



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. - DRAGÚŇ, M.: Proteomická klasifikácia samoopelivých línií 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. – DEBREOVÁ, 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 selekcie 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 β -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. - KUČTA, T. - SIEKEL, P.: Využitie metódy RAPD pri štúdiu evolúcie pšenice dvojrznej [<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 okrúhloľstvej (<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 ₂ a BC ₁ 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 antioxidačnej 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

MODELOVANIE A PREDIKCIA V ŠĽACHTENÍ RASTLÍN MODELLING AND PREDICTION IN PLANT BREEDING

Martin UŽÍK

In this paper possibilities of prediction of hybrid populations in F4 generation on the base of varieties effects are presented. Predicted values of hybrid populations were different from observed ones in F4, the most at wet gluten (72 % - 117.17 %) and the least at grain yield (95.86 % - 113.59 %).

Key words: wheat, F4 generation, varieties, hybrids, prediction, performance

Úvod

Modelovanie rastového a produkčného procesu rastlín nadobúda na význame pretože potreba informácií pre rozhodovanie v poľnohospodárstve rapídne rastie. Generovanie nových údajov a informácií získavaných len tradičným výskumom nedostačuje, pretože poľné experimenty sú obmedzené na určité miesto a čas a sú časovo náročné a drahé. Počítačový experiment sa môže vykonať 100 alebo 1000 krát pre rôzne podmienky. Modely, ktoré popisujú fyzikálne procesy ako napr. pôdne procesy a agrometeorologické podmienky sú dobre prijímané a využívané (HODGES et al., 1992), napr. problém globálneho otepľovania (ALEXANDROV, HOOGENBOOM, 2000), ale menej sú prijímané v agronómii a v šľachtení, kde prevláda názor, že model nemôže popísať taký zložitý systém ako je pôda – rastlina – atmosféra (BOOTE et al. 1996). Viaceré práce sa zaoberajú problémom ako inkorporovať do modelu fyziologické znaky (WHITE, HOOGENBOOM, 1996). Vyvinul sa model na inkorporáciu génových účinkov (HOOGENBOOM et al. 1997). S diferenciaciami medzi odrodami špecifikovanými len siedmimi génmi, ktoré sa dotýkajú fenológie, rastového habitu a veľkosti semena model GenGro vysvetlil 31 % pozorovanej variability pre úrodu semena, 58 % pre hmotnosť semena, 84 % pre termín kvitnutia, 52 % pre listový index a 36 % pre úrodu biomasy v dobe zrelosti, ale 0 % pre zberový index. Výsledky naznačili, že pre niektoré znaky prekvapujúco málo génov postačuje na simulovanie odrodových rozdielov podľa modelu BEANGRO. Podobné modely môže byť vyvinuté pre ďalšie plodiny. MAVROMATIS et al. (2001, 2002) uvádzajú postup ako odhadnúť genetické koeficienty z odrodových pokusov. Boli vypracované viaceré modely ako BEANGRO (HOOGENBOOM et al., 1994), GenGro (WHITE, HOOGENBOOM, 1996), CERES atď.

Použitie odrôd so známym genotypom (rht, Ppd, Vrn ai.) v simulačných modeloch umožňuje testovať hypotézy o genetickom základe adaptácie odrôd na rozličné podmienky prostredia.

Pri modelovaní rovnako ako pri poľných experimentoch pozorujeme fenotyp rastliny, ktorý je determinovaný genotypom, prostredím a interakciou genotyp x prostredie. Algoritmus simulačného modelovania musí zahrňovať génový efekt, efekt prostredia a interakciu génového efektu a efektu prostredia ($P = g + E + G \times E + e$).

Etapy šľachtenia odrody

V procese šľachtenia môžeme rozlíšiť tri etapy:

1. etapa – zhromažďujú sa údaje o rodičovských odrodách s cieľom vytvoriť najvhodnejšie páry pre hybridizáciu – efektívne kombinácie kríženia.
2. etapa – súbor hybridných populácií sa skúša a postupne selektuje počas generácií F₂-F₅ na detekciu - hybridných populácií s efektívnym výberovým potenciálom.
3. etapa – výsledky firemných pokusov, ŠOP ai. umožnia definitívne označiť efektívne kríženia.

Na analýzu genetického založenia rodičov boli vypracované veľmi zložené, sofistikované modely (MATHER, JINKS 1971, FALCONER 1989, NYQUIST, 1991), ktoré umožňujú separovať variáciu genetickú od prostredia, odhadnúť aditívnu variáciu, koeficient dedivosti a genetický zisk zo selekcie

$$R = i \cdot \sigma_p \cdot h^2 = i \cdot \sigma_A \cdot h$$

Uvedené modely nevyhovujú pre širšie použitie v šľachtení, pretože analyzujú len obmedzený počet rodičov (5 - 10) a najmä je potrebné vykonať hybridizáciu. Naším cieľom je z veľkého počtu odrôd a bez hybridizácie (ktorú nahradí modelovanie) odhadnúť najvhodnejšie, potenciálne efektívne kombinácie kríženia.

Koncept efektívnych krížení

Koncepcia efektívnych krížení vychádza z toho, že parametre sa zisťujú v dvoch etapách, tak ako to odpovedá schéme selekcie. Odhad μ a a_{ij} môžeme získať z parametrov odrôd, odhad e_{ij} – môžeme získať len z hybridizácie, teda v ďalšej etape (UŽÍK, 2004).

Budeme sa zaoberať odhadom parametrov v prvej etape, postupom ako bol uvedený v predchádzajúcej práci (UŽÍK, 2005).

Materiál a metódy

Pokusy s rodičovskými odrodami a ich hybridnými kombináciami (kríženia) boli založené metódou α -design v roku 2004/05 na 3 miestach (parcela 10 m², počet opakovaní=2). Predmetom analýzy je len pokus v Borovciach. Okrem obligátnych znakov analyzuje sa úroda zrna, obsah bielkovín, obsah mokrého lepku, stupeň tvrdosti (NIRs), výška rastlín a SPAD index. Zo súboru rodičovských odrôd sme odhadli odrodové efekty prvého a druhého rodiča, ktoré sme využili na odhad predikovaných hodnôt hybridných kombinácií (tab. 3).

Rozdiel medzi hybridnými populáciami a priemerom rodičov sme označili ako odchýlku od aditivity. Vzťahy medzi diferenciami od aditivity a znakmi hybridnej populácie – pozorovanej sú uvedené v tab. 1.

Vzťahy pre jednotlivé znaky medzi priemerom rodičov ako nezávislou premennou a ich hybridných kombinácií F4, sú uvedené v tab. 2.

Vzťahy medzi pozorovanými a predikovanými hodnotami hybridných kombinácií F4, sú uvedené v tab. 4.

Výsledky a diskusia

V publikovanom príspevku (UŽÍK, 2005) sme v generácii F2 zistili heterózný efekt v každom znaku. Odhad populačného priemeru μ a efektu aditivity a_{ij} bol v generácii F₂ skreslený prítomnosťou heterózy, ktorá nebola rovnaká pri všetkých kombináciách. V tomto príspevku v generácii F4 test na aditivitu naznačil, že rozdiely od aditivity neboli významné ani v jednom znaku. Napriek tomu je zaujímavé, že medzi odchýlkami od aditivity, a hodnotami HP boli vysoké korelácie pre úrodu zrna ($r = 0,713$), pre obsah bielkovín ($r = 0,506$), pre výšku rastliny ($r = 0,892$), pre SPAD index ($r = 0,769$) a nízky a záporný pre mokrý lepok ($r = -0,210$). Výsledky naznačujú, že v uvedených znakoch potenciál pre selekciu je úmerný diferencii od aditivity, prípadne absolútnej hodnote hybridnej populácie (tab. 1).

Tabuľka 1: Vzájomné vzťahy medzi diferenciou od aditivity (ad) a znakmi hybridnej populácie – pozorovanej (po)

Znak	t.ha ⁻¹ po	bielkoviny po	mokrý lepok po	tvrdosť po	výška po	SPAD po
t.ha ⁻¹ ad	0,713	0,352	0,314	0,207	0,003	0,472
bielkoviny ad	0,150	0,506	0,571	0,346	0,150	-0,044
mokrý lepok ad	0,062	-0,112	-0,210	-0,107	-0,050	0,516
tvrdosť ad	0,092	0,615	0,603	0,427	0,172	-0,096
výška ad	0,048	0,435	0,177	0,629	0,892	0,177
SPAD ad	0,400	0,112	-0,056	-0,001	-0,087	0,769

Vzájomné vzťahy medzi znakmi HP a rodičov (tab. 2)

Ďalší predpoklad modelu je, že medzi priemernými znakmi rodičov $R_{1\bar{2}}$ a znakmi hybridných populácií HP sú kladné vzťahy. Silné vzťahy medzi rodičmi a HP naznačujú možnosť predikcie charakteristík HP na základe hodnôt rodičov. Ako je zrejmé z tab. 2, vzťahy medzi priemerom rodičov a ich kríženia v generácii F4 boli stredne silné, slabšie ako sme zistili v F2 generácii (UŽÍK, 2005), avšak stále využiteľné pre predikciu. Slabý bol vzťah pre obsah mokrého lepku.

Tabuľka 2: Vzájomné vzťahy medzi znakmi rodičov (priemer) a kríženia F4 generácie

Znak	b	r	R ² %
Úroda zrna t.ha ⁻¹	0,646 ⁺	0,472 ⁺	22,3
Obsah bielkovín	0,612 ⁺⁺	0,579 ⁺⁺	33,5
Obsah mokrého lepku	0,283	0,294	8,6
Stupeň tvrdosti	0,914 ⁺⁺⁺	0,835 ⁺⁺	69,7
Výška rastliny	1,227 ⁺	0,559 ⁺	31,2 ⁺
SPAD index	0,645 ⁺⁺⁺	0,670 ⁺⁺	45,02

Predikcia – modelovanie

Doteraz sme analyzovali situáciu, keď parametre pre predikciu boli odvodené zo vzťahov medzi rodičmi $R_{1\bar{2}}$ a hybridnými populáciami HP

$$Y_{ij} = k + b_1R_1 + b_2R_2 = k + b R_1 R_2$$

Bez hybridných populácií (HP) predikčná rovnica alebo koeficienty b_1 a b_2 by sa nedali odhadnúť. Predikovať HP podľa R_1 a R_2 je možné, ale je to neúčelné, v prípade, že HP je už vytvorená, potom priame

hodnotenie HP je spoľahlivejšie a jednoduchšie ako nepriame podľa oboch rodičov. Potrebné je to len pre overenie modelu.

Potrebujeme parametre nezávisle od HP, ale vhodné na modelovanie výkonnosti HP, teda skôr ako HP reálne vytvoríme.

Odrodové efekty

Za charakteristiky nezávislé od HP môžeme považovať odrodové charakteristiky, z ktorých môžeme odhadnúť populačný priemer a aditívne efekty (odrodové efekty) v rovnici

$$G_{ij} = \mu + a_{ij} + e_{ij}$$

Na základe odrodových efektov a efektov lokalít sme odhadli predikované hodnoty hybridných populácií podľa rovnice $P_{ij} = \mu + R_i + R_j + E_k$

Tabuľka 3: Priemerné hodnoty predikovaných populácií v absolútnych hodnotách a v % pozorovaných hodnôt HP

HP	Predikované – absolútne hodnoty					
	t.ha ⁻¹	Bielkoviny	Mokrý lepok	Tvrdosť	Výška	SPAD
1	8,44	11,74	20,45	72,16	102,51	44,23
19	9,00	11,26	23,16	65,84	130,94	51,28
32	9,40	12,50	24,71	80,01	97,18	47,08
40	9,05	13,27	28,92	72,19	103,84	53,28
53	9,71	13,68	27,86	70,41	95,09	45,58
62	9,46	13,24	26,23	77,05	99,76	49,28
71	9,01	12,86	27,32	67,89	98,50	46,83
77	7,61	14,44	31,93	88,76	101,84	51,33
89	7,72	10,45	24,68	39,71	80,34	41,98
	Predikované v % (100 % = pozorované HP)					
1	95,86	85,75	72,29	88,47	81,2	103,23
19	100,9	90,04	87,11	90,29	109,42	103,81
32	113,59	100,39	98,15	104,11	75,43	103,02
40	105,85	112,25	114,48	104,85	84,31	106,03
53	107,56	104,93	109,68	95,52	77,26	102,89
62	98,78	104,40	102,74	104,76	89,4	111,25
71	96,01	103,53	105,27	96,83	88,22	104,07
77	92,36	107,26	117,17	109,02	84,28	99,67
89	98,41	88,77	92,57	67,69	82,83	87,92

Vzťahy medzi hodnotami predikovaných HP a pozorovaných HP (tab. 4)

Vzťah medzi pozorovanými a predikovanými hodnotami hybridných krížení naznačil mimoriadne vysokú spoľahlivosť predikcie a to pre obsah bielkovín až na 71 %, obsah mokrého lepku na 83,7 %, čo je prekvapujúce, nakoľko vzťah medzi hybridnými populáciami a rodičmi bol slabý. Podobne vysokú spoľahlivosť sme zistili pre stupeň tvrdosti 62,8 %, nízku pre SPAD index 26 %.

Tabuľka 4: Vzťah medzi pozorovanými a predikovanými hodnotami HP v F4

Znak	b	r	R ² %
Úroda zrna t.ha ⁻¹	0,056	0,105	1,10
Obsah bielkovín	0,648 ⁺⁺⁺	0,843 ⁺⁺	71,2 ⁺⁺
Obsah mokrého lepku	0,738	0,915	83,7
Stupeň tvrdosti	0,313	0,792	62,8
SPAD index	0,533	0,510	26,0

Selekcia na viac znakov - modelovanie

Selekcia je akumulácia priaznivých allel a tiež kombinácia viacerých znakov. Selekcia na jeden znak v praktickom šľachtení prichádza do úvahy zriedkavo. Pokiaľ sú medzi znakmi kladné vzťahy selekcia nerobí problémy. Kombinácia znakov spôsobuje problémy ak sú medzi znakmi záporné vzťahy. Na rozdiel od F2 (UŽÍK, 2005) vzťahy medzi úrodou a ukazovateľmi kvality neboli kritické a preto ich neuvádzame.

Záver

Cieľom riešenia bola možnosť predikovať efektívne kombinácie kríženia na základe informácií o rodičovských odrodách.

Medzi priemernou hodnotou znakov rodičov a ich hybridných populácií sme zistili stredne silné až silné vzťahy v závislosti od znaku a od prostredia.

Výkonnosť hybridných populácií sa môže odhadnúť na základe populačného priemeru a odrodových efektov, ktoré sa dajú určiť zo súboru rodičovských odrôd.

Rodičovské odrody je súbor odrôd, ktorý bude použitý v programe hybridizácie. Odrody, ktoré pre ich pozitívne rodičovské efekty opakovane zaradujeme do hybridizácie označujeme ako elitné odrody.

Vzhľadom na významné efekty interakcie $G \times E$ spoľahlivosť odhadu výkonnosti hybridných populácií sa zvyšuje testovaním súboru rodičovských odrôd na viacerých miestach.

Z údajov hybridných populácií generácie F4 je možné odhadnúť tiež rodičovské efekty, ktoré môžeme definovať ako realizované odrodové efekty v hybridoch.

Literatúra

1. ALEXANDROV, V.A. - HOOGENBOOM, G.: Vulnerability and adaptation assessments of agricultural crops under climate change in the Southeastern USA. In: Theor. Appl. Clim., 67, 2000, s. 45-63.
2. BOOTE, K.J. - JONES, J.W. - PICKERING, N.B.: Potential uses and limitation of crop models. In: Agron. J., 88, 1996, s. 704-716.
3. FALCONER, D.S.: Introduction to Quantitative Genetics, 3rd Ed. Longman Press, London, 1989.
4. HODGES, T. - JOHNSON, S.L. - JOHNSON, B.S.: A modular structure for crop simulation models: Implemented in the SIMPOTATO model. In: Agronomy J., 84, 1992, s. 911-915.
5. HOOGENBOOM, G. - WHITE, J.W. - ACOSTA-GALLEGOS, J. - GAUDIÉL, R.G. - MYERS, J.R., SILBERNAGEL, M.J.: Evaluation of a crop simulation model that incorporates gene action. In: Agron. J., 89, 1997, s. 613-620.
6. HOOGENBOOM, G. - WHITE, J.W. - JONES, J.W. - BOOTE, K.J.: BEANGRO: A process-oriented dry bean model with a versatile user interface. In: Agron. J., 86, 1994, s. 182-190.
7. MATHER, K., JINKS, J.L., 1971: Biometrical genetics. Chapman and Hall Ltd London.
8. MAVROMATIS, T. - BOOTE, K.J. - JONES, J.W. - IRMAK, A. - SHINDE, D. - HOOGENBOOM, G.: Developing genetic coefficients for crop simulation models with data from crop performance trials. In: Crop Sci., 41, 2001, s. 40-51.
9. MAVROMATIS, T. - BOOTE, K.J. - JONES, J.W. - WILKERSON, G.G. - HOOGENBOOM, G.: Repeatability of model genetic coefficients derived from soybean performance trials across different states. In: Crop Sci. 42, 2002, s. 76-89.
10. NYQUIST, W.E.: Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. In: Crit. Rev. in Plant Sci. 10, 1991, s. 235-322.
11. UŽÍK, M.: Využitie údajov o genetických zdrojoch na predikciu znakov hybridných kombinácií. In: Hodnotenie genetických zdrojov rastlín : Zborník zo 4. odborného seminára s medzinárodnou účasťou. Piešťany : VÚRV, 2005, s. 28-31.
12. UŽÍK, M.: Metodické a metodologické problémy šľachtenia samoopelivých plodín. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : Zborník z 11. odb. seminára 24. - 25. novembra 2004 / Ed. M. Užík. - Piešťany : VÚRV, 2004. s. 10 - 13.
13. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A. : Predikcia v šľachtení rastlín. 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.9-12
14. WHITE, J.W. - HOOGENBOOM, G.: Simulating effects of genes for physiological traits in a process-oriented crop model. In: Agron. J., 88, 1996, s. 416-422.

NOVÉ POZNATKY V OBLASTI ŠTÚDIA MOLEKULÁRNYCH MECHANIZMOV KLÍČENIA A PRERASTANIA ZRNA PŠENICE NEW CONCEPTS IN STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF GERMINATION AND SPROUTING OF WHEAT SEED

Ivan MICHALÍK - Dana URMINSKÁ

External application of morphoregulators (ABA, CCC, DMP) leads to amylolytic activity inhibition and subsequently to germination of winter wheat. On the other hand GA₃ stimulates increase in the alpha-amylase activity and the seed germination. Results confirmed the concept of GA₃ as the amylase gene inductor which is responsible for starting the process of germination and sprouting.

Key words: alpha – amylase, wheat, sprouting, germination, electrophoresis, glutenin subunits

Štúdium regulačných mechanizmov prechodu vyvíjajúceho sa embrya do fázy dormancie alebo prerastania predstavuje teoretický, ale predovšetkým hospodársky význam. Uvedené procesy bezprostredne súvisia s formovaním úrody a jej kvality. Absencia fázy dormancie a nefunkčnosť brzdiacich mechanizmov zodpovedných za klíčenie zvyšuje náchylnosť zrna na prerastanie, čo pri pestovaní obilnín má bezprostredný dopad na kvalitu úrody.

Semená mnohých druhov divo rastúcich rastlín sa vyznačujú vysokou úrovňou dormancie. Naproti tomu pre kultúrne druhy pestovaných plodín a najmä hexaploidné pšenice je charakteristická nízka úroveň dormancie, čo spôsobuje rýchly prechod embrya do fázy klíčenia. Tento jav spôsobuje pri pestovaní obilnín nežiadúci fenomén prerastanie (PHS pre harvest sprouting). Výskyt procesov PHS je možné určiť podľa nízkych hodnôt „číslo poklesu“. Pochopenie podstaty prerastania si vyžaduje poznať genetické a biochemické procesy a spôsoby regulácie embryogenézy a klíčenia. Na modele Arabidopsis bolo identifikovaných viac ako 30 genetických lokusov kontrolujúcich klíčenie.

Materiál a metódy

Pre testovanie vplyvu morforegulačných látok (kyselina abscisová, kyselina gibberelová, chlorchloridchlorid a dimetipine) na aktivitu alfa-amylázy počas klíčenia sme použili odrody ozimnej pšenice (Presto, Ibis, Caribo a BU-30). Klíčenie semena sa uskutočnilo v klimatizovanom boxe pri teplote 20° C ± 1 %. Semená pred ich naklíčením boli exponované počas 30 minút v nasledovných roztokoch: 0,05 % kyselina abscisová (ABA), 0,05 % kyselina gibberelová (GA₃), 1 % chlorchloridchlorid (CCC) a 1 % dimetipin (DMP). Vzorky semena počas klíčenia sme odoberali v nasledovných časových expozíciách 0, 24, 48, 96 a 168 hodín. Aktivita alfa-amylázy (alfa-1,4-glukán-glukanohydroláza-E.C. 3.2.1.1.) bola stanovená Spofa testom v 10 ml extrakte 0,2 mol.dm³ acetátového tlmivého roztoku o pH 5,5 z 2 g celozrnného šrotu. Komponentnú skladbu zásobných endospermových bielkovín sme stanovili metódou SDS-PAGE (ISTA).

Výsledky a diskusia

Vychádzajúc z aproximatívnej analógie procesov klíčenia a prerastania sme testovali účinok viacerých morforegulatorov na amylolytickú aktivitu počas klíčenia semien rozdielnych odrôd ozimnej pšenice. Experimentálny zámer modelového pokusu bol formulovaný s ohľadom na vysvetlenie štartovacích mechanizmov klíčenia, ale aj prerastania. Keďže katabolické reakcie klíčenia a prerastania sú biochemicky identické, potom i faktory, ktoré inhibujú klíčenie, zároveň inhibujú aj prerastanie. Inhibícia prerastania súvisí so stimuláciou embryogenézy a stabilizáciou dormancie semena a naopak. Z výsledkov testovania genotypov kvázi náchylných na prerastanie (BU-30) v porovnaní s relatívne odolnými (Ibis, Caribo a Presto) vyplýva, že u genotypu BU-30 je rýchlejší a väčší nárast aktivity alfa-amylázy už v počiatkových fázach klíčenia (obr. 1).

Je pozoruhodné, že testované odrody citlivo reagujú na exogénnu aplikáciu GA₃, čo sa prejavuje v náraste aktivity alfa-amylázy (obr. 2). Najmenší efekt GA₃ na stimuláciu amylolytickej aktivity v rámci súboru testovaných odrôd sa prejavil pri odrode Caribo. Na základe týchto výsledkov je možné hodnotiť odrodu Caribo v rámci testovaných odrôd za relatívne najrezistentnejšiu na prerastanie, čo zodpovedá i záverom TEMIRBEKOVEJ (1998). Naproti tomu biologicky aktívne látky typu ABA, CCC a DMP spôsobujú inhibíciu amylolytickej aktivity už po 24 hodinovej expozícii klíčenia (obr. 2). Tieto poznatky sú zhodné aj s výsledkami HILHORSTA a KARSEENA (1992) o tom, že ABA urýchľuje dozrievanie zrna a inhibuje klíčenie. Kvantitatívne vzťahy testovaných preparátov sú dobre viditeľné z výsledkov znázornených na obr. 3.

Stimulačný a inhibičný efekt aplikovaných preparátov na aktivitu α-amylázy počas klíčenia je viac menej zrovnateľný s odrodou náchylnou (BU-30) a kvázi tolerantnými na prerastanie (Caribo, Presto, Ibis). Z uvedeného vyplýva, že za priaznivých podmienok pre expresiu génov syntézy α-amylázy, ktoré môžu

byť indukované aj exogennými klimatickými faktormi, dochádza ku manifestácii klíčenia a prerastania nezávisle od genotypovej odlišnosti.

Elektroforetické analýzy komponentnej skladby zásobných endospermových bielkovín metódou SDS-PAGE vyhodnotené vo forme grafického záznamu elektroforegramov (obr. 4) potvrdili, že počas klíčenia semien následkom zvýšenej proteolýzy, dochádza ku výraznej hydrolyze glutenínových HMW subjednotiek. Počas klíčenia semena dochádza k nárastu absolútneho obsahu a percentuálneho podielu glutenínových LMW subjednotiek a frakcie monomerných gliadínov. Predpokladáme, že uvedené zmeny sú spôsobené zvýšenou hydrolyzou frakcie HMW. Z testovaných preparátov najväčší inhibičný účinok na hydrolyzu HMW- glutenínových subjednotiek vykazuje dimetipin (DMP). Inhibičný efekt klesá v poradí DMP – ABA – CCC. Z uvedeného je zrejme, že DMP, CCC a ABA v procesoch klíčenia pôsobia ako antagonisti GA₃. Účinok DMP je zrovnateľný s ABA, čo pravdepodobne súvisí s inhibíciou syntézy alfa-amylázy „de novo“. Okrem preparátov typu CCC a DMP existuje celý rad syntetických, ale aj prírodných látok, ktoré inhibujú aktivitu α -amylázy.

