práce boli vybrané rastliny s rezistenciou proti obom patogénom.

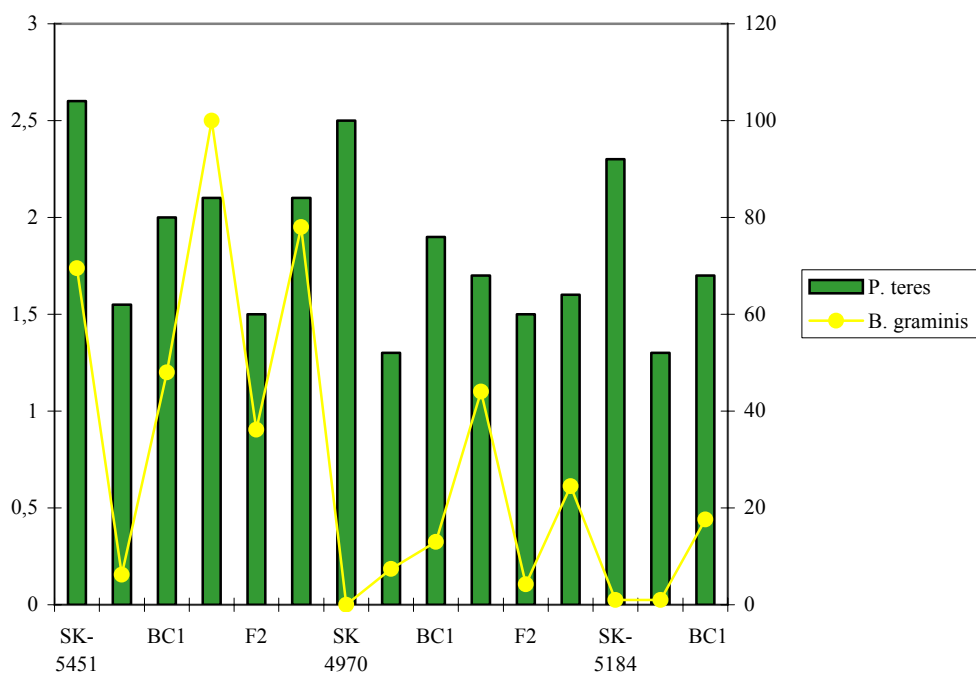
## Záver

Výsledky testovania medzidruhových hybridov jačmeňa (*H. vulgare* x *H. agriocrithon*) ukázali značné rozdiely v rezistencii hlavne proti múčnatke trávovej v jednotlivých kombináciách kríženia a F<sub>2</sub> a BC<sub>1</sub> generáciách. Z piatich hybridných kombinácií pri troch kombináciách a oboch generáciách bola rezistencia proti múčnatke trávovej podstatne vyššia v porovnaní s materskými genotypmi. Spätným krížením sa rezistencia hlavne proti múčnatke trávovej znižovala oproti generácii F<sub>2</sub>. Všetky hybridné kombinácie v oboch generáciách sa vyznačovali vysokou rezistenciou až relatívnou rezistenciou proti hnejdej škvrnitosti jačmeňa. Pritom materské genotypy boli relatívne rezistentné až náchylné.

## Literatúra

1. AFANASENKO, O. S. - HARTLEB, H. - GUSEVA, N. N. - MINAŘÍKOVÁ, V.: A set of differentials to characterize populations of *Pyrenophora teres* Drechs. for international use. In: J. Phytopathology, 143, 1995, s. 501-507.
2. DREISEITL, A. - STEFFENSON, B. J.: Postulation of leaf rust resistance in Czech and Slovak barley cultivars and breeding lines. Plant Breeding, 119, 2000, s. 211-214.
3. MASTEBROEK, H. D. - BALKEMA - BOOMSTRA, A. G.: Wilde gerste *Hordeum spontaneum* genen reservoir vor cultuurgerst, *Hordeum vulgare*. Prophyta, 42, 1998, 154.
4. SATO, K. - TAKEDA, K.: Net blotch Resistance in wild species *Hordeum*. Euphytica, 95, 1997, 179-185.

**Graf 1: Porovnanie reakcie materských genotypov a medzidruhových hybridov jačmeňa proti patotypom *B. graminis* a izolátom *P. teres* v generácii F<sub>2</sub> a BC<sub>1</sub>**



Adresa autorov:

Ing. Kvetoslava Masárová, CSc., RNDr. Viera Červená, Ing. Jozef Gubiš, Ing. Štefan Masár, CSc., Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 92168 Piešťany, e-mail: masarova@vurv.sk

## ODOLNOSŤ NOVOŠĽAHTENCOV PŠENICE LETNEJ VOČI MÚČNATKE TRÁVOVEJ NA PŠENICI NEW GENOTYPES OF WHEAT RESISTANT TO POWDERY MILDEW

Katarína BOJNANSKÁ

*Resistance of 158 new genotypes of wheat to powdery mildew was observed in 2005. In each genotype the range of the attack by powdery mildew was observed in five characteristics. No genotypes were found that were statistically significant more resistant in all evaluated characteristics in comparison with the controls. However, in individual characteristics were found statistically significant more resistant genotypes at least to one control. In a few isolated cases genotypes more susceptible than the control cultivars were found. Resistance of new genotypes to powdery mildew is on the same level as that of the control cultivars, which are nowadays commercially registered cultivars.*

*Key words: wheat, powdery mildew, Blumeria graminis, resistance*

### Úvod

Múčnatka trávová na pšenici letnej *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal patrí medzi obligátne parazity, ktoré pri epidemickom rozšírení dokážu redukovať nie len kvantitu ale aj kvalitu zrn pšenice. Má schopnosť veľmi rýchlo sa prispôbovať hostiteľovi a v krátkom čase prekonávať nové rezistentné odrody, hlavne tie, ktorých rezistencia je zabezpečovaná špecifickými génmi rezistencie. Preto kontinuálny proces vyhľadávania a tvorby nových genotypov odolných voči múčnatke by mal predstavovať jednu zo súčastí rastlinnej výroby.

### Materiál a metódy

V roku 2005 bolo sledovaných v záhrade VÚRV v Piešťanoch 158 genotypov zaradených do ŠOS a novošľachtencov. U každého genotypu bolo sledované napadnutie múčnatkou trávovou v piatich znakoch: v ontogenetických fázach steblovanie (DC 32 – 36), začiatok kvitnutia (DC 61-63), ďalej bolo sledované celkové AUDPC (plocha pod krivkou rozvoja choroby), AUDPC vlajkového listu a AUDPC klasu. Hodnotenie bolo v bodoch podľa BABAJANCA (1988), prípadne v % (napadnutie vlajkového listu a klasu), následne zo získaných hodnôt boli vygenerované AUDPC hodnoty. Percentuálne hodnoty (steblovanie a kvitnutie) a hodnoty AUDPC boli štatisticky vyhodnotené a porovnané s kontrolnými odrodami Astella, Brea, Ilona a Torysa.

### Výsledky a diskusia

V súbore ŠOS bolo zaradených 30 genotypov. Hodnoty AUDPC celkového sa pohybovali v rozhraní 85 – 1863, AUDPC vlajkového listu 18 – 158, klasu 0 – 97. Percentuálne napadnutie vo fáze steblovania bolo 0 – 11 %, kvitnutia 7 – 56 %. Aj keď v jednotlivých znakoch boli medzi genotypmi štatisticky preukazné rozdiely v porovnaní s kontrolami bol súbor ŠOS veľmi vyrovnaný a neboli medzi nimi štatisticky preukazné rozdiely, len v znaku AUDPC klasu boli štyri genotypy náchylnejšie ako kontroly a takmer všetky genotypy boli odolnejšie ako kontrolná odroda Astella.

Štatisticky preukazné rozdiely v porovnaní s kontrolami neboli zistené ani medzi novošľachtencami (70 genotypov) z VŠS Malý Šariš. Medzi najodolnejšie novošľachtence vo všetkých sledovaných znakoch patria PY 11-98-34-76 (celkové AUDPC=268), K 1582-53 (celkové AUDPC=38), K 1600-91 ((AUDPC=279), K 1554-13 (AUDPC=273) a K 1756-28 (AUDPC=164) s K 1750-184 (AUDPC=249), ktoré v jednom zo sledovaných znakov nepatrili medzi najodolnejšie. Hodnoty AUDPC celkového sa pohybovali v rozhraní 38 – 1725, AUDPC vlajkového listu 0 – 149, klasu 0 – 106. Percentuálne napadnutie vo fáze steblovania bolo 0 – 12 %, kvitnutia 3 – 53 %.

Medzi novošľachtencami z VŠS Vígľaš – Pstruša (43 genotypov) boli štatisticky preukazné rozdiely zistené len v dvoch znakoch: AUDPC vlajkového listu a v percentuálnom napadnutí vo fáze steblovania. V porovnaní s kontrolami boli rozdiely len v percentuálnom napadnutí vo fáze steblovania. Hodnoty AUDPC celkového sa pohybovali v rozhraní 6 – 1225, AUDPC vlajkového listu 0 – 97, klasu 0 – 70. Percentuálne napadnutie vo fáze steblovania bolo 0 – 10 %, kvitnutia 7 – 33 %. Genotypy V2-28, V2-29, V2-33, V2-40 a V2-41 (0 % napadnutej plochy rastliny) boli odolnejšie voči všetkým kontrolám. Najnižšie hodnoty celkového AUDPC mali novošľachtence V2-40 (AUDPC=6), V2-29 (AUDPC=92) a V2-41 (AUDPC=177) a aj vo všetkých sledovaných znakoch boli zistené najnižšie hodnoty napadnutia. Veľmi nízke hodnoty v sledovaných znakoch mali ešte genotypy: V2-5, V2-28, V2-5 a V2-12.

V súbore novošľachtencov (14 genotypov) so spoločnosti Hordeum Sládkovičovo s. r. o. neboli preukázané štatisticky významné rozdiely len v znaku AUDPC vlajkového listu. V znakoch celkové AUDPC, v percentuálnom napadnutí vo fáze steblovania aj kvitnutia boli nájdené genotypy preukazne odolnejšie v porovnaní s kontrolami. Hodnoty AUDPC celkového sa pohybovali v rozhraní 231 – 1057, AUDPC vlajkového listu 0 – 65, klasu 0 – 108. Percentuálne napadnutie vo fáze steblovania bolo 0 – 8 %, kvitnutia 5 – 30 %. Preukazne najodolnejší vo všetkých znakoch sa javil genotyp SK 14 (celkové

AUDPC=231). veľmi nízke hodnoty vo všetkých znakoch mali aj genotypy SK 6 (AUDPC=263), SK 12 (AUDPC=248) a SK 10 (AUDPC=297).

### **Záver**

V rámci hodnotených genotypov neboli nájdené genotypy, ktoré by boli preukazne odolnejšie v porovnaní so všetkými kontrolami vo všetkých znakoch. V jednotlivých znakoch však boli nájdené preukazne odolnejšie genotypy aspoň voči jednej kontrole. Veľmi ojedinele sa prejavili genotypy náchylnejšie ako kontrolné odrody a to hlavne v znaku AUDPC klasu v súbore genotypov zaradených do ŠOS. Odolnosť voči múčnatke trávovej nového šľachtiteľského materiálu je na úrovni kontrolných odrôd, čo sú v súčasnosti bežné komerčne pestované registrované odrody.

### **Literatúra**

1. BABAJANC, I. : Metody selekcie i ocenky ustojčivosti pšenici i jačmenja k bolezniam v stranach - členach, SEV. Praha, 1988, 321 s.

## KTORÉ GÉNY REZISTENCIE JAČMEŇA DOKÁŽU ZABEZPEČIŤ OCHRANU PRED MÚČNATKOU TRÁVOVOU NA JAČMENI? WHICH RESISTANCE GENES OF BARLEY CAN PROVIDE PROTECTION AGAINST BARLEY POWDERY MILDEW?

Viera ČERVENÁ

*For the study of the level of virulence against resistance genes of barley, that are common in the varieties grown in Slovakia 96 barley powdery mildew isolates were trapped using a mobile jet spore trap in the year 2004. The virulence against most of the resistance genes tested is increasing when compared with the situation in recent years. Simultaneously, the virulence genes complexity in each mildew isolate is rising, on the present the average number of virulence genes is 9 per isolate. The genes Mla6, Mla7, Mla12, Mlg and MlLa are on the present overcome by almost 100 % of the powdery mildew population. Out of the remaining genes tested the virulence level is low against the genes mlo, Mla3 and Mla1.*

*Key words: virulence frequency, resistance genes, powdery mildew, barley*

### Úvod

Medzi možnosti ochrany rastlín voči patogénom patrí aj pestovanie rezistentných odrôd. Táto forma ochrany prináša ekologické aj ekonomické výhody. Najvýznamnejším patogénom jačmeňa je múčnatka trávová na jačmeni (*Blumeria graminis* (DC.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Em. Marchal). Snahy šľachtiteľov tvoriť odrody jačmeňa odolné voči múčnatke neustále stroskotávajú v dôsledku vysokej flexibility genómu múčnatky, vďaka ktorej je patogén schopný rýchlo sa prispôbovať novým génom rezistencie. Nové virulentné patotypy sa následne rýchlo rozširujú vďaka pestovaniu odrôd s novými génmi rezistencie na veľkých plochách. Štúdium úrovne virulencie voči aktuálnym génom rezistencie jačmeňa v populácii múčnatky je preto dôležitou spätnou väzbou pre šľachtiteľov, ktorá im umožní správne reagovať pri výbere génov rezistencie pri tvorbe nových odrôd jačmeňa, ako aj pre pestovateľov, ktorým poskytuje aktuálne informácie o účinných génoch rezistencie.

### Materiál a metódy

Izoláty múčnatky sa zachytávali v máji roku 2004 na území západného Slovenska pomocou mobilného lapača konídií podľa SCHWARZBACHa (1979) na listové segmenty náchylnej odrody Diamant. Zachytenými izolátmi sa inokuloval 12-členný testovací sortiment pozostávajúci z izogénnych línií odrody Pallas (KØLSTER et al., 1986). Na inokuláciu bolo použité čerstvé 8-dňové inokulum izolátov múčnatky, inokulovali sa vždy 3 listové segmenty každej línie položené na agarovej pôde (3 g.l<sup>-1</sup>) s obsahom benzimidazolu (40 mg.l<sup>-1</sup>), AgNO<sub>3</sub> (1 mg.l<sup>-1</sup>) a kvapalného hnojiva Wuxal-Super® (50 µl.l<sup>-1</sup>). Hustota inokulácie bola približne 300 spór na cm<sup>2</sup>. Reakcie jednotlivých izolátov sa vyhodnotili po 8. dňoch inkubácie pri kontinuálnom osvetlení a teplote 18±0,5 °C pomocou stupnice podľa LIMPert (1985):

- 0 - žiadna reakcia, pri géne *mlo* môže dochádzať k tvorbe ojedinelých kolónií, čo sa označuje ako typ 0(IV),
- I - tvorba nekrotických škvŕn,
- II - tvorba nekrotických škvŕn s veľmi slabou sporuláciou,
- III - nekrotické škvŕny so silnou sporuláciou,
- IV - silná sporulácia bez tvorby nekrotických škvŕn;

pričom za dôkaz prítomnosti génu virulencie sa považovala reakcia označená ako infekčný typ III a IV s hustotou kolónií najmenej 50 % v porovnaní s kontrolou.

### Výsledky a diskusia

V roku 2004 sa zachytilo na území západného Slovenska 96 izolátov múčnatky. Po zhodnotení ich virulencie voči v súčasnosti najčastejšie využívaným génom rezistencie jačmeňa voči múčnatke boli získané výsledky, ktoré sú uvedené v grafe. Takmer 100 % analyzovaných izolátov bolo virulentných voči génom Mla6, Mla7, Mla12, Mlg a MlLa. Vysoké percento virulentných izolátov (60 - 86 %) sa zistilo aj pri testovaní reakcie izolátov na gény rezistencie Mla9, Mla13, Mlk a Mlat. Z týchto výsledkov je zrejmé, že populácia múčnatky je veľmi dobre prispôbena k väčšine génov využívaných v odrodách pestovaných v našich podmienkach. Čiastočný ochranný účinok poskytujú gény rezistencie Mla3 a Mla1, voči ktorým bolo virulentných 30,2 % resp. 44 % testovaných izolátov. Za jediný plne účinný gén rezistencie voči múčnatke trávovej na jačmeni môžeme v súčasnosti považovať gén *mlo*, voči ktorému nebola zistená virulencia. Na presnú analýzu virulencie voči génu *mlo* však nie je vhodná klasická virulencia analýza, ale komplikovanejší postup, ktorého metodiku uvádza ČERVENÁ (2004). V rokoch 2003 a 2004 bola v laboratórnych podmienkach najvyššia zistená parciálna *mlo*-virulencia izolátov pochádzajúcich z územia západného Slovenska 13,8 % (ČERVENÁ, 2005). Podľa SCHWARZBACHa (2005) úroveň *mlo*-virulencie niektorých poľných patotypov zozbieraných v Európe dosiahla 15 %, ak sa testovalo na samostatných primárnych listových segmentoch na agare. *mlo*-virulencia týchto izolátov na neskorších listoch a v poľných podmienkach je oveľa nižšia. V poľných podmienkach má teda gén *mlo* úplný ochranný účinok. Získané

výsledky zároveň prinášajú aktuálne informácie o komplexite génov virulencie v izolátoch. Testované izoláty mali v priemere 9 génov virulencie na izolát. SÝKORA a kol. pri podobnej štúdií z roku 1993 zistili, že izoláty zachytené v rokoch 1989 - 1992 mali v priemere 4 až 5 génov virulencie, teda v porovnaní s minulými rokmi komplexita génov virulencie rastie. Až 21 % izolátov bolo virulentných voči 10 z 12 testovaných génov rezistencie, 4 izoláty dokonca voči všetkým testovaným génom rezistencie, s výnimkou génu *mlo*.

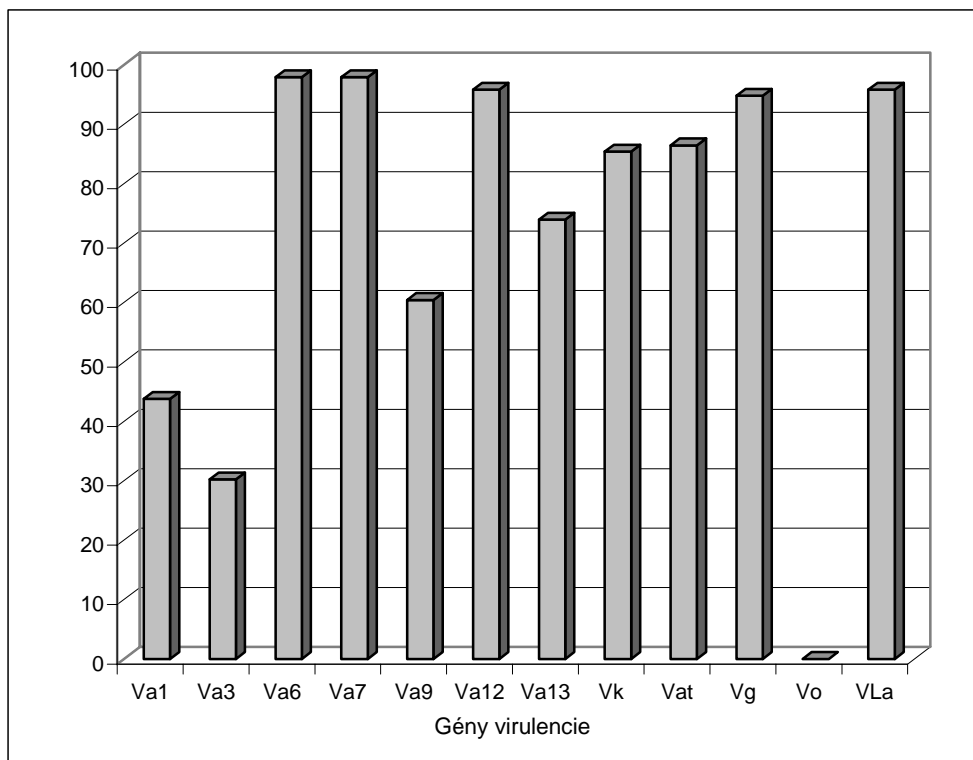
### Záver

Efektivita väčšiny v súčasnosti bežne využívaných génov rezistencie jačmeňa voči múčnatke klesá a súčasne sa zvyšuje počet génov virulencie v jednotlivých izolátoch múčnatky. Ochranu porastov jačmeňa voči múčnatke v súčasnosti zabezpečujú z 12 testovaných génov rezistencie len 3 gény: *mlo*, Mla3 a Mla1, pričom gén *mlo* je z testovaných génov jediný, ktorý zabezpečí plnú odolnosť jačmeňa voči múčnatke.

### Literatúra

1. ČERVENÁ, V.: Monitorovanie parciálnej *mlo*-virulencie v populácii múčnatky trávovej na jačmeni. Zborník z 11. odborného seminára „Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín“. Piešťany : VURV, 2004, s. 122-123.
2. ČERVENÁ, V.: Úroveň parciálnej *mlo*-virulencie v populácii múčnatky trávovej na jačmeni. In: Zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie 4. Biologické dni, 8. - 9. september 2005, Nitra, 393-394.
3. KØLSTER, P. - MUNK, L. - STØLEN, O. - LØHDE, J.: Near-isogenic barley lines with genes for resistance to barley mildew. In: Crop Sci., 26, 1986, s. 903-907.
4. LIMPET, E.: Ursachen unterschiedlicher Zusammensetzung der Gerstenmehltaus, *Erysiphe graminis* D.C. f. sp. *hordei* Marchal und deren Bedeutung für Anbau von Gerste in Europa. Dissertationarbeit, TU München-Weihenstephan, 1985, 183 s.
5. SCHWARZBACH E.: A high throughput jet trap for collecting mildew spores on living leaves. Phytopath. Z. 94, 1979, s. 165-171.
6. SCHWARZBACH, E.: The Mlo gene of barley. <http://www.crpmb.org/mlo/>, 6.9.2005
7. SÝKORA, M. - KRIPPEL, E. - MIKLOVIČOVÁ, M. - HLINKOVÁ, E. (1993): The complexity of virulence genes and development of reaction type after infection of barley testing assortment by barley powdery mildew isolates (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). In: Poľnohospodárstvo, 39, 1993, s. 310-317.

Graf: Frekvencia génov virulencie (v percentách) v populácii múčnatky trávovej na jačmeni v roku 2004



Adresa autora:

RNDr. Viera Červená, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, cervena@vurv.sk

**ZHODNOTENIE REAKCIE REGISTROVANÝCH ODRÔD PŠENICE LETNEJ  
FORMY OZIMNEJ NA INFEKCIU HUBOU *STAGONOSPORA NODORUM*  
*BERK.* V ROKOCH 2001 - 2004**  
**EVALUATION OF WINTER WHEAT REGISTERED CULTIVARS  
REACTION FOR INFECTION *STAGONOSPORA NODORUM BERK.* IN 2001 -  
2004**

Bernard VANČO

*In experiment years 2001 – 2004 on infection land of RIPP Piešťany was inoculated 26 registered winter wheat cultivars fungi *Stagonospora nodorum* Berk. There were found statistically highly significant differences in percentage of infection among cultivars, years and parts of plant (two leaves, head). There was found also statistically highly significant interaction cultivar x year. Influence of precipitation and temperature in period from inoculation to last evaluation of cultivars infection *S. nodorum* was not found.*

*Key words: winter wheat, cultivars, resistance*

### Úvod

Integrovaná ochrana rastlín proti škodlivým biotickým činiteľom vytvára spätný tlak na rozpracovanie všetkých jej zložiek. Medzi nimi významné miesto zaujala odroda, jej úroveň rezistencie proti patogénom a s tým súvisiace dosahovanie vysokých úrod, vrátane ich stability a vysokej kvality. Pšenica ozimná patrí u nás medzi najvýznamnejšie obilniny, preto sa musia neustále vytvárať optimálne podmienky pre rozpracovanie rezistentného šľachtienia v takej miere ako si to vyžaduje pestovateľská prax. Septorióza plevová sa v súčasnej dobe zaraďuje medzi významné choroby pšenice ozimnej (FRIED, 1989), preto si zasluhuje primeranú pozornosť aj u nás (VANČO, 2004). Pôvodcom choroby je huba *Stagonospora nodorum* Berk., ktorá vytvára na listoch i klasoch nekrotickú škvrnitosť (BARTOŠ, STUHLÍKOVÁ, 1990) a po preniknutí do zrn (AGRAWAL et al., 1986) znižuje jeho kvalitu. V tejto súvislosti je prvoradým zámerom príspevku posúdiť potenciál rezistencie na Slovensku pestovaných odrôd pšenice ozimnej proti *S. nodorum* z hľadiska jeho ročníkovú stabilitu.