Koncentrácia kyseliny gibereľovej je rozhodujúcim činiteľom na spustenie procesov klíčenia a prerastania. GA₃ patrí medzi priame alebo sprostredkované induktory transkripcie amylázového génu. Naproti tomu látky typu ABA, CCC, DMP tým, že urýchľujú dozrievanie, pôsobia stimulačne na prechod zrna do fázy dormancie, čo sa pozitívne prejavuje v retardácii klíčenia a dozrievania.

Zamedzenie nežiadúcich procesov predčasného klíčenia počas embryogenézy alebo i počas skladovania zrna si vyžaduje stabilizáciu biochemických procesov, zodpovedných za dormanciu. V tomto smere sa žiada minimalizovať amylolytickú aktivitu v zrne (inhibícia α -amylázy), ale aj represia expresie génov tvorby α -amylázy „de novo“. Minimálna aktivita α -amylázy v zrne je dôkazom toho, že v zrne sa ukončili procesy dozrievania a zrno prechádza do fázy dormancie. Zároveň je to aj indícia toho, že sa nerealizovali nezvratné procesy prerastania.

Vysvetlenie a objasnenie molekulárnej podstaty klíčenia a prerastania si vyžaduje poznanie predovšetkým geneticko-biochemických procesov regulácie dozrievania a klíčenia. V ostatnej dobe výsledky práce najmä kolektívu HOLDSWORTH (1999) poskytujú pozoruhodné poznatky o identifikácii genetických lokusov a génov, zodpovedných za procesy prerastania. Niektoré z týchto génov boli klonované a ich analýza umožňuje objasniť genetickú interakciu transkripčných faktorov, induktorov a génov zodpovedných za tranzíciu dormancie na klíčnu rastlinu (MCCARTY, 1995; HOECKER a kol., 1995; HOLDSWORTH a kol., 1999; BAILEY a kol., 1999).

Existujú dôkazy o lokusoch a génoch, ktoré súvisia s vývinom embrya. Boli identifikované transkripčné faktory, ktoré sú zodpovedné za prerastanie. Vo všeobecnosti hodnotíme prerastanie ako dôsledok prerušenia fázy dozrievania, dezintegráciu embryonálneho vývinu zrna a narušenie anabolicko-katabolických procesov. Na tvorbe alebo prenose signálov od špeciálnych rastlinných hormónov (ABA a GA₃) sa podieľajú viaceré lokusy. V tomto smere GA₃ je aktivátor presnejšie induktor transkripcie amylázového génu, tvorby α -amylázy a tým i stimulácie klíčenia a prerastania. Mutácia lokusov asociovaných s tvorbou GA₃ spôsobuje výraznú redukciu klíčenia. Kolektív vedený Holdsworthom (3) identifikoval CTS lokus (*Arabidopsis comatose*), ktorý kontroluje klíčenie. Pritom sa zistilo, že CTS lokus kódujúci peroxizomálny proteín reguluje metabolizmus zásobných lipidov. Expresia CTS proteínu stúpa ihneď po napučaní semien náchylných na klíčenie. Existujú priame dôkazy o tom, že CTS lokus reguluje expresiu viacerých enzýmov (malátsyntáza, izocitrátligáza, tioláza). Genetická analýza potvrdila, že lokusy stimulujúce dormanciu embrya zároveň negatívne vplyvajú na expresiu CTS proteínu. Z uvedeného vyplýva, že **funkcia CTS lokusu spočíva v prerušení dormancie a v odštartovaní klíčenia a prerastania.**

Na príklade embrya kukurice HOLDSWORTH a kol. (1999) a BAILEY a kol. (1999) izolovali transkripčný faktor VP1 (*viviparus-1*), ktorý zohráva významnú úlohu pri stabilizácii dormancie zrna kukurice. Bolo dokázané, že mutanty kukurice bez VP1 tvoria nezrelé embryá, ktoré predčasne klíčia. Z uvedeného vyplýva, že VP1 reguluje expresiu génov bezprostredne spojených s procesmi dozrievania, s procesmi represie transkripcie amylázového génu a prechodom zrna do fázy dormancie. Je pozoruhodné, že hladina VP1 je modulovaná environmentálnymi podmienkami (najmä atmosférickými zrážkami a teplotou) v dobe dozrievania, čo bolo potvrdené aj našimi výsledkami (7). Okrem VP1 i ďalšie faktory ako LEC 1, 2, 3 a ABI3 sú považované za reálne markery dormancie a odolnosti rastlín na prerastanie.

Predpokladá sa, že CTS fenotypy hexaploidnej pšenice sú podobné s VP1 mutantami kukurice. Z výsledkov analýzy štruktúry homologických génov kukuričného VP1 transkriptu počas vývinu embrya vyplýva dôležité zistenie, že väčšina transkriptov je chybné „zostrihnutá“ v rámci posttranskripčnej úpravy hn RNA. Transkripty obsahujú ako inzercie intronných sekvencií, tak aj delecie kódujúcich fragmentov. Takto vytvorený transkript neobsahuje plnú genetickú informáciu pre tvorbu uceleného regulačného proteínu, čo je príčinou toho, že VP1 faktor nie je funkčný. Následkom uvedeného dochádza ku stimulácii klíčenia a prerastania.

Riešenie odolnosti genotypov pšenice na prerastanie predpokladá predovšetkým využitie metód génového inžinierstva pri realizácii prenosu génov typu VP1 z divokých druhov obilnín (napríklad ovsu) do genómu hexaploidnej pšenice.

Záver

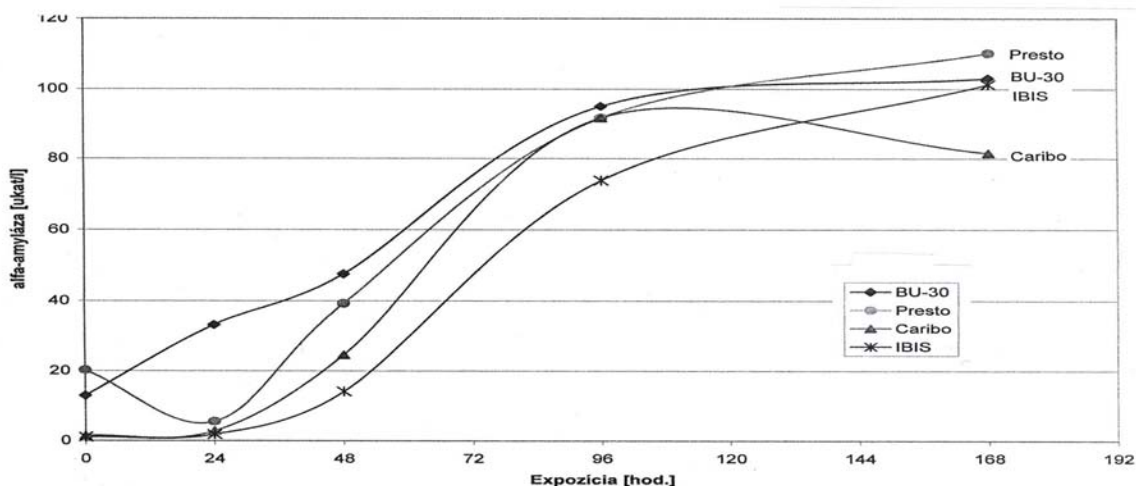
Exogenná aplikácia morforegulátorov (ABA, CCC, DMP) spôsobuje inhibíciu amylolytickej aktivity a následne aj procesov klíčenia zrna ozimnej pšenice. Naproti tomu kyselina gibberelová účinne stimuluje nárast aktivity alfa-amylázy a klíčenia.

Vychádzajúc z aproximatívnej analógie katabolicko-anabolických reakcií klíčenia a prerastania predpokladáme, že zvýšená hladina GA₃ plní úlohu induktora exprese amylázového génu a tým zodpovedá za odštartovanie procesov klíčenia a prerastania. Naproti tomu látky typu ABA, CCC, DMP stabilizujú fázu dormancie a tým zvyšujú odolnosť zrna na predčasné klíčenie.

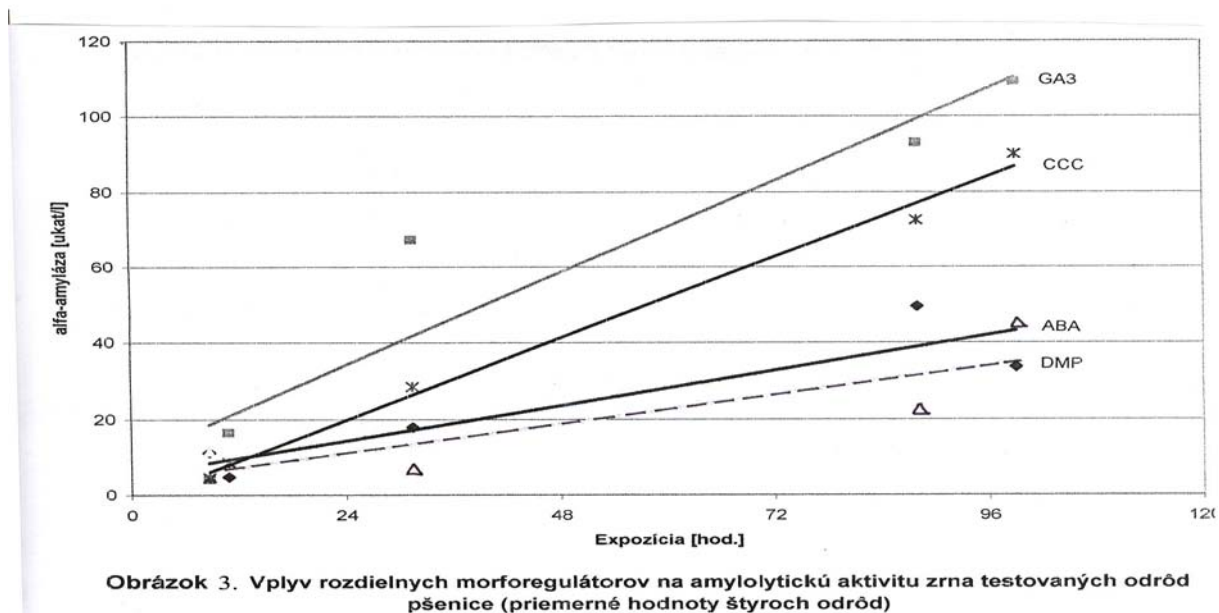
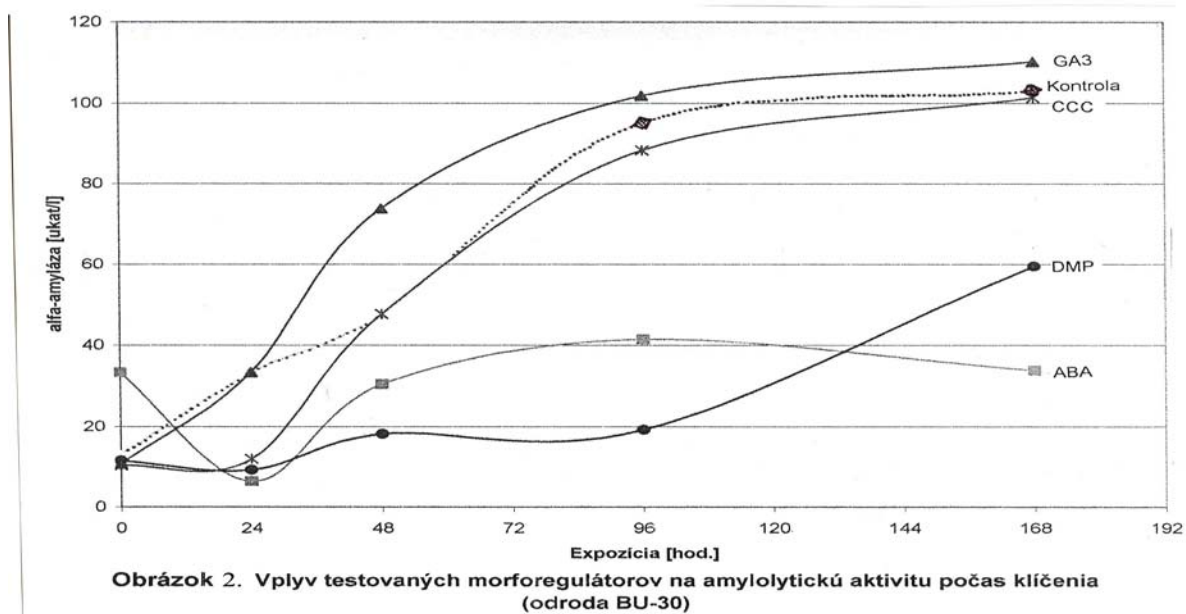
Z výsledkov testovania amylolytickej aktivity počas klíčenia jednotlivých odrôd ozimnej pšenice vyplýva, že v počiatočných fázach klíčenia najvyššiu reaktivitu v porovnaní s odrodami kvázi tolerantnými na prerastanie (Presto, Caribo, Ibis) vykazuje odroda BU-30.

Literatúra

1. BAILEY P.C. - MC KIBBIN, R.S. – LENTON, J. R. – HOLDSWORTH, M. J. – FLINTHAM, J.E. - GALE M. D.: Genetic map locations for orthoqous Vpl genes in wheat and rice. In: Theor. Appl. Genet., 98, 1999, s. 281-284.
2. HOECKER, U. – VASIL, I. K. - MC CARTY, D. R.: Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Vivaparous of maize. In: Gene Dev., 9, 1995, s. 2459 – 2469.
3. HOLDSWORTH, M. J. – KURUP, S. - MC KIBBIN, R.S.: Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. In.: Trends Plant Sci.Rev.,vol. 4, 1999, No. 7, s. 275-279.
4. MC CARTY: Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. In: Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol., 46, 1995, s. 71-93.
5. MICHALÍK, I. – PEŤOVSKÝ, P.: An interaction between amylase activity and content of store substances in wheat grain. In: Acta fytotechnica et zootechnica, 2, 1998, (1), s. 5 – 8.
6. MICHALÍK, I.: Molekulárna podstata procesov prerastania zrna vo vzťahu ku chlebopekárskej kvalite pšenice. In: Zborník: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín Piešťany : VÚRV, máj 2002, s.13-17.
7. MICHALÍK, I. – UŽÍK, M. – FENCÍK, R.: Vplyv genotypu a agroekologických podmienok pestovania pšenice na variabilitu čísla poklesu, Agriculture (Poľnohospodárstvo) 50, 2004, (10-12), s. 209-219.
8. MUCHOVÁ, Z.: Faktory ovplyvňujúce technologickú kvalitu pšenice a jej potravinárske využitie. Nitra : SPU, 2001, 112 str. ISBN 80-7137-923-9
9. TEMIRBEKOVA, S.K.: On the problem of enzyme-mycotic seed exhanstion in plant growing, Moskaw, Rosselkhozakademie, 1998, 306 str. ISBN 5-85941-002-6
10. URMINSKÁ, D. – MICHALÍK, I., 1996: Analysis of starter enzymes of wheat grain germination, In: Rostlinná výroba, 3, 1996, (42), s. 9-101.

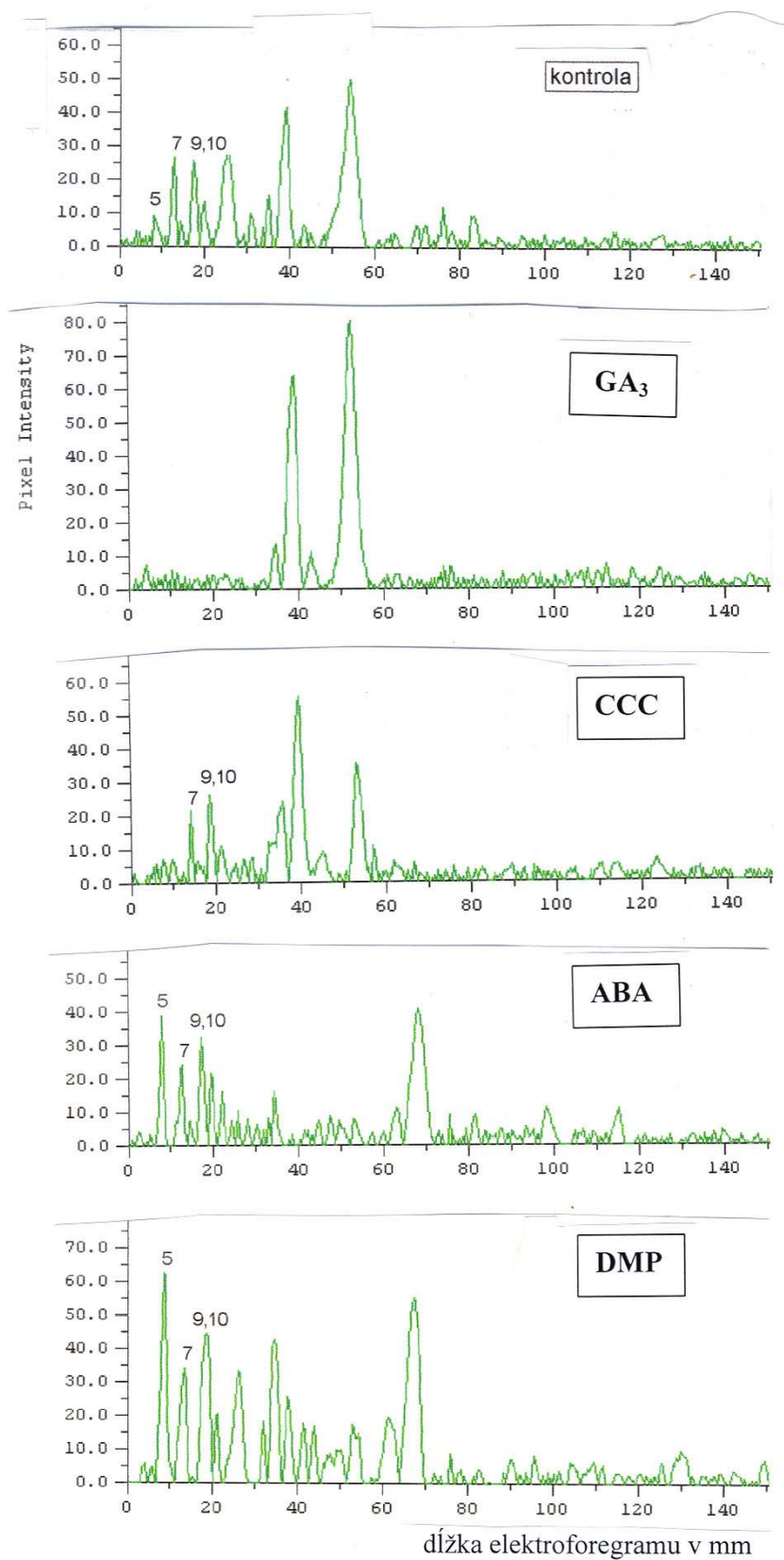


Obrázok 1. Dynamika amylolytickej aktivity počas klíčenia jednotlivých odrôd ozimnej pšenice (kontrolný variant)



Adresa autora:
prof. Ing. Ivan Michalík, DrSc., doc. RNDr. Dana Urminská, CSc., Katedra biochémie a biotechnológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra.

Obr. 4. Vplyv testovaných preparátov (ABA, GA₃, CCC, DMP) na elektroforetické spektrum glutenínových bielkovín (expozícia 168 hod., BU-30; SDS-PAGE-ISTA)



CELIAKÁLNE AKTÍVNE BIELKOVINY V CEREÁLIÁCH A PSEUDOCEREÁLIÁCH. COELIAC ACTIVE PROTEINS IN CEREALS AND PSEUDOCEREALS.

Zdenka GÁLOVÁ - Ivan MICHALÍK - Ján HOBLÍK - Milan CHŇAPEK - Želmíra GREGÁŇOVÁ

The different species of cereals and pseudocereals on the presence of coeliac active proteins were analysed. Results showed that wheat, barley and rye are not suitable on the production of products for coeliac patients. On the other hand the analysed pseudocereals are without coeliac active proteins and can be used in the diet of adults with coeliac disease. The secondary structure of gliadin proteins on the base of the UV CD spectra was determined. Wheat gliadins showed alpha-helix structure, which is stable in the different ionic strength and in the different pH. The UV CD spectrum of synthetical tetrapeptides (PSQQ, PQQQ, SQQQ, PKQQ) presented the irregular structure.

Key words: cereals, pseudocereals, SDS-PAGE, Elisa kit, UV CD spectrum

Úvod

Celiakia alebo glutén-senzitívna enteropatia je zápalové chronické ochorenie vstrebávania tenkého čreva, zapríčinené dedičnou precitlivosťou na gliadín, ktorý je súčasťou gluténových bielkovín. Histologicky je charakterizovaná poškodením klkov t.j. nízkym vzrastom klkov vo vysokom pomere a vzrastom vnútroepitelových lymfocytov. Doporučenou terapiou u takto postihnutých pacientov je vylúčenie gliadínu z diéty.

Cieľom práce bolo analyzovať viaceré druhy cereálií a pseudocereálií na prítomnosť celiakálne aktívnych bielkovín a na základe výsledkov doporučiť niektoré z nich ako potenciálny potravinový zdroj pre prípravu bezpečných potravín.

Materiál a metódy

Analýzovaný bol súbor cereálií a pseudocereálií získaný z Génovej banky semenných druhov ČR v Prahe. Frakčná skladba bielkovinového komplexu zrna bola realizovaná sekvenčnou extrakciou podľa metodiky MICHALÍKA (2002). Zásobné bielkoviny boli extrahované z individuálnych zŕn a separované metódou ISTA SDS-PAGE (WRIGLEY, 1992). Klasifikácia HMW-GS sa realizovala podľa katalógu PAYNE et al. (1987) a vyhodnotené boli pomocou programu GRAB-IT 259.

Celiakálne aktívne bielkoviny boli testované Elisa testom Transia Plate Gluten od firmy Diffchamb SA, Lyon, Francúzsko. Konformačný stav gliadínových bielkovín bol stanovený meraním UV CD spektier na JASCO spektropolarimetri model 720, výrobca Japonsko.

Výsledky a diskusia

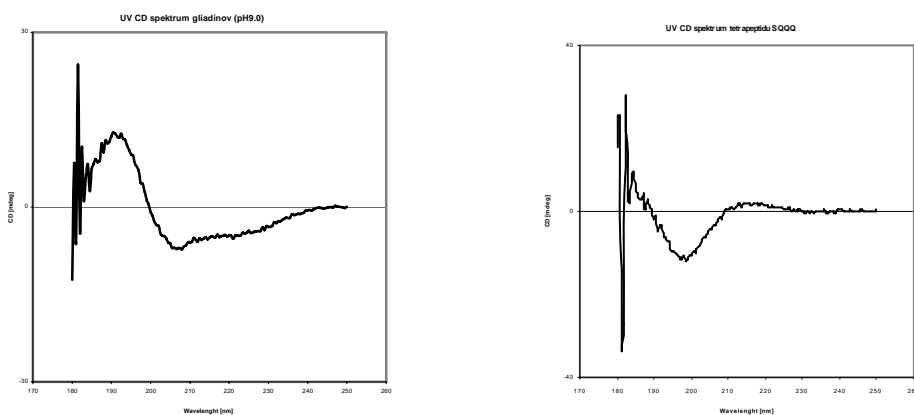
Celiakia sa klinicky prejavuje množstvom príznakov od asymptomatických cez únavu, nevyjasnené brušné príznaky, úbytok hmotnosti, hnačka, porucha vstrebávania, hnačka so šedou stolicou s nestráveným tukom až po nedostatok dôležitých vitamínov a minerálov. Príznaky a abnormálna histológia tenkého čreva rozhodujú o odstránení niektorých bielkovín ako sú gliadíny pšenice, sekalíny raže, hordeíny jačmeňa, aveníny ovsa z výživy. Na druhej strane, zásobné bielkoviny iných plodín ako sú zeíny kukurice, panicíny prosa, kefaríny sorga a oryzeíny ryže nevykazujú celiakálnu aktivitu, čo bolo potvrdené viacerými autormi (COLLIN, HAKAMEN et al., 2001; PETR et al., 2003).

V práci sa hodnotí variabilita komponentnej skladby bielkovinového komplexu zrna niektorých cereálií a pseudocereálií z hľadiska ich výživnej kvality a determinácie celiakálne aktívnych bielkovín. Ako vyplýva z viacerých prác (PETR et al., 2003; MICHALÍK et al., 1994), pseudoobilniny môžu byť úspešne využité vo výžive ľudí pre potreby bezpečnej diéty. Analyzované genotypy sa líšia nielen obsahom hrubých bielkovín, ale aj frakčnou skladbou bielkovinového komplexu. Z výsledkov vyplýva, že pseudoobilniny sa vyznačujú odlišnou frakčnou skladbou v porovnaní s konvenčnými obilninami. Pre viaceré druhy pseudocereálií ako sú quinoa, láskavec, pohánka, k tzv. zásobným bielkovinám patria cytoplazmatické bielkoviny reprezentované frakciou globulínových bielkovín.