### Materiál a metódy

Počas rokov 2001 – 2004 bolo hodnotených 26 registrovaných odrôd pšenice ozimnej na napadnutie hubou *Stagonospora nodorum* Berk. Parcelu tvorilo 5 riadkov, dlhých 1,0 m, so 150 mm vzdialenosťou medzi parcelami. Patogén bol vyizolovaný z pliev klasov získaných v rôznych pestovateľských podmienkach pšenice ozimnej. Pre izoláciu čistej kultúry patogéna sa použilo živné médium podľa MANANDHARA, CUNFERA (1991) a pre získanie dostatočného množstva inokula sa použilo organické médium podľa TVARUŽEKA (1991). Odrody sa inokulovali v rastovej fáze 61 (Zadoks) spórovou suspenziou pri koncentrácii  $1,2 \cdot 10^6$  spór v 1 ml inokula a dávkou 25 ml/25 klasov. Hodnotilo sa napadnutie klasu, prvého a druhého listu pod klasom podľa subjektívnej stupnice od 0 % do 100 % (BABAJANC et al., 1988). Zaznamenávala sa tiež vegetačná doba a merala dĺžka rastlín. Pre štatistické spracovanie primárnych údajov sa používala analýza rozptylu jednoduchého triedenia a jednoduchá lineárna korelácia.

### Výsledky a diskusia

Počas pokusných rokov 2001 až 2004 sa každoročne hodnotilo 26 u nás pestovaných odrôd pšenice ozimnej na rezistenciu proti hube *Stagonospora nodorum* Berk. Ako vyplynulo zo štatistického zhodnotenia (analýza rozptylu) percenta napadnutia odrôd na celkovom výsledku analýzy rozptylu sa podieľali najviac roky (20,28 %), potom nasledovali odrody (14,12 %), časť rastliny (12,68 %) a interakcia odrôd s rokmi (10,18 %).

Ako je známe z literárnych poznatkov (FEDOROVA, 1994) zrážky sú významné pre rozvoj septoriózy plevovej na pšenice. Pri porovnávaní priemerných denných zrážok za obdobie vývoja choroby (inokulácia – posledné hodnotenie) s priemerným percentom napadnutia za sledované roky sa ukázalo, že najvyššie percento napadnutia bolo v rokoch s priemernými dennými zrážkami 1,3 mm a 1,9 mm a najnižšie percento napadnutia bolo zistené pri enormne vysokých denných zrážkach (4,0 mm). Z výsledkov je tiež zrejmé, že príliš nízka denná teplota počas rozvoja septoriózy (2001 – 14,2 °C) spomalila vývoj patogéna na listoch i klasoch v roku 2001.

Zo sledovaných 26 odrôd v priemere štyroch rokov sa podľa úrovne štatistickej významnosti medzi najrezistentnejšie zaradilo 7 odrôd (Alana, Alka, Estica, Hana, Sana, Solida, Viginta), medzi náchylné tiež sedem odrôd (Blava, Brea, Bruta, Košútka, Livia, Rada, Vlada) a ostatné patria k stredne rezistentným odrodám. Zaujímavá je tu interakcia odrôd s rokmi. Z tohto hľadiska sa v rámci 26 hodnotených odrôd vytvorili 4 skupiny odrôd s rozdielnou ročníkovou (4 roky) reakciou na infekciu *S. nodorum*. V prvej skupine bolo 8 odrôd, ktoré reagovali opačnou úrovňou štatistickej významnosti k priemernému percentu napadnutia v jednom roku, 9 odrôd v dvoch rokoch, 2 odrody v troch rokoch a 7 odrôd sa v reakcii v pokusných rokoch nelíšilo.

Registrované odrody pšenice ozimnej sa líšia v dĺžke rastliny a vo vegetačnej dobe . Pritom ich vplyv sa neprejavil na napadnutí odrôd v sledovaných rokoch (  $r = - 0,03$  až  $0,23$  a  $r = - 0,20$  až  $0,14$ ). Pri hodnotení vplyvu denných zrážok a teplôt sa zistil štatisticky významný vplyv len pri dielčom hodnotení percenta napadnutia medzi prvým a druhým termínom v roku 2001 ( $r = 0,42^*$ ) a pri teplote v roku 2002 ( $r = 0,47^*$ ). Avšak priemerné denné zrážky a teplota za celé obdobie rozvoja choroby od inokulácie sa na úrovni napadnutia odrôd neprejavili ani v jednom roku.

**Tabuľka 1: Priemerné hodnoty napadnutia pšenice ozimnej hubou *Stagonospora nodorum* a povetnostné podmienky počas rozvoja choroby po umelej inokulácii**

Znak	2001	2002	2003	2004	Priemer
Napadnutie pšenice ozimnej (26 odrôd)					
Priemerné percento	19,0	9,8	27,5	32,7	22,2
Percento napadnutia - klas	13,0	7,7	25,0	21,6	16,8
- 1. list pod klasom	13,4	8,0	21,3	28,1	17,7
- 2. list pod klasom	32,9	14,3	36,9	49,9	33,5
Povetnostné podmienky počas rozvoja choroby					
Zrážky mm/deň	1,5	4,0	1,3	1,9	2,1
Teplota v °C/deň	14,2	19,0	22,6	18,6	18,6

### Záver

V experimentálnych rokoch 2001 – 2004 na poli VÚRV v Piešťanoch sa inokulovalo 26 u nás pestovaných odrôd pšenice ozimnej hubou *Stagonospora nodorum* Berk. Zistili sa štatisticky vysoko významné rozdiely medzi priemerným napadnutím odrôd, tiež medzi rokmi a časťami rastlín (klas, dva listy pod klasom) a vysoko významná bola i interakcia odrôd s rokmi. Nezistil sa vplyv zrážok a teploty za obdobie rozvoja choroby na úroveň napadnutia odrôd v sledovaných rokoch.

### Literatúra

1. AGRAWAL, K. - SINGH, T. - SINGH, D. - MATHUR, S.B.: Studie on Glume Blotch Disease of Wheat II. Phytomorphology, 36, 1986, 3, 4, s. 291 – 297.
2. BABAJANC, L.: Metody selekcie i ocenki ustojčivosti pšenicy i jačmenja k boleznjam v stranach SEV, Praga 1988, 321 s.
3. BARTOŠ, P. - STUHLÍKOVÁ, E.: Šlechtění pšenice na odolnost a toleranci k braničnatkám. Příloha časopisu Genetika a šlechtění, 26, 1990, 4, s. 1 – 16.
4. FEDOROVA, R.N.: The problem of septoria diseases of cereal crops in Russia. Hodowla roslin, aklimatyzacja i nasiennictwo, 38, 1994, ¾, s. 277 – 279.
5. FRIED, P.M.: Improved method to produce large quantities of *Septoria nodorum* inoculum. Septoria of cereals. Proceedings, July 4-7, Zurich, 1989, s. 28 – 31.
6. MANANDHAR, J.B. - CUNFER, B.M.: An Improved Selective Medium for the Assay of *Septoria nodorum* from Wheat Seed. In: Phytopathology, 81, 1991, s. 771 – 773.
7. TVARUŽEK, L.: The utilization of coloured photoselektive plastic foil in testing winter wheat for resistance to *Septoria nodorum* Berk. In: Ochr. Rostl., 27, 1991, s. 101 – 109.
8. VANČO, B.: Rozšírenie a miesto septorie plevovej v rámci listových škvrnitostí pšenice ozimnej. Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zbor. z 11. odborného seminára 24.-25.nov. 2004, VÚRV Piešťany, 2004, s. 51 – 52.

Adresa autora:

Ing. Bernard Vančo, PhD., Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta, 122, 921 68 Piešťany



## VPLYV ODRODY PŠENICE OZIMNEJ NA PRODUKCIU PYKNIDIOSPÓR HUBY *STAGONOSPORA NODORUM* BERK. INFLUENCE OF WINTER WHEAT CULTIVARS FOR PRODUCTION OF *STAGONOSPORA NODORUM* PYKNIDIOSPORE

Bernard VANČO

*In field provocate experiment 35 cultivars were evaluated for attack S. nodorum and level of production spores in 2004 and 2005. There were found statistically highly significant differences among cultivars in both features. There was found also positive but lower correlation between attack of S. nodorum and level of spores production of evaluated cultivars.*

*Key words: winter wheat, cultivars, Stagonospora nodorum, partial resistance*

### Úvod

Septoriózu plevovú na pšenici ozimnej zapríčiňuje ascomycétová huba asexuálneho štádia *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. a sexuálneho štádia *Phaeosphaeria nodorum* (Mueller) Hedja. Choroba spôsobuje na pšenici škvrnitosť na listoch a klasoch a jej ekonomicky význam sa prejavuje vo zvýšení strát na úrode zrna a jej kvalite. Šľachtenie pšenice ozimnej na rezistenciu proti hube *Stagonospora nodorum* Berk. je zložitejšie, pretože neexistujú žiadne gény pre úplnú rezistenciu, resp. imunitu. Vo svete existujú početné zdroje rezistencie, ktoré sa prejavujú v rozdieloch sily symptómov a úrodovej redukcií. Väčšina z nich je považovaná za parciálnu rezistenciu (PR), ktorú možno charakterizovať tak, že rôznym spôsobom zdržuje rast a vývoj patogéna (BROENNIMANN, 1982). Predpokladá sa, že parciálna rezistencia proti *S. nodorum* je rozdelená do niekoľkých nezávislých komponentov a každý z nich môže zdržovať vývoj a redukovať negatívny vplyv patogéna. Jeden z významných komponentov PR je produkcia spór, ktorú skúmali viacerí autori (NELSON, MARSHALL, 1990; BRUNE, NELSON, 1990) a s úspechom ju využívali i na rozlíšenie potomstiev. Ďalšie komponenty parciálnej rezistencie boli predmetom skúmania aj ďalších autorov (CUNFER, B.M. et al., 1988; DU et al., 1999, ai.).

Cieľom príspevku je zhodnotiť jeden z významných komponentov parciálnej rezistencie registrovaných odrôd pšenice ozimnej proti *Stagonospora nodorum* a jeho vzťah k iným sledovaným znakom.

### Materiál a metódy

V rokoch 2004 a 2005 boli na výskumnom poli v Piešťanoch zakladané infekčné škôlky s 35 registrovanými odrodami pšenice ozimnej, s rozmermi parcely 1, 0 m x 1,0 m pri vzdialenosti riadkov 150 mm. K inokulácii 25 stebiel postupne vo fáze začiatku kvitnutia sledovaných odrôd sa používala zmes troch izolátov *S. nodorum*, pri koncentrácii  $1,2 \times 10^6$  spór v 1 ml inokula a dávke 25 ml na 25 klasov. Metóda inokulácie bola aplikovaná podľa TVARUŽEKA (1991). Hodnotilo sa napadnutie prvého a druhého listu pod klasom, prípadne ďalšie znaky a pre zhodnotenie produkcie spór na listových škvrnách sa pod mikroskopom počítali spóry (Burker) osobitne z každej 9 dvojíc náhodne vybraných napadnutých listov (druhý list pod klasom). Pri štatistickom hodnotení dosiahnutých primárnych výsledkov sa použila jednoduchá analýza rozptylu a jednoduchá lineárna korelácia.

### Výsledky a diskusia

Pokusné roky v Piešťanoch 2004 a 2005 sa vyznačovali rozdielnymi poveternostnými podmienkami, najmä počas vývoja choroby septoriózy plevovej po umelej inokulácii *S. nodorum* na registrovaných odrodách pšenice ozimnej. Zatiaľ čo v roku 2004 priemerné denné zrážky činili 2,0 mm, v roku 2005 boli polovičné (0,9 mm/deň). Tomu zodpovedá aj priemerná produkcia spór v oboch rokoch (2004 – 1012,7 a 2005 – 495,5), čo súhlasí aj s literárnymi poznatkami (LEATH et al., 1993) o pozitívnom vplyve zrážok na výskyt choroby septoriózy plevovej na pšenici ozimnej. V infekčných experimentoch boli zaradené registrované odrody, ktoré sa podstatne líšili v dĺžke vegetačnej doby. I napriek tomu, nezistila sa nijaká súvislosť napadnutia odrôd chorobou, ani produkcie spór so zrážkami alebo s teplotou., pretože rozdiely v úhrne zrážok a priemernej teplote medzi odrodami boli zanedbateľné. Avšak pri súbore odrôd so širšou variabilitou v dĺžke vegetačného obdobia a tým i väčších rozdielov v zrážkach a teplotách sa môže prejavovať i vplyv odrody (SHAW, 1999).

Ako vyplýva z analýzy rozptylu (Tab. 1) na celkovom výsledku sa podieľali odrody a listy vysoko významne v percente napadnutia i produkcii spór, tak v roku 2004 ako aj roku 2005. Druhý list pod klasom bol viac napadnutý ako list vlajkový, čo odpovedá i literárnym poznatkom (WAINSHILBAUM, LIPPS, 1991) o vyššej citlivosti starších listov, pričom vplyv interakcie odrody x listy nebol štatisticky významný. I napriek tomu, že rozdiely medzi odrodami v percente napadnutia listov, i rozdiely v produkcii spór boli podstatné, zistil sa síce kladný, ale štatisticky nevýznamný korelačný vzťah medzi napadnutím listov a produkciou spór. Zrejme tu budú pôsobiť ďalšie faktory resp. i ďalšie komponenty PR, ktoré budú predmetom skúmania v ďalšom období. Ukazuje sa, že triedenie rezistencie genotypov pšenice ozimnej proti *S. nodorum* len podľa percenta pokryvnosti listov škvrnami patogéna nemusí byť najpresvedčivejšie a vhodné bude ho doplniť i o produkciu spór. Rozdielne vlhkostné pomery v sledovaných rokoch mohli

ovplyvniť i rôznu reakciu odrôd v produkcii spór. Poukazujú na to i výsledky na niektorých odrodách, ktoré v oboch rokoch (2004 a 2005 ) sa zaradili buď do rovnakej skupiny odrôd s nízkou produkciou spór (Ilona, Regia, Solida) alebo s vysokou produkciou spór (Arida, Armelis, Bety, Rada). S výrazne opačnou reakciou v oboch rokoch v produkcii spór sa vyznačovali odrody Boka a Velta. Pritom podľa úrovne napadnutia sa radia medzi stredne rezistentné alebo náchylné.

**Tabuľka 1: Analýza rozptylu komponentov rezistencie (PR) registrovaných odrôd pšenice ozimnej proti *Stagonospora nodorum* Berk. v poľných podmienkach pri umelej infekcii**

Zdroj premenlivosti	2004				2005			
	PPSL <sup>a)</sup>		PS/0,1 mm <sup>3b)</sup>		PPSL <sup>a)</sup>		PS/0,1 mm <sup>3b)</sup>	
	St.v.	Pr. štvorce	St.v.	Pr. štvorce	St.v.	Pr. štvorce	St.v.	Pr.štvorce
Odrody (O)	34	451**	34	2925220**	34	10000**	34	636751**
Listy (L)	1	8171**	1		1	58001**		
O x L	34	1587	34		34	159		
Reziduál	140	18015	140	178547	140	478	280	39014

<sup>a)</sup> Percento pokryvnosti listov škvrkami *S. nodorum*, <sup>b)</sup> Počet spór/ 0,1 mm<sup>3</sup>

### Záver

V poľných infekčných experimentoch pri umelej inokulácii hubou *Stagonospora nodorum* v rokoch 2004 a 2005 sa zhodnotilo percento pokryvnosti listov škvrkami septoriózy plevovej a v laboratórnych podmienkach sa hodnotila úroveň produkcie spór pri 35 registrovaných odrodách pšenice ozimnej. V oboch znakoch sa zistili štatisticky vysoko významné rozdiely medzi odrodami. Medzi percentuálnou pokryvnosťou listov škvrkami patogéna a produkciou spór sledovaných odrôd zistil sa kladný, ale slabý korelačný vzťah, čo poukazuje na to, že oba znaky sú nezávislé.

### Literatúra

1. BROENNIMANN, A.: Entwicklung der Kenntnisse euber *Septoria nodorum* Berk. im Hunblick auf die Toleranz oder Resistenzzuchtung bei Weizen. Neth. In: J. Agric. Sci., 30, 1982, s. 47 – 69.
2. BRUNE, H.H. - NELSON, L. R.: Partial Resistance to Septoris Glume Blotch Analazed in Winter Whrat Seedlings. In: Crop Sci., 30, 1990, s. 54 – 59.
3. CUNFER, B.M., Stooksbury, Johnson, J.W.: Components of partial resistance to *Leptosphaeria nodorum* among seven soft red winter wheats. Euphytica, 37, 1988, 129 – 140.
4. DU, C.G. - NELSON, L.R. - MCDANIEL, M.E.: Partial Resistance to *Stagonospora nodorum* in Wheat. Septoria and Stagonospora Disease of Cereals: A Compilation of Global Reserach. In: Proceeding of the Fifth International Septoria Workshop, September 20-24, 1999, Mexico, 1999, s. 160 – 162.
5. LEATH, S. - SCHAREN, A.L. - HOLMES, M.E.D.: Factors Associated with Global Occurences of *Septoria nodorum* Blotch and *Septoria tritici* Blotch of Wheat. In: Plant Diseases, 77, 1993, 12, s. 1266 – 1270.
6. NELSON, L. R. - MARSHALL, D.: Breeding wheat for resistance to *Septoria nodorum* and *Septoria tritici*. In: Advances in Agronomy, 44, 1990, s. 257 – 277.
7. SHAW, M.W.: Epidemiology of *Mycosphaerella graminicola* and *Phaeosphaeria nodorum*: An Overview. Septoria and Stagonospora Disease of Cereals: A Compilation of global Research. In: Proceeding of the Fifth International Septoria Workshop, September 20-24, 1999, Mexico, 1999, s. 93 – 97.
8. TVARUŽEK, L.: The utilization of coloured photoselective plastic foil in testing winter wheat for resistance to *Septoria nodorum* Bek. In: Ochr. Rostl. 27, 1991, s. 101 – 109.
9. WAINSHILBAUM, S.J. - LIPPS, P.E.: Effect of Temperature and Growth Stage of Wheat on Development of Leaf a Glume blotch Caused by *Septoria tritici* and *S. nodorum*. In: Plant Disease, 1991, s. 993 – 998.

Adresa autora:

Ing. Bernard Vančo, PhD., Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

## VYUŽITÍ METODY MIKROSATELITŮ (SSRs) PRO STUDIUM REZISTENCE KUKUŘICE (*ZEAMAYS L.*) K VIRU MOZAIKY CUKROVÉ TŘTINY (SCMV) THE USING OF MICROSATELLITE METHOD (SSRs) FOR STUDYING OF MAIZE RESISTANCE TO SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV)

Zuzana PIÁKOVÁ - Petra HÁJKOVÁ - Marie PORUBOVÁ

*The marker assisted selection is important tool of breeding process. The aim of this study is to determine and characterize the mechanism of maize resistance to Sugarcane mosaic virus (SCMV). We studied the genetic base of maize resistance to SCMV by means of virological testing and molecular analysis using PCR method. The plants at the stage of 2.-3. leaves were mechanically inoculated with Czech isolate of SCMV Tr-190. The number of plants with symptoms was appointed in F<sub>3</sub> generations and in maternal lines TR 42 (resistant) and TR 56 (sensitive) in week periods after inoculation and the resistance index was calculated according to the rate of symptoms appearing. The maternal lines of F<sub>3</sub> generation (designated 153 and 159) were tested by means of 98 SSR primers. The primers for analysis of individuals of F<sub>3</sub> generation were selected in accordance with the detected polymorphism of maternal lines TR 42, TR 61 (resistant) and TR 56, TR 65 (sensitive). In conformity with this screening 15 SSR primers for analysis of F<sub>3</sub> generation (designated 153) and 20 SSR primers for analysis of F<sub>3</sub> generation (designated 159) were selected. After the complementation of analysis results the data will be evaluated through the MapManager software and will be estimated QTLs locuses resistance of maize to SCMV.*

Key words: breeding resistance, PCR, microsatellites, SSR primers, maize, sugarcane mosaic virus, index of resistance, *Zea mays L.*

### Úvod

Kukuřice je napadána celou řadou chorob a škůdců. Významným patogenem způsobující vážné ztráty na výnosu zelené hmoty i zrna je virus mozaiky cukrové třtiny (Sugarcane mosaic virus - SCMV). K omezení výskytu virových chorob neexistuje dosud žádná dostupná přímá metoda ochrany, a proto je jedním z důležitých opatření k omezení poškození porostů virovými patogeny šlechtění odolných odrůd. Významným prostředkem ve šlechtění na rezistenci je v současné době markery asistovaná selekce, která spočívá v identifikaci markerů v těsné vazbě s genem a jejich využití při urychlení šlechtitelské práce. Při výběru rostlin odolných vůči různým patogenům je v procesu selekce pomocí markerů jedním z používaných typů DNA markerů SSR (WANG et al., 2002).

Cílem práce je využití metody detekce mikrosatelitů (SSR) pro studium rezistence kukuřice k viru SCMV. Na základě virologického testování a molekulární analýzy pomocí DNA markerů, je studován genetický základ rezistence kukuřice (*Zea mays L.*) k SCMV.

### Materiál a metody

#### Rostlinný materiál a hodnocení rezistence

Na základě předchozího testování (HÁJKOVÁ et al., 2003) byla pro další studium a hodnocení stupně rezistence vybrána F<sub>3</sub> generace (označení 153), jejíž výchozí rodičovské linie jsou TR 42 (rezistentní) a TR 56 (náchylná) a F<sub>3</sub> generace (označení 159), jejíž výchozí rodičovské linie jsou TR 61 (rezistentní), TR 65 (náchylná). Pro testování rezistence kukuřice k SCMV ve skleníkových podmínkách byl vybrán český izolát Tr – 190 (POKORNÝ, PORUBOVÁ, 2000). Rostlinný materiál F<sub>3</sub> generace (označení 153) byl inokulován ve stádiu 2. – 3. listu (1 g zelené hmoty / 7 ml pufru), ve dvou časových opakováních. V týdenních intervalech po inokulaci byl u jednotlivých materiálů F<sub>3</sub> generace (označení 153) a rodičovských linií (TR 42, TR 56) stanoven počet rostlin s příznaky infekce 8. – 63. den po inokulaci (DAI – day after inoculation) a na základě rychlosti objevování příznaků byl u jednotlivých materiálů vypočítán index rezistence (IR).

Při zjišťování kandidátů SSR markerů byly pro izolace DNA použity neinokulované výchozí linie pěstované ve skleníkových podmínkách (TR 42, TR 56, TR 65, TR 61). Byl odebrán směsný vzorek z 5 – 7 rostlin, který byl homogenizován v prostředí tekutého dusíku a zamražen na – 80 °C. Při této teplotě byl materiál také dále uchováván. Pro následnou analýzu byl odebrán rostlinný materiál individuálních rostlin z II. opakování po hodnocení rezistence z inokulovaných rostlin a rostlinný materiál bulků neinokulovaných rostlin. Odebraný materiál byl ihned zamražen v tekutém dusíku a dále uchováván do doby izolace DNA při – 80 °C. U těchto materiálů probíhala homogenizace těsně před extrakcí DNA.

#### Izolace DNA a SSR analýza

DNA byla izolována komerčním soupravou Kit Gen Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma dle metodiky uvedené v protokolu dodaném výrobcem.

Screening výchozích linií TR 42, TR 56, TR 65, TR 61 mapovací F<sub>3</sub> generace byl proveden s 98 SSR primery. Tyto primery byly získány z databáze [www.maize.gdb.org](http://www.maize.gdb.org) a syntetizovány firmou East-port. PCR reakční protokol byl v naší laboratoři optimalizován (HÁJKOVÁ et al., 2004).

Produkty byly separovány elektroforeticky na 3 % Metaphor agarózovém gelu a barveny ethidium bromidem. Detekce DNA byla provedena v UV světle, fotodokumentace byla pořízena fotoaparátem Canon prostřednictvím fotodokumentačního systému Ultra-Lum UC4100. Polymorfismus byl vyhodnocen vizuální detekcí.

Po tomto screeningu byly vybrány SSR primery dávající polymorfismus u výchozích linií TR 42, TR 56, TR 65, TR 61 mapovací F<sub>3</sub> generace (označení 153 a 159). Polymorfismus byl determinován jako různé pozice (velikosti fragmentu) v gelu.

### Výsledky a diskuse

Výchozí mateřské linie byly testovány s 98 SSR primery. Tyto primery byly selektovány na 3 a 6 chromozomu na základě literárních poznatků o lokusech rezistence. Chromozomy 3,6 jsou saturovány AFLP a SSR markery v oblasti Scmv1 a Scmv2 odpovědných za rezistenci kukuřice k SCMV (DUSSLE et al., 2003). Na základě detekovaného polymorfismu u výchozích linií TR 42, TR 61 (rezistentní) a TR 56, TR 65 (náchylná) byly selektovány primery pro analýzu individuí F<sub>3</sub> generace. Prostřednictvím tohoto screeningu bylo vybráno 15 SSR primerů pro analýzu F<sub>3</sub> generace (označení 153) a 20 SSR primerů pro analýzu F<sub>3</sub> generace (označení 159). YUAN et al. (2003) mapoval oblasti na chromozomech 3 a 6 obsahující QTLs prostřednictvím 24 SSR markerů. ZHANG et al. (2003) detekoval na chromozomech 3,5,6,10 QTLs rezistence k SCMV v závislosti na fázích vývoje rostliny. Po kompletaci výsledků z analýz budou data hodnocena pomocí mapovacího softwaru MapManager a budou stanoveny QTLs lokusy rezistence kukuřice k SCMV.

### Závěr

Z testovaných 98 primerů je po screeningu na základě detekovaného polymorfismu využitelných 15 SSR primerů pro analýzu F<sub>3</sub> generace (označení 153), což odpovídá 14,7% polymorfních markerů a 20 SSR primerů pro analýzu F<sub>3</sub> generace (označení 159), což odpovídá 19,6% polymorfních markerů. V současné době probíhá analýza celého souboru individuí a bulků s vybranými primery u F<sub>3</sub> generace (označení 153). Po kompletaci získaných dat na základě molekulární analýzy bude soubor dat hodnocen prostřednictvím mapovacího softwaru MapManager a budou stanoveny QTLs lokusy rezistence kukuřice k SCMV.

### Literatura

1. DUSSLE, C.M. - QUINT, M. - MELCHINGER, A.E. - XU, M.L. - LUBBERSTEDT, T.: Saturation of two chromosome regions conferring resistance to SCMV with SSR and AFLP markers by targeted BSA. *Theor. Appl. Genet.* 106, 2003, 3, s. 485-493.
2. HÁJKOVÁ, P. - PORUBOVÁ, M.: Optimalizace metody mikrosatelitů (PCR-SSR) pro kukuřice i *Zea mays* L. In: Sborník: „Nové poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin“. Brno, VÚPT, 2004, s. 81-85, ISBN 80-902436-9-X.
3. HÁJKOVÁ, P. - SMOLÍKOVÁ, M. - POKORNÝ, R. - PORUBOVÁ, M.: RAPD markery rezistence k viru mozaiky cukrové třtiny SCMV u kukuřice. Sborník, Piešťany, 2003, s. 109 – 110.
4. POKORNÝ, R. - PORUBOVÁ, M.: The occurrence of viral pathogens of the genus *Potyvirus* on maize (*Zea mays* L.) in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107, 2000, 3, 329 – 336. ISSN 0340-8159
5. WANG, J. - ZHONG, G.Y. - CHIN, E.C.L. - REGISTER, J.C. - RILEY, R.D. - NIEBUR, W.S. - SMITH, J.S.C.: Identification of patentes of F<sub>1</sub> hybrids through SSR profilig of Maternal and hybrid tissue. *Euphytica* 124, 2002, s. 29-34.
6. YUAN, L. - DUSSLE, C.M. - MELCHINGER, A.E. - UTZ, H.F. - LUBBERSTEDT, T.: Clustering of QTL conferring SCMV resistance in maize. *Maydica* 48, 2003, 1, s. 55-62.
7. ZHANG, S.H. - LI, S.H. - WANG, Z.H. - GEORGE, M.L. - JEFFERS, D. - WANG, F.G. - LIU, X.D. - LI, M.S. - YUAN, L.X.: QTL mapping for resistance to SCMV in chinese maize germplasm. *Maydica* 48, 2003,4, s. 307-312.

www.maize.gdb.org

### Zdroje financování:

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT – VZ MSM, č. 2629608001

---

### Kontaktní adresy:

Ing. Petra Hájková, Ing. Zuzana Piáková, PhD., Zemědělský výzkum, s.r.o.. Zahradní 1, 664 41 Troubsko, Česká republika, e-mail: [hajkova@vupt.cz](mailto:hajkova@vupt.cz), [piakova@vupt.cz](mailto:piakova@vupt.cz)  
RNDr. Marie Porubová, CEZEA – šlechtitelská stanice, a.s., 696 14 Čejč, Česká republika, [cezea.as@worldonline.cz](mailto:cezea.as@worldonline.cz)

## ZMENY VO VÝSKYTE RÁS V POPULÁCII PLESNE ZEMIAKOVEJ NA SLOVENSKU V ROKOCH 1996 - 2005 CHANGES IN OCCURRENCE OF RACES OF LATE BLIGHT POPULATION IN SLOVAKIA DURING 1996 - 2005 YEARS

Kvetoslava FORIŠEKOVÁ - Ján HELDÁK

*The Slovak *P. infestans* population has been monitored since 1996, with primary focus to physiological race determination, metalaxyl resistance and mating types. Virulence characteristics have been monitored in order to identify races for use in breeding potatoes resistant to *P. infestans*. Changes in late blight population were confirmed. The occurrence of isolates with R2, R5, R9 and R11 virulence factors was noted neither in 1996 nor in 1997, and tested isolates had maximum six virulence genes. Since 1999, the occurrence of isolates with seven, eight and even ten R-genes has been recorded. Evident tendency in moving up to more complex races can be seen. It is likely that problems concerning more aggressive new pathogen may appear also in our potato-growing area.*

*Key words: potato, late blight, race, R-gene.*

### Úvod

Až do 80-tych rokov minulého storočia dominovali v porastoch zemiakov klonové línie plesne zemiakovej *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, ktoré sa množili len vegetatívne. Klonová reprodukcia mala za následok uchovávanie vlastností a populácie plesne zemiakovej boli viac menej stabilizované. Prvým náznakom zmeny bola prítomnosť izolátov plesne zemiakovej rezistentných na metalaxyl. Pôvodne sa predpokladalo, že rezistencia sa vyvinula v domácich populáciách plesne v Európe. Následne bolo dokázané, že táto odlišná populácia bola do Európy dovezená sadivom z Južnej Ameriky. Dôkazom bolo potvrdenie výskytu A<sub>2</sub> kopulačného typu, ktorý umožnil začiatok generatívneho rozmnožovania sa plesne zemiakovej v Európe. Generatívna reprodukcia patogéna tak umožnila vznik nových genotypov a tým vytvorila predpoklad zvýšenie agresívnosti v novovzniknutých genotypoch plesne zemiakovej. Zmeny v populáciách plesne zemiakovej potvrdzujú: včasnejší začiatok epidémie, výskyt oospór, objavenie sa stonkových infekcií, zvýšenie patogenity a agresívnosti, vyšší počet primárnych ohnísk infekcie, rezistencia k fenylamidom, veľmi silná infekcia hl'úz. Okrem výskytu oospór na poli, boli všetky ostatné faktory pozorované aj na Slovensku (FORIŠEKOVÁ, 2005).

### Materiál a metóda

Izoláty plesne zemiakovej sme získavali z polí v lokalitách Poprad a Kežmarok – hlavnej sadivovej oblasti Slovenska. Fyziologické rasy izolátov sa určovali podľa reakcie na sérii genotypov zemiaka obsahujúcich jednotlivé R - gény (R1 až R11 a r) (DRENTH, 1994). Po infikovaní inokulom neznámej rasy sa hodnotil vývoj sporulujúcich lézií na jednotlivých testeroch. Listy sa inokulujú kvapkou suspenzie o koncentrácii 10<sup>4</sup> spór . ml<sup>-1</sup> a inkubujú 6 dní pri 18 °C a 16 hod. osvetlení. Izolát je pokladaný za virulentný, ak najmenej na troch listoch zo štyroch bola pozorovaná kompatibilná reakcia (rast mycélia a sporulácia).

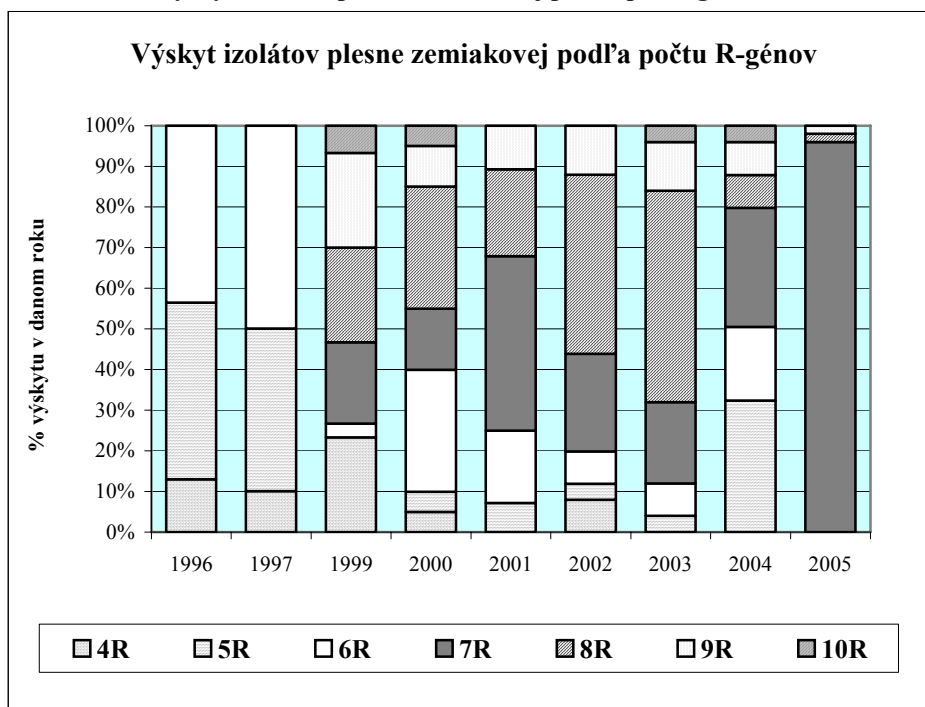
### Výsledky a diskusia

Vývoj komplexnosti rás plesne zemiakovej sa vo VŠUZ Veľká Lomnica začal hodnotiť v laboratórnych podmienkach už v roku 1996. V prvom roku okrem jednoduchých kombinácií génov virulencie ako R1,R4 (8%) alebo R1,R3,R4 (19%) k najčastejšie sa vyskytujúcim patrili R1, R3, R4, R7, R10 (28%) a R1, R3, R4, R7, R8, R10 (tiež 28% z testovanej populácie izolátov). Až do roku 1999 nebol potvrdený výskyt R2, R5, ani R11 izolátov plesne. V týchto rokoch mali testované izoláty najviac šesť génov virulencie. Komplexnejšie izoláty sa objavili až po roku 1999, keď sa detekovali izoláty s ôsmimi, deviatimi i desiatimi génmi virulencie. V roku 2003 bol najčastejšie zaznamenaný výskyt komplexu génov virulencie R1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 – 42,3%. Percentuálne rozdelenie podľa počtu génov virulencie 5 R-génov 3,7%, 6 R-génov 11,1%, 7 R-génov 18,5%, 8 R-génov 48,2%, 9 R-génov 11,1% a 10 R-génov len 3,7%. V roku 2004 bol pri testovaní virulencie zistený výskyt od troch po 10 génov virulencie. Najčastejšie sa vyskytovala kombinácia R1,3,4,7,8,10,11 – 20% a R1,3,4,7,10,11 – 16,6% z testovaných izolátov. Percentuálne rozdelenie podľa počtu génov virulencie: menej ako 5 génov virulencie 32%, 6 – 18%, 7 – 29%, 8 – 8%, 9 – 8% a 10 – 4%. V roku 2005 bol pri testovaní virulencie prekvapivý: v priebehu sezóny sa vyskytovala len uniformná kombinácia R1,3,4,7,8,10,11 – 96% z testovaných a len ku koncu sezóny sa objavila kombinácia R1,2,3,4,6,7,8,10,11 - 2% a R1,3,4,6,7,8,10,11 – 2 % z testovaných izolátov. Ani v jednom prípade nebol potvrdený výskyt R9 a výskyt R5 bol zaznamenaný len ojedinele, čo je v súlade s poznatkami získanými aj v okolitých krajinách.

Napr. V Nemecku robili súvislý výskum plesne od roku 1950 (SCHÖBER-BUTIN et al., 1996). Ešte v roku 1970 sa vyskytovali aj rasy len s jedným R-génom virulencie samostatne a to iba R1 a R4 a potom len kombinácie s dvomi R1,4, tromi R1,3,4 a maximálne štyrmi génmi virulencie R1, 2, 3, 4. V roku 1990 sa už vyskytovali iba komplexné izoláty s piatimi až deviatimi R-génmi .

V nasledujúcom grafe (Graf 1) sú znázornené zmeny v populácii plesne zemiakovej na Slovensku od roku 1996. Stĺpec každého roku je rozdelený na úseky podľa percentuálneho výskytu izolátov plesne zemiakovej s daným počtom R-génov virulence. Môžeme teda porovnať, ako sa v jednotlivých rokoch tento pomer menil. Kým v rokoch 1996 a 1997 bol najvyšší počet R-génov virulence 6, z grafu vidíme, že v roku 1999 došlo k výraznej zmene v počte génov virulence. Prudko vzrástol počet izolátov so 7 (20%), 8 (23%) a 9 (23%) génmi virulence a dokonca bol zistený aj výskyt izolátov s desiatimi R-génmi virulence (7%). Z toho sa dá predpokladať, že práve v tomto roku sa dovozmi sadiva na územie Slovenska dostala tzv. nová agresívnejšia populácia plesne zemiakovej, ktorej výskyt bol predtým zaznamenaný v západnej Európe. Kým v roku 2000 bol výskyt izolátov s 8 génmi virulence na úrovni 29%, v roku 2002 to už bolo 37% a v roku 2003 až 50%. V roku 2003 už nebol zistený ani jeden izolát s menej ako 5 génmi virulence. Z grafu teda jednoznačne vidieť tendenciu posunu k výskytu izolátov s vyšším počtom génov virulence.

**Graf 1: Výskyt izolátov plesne zemiakovej podľa počtu génov virulence**



### Záver

Efektívny manažment ochrany proti plesni zemiakovej musí byť založený na dokonalom poznaní patogéna. Na Slovensku je populácia plesne zemiakovej monitorovaná z tohto hľadiska od roku 1996. V priebehu sledovania boli potvrdené zmeny v populáciách plesne zemiakovej na našom území. V rokoch 1996 izoláty mali maximálne šesť génov virulence. Od roku 1999 sa začali vyskytovať izoláty so siedmimi, ôsmimi, dokonca až desiatimi R-génmi. Možno teda skonštatovať, že dochádza k posunu a k výskytu komplexnejších a agresívnejších izolátov plesne zemiakovej. Problémy súvisiace s novými agresívnejšími populáciami plesne zemiakovej sa prejavujú už aj v našej oblasti (prelomenie rezistencie odolnej odrody Alva).

### Literatúra

1. DRENTH, A. – TAS, I. – GOVERS, F.: DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherland. In: *European Journal of Plant Pathology*, 1994, 100, s. 97-107
2. FORIŠEKOVÁ, K.: Analýza agresivity rás plesne zemiakovej a inovácia ochrany proti tomuto patogénu. In: *Záv. správa. Veľká Lomnica : VŠÚZ*, 2005, 64 s.
3. SCHÖBER-BUTIN, B. – KNAPOVA, G. – KNIPFELBERG, I. – NIEPOLD, F.: *Phytophthora infestans* in Germany: population dynamics and modern methods in diagnosis. In: DOWLEY, L.J. et al. /eds./, *Phytophthora infestans 150*, Boole Press Ltd., Dublin, Ireland, ISBN 1 854748 0090, 1996, 382 s.

Adresa autora:

Kvetoslava Forišeková, Ján Heldák, VŠÚZ - Výskumný a šľachtiteľský ústav zemiakársky a.s., Popradská 518, 059 52 Veľká Lomnica, forisek@sinet.sk

## SÚČASNÝ POTENCIÁL GENETICKÝCH ZDROJOV OVOCNÝCH DRUHOV VYUŽITEĽNÝ V ŠĽACHTENÍ ACTUAL POTENTIAL OF FRUIT GENETIC RESOURCES AVAILABLE IN BREEDING

Daniela BENEDIKOVÁ

*National program registered 26 742 plant genetic resources, from that fruit species to create 4 320 genotypes it is 16.20 %. Vegetative multiplied species are conserved in field collection or in repositories. We to preserve 29.96 ha collection of fruit species and 40.58 ha repositories. The List of registered varieties Slovak Republic to register 280 varieties and 57 rootstocks from 26 species. The breeding perspective for home producer conditions is only for limited numbers of species like are small fruits or temperate stone fruits. Contemporary breeding level is endangered by reason of no funding from state.*

*Key words: National program, genetic resources, fruits, breeding*

### Úvod

Genetické zdroje poľnohospodárskych rastlín majú pre ľudstvo nevyčísliteľnú hodnotu či už sú využívané v tradičnom poľnohospodárstve, alebo v konvenčnom či modernom šľachtení alebo génovom inžinierstve. Sú zdrojom unikátnych a nenahraditeľných génov a génových komplexov pre ďalšie genetické zlepšovanie biologického a hospodárskeho potenciálu produkčných organizmov v poľnohospodárstve. Sú predpokladom pre rozširovanie genetickej základne súčasných odrôd a zvyšovanie agrobiodiverzity, majú význam pre rozvoj ekologických systémov poľnohospodárstva a zabezpečujú jeho trvalo udržateľný rozvoj.

### Materiál a metódy

**Národný program** ako súhrn organizačných, právnych a ekonomických opatrení na zabezpečovanie komplexnej a sústavnej ochrany genetických zdrojov rastlín je základný dokument v oblasti ochrany genetických zdrojov rastlín. Inovácia tohto dokumentu bola schválená v roku 2005 a uverejnená vo Vestníku MP SR č. 8 v marci 2005 a nadviazala na doterajšie aktivity v práci s genetickými zdrojmi, aktualizuje používané metódy a ciele a uvádza ich do súladu s platnou národnou legislatívou a prijatými medzinárodnými dokumentmi (BENEDIKOVÁ a kol., 2004; Vestník MP SR, 2005, Zbierka, 1996).

Základnými prioritami činnosti na obdobie 2005 – 2009 je:

- chrániť kultúrne dedičstvo a v súčasnosti vytvorené hodnoty vyjadrené v genetických zdrojoch rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo v prospech súčasnej a budúcich generácií,
- prispievať k národnému rozvoju, potravinovej bezpečnosti, trvalo udržateľnému poľnohospodárstvu a spravovaniu agrobiodiverzity prostredníctvom uchovávanía a využitia genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo.

V súlade s vývojom vo svete a medzinárodnými prioritami sa uchovávanie a využívanie genetických zdrojov stáva trvalou súčasťou výskumnej a šľachtiteľskej náplne riešiteľských pracovísk Národného programu SR. Úlohy Národného programu plnia riešiteľské pracoviská zriaďované zmluvne v zmysle § 8 a 9 zákona 215/2001 Z.z. o ochrane genetických zdrojov.

Súčasný potenciál kolekcii genetických zdrojov ovocných druhov ktoré sú k dispozícii pre šľachtiteľské účely sa nachádzajú na VÚOOD, a.s. Bojnice, VŠS Veselé, s.r.o.. Okrem toho sú kolekcie starých odrôd ovocných druhov potencionálne využiteľné pre šľachtenie. Nachádzajú sa v zbierkach Botanickej záhrady SPU Nitra a v repozitóriách v Bošáci, Sabinove, Krupine, Revúcej a Sebechleboch.

Podľa Nariadenia vlády SR č. 164 z 3. marca 2004 ktorým sa vykonáva registrácia odrôd poľnohospodárskych plodín došlo k zmenám a úpravám, ktoré ovplyvnili hlavne ovocné druhy. Tieto ako samostatná skupina neboli zahrnuté do skupiny plodín, pri ktorých sa vykonáva povinná registrácia odrôd. Tento úkon dobrovoľnej registrácie silne ovplyvňuje úroveň šľachtenia ovocných druhov všeobecne.

### Výsledky

Šľachtenie nových výkonných a miestnym podmienkam dobre prispôsobených odrôd ovocných druhov je najreálnejšou i keď nie najkratšou cestou pre riešenie daného problému. Doterajšie výsledky domáce i zahraničné túto skutočnosť len potvrdzujú. V súčasnosti si každé šľachtiteľské pracovisko vypracováva svoj vlastný metodický materiál, vzhľadom k tomu, že nie je v rámci rezortu pôdohospodárstva žiaden subjekt poverený koordináciou šľachtiteľských prác. Dobrovoľná registrácia ovocných druhov podľa Nariadenia vlády SR č. 164 / 2004 nepriaznivo ovplyvňuje úroveň šľachtenia ovocných druhov všeobecne. LRO eviduje pre 26 druhov ovocných drevín 280 odrôd a 57 podpníkov (LRO 2004).

**VŠS, s.r.o Veselé** je pracovisko s dlhoročnou tradíciou v šľachtení najmä marhúl a broskyň. Potenciál udržiavaných genetických zdrojov je v 5 kolekciiach (marhuľa obyčajná *Prunus armeniaca L.*, broskyňa



obyčajná *Prunus persica* L., mandľa obyčajná *Prunus amygdalus* L., myrobalán *Prunus cerasifera* L. a orech kráľovský *Juglans regia* L. v celkovom počte 646 genotypov na ploche 10 ha.

Nachádza sa tu ďalej i šľachtiteľský materiál na pokusnej ploche 7,70 ha. Na pracovisku sa pokračuje i v zhodnocovaní hybridného materiálu broskyň zo šľachtienia Gustáva Čejku. Doterajšie výsledky šľachtiteľských aktivít boli veľmi úspešné. Výsledkom je 10 registrovaných odrôd marhúľ, 2 mandle a 1 myrobalán. Prvými registrovanými odrodami boli marhule a podpníky pre myrobalán a mandľu v roku 2001.

**VÚOOD, a.s. Bojnice** je výskumné pracovisko s dlhoročnou tradíciou v šľachtení ovocných druhov a s vysokým počtom registrovaných odrôd najmä drobného ovocia ako sú ríbezle, egreše, maliny a jahody.

V súčasnosti sa tu uchováva 23 kolekcií s 2 049 položkami ovocných druhov najmä drobného ovocia na ploche 14,21 ha. Sú to tieto druhy: jablone, hrušky, dula, slivkoviny, čerešne, višne, jahody, ríbezle, egreše, maliny, ostružiny, zemleze, baza čierna, drieň, ruža plodová, gaštan jedlý, rakytník, arónia, jarabina, oskoruša, mišpuľa, čučoriedka, kľukva.

**Botanická záhrada SPU Nitra** v demonštračnom sade na ploche 5,75 ha udržiava sortiment ovocných drevín. Sortiment je tvorený svetovými odrodami registrovanými, starými odrodami reštrigovaným z LRO, starými krajovými odrodami získanými z územia Slovenskej a Českej republiky v minulosti. Starých krajových odrôd domáceho i zahraničného pôvodu je asi 70 genotypov. Ovocná výsadba bola zriadená ako demonštračná výsadba pre účely študentov SPU Nitra, v súčasnosti slúži však i pre verejnosť. Po zhodnotení jednotlivých genotypov je možné potencionálne využiť najmä sortiment krajových odrôd pri projektoch spojených s ozeleňovaním krajiny, agroturistikou a podobne. Nepredpokladá sa s otváraním šľachtiteľských projektov.

Kolekcie sú tvorené nasledovnými druhmi: jablone 240 odrôd, hrušky 36, dule 3, mišpuľa 5, jarabina 4, marhule 11, broskyne 15, slivky 13, čerešne 8, višne 10, orech 2, mandľa 3, lieska 5, gaštan 12, ríbezle 12, egreše 5, malina 3, černica 1, drieň 4, moruša 3, josta, vinič 75 odrôd, 7 podpníkov.

V súlade s celosvetovým trendom aj v Slovenskej republike sa uskutočňuje systematická a cieľavedomá ochrana a využívanie genofondu pestovaných rastlín. V rámci Národného programu zmluvne zriadené riešiteľské pracoviská (13) a repozitóriá (5) nepostačujú na to, aby sa zabezpečila záchrana zaujímavých starých genotypov ovocných druhov. Je ešte niekoľko založených repozitórií, ale v súčasnosti nebola s nimi z rôznych, najmä však legislatívnych a vlastníckych problémov uzatvorená zmluva o zriadení riešiteľského pracoviska v zmysle zákona.

Veľmi problematická je i ochrana starých historických odrôd, ktoré sa vyskytujú i ako pamiatka na významné šľachtiteľské či kultúrne osobnosti. Ako prvý krok sme začali so záchranou historickej „Fándlyho jablone“ a „Geschwindových ruží“.

Jabloň sa nachádza v obci Naháč, kde J. Fándly pôsobil. Strom je evidovaný ako štátom chránený strom v zmysle zákona č. 543/2002 Z.z. o ochrane prírody a krajiny. Po dohode so správcom fary bol odobratý biologický materiál na záchranu a rozmnoženie uvedenej jablone a jej opätovné vysadenie v objekte starej farskej záhrady. Táto jabloň môže byť potencionálne využitá do výskumných projektov, alebo fyziologických štúdií nakoľko jej bionómia kvitnutia je veľmi zaujímavá (kvety bez korunných lupienkov, partenokarpické oplodnenie a i.).

Rudolf Geschwind pôsobil na území Krupiny ako lesmajster v rokoch 1872 až 1906. Dosiahol významné výsledky nielen v hybridizácii lesných drevín a zalesňovaní ale preslávili ho najmä ruže, ktorých údajne vyšľachtil 707, ale zachovalo sa ich len 120. Výsledkom spolupráce s Botanickou záhradou pri SZAš v Piešťanoch sme začali so získavaním a premnožovaním uvedených ruží.

## Záver

Legislatívne zmeny ku ktorým došlo najmä v zákone ktorý sa zaoberá registráciou odrôd, a kde sa už nehodnotí pri ovocných druhoch ich hospodárska hodnota nepriaznivo ovplyvnili úroveň šľachtienia ovocných druhov na Slovensku. Prežívajú len ekonomicky silné firmy s dostatočne rozpracovaným materiálom a dlhodobou tradíciou. Perspektíva šľachtienia pre domáce pestovateľské podmienky je len pre obmedzený počet druhov ako je drobné ovocie, teplomilné kôstkoviny. Súčasná úroveň novošľachtienia je ohrozená i z dôvodu nepodporovania tejto činnosti zo strany štátu.