Elisa analýzy potvrdili predpoklad, že cirok, proso, bér vlašský, rosička krvavá, pohánka, quinoa a amarantus, kde je zastúpenie celiakálne aktívnych agens nízke alebo nebolo detegované, sú pre bezpečnú diétu vhodné. Ďalšie analyzované plodiny ako sú pšenica jednozrnová, pšenica dvojzrnová, pšenica špalda, kamut, pšenica letná a triticales rizikové pre diétu pacientov chorých na celiakiu (MICHALÍK, 1994; PETR et al., 2003; MOWAT, 2003; GÁLOVÁ et al., 2005). Celiakálne aktívne bielkoviny v zrne ovsa nepresahovali limitné hodnoty (0,02 %) pre potreby bezpečnej diéty, avšak na využitie tejto plodiny pre výrobu potravín pre chorých na celiakiu neexistujú jednoznačné názory (MICHALÍK, 1994).

V ďalšom bol stanovený konformačný stav gliadínových bielkovín meraním UV CD spektier (spektrum cirkulárneho dichroizmu) na JASCO spektropolarimetri model 720, výrobca Japonsko, v Laboratóriu molekulárnej biofyziky a farmakológie Inštitútu biofyziky ČAV v Brne. Testoval sa vplyv rozdielnych rozpúšťadiel, ktoré sa vyznačujú nízkou (TFE-trifluoretanol, etándiol) resp. vysokou (voda, rôzne izotonické

roztoky) dielektrickou konštantou na konformačný stav (alfa-helix resp. beta-závit) gliadínu, pričom UV CD spektrá boli merané v rozsahu 180 – 260 nm.



Z dosiahnutých výsledkov získaných meraním UV CD spektier je možné konštatovať, že gliadíny pšenice sa vyznačujú alfa-helixovou štruktúrou, ktorá sa nemení vplyvom rôznej iónovej sily prostredia, ani vplyvom rozdielneho pH.

UV CD spektrá boli merané aj v syntetických tetrapeptidoch, ktoré boli zakúpené od firmy Sigma o sekvenci aminokyselín PSQQ (Pro-Ser-Gln-Gln), PQQQ (Pro-Gln-Gln-Gln), SQQQ (Ser-Gln-Gln-Gln), PKQQ (Pro-Lys-Gln-Gln), ktoré podľa literárnych prameňov (Michalík, 1994), ale aj stanovením ich celiakálnej aktivity pomocou Elisa testov vykazujú celiakálnu aktivitu. Získané UV CD spektrá uvedených tetrapeptidov sa vyznačovali nepravidelnou štruktúrou.

Záver

Z analyzovaných pseudocereálií, vhodných na prípravu diétnej potraviny pre pacientov s celiakiou možno odporučiť quinou, cirok, pohánku, amarantus, rosičku krvavú a proso. Tieto druhy nevykazujú celiakálne aktívne bielkoviny. Ďalšie analyzované druhy pšenice, tritikale a ovsu sa ukázali pre diétu rizikové.

Literatúra

1. COLLIN, P.-HAKAMEN et al.: Scand J Gastroenterol, vol.5, 2001, pp.558-560.
2. GÁLOVÁ, Z. et al.: Risk Factors of Food chain. Nitra, 2005, pp. 54-58.
3. MICHALÍK, I.: Agriculture, 2002, vol. 48, pp. 333-341.
4. MICHALÍK, I.: Výživa a zdravie, 1994, vol. 39, pp. 159-160.
5. MOWAT, A.M.: The Lancet, vol. 361, 2003, pp. 1290-1292.
6. PAYNE, P. I. et al.: Science Food. Agriculture, vol. 40, 1987, 8, pp. 51 - 65.
7. PETR, J. et al.: Scientia Agriculturae Bohemica, 2003, vol. 34, pp. 8-15.
8. WRIGLEY, C. W.: Seed analysis. Berlin, Springer Verlag, 1992, pp. 17-41.

Poznámka: Práca bola podporená štátnym podprogramom výskumu a vývoja „Potraviny - kvalita a bezpečnosť“ č. 2003SP270280E010280E01 a VEGA projektu č. 1/0599/03

Adresa autorov:

Zdenka Gálová, Ivan Michalík, Ján Hoblík, Milan Chňapek, Želmíra Gregáňová, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, kontakt: Zdenka.Galova@uniag.sk

PROTEOMICKÁ KLASIFIKÁCIA SAMOPELIVÝCH LÍNIÍ A ICH DVOJLÍNIOVÝCH HYBRIDOV KUKURICE SIATEJ (*ZEА MAYS L.*) IZOENZÝMOVÝMI MARKERMI – REALITA A PERSPEKTÍVY VYUŽITIA PROTEOMIC CLASSIFICATION OF SELF-POLLINATED LINES OF MAIZE (*ZEА MAYS L.*) AND THEIR SINGLE CROSSES – REALITY AND PERSPECTIVES OF UTILIZATION

Pavol MÚDRY - Marián DRAGÚŇ

In this work 18 self pollinated lines (L) of maize (Zea mays L.) and their 13 single crosses (Sc) have been analysed by electrophoretic profiling of 11 enzymes – acid phosphatase (ACP), alcohol dehydrogenase (ADH), catalase (CAT), diaphorase (DIA), β -glucosidase (GLU), glutamateoxaloacetate transaminase (GOT), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD), phosphoglucoisomerase (PGI) and phosphoglucomutase (PGM). All biological materials to be analysed were from breeding programme of SEMPOL Holding (Trnava). From the results it is clear that all samples of biological materials (L and their Sc) were homogeneous. In each from the 13 Sc, male component, female component and their Sc were distinguishable each other by means of this proteomic classification. Eleven from the thirteen Sc and fourteen from the eighteen lines had original fingerprints. Loci: Cat3:9, Dia2:4, Got1:4, Got2:4, Got3:4, Mdh1:6, Mdh4:12, Mmm:M, Pgd2:5 a Pgm1:9 were monomorphic (frequency = 1) and in this set of analysed lines had no discriminatory role. There were detected alleles at individual loci – Acp1 (alleles 2, 3, 4), Adh1 (4, 6), Cat3 (9), Dia1 (8, 12), Dia2 (4), Glu1 (2, 6-7), Got1 (4), Got2 (4), Got3 (4), Idh1 (4, 6), Idh2 (4, 6), Mdh1 (6), Mdh2 (3, 6), Mdh3 (16, 18), Mdh4 (12), Mdh5 (12, 15), Mmm (M), Pgd1 (2, 3.8), Pgd2 (5), Pgi1 (4, 5), Pgm1 (9) and Pgm2 (1, 4, and 8). New, unique allele/alleles were not identified. In this article applicability of proteomic classification of maize by enzyme polymorphism as very efficient tool for checking genotypic identity and homogeneity of Slovak maize genotypes for genetic, breeding, seed improvement, ecophysiology and other research purposes are confirmed.

Key words: maize (*Zea mays L.*), self-pollinated lines, single crosses, electrophoresis, isoenzymes, molecular markers

Úvod

História výskumu polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín má už temer päťdesiat rokov. Prvá práca, ktorá poukazovala na možnosť využitia multiplicity enzýmov v genetike a v šľachtení sa týkala práve kukurice (SCHWARTZ, 1960). Dnes už nikto nepochybuje o možnostiach praktického využitia polymorfizmu enzýmov v genetike, šľachtení a v semenárstve väčšiny kultúrnych rastlinných druhov, i keď kukurica bola priekopníckou plodinou.

V priebehu uplynulých štyroch desaťročí bolo publikovaných množstvo prác týkajúcich sa tvorby štandardizovanej metódy analýzy polymorfizmu enzýmov kukurice a jeho genetickej interpretácie, dokumentujúcich význam a výhody elektroforetických analýz pri určovaní genotypovej identity a homogenity partií osív (resp. odrodovej pravosti), ich zachovávaní a právnej ochrany (ORMAN a kol., 1991; SMITH a kol., 1986, 1987, 1992; MÚDRY, JURÁČEK, 1994, 1998). Neoddeliteľnou súčasťou je aj štúdium rozsahu variability polymorfizmu enzýmov a mapovanie národných genofondov kukurice pre účely poznania rozsahu ich využitia v šľachtení aj prostredníctvom obohatenia zárodočnej plazmy o lokusy a alely s veľmi malou frekvenciou výskytu.

Možnosti využitia polymorfizmu enzýmov ako molekulárnych markerov v genetike, šľachtení a v iných teoretických a aplikačných rovinách vyplýva z týchto atribútov: sú to vždy bielkoviny s katalytickým účinkom, syntéza enzýmov je bezprostredne pod dobre známu genetickou kontrolou, nezávislosť expresie izoenzýmov od vplyvu faktorov vonkajšieho prostredia (sú stabilným deskriptorom genotypu), variabilita izoenzýmov pri kukurici pre rozlišovanie genotypov je dostatočne veľká a prevažne kodominantná expresia polymorfizmu enzýmov.

Cieľom výskumu tejto práce bolo: zmapovať a určiť rozsah polymorfizmu enzýmov najaktuálnejšieho súboru línií a ich dvojlíniových hybridov zo šľachtiteľského programu Sempol Holding a. s. Trnava, určiť mieru homogenity ich vzoriek a posúdiť do akej miery umožňuje variabilita polymorfizmu enzýmov jeho využitie v rôznych teoretických a aplikačných rovinách.

Materiál a metódy

V rokoch 2003 – 2005 sme uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov 18 samoopelivých línií (L) a ich 13 dvojlíniových hybridov kukurice siatej (*Zea mays L.*), ktorých biologickú identitu garantovali a pre experimentálnu prácu poskytli Ing. Miloslav Masnica, PhD. a Ing. Rudolf Izakovič, CSc. (Sempol Holding a. s., Trnava). Na analýzu polymorfizmu enzýmov kyslej fosfatázy (ACP, E.C. 3.1.3.2), alkoholdehydrogenázy (ADH, E.C. 1.1.1.1), katalázy (CAT, E.C. 1.1.1.6), diaforázy (DIA, E.C. 1.6.99.2), β -glukozidázy (GLU, E.C. 3.2.1.21), glutamát-oxaloacetyltransaminázy (GOT, E.C. 2.6.1.1), izocitrátdehydrogenázy (IDH, E.C. 1.1.1.42), malátdehydrogenázy (MDH, E.C. 1.1.1.37), 6-fosfogluconátdehydrogenázy (PGD, E.C. 1.1.1.44), fosfoglukoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1) bol použitý štandardizovaný metodologický postup horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle (CARDY a kol., 1980, STUBER a kol., 1988, BOURGOIN-GRENECHE

a kol., 1998). Metodológia zahŕňa nasledujúce kroky: klíčenie zŕn (päť koleoptíl reprezentovalo L resp. Sc), príprava škrobových gélov, ukladanie vzoriek do gélov, samotná elektroforéza, rezanie škrobových gélov, vyfarbovanie zón enzymatickej aktivity a genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov analyzovaných vzoriek. Klíčenie zŕn prebiehalo po dobu piatich dní v termostate na mokrom filtračnom papieri v Petriho miskách za tmy a pri teplote 25 °C. Presná metodológia, zloženie extrakčného činidla, tlmivých roztokov a farbiacich médií sú detailne uvedené v citovanej literatúre a v mnohých našich publikáciách, napr. MÚDRY, JURÁČEK (2001).

Pri genetickej interpretácii izozymogramov sme brali do úvahy rozsah variability polymorfizmu v študovanom lokuse, štruktúru enzýmu, existenciu intra- a interlokusových interakcií, možnú komigráciu zón enzymatickej aktivity (pásov) jedného lokusu s iným lokusom, prítomnosť nulových alel atď. Alely v lokusoch boli klasifikované podľa ich migračných vzdialeností. Pre lokusy MDH platí, že väčšie číslo zodpovedá rýchlejšej migrácii k anóde. Pre iné enzýmy väčšie čísla zodpovedajú pomalšej migrácii. Symbolom pre recesívnu nulovú alelu je *n*. *Mmm* je označenie modifikujúceho lokusu, alely ktorého ovplyvňujú rýchlosť migrácie istých pásov MDH.

Výsledky a diskusia

Počas rokov 2003-2005 sme uskutočnili proteomickú klasifikáciu 18 samoopelivých línií (L) s excelentnou kombinačnou schopnosťou a ich 13 dvojlíniových hybridov (Sc) proveniencie SEMPOL Holding a. s., Trnava na báze analýzy a genetickej interpretácie polymorfizmu 11-tich druhov enzýmov. V Tab. 1 sú popisy (fingerprinty) línií a ich dvojlíniových hybridov. Všetky vzorky analyzovaných biologických materiálov boli homogénne. Na základe uvedených výsledkov vyplýva, že šľachtiteľský materiál kukurice je aj po stránke molekulárno-biochemickej v sledovaných znakoch čistý a homogénny. Vo všetkých trinástich prípadoch sa izozymogramy rodičovských komponentov a ich dvojlíniových hybridov navzájom odlišujú, z čoho vyplýva, že ich na báze polymorfizmu 11 druhov enzýmov možno od seba odlíšiť a že uvedené dvojlíniové hybridy majú v jednom alebo viacerých lokusoch heterozygotnú konštitúciu. Z analyzovaných 13 genotypov dvojlíniových hybridov má 11 originálny izozymogram, ale hybridy Sc 3154 x 3119 a Sc 3162 x 3119 majú zhodné izozymogramy, a preto sa navzájom odlíšiť nedajú. Sedem lokusov s heterozygotnou konštitúciou má hybrid Sc 3098 x 3153, šesť 3171 x 3161, päť 1149 x 3119, 3158 x 3119 a 3098 x 3159, štyri 3154 x 3119, 3148 x 3163, 3061 x 3098, 3162 x 3119 a 3150 x 3036, tri 4023 x 3151 a 3155 x 3163 a len dva Sc 3157 x 3119.

Zhodné izozymogramy majú štyri línie, a to sú: línie 3154, 3162 a 3036, 3155. Pre posudzovanie kvality kríženia je podstatné, aby sa nezhodovali izozymogramy rodičovských komponentov. V našom prípade žiadna z dvoch dvojíc línií so zhodnými fingerprintami netvorí spoločných hybridov. Z pohľadu šľachtenia môžu byť zaujímavé línie v izozymogramoch ktorých sa vyskytujú štatisticky vzácne izoformy, napr. : 3163, 3158 a 3153 (Pgi1:5), 3171 (Mdh3:18) a 3061 (Pgm2:1). Na základe frekvencie alel jednotlivých izoenzymových lokusov vypočítaných zo súboru analyzovaných 13 samoopelivých línií kukurice vyplýva, že lokusy Cat3:9, Dia2:4, Got1:4, Got2:4, Got3:4, Mdh1:6, Mdh4:12, Mmm:M, Pgd2:5 a Pgm1:9 s frekvenciou 1,0 sú monomorfné a nemajú v danom analyzovanom súbore samoopelivých línií diskriminačnú hodnotu. V jednotlivých lokusoch analyzovaného súboru línií a dvojlíniových hybridov bola zistená prítomnosť alel: Acp1:2, 3 a 4; Adh1:4 a 6; Cat3:9; Dia1:8 a 12; Dia2:4; Glu1:2 a 6-7; Got1:4, Got2:4; Got3:4; Idh1:4 a 6; Idh2:4 a 6; Mdh1:6 ; Mdh2:3 a 6; Mdh3:16 a 18; Mdh4: 12; Mdh5:12 a 15; Mmm:M; Pgd1:2 a 3.8; Pgd2:5; Pgi1:4 a 5; Pgm1:9 a Pgm2:1,4 a 8.

Z výsledkov analýz uvedeného súboru vyplýva, že variabilita polymorfizmu enzýmov je malá a nepostačuje na absolútnu identifikáciu všetkých genotypov, ale to nebráni využívaniu fingerprintov pri určovaní genotypovej identity a homogenity partii osiva, posudzovaniu kvality šľachtiteľských a semenárskych prác, nadštandardnému hodnoteniu líniového materiálu atď. Absolútnu identifikáciu možno zabezpečiť spojením tejto techniky identifikácie s niektorou z metód využívajúcich analýzy variability nukleových kyselín tak, ako je známe zo zahraničnej literatúry. Naše výsledky potvrdzujú aj skutočnosť, že vzhľadom na malú variabilitu polymorfizmu sa nedá očakávať, že bude možné šľachtiť kukuricu klasickým spôsobom prostredníctvom poznania polymorfizmu enzýmov vo vzťahu k morfológickým, produkčným a agronomickým charakteristikám. Do akej miery došlo k erózii alebo k obohateniu zárodočnej plazmy o nové alely v analyzovanom súbore línií a hybridov sa nemôžeme vyjadriť, lebo nepoznáme ich pôvod.

V budúcnosti zo šľachtiteľského hľadiska môžu byť hodnotné poznatky týkajúce sa jednotlivých izoformiem vo vzťahu k stresovým podmienkam prostredia, vrátane xenobiotík a participácia týchto interakcií v ontogenéze rastliny, resp. porastu. Súčasná vedecká pracoviská vo svete sústreďujú svoje úsilie aj týmto smerom už druhé desaťročie. Záujem o štúdium polymorfizmu enzýmov vo svete aj u nás vzrastá, aj preto je a bude mapovanie kukurice aj iných poľnohospodárskych plodín nevyhnutnosťou ako pre výrobnú prax, tak aj pre exaktnosť poznania v základných vedeckých disciplínach.

Záver

Práca prináša výsledky z oblasti hodnotenia línií a hybridov kukurice na báze analýzy a genetickej interpretácie polymorfizmu jedenástich druhov enzýmov. Potvrdzuje na základe analyzovaného súboru vhodnosť metodologického postupu pre priame využívanie v praxi. K efektívnemu a systematickému

využívaniu v praxi by napomohla právna norma, ktorá by nariaďovala testovanie každého biologického materiálu kukurice prihlasovaného do odrodových skúšok. To však predpokladá aj záujem testovacieho pracoviska a pestovateľskej praxe. Dnes je už evidentné, že významní svetoví producenti kukurice neustúpia z pozície testovania, hodnotenia kvality šľachtienia a právnej ochrany línií a hybridov tejto komodity polymorfizmom enzýmov a už vôbec nie od poznania významu polymorfizmu enzýmov v rôznych nasmerovaniach základného výskumu.

Pod'akovanie: Výskum bol podporený MP SR (projekt č. 2003 SP27/0280D01/0280D01) a Agentúrou pre vedu a techniku SR (projekt č. 20-017002).

Literatúra

1. BOURGOIN-GRENECHE, M. - LALLEMAND, J. - POUGET, R.: Technical reference manual for the isoenzymatic analysis of maize. Ed. by: GEVES - La Minière - F 78285 GUYANCOURT Cedex, 1998, p. 73.
2. CARDY, B.J. – STUBER, C.W. – GOODMAN, M.M.: Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Institute of Statistics Mimeograph Series No. 1317, North Carolina State University, Raleigh, 1980, p. 87.
3. MÚDRY, P. – JURÁČEK, E.: Analýza izoenzymového fingerprintingu v kontrole úrovne šľachtienia a semenárstva kukurice. Poľnohospodárske skúšobníctvo, 2, č. 2-3, 1994, s. 8-9.
4. MÚDRY, P. - JURÁČEK, E.: Biochemická identifikácia osiva kukurice. In: Manažment a marketing výroby, spracovania a predaja kukurice. Zborník z vedeckej konferencie, SPU Nitra, 1998, s. 25-27.
5. MÚDRY, P. – JURÁČEK, E.: Modifikovaná štandardizovaná metodika analýzy polymorfizmu jedenástich druhov enzýmov – molekulárnych značkovačov kukurice siatej (*Zea mays* L.). In: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín BIOS 2001. Zborník referátov zo VII. Vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, SPU - Nitra, 2001, 68-73.
6. ORMAN, B. A. - LAWRENCE, G. D. - DOWNES, P. M. - PHILLIPS, D. S. - RIPBERGER, C. J.: Assesment of maize inbred genetic purity by isozyme electrophoresis. Seed Science and Technology, 19, 1991, 527-535.
7. SCHWARTZ, D.: Genetic studies on mutant enzymes in maize: Synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46, 1960, 1210-1215.
8. SMITH, J. S. C. - PASZKIEWICZ, S. - SMITH, O. S. - SCHAFFER, J.: Electrophoretic, Chromatographic, And Genetic Techniques For Identifying Associations And Measuring Genetic Diversity Among Corn Hybrids. 42-nd Annual Corn and Sorghum Research Conference, ASTA (Amer. Seed Trade Association), Ed. and Pub. By Dolores Wilkinson, Chicago, 42, 1987, 187-203.
9. SMITH, J. S. C. - SMITH, O. S.: Fingerprinting Crop Varieties. Advances in Agronomy, 47, 1992, 85-140.
10. SMITH, J.S.C. - WYCH, R.D.: The identification of female selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. Seed Science and Technology, 14, 1986, 1-8.
11. STUBER, C.W. – WENDEL, J.F. – GOODMAN, M.M. – SMITH, J.S.C.: Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin 286, North Carolina Agric. Res. Service, North Carolina State University, Raleigh, 1988, 1-87.

Tab. 1: Abbreviations:

- (1) Description of self-pollinated maize (*Zea mays* L.) lines and their single crosses (Sc) on the base of enzyme polymorphism during years 2003 - 2005
- (2) genotype
- (3) number of analysed grains (coleoptiles)

Adresa pracoviska:

RNDr. Pavol Múdry, CSc., Mgr. Marián Dragúň, CSc., Trnavská univerzita, Pedagogická fakulta, Katedra biológie, Priemyselná 4, P.O. Box č.9, 918 43 Trnava, tel.: 033/5514618, fax: 033/5516047, e-mail: pmudry@truni.sk, mdragun@truni.sk

Tab. 1: Popis samoopelivých línií a dvojlíniových hybridov (Sc) kukurice stetej (Zea mays L.) na báze polymorfizmu enzýmov za roky 2003 - 2005

OZNAČENIE GENOTYPU	(2)	POČET ZRN (3)	Lokusy a alély (loci and alleles)																(1)							
			Acp1	Adh1	Cat3	Dat1	Dia2	Glut1	Got1	Got2	Got3	Iah1	Iah2	Mdh1	Mdh2	Mdh3	Mdh4	Mdh5		Mmm	Pgd1	Pgd2	Pgi1	Pgm1	Pgm2	
3154		5	2	4	9	8	4	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3119		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	4	3	16	12	12	M	2	5	4	8		
Sc 3154 x 3119		5	2	4	9	8	4	2/6-7	4	4	4	4	4	4	4/6	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4/8	
3148		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4		
3163		5	2	4	9	12	4	6-7	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2	5	5		
Sc 3148 x 3163		5	2	4	9	8/12	4	6-7	4	4	4	4	4	4	4/6	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4/5	4	
4149		5	4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3119		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	2	5	4	8	
Sc 4149 x 3119		5	2/4	4	9	8	4	2/6-7	4	4	4	4	4	4	4/6	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4/8	
4023		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2	5	4	4	
3151		5	3	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4
Sc 4023 x 3151		5	2/3	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	3/6	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4	
3061		5	2	6	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	1		
3098		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4		
Sc 3061 x 3098		5	2	4/6	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	4/6	6	3	16	12	12/15	M	3,8	5	4	1/4	
3158		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	5	4	
3119		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2	5	4	8	
Sc 3158 x 3119		5	2	4	9	8	4	2/6-7	4	4	4	4	4	4	4/6	6	3/6	16	12	12	M	2/3,8	5	4/5	4/8	
3157		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3119		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2	5	4	8	
Sc 3157 x 3119		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4/8	
3162		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3119		5	2	4	9	8	4	2	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2	5	4	8	
Sc 3162 x 3119		5	2	4	9	8	4	2/6-7	4	4	4	4	4	4	4/6	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4/8	
3098		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3159		5	4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	6	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
Sc 3098 x 3159		5	2/4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4/6	4/6	6	3/6	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3098		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3153		5	4	4	9	12	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	6	16	12	12	M	2	5	5	4	
Sc 3098 x 3153		5	2/4	4	9	8/12	4	6-7	4	4	4	4	4	4/6	4/6	6	3/6	16	12	12	M	2/3,8	5	4/5	4	
3171		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	6	6	18	12	12	M	2	5	4	4	
3161		5	4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	4	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	8	
Sc 3171 x 3161		5	2/4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	4/6	6	3/6	16	18	12	M	2/3,8	5	4	4/8	
3150		5	4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	4	6	3	16	12	12	M	2	5	4	4	
3036		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
Sc 3150 x 3036		5	2/4	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4/6	4/6	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4	
3155		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	6	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
3163		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4	6	6	3	16	12	12	M	3,8	5	4	4	
Sc 3155 x 3163		5	2	4	9	8	4	6-7	4	4	4	4	4	4/6	4/6	6	3	16	12	12	M	2/3,8	5	4	4	

VPLYV A VYUŽITIE GÉNOV KRÁTKOSTEBLOVOSTI V ŠĽACHTENÍ PŠENICE EFFECT AND UTILIZATION OF DWARF GENES IN WHEAT BREEDING

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Martin UŽÍK – Daniel MIHÁLIK – Michal ŠAJGALÍK

Review about exploitation of gibberellic acid insensitive and sensitive dwarfing genes in world wheat breeding is presented. Shortening of coleoptile length at variety Astella (with Rht 1) and at newer varieties in comparison to old ones is documented by own results. In the set of 30 winter wheat varieties originated from local breeding or registered and grown in Slovakia, length polymorphism of microsatellite marker WMS 261 was analysed. Microsatellite locus WMS 261 is tightly linked to the dwarf gene Rht 8. 192-bp allele was prevalent, detected at 24 varieties (80 %). 165-bp allele was detected at varieties Diana I, Košútka and Solaris. Only variety Torysa is with 174-bp allele. At plant height, differences between varieties with 165-bp allele and 192-bp allele were from 3 to 12 cm.

Key words: wheat, dwarf genes, Rht 8

Doteraz pri ozimnej pšenici je poznaných a využíva sa v šľachtení len málo skupín génov veľkého účinku: Rht gény, ktoré determinujú výšku rastliny, Ppd gény podmieňujúce reakciu na fotoperiódou, gény jarovizačné (Vrn), ako aj gény pre rezistenciu voči chorobám, prípadne gény determinujúce kvalitu. Proces adaptácie a aklimatizácie priamo alebo nepriamo podmieňujú najmä gény Rht, Ppd, prípadne Vrn.

Pravdepodobne najvýraznejšou zmenou v rastlinách pšenice za ostatných 150 rokov je dramatická redukcia vo výške zo 150 cm na súčasných asi 85 cm, čo bolo spojené so zvýšením produktivity klasu. Zníženie výšky prispelo k tvorbe rastlín, ktoré efektívnejšie využívajú asimiláty pre tvorbu zrna a tak výrazne zvyšujú zberový index (AUSTIN et al., 1980; UŽÍK, ŽOFAJOVÁ, 2003). Zvýšila sa tiež odolnosť voči poliehaniu, čo umožnilo zvýšiť dávky živín. Genetická kontrola výšky rastlín je veľmi komplexná, podmieňuje ju súbor major alebo minor génov lokalizovaných na mnohých chromozómoch, ktoré pôsobia separátne v smere podporovania alebo potláčania výšky rastlín (WORLAND et al., 1990). Hoci krátkosteblové rastliny pšenice majú potenciál pre zlepšenie zberového indexu a úrody, vo všeobecnosti je korelácia medzi redukovanou výškou a redukovanou úrodou (LAW et al. 1973). V súčasnosti je známych 21 major génov (Rht), ktoré redukujú výšku (McINTOSH et al., 1998). Väčšina z týchto génov boli odvodené ako mutačné formy a nemajú žiadnu šľachtiteľskú hodnotu. Je iba niekoľko major génov, ktoré redukujú výšku a neredukujú úrodu a preto sú vhodné pre komerčné šľachtiteľské programy (DALRYMPLE, 1986).

Gény krátkosteblovosti necitlivé na GA

Podľa reakcie na kyselinu giberelínovú sú Rht gény klasifikované ako necitlivé a citlivé na exogénnu GA. Gény krátkosteblovosti necitlivé na GA je možné detekovať pomocou aplikácie slabého roztoku GA na kľúčiacie rastliny (GALE, GREGORY, 1977). Gény necitlivé na GA, Rht-B1b alebo Rht-D1b (pôvodné označenie Rht 1 a Rht 2) sú prítomné vo väčšine krátkosteblových odrôd pšenice vo svete. Oba gény pochádzajú zo starej japonskej odrody NORIN 10, redukujú výšku asi o 18 % a majú pleiotropné efekty na zvýšenú fertilitu klásku a úrodu, ktorá v optimálnych podmienkach je vyššia o 15 % (FLINTHAM et al., 1997). Pestovanie izogénnych línií (Rht a bez Rht) ukázalo, že krátkosteblové línie, t. j. s Rht mali úrodu o 1 t.ha⁻¹ vyššiu v úrodnejších prostrediach (6 t.ha⁻¹).

Odrody s génmi Rht – B1b alebo Rht – D1b majú kratšiu koleoptylu a redukovanú energiu klíčenia (REBETZKE et al., 2001), čo je negatívom v suchých podmienkach. Dlhšia koleoptyla je žiaduca vtedy, ak semená sú siate hlbšie v dôsledku vysušeného pôdneho povrchu. Vyššia energia klíčenia znamená tiež vyššiu konkurenciu s burinami a väčšiu listovú plochu, ktorá pokrýva pôdu a redukuje povrchovú evaporáciu.

Skrátenie dĺžky koleoptylu pri odrode Astella s Rht 1 dokumentujeme na historickom súbore 10 odrôd pšenice (tab. 1), kde dosiahla najnižšiu priemernú hodnotu 21,0 mm. Z výsledkov je zrejmé, že v priemere pri novších odrodách bez ohľadu na genetickú determináciu výšky rastlín, došlo ku skráteniu dĺžky koleoptylu o 8,6 % v porovnaní so staršími odrodami.

ELLIS et al. (2002) pre detekciu bodových mutácií zodpovedných za Rht 1 a Rht 2 vyvinuli PCR markery. Oba markery boli v silnej korelácii s redukciou vo výške a predpokladajú ich využitie v šľachtiteľských programoch pri markermi asistovanej selekcii.

Gény krátkosteblovosti citlivé na GA

Hoci zisky z Rht – B1b a Rht – D1b sú významné vo väčšine prostredí a boli základom Bourlagovej zelenej revolúcie, v šľachtení pšeníc v južnej Európe zlyhávajú pri kombinovaní redukcie výšky so zvýšením úrody (KERTESZ et al., 1991; WORLAND et al., 1990). Zdá sa, že je to v dôsledku citlivosti na stres z tepla, ktorý je v čase meiózy, pred klasením (WORLAND, LAW, 1985). Teplota vyššia ako 24 °C, pôsobí ako šok, ktorý znižuje fertilitu, je častá v južnej Európe v priebehu kritického rastového štádia. Preto v južných oblastiach sa pestujú odrody s inými génmi krátkosteblovosti, responzívnymi na GA. Gény v týchto odrodách môžu byť zo starej japonskej odrody Akakomugi, ktorá bola použitá Strampellim (1932). Pre označenie týchto génov krátkosteblovosti na chromozómoch 2D a 5BS – 7BS boli použité symboly Rht

8 a Rht 9 (LAW et al. 1981, GALE et al. 1982), pričom Rht 8 je prítomný vo všetkých odrodách vyšľachtených v republikách bývalej Juhoslávie (WORLAND et al., 1998a) a v mnohých talianskych a ruských odrodách ako Bezostaja 1, Aurora a Kavkaz.

Detekcia génov krátkosteblovosti si vyžaduje tiež hybridologickú analýzu čo je náročné na čas a na prostriedky. KORZUN et al. (1998) zistili, že mikrosatelitný marker WMS-261 a jeho 192 bázičných alelových párov (bp) sa javí byť diagnostickým pre Rht 8. Šľachtitelia očakávali, že gén by mohol byť prítomný v pšeniciach zo CIMMYT, tieto zvyčajne majú alelický variant na WMS-261 lokuse 165 bp (WORLAND et al., 1998b). Väčšina pšeníc zo severnej Európy má tretí alelický variant na WMS-261 lokuse, 174 bp (WORLAND et al., 1998a). Mnohé menej bežné varianty až do 216 bp boli detekované v diverzifikovaných medzinárodných odrodách pšenice.

V 30 odrodách pšenice (tab. 2), ktoré pochádzali z domáceho šľachtenia, alebo boli v minulosti registrované a pestované na Slovensku sme analyzovali dĺžkový polymorfizmus mikrosatelitného markeru WMS 261. PCR reakciu sme uskutočnili v MJ Research PTC-200 podľa KORZUN et al. (1998) (Ta=60 °C). Separáciu mikrosatelitných alel sme uskutočnili v 6% močovinou denaturovaných PAGE. Vizualizáciu sme uskutočnili striebrom (BASSAM et al., 1991). Dĺžku alel sme určili programom Kodak Digital Science 1D porovnaním veľkosti alel odrôd so známou dĺžkou a pomocou markeru molekulevej hmotnosti.

Pri 24 odrodách (80 %) bola detekovaná alela 192 bp, ktorá je charakteristická pre odrody pochádzajúce z južnej Európy. Je tu zrejmy historický vplyv genofondu pšenice najmä z bývalej Juhoslávie na domáce šľachtenie. Prítomnosť alely 192 bp bola potvrdená v odrodách bývalej Juhoslávie – Sáva, Zlatná Dolina a Super Zlatná, ktoré boli v minulosti u nás pestované. Odrody pšenice vyšľachtené v CIMMYT Mexiko majú alelu 165 bp. V nami hodnotenom súbore odrôd alela 165 bp bola detekovaná v odrodách – Diana I, Košútka a Solaris. Alela 174 bp je prevalentná pri odrodách zo západnej Európy, čo potvrdzuje tiež pôvod odrody Jubilar (DEU). Jedným z rodičov odrody Torysa, ktorá ako jediná z domácich odrôd má alelu 174 je odroda Maris Marksman (GBR). Rovnakú detekciu, 174 bp pri odrode Mironovská uviedli tiež KORZUN et al. (1998)

Alela 192 bp na lokuse WMS 261 je spojená so znížením výšky rastlín (o 7 až 8 cm) a nemá žiaden pleiotropný efekt na iné agronomické znaky. Alela 174 bp je neutrálna vo vzťahu k výške rastlín. Alela 165 bp koreluje so zvýšením vo výške rastlín o 3 až 4 cm a nemá žiaden vplyv na iné agronomické znaky. Diferencia vo výške rastlín medzi odrodami ktoré majú alelu 192 bp a 165 bp je niekedy väčšia ako 10 až 12 cm (KORZUN et al. 1998). Diferencie vo výške rastlín medzi odrodami s alelami 192 bp a 165 bp sme tiež pozorovali v nádobovom pokuse s historickým súborom 10 odrôd pšenice (tab. 3). Odrody Diana I, Solaris a Košútka s alelou so 165 bp sa vo výške rastlín odlišovali od odrody Viginta, s alelou 192 bp o 3, 7 a 12 cm jednotlivo.

Súčasnosť a perspektívy

Na Slovensku sa v doterajších výskumných a šľachtiteľských programoch cielená detekcia jednotlivých génov krátkosteblovosti za použitia molekulárných markerov nerobila. Za zdroj potrebných informácií boli považované predovšetkým rodokmene odrôd. Čiastočné informácie a to len o skupine Rht génov GA necitlivých boli získavané z laboratórnych testov, pri ktorých je aplikovaný slabý roztok GA na klíčiace rastliny. Presné hybridologické analýzy boli robené v minulosti vo viacerých štátoch Európy, avšak len na vybrané Rht gény. V smere identifikácie jednotlivých Rht génov predstavujú molekulárne markery rýchle, prístupné detekčné metódy, ktoré nie sú ovplyvnené pestovateľským prostredím. Gény pre krátkosteblosť (Rht) a pre fotoperiodickú reakciu (Ppd) sú génmi veľkého účinku, ktoré majú pleiotropné efekty na celý rad hospodársky významných znakov a vlastností. Sú tiež v interakcii s prostredím, ktorá významne ovplyvňuje adaptáciu krátkosteblových a fotoperiodicky necitlivých genotypov. Z dôvodu interakcie je nevyhnutné detekovať a tvoriť genotypy pre požadované prostredie, teda aj pre naše. Introdukcia nových Rht alel (prípadne Ppd) pre naše agroklimatické podmienky bude spoľahlivejšia ak bude realizovaná na genetickom pozadí domácich adaptovaných odrôd.

Literatúra

1. AUSTIN, R.B. - BINGHAM, J. - BLACKWELL, R.D. - EVANS, L.T. - FORD, M.A. - MORGAN, C.L. - TAYLOR, M.: J. Agric. Sci. Camb., 94, 1980, s. 675-689.
2. BASSAM, B. J. - CAETANO-ANOLLES, G. - GRESSHOFF, P. M.: Anal. Biochem., 1991, no. 196, pp. 80-83.
3. CHRPOVÁ, J. - ŠKORPÍK, M. - PRÁŠILOVÁ, P. - ŠÍP, V.: Czech J. Genet. Plant Breed., 39, 2003 (3): 89-92
4. DALRYMPLE, D. G.: Bureau for Science and Technology, Washington, 1986, 99 pages
5. ELLIS, M.H. - SPIELMEYER, W. - GALE, K. R. - REBETZKE, G. J. - RICHARDS, R. A.: TAG, 105, 2002, 6-7, s. 1038-1042
6. FLINTHAM, J.E. - BORNER, A. - WORLAND, A.J. - GALE, M.D.: Journal of Agric. Sci., Cambridge 128, 1997, s. 11-25.
7. GALE, M.D. - GREGORY, R.S.: Euphytica, 126, 1977, 733-739.

8. GALE, M.D. - LAW, C.N. - MARSHALL, G.A. - SNAPE, J.W. - WORLAND, A.J.: IAEA Terdoc: Semi dwarf cereal mutants and their use in cross breeding 268, 1982, pp 7-23.
9. KERTESZ, Z. - FLINTHAM, J.E. - GALE, M.D.: Cereal Res. Commun., 19, 1991, s. 297-304.
10. KORZUN, V. - RODER, M. - GANAL, M. - WORLAND, A.J.: Theor. and Applied Genet., 96, 1998, s. 1104-1109.
11. LAW, C.N. - SNAPE, J.W. - WORLAND, A.J.: The genetical relationship between height and yield in wheat. Heredity, 40, 1973, s. 133-151.
12. LAW, C.N. - SNAPE, J.W. - WORLAND, A.J.: The Royal Society, London, 1981, pp 109-118.
13. McINTOSH, R.A. - HART, G.E. - GALE, M.D.: Proc. 9th Int. Wheat Genetic Symposium, Saskatoon, Canada, Vol 5, 1998.
14. REBETZKE, G.J. - APPELS, R. - MORRISON, A.D. - RICHARDS, R.A. - McDONALD, G. - ELLIS, M.H. - SPIELMEYER, W. - BONNETT, D.G.: Australian Journal of Agricultural Research, 52, 2001, s. 1221-1234.
15. UŽÍK, M. – ŽOFAJOVÁ, A.: In: Acta fytotechnica et zootechnica, 6, 2003, 4, s. 93-100
16. WORLAND, A.J. - KORZUN, V. - GANAL, M.W. - RODER, M. - LAW, C.N.: Theor. Applied Genet. 96, 1998b, s. 1110-1120.
17. WORLAND, A.J. - KORZUN, V. - PETROVIC, S.: In Proc. 2nd Balkan Symp. On field Crops, Novi Sad, 1998a, Vol 1, pp 51-55.
18. WORLAND, A.J. - LAW, C.N. (1985): Annual Rep. Plant Breeding Inst., Cambridge 1984, p 69-71.
19. WORLAND, A.J. - LAW, C.N. - PETROVIC, S.: Savremena Poljoprivreda, 38, 1990, s. 245-258.

Tabuľka 1: Priemerné hodnoty morfológických znakov historického súboru odrôd pšenice letnej f. ozimnej testovaných v roztoku kyseliny gibereľinovej (GA) a ich reakcia na GA

P. č.	Názov odrody	n	Dĺžka koleoptily		Dĺžka nadzemnej časti rastliny				Reakcia na GA
			\bar{x}	SE	Po jazýček 2 listu		Celková		
					\bar{x}	SE	\bar{x}	SE	
1	Slovenská 777	142	23,7 bc *	0,369	65,5 e	0,922	194,4 e	2,249	S
2	Slovenská B	158	24,6 cd	0,349	72,7 f	0,875	191,6 e	2,133	S
3	Diana I	200	32,1 g	0,311	76,3 g	0,777	216,9 f	1,895	S
	\bar{x}_{1-3}	166	26,8	–	71,5	–	200,9	–	
4	Solaris	200	28,7 f	0,311	46,1 b	0,777	164,6 c	1,895	S
5	Košútka	168	21,8 a	0,339	53,3 c	0,848	181,4 d	2,068	S
6	Viginta	106	23,1 b	0,427	63,5 e	1,068	160,3 bc	2,604	S
7	Torysa	168	24,7 d	0,339	64,3 e	0,848	156,8 b	2,068	S
8	Astella	170	21,0 a	0,337	42,1 a	0,843	127,4 a	2,057	I (Rht1)
9	Vanda	200	27,0 e	0,311	71,5 f	0,777	178,8 d	1,895	S
10	Axis	200	25,4 d	0,311	59,8 d	0,777	215,8 f	1,895	S,I
	\bar{x}_{4-10}	173	24,5	–	57,2	–	169,3	–	
	\bar{x}_C	171	25,2	0,108	61,5	0,270	178,8	0,659	
	LSD _(0,05)		0,997		2,495		6,082		

* medzi priemermi označenými rovnakým písmenom nie sú štatisticky významné rozdiely

Tabuľka 2: Klasifikácia odrôd pšenice podľa alelických variantov mikrosatelitu WMS 261

Alela na lokuse WMS 261, bp	Odrody	Počet
192	Jubilejná, Aurora, Kavkaz, Iljičovka, Sáva, Zlatná Dolina, Slávia, Vala, Amika, Super Zlatná, Iris, Viginta, Hana, Danubia, Agra, Ilona, Lívia, Blava, Barbara, Solida, Rada, Sana, Astella, Solara	24
165	Diana I, Solaris, Košútka	3
174	Mironovská, Jubilar, Torysa	3
Spolu		30

Tabuľka 3: Výška rastlín a alely na lokuse WMS 261 historického súboru odrôd pšenice letnej f. ozimnej

P. č.	Názov odrody	Výška rastlín (cm)	Alela na lokuse WMS 261, bp
1	Slovenská 777	95	neanalyzovaná
2	Slovenská B	97	neanalyzovaná
3	Diana 1	83	165
4	Solaris	79	165
5	Košútka	74	165
6	Viginta	86	192
7	Torysa	83	174
8	Astella	68	192
9	Vanda	92	neanalyzovaná
10	Axis	77	neanalyzovaná
	\bar{x}	83,4	

Práca bola realizovaná v rámci úlohy „PARAMETRIZOVANIE A VYUŽITIE GENETICKÝCH ZDROJOV V TVORBE GENOTYPOV ADAPTOVANÝCH NA ZMENU KLÍMY“.

Adresa autorov:

Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., Ing. Martin Užík, DrSc., Mgr. Daniel Mihálik, Mgr. Michal Šajgalík, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 01 Piešťany, zofajova@vurv.sk

**DEDIČNOSŤ GÉNOV REZISTENCIE PROTI VÍRUSU Y ZEMIAKA (PVY)
V HYBRIDOCH Z VYBRANÝCH GENETICKÝCH ZDROJOV
ĽUŽKA ZEMIAKOVÉHO (*SOLANUM TUBEROSUM*, L)
INHERITANCE OF GENES OF RESISTANCE AGAINST POTATO VIRUS Y
(PVY) IN HYBRIDS FROM SELECTED GENETIC RESOURCES OF POTATO
(*SOLANUM TUBEROSUM*, L)**

Ján HELDÁK - Milan BEŽO - Veronika ŠTEFÚNOVÁ - Katarína DEBREOVÁ -
Kvetoslava FORIŠEKOVÁ - Andrea GALLIKOVÁ

One of ways for making breeding more effective is the use at least two copies of dominant major genes for resistance against PVY in parent genotypes. Application of multiplex (duplex or triplex) provides to obtain more resistant genotypes for selection. This may be effective if both genotypes are satisfactory different. There were developed duplex resistant parental genotype with extreme resistance against PVY that contained two genes – the gene $Ry-f_{sto}$ and the gene for extreme resistance against PVY derived from variety Cruza 27. Hybridological analysis was conducted to determine gene dosage in parental clones and source of resistance against PVY. Gene $Ry-f_{sto}$ was proved by marker GP122₇₁₈ in genotypes with extreme resistance against PVY.

Key words: potato, potato virus Y (PVY), resistance, Ry_{sto} , inheritance

Úvod

Rod *Solanum* má základné chromozómové číslo 12, od ktorého sa odvodzujú všetky ďalšie stupne ploidity od diploidov až po hexaploidy. Väčšina druhov, až 74% sú diploidy, 4,5 % sú triploidy, 11,5 % sú tetraploidy, 2,5 % pentaploidy a 5 % sú hexaploidy. Predpokladá sa, že tetraploidy sa vyvinuli z diploidných foriem zdvojením chromozómov, ktoré mohlo byť indukované napr. poškodením alebo extrémnymi teplotami, alebo nedostatkami v procese redukčného delenia. Takmer všetky kultúrne genotypy ľuľka zemiakového - odrody - sú tetraploidy a vznikli vo väčšine prípadov hybridizáciou tetraploidných genotypov (BURTON, 1989).

Dedičnosť ľuľka zemiakového prebieha podľa schémy štiepenia tetraploida. Pri tomto type dedičnosti môžu byť vlastnosti ovládané monogénne a to dominantným génom, ktorý môže byť založený alebo homozygotne a to buď dominantne (kvadruplex AAAA) alebo recesívne (aaaa), alebo heterozygotne a to ako simplex (Aaaa), duplex (AAaa) alebo triplex (AAAA) (BEŽO, KUTIŠOVÁ, 1996). Vlastnosti ovládané jedným dominantným génom sa v genotypoch ľuľka zemiakového vyskytujú väčšinou v simplexnej zostave. Použitie takýchto genotypov v hybridizácii prináša podstatne lepšie výsledky, pretože už pri použití AAAA x aaaa sa získava 100 % potomstva v požadovanom genotype. Aj keď sú duplexné, triplexné príp. kvadruplexné genotypy dôležité zo šľachtiteľského hľadiska, nemajú žiadny vplyv z hľadiska zvýšenia úrovne rezistencie (ZADINA, 1987).

Gény extrémnej rezistencie proti PVY môžu pochádzať zo *Solanum stoloniferum*, *Solanum houghasii* a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Gén rezistencie Ry_{sto} je dominantným génom pochádzajúcim zo *Solanum stoloniferum*. Segregácia pre extrémnu rezistenciu proti PVY sa obyčajne trochu odlišuje od očakávaných hodnôt, a zistilo sa, že tieto odchýlky spôsobujú minor gény. Je známych niekoľko odrôd, u ktorých bola extrémna rezistencia odvodená od *Solanum stoloniferum*: Corine, Sante (Holandsko), Bobr, Boda, Bzura, Pilica, San (Poľsko), Magyar Rosa, Szignal (Maďarsko) a Barbara, Bison, Cordia, Esta, Fanal, Forelle, Franzi, Heidrun, Pirola, Wega (Nemecko). Extrémna rezistencia v týchto genotypoch bola potvrdená viacerými autormi (ROSS, 1986; SWIEŻINSKI, 1994; SONG, 2004). Cieľom práce bolo zhodnotiť možnosti získavania genotypov s extrémnou rezistenciou proti PVY pochádzajúcich z odrody Assia (Ry_{sto}) a odrody Cruza 27, v ktorej je prítomný gén extrémnej rezistencie proti PVY, ale zatiaľ nie je známy zdroj, z ktorého tento gén pochádza.

Materiál a metódy

Tieto tri skupiny genotypov sa medzisebou krížili nasledovne:

- 1) typ kríženia $ryryryry$ x $ryryryRy_{Cr}$ a $ryryryry$ x $ryryryRy_{sto}$, v ktorom boli použité rezistentné odrody Cruza 27 a Assia a náchylné genotypy (Bonita, Desirée, C2264, Duca, Hera, Rosanna, Andra, Folva, Helena, VL 28/94, Satina, Anosta, Nikita, Esta, Jaerla, Optima, Osirene, Gloria, Stina),
- 2) typ kríženia a $ryryryry$ x $ryryryRy_{sto}$, v ktorom boli použité genotypy s extrémnou rezistenciou proti PVY založenou na génoch Ry_{sto} (San, Y01/30, Santé, V-2, Fanal, Forelle, Assia, Bettina, MPI 441016/10) a náchylné genotypy (Bonita, Desirée, C2264, Duca, Hera, Rosanna, Andra, Folva, Helena, VL 28/94, Satina, Anosta, Nikita, Esta, Jaerla, Optima, Osirene, Gloria, Stina),
- 3) typ kríženia $ryryryRy_{Cr}$ x $ryryryry$, $ryryryRy_{sto}$ x $ryryryry$ a $ryryRy_{sto}Ry_{Cr}$ x $ryryryry$, v ktorom boli použité genotypy s extrémnou rezistenciou proti PVY založenou na génoch Ry_{sto} a Ry_{Cr} (Y 02/5, Y 02/14, Y 02/15, Y 02/17, Y 02/31, Y 02/112, Y 02/149, A 03/95, A 03/229, 03/389) a krížili sa s náchylnou odrodou Impala,
- 4) typ kríženia $ryryryRy_{Cr}$ x $nynynyNy$, v ktorom boli použité odrody Cruza 27 a Conchita.

Semenáčová populácia z týchto troch typov krížení sa vysiala a semenáče v štádiu 2 – 4 pravých listov sa infikovali suspenziou s obsahom izolátov PVY podľa metodiky ZADINA, JERMOLJEV (1976). Hodnotili sa vizuálne prejavy primárnych infekcií v týždňových intervaloch, prítomnosť PVY v rastlinách sa overovala testom ELISA a vo vybraných genotypoch aj RT-PCR. Štiepne pomery sa vyhodnotili χ^2 testom.