## Literatúra

1. ANONYM: Listina registrovaných odrôd pre rok 2004, Vydáva UKSUP Bratislava, Vestník MP SR
2. BENEDIKOVÁ, D. - HORŇÁKOVÁ, O. - ŽÁKOVÁ, M. - HAUPTVOGEL, P.: Ochrana genetických zdrojov rastlín a jej integrácia s Európskym kooperatívnym programom: Záverečná správa za účelovú činnosť [Preservation of plant genetic resources and your integration with ECP/GR: Final report for expert services]. Piešťany : VÚRV, 2004, 60 s., tab.16.
3. VESTNÍK MP SR: Národný program ochrany genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo. Roč. XXXVII, č.8, 2005, s.55-101.
4. Zbierka zákonov, 1996. Zákon NR SR č. 34/1996 o uzavretí Dohovoru o biologickej diverzite
5. Zbierka zákonov, 2002. Zákon NR SR č. 543/2002 Z.z. o ochrane prírody a krajiny.

Adresa autora:

Ing, Daniela Benediková, Ph.D. Génová banka SR VÚRV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, SR



**VYUŽITIE NIEKTORÝCH MATEMATICKÝCH METÓD PRI ŠTÚDIU  
FYZIKÁLNYCH VLASTNOSTÍ STEBIEL OBILNÍN  
USING OF SOME MATHEMATICAL METHODS FOR STUDY OF PHYSICAL  
PROPERTIES OF CEREALS STEMS**

Juraj DUNCA – Alena DUNCOVÁ – Ondrej ŠVEC

*In this paper using of some mathematical methods for study physical methods for study physical properties of cereals stems.*

*Key words: physical properties, stems, wheat*

**Úvod**

Medzi významné fyzikálne vlastnosti stebiel obilnín patria: pružné vlastnosti, väzkoplastické a pevnostné vlastnosti. Fyzikálne vlastnosti stebiel obilnín majú dôležitú úlohu pri riešení otázok odolnosti proti poliehaniu [1,2,3,5].

**Materiál a metódy**

Vzorky stebiel pšeníc vybraných odrôd sme dostali z VÚRV Piešťany. Pri meraniach vzorky stebiel vykonávali priečne kmity. Na meranie fyzikálnych vlastností bola použitá rezonančná dynamická metóda. Pri priečnych kmitoch vzorky stebiel spĺňali parciálnu diferenciálnu rovnicu 4. rádu [3,4].

$$a^2 \frac{\partial^4 u}{\partial x^4} + \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = 0 \quad (1)$$

$$\text{kde } a^2 = \frac{EJ}{\rho S}$$

E - modul pružnosti,

J - modul zotrvačnosti,

$\rho$  - hustota stebľa,

S - plocha v priečnom priereze stebľa.

Riešením diferenciálnej rovnice je funkcia [3]

$$u = (A \cos \omega t + B \sin \omega t) X(x) \quad (2)$$

Ak dosadíme (2) do (1) a zavedieme označenie

$$\frac{\omega^2}{a^2} = k^4$$

potom dostaneme charakteristickú rovnicu

$$r^4 - k^4 = 0 \quad (3)$$

Riešením charakteristickej rovnice (3) dostaneme nasledovné korene

$$r_1 = k; \quad r_2 = -k; \quad r_3 = ik; \quad r_4 = -ik;$$

Funkcia X(x) potom nadobudne tvar [4]

$$X(x) = C_1 e^{kx} + C_2 e^{-kx} + C_3 e^{ikx} + C_4 e^{-ikx} \quad (4)$$

Ak zameníme význam ľubovoľných konštánt, potom funkciu X(x) prepíšeme do tvaru

$$X(x) = C_1 \cos kx + C_2 \sin kx + C_3 \cosh x + C_4 \sinh x \quad (5)$$

Použitím hraničných podmienok, potom pomocou (5) dostaneme frekvenčnú rovnicu v tvare [3]

$$\cos \lambda \cosh \lambda = 1 \quad (6)$$

Využitím rovnice ohybovej čiary [6]

$$\gamma'' = \frac{M}{EJ} \quad (7)$$

kde

M- moment sily,

J - moment zotrvačnosti prierezu stebľa,

E - modul pružnosti,

$\gamma$  - ohyb stebľa

a vzorca pre výpočet modulu pružnosti [3], potom dostaneme vzorec pre výpočet koeficienta pevnosti v ohybe v tvare [2]

$$k_2 = \frac{f^2 S}{\ell^3} \quad (8)$$

kde

f - rezonančná frekvencia,

S - plocha v priečnom reze internódia stebľa,

$\ell$  - dĺžka rastliny.

### Výsledky a diskusia

V tab. 1 a v tab. 2 sú uvedené namerané a vypočítané hodnoty fyzikálnych veličín. V tab. 1 označenie „n“ znamená poradové číslo meranej vzorky. Označenie U(mV) znamená maximálne napätie pri rezonancii. Rezonančná frekvencia je označená „f“. „f<sub>1</sub> a f<sub>2</sub>“ sú frekvencie, keď amplitúdy kmitov poklesli na polovicu maximálnej hodnoty. Označenie  $\Delta f = f_2 - f_1$  znamená šírku rezonančnej krivky a  $\delta$  je vnútorné tlmenie stebiel ako charakteristika väzkoplastických vlastností.

V tab. 2 sú uvedené namerané hodnoty rezonančných frekvencií, vonkajších priemerov d<sub>2</sub> [mm], hrúbky steny stebľa  $\Delta r$  [mm], dĺžky rastliny  $\ell_r$  [mm] a vypočítané koeficienty pevnosti k<sub>2</sub>.

O odolnosti proti poliehaniu rozhoduje pevnosť stebiel. Pevnosť stebiel je funkciou nielen pružných, ale aj väzkoplastických vlastností. Pri rovnakých pružných vlastnostiach charakterizovaných rezonančnými frekvenciami a modulmi pružnosti väčšou pevnosťou sa vyznačujú stebľa, ktoré majú menšie vnútorné tlmenie  $\delta$ .

### Záver

Fyzikálne vlastnosti charakterizované rezonančnými frekvenciami a modulmi pružnosti, väzkoplastické vlastnosti charakterizované vnútorným tlmením a najmä pevnostné vlastnosti stebiel pšenice charakterizované koeficientom pevnosti v ohybe k<sub>2</sub> majú dôležitú úlohu pri riešení otázok odolnosti proti poliehaniu.

### Literatúra

1. DUNCA, J.: Fyzikálne vlastnosti stebiel pšenice. In: Zborník z 10. odborného seminára, Piešťany, VÚRV, 2003, s. 90-91.
2. DUNCA, J. – DUNCOVÁ, A. – ŠVEC, O.: Využitie t-testu pri vyhodnotení pevnostných vlastností stebiel pšenice. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z 11. odborného seminára, Piešťany, VÚRV, 2004.
3. DUNCA, J.: Využitie parciálnej diferenciálnej rovnice 4. rádu pri štúdiu fyzikálnych vlastností biologických materiálov. In: Matematika vo výučbe, výskume a praxi 2004. Zborník z medzinárodnej konferencie, s. 47-51, ISBN 80-8069-371-4.
4. PLANDER, I.- TOMÁŠ, J.: Dynamické vlastnosti viskoelastických materiálov a ich meranie. Bratislava: SAV, 1968, 116 s.
5. PRUCKOVÁ, M.G. – UCHANOVÁ, O.I.: Nové odrody ozimnej pšenice. Príroda, Bratislava, 1976, 302 s.
6. SMIRNOV, V.I.: Kurz vyššej matematiky. Moskva: Štátne vydavateľstvo technicko-teoretickej literatúry, 1956, 630 s.

Táto práca bola podporená grantom VEGA č. 1/2374/05.

Adresa autora:

doc. RNDr. Juraj Dunca, CSc., Katedra fyziky, MF, SPU v Nitre. Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

**Tabuľka 1: Rezonančná frekvencia  $f$  [Hz], vnútorné tlmenie  $\delta$  [1], frekvencia  $f_1$  [Hz] a  $f_2$  [Hz] u pšenice odrody (FRA) NOUGAT**

n	U [mV]	f [Hz]	$f_1$ [Hz]	$f_2$ [Hz]	$\Delta f$ [Hz]	$\delta$ [1]	K [Hz]
1	2,3	245,4	241,7	250,6	8,9	0,06564	3738,57
2	2,7	246,9	242,4	250,1	7,7	0,05645	4377,66
3	2,4	248,2	244,0	251,9	7,9	0,05761	4308,28
4	2,3	245,5	237,8	250,8	13,0	0,09585	2561,29
5	2,9	246,3	241,8	249,7	7,9	0,05806	4242,16
6	1,6	246,2	242,4	249,6	7,2	0,05293	4651,43
7	1,6	246,3	243,4	251,1	7,7	0,05659	4352,36
8	1,8	246,6	242,4	251,2	8,8	0,06459	3817,93
9	2,4	246,9	239,7	252,1	12,4	0,09090	2716,17
10	2,4	247,7	241,1	251,6	10,5	0,07673	3228,20
11	2,4	247,3	243,6	252,0	8,4	0,06148	4022,45
12	3,4	247,6	242,9	250,8	7,9	0,05775	4287,45
13	1,8	247,1	241,9	249,9	8,0	0,05860	4216,72
14	1,9	247,4	244,0	252,3	8,3	0,06072	4074,44
15	1,75	247,9	243,0	252,5	9,5	0,06936	3574,11
16	2,5	244,7	240,6	250,3	9,7	0,07175	3410,45
17	2,3	246,0	242,0	249,9	7,9	0,05813	4231,89
18	1,5	248,3	244,3	250,4	6,1	0,04447	5583,54
19	1,7	246,6	240,7	248,4	7,7	0,05652	4363,06
20	1,8	245,3	241,2	248,8	7,6	0,05608	4374,11
$\Sigma$	43,45	4934,2	4840,9	5014	173,1	1,27021	80132,27
$\bar{x}$	2,2	246,71	242,04	250,70	8,66	0,06351	4006,614

**Tabuľka 2: Fyzikálne vlastnosti stebiel pšenice odrody (DEU) RIMPAUS BRAUN**

n	f [Hz]	$d_2$ [mm]	$\Delta r$ [mm]	$\ell_r$ [mm]	$k_2$
1	234,2	3,81	0,30	1120	1,29-04
2	242,8	3,45	0,32	1160	1,18-04
3	236,8	4,78	0,40	1070	2,51-04
4	240,1	3,33	0,28	1080	1,22-04
5	242,7	4,25	0,33	1160	1,53-04
6	240,7	3,83	0,25	990	1,67-04
7	237,1	3,97	0,38	1160	1,54-04
8	237,5	4,10	0,38	960	2,82-04
9	238,0	4,45	0,38	1070	2,24-04
10	235,7	4,51	0,35	1075	2,04-04
11	243,4	4,70	0,37	1190	1,76-04
12	241,3	4,40	0,40	1040	2,60-04
13	241,5	3,65	0,43	1100	1,90-04
14	237,7	4,34	0,46	1100	2,37-04
15	241,6	3,94	0,38	1210	1,39-04
16	242,3	2,72	0,23	1040	0,93-04
17	244,5	3,32	0,25	1180	0,87-04
18	242,0	4,49	0,42	1055	2,67-04
19	264,1	2,83	0,25	1120	1,00-04
20	271,3	3,45	0,29	1100	1,59-04
$\Sigma$	4855,3	78,32	6,85	21980	35,23-04
$\bar{x}$	242,77	3,92	0,34	1099	1,76-04

**POSTUPY SMERUJÚCE K ZÍSKANIU ÚDAJŮ PRE TVORBU CORE  
KOLEKČIE ĽANU (*Linum usitatissimum* L.)  
ADVANCEMENTS AIMING TO DATA ACQUISITION FOR CREATION OF  
FLAX CORE COLLECTION (*Linum usitatissimum* L.)**

Bohumila MATYSOVÁ - Martin PAVELEK - Petra VINKLÁRKOVÁ

*The current collection of genus Linum is represented by 2046 items of which 50% are ancestral and current varieties (X13), 26% are regional varieties (X12) and 24% are breeding materials (X11). The collection contains 53% of flax, 39% of linseed and 8% of combined types assorted by agricultural type (Pavelek et al. 2001). A prototype core collection based on detail analysis of structure of passport and describing descriptors will be created from this collection. The collection will be reduced to approximately 20% of an original size. An identification of duplicities based on accession name synonyms in the same agricultural type of flax will be used for the reduction of the collection, as well as an identification of identical varieties obtained to the collection from various gene banks (varieties from country of origin will be kept and the rest will be weeded out). An image analysis of morphological attributes will be used for the reduction of the collection as well. Genotypes included in the prototype core collection should represent the widest genetic variability of Linum genus in Europe. Selected morphological attributes will be studied according to the Descriptor List of genus Linum (Faberová and Pavelek, in press), matching with an international descriptor system UPOV (UPOV 1980,1994) and in association with IPGRI Multicrop Passport Descriptors (MCPDs) for flax, accredited on the meeting of European gene banks curators (Maggioni et al. 2001). Biological characterizations, yield parameters, content of qualitative traits and resistance against fungi disease Fusarium oxysporum f.sp.lini will be evaluated at the same time.*

*Key words: core collection, Linum usitatissimum L., gene bank*

## Úvod

Až dosud využívané metody charakterizace a popisu genetických zdrojů vycházely z pasportních, charakterizačních a popisných dat. Pasportní data, obecně platná pro všechny druhy kulturních rostlin jsou v genofondových kolekcích nejpropracovanějšími údaji o jednotlivých vzorcích, v současnosti uchovávanými v centrálním databázovém systému Evidence Genetických Zdrojů EVIGEZ, který byl vytvořen na počátku 80. let minulého století (FABEROVÁ, 1998).

## Materiál a metody

Tvorba core kolekce rodu *Linum* je ve společnosti Agritec Plant Research, s.r.o řešena v rámci Výzkumného záměru MSM 2678424601 (2004 – 2010). Je analyzováno cca 50 % kolekce zahrnující položky označené X13 – starší i současné komerční odrůdy přadného i olejného lnu, celkem se jedná o cca 1010 položek. Ročně je zhodnoceno 330 – 340 genotypů, které jsou vysety secím strojem HEGE na parcelky o velikosti 0,6 m<sup>2</sup> v jednom opakování. Každý genotyp je vyséván v průběhu dvou let na různých stanovištích z důvodu stanovení vlivu ročníku a lokality na projev jednotlivých znaků a charakteristik. Podle klasifikátoru lnu (PAVELEK, FABEROVÁ, v tisku) jsou sledovány následující morfologické znaky: celková délka, technická délka, velikost květu, velikost korunních lístků, tečkování kalicha, barva korunních lístků, tvar koruny (horizontální řez), tvar koruny (vertikální řez), barva nehtu korunních lístků, barva prašníků, barva nitěk, barva čnělky na bázi, ořasení sept tobolek, barva semene, tvar tobolky, uzavření tobolek.

Během vegetace jsou sledovány tyto biologické charakteristiky: datum setí, datum vzejtí, rychlost počátečního růstu, držení vrcholu stonku v RR, datum kvetení, doba setí – kvetení, datum raně žluté zralosti, doba setí – raně žluté zralosti, datum žluté zralosti, doba setí – žluté zralosti, odolnost proti poléhání v době květu, odolnost proti poléhání v době zralosti. Z výnosových charakteristik jsou hodnoceny: výnos neroseného stonku z parcely (přadný len), výnos máčeného stonku z parcely (přadný len), obsah vlákniny v stonku (přadný len), výnos vlákniny z parcely (přadný len), výnos semene z parcely (přadný, olejný len). Z obsahových látek v semeni lnu je analyzován obsah tuku, mastných kyselin a antinutričních látek (olejný len).

Pro přesnější zhodnocení kolekce pomocí speciálních popisných deskriptorů, zejména morfologických znaků, používáme metody obrazové analýzy, kterou použili ve svém projektu i slovenští výzkumní pracovníci (BRINDZA et al., 2001). Tato metoda umožňuje daleko detailnější hodnocení znaků a rozdílů mezi odrůdami a jednotlivými položkami genofondu na základě vyhodnocení parametrů obrazové analýzy, převedených do matematických algoritmů. Velmi dobrým rozlišovacím znakem u rodu *Linum* jsou korunní lístky a parametry obrazové analýzy: obvod (area), prodloužení (elongace), plocha (PAVELEK a kol., 2004). Pomocí obrazové analýzy je možno nejenom některé položky genofondu odlišit, ale zároveň je rozdělit do charakterizačních skupin, ohodnocených bodovou stupnicí 9 – 1.

Při tvorbě core kolekce se nejdříve analyzují pasportní deskriptory, zejména ACCENUMB – ECN jako jedinečný „identifikátor“ genetického zdroje a dále pak ACCENAME – název genotypu a ORIGCTY – stát původu, které jsou důležité pro detekci duplicit. Dále se analyzují popisné deskriptory, především deskriptory pro morfologické znaky, biologické a výnosové charakteristiky.

U každého genotypu je pořizována obrazová dokumentace zahrnující vegetativní a generativní části rostliny, která bude sloužit k odlišení, respektive potvrzení shodnosti duplicitních a multiplicitních genotypů, zařazených v původní databázi. Zároveň se u této databáze počítá s možností vyhledávání genotypů dle zadaných parametrů morfologických znaků ve shodě s klasifikátorem Inu.

### Výsledky a diskuse

V roce 2004 bylo programem UNISTAT zhodnoceno prvních 340 genotypů starších i současných odrůd (X13).

Analýzou pasportních deskriptorů ACCENAME a ORGCTY bylo identifikováno 5 duplikačních skupin. Tyto duplikační skupiny byly současně podrobeny obrazové analýze pro prokázání, respektive nepotvrzení shody u genotypů se shodným názvem a státem původu. U duplikací, které prokáží shodu jak v pasportních deskriptorech, tak v parametrech obrazové analýzy budou aplikovány metody molekulární biologie, zejména analýza DNA a teprve na základě tohoto komplexního hodnocení bude přistoupeno k redukci počtu genotypů v původní kolekci a tvorbě prototypové core kolekce.

Na základě hierarchické shlukové analýzy, Euklidovy metody a tabulky průměrů byly genotypy rozděleny do 40 shluků – každý shluk je jedinečný, odlišný od ostatních. Např. mezi shluky s největší četností genotypů patří shluk č. 7, ve kterém je zahrnuto 78 genotypů. Jsou to argentinské, uruguayské a americké olejné lny s dobrou odolností proti poléhání, velkým modrým květem s kruhovitým tvarem koruny, modrými prašníky, nitkami a čnělkou na bázi, s nepukavými nebo středně pukavými tobolkami.

### Závěr

1. V práci jsou uvedeny postupné kroky ve směru: analýza pasportních deskriptorů – analýza popisných deskriptorů – obrazová analýza – identifikace duplikací – shluková analýza, vedoucí k získání vstupních dat pro redukci původní kolekce rodu *Linum* a tvorby prototypové core kolekce.
2. V roce 2004 bylo shlukovou analýzou zhodnoceno prvních 340 položek X13, které byly rozděleny do 40 jedinečných shluků.
3. Každý shluk je charakterizován pomocí pasportních a popisných deskriptorů.
4. Bylo identifikováno 5 duplikačních skupin.
5. Ke skutečné redukci kolekce bude přistoupeno až po další podrobné analýze dat, která získáme zhodnocením výnosových, biologických charakteristik (rezistence k chorobám) a molekulární analýzy.

### Literatura

1. BRINDZA, J. - NOŽKOVÁ, J. - GAŽO, J. - POPÍK, M.: Genotypdata *Linum*. Developing the Specific Databases for Evidence and Evaluation of the Genetic Resources of the Linen (*Linum spp*) – poster. Proceedings of the Second Global Workshop „Bast Plants in the New Millennium“, 3 – 6 June, 2001, Borovets, Bulgaria, p. 161 - 163
2. MAGGIONI, L. - PAVELEK, M. - SOEST van L.J.M. - LIPMAN, E., compilers 2002: Flax genetic Resources in Europe. Ad hoc meeting, 7 – 8 December 2001, Prague, Czech Republic. International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy
3. PAVELEK, M. - FABEROVÁ, I.: Klasifikátor Descriptor List *Linum usitatissimum* L., ČRGZ, Agritec s.r.o. Šumperk, VÚRV Praha – Ruzyně, v tisku
4. PAVELEK, M. - TEJKLOVÁ, E. - HORÁČEK, J.: Flax National Collection, International Flax Data Base and Breeding of Flax, Linseed and both types in the Czech Republic. In: Proceedings of the Second Global Workshop „Bast Plants in the New Millennium“, 3 – 6 June, Borovets, Bulgaria, 2001, p. 64 - 78
5. PAVELEK, M. a kol.: Zvyšování konkurenceschopnosti odrůd Inu (*Linum usitatissimum* L.) a diverzifikace jejich užití šlechtěním klasickými a biotechnologickými postupy, Závěrečná zpráva projektu NAZV QE 1123, 2004
6. UPOV – FLAX (*Linum usitatissimum* L.): International Union for the Protection of new Varieties of Plants. Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability, Genève, 1980, 1994, 20 p.

*Příspěvek byl vypracován za podpory projektu MSM 2678424601*

Adresa autora:

Matysová Bohumila, Pavelek Martin, Vinklárková Petra

AGRITEC, Research, Breeding and Services Ltd., Zemedelska 16, CZ- 787 01 Šumperk, Czech Republic

## ŠTÚDIUM A VYUŽITIE DIVORASTÚCICH PRÍBUZNÝCH DRUHOV RASTLÍN STUDY AND EXPLOITATION OF CROP WILD RELATIVES

Jarmila DROBNÁ

*Crop improvement through plant breeding critically depends on crop genetic resources. Pests, pathogens and climate evolve and change, so that the need of diverse parental material continually grows. The screening programs aimed at identifying new sources of resistance and tolerance should include a wide range of wild and improved genetic resources, including related and unrelated species. Interest in the conservation and use of wild relatives of cultivated plants has increased considerably in recent years and is recognised as one of the priority activities of the Leipzig Global Plan of Action. Wild relatives have contributed to the improvement of most crop plants and are used mostly as sources of desirable genes as well as in research relating to crop improvement.*

*Key words: crop wild relatives, conservation, exploitation*

### Úvod

Meniace sa podmienky prostredia a výraznejší tlak škodlivých činiteľov, spôsobené klimatickými zmenami, si vyžadujú neustále zlepšovanie a šľachtenie plodín zameraných hlavne na tvorbu odrôd s vyššou toleranciou k biotickým a abiotickým faktorom. SMALE et al., (2001) uvádzajú, že nové odrody sú rezistentné k biologickým stresom v priemere 5 rokov, zatiaľ čo vyšľachtenie novej odrody môže trvať 8-11 rokov. Škodcovia, patogény a klíma sa vyvíjajú a menia, čím vzniká potreba získavať stále nové šľachtiteľské materiály a genetické zdroje so žiaducimi znakmi.

Významným zdrojom nových génov a vlastností sú materiály uchovávané v génových bankách. Tieto sú kategorizované na šľachtené odrody, krajové odrody, divorastúce príbuzné druhy a šľachtiteľské materiály. Šľachtené odrody sa využívajú ako východiskový materiál zvlášť pri tvorbe vysokoúrodných odrôd s lepšími kvalitatívnymi vlastnosťami. Krajové odrody, prispôbené nepriaznivým podmienkam prostredia a divorastúce druhy sú v šľachtení označované ako zdroj rezistencie k chorobám a škodcom a tolerance k nepriaznivým abiotickým faktorom.

Pri využívaní divorastúcich druhov konvenčným šľachtením vznikajú praktické problémy spôsobené bariérami medzi genetickým materiálom. Všeobecne je potrebné vynaložiť značné úsilie pri transformácii vhodných génov do finálnej odrody, vyžadujú sa cytologické expertízy a uchovávanie embryí. Pre priame kríženie sú vhodné len niektoré príbuzné druhy, patriace do primárneho genofondu.

Prieskum u užívateľov kolekcie pšenice U.S. NPGS ukázal, že krajové odrody a divorastúce príbuzné druhy predstavovali len malé percento materiálov použitých do kríženia, pričom viac boli vyhľadávané pre znaky rezistencie ako pre úrodový potenciál (SMALE et al., 2001). Naproti tomu KULEŠOV (cit. TAYLOR a QUESENBERRY, 1996) uvádza na vzorke 54 ruských odrôd d'ateliny ľúcej, že až 68,5 % z nich vzniklo z krajových odrôd, 9,2 % z divorastúcich populácií, 16,6 % zo starých ruských odrôd a 5,5 % bolo vyšľachtených zo zahraničných odrôd.

Záujem o uchovávanie divorastúcich príbuzných druhov pestovaných plodín v posledných rokoch významne vzrástol. Príbuzné divorastúce druhy prispeli k zlepšeniu viacerých plodín a sú v šľachtení a výskume využívané ako zdroj vhodných génov. Vzhľadom na rozširujúce sa informácie o génoch kontrolujúcich prospešné znaky pri divorastúcich druhoch, zdokonalené metódy kríženia druhov z rôznych genofondov, pokroky v molekulárnych metódach a zvyšujúci sa počet položiek divorastúcich druhov v génových bankách sa očakáva, že využívanie divorastúcich príbuzných druhov v šľachtiteľských programoch sa bude neustále zvyšovať (HAJJAR, HODGKIN, 2005).