Výsledky a diskusia

Nové trendy v šľachtení ľuľka zemiakového si vyžadujú efektívnejšiu formu tvorby nových odrôd s vysokými stupňami rezistencie proti patogénom. Jednou z foriem je využívanie genotypov s duplexným, triplexným resp. kvadruplexným založením rezistencie. Využívanie takýchto genotypov zvyšuje potenciál podielu rezistentných genotypov v potomstve spolu so žiadúcimi znakmi. Na druhej strane používanie rezistentných genotypov z rovnakého zdroja nesie so sebou potenciál pre kumuláciu nežiadúcich znakov. Preto sa začínajú stále viac presadzovať smery, ktoré využívajú kumuláciu génov rezistencie z rôznych genetických zdrojov, najmä kombinácia génov rezistencie *Ry* zo *Solanum stoloniferum* a *Ry_{adg}* zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Tieto dva druhy boli doteraz v šľachtení využívané aj pre introdukciiu iných znakov, preto sú tieto dva druhy v určitom pomere zakomponované takmer vo všetkých kultúrnych formách ľuľka zemiakového a ich kombinovaním nie je šľachtiteľská úspešnosť na žiadúcej úrovni. Z toho dôvodu sa monitorujú génové banky na celom svete s cieľom nachádzať také zdroje rezistencie, ktoré sa v šľachtení ešte nevyužívali. V našom prípade sa siahlo po mexickej odrode Cruza 27, pretože v šľachtení ľuľka zemiakového na rezistenciu proti PVY sa na Slovensku mexické genetické zdroje doteraz nepoužívali. Pre porovnanie sa použila odroda Assia, ktorá je nositeľom génu *Ry_{sto}*. Výsledky kríženia poukazujú na skutočnosť, že tu nie sú silné bariéry krížiteľnosti a je možné využívať všetky použité odrody a genotypy, aj keď úspešnosť kríženia je v niektorých typoch kríženia nízka. Reakcia genotypov na infekciu mechanickou inokuláciou s PVY a štiepne pomery sú zosumarizované v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Štiepne pomery v kombináciách krížení k získaniu genotypov s extrémnou rezistenciou proti PVY z troch typov kríženia

kombinácia	počet kombinácií (n)	štiepny pomer	χ^2 (od – do)
		očakávaný	
ryryryry x ryryryRy _{Cr} (Cruza 27)	6	1:1	0,008 – 2,106
ryryryry x ryryryRy _{sto} (Assia)	11	1:1	0,026 – 1,403
ryryryry x ryryryRy _{sto}	13	1:1	0,267 – 3,828

Kritická hodnota χ^2 – testu pre $P_{0,05} = 3,841$ a pre $P_{0,01} = 6,635$

V súbore úspešných kombinácií kríženia typu náchylný x rezistentný genotyp mala odroda Cruza 27 20%-né zastúpenie, odroda Assia 36,6%-né zastúpenie a ostatné kombinácie 43,3%. Štiepny pomer zdravých a infikovaných rastlín pri predpokladanom štiepnom pomere rezistentných a náchylných genotypov 1:1 (Assia $\chi^2 = 0,026 - 1,403$; Cruza 27 $\chi^2 = 0,008 - 2,106$) potvrdil, že obe odrody majú dominantný major gén pre rezistenciu proti PVY v jednom lókuze. Jednoznačne rezistentné genotypy semenáčovej populácie mali hypersenzitívnu reakciu, charakteristickú pre mechanicky inokulované rezistentné genotypy. V niektorých kombináciách boli reakcie náchylných genotypov na infekciu širokospektrálne, od mozaikového prejavu, cez ťažkú mozaiku, kučeravosť až po typickú nekrotickú reakciu. Rozhodujúcu úlohu tu zohrával genotyp, ktorý bol použitý v krížení s Cruzou alebo Assiou. Prítomnosť resp. absencia PVY v infikovaných rastlinách bola potvrdená testom ELISA a v sporných prípadoch aj RT-PCR. Segregačný pomer 1:1 pri predpokladanom štiepnom pomere rezistentných a náchylných genotypov v 13 kombináciách ($\chi^2 = 0,267 - 3,828$) sa potvrdil aj v odrodách ako Forelle ($\chi^2 = 0,749 - 2,932$), Fanal ($\chi^2 = 0,267 - 0,522$), Santé ($\chi^2 = 0,524 - 1,504$) a ďalších, ktoré sú sumárne uvedené v tabuľke 1. V niektorých kombináciách množstvo rezistentných a náchylných genotypov sa do určitej miery odlišovalo od očakávaných pomerov. Kombinácia ako Hera x Forelle pozostávala z malého množstva genotypov, čo mohlo spôsobiť vyššie zastúpenie rezistentných alebo náchylných genotypov. Napriek tomu rozdiely v rámci testovaného súboru neboli štatisticky preukazné.

Pri porovnaní počtu náchylných a rezistentných genotypov v semenáčovej populácii z kríženia rezistentných odrôd Cruza a Assia s náchylnými genotypmi Folva, Helena a VL28/94 vyplynul veľmi podobný pomer a chí-kvadrát, ako je to vidieť v nasledovnej tabuľke 2.

Z kríženia typu ryryryRy_{Cr} x ryryryry, ryryryRy_{sto} x ryryryry a ryryRy_{sto}Ry_{Cr} x ryryryry sa získali heterogénne populácie. V prvých dvoch typoch kríženia so simplexným založením rezistencie sa potvrdil štiepny pomer 1:1. Potomstvo kríženia typu ryryRy_{sto}Ry_{Cr} x ryryryry – (San x Cruza) x Impala malo štiepny pomer 3:1, čo zodpovedá segregačným pomerom pre dva lókusy so simplexným založením (SOLOMON-BLACKBURN, MACKAY, 1993).

Tabuľka 2: Štiepne pomery v kombináciách z kríženia náchylných genotypov a rezistentných odrôd Cruza a Assia

Kombinácia	počet genotypov (n)	skutočný počet (n)		teoretický počet (n)		χ^2
		rezistentných	náchylných	rezistentných	náchylných	
Folva x Cruza	59	29	30	29,5	29,5	0,008
Helena x Cruza	54	24	30	27	27	0,458
VL28/94 x Cruza	77	35	42	38,5	38,5	0,319
Folva x Assia	78	38	40	39	39	0,026
Helena x Assia	37	15	22	18,5	18,5	0,668
VL28/94 x Assia	50	20	30	25	25	1,010

Kritická hodnota χ^2 – testu pre $P_{0,05} = 3,841$ a pre $P_{0,01} = 6,635$

Štiepny pomer 3:1, ktorý sa zistil v populácii kríženia San x Cruza sa zistil aj v iných kombináciách, kde sa nepredpokladal. Predovšetkým v krížení odrôd a krížencov, o ktorých je známe, že majú gén extrémnej rezistencie proti PVY odvodený zo *Solanum stoloniferum* - Ry_{sto} : Santé, Assia a Y01/30 (Tabuľka 3).

Tabuľka 3: Štiepne pomery v kombináciách krížených k získaniu genotypov s extrémnou rezistenciou proti PVY z troch typov kríženia

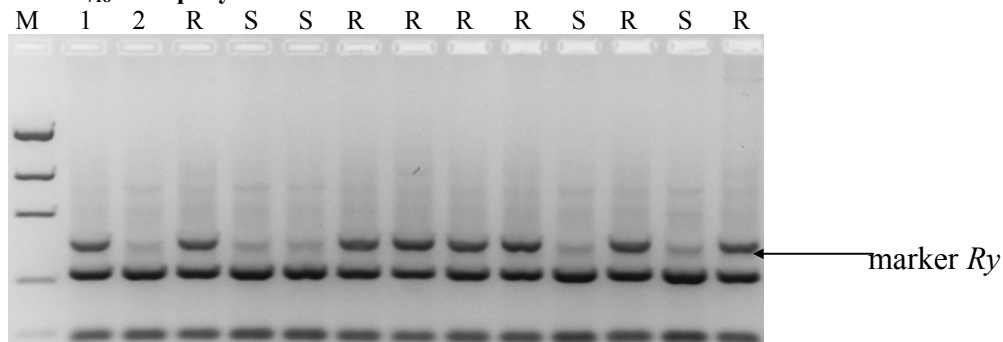
kombinácia	počet testovaných genotypov (n)	štiepny pomer	χ^2
		očakávaný	
San x Cruza	96	3:1	2,490
Santé x Assia	60	3:1	2,143
Santé x Y01/30	98	3:1	0,030
Boda x Assia	55	3:1	1,219

Kritická hodnota χ^2 – testu pre $P_{0,05} = 3,841$ a pre $P_{0,01} = 6,635$

Štiepny pomer naznačil, že rodičovské genotypy majú dva rozdielne simplexné lókusy, čo bolo v rozpore s doterajšími poznatkami o použitých genotypoch. Až v roku 2005 FLIS a kol. (2005) dokázali, že nový lókus, $Ry_{f_{sto}}$ pre extrémnu rezistenciu proti PVY, ktorý sa nachádza na chromozóme XII, a je prítomný vo všetkých odrodách a genotypoch odvodených zo *Solanum stoloniferum*. Tento lókus sa ale nezistil v odrode Santé, čo bolo preukázané pomocou molekulového markeru GP122₇₁₈. Výsledky štiepných pomerov z kríženia genotypov s duplexným založením génov rezistencie s extrémnou rezistenciou proti PVY by mali zodpovedať pomeru 5:1. Z našich analýz vyplýva, že duplexy z kríženia odrody Santé a Assia, resp. Santé x Y 01/30 mali štiepne pomery 3:1 čo svedčí o prítomnosti dvoch lókusov so simplexným založením. Tento výsledok je v súlade so zistením FLISA a kol. (2005), ale je v rozpore so zisteniami SONG (2004). Aj napriek skutočnosti, že analýza potvrdila rozdielne založenie lókusov, jedná sa o gén Ry_{sto} a jeho využívanie v šľachtení nesie so sebou všetky potenciálne negatíva.

Podobne, výsledky kríženia s odrodou Conchita (Ny) potvrdili, že odroda Cruza nemala také symptómy a segregáčné pomery, ktoré by viedli k záveru, že podstata rezistencie odrody Cruza je založená na precitlivelosti k PVY.

Obrázok 1: Vyhodnotenie prítomnosti markerov v genotypoch z kríženia odrody White Lady x C2264 asociovaných s extrémnou rezistenciou proti PVY získaných pomocou špecifických prajmerov GP122₇₁₈ a štiepných restriktčnou endonukleázou Eco RV



1 – White Lady (R), C2264 (S), R – rezistentné genotypy, S – náchylné genotypy.

Výsledky molekulárnych analýz, publikovaných v roku 2005, uvádzajú, že odrody s génom rezistencie Ry_{sto} majú spoločný molekulový DNA marker s výnimkou odrody Santé. Potomstvo z viacerých populácií

pochádzajúcich z kríženia genotypov s extrémnou rezistenciou proti PVY bolo analyzované pomocou markeru GP122₇₁₈ (Obrázok 1) a bolo potvrdené, že výsledky analýzy DNA korelovali s výsledkami infekcií s PVY. Ani v našich populáciách nebola preukázaná prítomnosť markeru, ktorý bol prítomný v potomstve z kríženia odrody White Lady (*Ry-f_{sto}*) a náchylného genotypu C2264.

Odroda Impala, ako náchylná odroda bola použitá na analýzu genotypov, ktoré pochádzali z kríženia genotypov s gémi *Ry_{sto}* a odrodou Cruza. Segregačný pomer 3:1 pri predpokladanom štiepnom pomere rezistentných a náchylných genotypov ($\chi^2 = 0,125 - 0,695$) sa potvrdil vo všetkých troch kombináciách. Tým sa vlastne aj potvrdilo založenie rezistencie vo forme dvoch simplexných lokusov *R₁R₂rr*, z ktorých jeden gén *Ry_{sto}* pochádza z odrôd založených zo *Solanum stoloniferum* a druhý z odrody Cruza.

Záver

Vytvorenie nových biologických materiálov a genetických markerov pre ľuľok zemiakový je veľmi dôležitý pre vedecké štúdie a praktické využitie v šľachtiteľských programoch. Selekcia na základe DNA markerov (MAS) je veľmi atraktívnou metódou pre šľachtiteľov, pretože umožňuje zrýchliť selekciu žiadúcich genotypov. MAS môže zlepšiť nákladovosť a významne zrýchliť introgresiu génov rezistencie do nových odrôd ľuľka zemiakového. V klasických šľachtiteľských programoch sa 99% biologického materiálu vylúči v prvých troch rokoch šľachtenia na základe vizuálneho hodnotenia rastlín a hl'úz. MAS je a ešte určitú dobu bude limitovaný alebo neefektívny v šľachtiteľských programoch z dôvodu nedostatku markerov asociovaných so žiadanými znakmi.

Extrémna rezistencia proti PVY bola efektívne získaná z dvoch základných zdrojov *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* a *Solanum stoloniferum*. Nakoľko oba druhy sa v šľachtení ľuľka zemiakového hojne využívali aj pre iné pozitívne vlastnosti, ich vzájomné kríženie a introdukcia extrémnej rezistencie proti PVY z týchto dvoch druhov nesie mnohokrát v potomstve známky inzuchtnej depresie.

Jednou z ciest zefektívnenia šľachtenia proti patogénom je využívanie duplexných, prípadne triplexných foriem, ktoré zabezpečujú väčšie množstvo rezistentného materiálu pre selekčný proces. Táto cesta môže byť efektívna v tom prípade, ak sú oba genetické zdroje pre vytváranie duplexných genotypov dostatočne geneticky odlišné. Boli vytvorené duplexné genotypy pre extrémnu rezistenciu proti PVY, ktoré boli zložené z dvoch génov – génu *Ry-f_{sto}* a génu extrémnej rezistencie pochádzajúceho z odrody Cruza 27, ktorý doteraz bližšie popísaný v literatúre nebol. Hybridologickou analýzou sa dokázalo rozdielne založenie génu extrémnej rezistencie z odrody Cruza 27 v porovnaní s doteraz popísanými gémi extrémnej rezistencie proti PVY.

Literatúra

1. BURTON, W. G. 1989. The potato. 3rd edition. London: Longman Group UK Limited, 1989, 742s.
2. BEŽO, M. - KUTIŠOVÁ, J.: Genetika rastlín. Nitra: ES VŠP, 1996, 165 s.
3. FLIS, B. – HENNIG, J. – STRELZYK-ZYTA, D. – GEBHARDT, C. – MARCZEWSKI, W.: The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. In: Molecular breeding, 15, 2005, s.95-101.
4. ROSS, H.: Potato breeding - problems and perspectives. Advances in plant breeding: Supplement 13. Journal of plant breeding. Berlin and Hamburg: Paul Parey, 1986.
5. SONG, Y.-S.: Genetic marker analysis in potato for extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and chip quality after long term storage at 4°C. PhD Thesis, Technischen Universität München, 2004, 111 s.
6. SWIEZYNSKI, K. M.: Inheritance of resistance to viruses. In: BRADSHAW, J. E. - MACKAY, G. R.: Potato genetics. Cambridge: CAB International University Press, 1994, s. 339-364.
7. ZADINA, J.: Genetika rezistence bramboru proti hlavním, v ČSSR ekonomicky významným virům a její uplatnění ve šlechtění bramboru: Vedecké práce –OSEVA. Havlíčkův Brod: Výzkumný a šlechtitelský ústav bramborářský, 1986, č.10, s. 15-30.
8. ZADINA, J. - JERMOLJEV, E.: Šlechtění bramboru. Praha: Academia, 1976, 359s.

Adresy autorov:

VŠÚZ – Výskumný a šľachtiteľský ústav zemiakársky, a.s., Popradská 518, 05952 Veľká Lomnica, e-mail: Ing. J. Heldák, PhD., e-mail: heldak@sinet.sk; Ing. K. Forišeková, e-mail: forisek@sinet.sk; RNDr. K. Debreová, e-mail: debreova@sinet.sk. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, Prof. RNDr. M. Bežo, CSc., e-mail: Milan.Bežo@uniag.sk; Ing. V. Štefúnová, e-mail: Veronika.Stefunova@uniag.sk.

KLONOVÁ SELEKCE U RÉVY VINNÉ CLONAL SELECTION IN GRAPEVINE

Olga M. JANDUROVÁ

Clonal selection was used in fruit woody crops as an alternative way of selection for improvement of selected varieties. Negative and positive selection applied during clonal and subclonal selection and individual testing of plants led finally to collection of better adapted genotypes bearing desirable traits and having more stable yield characteristics. Concrete example how to use successfully these principles is shown in this contribution.

Key words: Grapevine, clonal selection, yield stability

Úvod

Selekce klonového materiálu u komerčně pěstovaných odrůd révy vinné se v ČSSR prováděla od padesátých let, měla sjednocenou metodiku a testování a první klony byly povoleny pro pěstování na začátku let šedesátých. Je třeba ocenit množství vložené šlechtitelské práce, ale i konstatovat, že mnohé z dostupných výsledků nebyly vyhodnoceny a odpovídajícím způsobem uplatněny. Jedná se především o přesnou rajonizaci vyselektovaného materiálu, která je podstatná pro jeho optimální využití v podmínkách ČR. Je proto naší snahou u dostupného materiálu toto vyhodnocení provést a vyvodit z něj závěry pro využití metody klonové selekce, případně pro úpravu metodiky.

Materiál a metody

V příspěvku uvádíme výsledky u klonového materiálu dvou odrůd Muller Thurgau a Modrý Portugal. V letech 1999 – 2001 byl ve výsadbě klonového materiálu hodnocen celkový výnos u daného klonu a výnosy jednotlivých keřů individuálně. Soubory dat byly vyhodnoceny analýzou ANOVA a pro testování statisticky významných rozdílů mezi klony jsme použili Scheffeho test. Výsledky klonů téže odrůdy jsou porovnány graficky s vyznačením průměrné sklizně a intervalu 95 % spolehlivosti.

Výsledky a diskuse

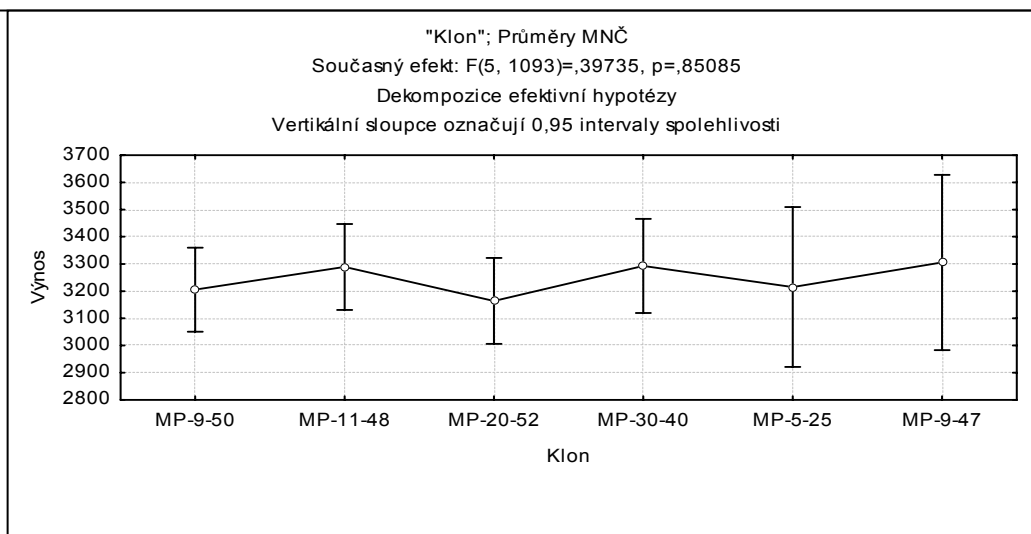
Přehledná základní statistická data klonů obou odrůd – Müller Thurgau (MT) a Modrý Portugal (MP) uvádí rozkladové tabulky. Pro posouzení rozdílů dosažených nejen mezi klony, ale i směrodatné odchylky a intervalu 95 % spolehlivosti je potřeba zdůraznit, že keře zahrnuté do hodnocení jsou vysázené na dvou sousedních terasách vinice Nové Vrše a při otestování rozdílů mezi výnosy téhož klonu nebyl mezi oběma terasami zjištěn statisticky významný rozdíl. Zajímala nás pochopitelně i variabilita mezi ročníky a individuální variabilita jednotlivých keřů. Podle očekávání, variabilita mezi ročníky byla statisticky významná. Individuální variabilita se výrazně lišila, pro její souhrnné vyhodnocení nemáme zatím dostatečný počet hodnocených sezón, ale práce v tomto směru pokračuje. Z hlediska zvýšení stability sklizní je klíčové potvrdit nebo vyvrátit zatímní pozorování, kdy jednotlivé keře dosahují velmi vysoký výnos ale nepravidelně, zatímco jiné jsou nadprůměrně úrodné každou sezónu.

Z průběžného hodnocení klonového materiálu obou odrůd je možné shrnout, že klony MT se z hlediska parametru výnosu významně liší, nadprůměrné klony jsou MT 25/7 a MT 30/34. U odrůdy Modrý Portugal není výrazný rozdíl v plodnosti keřů, nejplodnější klon MP 9/47 má i největší interval spolehlivosti. Pro udržovací šlechtění klonového materiálu révy vinné lze doporučit individuální sledování jednotlivých keřů a pokud je to možné tak i charakteristik moštu, protože nové legislativní podmínky pro výrobu vín a jejich uplatnění na trhu kladou daleko vyšší nároky na cukernatost moštových odrůd. Udržovací šlechtění klonů by mělo být založeno na pozitivní selekci v malých populacích kdy se zvláště u ovocných dřevin mohou uplatnit somatické mutace, které je vzhledem k vegetativnímu rozmnožování révy možno snadno rozmnožit v dalším cyklu reprodukce. Metodika klonové selekce může být doplněna i o testování keřů na jejich zdravotní stav případně o další vlastnosti (např. mrazuodolnost) je však potřeba si uvědomit, že každý další selekční zásah na znak složitě geneticky založený, případně i negativně korelovaný se znakem prvním znamená selekci genetických sestav vloh odlišných od souboru výchozího a mnohdy také narušení normálního rozdělení selektované subpopulace.

Rozkladová tabuľka popisných statistik Nejmenší N ze všech proměn.: 1105			
Klon	Výnos průměr	Výnos N	Výnos Sm.odch.
MP-9-50	3205,406	261	1141,626
MP-11-48	3240,890	255	1276,659
MP-20-52	3164,177	249	1251,039
MP-30-40	3292,813	208	1370,790
MP-5-25	3215,278	72	1417,238
MP-9-47	3305,500	60	1473,128
Vš.skup.	3226,835	1105	1277,960

Test významnosti rozdílů mezi MP klony - statisticky významné rozdíly nebyly prokázány.

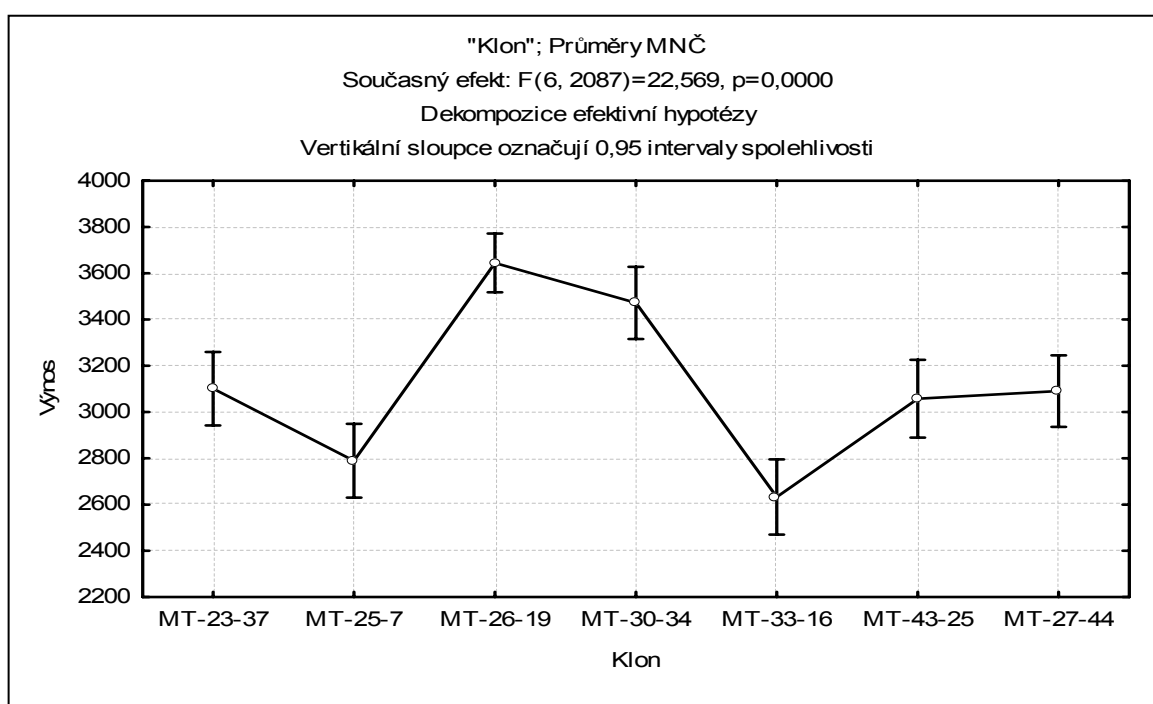
Scheffeho test; proměnná Výnos Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 1619E3, sv = 1093,0							
Č. buňky	Klon	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
		3205,4	3289,0	3164,2	3292,8	3215,3	3305,5
1	MP-9-50		0,990163	0,999667	0,990310	1,000000	0,997601
2	MP-11-48	0,990163		0,945001	1,000000	0,999241	1,000000
3	MP-20-52	0,999667	0,945001		0,948735	0,999874	0,988138
4	MP-30-40	0,990310	1,000000	0,948735		0,999126	1,000000
5	MP-5-25	1,000000	0,999241	0,999874	0,999126		0,999447
6	MP-9-47	0,997601	1,000000	0,988138	1,000000	0,999447	



Rozkladová tabuľka popisných statistik Nejmenší N ze všech proměn.: 1992			
Klon	Výnos průměr	Výnos N	Výnos Sm.odch.
MT-23-37	3294,529	255	1271,675
MT-25-7	2964,569	255	1108,070
MT-26-19	3705,780	423	1342,863
MT-30-34	3537,437	279	1494,409
MT-33-16	2758,534	249	1263,667
MT-43-25	3116,917	240	1247,243
MT-27-44	3119,502	291	1154,557
Vš.skup.	3259,674	1992	1318,303

Test významnosti rozdílů mezi klony MT (šedá pole jsou vysoce významné rozdíly)

		Scheffeho test; proměnná Výnos Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 1642E3, sv = 1985,0						
Č. buňky	Klon	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		3294,5	2964,6	3705,8	3537,4	2758,5	3116,9	3119,5
1	MT-23-37		0,207220	0,012048	0,571358	0,001238	0,882006	0,864310
2	MT-25-7	0,207220		0,000000	0,000181	0,775821	0,941284	0,920786
3	MT-26-19	0,012048	0,000000		0,820946	0,000000	0,000016	0,000003
4	MT-30-34	0,571358	0,000181	0,820946		0,000000	0,031210	0,019403
5	MT-33-16	0,001238	0,775821	0,000000	0,000000		0,145050	0,100444
6	MT-43-25	0,882006	0,941284	0,000016	0,031210	0,145050		1,000000
7	MT-27-44	0,864310	0,920786	0,000003	0,019403	0,100444	1,000000	



Poděkování: Hodnocení klonového materiálu je součástí programu Výzkumného záměru : Studium biodiversity zahradních plodin a léčivých rostlin, který je financován MZE ČR.

Literatura

1. SCHOFFLING, H. – STELLMACH, G.: Klon Züchtung bei Weinreben in Deutschland. Waldkircher Verlag, 1993. ISBN 3-87885-273-8
2. MEREDITH, C.P.: The current status of genetic engineering in grapevines. Proc. Office International de la Vigne et du Vin (OIV). 68. Assemblée générale, Paris, 5-9. Septembre 1988

Adresa autora:

Olga Mercedes Jandurová, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha, Výzkumná stanice vinařská Karlštejn 98 PSČ: 267 18

VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍHO FINGERPRINTINGU PRO IDENTIFIKACI A ODLIŠENÍ HYBRIDŮ KUKUŘICE (*Zea mays* L.) THE USING OF MOLECULAR FINGERPRINTING METHODS FOR IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF MAIZE HYBRIDS (*Zea mays* L.)

Petra HÁJKOVÁ - Marie PORUBOVÁ

Modern breeding methods require new approaches to analysis of breeding material. The characterization and identification of plant material on molecular level is important part of molecular breeding development. The exact identification of maize hybrid lines is tool of authenticity and pedigree determination in possible commercial causes. The collection of 30 maize hybrids was analysed by means of the RAPD molecular method based on Polymerase Chain Reaction. The preliminary screening of the plant material was accomplished by the collection of 37 primers on the two- and three-lines maize hybrids. 14 primers for the analysis of 30 hybrids were selected on basis of detected polymorphism. After repeated analysing of this 14 primers were selected 4 primers, that in common can differentiate this collection of 30 maize hybrid lines. All hybrids were differentiated and the genetic relation between individual hybrids was determined in dependence on the used RAPD primers. The resulting RAPD profiles can be used for the exact identification of the analysed maize hybrid lines.

Key words: *genetic diversity, dendrogram, PCR, RAPD, DNA analysis, breeding, cluster analysis*

DNA fingerprinting je metoda genetické identifikace, která se používá například k ověřování pravosti odrůd pro ochranu práv šlechtitelů a spotřebitelů. Pro identifikaci lze použít jak proteinové tak i DNA markery. Velkou předností DNA markerů je vyšší úroveň polymorfismu a stabilita analyzované DNA nezávislá na podmínkách prostředí. Pro účely charakterizace materiálů kukuřice je možné využít různých aplikací základních metod fingerprintingu. Tyto metody jsou založeny buď na PCR nebo na hybridizaci. Jednou z metod je také RAPD, která využívá principu PCR k exponenciálnímu namnožení náhodně vybraných úseků genomové DNA. Počet a délka získaných fragmentů je specifická pro každou konkrétní kombinaci náhodného primeru a genotypu. Po rozdělení získaných fragmentů na elektroforéze získáme charakteristický otisk genomu nazývaný fingerprint. Jde o metodu se střední úrovní polymorfismu, relativně nízkou reprodukovatelností. Optimalizovaná metodika je reprodukovatelná v rámci laboratorní za předpokladu striktního dodržení všech parametrů PCR protokolu. Cílem této práce bylo nalézt RAPD primery vhodné pro odlišení souboru 30 hybridních linií kukuřic, stanovit genetickou diverzitu v souvislosti s původem hybridů. Celosvětově se problematikou identifikace hybridů nebo linií kukuřice zabývalo mnoho autorů. K identifikaci kukuřice využili tuto metodu RAPD fingerprintingu například (CHEN et al., 2000; SHIEH et al., 2002; MAURIA et al., 2002). Kromě RAPD lze využít ještě SSR, RFLP a AFLP metody k charakterizaci hybridů a linií kukuřice (LUBBERSTEDT et al., 1999; PEJIC et al., 1998).

Materiál a metody

Rostlinný materiál a odběry:

Osivo 30 hybridů dodala šlechtitelská stanice CEZEA v Čejčci (viz. dendrogram). Materiál pro izolaci DNA byl odebírán z listů rostlin pěstovaných ve skleníkových podmínkách. Byl proveden odběr materiálu ve fázi 3-4 listu. Odebrán byl vždy směsný vzorek z 5 -7 rostlin, přičemž každý vzorek byl homogenizován v prostředí tekutého dusíku a uchován v mrazícím boxu při -80 °C.

Extrakce DNA a PCR reakce:

DNA byla izolována kitem Gen Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma dle metodiky uvedené v protokolu dodaném s kitem. Tímto způsobem byla získána DNA v dostatečné kvantitě i kvalitě. Kvantita DNA byla vyhodnocena elektroforeticky pomocí hmotnostního standartu.

Pro amplifikaci byly použity primery o velikosti 10 oligonukleotidů (tab.2). Reakční směs (25 µl) obsahovala 20 ng templátové DNA, 0,2 mM dNTP, 8 µM primeru, 2 U DyNAzyme™ II polymerázy (Finnzymes), 1x reakční pufr (10 mM TRIS-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl a 0,1 % Triton X-100). Amplifikační cyklus byl prováděn podle Heun a Helentjaris (1993) v gradientovém termocycleru Touchgene (KRD). Produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu a barveny ethidium bromidem. Detekce DNA byla provedena v UV světle, fotodokumentace byla pořízena fotoaparátem Canon prostřednictvím fotodokumentačního systému Ultra-Lum UC4100.

RAPD analýza:

Nejprve byl v rámci 1. screeningu primerů analyzován materiál dvouliniových a tříliniových hybridů, výchozích linií a jejich komponent 37 RAPD primery. Na základě polymorfismu bylo vybráno 14 primerů, které byly použity pro 2. screening u 30 hybridů. Tento postup byl zvolen z důvodu analýzy užšího spektra materiálu s velkým počtem RAPD primerů na počátku analýz.

Z těchto 14 primerů vykazovalo nejvyšší polymorfismus 8 primerů, které byly použity k opětovné amplifikaci celého souboru 30 hybridů. Na základě opakování byly vybrány 4 primery, jejichž aplikací byl rozlišen soubor 30 hybridů.

Analyza dat pomocí AQ softwaru:

Cílem screeningu bylo vybrat ze 37 primerů ty, které produkovaly nejvíce polymorfních silných až středně silných fragmentů a vykazovaly nejvyšší míru genetické diverzity. V této studii bylo po základním screeningu aplikováno 14 RAPD primerů na 30 hybridních kukuřice (tab 1). Těchto 14 primerů amplifikovalo v celém souboru 177 fragmentů, přičemž počet polymorfních lokusů byl 56 fragmentů (31,64%). Velikost fragmentů se pohybovala od 1000 – 100 bp.

Při analýze jednotlivých gelů byla fotografie upravena (jas, kontrast) a dále analyzována v Advanced Quantifier softwaru. Tento software zpracovává spektra na základě detekce přítomnosti a nepřítomnosti fragmentů v porovnání s přesně definovaným hmotnostním markerem v bp (Step ladder 50 bp, Sigma). Na základě Jaccardova podobnostního koeficientu software stanovil vzájemnou genetickou identitu a genetickou vzdálenost mezi analyzovaným souborem 30 hybridů kukuřice. Na základě stanovení genetické diverzity AQ software vytvořil dendrogramy podobnosti mezi jednotlivými hybridy kukuřice u 4 RAPD primerů vybraných po 2. screeningu.

Tabulka 1: 14 RAPD primerů dávajících polymorfismus na a tříliniovém hybridním potomstvu (1-9) a dvouliniovém hybridním potomstvu (10-14)

Číslo	Primer	Sekvence 5'-----3'
1	AG03	TGC GGG AGT G
2	OPA4	AAT CGG GCT G
3	OW13	CAC AGC GAC A
4	OPG12	CAG CTC ACG A
5	OPG03	GAC CCC TCC A
6	UBC446	GCC AGC GTT C
7	OPE16	GGT GAC TGT G
8	UBC407	TGG TCC TGG C
9	OPG18	GGC TCA TGT G
10	OPN09	TGC CGG CTT G
11	OPV12	ACC CCC CAC T
12	OPX04	CCG GTA CCG A
13	UBC506	CCT TTC CCG A
14	UBC401	TAG GAC AGT C

Výsledky a diskuse

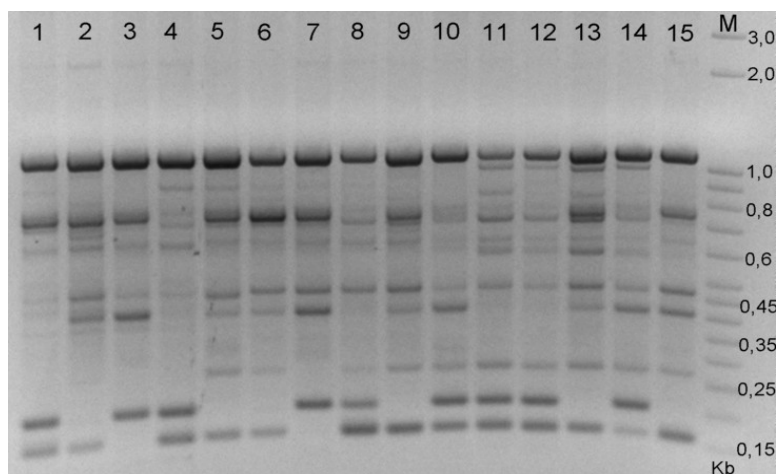
Byl proveden screening 37 RAPD primerů na dvouliniovém a tříliniovém hybridním materiálu kukuřice. Bylo vybráno 14 RAPD primerů pro analýzu souboru 30 hybridů kukuřice. Analýzy byly opakovány z důvodu zachycení reprodukovatelnosti silných a středně silných pruhů. Byl hodnocen polymorfismus prostřednictvím 14 oligonukleotidových primerů. Celkem bylo amplifikováno 177 lokusů, z nichž 56 bylo polymorfních, což odpovídá 31,64 % polymorfismu. Na základě opakování pro potvrzení polymorfismu mezi hybridy byly vybrány 4 primery – UBC506, OPX04, OW13, OPG18, jejichž aplikací byl rozlišen soubor 30 hybridů.

Předpoklad, že RAPD primery dávající polymorfismus u výchozího testačního materiálu (dvouliniový a tříliniový hybridní materiál, jejich výchozí linie a komponenty), budou dávat ve většině případů polymorfismus také u souboru 30 hybridů, se potvrdil. Hodnoty genetické diverzity se pohybovaly v rozmezí od 10 – 78%. Příklad elektroforetického spektra souboru 30 hybridů kukuřice pomocí RAPD primeru OPX04 1-15, OPX04 16-30 dokumentují obr.1 a 2.

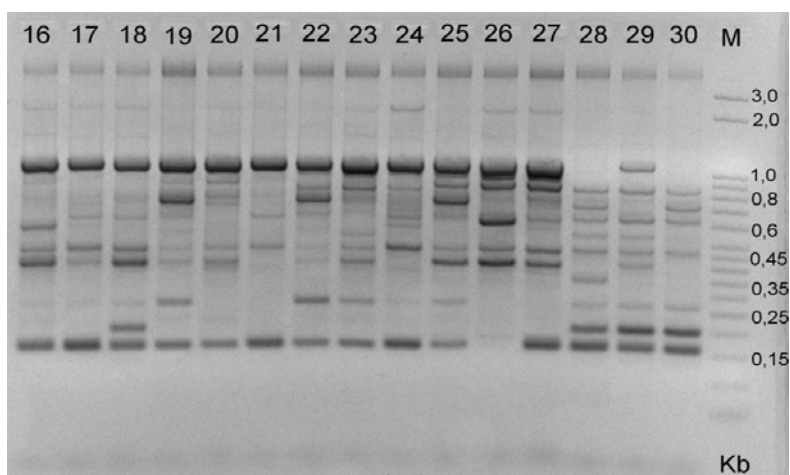
Dendrogram podobnosti tvořený aplikací primeru OPX04 dokumentuje obr. 3. Výsledné dendrogramy byly konstruovány prostřednictvím statistického vyhodnocení matice programem Advanced Quantifier pomocí metody UPGMA a za použití Jaccardova koeficientu. Byly stanoveny RAPD profily hybridů kukuřice získané aplikací výchozí DNA s konkrétními primery (UBC506, OPX04, OW13, OPG18).

MAURIA et al. (2002) používali RAPD analýzu k odhadu genetické variability a příbuznosti u 30 indických inbredních linií. Výsledky potvrdily velkou použitelnost RAPD techniky pro stanovení genetické čistoty a hodnocení genetické rozmanitosti a příbuznosti. SHIEH et. al (2002) se zabývali hodnocením genetické rozdílnosti mezi 13 liniemi kukuřice a stanovením vzájemného vztahu mezi genetickou vzdáleností a výkonností hybridů pomocí RAPD analýzy. Výsledky ukázaly, že tato analýza založená na RAPD nemůže být užita k přesné předpovědi výkonnosti F1 hybridů a hodnoty heterozy, jelikož koeficienty determinace jsou nevýznamné a předpovědní hodnota je tak limitována. CHEN et al. (2000) za použití této metody analyzoval 12 elitních linií kukuřice a zjistil, že metoda RAPD DNA fingerprintingu může být užita v praxi k identifikaci těchto linií kukuřice.

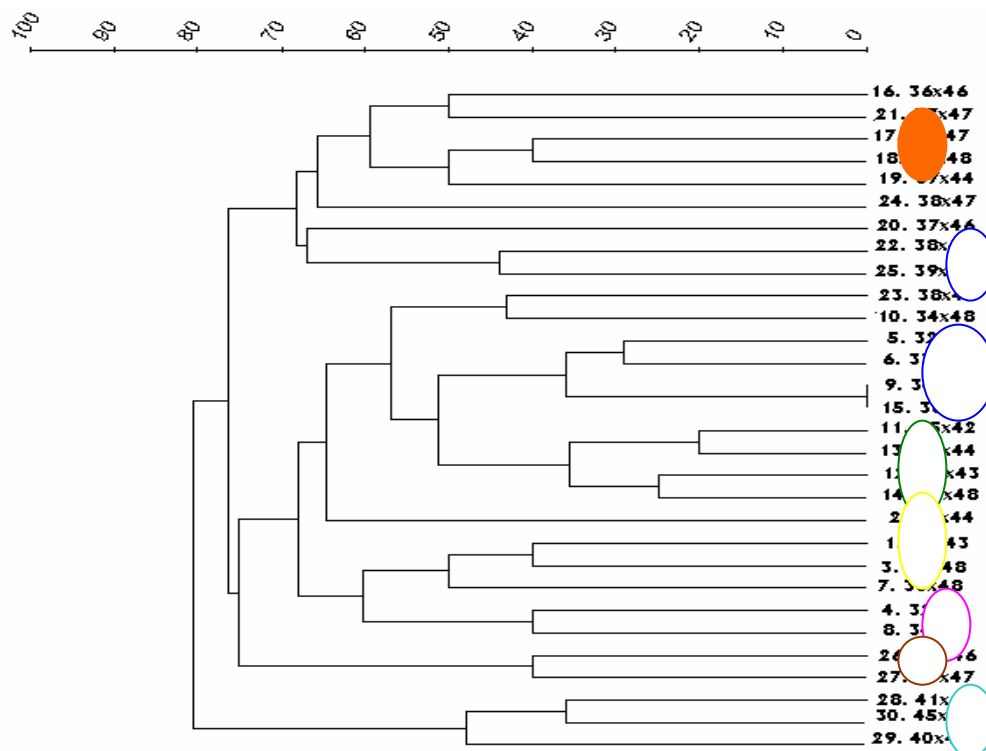
Obr. 1. RAPD profily hybridů kukuřice s RAPD markerem OPX04. M – hmotnostní standard 50 bp (Sigma Aldrich). 1-15 označení hybridů kukuřice



Obr. 2. RAPD profily hybridů kukuřice s RAPD markerem OPX04. M – hmotnostní standard 50 bp (Sigma Aldrich). 16-30 označení hybridů kukuřice



Obr. 3. Dendrogram příbuznosti 30 hybridů kukuřice vytvořený pomocí Advanced Quantifier 4.2. na základě amplifikace s RAPD markerem OPX04. Shluky jsou označeny barevně a odpovídají stejnému původu



Závěr

V rámci analýz dvouliniových a tříliniových hybridů kukuřice bylo vybráno na základě polymorfismu celkem 14 RAPD primerů pro testování 30 hybridů kukuřice. Analýzou 30 hybridů bylo detekováno 56 polymorfních fragmentů v rámci celého souboru hybridů kukuřice, což odpovídá 31,64 % polymorfismu. Úroveň genetické diverzity byla vysoká a se pohybovala v závislosti na použitém primeru od 10 – 78%. V rámci celého souboru 30 hybridů při použití primerů UBC506, OPX04, OW13, OPG18 vytvořené shluky odpovídaly genetickému původu kukuřice. V plánovaném řešení této problematiky bude pro fingerprinting kukuřice použita metoda mikrosatelitů (SSR), která byla na našem pracovišti pro kukuřice optimalizována (HÁJKOVÁ, et al. 2004)

Literatura

1. HÁJKOVÁ, P. - PORUBOVÁ, M.: Optimalizace metody mikrosatelitů (PCR-SSR) pro kukuřici *Zea mays*, L. In: Sborník: Nové poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin. Brno, VÚPT, 2004, s. 81-85.
2. CHEN, YH. - ZHANG, CHL. - WANG, ZL. - JIA, JH. - SUN, ZL. - JIN, DM. - WANG, B.: Computerized identification of DNA fingerprinting of maize seed. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 6, 2000, s. 223-226
3. LUBBERSTEDT, T. - VYULSTEKE, M. - DUSSLE, C. - KUIPER, M. - MELCHINGER, A.E.: Report of the 1998 conference of the Association of Austrian Plant Breeders, Austria, 1998, s. 24 – 26.
4. MAURIA, S. - SINGH, NN. - BHAT, KV. - LAKHANPAUL, S.: Assessment of genetic variation in Indian maize inbreds using RAPD markers. Journal of Genetics and Breeding 56, 2002, s. 15-16.
5. PEJIC, I. - AJMONE, M.P. - MORGANTE, M. - KOZUMPLICK, V. - CASTIGLIONI, P. - TARMINO, G. - MOTTO, M.: Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Maize Genetics Cooperation Newsletter 72, 1998, s. 18 – 19.
6. SHIEH, GJ - THSENG, FS.: Genetic diversity of Tinan- white maize inbred lines and prediction of single cross hybrid performance using RAPD markers. Euphytica 124, 2002, s. 307 – 313.

Financování:

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

Adresa autorov:

Petra Hájková, Zemědělský výzkum, s.r.o., Zahradní 1, 664 41 Troubsko, Česká republika, e-mail: hajkova@vupt.cz
Marie Porubová, CEZEA – šlechtitelská stanice, a.s., 696 14 Čejč, Česká republika, cezea.as@worldonline.cz

VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ PRO ODLIŠOVÁNÍ ODRŮD LNU MOLECULAR MARKERS FOR FLAX GENOTYPING

Jiří HORÁČEK - Petr SMÝKAL - Martin PAVELEK

Molecular markers are molecules, that could be used to trace a desired gene or genes in examined genotypes. In fact, a piece of DNA or a protein can be used as a marker. The various categories of markers differ for several attributes: level of polymorphism, degree of environmental stability, number of loci, molecular basis of the polymorphism. Earlier approaches were based on the evaluation of storage proteins or isozymes. DNA markers seem to be the best candidates for efficient evaluation and selection of plant material. Molecular markers can be used for identification of cultivars, for taxonomic, phylogenetic and genetic diversity analyses. A set of 50 RAPD markers, three ISSR markers and AFLP markers were used for genotyping of twelve flax cultivars.

*Key words: genotyping, molecular markers, flax, *Linum usitatissimum* L., RAPD, ISSR, AFLP*

Úvod

Rod *Linum* náleží do čeledi *Linaceae*, která zahrnuje 22 rodů rostoucích převážně v tropech. V této čeledi zaujímá rod *Linum* významné postavení, neboť je rozšířen v mírném pásmu a některé jeho formy sahají až daleko na sever. Tento rod zahrnuje více než 200 druhů planě rostoucích rostlin jednoletých i vytrvalých, z nichž praktický význam má pouze len setý (*Linum usitatissimum* L.). Rozšíření kulturního lnu ve všech světadílech s různými klimatickými a půdními podmínkami historicky způsobily značnou vývojovou, růstovou i morfológickou rozmanitost jeho forem a jsou také příčinou nejednotnosti literárních pramenů v jeho klasifikaci a systematice. V současné době nejsou k dispozici práce, které by s využitím molekulárních markerů řešily taxonomické a evoluční aspekty rodu *Linum*.

Kolekce rodu *Linum* je v současné době reprezentována 2041 položkami, z toho je 519 krajových odrůd, 1024 odrůd a 498 vzorků šlechtitelského materiálu. U 1972 položek, u kterých je znám stát původu je 78 % vzorků z Evropy, 7 % z USA a Jižní Ameriky, 4 % z Afriky, 4,5 % z Asie a 0,25 % z Austrálie. Podle původu 50 % kolekce tvoří starší i současné odrůdy, 26 % tvoří krajové odrůdy a 24 % šlechtitelský materiál. Podle hospodářského typu kolekce lnu obsahuje 53 % přadných typů, 39 % olejních typů a 8 % olejnopřadných typů (PAVELEK et al., 2001). Kolekce je dlouhodobě uchovávána v centrální genové bance VÚRV v Praze – Ruzyni, kde část je uložena při – 5°C jako tzv. aktivní kolekce a větší část při – 20°C jako tzv. základní kolekce, obě při standardní vlhkosti 5 %.

V současné době je snaha o racionalizaci genových zdrojů odhalením a eliminací duplikací a vytvořením předpokladů pro tvorbu core kolekce kombinací klasických pasportních a popisných deskriptorů (a jejich dalším zpřesněním metodami obrazové analýzy) a masivním využitím biochemických (proteiny) a molekulárních markerů (RAPD, SSR, AFLP). Molekulární techniky jsou a budou dále směřovány jednak na vyhledávání markerů vhodných pro identifikaci a rozlišení genotypů a dále na vyhledávání markerů spojených s významnými hospodářskými znaky.