Na medzinárodnej konferencii venovanej uchovávaniu a využívaniu divorastúcich príbuzných druhov pestovaných plodín, ktorá sa konala v septembri 2005 na Sicílii, bolo prezentovaných viacero príspevkov s touto problematikou. SCHOLZ et al. (2005) využili ako potenciálny zdroj nových génov pre šľachtenie jačmeňa divorastúci druh *Hordeum bulbosum* L., ktorý má množstvo užitočných vlastností vrátane rezistencie k biotickým a abiotickým stresom. Bariéry v krížení medzi *H. bulbosum* a *H. vulgare* boli prekonané využitím embryonálnych techník. Do pestovaného jačmeňa boli transformované gény rezistencie k BYDV, hrdzi a múčnatke. Divorastúca dvojrznová pšenica, *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* a diploidné druhy *Aegilops* sú významným zdrojom rezistencie k rôznym chorobám pšenice. Prenos génov z týchto divorastúcich obilnín do pestovanej pšenice závisí od ich príbuznosti k pšenici. *Aegilops sharonensis* je blízky príbuzný druh pšenice a potenciálny donor užitočných génov pre jej zlepšenie. Hodnotením 60 populácií bola pri niektorých zistená vysoká frekvencia rezistencie k hrdzi listovej a hrdzi plevovej (EZRATI et al., 2005). LINGA et al., (2005) zistili vysokú genetickú variabilitu medzi odrodami cícera a ich divorastúcimi príbuznými druhmi, ktorá môže byť efektívne využitá pre genetické mapovanie krížencov medzi odrodami a divorastúcimi druhmi a na introgresiu rezistencie k chorobám a škodcom do pestovaných genotypov.

Európsky kontinent je bohatý na divorastúci genofond mnohých druhov rastlín vrátane obilnín, strukovín, ovocných drevín, zeleniny, aromatických a liečivých rastlín, krmovín atď. Flóra Európy a oblasti Stredozemného mora predstavuje zo 77 % divorastúce príbuzné druhy a iné využívané druhy, to znamená že

tri štvrtiny rastlinných druhov v regióne má pre ľudstvo súčasné alebo potenciálne využitie. Heywood a Zohary zostavili Katalóg divorastúcich príbuzných druhov pestovaných plodín pochádzajúcich z Európy, ktorý poskytuje prehľad divorastúcich genetických zdrojov. V katalógu sú spomenuté druhy a poddruhy patriace ku skupinám pestovaných plodín, ktoré rastú v Európe a majú na tomto kontinente divorastúce príbuzné druhy. Celkový počet ekonomicky významných divorastúcich príbuzných druhov uverejnených v katalógu predstavuje viac ako 200 taxónov (HEYWOOD, 1999).

Viacere odrody tráv a krmovín pochádzajú z pôvodných divých foriem. Príkladom je i česká odroda ranostaja pestrého Eroza, ktorá bola vyšľachtená vo VÚP Troubsko z divjej flóry s následným výberom. CROCHEMORE a kol. (1998) uvádzajú, že divé populácie *Medicago sativa* a *M. falcata* reprezentujú obrovský rezervoár variability pre budúce šľachtenie týchto druhov.

Taktiež rod *Trifolium* sa vyznačuje veľkou druhovou variabilitou, ktorá je dosiaľ v šľachtiteľskej práci veľmi málo využívaná. Divorastúce d'ateliny sa vyznačujú dlhšou trvácnosťou ako kultúrne a sú zimuvzdornejšie. ANIKEJENKO (cit. MUCHINA a STANKEVIČ, 1993) zistil, že skoré divorastúce formy boli v porovnaní so skorými kultúrnymi formami charakteristické vyšším obsahom sušiny, bielkovín, vlákniny a vápnika. Pre medzidruhová hybridizáciu s d'atelinou lúčnou by sa mohli využiť z viacročných druhov *Trifolium medium* a *Trifolium alpestre*. Podľa MERKERA (cit. ČAPURIN, 1989) bol takouto hybridizáciou získaný východiskový materiál, vyznačujúci sa vysokou zimuvzdornosťou, trvácnosťou a stabilne vysokou úrodou zelenej hmoty.

V rámci štúdia genetických zdrojov krmovín boli v rokoch 2002-2005 na experimentálnej stanici VÚRV Piešťany hodnotené divorastúce populácie d'ateliny lúčnej (*Trifolium pratense* L.) a lucerny siatej (*Medicago sativa* L.). Divorastúce populácie d'ateliny lúčnej boli charakteristické rozložitým tvarom trsu a tenšími plazivými byľami, pričom tento habitus bol spojený s vyšším percentom prežívajúcich rastlín v roku sejby (DROBNÁ, 2005). Hodnotením divorastúcich populácií lucerny siatej sa ukázalo, že viacere genotypy sa vyznačovali dobrým úrodovým potenciálom, ale najvýraznejšie rozdiely v porovnaní s kontrolnými odrodami sa prejavili v celkovom zdravotnom stave a percente prežívajúcich rastlín (DROBNÁ, HAUPTVOGEL, 2005).

## Záver

Potreba uchovávanania a trvalého využívania divorastúcich príbuzných druhov pestovaných plodín je zdôraznená Dohovorom o biologickej diverzite, Agendou 21, Globálnym plánom akcií a inými rozhodujúcimi medzinárodnými dokumentmi. Medzinárodné aktivity a iniciatívy v oblasti divorastúcich príbuzných druhov smerujú k propagácii významu divorastúcich druhov so spoločensko-ekonomickou hodnotou, k vytvoreniu informačného systému a prehľadu o uchovávaných druhoch, snahou je vybudovať monitoring ohrozených druhov. Dôležitým cieľom je zhodnotiť a vytvoriť štandardné metódy pre *in situ* a *ex situ* uchovávanie a posilniť využívanie divorastúcich a menej využívaných druhov rastlín.

## Literatúra

1. CRÓCHEMORE, M.L. a kol.: Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. *Agronomie*, 18, 1998, s. 79-94.
2. ČAPURIN, V.F.: Napravlenija i zadači selekcii po kormovym kul'turam v Švecii. In: Mobilizacija mirovych rastitel'nyh resursov. Sbor. nauč. trudov, 126, Leningrad: VIR, 1989, s. 46-52.
3. DROBNÁ, J.: Hodnotenie divorastúcich populácií d'ateliny lúčnej (*Trifolium pratense* L.) In: Hodnotenie genetických zdrojov rastlín : Zborník z 2. odborného seminára, Piešťany: VÚRV, 2005, s. 154-155. ISBN 80-88790-38-7.
4. DROBNÁ, J. - HAUPTVOGEL, P.: Collecting and evaluation of wild *Medicago* species. First Internat. Conf. on Crop Wild Relative Conservat. And Use. Book of Abstracts. Univ. of Birmingham, 2005, s. 108.
5. EZRATI, S. et al: Molecular and phytopathological characterization of natural populations of *Aegilops sharonensis* in Israel. First Internat. Conf. on Crop Wild Relative Conservat. And Use. Book of Abstracts. Univ. of Birmingham, 2005, s. 109.
6. HAJJAR, R. - HODGKIN, T: Using crop wild relatives for crop improvement: trends and perspectives. First Internat. Conf. on Crop Wild Relative Conservat. And Use. Book of Abstracts. Univ. of Birmingham, 2005, s. 97.
7. HEYWOOD, V.: Conservation of the wild relatives of native European crops. Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, 1999, s. 146-147.
8. LINGA et al.: RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and wild species. First Internat. Conf. on Crop Wild Relative Conservat. And Use. Book of Abstracts. Univ. of Birmingham, 2005, s. 110.
9. MUCHINA, N. A. - STANKEVIČ, A. K.: Kul'turnaja flora. Mnogoletnije bobovyje travy (Klever, Ljadvenec). Moskva, Kolos, 1993, 334 s.
10. SCHOLZ, M. et al.: The secondary gene pool of *Hordeum* as gene donor for crop improvement. First Internat. Conf. on Crop Wild Relative Conservat. And Use. Book of Abstracts. Univ. of Birmingham, 2005, s. 97.
11. SMALE, M. et al.: The demand for crop genetic resources: International use of the national plant germplasm system. EPTD Discussion Paper No. 82. IFPRI USA, IPGRI Italy, 2001, 33 s.
12. TAYLOR, N.L. - QUESENBERRY, K.H.: Red clover science. Kluwer Acad. Publ., London, 1996, 226 s.

Adresa autora:

Ing. Jarmila Drobna, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, e-mail: drobna@vurv.sk

## PODMIENKY POUŽITIA ANALÝZY ROZPTYLU V HODNOTENÍ GENETICKÝCH ZDROJOV JAČMEŇA EVALUATION OF CRITERIAS IN ANALYSIS OF VARIANCE OF THE BARLEY GENETIC RESOURCES

Mária ŽÁKOVÁ - Michaela BENKOVÁ

*Analysis variance is the most widespread method of evaluation in genetic resources. This paper should facilitate and help the decision for the correct use of the analysis of variance and describes possibilities for its application for evaluation of barley genetic resources. Analyses were obtained by Statgraphic and SPSS program. We analysed yield, plant height, weigh of 1000 grains, vegetation period-sowing/full maturity, lodging, resistance of diseases (Pyrenophora teres and Blumeria graminis).*

*Key words: analysis variance, covariance analysis, barley, genetic resources, Hordeum vulgare*

### Úvod

Analýza rozptylu (AR), definovaná Fisherom sa považuje za univerzálnu metódu pre štatistické hodnotenie a zobecnenie výsledkov poľných pokusov (1). Avšak zdanlivo jednoznačné riešenie, ktoré poskytuje štatistický software, ako hovoria spomenutí autori, môže priniesť aj isté rozpaky pri získaní spoľahlivých výsledkov. Pri hodnotení pokusov analýzou rozptylu je dôležitým predpokladom okrem normálneho rozdelenia aj homogenita rozptylov vo vybraných súboroch. Vlastnému výpočtu by preto malo predchádzať testovanie týchto podmienok. Cieľom práce bolo štatisticky zhodnotiť a posúdiť podmienky použitia AR pri hodnotení genetických zdrojov jačmeňa.

### Metóda

Sledovaný súbor pozostával zo 106 genetických zdrojov jačmeňa slovenského a českého pôvodu, ktoré boli rozdelené do 6 období (s rôznym počtom odrôd) v závislosti od vzniku odrody (1900-2002). Hodnotili sme znaky úroda, výška rastliny, vegetačná doba (VDOB), hmotnosť 1000 zrn (HTZ), odolnosť voči poliehaniu, múčnatke trávovej a hnedej škvrnitosti jačmeňa počas rokov 2003-2005. Štatistickú analýzu sme uskutočnili Statgraphicom a SPSS.

### Výsledky a diskusia

Na sledovanie homogenity rozptylov sme použili Bartlettov test. Podľa výsledku testu nebola zamietnutá nulová hypotéza  $H_0$  o nepreukazne rozdielných hodnotách rozptylov pri HTZ, VDOB a odolnosti voči múčnatke trávovej (*B. graminis*), tab.1, teda podmienka bezchybného podrobnejšieho vyhodnotenia analýzy rozptylu je splnená pre hodnoty v jednotlivých obdobiach vo výške, úrode, poliehaní a odolnosti voči hnedej škvrnitosti jačmeňa (*P. teres*).

**Tabuľka 1: Výsledok Bartlettovho testu o rovnosti rozptylov v sledovaných znakoch pre jednotlivé obdobia**

znaky	Bartlettov test	A
HTZ	1,00023	0,9999
VDOB	1,02237	0,2329
výška	1,0512	0,008
úroda	1,0723	0,0006
odolnosť voči poliehaniu	1,10544	0,0000
odolnosť voči <i>B.graminis</i>	1,00837	0,7662
odolnosť voči <i>P.teres</i>	1,08568	0,0001

Testovanie normality ukázalo, že dáta odolnosti voči poliehaniu a *P. teres* nevykazujú normálne rozdelenie a preto sa použitie analýzy variancie nedoporučuje. Vhodnou metódou je Kruskal-Wallisov test, ktorý potvrdil štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými obdobiach v obidvoch znakoch. Na základe výsledkov sme postupovali ďalej vo výpočtoch a AR aplikovali len na znaky úroda a výška rastliny.

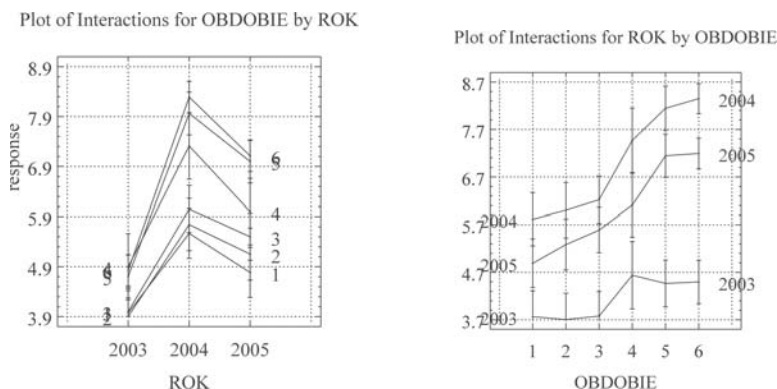
**Tabuľka 2: Priemerné štvorce, F hodnoty a stupne voľnosti z analýzy rozptylu pre úrodu a výšku**

zdroj premenlivosti	d.f.	Úroda		výška	
		MS	F test	MS	F test
rok	2	131.86942	155.127**	43941.06	10.661**
obdobie	5	44.86942	51.971**	321391.63	77.973**
obdobie x rok	10	3.5156048	4.136**	5619.0853	1.363
chyba	300	0.8500726		4121.8419	

\*\* štatisticky významné, hladina významnosti  $\alpha=0.01$



Z tabuľky č.2. vidíme, že v úrodách a vo výške sú významné rozdiely v jednotlivých rokoch a obdobiach. Ďalej, že hladina významnosti interakcie roky a obdobia pre úrodu je 0,0001 (menšie ako 0,05), takže môžeme povedať, že medzi týmito dvoma faktormi existuje určitá interakcia, obr. 1.



Obr. 1: Interakcie premennej úrody pre rok a obdobie

Mnohonásobné porovnanie priemerov období v znakov úroda a výška

Pre podrobnejšie vyhodnotenie analýzy rozptylu, pre mnohonásobné porovnanie priemerov nám Statgraphic ponúka niekoľko metód, ktoré sa vyznačujú rozdielnou tzv. „silou testu“, to znamená rozdielnou hodnotou výpočtu minimálnej preukaznej diferencie. V podstate závisí na nás, pre ktorú metódu sa rozhodneme, či chceme dosiahnuť väčší počet preukazných rozdielov medzi priermi alebo zvolíme prísnejšiu metódu. Sú to LSD metóda, Tukeyova, Sheffeho a Bonferroniho metóda, tab.3. Z ponúkaných možností sme si zvolili strednú hodnotu diferencie, Tukeyov test, tab.4.

Tabuľka 3: Hodnoty minimálnej preukaznej diferencie d pre úrodu medzi priermi I. a IV. obdobia

metóda	d hodnota pre $\alpha=0,05$	d hodnota pre $\alpha=0,01$
LSD	2,134	2,81155
Tukey	3,11025	3,6818
Bonferroni	3,20878	3,72881
Sheffe	3,63235	4,25399

Tabuľka 4: Homogénne skupiny úrod a výšky rastliny jednotlivých období GZR jačmeňa, Tukeyov test

obdobie	Úroda		výška	
	priemer	homogénne skupiny	priemer	homogénne skupiny
I.	4.8214286	X	891.76190	XX
II.	4.9000000	X	916.71795	X
III.	5.1810417	X	878.81250	XX
IV.	6.0716667	X	859.83333	X
V.	6.5735088	XX	790.91228	X
VI.	6.7750926	X	735.36111	X

Vidíme, že pre jednotlivé obdobia sú významné rozdiely v úrode odrôd, ako aj vo výške rastlín, že skupiny z období I.-III. vykazujú menšiu úrodu ako odrody zo skupín IV.-VI. Medzi skupinami I.- III. nie sú štatisticky preukazné rozdiely v úrode, tak ako aj medzi skupinami z obdobia IV.-V. a V.-VI. Skupiny z období I.-III. majú vyššie rastliny ako odrody zo skupín IV.-VI. Skupina odrôd z obdobia IV. je akoby medzníkom medzi nimi, je štatisticky odlišná od odrôd staršieho (I.-III.), ako aj novšieho (V.-VI.) obdobia.

**Záver**

Pri spracovaní genotypov jarného jačmeňa sme poukázali na niektoré aspekty, ktoré sú dôležité pri použití analýzy rozptylu a hodnotení výsledkov. Pre ďalšie spracovanie týchto dát doporučujeme viacrozmerné štatistické metódy, ako napr. PCA analýzu, zhlukovú analýzu, prípadne faktorovú, kde môžeme zobrazit' aj akési priestorové usporiadanie genotypov.

**Literatúra**

- BRABEC V.- KÉBA B.: Posouzení kritérií ovlivňujících využití výsledku analýzy rozptylu, Sborník referátu XV.letní školy biometrie, Lednice, 2.9-6.9.2002, 291-300
- Design and analysis of evaluation trials of genetic resources collections, IPGRI Technical Bulletin No. 4, Rome, 2001, s 53

Praca bola vypracovaná v Rámci Výskumnej úlohy Ochrana genetických zdrojov rastlín a jej integrácia s Európskym kooperatívnym programom a Ekologizácia a ekonomická racionalizácia primárnej rastlinnej produkcie.

Adresa autorov:

Mária Žáková, Michaela Benková: Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

## CHARAKTERIZÁCIA GENOTYPOV JAČMEŇA VIACROZMERNOU ANALÝZOU MULTIVARIATION CHARACTERIZATION ON SPRING BARLEY GENOTYPES

Michaela BENKOVÁ - Mária ŽÁKOVÁ – Jozef GUBIŠ

*On experimental basis of RIPP in 2003-2005 a set of 106 spring barley genetic resources of Slovak origin and former Czechoslovakia origin was tested for characterization variability. The tested trait (vegetation period, plant height, 1000 grains weight, yield in t. ha<sup>-1</sup> and resistance to lodging, resistance to *Blumeria graminis* and *Pyrenophora teres*) were evaluated using multivariate methods by variances and PCA analyses. Relations between the traits and characteristics were expressed in correlation coefficients. The variance analysis showed on strong effect of the year and genotypes on traits. PCA analysis with the selected morphological and agronomic data revealed the existence of genetic variability among spring barley accessions. PCA analysis with five selected characters classified the accessions into two big groups and one small group. Study of matrix interrelationship between different variables showed that 1000 grains weight is greatly correlated to vegetation period and resistance to lodging to resistance to *Blumeria graminis*. Negative dependence was also found between the yield and weight of 1000 grains and plant height.*

*Key words: *Hordeum vulgare*, spring barley, variance, correlation, PCA analysis*

### Úvod

Hodnotenie fenotypovej variability je prínosom pre súčasné moderné šľachtenie jačmeňa. Porovnanie starších a súčasných odrôd jarného jačmeňa z pohľadu vybraných agro-morfologických znakov nám môže poskytnúť obraz o trende vývoja jarného jačmeňa na našom území za určité časové obdobie. Analýza variácie a analýza hlavných komponentov s vybranými agro-morfologickými znakmi poukazuje na existenciu variability medzi genotypmi. Cieľom práce bola charakterizácia vybraných agro-morfologických znakov súčasného a historického jarného jačmeňa československého, českého a slovenského pôvodu použitím viacrozmerných štatistických analýz.

### Materiál a metódy

Pokusným stanovišťom hodnoteného genofondu jarného jačmeňa bolo v roku 2003 pokusné pole v areáli VÚRV Piešťany a v roku 2004 a 2005 lokalita Borovce. Zhromaždený súbor 106 genotypov jarného jačmeňa sme rozdelili do časových období vývoja selekcie jačmeňa, ktoré boli ovplyvnené rozhodujúcimi donormi (LEKEŠ, 1997): *genotypy z rokov 1900-1926* (krajové hanácke populácie) s počtom 14; *genotypy z rokov 1933 - 38* (obdobie Valtického jačmeňa) – 13; *genotypy z rokov 1946 - 1964* (odrody vzniknuté po roku 1946) – 16; *genotypy z rokov 1965 - 1971* (obdobie Diamantu) – 8; *genotypy z rokov 1972 - 1985* (Diamantova rada) – 19 a *genotypy z rokov 1986 - doteraz* (krátkosteblové odrody), s počtom 36. Súbor genotypov bol vysiaty v rokoch 2003-2004 do maloparcelkových pokusov, v troch opakovaniach v znáhodnených blokoch na parcelky veľkosti 2,5 m<sup>2</sup>. Hodnotil sa z hľadiska 7 agro-morfologických znakov a vlastností podľa príslušného klasifikátora (IPGRI, 1994): výška rastliny (mm), hmotnosť 1000 zrn (HTZ) v g, vegetačná doba (VDOB)-dni, úroda v t.ha<sup>-1</sup> a odolnosť voči poliehaniu (9-1 bod), odolnosť voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis*) a odolnosť voči hnedej škvrnitosti (*Pyrenophora teres*). Výsledky boli zhodnotené viacrozmernými štatistickými analýzami, ktoré sú súčasťou štatistických balíkov SPSS a STATGRAPHIC. Jedným z hlavných cieľov analýzy PCA je redukcia pôvodného viacrozmerného priestoru pozorovaní do priestorov hlavných komponentov menšej dimenzie tak, aby nedošlo k podstatnej strate informácie o celkovom rozptyle premenných. Hlavné komponenty môžu slúžiť na podrobnejšiu analýzu štruktúry vzťahov medzi pozorovanými premennými.

### Výsledky a diskusia

Variabilitu agro-morfologických znakov a vlastností sme sledovali v celom súbore, ako aj v rámci jednotlivých období vzniku. Analýza rozptylu celého súboru ukázala vysokopreukazný vplyv genotypu a ročníka na všetky sledované znaky (tab.1). Rok 2003 bol veľmi suchý, čo sa prejavilo na predĺžení vegetačnej doby a veľmi nízkej úrode všetkých skúšaných genotypov. Pokus musel byť zavlažovaný, čo napomohlo k získaniu dostatočnej hmotnosti 1000 zrn, ktorá bola zo všetkých hodnotených rokov najvyššia. V roku 2004 boli v čase vzchádzania vysoké zrážky, ktoré vystriedalo opäť sucho. Tento stav trval až do začiatku mliečnej zrelosti, kedy zrážky a teploty zodpovedali normálu. Tento rok bol vhodnejší pre pestovanie jačmeňa, čo sa prejavilo aj na vyššej úrode a lepšej odolnosti voči chorobám. V roku 2005 vysoké zrážky v čase vzchádzania zabezpečili rýchly rast listovej hmoty. Suché a teplé obdobie v mesiaci máj a jún spôsobilo urýchlenie kvitnutia a dozrievania, čoho následkom bolo skrátenie vegetačnej doby pri všetkých genotypoch.

Korelačnou analýzou sme zistili priamu stredne silnú závislosť medzi znakmi HTZ a vegetačná doba, odolnosť voči poliehaniu a odolnosť voči múčnatke. Nepriama stredne silná závislosť bola zistená medzi znakmi úroda a HTZ, ako aj medzi úrodou a výškou rastliny (tab.2).

**Tabuľka 1: Analýza variancie pre vybrané agro-morfologické znaky a vlastnosti**

Znaky	F-test	
	Genotyp	Roky
Dĺžka vegetačnej doby (dni)	1,804**	211,24**
Výška rastliny (mm)	6,505**	12,66**
HTZ (g)	2,804**	628,03**
Úroda (t.ha <sup>-1</sup> )	3,862**	232,39**
Poliehanie (9-1 bod)	1,802**	134,46**
Múčnatka (9-1bod)	3,534**	93,06**
Hnedá škvrnitosť (9-1bod)	1,733**	85,16**

Významnosť: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01

**Tabuľka 2: Vybrané korelačné koeficienty medzi hodnotenými znakmi súboru**

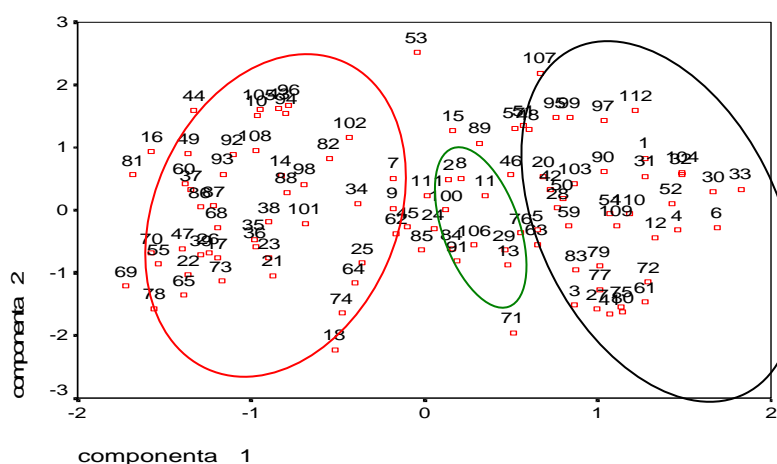
	HTZ	Veget. doba	Výška rastliny	Úroda	Poliehanie	Odol. voči múč.
	(g)	(dni)	(mm)	(t.ha <sup>-1</sup> )	(9-1b)	(9-1b)
Veg. doba	0,38**					
Výška rastliny	-0,02	0,16**				
Úroda	-0,44**	-0,26**	-0,38**			
Poliehanie	0,41**	-0,15**	-0,34**	-0,03		
Odolnosť voči múčnatke	0,51**	0,25**	-0,12*	-0,06	0,29**	
Odolnosť voči hnejdej škvrnitosti	0,15**	0,39**	0,26**	-0,14*	-0,30**	0,03

Významnosť: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01

Analýzou PCA sme zistili, že variabilita a znakov a vlastností celého súboru je sústredená do troch

komponentov, ktoré tvoria 72,67% celkovej variability. Podobné výsledky sledovania variability agro-morfologických znakov jačmeňa PCA analýzou dosiahol ATANASSOV (2001). Z obr. č.1 vidíme, že sledovaná skupina odrôd sa rozdelila hlavnými dvoma komponentami na základe podobnosti na dve veľké skupiny, ktoré tvoria odrody z obdobia I.-III. (pôvod genotypov v rokoch 1900-1964) a V.-VI. (pôvod genotypov v rokoch 1972-2002).

**Obr. 1: Rozmiestnenie 106 sledovaných genotypov na prvých dvoch hlavných komponentoch**



Skupina IV. je akýmsi medzníkom medzi týmito skupinami. Toto IV.obdobie tzv. obdobie vzniku Diamantu, sa líši od ostatných v znakoch úroda zrna, výška rastliny a odolnosť voči poliehaniu, ktorá samozrejme súvisí s výškou rastliny. Výška rastliny v IV. skupine je podobná výškam rastliny genotypov zoskupených do skupiny I.-III., avšak v úrode je to naopak, hodnotami sa približuje k obdobiám V.-VI. Súvisí to so zameraním šľachtenia na vysokú produktivnosť odrôd jačmeňa, ktoré ovplyvnilo vytvorenie a povolenie odrody „Diamant“. Samozrejme, že rozdelenie nie je 100%, lebo niektoré odrody z tretieho obdobia, ako Diosecký Sprinter, Slovenský kvalitný, Bohatýr, Čelechovický Hanácky, Branišovický vynosný a Ekonom sa zaradili svojimi hodnotami do druhej skupiny, čo spôsobili výkyvy v niektorých znakoch, individuálne vyššia úroda v porovnaní s celkovým priemerom prvej skupiny, alebo nižšia rastlina, prípadne vyššie HTZ. Zaujímavú skupinu tvorili genotypy, ktoré sa vymykali z usporiadania všetkých skupín a boli roztrúsené mimo zoskupenia. Boli to genotypy: Ekonom, Merkur a Diosecký Sprinter vzniknuté v treťom období, Opál a Koral z piateho obdobia a Novum zo šiesteho obdobia. Tieto genotypy sa líšili od všetkých nestálou úrodou, vegetačnou dobou a HTZ, zrejme ovplyvnenou klimatickými pomermi v skúšaných rokoch.

## Záver

Analýza hlavných komponentov s vybranými agro-morfologickými znakmi poukázala na existenciu veľkej variability medzi genotypmi. PCA analýza s 5 sledovanými znakmi, klasifikovala genotypy do dvoch skupín, ktoré odpovedajú skupinám genotypov z obdobia I.-III. a z obdobia V.-VI.

## Literatúra

1. ATANASSOV, P. et al.: Hordein polymorphism and variation of agromorphological traits in a collection of naked barley. In: Genetic Resources and Crop Evaluation, 2001, 48, s. 353-360
2. LEKEŠ, J.: Šľachtení obilovín na území Československa. Praha : Nakl. Brázda, 1997, s. 94 -96. ISBN 80-209-0271-6
3. WARD J. K.: Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. Am. Stat. Assoc. 1963, 58, s. 236-244  
Praca bola vypracovaná v rámci Výskumnej úlohy Ochrana genetických zdrojov rastlín a jej integrácia s Európskym kooperatívnym programom a Ekologizácia a ekonomická racionalizácia primárnej rastlinnej produkcie.

## ÚČINOK OSMOTICKÉHO STRESU NA RAST A VÝVIN KLÍČIACICH SEMIEN VYBRANÝCH KULTIVAROV SÓJE FAZUĽOVEJ (*Glycine max.* (L.) Merr.) EFFECT OF OSMOTIC STRESS ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF SEEDLING OF SELECTED CULTIVATES OF SOYBEAN (*Glycine max.* (L.) Merr.)

Angelika FILOVÁ – Marián BRESTIČ – Miroslav DOBRODENKA – Jozef ŠTEFANKA

*In laboratory hydroponic conditions with soybean genotypes the juvenile plants in phase V1 1. nodus first leaves were tested for their physiological responses to osmotic stress evoked by blocking the water uptake in roots by polyethylenglycol (PEG-6000). Results from the measurements relative water content, from accumulation proline in leaves and stem elongation rates show dominant role of metabolic changes signalization drought. The stress factor limited the growth of juvenile plants, especially content of water, free and dry weight. Osmotic stress caused free proline accumulation in young leaves. Between genotypes statistically significant differences were found. The use of model conditions allowed the elucidation of the tested responses. Maintenance of water content and turgor in the leaf tissues resulted from expression of morphological and physiological mechanisms of resistance and tolerance to drought different from that in mature plants which might be useful in the screening genotypes with different level of drought tolerance.*

*Key words: osmotic stress, soybean, polyethylenglycol, drought resistance, proline*

### Úvod

Pri súčasnom trende klimatických zmien a ich následkoch na živé organizmy sa zamýšľame nad typmi rastlín „budúcnosti“, s vlastnosťami, ktoré im umožnia odolávať environmentálnym zmenám najmä zasoleniu pôdy, suchu a extrémnym teplotám. Práve tieto stresy sú odlišné od všetkých ostatných abiotických stresov tým, že každý je elicitom špecifických odpovedí rastlín, ale zároveň aktivuje aj niektoré všeobecné reakcie. V súčasnosti sa objavujú molekulové základy odolnosti voči abiotickým stresom (ZHU, 2001; HASEGAWA et al., 2000). Objavujú sa práce, ktoré indukujú potrebu hodnotenia vlastností transgénnych rastlín z hľadiska ich fyziologických a metabolických vlastností vrátane ich produkčnej výkonnosti. To je výzva pre rastlinných fyziológov a biochemikov, ktorí musia nájsť selekčné kritériá pre hodnotenie rozdielov, identifikovať relatívne a náhodné znaky. Hľadajú sa možnosti hodnotenia genotypových rozdielov vo vlastnostiach, ktoré majú tesný vzťah k vyššej efektívnosti využitia vody už v skorých rastových štádiách.

Cieľom práce bolo charakterizovať aktivitu rastu mladých klíčiach rastlín pri osmotickom blokovaní príjmu vody polyetylén glykolom v živnom roztoku v hydroponii a determinovať fyziologické ukazovatele a ich použiteľnosť ako rýchleho skríningového kritéria pre hodnotenie suchovzdornosti genotypov.

### Materiál a metódy

Našu prácu sme uskutočnili s 5 genotypmi sóje fazuľovej cv. KRAJINKA (Juhoslávia), cv. VISION, cv. KORADA (Kanada), cv. HS098 a cv. HS105 (Slovensko) v laboratórnych hydroponických podmienkach. Klíčenie semien a následná kultivácia prebiehala v Reid - Yorkovom živnom roztoku, v špeciálne upravených 1 l nádobách po 5 klíčiach rastlinách v 9 opakovaníach, pri ožiarení  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fotosynteticky aktívnej radiácie, 12 hodinovej fotoperióde, s priemernými dennými a nočnými teplotami 24/18°C a s priemernou vlhkosťou vzduchu 45%. Testované boli mladé rastliny s podobnými morfológickými parametrami vo fenofáze V1 1.nóda vyvinutých prvých pravých nedelených listov prenesením do 300 ml kultivačných Erlenmayerových baniek. Pre simulovanie blokovania príjmu vody bol do koreňového prostredia aplikovaný roztok polyetylén glykolu (PEG-6000) s koncentráciou 5, 10, and 15 %. Merania boli realizované po 1-24-48 hodín po aplikácii roztoku, kedy bola meraná retardácia predĺžovacieho rastu stoniek (LER) ako prírastok v  $\text{mm.hod}^{-1}$ . Stav vody v listoch sa zisťoval gravimetricky z čerstvej, saturovanej a suchej hmotnosti segmentov listov a kalkuloval sa podľa vzťahu:  $\%RWC = 100 - (SW - FW / SW - DW)$ , kde SW je hmotnosť vzorky po nasýtení, FW hmotnosť čerstvej vzorky, DW hmotnosť sušiny.

Paralelne s obsahom vody bol meraný obsah voľného prolínu, ktorý bol stanovený kolorimetricky podľa BATES et al.(1973) vyjadrený v  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  FW.

### Výsledky a diskusia

Vplyv vodného stresu na funkčné prejavy rastlín nie je možné študovať v prirodzených podmienkach. Jedným z prostredí, kde môžeme navodiť osmotický stres je hydroponia, napríklad blokovaním príjmu vody pridaním osmotik do živného roztoku. Polyetylén glykol (PEG) je osmotikum, syntetická látka rozpustná vo vode s veľkou molekulovou hmotnosťou, ktorá je len ťažko prijímaná koreňmi rastlín. Preto jeho prídanie do koreňového prostredia intaktných fotosyntetizujúcich rastlín spôsobuje zablokovanie príjmu vody. Aplikácia rôznych koncentrácií PEG simuluje intenzitu vodného stresu. Reakciu na PEG možno považovať za rýchlu hydraulickú signalizáciu o zníženej prístupnosti vody, nakoľko už od prvých momentov jeho

pôsobenia sa príjem vody do rastliny znižuje až zastavuje. Na rozdiel od pôdneho sucha PEG účinkuje na celú koreňovú sústavu homogénne, bez možnosti úniku zo stresu, resp. metabolickej úpravy, napr. biosyntézy prolínu.

Pri hodnotení účinkov vodného stresu na kľúčiacie rastliny sóje vychádzame z predpokladu, že odpovede rastlín sa budú týkať predovšetkým inhibície rastu a inhibície akumulácie sušiny ako následku redukcie využitia vody, redukcie obsahu vody v orgánoch a zmeny hydratácie. V literatúre sa uvádzajú aj zmeny na metabolickej úrovni, ako je napr. tvorba osmoprotektantov, látok znižujúcich vodný potenciál bunkového roztoku (čo môže zvýšiť potenciálny príjem vody).

Sledovanie fyziologických ukazovateľov 5 odrôd sóje fazuľovej potvrdilo rozdiely v ich základných ukazovateľoch a to v obsahu vody, čerstvej a suchej hmotnosti. Signifikantné rozdiely boli medzi odrodami HS098 a VISION nepreukazné medzi HS105 a KRAJINKA, KORADA a HS 098. Ako je vidieť stresový faktor prítomný v živnom roztoku (PEG) ovplyvnil obsah vody v rastlinných orgánoch v závislosti na odrode rozdielne. Prejavila sa najmä rozdielna vododržujúca schopnosť, keď v rovnakých podmienkach znížili obsah vody najvýraznejšie juvenilné rastliny sóje genotypu KRAJINKA (-12,3%), HS105 a HS098 (-10,6 % a -9,9%), najmenej kanadské odrody KORADA a VISION (-5,3 a -2,7%).

Rovnako sa potvrdila výrazná genotypovo podmienená reakcia v raste. Na základe štatistického hodnotenia je preukazný rozdiel v dĺžke stoniek medzi genotypmi VISION – HS098, VISION- KRAJINKA, VISION – KORADA, HS098 – KORADA, a HS105 – KRAJINKA. Inhibičný účinok vodného stresu sa najvýraznejšie prejavil pri genotypu KRAJINKA, HS105, HS098, KORADA a najmenej pri odrode VISION. Genotypovo rozdielnu reakciu sme zistili v akumulácii suchej hmoty, ktorá výrazne klesala pri odrode KRAJINKA, HS098, KORADA, HS105 a napokon VISION. Za významný determinatívny znak tolerancie druhu voči suchu sa považuje akumulácia voľného prolínu, ktorého obsah sa pri dehydratácii zvyšuje niekoľkonásobne. Zvýšenú akumuláciu prolínu považujú niektorí autori za adaptačnú reakciu rastlín (LEWITT, 1980; BANDURSKA, 1991; BRESTIČ, OLŠOVSKÁ, 2001). Z našich experimentov vyplýva, že vodný stres výrazne ovplyvnil akumuláciu voľného prolínu oproti kontrolným vzorkám. Preukaznosť rozdielov sme potvrdili medzi VISION – HS098, VISION – HS105, VISION – KRAJINKA a HS098-KRAJINKA. Deficit vody spôsobil teda významné modifikácie a signifikantné rozdiely vo fyziologických a biochemických ukazovateľoch skúmaných genotypov sóje.

Adaptačný potenciál mladých rastlín je ťažšie determinovať ako pri dospelých rastlinách. Ich testovanie však môže priniesť nové informácie o skúmanom biologickom materiáli. Mladé intenzívne rastúce rastliny reagujú na vodný deficit odlišným spôsobom v porovnaní s dospelými. Realizujú menší počet mechanizmov a vlastností, ktoré sú súčasťou adaptačného potenciálu genotypu.

## **Literatúra**

1. BANDURSKA, H.: The effect of proline on nitrate reductase activity in water stressed barley leaves. In: Acta Physiol. Plant. 13, 1991, 3-11.
2. BATES, D.: Rapid determination of free proline for water-stress studies. In: Plant and soil, 39, 1973, p. 205-207.
3. BRESTIČ M. - OLŠOVSKÁ K.: Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. Nitra : VES SPU, 2001, ISBN 80-7137-902-6, 149 s.
4. HASEGAWA, P.M.: Plant cellular and molecular responses to high salinity. In: Annu Rev. Plant. Mol. Plant Physiol, 51, 2000, 463-499.
5. LEWITT, A.: Response of plant to environmental stress. In: Acad. Press. New York, 1980, 503p.
6. ZHU, J.K.: Cell signaling under salt, water and cold stresses. In: Current Opinion in Plant Biology, 4, 2001, 401-406p.

Experimentálne riešenie bolo podporované grantovou agentúrou AVT č.p. aAV/1109/2004 od ktorej získali autori finančné prostriedky.

---

Adresa autora:

Ing. Angelika Filová, PhD., Katedra fyziológie rastlín, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A Hlinku 2, Nitra 949 01, Slovensko, Angela.Filova@uniag.sk

## ÚLOHA PROLÍNU V OCHRANE BIOLOGICKÝCH PROCESOV RASTLÍN POČAS STRESU THE ROLE OF PROLINE IN PROTECTION OF PLANT BIOLOGICAL PROCESSES UNDER STRESS CONDITION

Marek KOVÁR – Miriam KÁDASI-HORÁKOVÁ

*Many organisms, including higher plants, accumulate free proline in response to environmental stress. Although various studies have focused on the ability of proline as a compatible osmolyte involved in osmotic adjustment, its specific role in stress protection is still unclear. In this brief study we indicate that proline accumulation is not just an osmoprotectant in stressed plants but has a unique functions in protection key biological processes as well as primary photochemical reaction, lipid bilayer membrane stabilisation, scavenger of free radicals and even as a source of energy, carbon and reverse nitrogen in poststress recovery.*

*Key words: proline, osmotic adjustment, photochemistry, membrane stability, environmental stress*

### Úvod

Environmentálne stresové situácie sú dôležitými faktormi limitujúcimi distribúciu rastlín a ich produktivitu. Rastliny sú do určitej miery schopné tolerovať účinok jednotlivých environmentálnych faktorov prostredníctvom prispôsobenia svojich metabolických procesov (HANSON, HITZ, 1982). Evolučne si osvojili celý rad krátkodobých, ako aj dlhodobých stratégií, ktorých úlohou je udržať homeostázu a tak intaktnú štruktúru rastliny. Adaptačné stratégie si rastlinné bunky realizujú simultánne alebo postupne. V prvom prípade je indukovaná syntéza predtým absentujúcich molekúl, s novými vlastnosťami, potrebnými pre normálny metabolizmus buniek počas stresových podmienok (napr. stresové proteíny) (BRAY, 1997). V druhom prípade koncentrácia intracelulárneho roztoku je optimalizovaná akumuláciou nízkomolekulárnych organických komponentov, s protekčnými a/alebo osmoregulačnými vlastnosťami (HARE et al., 1999), prostredníctvom procesu osmotického prispôsobenia. Úlohou oboch adaptačných reakcií je vyriešenie mnohých problémov, ktoré pre bunku prinášajú stresové podmienky.

Prolín (Pro) predstavuje dominantnú organickú molekulu, ktorá sa akumuluje v procese odpovedí rastlín na stres, ako sucho, zasolenie, sub- a super-optimálnu teplotu, UV-žiarenie atď. Vo vyšších rastlinách je Pro akumulovaný výsledkom *de novo* syntézy biosyntetickou dráhou z glutamátu cez  $\Delta^1$ -pyrolín-5-karboxylát (P5C) enzýmami P5C syntetáza (P5CS) a P5C reduktáza (P5CR) (ADAMS, FRANK, 1980).

Predpokladá sa, že Pro počas stresových podmienok plní úlohy osmoprotektanta (MORGAN, 1992). V súčasnosti existujú náznaky, že zohráva ďalšie úlohy, napr. ako protektant membránových štruktúr, zdrojom uhlíka a dusíka, detoxikačný komponent a pod. (podrobnejšie KUZNETSOV, SHEVYAKOVA, 1998 a tam uvedené citácie).

Cieľom práce je kvantifikovať niektoré unikátne vlastnosti Pro v ochrane biologických procesov počas sucha, ako príspevok k osmotickému prispôsobeniu, reguláciu prerozdelenia excitačnej energie v primárnych procesoch fotosyntézy, formovania superoxidových radikálov a udržania membránovej stability.

### Materiál a metódy

Rastliny jarného jačmeňa (*Hordeum vulgare* L., cv. Kompakt) boli hydroponicky pestované v Ried-Yorkovej roztoku v laboratórnych podmienkach. Dehydratácia dekapitovaného 3 listu bola indukovaná prirodzenou desikáciou počas 120 min v laboratórnych podmienkach v normálnej atmosfére. Listy pred desikáciou boli ovplyvnené 60 min inkubáciou v 10 ml roztoku L-prolínu (10, 20, 50 mmol dm<sup>-3</sup>) alebo deionizovanej vode (pH upravené na pH 7,0).

Relatívny obsah vody (RWC, %) bol hodnotený gravimetricky. Vodný ( $\psi_w$ , MPa) a osmotický potenciál ( $\psi_s$ , MPa) bol meraný psychrometricky (Wescor, Logan, Utah, USA). Kapacita pre osmotické prispôsobenie (OA, MPa) bola kalkulovaná podľa LUDLOW et al. (1983). Obsah voľného prolínu (Pro,  $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW) bol stanovený podľa BATES et al. (1973) spektrofotometricky ninhidrínovou metódou. Príspevok prolínu k OA bol hodnotený podľa MARTIN et al. (1993). Parametre fluorescencie boli merané po 30 min. adaptácii na tmu využitím MiniPam (Walz, Nemecko) podľa protokolu HORTON, HAGUE (1988) a OXBOROUGH, BAKER (1997). Membránová stabilita bola meraná konduktometricky podľa TRIPATHY et al. (2000). Izolácia chloroplastov z ovplyvnených listov bola uskutočnená podľa WIJK et al (1995). Koncentrácia chlorofylu bola stanovená podľa LICHTENTHALER (1987) a celkový proteín podľa BRADFORD (1976). Peroxidácia lipidov bola hodnotená meraním úrovne malondialdehydu (MDA) spektrofotometricky pri  $\lambda$  532 nm podľa HODGES et al. (1999). Celková aktivita fotosyntetického elektróntransportného reťazca bola hodnotená spektrofotometricky pri  $\lambda$  420 nm podľa TRIPATHY, MOHANTY (1980) s 1,5 mM ferikyanidom draselným ako akceptorom elektrónov.

### Výsledky a diskusia

Je všeobecne akceptované, že počas environmentálneho stresu dochádza k indukcii akumulácie Pro (HANSON, HITZ 1982). V našich experimentoch 120 min desikácia listu indukovala takmer 12 násobný nárast koncentrácie Pro (z 0,22 na 2,65  $\mu\text{mol g}^{-1}$  listu), pričom RWC poklesol na úroveň 69 % a  $\psi_w$  klesol z -0,73 na -1,54 MPa. Simultánne uskutočnenou kvantifikáciou kapacity pre OA sme zistili, že desikácia indukovala OA na úroveň 0,18 MPa. Mnohé literárne referencie ukazujú, že Pro počas sucha je významným osmoprotektantom,

schopným prispieť k udržaniu turgoru bunky (MORGAN, 1992). Naše výsledky však ukázali, že príspevok Pro k OA predstavuje len 5,3 %. Ukazuje to na skutočnosť, kapacita pre OA bola vyjadrená hlavne dôsledkom akumuláciou iných osmoticky aktívnych látok, pravdepodobne anorganického pôvodu, alebo rozpustných cukrov. Je potrebné zdôrazniť, že molekula Pro interaguje s jednotlivými intracelulárnymi makromolekulami a pomáha tak počas podmienok nízkeho vodného potenciálu udržať ich natívnu konformáciu. Táto vlastnosť je spôsobená vysokou rozpustnosťou molekuly Pro vo vode (SCHOBERT, TSCHESCHE, 1978).

Hypotetizuje sa, že Pro je schopný ochrániť primárne fotosyntetické reakcie pred stresom indukovaným poškodením. Prvým zistením bolo, že zvýšená akumulácia Pro ochraňuje kyslík vyvíjajúci komplex (OEC) fotosystému 2 (PAPAGEORGIOU et al., 1991). V našom experimente sme využijúc izolované chloroplasty z desikovaných listov ovplyvnených rôznou koncentráciou Pro zistili, že celková rýchlosť transportu elektrónov elektróntransportným reťazcom, je prolínom udržaná a je redukovaná s poklesom koncentrácie Pro. Ukazuje to na skutočnosť, že Pro je schopný eliminovať reaktívne formy O<sub>2</sub> (ROS) (ALIA et al., 2001), ktorých koncentrácia počas stresu narastá. Výsledkom akumulácie ROS je nárast peroxidácie lipidových komponentov membrán, čo sme pozorovali prostredníctvom akumulácie MDA, pričom exogénna aplikácia Pro významne redukovala peroxidáciu. Pritom bolo pozorované, že prolín je schopný stabilizovať vďaka svojim fyzikálnym vlastnostiam stabilitu fosfolipidových komponentov biologickej membrány (SARADHI et al., 1995).

Udržanie stability primárnych reakcií fotosyntézy sa potvrdilo aj kvantifikáciou maximálnej fotochemickej efektívnosti PSII (Fv/Fm). Desikácia indukovala 38 % pokles Fv/Fm, pričom aplikácia Pro tento efekt redukovala (50 mM Pro na úroveň 7,3 % redukcie). Pro je spojený s udržaním toku excitačnej energie do fotochemických procesov, čoho výsledkom je vyššia úroveň qP a F'v/F'm počas desikácie v Pro ovplyvnených listoch v porovnaní s kontrolným variantom. Tieto výsledky potvrdzujú pozorovania ALIA et al. (1995), ktorí pozorovali zvýšenie stability komplexov tylakoidnej membrány Pro v podmienkach osmotického stresu.

## **Záver**

Práca sumarizuje poznatky o protekčných úlohách Pro v metabolizme rastlinnej bunky v podmienkach stresu. Podáva niektoré dôkazy o priamom príspevku Pro v ochrane primárnych fotochemických reakcií, o regulácii a udržaní toku excitačnej energie do fotochemických procesov a tiež o schopnosti Pro odbúravať ROS, ktoré vznikajú v stresových situáciách a spôsobujú oxidačné poškodenie, hlavne proteínov a lipidových komponentov biologických membrán. Na základe týchto skutočností je možné hypotetizovať, že prolín neplní v bunke počas stresu len osmoprotekčné úlohy, ako sa donedávna predpokladalo, ale jeho fyziologicky významnou vlastnosťou je zapojenie do kaskády dôležitých biologických reakcií, minimalizujúcich metabolicky nežiadúci vplyv stresových faktorov.