Současné možnosti využívání molekulárních markerů pro odlišování odrůd lnu jsou však poněkud omezené, doposud bylo publikováno jen málo prací přímo zaměřených na tuto problematiku a také informace o sekvencích genomové DNA lnu v databázích jsou velmi chudé. Situace se však do budoucna zřejmě rapidně zlepšit, zejména z důvodu mimořádných investic do výzkumu lnu v případě světových velmocí (Kanada, Čína). V ještě nedávné době byla oblíbenou metodou analýza isoenzymových spekter, tato práce byla prováděna i na pracovišti Agritec. Soubor 28 odrůd lnu byl analyzován pomocí 18 isoenzymových systémů, bylo nalezeno 145 markerů, z nichž 66 bylo polymorfních (KRULÍČKOVÁ et al., 2002). Větší informační potenciál mají však DNA markery, které jsou oproti isoenzymům více polymorfní a nejsou ovlivňovány jinými faktory (ontogenetická fáze rostliny při odběru vzorku, vliv lokality a ročníku). Vzhledem k malé znalosti sekvencí genomové DNA byly zatím vyvíjeny zejména takové DNA markery, které tuto znalost nevyžadují. Pro analýzu menšího souboru lnu byla využita metodika ISSR (WIESNER et al., 2001). Velký soubor genotypů lnu byl analyzován pomocí nespecifických RAPD markerů (Fu 2005), tento typ markerů byl využit i v jiných studiích (CULLIS et al., 1999; MANSBY et al., 2000).

Cílem prezentované práce bylo vyzkoušení možností využití různých typů nespecifických DNA markerů na malém souboru kontrastních genotypů lnu.

Materiál a metody

Rostlinný materiál. Dvanáct kontrastních odrůd lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) z genové kolekce Agritec bylo vyseto v maloparcelkových pokusech. Seznam odrůd viz Tab.1.

Izolace genomové DNA. Genomová DNA byla izolována z čerstvě sklizených mladých listů lnu z maloparcelkových pokusů pomocí komerčního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitac). Kvalita a množství izolované DNA byly poté stanoveny spektrofotometricky (Eppendorf Biophotometer) a DNA byla naředěna na koncentraci 30 µg/ml

Analýza RAPD. Analýzy RAPD markerů byly provedeny dle standardní metodiky (FU et al., 2005). Bylo použito 50 různých primerů, zejména Operon (OPC1-OPC20, OPD1-OPD20, OPW08, OPW02, OPAB4P9, P10, P14, OPW01, UBC741, UBC556, UBC561). Pro PCR reakci byla použita taq polymeráza TaKaRa a termocycler Eppendorf Mastercycler.

Analýza ISSR. Analýzy ISSR markerů byly provedeny dle publikované metodiky (BARANGER et al., 2004; WIESNER et al., 2001) s použitím repetitivních primerů, kotvených na 3' nebo 5' konci částečně degenerovanými nukleotidy: 3PCT1, 3PCT2, 3PCT3.

Analýza AFLP. Analýzy AFLP markerů byly provedeny podle publikované metodiky (TREUREN van et al., 2001; VOS et al., 1995). Byly použity restriktázy *MseI* a *EcoRI* s příslušnými adaptory. Elektroforetické dělení výsledných fragmentů bylo provedeno na polyakrylamidovém gelu barveném stříbrem.

Zpracování dat. Elektroforetické gely byly po obarvení ethidium-bromidem fotografovány digitálním fotoaparátem, elektroforeogramy byly vyhodnoceny pomocí software Bio1D++ (Vilber Lourmat).

Výsledky a diskuse

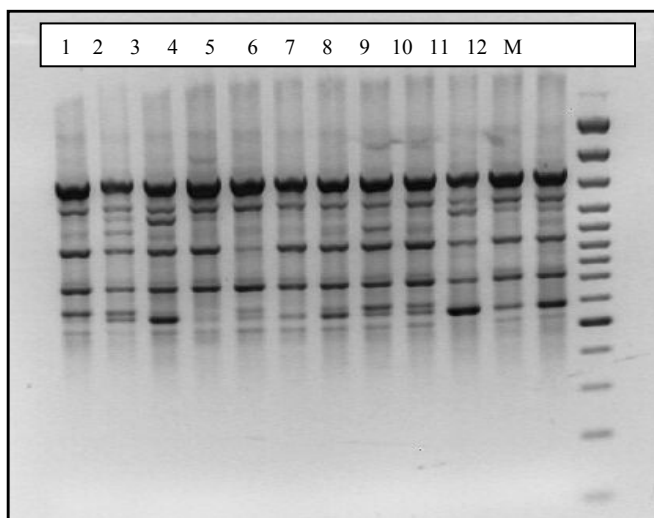
Prvním typem DNA markerů testovaných na odlišení odrůd hrachu byly RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Technika RAPD je založena na využití krátkých primerů (dekamerů), které se váží na homologní místa genomu. Sekvence primerů nejsou voleny cíleně, jsou náhodné. Ke vzniku produktu PCR reakce dochází tehdy, jestliže jsou dvě homologní místa dostatečně blízko. Výhodou RAPD je jednoduchost, rychlost a velmi nízké náklady na vývoj. Jako nevýhoda metody bývá uváděna nízká reprodukovatelnost výsledků a nízký polymorfismus. Soubor 12 kontrastních odrůd lnu byl analyzován pomocí 50 náhodně zvolených RAPD primerů. Cílem bylo nalézt takové RAPD primery, které by poskytly co nejvyšší počet polymorfních proužků a umožnily tak identifikaci jednotlivých odrůd. Odrůdy lnu byly záměrně zvoleny tak, aby se výrazně lišily původem. Přesto bylo z celkového počtu 508 nalezených RAPD markerů pouze 104 polymorfních, tedy jeden z pěti. Žádný z použitých primerů neodlišil všech 12 odrůd lnu najednou, pro jejich jednoznačnou identifikaci bylo vždy potřebné kombinovat tři i více primerů. V případě rozsáhlejších souborů odrůd lnu by počet potřebných primerů úměrně narostl, jak je vidět na příkladu kanadské studie, kdy k popisu genové kolekce bylo použito 16 RAPD primerů pro každou položku (FU, 2005). Tak vysoký počet PCR analýz je finančně velmi nákladný, je tedy zapotřebí hledat jiné markerovací systémy.

V případě ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) byl soubor 12 odrůd lnu analyzován třemi ISSR primery, jejichž sekvence byly převzaty z literatury (WIESNER et al., 2001). Technika ISSR využívá existence tzv. mikrosatelitní DNA, což jsou mnohonásobně se opakující krátké oligonukleotidové motivy. Oproti pravé analýze mikrosatelitů (SSR – Simple Sequence Repeats), která vyžaduje znalost sekvencí nukleotidů v okolí mikrosatelitů, dosedají ISSR primery přímo do sekvence mikrosatelitu a pomocí degenerovaných primerů se zakotvují na jeho kraji. Výhodou techniky by měla být její jednoduchost, nízké náklady na vývoj. Jasnou nevýhodou se však ukázal nízký, zcela nedostačující polymorfismus. Z celkového počtu 38 nalezených ISSR markerů byly pouze 4 polymorfní (1:10). Žádný z testovaných ISSR primerů, ani jejich kombinace, nerozlišily všech 12 odrůd lnu.

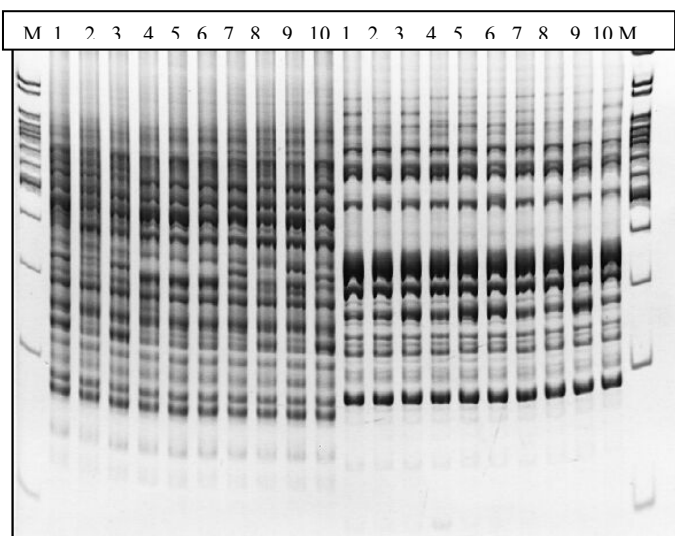
Další testovanou metodikou pro odlišení vybraných odrůd lnu byla AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Principem AFLP je selektivní amplifikace restričních fragmentů, vzniklých z genomové DNA účinkem restriktáz. Polymorfismus se pak zjišťuje separací na polyakrylamidovém gelu nebo v kapiláře na základě rozdílů ve velikosti amplifikovaných produktů. Na daném testovacím souboru genotypů bylo testováno celkem 6 primerových *EcoRI* a *MseI* kombinací s ukotvením 3 selektivních bází na 3' konci. V případě elektroforetické separace produktů na 20 cm BioRad Protean II gelu bylo možné detekovat průměrně 30 fragmentů, z nichž 7 bylo polymorfních (23%). V případě analýzy na 40 cm sekvenačním gelu bylo možné detekovat průměrně 50 fragmentů na primerovou kombinaci, z nichž 12 bylo polymorfních. Celkově bylo takto získáno 278 markerů z 6 primerových kombinací s informačním ziskem 58 (21%). S použitím 3 vybraných kombinací primerů bylo možné rozlišit všech testovaných 12 odrůd lnu.

Tabulka 1: Seznam analyzovaných odrůd lnu

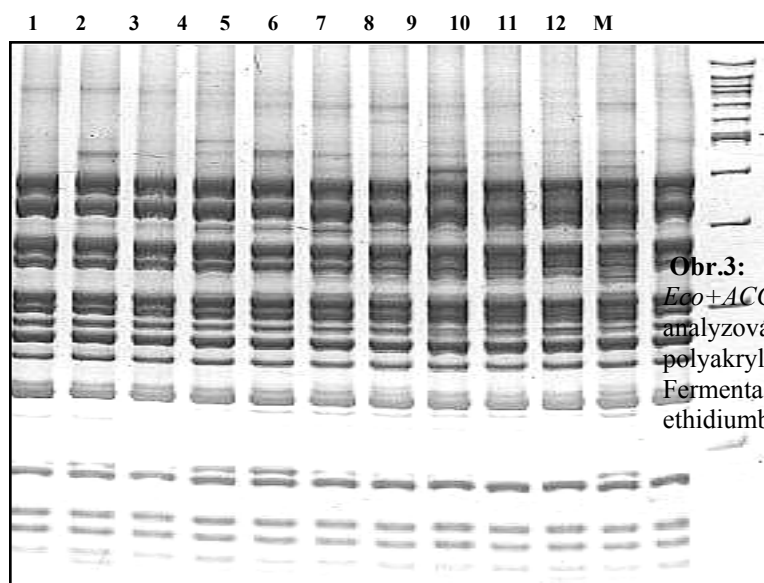
č.	odrůda	původ	typ
1	Alba	POL	přadný
2	Giganta	NLD	přadný
3	Stormont Cirrus	IRL	přadný
4	Kenya CI 709	USA	olejný
5	La Estanzuela	URY	olejný
6	Punjab 125	IND	olejný
7	Textilčik	CSK	přadný
8	Šumperský rekord	CSK	přadný
9	Egyptský	EGY	olejný
10	Maďarský olejný	HUN	olejný
11	Viking CI 681	USA	olejný
12	Janetzki Feinflachs	GER	přadný



Obr.1: Příklad analýzy RAPD markerů (primer OPC09), vzorky na gelu jsou řazeny zleva doprava ve vzestupném pořadí. Žebřík: MBI Fermentas 100 bp. Barveno ethidiumbromidem.



Obr.2: Příklad analýzy ISSR markerů (primery 3PCT1 - vlevo a 3PCT2 - vpravo), vzorky na polyakrylamidovém gelu jsou řazeny zleva doprava ve vzestupném pořadí. Žebřík MBI Fermentas 100 bp. Barveno ethidiumbromidem.



Obr.3: Příklad AFLP analýzy (primery *Eco+ACC*, *Mse-CTC*), vzorky byly analyzovány na 20 cm 8% TBE polyakrylamidovém gelu. Žebřík MBI Fermentas 100 bp. Barveno ethidiumbromidem.

Závěr

Výhledy do budoucna: Dále bude rozvíjena a optimalizována metodika AFLP, která se z nesespecifických metod jeví jako nejperspektivnější (také s ohledem na možnost automatizace). Vzhledem k poměrně málo uspokojivým výsledkům dosaženým pomocí nesespecifických markerů budou do budoucna vyvíjeny molekulární markery, které již vyžadují znalosti ohledně sekvence genomové DNA (mikrosatelity, retrotransposony). Očekává se, že s jejich pomocí bude možno jednoznačně identifikovat jednotlivé odrůdy lnu a to co možná nejnížším počtem markerů.

Literatura

1. CULLIS, C.A. – SWAMI, S. – SONG, Y.: RAPD polymorphism detected among the flax genotypes. In: Plant Molecular Biology, 41, 1999, s. 795-800.
2. FU, Y.B.: Geographic patterns of RAPD Variation in Cultivated Flax. In: Crop Sci., 45, 2005, s. 1084-1091.
3. KRULÍČKOVÁ, K. – POŠVEC, Z. – GRIGA, M.: Identification of flax and linseed cultivars by isozyme markers. In: Biol Plant, 45, 2002, s. 327-336.
4. MANSBY, E. – DIAZ, O. – BOTHMER, R.: Preliminary study of genetic diversity in Swedish flax (*Linum usitatissimum* L.). In: Genetic Resources and Crop Evolution, 47, 2000, s.417-424.
5. PAVELEK, M.: Status of the Czech National Flax Collection and Management of the International Flax Database within the Framework of the FAO/SCORENA Flax and other Bast Plants Network. 22 – 28. In: Maggioni, L., Pavelek, M., van Soest, L., J., M. a 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.
6. TREUREN, VAN R. - VAN SOEST. L.J.M. - VAN HINTUM, TH.J.L.: Marker-assisted rationalisation of genetic resource collections. a case study in flax using AFLPs. In: Theor.Appl. Genet., 103, 2001, s. 144-152.
7. VOS, P. – HOGERS, R. – BLEEKER, M. – REIJANS, M. – LEE, T. – HORNES, M. – FRIJTERS, A. – POT, J. – PELEMAN, J. – KUIPER, M. – ZABEAU, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. In: Nucleic Acids Res., 23, 1995, s. 4407-4414
8. WIESNER, I. – WIESNEROVÁ, D. – TEJKLOVÁ, E.: Effect of anchor and core sequence in microsatellite primers on flax fingerprinting patterns. In: J. Agric. Sci., 137, 2001, s. 37-44

Poděkování

Tato práce byla vykonána za finanční podpory MZe ČR, grant č. QE1123 a výzkumného záměru MŠMT, grant č. MSM2678424601.

Adresa autora:

Mgr. Jiří Horáček, PhD., Agritec Plant Research, s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Česká republika

LOKALIZACE NOVÉHO GENU ODOLNOSTI K PADLÍ TRAVNÍMU U *HORDEUM VULGARE* ssp. *SPONTANEUM* POMOCÍ DNA MARKERŮ LOCALIZATION OF A NEW RESISTANCE GENE AGAINST POWDERY MILDEW IN *HORDEUM VULGARE* ssp. *SPONTANEUM* BY MEANS OF DNA MARKERS

Kateřina TETUROVÁ – Jana ŘEPKOVÁ – Pavel LÍZAL – Antonín DREISEITL

A newly identified accession of wild barley (Hordeum vulgare ssp. spontaneum) resistant to powdery mildew caused by Blumeria graminis f. sp. hordei was studied with the aim of finding the number of genes conferring the resistance to powdery mildew, their allelism with the Mla locus, and the other aim was to localize individual genes on barley genetic map. The genetic as well as the molecular analyses were performed in the segregating F₂ population of the cross between the winter barley cultivar Tiffany and the resistant accession PI466197. Microsatellite DNA markers from known databases were used for the localization of resistance genes on barley chromosomes. The amplification methods for each of 117 DNA markers were optimized and polymorphism between the parents (Tiffany vs. H. spontaneum accession) was investigated and analysed by agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. Polymorphism was displayed for 64% microsatellites. Modified bulk segregant analysis was used for the identification of markers linked with resistance genes. The genetic analysis showed that in this accession the resistance was determined by two independent genes with dominant mode of inheritance. Allelism test confirmed that one resistance gene was in Mla locus. The molecular analysis revealed highly significant linkage with the markers Bmac0213 and MGB402 on the short arm of chromosome 1H. This position is consistent with the Mla locus. The other gene was proved to be highly significantly linked with Bmac0134 and MWG878 on the short arm of chromosome 2H. This is the promising newly identified locus. The prospect of our work is the identification of further more tightly linked DNA markers and fine mapping of resistance genes.

Key words: barley, Hordeum vulgare ssp. spontaneum, microsatellite markers, powdery mildew, resistance genes

Úvod

Padlí travní způsobené houbovým patogenem *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* je nejrozšířenější chorobou ječmene, jejíž epidemie snižují výnos zrna, sladovnickou a krmnou kvalitu a rentabilitu výroby této plodiny. Z ekonomického i ekologického hlediska je pro pěstitele nejvýhodnější ochranou před patogenem pěstování odolných odrůd. U ječmene je již známo několik desítek genů odolnosti k padlí travnímu, z nichž se významná část nachází v oblasti lokusu *Mla* na chromozomu 1H (JAHOR, FISHBECK, 1987; 1993; JØRGENSEN, 1994). JØRGENSEN (1994) shrnul i další známé lokusy rasově specifických genů determinujících odolnost k padlí travnímu s jejich lokalizacemi na chromozomech 1H (*Mla*, *Mlk*, *Mlat*, *Mlnn*, *Mlra*, *MLGa*), 2H (*MLLa*), 4H (*Mlg*, *mlo*) a 6H (*Mlh*). Později SCHÖNFELD et al. (1996) zmapovali geny *Mlj* na chromozomu 5H, *mlt* a *Mlf* na chromozomu 7H. Účinnost některých genů odolnosti byla však již patogenem díky jeho vysoké přizpůsobivosti překonána. Jedním z nositelů odolnosti je planě rostoucí ječmen *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, v jehož kolekci bylo zjištěno několik nových plně účinných zdrojů odolnosti k evropským patotypům padlí travního (DREISEITL, BOCKELMAN, 2003). Molekulární markery jsou již široce využívány při genetickém mapování a k lokalizaci genů ječmene determinujících kvalitativní i kvantitativní znaky. V posledních letech byly vytvořeny u různých genotypů ječmene relativně vysycené mapy s molekulárními markery, které zahrnují stovky RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a SSR (Simple Sequence Repeat) markerů. V poslední době jsou pro mapování u ječmene široce využívány SSR markery vycházející z krátkých, mnohonásobně se opakujících repetíci (BECKER, HEUN, 1995; RAMSAY et al., 2000; THIEL et al., 2003).

Toto studium bylo zaměřeno na genetický popis nedávno získaného zdroje odolnosti k padlí travnímu. Cílem bylo určit počet genů/lokusů determinujících odolnost, určit typ dědičnosti těchto genů a jejich vztah k lokusu *Mla*. Microsatelitové DNA markery byly využity k identifikaci jednotlivých genů/lokusů odolnosti prostřednictvím jejich chromozomální lokalizace.

Materiál a metody

Genetické i molekulární analýzy byly prováděny v segregující populaci F₂ vzniklé po křížení ozimé odrůdy Tiffany nesoucí gen odolnosti *Mla7* se zdrojem odolnosti *H. vulgare* ssp. *spontaneum* PI466197 získaného z genové banky USDA. Pro zjištění počtu genů determinujících odolnost a typ dědičnosti byly testované rostliny inokulovány virulentním patotypem (*Va7*) 0323 a pro testy na alelismus s lokusem *Mla* avirulentním patotypem (*Aa7*) 1002. Při testech odolnosti byly inokulovány segmenty odebrané z plně vyvinutých primárních listů 18 dní starých rostlin a 8 dní po inokulaci byly odečítány reakční typy (RT) podle devítibodové stupnice 0-4, včetně intertypů. Byly hodnoceny rostliny rodičovské, F₁ a F₂ generace. Zjištěné počty rostlin v F₂ populaci ve dvou fenotypových kategoriích (odolné – RT 0 až 3, náchylné – RT 3-4 a 4) byly srovnány s teoretickými štěpnými poměry testem chí-kvadrát, a tak byl odhadnut počet genů rezistence. Porovnáním hodnot reakčních typů v rodičovské a F₁ generaci byl vyhodnocen typ dědičnosti sledovaného znaku.

Pro genetické mapování byly využity SSR markery, které byly vybrány z dostupných databází (<http://www.graingenes.org/>) a literárních zdrojů (RAMSAY et al., 2000; KORFF et al., 2004). Pro každý marker byl optimalizován amplifikační cyklus a ověřen polymorfismus mezi rodiči. DNA rodičovských a F₂ rostlin byla izolována z listů pomocí kitu (Gene Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich Co.). Fragmenty PCR byly separovány a vizualizovány na 3% agarózových nebo 10% polyakrylamidových gelech barvených etidium bromidem. K nalezení markerů ve vazbě se sledovaným genem rezistence byla využita modifikovaná bulková segreganční analýza (BSA), kdy odolný bulk sestával z 20 rostlin reakčního typu 0 a 0-1 a náchylný z 31 rostlin reakčního typu 4 bez vytváření směsných vzorků DNA.

Ověření vazby předběžně identifikované pomocí BSA bylo uskutečněno prostřednictvím 113 rostlin generace F₂ všech genotypů. Statistická významnost vazby mezi genem odolnosti a DNA markerem byla určena regresní analýzou, mapové vzdálenosti mezi jednotlivými markery v cM (výpočet pomocí Kosambiho funkce), pořadí lokusů a lokalizace genu na chromozomu byly zjištěny prostřednictvím softwaru MapManager QTX (MEER et al., 2002). Statistická významnost vazby byla vypočítána pomocí hodnoty LRS (likelihood ratio statistic). Genetická mapa pravděpodobné pozice genů rezistence na chromozomech byla sestrojena softwarem MapChart (VOORRIPS, 2002).

Výsledky a diskuse

V populaci generace F₂ bylo zjištěno 431 odolných a 31 náchylných rostlin. Po ověření shody s teoretickým štěpným poměrem 15:1 testem chí-kvadrát tak byla u zdroje odolnosti stanovena přítomnost dvou genů odolnosti s dominantním charakterem dědičnosti. Testem na alelismus bylo potvrzeno, že jeden z genů se nachází v lokusu *Mla*, protože po inokulaci avirulentním patotypem byly zjištěny pouze odolné rostliny.

Ze 109 mikrosatelitových markerů, které byly využity k otestování polymorfismu, 59 (54%) bylo polymorfních mezi 'Tiffany' a zdrojem odolnosti PI466197. Pro nalezení markerů ve vazbě s geny rezistence bylo u tohoto křížení použito celkem 32 polymorfních markerů, rovnoměrně rozptýlených po sedmi chromozomech ječmene. Modifikovanou analýzou BSA 20 odolných a 31 náchylných rostlin generace F₂ byla takto zachycena vazba s markery *Bmac0213* a *MGB402* na krátkém rameni chromozomu 1H (*Mla* lokus) a s markery *Bmac0134* a *MWG878* na krátkém rameni chromozomu 2H. Pro bulk 31 náchylných rostlin bylo identifikováno 5 rekombinant z 56 testovaných chromozomů (podíl rekombinace $r = 0,09$) u *Bmac0213* a 2 rekombinanti z 62 chromozomů ($r = 0,03$) u *Bmac0134* a 6 rekombinant z 56 chromozomů ($r = 0,10$) u *MWG878*. Nezávislé lokusy měly četnost rekombinace kolem 0,50.

Pro ověření vazby mezi genem odolnosti a markery již identifikované pomocí BSA a zpřesnění lokalizace genů odolnosti na jednotlivých chromozomech byla využita populace F₂ v rozsahu 113 rostlin všech fenotypů. Program MapManager QTX a regresní analýza potvrdila vazbu mezi geny odolnosti a markery *Bmac0213*, *MGB402*, *Bmac0134* a *MWG878* (Obr. 1). Statistická významnost vazby byla stanovena pomocí hodnoty LRS (likelihood ratio statistic), přičemž za kritérium byla použita pravděpodobnost $P = 0,001$. Očekávaná pozice jednoho genu odolnosti *R* byla určena mezi mikrosatelity *Bmac0213* a *MGB402* (LRS = 30,8 a 25,2). Pozice druhého lokusu *R* byla určena na chromozomu 2HS proximálně od markerů *MWG878* a *Bmac0134* a (LRS = 22,7 a 27,8). Program MapManager QTX byl použit pro výpočet mapových vzdáleností mezi všemi uvedenými lokusy. Pomocí programu MapChart byly sestrojeny genetické mapy a určeny pravděpodobné lokalizace nově zjištěných genů odolnosti na dvou chromozomech ječmene (Obr. 1) pomocí výše uvedených údajů. LRS pro zjištěné lokalizace genů na chromozomech 1H a 2H jsou 41,5 a 61,7. Kritická hodnota LRS pro statisticky vysoce signifikantní vazbu je 30,4 (Obr. 1).

Znalost chromozomální lokalizace je předpokladem pro určení identity jednotlivých genů odolnosti. Na krátkém rameni chromozomu 2H nebyl doposud lokalizován žádný gen odolnosti, pouze na dlouhém rameni chromozomu byly identifikovány geny *Rar1* a *Rar2* (Lahaye et al., 1998). Další náplní naší práce bude získat a otestovat nové polymorfní markery v oblasti nově zjištěného genu rezistence a zpřesnit tak jeho lokalizaci.