## **Literatúra**

1. ALIA, P. - SARADHI, P. - MOHANTY, P. 1995: Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol IV, 1995, 705-708.
2. BATES, L.S. - WALDREN, R.P. - TEARE, J.D. : Plant Soil, 39, 1973, 205-207.
3. BRADFORD, M.M.: Anal Biochem., 72, 1976, 248-254.
4. BRAY, E.A.: Trends Plant Sci., Vol., 2, 1997, p. 48-54.
5. HANSON, A.D. - HITZ, W.D.: Annu. Rev. Plant Physiol., Vol. 33, 1982, p. 163-203.
6. HODGES, D.M. - DELONG, J.M. - FORNEY, C.F. - PRANGE, R.K.: Planta, 207, 1999, 604-611.
7. HORTON, P. - HAGUE, A.: Bichim Biophys Acta, 932, 1988, 107-115.
8. KUZNETSOV, V.V. - SHEVYAKOVA, N.I.: Russ. J. Plant Physiol., Vol. 46, 1998, p. 305-320.
9. LUDLOW, M.M. - CHU, A.C.P. - CLEMENTS, R.J. - KERSLAKE, R.G.: Aust. J. Plant Physiol., 10, 1983, 119-130.
10. MARTIN, M. - MICELI, F. - MORGAN, J.A. - SCALET, M. - ZERBI, G.: J. Agronom. Crop Sci., 171, 1993, 176-184.
11. MORGAN, J.M.: Aust. Journal Plant Physiol., 19, 1992, s. 67-76.
12. OXBOROUGH, K. - Baker, N.R.: Photosynth. Res. 54, 1997, 135-142.
13. SARADHI, P.P. - ARORA, S. - PRASAD, V.V.S.K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 1995, p. 1-5.
14. SCHOBERT, B. - TSCHESCHE, H.: Biochem Biophys Acta, 541, 1978, 270-277.
15. TRIPATHY et al.: TAG, 100, 2000, 1197-1202.
16. TRIPATHY, B.C. - MOHANTY, P.: Plant Physiol., 66, 1980, 1174-1178.
17. WIJK, K.J. - BINGSMARK, S. - ARO, E.M. - ANDERSSON, B.: J Biol Chem., 270, 1995, 25685-25695.

## **PodĎakovanie**

Autori ďakujú JF a EH za precíznu laboratórnu prácu. Práca je výsledkom finančnej podpory VEGA číslo 1/0596/03.

---

Adresa autorov:

Marek KOVÁR, Miriam KÁDASI-HORÁKOVÁ, Katedra fyziológie rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; e-mail: kovar@afnet.uniag.sk

## REGULÁCIA GAZOMETRICKEJ VÝMENY PLYNOV FOLIÁRNOU APLIKÁCIOU POTENCIÁLNYCH ANTISTRESOVÝCH LÁTOK GAS-EXCHANGE REGULATION BY PHOLIAR APPLICATION OF POTENTIAL ANTISTRESS COMPOUNT

Marek KOVÁR – Miriam KÁDASI HORÁKOVÁ – Jozef HUDEC

*We analysed the gas-exchange responses in to-harvest rain-fall plants of wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Astella). The plants were grown in semicontrolled condition and in grain filling phase were exposed intensive rains. For study of potentially regulation of gas exchange we foliarly applied antistress solution. On the flag leaf we under grain filling simultaneously monitored the relative water content, water and osmotic potentials, turgor, net CO<sub>2</sub> assimilation rate, stomatal conductance and chlorophyll content.*

*Key words: gas-exchange, stomata, photosynthesis, WUE, antistress solution, grain filling, wheat*

### Úvod

Rast a produktivita plodín sa realizuje v podmienkach dennej a sezónnej fluktuácie meteorologických faktorov prostredia (BOYER, 1982). Nepriaznivé podmienky prostredia spôsobujú stresové situácie, dôsledkom ktorých je redukcia produkčného potenciálu. Rastliny sú schopné prispôbiť sa na stresové situácie morfológickými, anatomickými, fyziologickými, biochemickými a molekulárnymi adaptáciami, ktorých úlohou je udržať homeostázu bunkového prostredia (HANSON et al., 1986). Aklimatické reakcie rastlín na environmentálne stresové situácie vyžadujú modifikácie fyziologických procesov. Kľúčovou charakteristikou sa ukazuje byť spätnoväzbová regulácia apertúry prieduchového aparátu, ovplyvňujúca výdaj vody z rastlinného organizmu a príjem CO<sub>2</sub>, s cieľom optimalizácie zisku uhlíka a minimalizácie strát vody (COWAN, FARQUHAR, 1977).

Tvorba úrody je proces vysoko regulovaný, daný vzťahmi medzi zdrojom a akceptorom asimilátov (NÁTR, 1995). V konečnom dôsledku je úroda určovaná množstvom asimilátov, vytvorených vo fotosynteticky aktívnych orgánoch rastliny. Environmentálne stresové situácie nastávajúce v dozrievacom procese obilnín výrazne zasahujú do procesov syntézy asimilátov, ich prechodu z listov do stbla, klasu a individuálnych zŕn (KOSTREJ, 1992; TAKAHASHI et al., 1993). Medzi stresovú situáciu, narušujúcu geneticky determinované obdobie naplňovania zŕn a prirodzenú senescenciu listov, patrí tiež obdobie intenzívnych zrážok. Výsledkom je zásah do fyziologických procesov senescencie, modifikácia prieduchovej vodivosti a regulácia vzťahu v systéme medzi zdrojom a akceptorom asimilátov (TAKAHASHI et al., 1993)

Cieľom práce bolo hodnotiť dopad zrážok v naplňovacom období rastlín pšenice na parametre gazometrickej výmeny plynov, ako aj dopad foliárnej aplikácie niektorých potenciálnych antistresových látok na reguláciu fotosyntézy, vodného režimu a senescencie listov.

### Materiál a metódy

Rastliny pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L., cv. Astella) boli pestované v nádobovom experimente v pôdnom substráte vo vegetačnej voliére. V období mliečnej zrelosti (fáza 11.1 podľa Feekesa) boli na listy rastlín foliárne aplikované potenciálne antistresové látky Nfol (adhézivum Nitrafol A zelený, riedený s vodou v pomere 1:23), Avit B, GÚ extrakt (v množstve 300 dm<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) a kontrolné rastliny boli ovplyvnené vodou. Po 3 dňoch od ovplyvnenia vybranými potenciálnymi antistresovými látkami boli rastliny v nádobách ovplyvnené simulovanými intenzívnymi zrážkami štyrmi dávkami vody v množstve 20 mm.

Relatívny obsah vody (RWC, %) bol hodnotený gravimetricky. Vodný ( $\psi_w$ , MPa) a osmotický potenciál ( $\psi_s$ , MPa) bol meraný psychometricky (Wescor, Logan, Utah, USA). Tlakový potenciál ( $\psi_p$ , MPa) bol počítaný ako rozdiel medzi  $\psi_w$  a  $\psi_s$ .

Gazometrická výmena plynov, meraná ako čistá rýchlosť asimilácie CO<sub>2</sub> ( $A_{CO_2}$ ;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a stomatálna vodivosť ( $g_s$ ;  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bola hodnotená uzatvoreným gazometrickým systémom Licor-6200 (Licor, Lincoln, Nebraska, USA). Koncentrácia CO<sub>2</sub> v intercelulárnych priestoroch ( $C_i$ ;  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) bola kalkulovaná podľa von CAEMMERER a FARQUHAR (1981). Efektívnosť využitia vody pre fotosyntézu (WUE) bola kalkulovaná ako podiel  $A_{CO_2}$  a  $g_s$ .

Koncentrácia asimilačných pigmentov bola nedeštruktívne hodnotená prostredníctvom chlorofylmetra SPAD-502 (Minolta, Japonsko).

### Výsledky a diskusia

Regulácia produkčného procesu prostredníctvom ovplyvňovania základných fyziologických procesov sa stáva kľúčovou otázkou úspešného manažmentu rastlinnej produkcie (KOSTREJ, 1992). Počas vegetačného obdobia sú rastliny vystavované mnohým, často simultánne spolupôsobiacim faktorom prostredia, pričom v období dozrievania a naplňovania zŕn obilnín sú hlavnými faktormi sucho a vysoká teplota. V poslednom



období sa ukazuje, že v období dozrievania obilnín, okrem vysokej teploty spoluúčinkujú ako stresový faktor aj zrážky, ktoré majú významný potenciál modifikovať fyziologické procesy.

Naplňovacie obdobie zrn pšenice je doprevádzané postupnou prirodzenou senescenciou listov, postupujúcou od bazálnych inzercii listov k apikálnym (NÁTR, 1995). Vľajkový list, ktorý je v pšenici najvýkonnejším zdrojom asimilátov pre klas vo fáze naplňovania zrn, s postupom ontogenézy podlieha senescencii, ktorá je doprevádzaná rozpadom asimilačných pigmentov, poklesom prieduchovej vodivosti, RWC, redukciou asimilácie oxidu uhličitého a WUE. Zrážky v tomto období spomaľujú procesy senescencie, ako bolo merané prostredníctvom SPAD indexu, hoci  $A_{CO_2}$  je napriek počiatočnému udržaniu redukované s postupom ontogenézy podobne ako v neovplyvnených rastlinách. Ukazuje sa, že prieduchový aparát, hlavne adaxiálnej strany listu, sa stáva menej dynamický a senzitívny na faktory vonkajšieho prostredia, pretože  $g_s$  reagovala na udržanie RWC len veľmi málo (BLUM et al., 1999), pravdepodobne v dôsledku vysokej endogénnej koncentrácie ABA v liste.

Foliárna aplikácia látok s potenciálnou antistresovou účinnosťou (HUDEC et al., 2004) indukovala určité protichodné reakcie. Adhézivum Nitrafol A indukovalo rýchlu redukciu  $g_s$  vľajkového listu už na druhý deň po aplikácii, napriek dočasnému udržaniu  $A_{CO_2}$ , výsledkom čoho bol krátkodobý nárast WUE. Rýchlosť senescencie vyjadrená ako zmena SPAD indexu nebola negatívne, ani pozitívne ovplyvnená. Na druhej strane, GÚ extrakt sa prejavil ako faktor udržiavajúci  $g_s$  listu, hoci  $A_{CO_2}$  bolo limitované rýchlejšie ako na neovplyvnených rastlinách a najrýchlejšie bol dosiahnutý kompenzačný bod fotosyntézy. Pravdepodobne GÚ extrakt ovplyvnil enzymatickú aktivitu asimilačného procesu bez limitácie difúzných dráh pre  $CO_2$ . Foliárna aplikácia roztoku Avit B sa prejavila predĺžením obdobia senescencie listov a tým aj celého obdobia naplňovania. Efektívnosť využitia vody pre fotosyntézu sa po aplikácii zvýšila, čo bolo spôsobené na jednej strane redukciou  $g_s$  a na strane druhej, prechodným zvýšením  $A_{CO_2}$ .

## Záver

V práci sme sa zamerali na štúdium dopadu predzberových zrážok na procesy gazometrickej výmeny plynov a rýchlosť prirodzenej senescencie vľajkového listu rastlín pšenice, pestovaných v nádobovom experimente. Zrážky v naplňovacom období spôsobili spomalenie procesov senescencie a rozpadu asimilačných pigmentov (kvantifikované prostredníctvom SPAD indexu), čo však bolo doprevádzané súčasnou redukciou  $g_s$  a  $A_{CO_2}$ . Foliárna aplikácia potenciálnych antistresových látok (Nfol A, GÚ extrakt, Avit B) regulovala gazometrickú výmenu plynov prostredníctvom negatívneho rýchleho efektu na  $g_s$  pri dočasnom udržaní WUE (Nfol a Avit), alebo prostredníctvom nežiadúceho zníženia  $A_{CO_2}$  bez intervencie na  $g_s$  (GÚ extrakt).

## Literatúra

1. BLUM, A. - ZHANG, J. - NGUYEN, H.T.: Consistent differences among wheat cultivars in osmotic adjustment and their relationship to plant production. In: Field Crops Res., 64, 2000, 287-291.
2. BOYER, J.S.: Plant productivity and environment. In: Science, Vol. 218, 1982, p. 443-448.
3. COWAN, I.R. - FARQUHAR, G.D.: Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. In: Jennings D.H. (ed): Integration of activity in higher plants. Soc. Exp. Biol. Symp. 31, 1977, 471-505.
4. HANSON, A.D. - HOFFMAN, N.E. - SAMPER, C.: Identifying and manipulating metabolic stress-resistance traits. In: Hort. Sci., 21, 1986, 1313-1317.
5. HUDEC, J. - FRANČÁKOVÁ, H. - BURDOVÁ, M.: Changes in defensive mechanism of winter wheat variety astella under elevated temperatures and intensive to-harvest rain-fall after foliar application of the potential antistressors. In Výživa a potraviny pre tretie tisícročie. Zborník z konferencie, Nitra, 2004, 150-155.
6. KOSTREJ, A.: Kvantitatívne charakteristiky a modelovanie produkčného procesu poľných plodín. ES VŠP, Nitra, 1992, 197.
7. NÁTR, L.: Grain yield formation. In: Fragmenta Agronomica, 12, 1995, 2, 84-93.
8. TAKAHASHI, T.: Grain filling mechanisms in spring wheat. In: Jap. J. Crop Sci., 62, 1993, 4, 560-565.

Adresa autorov:

Marek KOVÁR, Miriam KÁDASI HORÁKOVÁ, Katedra fyziológie rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; e-mail: kovar@afnet.uniag.sk

Jozef HUDEC, Katedra agrochémie a výživy rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

## EXISTUJÚ ROZDIELY V ANTIOXIDAČNEJ AKTIVITE GENOTYPOV JARNÉHO JAČMEŇA S RÔZNOU KAPACITOU PRE OSMOTICKÉ PRISPÔSOBENIE?

### DOES EXIST OF DIFFERENCE IN THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SPRING BARLEY GENOTYPES WITH VARIABLE CAPACITY FOR OSMOTIC ADJUSTMENT?

Miriam KÁDASI HORÁKOVÁ – Marek KOVÁR

*In plant cells, chloroplasts are one of the most important intracellular generators of reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ( $^1O_2$ ), superoxide radicals  $H_2O_2$  and hydroxyl radicals. ROS are highly reactive and in the absence of protective mechanisms, can produce damage to cell structure and function. To prevent oxidative damage, plants have evolved a complex antioxidant defence system, including both non-enzymatic and enzymatic constituents. Superoxid dismutase and catalase are key antioxidant enzymes which scavenge ROS and protect plant cells to oxidative damage.*  
*Key words: antioxidant enzymes, photosynthesis, drought, barley*

#### Úvod

Rastlinný organizmus je počas ontogenézy vystavený pôsobeniu rozličných podmienok prostredia, či už endogénneho, alebo exogénneho pôvodu. Exogénne faktory ako teplota, svetlo, sucho vplývajú na rastlinu buď pozitívne alebo negatívne. Každá zmena podmienok presahujúca prahové hodnoty vyvoláva v rastlinnom organizme zmenu vnútornej rovnováhy, ktorá môže viesť k stresu, a tým dochádza k rôznym metabolickým a fyziologickým zmenám.

Vodný stres zapríčiňuje radu zmien v biochemických procesoch týkajúcich sa hlavne fotosyntézy (LAWLOR, 1995). Jednou z hlavných príčin poškodenia fotosyntetického aparátu a aj iných bunkových štruktúr v stresových podmienkach je tvorba a uvoľňovanie aktívnych foriem kyslíka, ako sú superoxidový radikál ( $\cdot O_2^-$ ), peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ) (ASADA, 1999), ale súčasne dochádza k zvýšenému potenciálu na ich odstránenie. Antioxidačná odpoveď organizmu na stres zahŕňa antioxidantné enzýmy (SOD, CAT, APX) a tiež neenzymatické komponenty (glutatión, kyselina askorbová atď.). Uvažuje sa, že práve expresia antioxidantných enzýmov zohráva dôležitú úlohu v tolerancii rastlín voči nepriaznivým faktorom prostredia (FOYER, NOCTOR, 2000).

Cieľom práce bolo zistiť rozdiely v antioxidačnej aktivite počas sucha pri genotypoch jarného jačmeňa *Kompakt* a *Dobla*, ktoré sa vyznačujú rôznou kapacitou osmotického prispôsobenia. V podmienkach narastajúceho vodného deficitu sme sledovali parametre vodného režimu a gazometrickej výmeny plynov. Antioxidačnú aktivitu sme porovnávali v listoch prostredníctvom stanovovania aktivity antioxidantných enzýmov superoxiddismutázy (SOD) a katalázy (CAT).

#### Materiál a metódy

Rastliny jarného jačmeňa (*Hordeum vulgare* L., cvs. *Kompakt* a *Dobla*) boli pestované v pôdno-rašelinovom substráte v laboratórnych podmienkach (PPFD  $200 \pm 15 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ , RH  $40 \pm 5 \%$ , teplota  $25 \pm 3$  °C, normálna atmosféra a fotoperiódou 14/10 hod). Substrát bol denne hydratovaný dávkou 100 ml vody na nádobu. Po 20 dňoch kultivácie bol indukovaný vodný stres prerušením zalievania substrátu.

Všetky fyziologické a biochemické parametre boli hodnotené simultánne na 3. liste (od bázy rastliny). Relatívny obsah vody (RWC, %) bol hodnotený gravimetricky (BARR, WEATHERLEY, 1962). Vodný ( $\psi_w$ , MPa) a osmotický ( $\psi_s$ , MPa) potenciál bol meraný psychrometricky (Wescor, Logan, Utah, USA). Kapacita pre osmotické prispôsobenie (OA, MPa) bola kalkulovaná podľa LUDLOW et al. (1983). Parametre gazometrickej výmeny plynov bola hodnotená použitím Licor-6200 (Licor, Nebraska, USA). Aktivitu antioxidantného enzýmu SOD sme stanovovali podľa MADAMANCHI et al. (1994) pri vlnovej dĺžke 560 nm. Aktivitu antioxidantného enzýmu CAT sme stanovovali podľa AEBI (1984) pri vlnovej dĺžke 240 nm. Vo všetkých analýzach sa použil spektrofotometer Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena, Nemecko). Obsah bielkovín sme stanovili štandardnou metódou podľa BRADFORD (1976) pri vlnovej dĺžke 595 nm.

#### Výsledky a diskusia

Rastliny jačmeňa odrody *Kompakt* a *Dobla* boli vystavené postupnej dehydratácii. So zvyšujúcim sa vodným stresom pri rastlinách nastal pokles RWC. Reakciou oboch odrôd na narastajúcu dehydratáciu bola expresia osmotického prispôsobenia, pričom genotyp *Dobla* sa prejavil výraznejšou kapacitou pre osmotické prispôsobenie, vyššou schopnosťou udržať turgor a tým lepšie osmoticky pútať vodu oproti genotypu *Kompakt*.

Je všeobecne známe, že rýchlosť čistej fotosyntetickej asimilácie  $CO_2$  ( $A_{CO_2}$ ) klesá pri znižovaní RWC s  $\psi_w$  pletív listov (LAWLOR, 1995; CORNIC, MASSACCI, 1996). Pri poklese RWC zo 100% na 75% dochádza k zníženiu  $A_{CO_2}$ . V tejto etape v dôsledku nárastu odporu pre difúziu  $CO_2$  do listu poklesom  $g_s$

dochádza k znižovaniu intercelulárnej koncentrácie CO<sub>2</sub>, ktorej hodnota klesá až na kompenzačný bod ( $\Gamma_{CO_2}$ ). Tento syndróm je v literatúre popisovaný ako prieduchová (stomatická) limitácia fotosyntézy. Táto fáza stresu sa vyznačovala intaktnosťou primárnych fotosyntetických reakcií, ako bolo dokumentované prostredníctvom merania maximálnej fotochemickej efektívnosti PSII (Fv/Fm). Ďalším prehĺbením vodného stresu po uzatvorení prieduchov bolo pozorované zvýšenie citlivosti fotosyntetického aparátu na žiarenie pri obidvoch genotypoch jačmeňa, čo sa prejavilo poklesom Fv/Fm.

Poškodenie PSII excitačnou energiou, ktorá sa nevyužije vo fotochemických procesoch ani nie je efektívne disipovaná termálne, je spôsobené akumuláciou ROS v blízkosti reakčného centra PSII, ktoré poškodzujú D1 proteín. Práve nárast aktivity ROS je možné nepriamo zistiť prostredníctvom zvýšenej aktivity antioxidantných enzýmov.

Produkcia ROS spôsobuje degradáciu proteínových komplexov, ako aj peroxidáciu nesaturovaných lipidových komponentov tylakoidnej membrány (TAMBUSSI et al., 2000). Pokles RWC listu spôsobilo nárast aktivity antioxidantných enzýmov. Pri genotype *Kompakt* sme pozorovali indukciu pri vyšších hodnotách RWC ( $\Gamma_{CO_2}$  bol dosiahnutý pri RWC okolo 74 %), ako v prípade genotypu *Dobla*. Na druhej strane, absolútna aktivita SOD, meraná po uzatvorení prieduchového aparátu a  $\Gamma_{CO_2}$  bola vyššia pri genotype *Dobla*, čo poukazuje na vyššiu kapacitu odbúravať ROS, a tak chrániť membránové štruktúry pred poškodením.

## Záver

Tieto výsledky nám ukázali zmeny aktivity antioxidantných enzýmov po dosiahnutí kompenzačného bodu pri genotypoch jarného jačmeňa *Kompakt* a *Dobla* s rôznou úrovňou osmotického prispôsobenia. Pozorovali sme, že vodný stres indukuje nárast aktivity antioxidantných enzýmov pri obidvoch genotypoch jarného jačmeňa, pričom genotyp *Dobla* dosiahol vyššiu kapacitu odbúravať ROS v porovnaní s genotypom *Kompakt*. Antioxidantné enzýmy (superoxiddismutáza, kataláza a iné) podliehajú regulácií a sú časovo i funkčne koordinované. Majú dôležitú úlohu v tolerancii rastlín voči vodnému stresu, vieme však, že predstavujú len jeden z komponentov celkovej antioxidantnej ochrany rastlín.

## Literatúra

1. AEBI, H.: Catalase in *vitro*. Meth. Enzymol., 105,1984, p. 121-126.
2. ASADA, K.: The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. In: Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 1990, p. 601-639.
3. BARR, H.D. - WEATHERLEY, P.E.: A re-examination oh the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. In: Aust. J. Biol. Sci., 15, 1962, p. 413-428.
4. BRADFORD M.M.: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. In: Analytical Biochemistry 72, 1976, p. 319-321.
5. CORNIC, G. - MASSACCI, A.: Leaf photosynthesis under drought stress. In: Baker, N.R. (ed.) Photosynthesis and the environment, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, 1996, p. 347-366.
6. FOYER, CH. - NOCTOR, G.: Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. New Phytol., 146, 2000, p. 359-388.
7. LAWLOR, D.W.: The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff, N. (ed.) Environment and plant metabolism. In: Bios. Sci. Publ., 1995, p.129-150.
8. LUDLOW, M.M. - CHU, A.C.P. - CLEMENTS, R.J. - KERSLAKE, R.G.: Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. In: Aust. J. Plant Physiol., 10, 1983, p. 119-130.
9. MADAMANCHI, N.R. - DONAHUE, C.L. - CRAMER, R.G.: Differential response of Cu, Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulphur dioxide. Plant Mol. Biol., 26, 1994, s. 95-103.
10. TAMBUSSI, E.A. - BARTOLI, C.G. - BELTRANO, J. - GUIAMET, J.J. : Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum* L. ). In: Physiol. Pl., 108, 2000, p.398-404.

Adresa autora:

Miriám Kádasi Horáková, Marek Kovár, Katedra fyziológie rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, e-mail: mhorakova@excite.com

## DETERMINÁCIA CITLIVOSTI FOTOSYNTETICKÉHO APARÁTU GENOTYPOV PŠENICE NA SUCHO A VYSOKÚ TEPLOTU DETERMINATION OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS SENSITIVITY OF WHEAT GENOTYPES TO DROUGHT AND HIGH TEMPERATURE

Marek ŽIVČÁK – Marián BRESTIČ – Katarína OLŠOVSKÁ – Elena HUNKOVÁ – Jana FERENCOVÁ

*Chlorophyll fluorescence is a subtle reflection of primary reactions of photosynthesis. Intricate relationships between fluorescence kinetics and photosynthesis help our understanding of photosynthetic biophysical process and its changes during stress. In our experiments with different genotypes of winter wheat we assessed the influence of drought and high temperature on their PS II efficiency. During water stress we observed differences among genotypes in sensitivity of PS II to same water deficit in leaves. Much stronger was impact of high temperature. Temperature over 40 °C strongly affected stability of membranes as showed substantial decrease of OJIP-transient. Leaves of different genotypes exposed to 40 °C showed large variances in sensitivity of PS II, expressed as fluorescence parameters.*

*Key words: wheat, drought, high temperature, chlorophyll fluorescence*

### Úvod

Fluorescencia chlorofylu predstavuje nedeštrukčný a rýchly nástroj pre sledovanie účinku mnohých biotických a abiotických faktorov na fotosyntézu rastlín a navyše odráža aj stav rastliny ako celku. Má široké spektrum uplatnení a poskytuje mimoriadne účinný prostriedok pre výskum transferu excitačnej energie, primárnej fotochémie, toku elektrónov na donorovej aj akceptorovej strane fotosystému II, no súčasne je rýchlou metódou pre účinné zistenie mutácií PS II, inhibície či iného prispôsobenia sa stresom, či už teplotnému, vodnému stresu, stresu z nadmerného žiarenia, výživy či použitia herbicídov. Fluorescenčná technika známa ako analýza efektívnosti rastlín (PEA) sa využíva pre monitorovanie rýchlej indukcie fluorescence chlorofylu a, ktorá v časovom intervale jednosekundového svetelného pulzu, po zobrazení na logaritmickú osi, vytvára typický polyfázový priebeh, s fázami nazvanými J a I medzi počiatočnou fázou O a úrovňou maximálnej fluorescence P (STRASSER et al., 2000).

Asi najvýznamnejším environmentálnym abiotickým stresom je deficit vody. V prostredí s nedostatkom zrážok býva často doprevádzaný vysokými teplotami. I keď vysoká teplota urýchľuje priebeh deficitu vody, vodný stres pri pšenici zvyšuje toleranciu rastlín k vysokej teplote (LU, ZHANG, 1999). Všeobecne však platí, že teploty prevyšujúce kritickú hranicu spôsobujú ireverzibilné alebo čiastočne reverzibilné poškodenie membrán, prejavujúce sa nárastom minimálnej fluorescence Fo (PASTENES, HORTON, 1999; YAMANE et al., 1997). Zámerom nášho výskumu bolo overiť možnosť využitia JIP-testu pre hodnotenie vplyvu sucha a vysokej teploty na rastliny pšenice a hľadanie genotypových rozdielov medzi odrodami v optimálnych podmienkach i v podmienkach teplotného a vodného stresu.

### Materiál a metódy

Na realizáciu našich pokusných zámerov sme využili 7 odrôd ozimnej pšenice (*Triticum aestivum* L.) 'Viginta', 'Ilona', 'Arida', 'Eva' (Slovensko), 'Pobeda' (Republika Srbsko a Čierna Hora), BU-9 (Francúzsko) a 'Stephens' (USA). Rastliny sme pestovali v nádobách vo vonkajších podmienkach. Časť rastlín sme vystavili vodnému stresu prerušením zálievky. Pôsobenie teplotného stresu sme sledovali na listových segmentoch odobratých z kontrolných rastlín, ktoré sme vystavili po dobu 1 hodiny teplotám 30 až 45°C v skúmavkách ohrievaných vodným kúpeľom. Rýchlu fluorescenciu chlorofylu sme merali prístrojom HandyPEA po minimálne 30 minútovej adaptácii na tmu pred a po expozícii vysokým teplotám. Vplyv sucha na fotosyntetický aparát sme hodnotili na základe meraní rýchlej fluorescence chlorofylu a prístrojom HandyPEA (Hansatech, V. Británia) a vyhodnotením výsledkov JIP-testom podľa STRASSER et al. (1995) a využitím softvéru Biolyzer<sup>®</sup>.

### Výsledky a diskusia

Cieľom meraní prístrojom HandyPea (Hansatech, Veľká Británia) pri intenzite svetelného pulzu 3000  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  a analýzy nameraných dát tzv. JIP-testom podľa STRASSER et al. (1995) a programom Biolyzer<sup>®</sup> je polyfázová krivka priebehu hodnôt fluorescence v čase s logaritmicky znázornenou časovou osou a množstvo od nej odvodených parametrov. Pri vodnom strese sa hodnoty Fv/Fm menia až po pomerne hlbokom poklese obsahu vody v listoch (LU, ZHANG, 1999). Preto z hľadiska skríningu sa ako veľmi zaujímavý javí vypočítaný parameter P.I. (Performance Index), ktorý v sebe zahŕňa viaceré parametre charakterizujúce priebeh OJIP krivky a citlivo reflektuje akékoľvek vybočenie krivky z optimálneho priebehu. Aj keď mnohé štúdie uvádzajú, že merania fluorescence chlorofylu neodzrkadľujú priamy vplyv vodného stresu na primárne procesy fotosyntézy tak, ako je to pri iných druhoch stresov (CORNIC, MASSACCI, 1996; LU, ZHANG, 1999; FRACHEBOUD, LEIPNER, 2002 a i.), naše pozorovania ukázali, že počas dehydratácie postupne dochádza k zmenám v priebehu fluorescence, ktoré naznačujú aj zmeny vo

fotosyntetickej výkonnosti. Môže sa tu jednať aj o nepriame pôsobenie prostredníctvom zmien vo fotosyntetickom aparáte spojené napríklad s urýchlením senescencie listov počas vodného stresu.

Vplyv jednotlivých úrovní vysokých teplôt na fotosyntézu sme hodnotili aplikovaním stupňovaných teplôt 30 až 45°C na listové segmenty. Teploty 30 až 37,5°C spôsobili len veľmi malé zmeny v priebehu rýchlej kinetiky fluorescence chlorofylu a, s minimálnym poklesom hodnôt Fv/Fm a s minimálnymi odrodovými rozdielmi. Pri 40°C došlo k výraznému poklesu Fv/Fm, spôsobenému nie len poklesom maximálnej fluorescence, ale aj nárastom hodnôt Fo. Pri tejto teplote sa prejavili pomerne výrazné rozdiely medzi odrodami, kde sa vyprofilovali tolerantnejšie a náchylnejšie. Rovnako, pri tejto teplote sa prejavili rozdiely medzi listami kontrolných a stresovaných rastlín, s vyššou mierou tolerance pri rastlinách predtým vystavených deficitu vody. Pri teplotách 42,5 a 45°C sa prejavila výrazná inhibícia primárnych procesov fotosyntézy, ktorá sa okrem takmer úplnému poklesu hodnôt Fm, výraznému nárastu hodnôt Fo prejavila aj objavením fázy K na fluorescenčnej krivke nárastom a následným poklesom fluorescence v čase približne 0,3 ms a potlačením fáz J, I a P, čo je najlepšie viditeľné pri zobrazení normalizácie J-fázy v programe Biolyzer<sup>©</sup>.

## **Záver**

Sucho a vysoká teplota ako významné faktory znižujúce úrody plodín sa odzrkadľujú aj v primárnych procesoch fotosyntézy monitorovaných technikami fluorescence chlorofylu. Miera ich účinku závisí okrem vonkajších podmienok aj na tolerancii genotypu na suboptimálne podmienky prostredia. Preto sa nám merania zmien parametrov fluorescence počas stresu javia ako vhodné na rozlíšenie viac či menej tolerantných genotypov. Tak ako viaceré literárne pramene, aj naše výsledky v tomto zmysle poukazujú na to, že pri teplotnom strese vplývajúcom priamo na fotosystémy je táto metóda oveľa citlivejšia a lepšie použiteľná, než pri strese vodnom, kde je efekt nepriamy. Vybrané parametre sú však dostatočne citlivé a potenciálne využiteľné v skriningu pre vyššiu toleranciu.

## **Literatúra**

1. CORNIC, G. – MASSACCI, A.: *Advances in photosynthesis, Volume 5: Photosynthesis and the Environment*. London: Kluwer Academic Press, 1996, s.347-366.
2. FORCE, L. - CRITCHLEY, C. - Van RENSEN, J.J.S. : *Photosynthesis Research*, 2003, 78, 1733.
3. FRACHEBOUD, Y. - LEIPNER, J. : *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Press, 2003, 125-150. ISBN 1-4020-7440-9.
4. LU, C. - ZHANG, J. 1998: *Journal of Experimental Botany*, 1999, 336 (50), 1199-1206.
5. PASTENES, C. - HORTON, P.: *Photosynthesis Research*, 62, 1999, 197-203.
6. STRASSER, R. J. - SRIVATSAVA, A. - GOVINDJEE. : *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 61, 32-42.
7. STRASSER, R.J. - SRIVATSAVA, A. - TSIMILLI-MICHAEL, M. : *Probing Photosynthesis Mechanisms, Regulation and Adaptation*. London and New York: Taylor and Francis, 2000, chp.25, 445-483).
8. YAMANE, Y. - KASHINO, Y. - KOIKE, H. - SATOH, K. : *Photosynthesis Research*, 1997, 52, 57-64.

Práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/1350/04.

---

Adresa autorov:

Ing. Marek ŽIVČÁK; doc. Ing. Marián BRESTIČ, CSc., Ing. Katarína Olšovská, PhD., Ing. Elena Hunková, Ing. Jana Ferencová, Katedra fyziológie rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; e-mail: marek.zivcak@uniag.sk

## CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH GENOTYPOV HRACHU SIATEHO V PODMIENKACH VODNÉHO STRESU CHARACTERISTICS OF SELECTED GENOTYPES OF PEA IN WATER STRESS CONDITIONS

Eleonóra KRIVOSUDSKÁ - Marián BRESTIČ - Miroslav DOBRODENKA - Jozef ŠTEFANKA

*Four genotypes (Xantos, Svit, Novozélandský and Debrecényi Galamb) of pea (Pisum sativum L.) was evaluated in water stress conditions in this work. Water status in leaves was measured as relative water content (RWC). In compare with other genotypes Xantos was shown the smallest decrease in RWC.*

*Key words : water deficit, pea, genotypes, breeding*

### Úvod

Trend klimatických zmien za posledných sto rokov signalizuje stály pokles sumy ročných atmosférických vodných zrážok a pokles ročných priemerov relatívnej vlhkosti vzduchu. Súčasne sa zvyšujú priemerné ročné teploty vzduchu a narastajú evapotranspiračné požiadavky na vodu. Periódy sucha medzi atmosférickými zrážkami sa predlžujú, takže rastliny často trpia nedostatkom vody. Vodný stres (presnejšie stres zo sucha) sa stáva prvoradým abiotickým stresovým faktorom, ktorý obmedzuje rast a produktivitu na zemi (MASAROVICOVÁ et al., 2002).

Dlhodobý pretrvávajúci vodný deficit môže mať nepriaznivý vplyv na zber plodín a viesť dokonca k starnutiu rastlín (SIDDIQUE, 2004). Sucho a vysoká teplota sa s meniacou klímou stávajú čoraz väčšou hrozbou aj pre oblasti, kde sa doteraz objavoval ich škodlivý význam iba sporadicky. Dosiachnutie zvýšenej tolerancie na suchu pri zachovaní vysokých úrod je zložitá a jednou z možností sa ukazuje využitie vhodných fyziologických kritérií a techník v šľachtení rastlín (REYNOLDS et al., 2001).

V porovnaní s inými plodínami majú strukoviny mnoho predností. Význam strukovín spočíva v širokej možnosti ich pestovania a zúžitkovania (ŠINSKÝ, 1985).

Najčastejšie pestovanou strukovinou v našich podmienkach je hrach siaty. V poslednom období sa začínajú pestovať formy bezlistového hrachu, pri ktorom sa celé listy premenili na úponky vo forme antén. Fotosyntetické merania dokázali, že tieto antény majú vysokú fotosyntetickú aktivitu. Sú schopné vytvoriť veľkú úrodu semien. Bezlisté formy sú perspektívnejšie, pretože lepšie využívajú svetlo (nezatieňujú sa). Odrody vysokého vzrastu majú na začiatku väčší podiel úponkov, ale v neskoršom vegetačnom období ju prevažujú nízke odrody (KOSTREJ et al., 1998).

Cieľom tejto práce bolo sledovanie fyziologických parametrov rôznych genotypov hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), vystavených vodnému stresu v období kvitnutia.

### Materiál a metódy

V roku 2005 boli založené na Katedre fyziológie rastlín nádobové pokusy štyroch genetických zdrojov hrachu siateho (Xantos, Svit, Novozélandský a Debrecényi Galamb). Prvé dve odrody boli vyšľachtené na Šľachtiteľskej stanici v Hornej Strede a patria k semileafless (bezlistovým) odrodám. Odroda Svit – žltosemenná, poloskorá odroda intermediárneho vzrastu. Má veľmi dobrú odolnosť proti poliehaniu i chorobám, hlavne proti fuzáriám. Je charakteristická farebne vyrovnaným semenom s nižšou HTS. Nová, žltosemenná odroda Xantos je vhodná pre pestovanie vo všetkých výrobných oblastiach. Je to poloskorá odroda, intermediárneho vzrastu a vyznačuje sa výborným zdravotným stavom, najmä odolnosťou proti fuzáriám, múčnatke a chorobám ascochyta – komplexu. Má dobrú odolnosť proti poliehaniu a dosahuje výbornú úrodu semena. Zahraničné odrody Novozélandský (vysokého vzrastu) a Debrecényi Galamb (nízkeho vzrastu) patria medzi listové odrody.

Výsev hrachu bol realizovaný 12. apríla 2005 do pôdy s pH 6,89. Rastliny boli pestované v laboratórnych podmienkach v klimatizovanom boxe pri umelom osvetlení.

Na začiatku kvitnutia sme vystavili rastliny vodnému stresu prerušením dodávky vody.

Porometrom Delta- T- Devices (Camridge, England) sa v období dehydratácie pravidelne merala difúzna vodivosť ( $G_c$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) vrchných listov.

Na meranie osmotického potenciálu ( $\Psi_s$ , MPa) sme využili psychrometrickú metódu (Wescor, Logan, Utah, USA).

Počas vodného stresu bol sledovaný aj parameter, ktorý nám udáva vzťah medzi obsahom vody v orgáne rastliny a obsahom vody v plnej turgescencii t.j. relatívny obsah vody - RWC v % (BARS, WEATHERLEY, 1962).

## Výsledky a diskusia

Kritickým obdobím v požiadavkách na vodu je začiatok tvorby kvetov (ŠINSKÝ, 1985). Preto sme v tomto období vystavili genotypy hrachu postupnej dehydratácii, ktoré trvalo v našom experimente 20 resp. 24 dní, kedy sme zaznamenali výrazné zníženie hodnôt RWC pri všetkých odrodách. Nakoľko genotypová rozdielnosť bola zrejma už pri porovnávaní hodnôt RWC, pretože pri odrode Novozélandský bol zaznamenaný najvýraznejší pokles RWC t.j. 37,2% a pri odrode Svit 40,7% počas 20-tich dní dehydratácie. Pri sledovaných odrodách sme zaznamenali výraznejšie zníženie RWC pod 70% na 14. deň dehydratácie, pričom tento pokles už podľa niektorých autorov (BRESTIČ, OLŠOVSKÁ, 2001 a i.) predstavuje často významný zásah do metabolizmu fyziologických procesov. Ďalšie dve spomenuté odrody reagovali na vodný stres výraznejšie počas 24 dní dehydratácie, pričom sa RWC odrody Debrecényi Galamb znížilo na 53,1% v porovnaní s kontrolou. Aj počas tohto obdobia najmenší pokles spomenutého ukazovateľa sme zaznamenali pri novovyšľachtenej bezlistovej odrode Xantos t.j. 63,4%. Zároveň sme pri týchto dvoch odrodách na konci 20 – dňovej dehydratácie zaznamenali nižšie hodnoty voľného prolínu ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) ako pri odrode Novozélandský a Svit. Taktiež sme sledovali zníženie hodnôt osmotického potenciálu pri všetkých odrodách do konca dehydratácie.

Zníženie konduktivity listov ako odpoveď na sucho má za následok podstatné zvýšenie efektívnosti využitia vody (BRESTIČ, OLŠOVSKÁ, 2001). Pri meraniach difúznej vodivosti porometrom Delta – T – Devices sme zistili, že odroda Xantos najrýchlejšie reagovala na vodný stres a k zatvoreniu prieduchov došlo na piaty deň dehydratácie. Pri ďalších odrodách nastal výrazný pokles difúznej vodivosti na siedmy deň vodného stresu.

## Záver

Cieľom experimentálnej práce bolo sledovanie fyziologických parametrov 4 odrôd hrachu počas dehydratácie. Rastliny boli pestované v klimatizovanom boxe pri umelom osvetlení.

V období kvitnutia sme vystavili genotypy hrachu (Novozélandský, Debrecényi Galamb, Svit, Xantos) s odlišnými charakteristikami (vysokého vzrastu, nízkeho vzrastu, bezlistové) vodnému stresu. Odroda Xantos reagovala znížením difúznej vodivosti listov už na piaty deň dehydratácie a zároveň sme pri tejto odrode zaznamenali počas 24 - dňovej dehydratácie najnižší pokles RWC v porovnaní s ďalšími genotypmi.

## Literatúra

1. BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K.: Vodný stres: príčiny, dôsledky, perspektívy. Nitra: SPU, 2001, 149s. ISBN 80-7137-902-6.
2. KOSTREJ, A. et al.: Ekofyziológia produkčného procesu porastu a plodín. Nitra: SPU, 1998, s.140-147. ISBN 80-7137-528-4.
3. MASAROVIČOVÁ, E. et al.: Fyziológia rastlín. Bratislava: Univerzita Komenského, 2002, s. 267-282. ISBN 80-223.
4. REYNOLDS, M. P.- ORTIZ-MONASTERIO, J. I.- MCNAB, A.: Application of Physiology in Wheat Breeding. Mexiko, D. F.: CIMMYT, 2001. ISBN 970-648-077-3.
5. SIDDIQUE, K. H. M.: Water Deficits: Development. Australia. In: Encyclopedia of Plant and Crop Science, 2004, s. 1284-1287.
6. ŠINSKÝ, T. et al.: Strukoviny. Bratislava: Príroda, 1985, 157s.

Táto práca bola riešená v rámci VTP aplikovaného výskumu č. 1109/ 2004 MŠ SR.

Adresa autorov:

Ing. Eleonóra Krivosudská, PhD., doc. Ing. Marián Brestič, CSc., Katedra fyziológie rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, e-mail: [Eleonora.Krivosudska@uniag.sk](mailto:Eleonora.Krivosudska@uniag.sk)  
Ing. Miroslav Dobrodenka, Ing. Jozef Štefanka, Šľachtiteľská stanica Horná Streda, a.s.

## CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH GENOTYPOV CÍCERA BARANIEHO V PODMIENKACH VODNÉHO STRESU CHARACTERISTICS OF SELECTED GENOTYPES OF CHICKPEA IN WATER STRESS CONDITIONS

Eleonóra KRIVOSUDSKÁ - Marián BRESTIČ

*There are characteristics of 5 foreign genotypes (88194, Knoor 91, CM-7-1/85, Punjab 91, PK 51814) of chickpea (Cicer arietinum L.) included in this work. These genotypes were tested in water stress conditions. Water status in leaves was measured as relative water content (RWC). As the most tolerant was shown genotype CM-7-1/85 in which was observed the minimal decrease of RWC during dehydration.*

*Key words : chickpea, water stress, genotypes, drought*

### Úvod

Cicer baraní (*Cicer arietinum* L.) je jednou z najvýznamnejších a najvhodnejších strukovín a možno aj poľných plodín vôbec, pre teplé a suché až polosuché oblasti. V takýchto oblastiach ostatné strukoviny trpia nedostatkom vody a sú viac napádané škodcami, ich úrodnosť a stabilita úrod silno klesá.

Suchovzdornosť a celková nenáročnosť na vodu je najvýznamnejším agronomickým znakom cícera baranieho. Najvyššie nároky na vodu má pri kľčení a vzhádzaní. V období, keď sa už vyvíja pomerne mohutne rozkonárená koreňová sústava, sa uspokojí s minimom vlahy. Nadbytočné zrážky, najmä počas generatívnej fázy, sú dokonca škodlivé (PASTUCHA, 1993).

Suchovzdornosťou predstihuje cicer všetky hlavné druhy strukovín, preto i jeho úrody sú v suchších a teplejších oblastiach istejšie a vyššie (ŠINSKÝ, 1985). V porovnaní s inými plodinami majú strukoviny mnoho predností.

Keďže adaptácie rastlín na sucho predstavujú komplexnú vlastnosť celého organizmu, charakterizovanú súborom menšieho alebo väčšieho počtu znakov podmienených viacerými génmi a ich realizácia bude závisieť aj od ontogenetického stavu rastlín, môže byť významné hľadať také interakcie stresového faktora a reakcií rastlín, ktoré umožnia expeditívne testovať odrody už v skorých rastových fázach (KOSTREJ, 2000).

Vodný deficit má za následok inhibíciu rastu, akumuláciu kyseliny abscisovej, prolínu, manitolu a sorbitolu, formovanie komponentov, zachytávajúcich reaktívne formy kyslíka, zatvorenie prieduchov a redukciu rýchlosti transpirácie, pokles vodného potenciálu pletív, rýchlosti fotosyntézy a syntézy nových proteínov (YORDANOV, 2000).

Hydratovaný list a vzdušná vlhkosť sú považované za významné faktory, ovplyvňujúce prieduchovú vodivosť (TURNER, WRIGHT, SIDDIQUE, 2001).

Konduktivita (vodivosť) prieduchov je v tesnejšej korelácii s obsahom vody v pôde ako s obsahom vody v listoch, čo dokumentuje existenciu mechanizmu nezávislého od hydraulického efektu.

Vzhľadom k zložitým vzťahom medzi množstvom vody v rastline a v okolitom prostredí nie je úplne presne možné zaviesť jednoduché kritérium, podľa ktorého by sme hodnotili, akému veľkému stresu z nedostatku vody je rastlina vystavená (PROCHÁZKA, 1998).

Preto aj cieľom experimentálnej práce bolo sledovanie fyziologických parametrov zahraničných genotypov cícera v období postupnej dehydratácie.

### Materiál a metódy

Pri štúdiu fyziologických aspektov tolerance rastlín na environmentálne stresy sa v súčasnosti využíva široké spektrum metód.

V roku 2005 boli založené nádobové pokusy piatich zahraničných genetických zdrojov cícera baranieho (88194, Knoor 91, CM-7-1/85, Punjab 91, PK 51814), ktoré nám poskytol Výskumný ústav rastlinnej výroby v Piešťanoch. Výsev cícera bol realizovaný po naklíčení semien 19. apríla 2005. Rastliny boli pestované vo vonkajších podmienkach s pH pôdy 6,47. V štádiu kvitnutia bol indukovaný vodný stres pozastavením zálievky.

V období dehydratácie sa pravidelne merala difúzna vodivosť ( $G_c$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) vrchných listov porometrom Delta – T – Devices (Camridge, England).

Na meranie osmotického potenciálu ( $\Psi_s$ , MPa) sme využili psychrometrickú metódu (Wescor, Logan, Utah, USA).

Počas postupnej dehydratácie bol sledovaný aj relatívny obsah vody RWC v % (BARS, WEATHERLEY 1962), ktorý nám udáva vzťah medzi obsahom vody v orgáne rastliny a obsahom vody v plnej turgescencii.



## **Výsledky a diskusia**

Počas vodného stresu, ktorý trval 21 dní sme sledovali niektoré parametre vodného režimu. Po prerušení dodávky vody sa prieduchy začali zatvárať na piaty deň dehydratácie a úplne sa zatvorili na ôsmy deň. Bilanciu vody odráža parameter RWC – relatívny obsah vody. Pokles hodnôt pod 90% znamená iniciovanie zatvárania prieduchov, pokles pod 80% znamená iniciovanie metabolických mechanizmov ako je osmotické prispôsobenie a pokles pod 70% už často predstavuje významný zásah do metabolizmu základných fyziologických procesov (BRESTIČ, OLŠOVSKÁ, 2001). Sledované odrody zaznamenali podobný trend poklesu hodnôt, pričom zníženie hodnôt RWC pod 70% nastalo na 16. deň dehydratácie pri troch odrodách (CM-7-1/85, 88194, PK 51814) a pri ďalších dvoch o niečo skôr. Genotypová rozdielnosť bola zrejmalá, pretože najnižšie hodnoty RWC rastlín, vystavených vodnému stresu za uvedené obdobie sme zaznamenali pri odrode PK 51814 (41,1%) a pri odrode Knoop 91 (43,3%) v porovnaní s kontrolnými variantami (89,5% a 93,3%), s čím súvisí aj zvýšenie obsahu voľného prolínu a zníženie osmotického potenciálu. O niečo vyššie hodnoty dosiahli odrody 88194 (54,1%) a Punjab 91 (57,1%). Najnižší pokles RWC počas vodného stresu bol pri odrode CM-7-1/85 (67,0%).

## **Záver**

V našom experimente sme vychádzali z poznatku o suchovzdornosti cícera s tým, že sme v období kvitnutia indukovali vodný stres pozastavením zálievky. Pri kontrolných variantoch i variantoch bez vody sme počas obdobia dehydratácie, ktoré trvalo 21 dní, sledovali zatváranie prieduchov, zníženie osmotického potenciálu a zároveň výrazné zníženie relatívneho obsahu vody. Genotypy, ovplyvnené nedostatkom vody, mali na konci obdobia dehydratácie zvýšený obsah voľného prolínu. Sledované odrody cícera (88194, Knoop 91, CM-7-1/85, Punjab 91, PK 51814) reagovali na vodný deficit rozdielne.

## **Literatúra**

1. BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K.: Vodný stres: príčiny, dôsledky, perspektívy. Nitra: SPU, 2001, 149s. ISBN 80-7137-902-6.
2. KOSTREJ, A. et al.: Funkčné parametre produkčného procesu obilnín v meniacich sa podmienkach prostredia. Agroinštitút: Nitra, 2000, 110s. ISBN-81-9974-41.
3. PASTUCHA, L.: Agronomický význam cícera baranieho. In: Cícer baraní a jeho využitie (Zborník referátov z odbornej konferencie). Nitra: SPU, 1993, s. 3-4.
4. PROCHÁZKA, S. et al.: Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Academia, 1998, s. 412-430. ISBN 80-200-0562-2.
5. ŠINSKÝ, T. et al.: Strukoviny. Bratislava: Príroda, 1985, 157s.
6. TURNER, NEIL C.– WRIGHT, GRAEME C. – SIDDIQUE, K.H.M: Adaptation of Grain Legumes (Pulses) to Water – Limited Environments. Australia, In: Advances in Agronomy, Volume 71, 2001.
7. YORDANOV, I. et al.: Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. In: Photosynthetica, 38 (1), 2000, s. 176-186.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory č. APVT-27-028704.

---

Adresa autorov:

Ing. Eleonóra Krivosudská, PhD., doc. Ing. Marián Brestič, CSc., Katedra fyziológie rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, e-mail: Eleonora.Krivosudska@uniag.sk