Závěr

U analyzovaného křížení byl jeden gen odolnosti k padlí travnímu identifikován v lokusu *Mla*, který se často podílí na determinaci tohoto znaku a patří ke genům s nejvyšší účinností. Druhý, nově identifikovaný gen, byl lokalizován na krátkém rameni chromozomu 2H. Perspektivní snahou ve šlechtění je cílený výběr potomstev kombinujících plně účinné geny rezistence, což není možné používáním klasických metod. Proto jsou jednotlivé geny mapovány pomocí DNA markerů a vyvíjeny markery v těsné vazbě s těmito geny, aby mohly být dále využívány v tzv. „marker assisted selection“, popřípadě kombinovány v jedné odolné odrůdě.

Literatura

1. BECKER, J. – HEUN, M.: Barley microsatellites – allele variation and mapping. In: Plant. Mol. Biol., 27, 1995, s. 835–845.

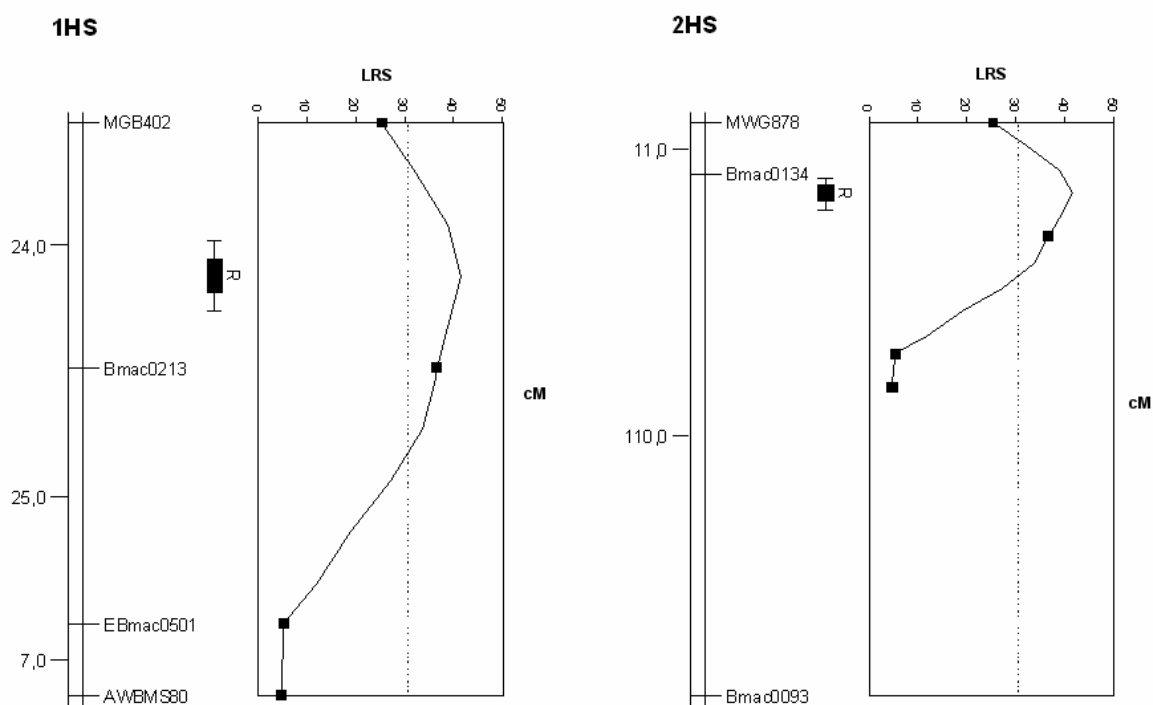
2. JAHOR, A. – FISCHBECK, G.: Sources of resistance to powdery mildew in barley lines derived from *Hordeum spontaneum* collected in Israel. In: Plant Breed., 99, 1987, s. 274–281.
3. JAHOR, A. – FISCHBECK, G.: Identification of new genes for mildew resistance of barley at the *Mla* locus in lines derived from *Hordeum spontaneum*. In: Plant Breed., 110, 1993, s. 116–122.
4. Jørgensen, J. H.: Genetics of powdery mildew resistance in barley. In: Critical Rev. Plant Sci., 13, 1994, s. 97–119.
5. DREISEITL, A. – BOCKELMAN, H. E.: Sources of powdery mildew resistance in a wild barley collection. Genet. In: Resour. Crop Evol., 50, 2000, s. 345–350.
6. KORFF, M. – PLÜMPE, J. – MICHALEK, W. – LÉON, J. – PILLEN, K.: Insertion of 18 new SSR markers into the Oregon Wolfe Barley map. In: Barley Genet. Newslett., 34, 2004, s. 1–4.
7. LAHAYE, T. – HARTMANN, S. – TÖPSCH, S. – FREIALDENHOVEN, A. – YANO, M. – SCHULZE-LEFERT, P.: High-resolution genetic and physical mapping of the *Rar1* locus in barley. In: Theor. Appl. Genet., 97, 1998, s. 526–534.
8. MEER, J.M. – MANLY, K.F. – CUDMORE, R.H.: Software for genetic mapping of Mendelian markers and quantitative trait loci. Roswell Park Cancer Institute, 2002.
9. RAMSAY, L. – MACAULAY, M. – IVANISSEVICH, S. – MACLEAN, K. – CARDLE, L. – FULLER, J. et al.: A simple sequence repeat-based linkage map of barley. In: Genetics, 156, 2000, s. 1997–2005.
10. SCHÖNFELD, M. – RAGNI, A. – FISCHBECK, G. – JAHOR, A.: RFLP mapping of three new loci for resistance genes to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) in barley. In: Theor. Appl. Genet., 93, 1996, s. 48–56.
11. THIEL, T. – MICHALEK, W. – VARSHNEY, R. K. – GRANER, A.: Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Theor. Appl. Genet., 106, 2003, s. 411–422.
12. VOORRIPS, R.E.: MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. In: J. Heredity, 93, 2002, s. 77–78.

Poděkování

Uvedené výsledky byly získány v rámci řešení projektů Grantové Agentury České republiky (granty č. 522/03/0112 a 204/05/H505).

Obr. 1: Částečná genetická mapa chromozomu 1H a 2H ječmene s pravděpodobnou pozicí genů odolnosti *R* vůči padlí travnímu detekovanými u zdroje odolnosti PI466197.

Hodnoty v levé části chromozomu jsou mapové vzdálenosti mezi sousedními DNA markery udávané v cM.



Adresy autorů:

Ing. Kateřina Teturová, RNDr. Jana Řepková, CSc., RNDr. Pavel Lízal, Ph.D.: Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 602 00, Brno, Česká republika, 151559@mail.muni.cz

Ing. Antonín Dreiseitl, CSc.: Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01, Kroměříž, Česká republika, dreiseitl@vukrom.cz

DIAGNOSTIKA FYTOPATOGENOV V ŠĽACHTITEĽSKÝCH PROGRAMOCH DIAGNOSTIC OF PHYTOPATHOGENS IN BREEDING PROGRAM

Otakar KÚDELA - Miroslav GLASA

The conventional breeding and breeding including the new biotechnological procedures are labour and time consuming processes. There are many critical steps in breeding program. One of risks is the infection with phytopathogens. Due to their biological properties, mainly the infection with viruses, viroids and phytoplasmas can be serious problem. The lecture presents the possibilities of current and perspective detection technologies for the diagnostic of these pathogens and our practical experience with their detection.

Key words: viruses, viroids, phytoplasmas, detection methods

1. Úvod

Konvenčné šľachtenie ako aj šľachtenie využívajúce moderné biotechnologické postupy a metódy je pracné a časovo náročné. Úspešnosť šľachtiteľského programu a produkcia potomstva s požadovanými a stabilnými vlastnosťami závisí od mnohých faktorov (napr. genetická výbava a variabilita biologického materiálu, použité metódy, šľachtená vlastnosť ap.). Rizikovým faktorom s významným vplyvom na výsledok šľachtienia je infekcia rastlinnými patogénmi. Z nich najmä vírusy, viroidy a fytoplazmy vďaka svojim biologickým vlastnostiam a mechanizmami interakcie s hosťiteľmi môžu byť vážnym až neriešiteľným problémom.

2. Vírusy

Rastlinné vírusy reprezentujú početnú skupinu patogénov, prevažne s RNA genómom. K ich základným charakteristikám v súvislosti s procesom šľachtienia patrí:

- rozmanitosť prejavov infekcie od bezpríznačovej až po rozsiahlu systémovú infekciu, ktorá spravidla vedie k uhynutiu hosťiteľa
- široké hosťiteľské spektrum (mnoho vírusov je schopných infikovať až niekoľko sto rastlinných druhov z mnohých čeľadí)
- ľahká prenosnosť (semeno, peľ, vegetatívne, mechanicky, hmyzie vektory).
- vysoká genetická variabilita, ktorá im umožňuje prekonať napr. prirodzené obranné mechanizmy, konštruovanú rezistenciu (GMR) a umožňuje im adaptovať sa na nové odrody a rôzne abiotické faktory
- minimálne možnosti liečenia ochorení (použitie meristémov, termoterapia a chemoterapia sú málo účinné a silne závisia od kmeňa vírusového druhu, druhu a odrody hosťiteľa)

3. Viroidy

Viroidy sú subvírusové agensy, ktoré tvoria obnažená kruhová RNA. Jej sekvencia a od nej odvodená sekundárna štruktúra jej zabezpečuje vysokú infekčnosť a odolnosť voči faktorom prostredia a obranným mechanizmom hosťiteľa. V závislosti od vitulencie a hosťiteľa infekcia môže byť bezpríznačová alebo sa prejaví vznikom symptómov ako napr. zakrpatenosť, zvinovanie listov, nekróza a hnednutie žíl, mozaika, chlorotické a nekrotické škvrny. Infekcia viroidmi nie je liečiteľná. Všetky známe viroidy sú mechanicky prenosné. Na ich šírení sa najviac podieľa človek prostredníctvom najmä poľnohospodárskych nástrojov a technológií. V menšej miere sú prenášané hmyzom alebo vertikálne cez peľové zrná a semená. Na našom území hosťiteľmi viroidov môžu byť okrasné rastliny, uhorka, chmeľ, zemiak, rajčiak, jablň, hruška, vinič a skleníkové citrusy a palmy.

4. Fytoplazmy

Fytoplazmy sú prokaryotické (*Mollicutes*) patogény, ktoré sa zatiaľ nepodarilo kultivovať. V infikovanej rastline sa distribuujú sitkovicami. Doposiaľ sa zistilo v asi 300 druhoch rastlín. Interakcia s hosťiteľom vedie k vzniku ochorení, ktoré sa môžu prejavovať ako žltáčka, chlorotické zvinovanie listov, metľovitosť, fylódia, sterilita kvetov a virescencia, chradnutie a odumieranie výhonkov a celých rastlín. Infekcia je tiež často bezpríznačová. Na intenzite ochorenia a šírení fytoplaziem sa aktívne podieľajú ako biotické tak i abiotické faktory. Prenosné sú vrúbľami, hmyzom a kukučinou (*Cuscuta spp.*). Z aspektu šľachtiteľských programov najvýznamnejšími hosťiteľmi sú kôstkoviny, jadroviny, okrasné rastliny, zemiak, rajčiak, cukrová repa, dyňa, lucerna a drobné ovocie.

5. Diagnostika

V súčasnosti používané ako aj vyvíjané detekčné metódy sú založené na štruktúrnych vlastnostiach patogénov, spôsoboch ich prenosu a mechanizmoch interakcie s hosťiteľom. Ich základnými kritériami sú citlivosť, špecifická, pracnosť a časová náročnosť a nezanedbateľné sú tiež náklady. Výber metód, resp. ich kombinácie určujú vlastnosti testovaných patogénov, druh hosťiteľa ako aj účel a ciele diagnostiky.

5.1. Imunochemické metódy

Táto skupina metód využíva antigénne vlastnosti hlavne štruktúrnych bielkovinných zložiek patogénov, ktoré umožňujú prípravu polyklonových a monoklonových (hybridómová technika) protilátok.

Najrozšírenejšou metódou je ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) v usporiadaní DAS, TAS alebo PTA. Jej prednosťou je najmä jednoduchosť, dostupnosť širokej škály komerčných protilátok a súprav a tiež citlivosť (detekčný limit = 1-10 ng vírusu/ml) a špecificita sú relatívne vyhovujúce. Vyhodnotenie ELISA môže komplikovať vysoké pozadie v dôsledku nešpecifických reakcií a slabý signál spôsobený nízkou koncentráciou patogéna. ELISA techniky majú dominantné postavenie hlavne v diagnostike rastlinných vírusov. V obmedzenom rozsahu sa používajú v diagnostike fytoplazmiem (napr. žltáčka astier).

Porovnateľnú citlivosť s DAS-ELISA má DIBA (dot immunobinding assay) technika. Vírus je ukotvený na nitrocelulóзовú membránu a detekovaný vírus špecifickou protilátkou a následne reakciou s konjugátom.

Obdobné usporiadanie má technika pletivových odtlačkov. Pletivové odtlačky môžu navyše poskytnúť zaujímavé informácie o distribúcii vírusov v rastlinných orgánoch.

5.2. Metódy detekcie nukleových kyselín

Vývoj molekulárno-biologických techník a molekulárna charakterizácia patogénov umožnili aplikáciu diagnostických postupov, založených na detekcii genómov (RNA, DNA) a ich špecifických sekvencií.

5.2.1. Elektroforetické metódy

V súčasnosti sa pre priamu elektroforetickú diagnostiku používa dvojsmerná elektroforéza v polyakralamidovom gély (2D-PAGE) a to na detekciu viroidov. Kombináciou natívnych a denaturačných podmienok sa viroid oddelí od hostiteľských nukleových kyselín a jeho prítomnosť sa identifikuje vyfarbením gélu. Detekčný limit je cca 5ng RNA na dráhu.

5.2.2. Molekulárna hybridizácia

Zavedenie techník molekulárnej hybridizácie do diagnostickej praxe umožnili poznatky o štruktúrnych vlastnostiach genómov. Princípom týchto techník je imobilizácia nukleových kyselín na membránach a ich následná hybridizácia s rádioaktívne alebo nerádioaktívne značenou sondou (cDNA, cRNA, oligonukleotidy, ampliméry). Rádioaktívne sondy sa nahrádzajú chemiluminiscentnými procedúrami (detekujú asi 2pg viroidovej RNA).

5.2.3. PCR techniky

Polymerázová reťazová reakcia je popri konvenčnej DAS-ELISA najviac používanou diagnostickou metódou. Dosahuje vysokú špecificitu (úroveň izolátov a kmeňov), 10 až 100 násobne vyššiu citlivosť ako hybridizačné techniky a umožňuje identifikovať patogéna v rôznych rastlinných orgánoch, vo vektoroch a v rôznych štádiách interakcie s hostiteľom. Možno ju použiť pre priamu detekciu ako DNA tak i RNA sekvencií (RT-PCR). V kombinácii s protilátkami (imunovychytávací PCR) je možné až 100 násobne zvýšiť jej citlivosť. Produkty amplifikácie sú verifikované analýzou v géloch aplikáciou špecifických farbičiek, RFLP analýzou, hybridizáciou, príp. sekvenovaním.

Vývoj softwarových aplikácií a prístrojových technológií umožnil do oblasti diagnostiky zavedenie „Real-time“ kvantitatívnej PCR. Technika (použitím TaqMan alebo SYBR Green) generuje kvantitatívne údaje o PCR v skorých cykloch, keď je presnosť PCR najvyššia. TaqMan poskytuje presnú a vysoko špecifickú detekciu templátov. Metóda SYBR Green sa využíva pri rôznych variantách primerov a pre rôzne typy templátov. Používa sa pre detekciu viriodov (10x citlivejšia ako RT-PCR), vírusov (napr. multiplex TaqMan detekcia vírusov zemiaka) a baktérií. Metóda nepotrebuje „post“ PCR analýzy.

5.2.4. Microarray

Microarray technológia bola pôvodne vyvinutá pre štúdium génovej expresie. V podstate nadväzuje na Southernovu hybridizačnú techniku pričom však aplikuje najnovšie poznatky a prístrojové vybavenie z oblasti analýz nukleových kyselín a genómov. Umožňuje simultánnu detekciu až tisícov génov a sekvencií. Na základe týchto parametrov je veľmi perspektívna aj pre oblasť diagnostiky. V súčasnosti sa už využíva v klinickej diagnostike napr. pre diagnostiku rakovinných ochorení alebo typizáciu a monitorovanie patogénnych baktérií. Biočipy sú komerčne dostupné v usporiadaní DNA, RNA, oligonukleotidy a bielkoviny. Biočipy pre detekciu rastlinných patogénov sú v štádiu vývoja.

Záver

Konvenčné a molekulárne šľachtenie sú komplexné procesy. S narastajúcimi poznatkami o genetike rastlinných druhov a odrôd a ich interakcii s prostredím musia šľachtiteľské programy pracovať z čoraz početnejšími údajmi. Rastlinné vírusy, viroidy a fytoplazmy sú významnými biotickými faktormi. Z dávnejšej i menej dávnej minulosti existuje viacero príkladov, keď vlastnosti a variabilita týchto patogénov mala priamy dopad na praktické uplatnenie výsledkov šľachtenia (napr. odrody zemiakov Bintje a Russel Burbank, čačanské odrody sliviek, transgénna rezistencia k vírusu šarky slivky).

Diagnostika fytopatogénov má nezastupiteľnú úlohu v prevencii ochorení a v získavaní zdravého rastlinného materiálu. Príklady z praxe poukazujú aj na jej význam v šľachtiteľskej praxi. Problematika diagnostiky je otvorený proces, pretože tak ako sa rozširujú a prehlbujú poznatky o patogénoch, otvárajú sa možnosti ďalšieho zdokonaľovania používaných detekčných metód a vývoja nových diagnostických technológií.

Množstvo informácií a viac či menej preverených údajov a faktov o biologických a molekulárnych vlastnostiach patogénov kladie vysoké požiadavky na odbornosť, experimentálne a praktické diagnostické skúsenosti. Tieto skutočnosti tak formujú potrebu úzkej spolupráce pracovísk, orientovaných na molekulárno-biologický výskum patogénov a ich diagnostikovanie, s pracoviskami, ktoré sa zaoberajú realizáciou šľachtiteľských programov.

Literatúra

1. BROWN, M.P. et al.: PNAS 97/2000, s. 262-267
2. CANDRESSE, T. et al.: Acta Horticulture 386/1995, s. 601-605
3. HUTTINGA, H.: Advances in Botanical Research 23/1996, s. 59-71
4. KISON, H. - SEEMULLER, E.: J. Phytopathology 149/2001, s. 533-541
5. KÚDELA, O. - GLASA, M.: Poľnohospodárska výroba skúšobníctvo 1-2/1998, s. 3-6
6. THOMAS, E.J.: ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences 1988, s. 137-142
7. VAN IJPEREN, C. et al.: Molecular and Cellular Probes 16/2002, s. 371-378

Pozn.: Časť údajov a výsledkov prezentovaných v prednáške vznikla za podpory VEGA 3080/25 a SE 08.

Adresa autora:

RNDr. Otakar Kúdela, CSc., Ing. Miroslav Glasa, Ph.D., Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, e-mail: viruotku@savba.sk

**EXOCHITINÁZY A EXO- β -1,3-GLUKANÁZY SYNTETIZOVANÉ
V PRIMÁRNÝCH LISTOCH JAČMEŇA PO INFEKCII MÚČNATKOU V
OBDOBÍ SPORULÁCIE PATOGÉNOV
EXOCHITINASES AND EXO- β -1,3-GLUCANASES SYNTHESIZED IN THE
BARLEY PRIMARY LEAVES INFECTED BY POWDERY MILDEW IN THE
PERIOD OF PATHOGEN SPORULATION**

Elena HLINKOVÁ- Dušan PEREČKO- Ján RAFAY- Zuzana KOVÁČOVÁ- Milan BOBÁK- Zuzana KUTARŇOVÁ

Present work studied changes in the content of selected hydrolytic enzymes induced in the patterns of basic proteins synthesized in the barley primary leaves infected by powdery mildew with different virulence possibility. Protein patterns analyses show that basic intercellular protein spectra strongly reflect of interaction phenotype. Incompatible and hypersensitive interaction of hosts showed relatively the smallest changes in the both quantitative and qualitative changes in the protein content in the period of pathogen sporulation. By compatible interactions, content of basic β -1,3-exoglucanases changed their quantity as well as their quality. The most expressive changes were in the region of $M_r \approx 40-45$ kDa where are localized de novo synthesized basic glucanases. Four basic exo- glucanases were synthesized constitutively independently of the host resistance genes and the pathogen avirulence/virulence genes. Their M_r were from molecular mass interval 72-45 kDa. De novo synthesized exochitinases were two. Low molecular basic form of exo Chi 14.4 was not serologically related to their acid form, or it is possible that the quantitative content of this protein is under level of immunoblot sensitivity.

Key words: barley, powdery mildew, basic proteins, exoB- β -1,3-glucanase, exoB-chitinase

Úvod

Jedným z dôsledkov infekcie múčnatkou pri všetkých typoch interakcií je syntéza PR-a DR-proteínov. PR-proteíny sú rozdelené do 14 skupín na základe ich biochemických, molekulárnych a fyzikálnochemických vlastností (Madsen et al. 2003). Medzi dve najrozsiahlejšie skupiny PR-proteínov, ktoré sú syntetizované v priebehu patogenézy patria β -1,3-glukanázy (EC 3.2.1.39) a chitinázy (EC 3.2.1.14). V hostiteľských rastlinách sú kódované viacerými rodinami paralogických génov. β -1,3-glukanázy hydrolyzujú 1,3-D-glukozidovú väzbu v β -1,3-glukáne. Na základe ich primárnej štruktúry boli rozdelené do 5-tried (Meins et al. 1993). V infikovaných rastlinách plnia obrannú funkciu, ktorej cieľovým miestom sú β -1,3-glukány bunkových stien patogéna (WESSELS, STIESMA, 1981). Viaceré z nich majú antifungálnu aktivitu (HLINKOVÁ et al., 2004). Degradačné produkty, ktorými sú prevážne modifikované molekuly glukózy (OKINAKA et al., 1995) hydrolytických procesov týchto enzýmov, plnia často-krát funkciu elicitorov obranných reakcií v hostiteľských rastlinách. Produkty ortologických génov nachádzame aj u patogénov (HLINKOVÁ a kol., 2001). Nešpecifické formy β -1,3-glukanáz exprimovaných konštitutívne, nachádzame aj v skorých vývinových procesoch zdravých rastlín (WU et al., 2001; HLINKOVÁ et al., 2005; MATUŠÍKOVÁ et al., 2005). Chitinázy sú ďalšie hydrolytické enzýmy, ktorých gény sú exprimované vo zvýšenej miere v období patogenézy. Chitinázy [1,4-(N-acetyl- β -D-glukózoamid)-glykánohydrolázy] hydrolyzujú chitín, ktorý je lineárnym polymérom β -1,4-N-glukózoamínu (GlcNac, LEUBNER-METZGER, MEINS, 2000). Chitinázy degradujú jednoduchú väzbu C-C medzi dvomi nasledovnými N-acetylglukózoamínmi v chitíne na N,N'-diacetylchitobiózu a vyššie oligoméry. Hydrolyza môže byť indukovaná ako exo tak endolytickými dráhami (SHINSHI et al., 1990). Chitinázy syntetizované v priebehu patogenézy sú delené do 7 tried, ktoré kódujú paralogické gény *chi a (ypr 3)*; *chi b (ypr 8)*; *chi c (ypr11)*; *chi d (ypr4)* (VAN LOON, VAN STIESMA, 1999). Podobne ako niektoré glukanázy aj určité chitinázy majú antifungálne účinky (SELA-BURLAGE et al., 1993; HLINKOVÁ et al., 2003). Glukanázy a chitinázy majú synergický účinok a ich nadprodukcia v transgénnych rastlinách patogénom (MATUŠÍKOVÁ et al., 2005). Bázické formy týchto hydrolytických enzýmov sú preskúmané podstatne menej ako ich kyslé formy a to predovšetkým v neskorých fázach patogenézy. Cieľom našej práce bola identifikácia PR a DR-proteínov s glukanázovou a chitinázovou aktivitou v bázičkej oblasti proteínového spektra v intercelulárnom extrakte primárnych listov jačmeňa nesúceho rôzne gény rezistencie a infikovaného múčnatkou s rôznou virulenciou schopnosťou v období sporulácie patogénov.

Materiál a metódy

Na analýzu bázičkových proteínov syntetizovaných v priebehu hostiteľsko-parazitických interakcií boli použité mladé, osemdňové asepticky kultivované rastliny jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Reakcie boli sledované pri štyroch genotypoch jačmeňa nesúceho rôzne gény rezistencie (P02-*Ml-a3*; P04B-*Ml-a7* a P10-*Ml-a12*). Ako pozitívna kontrola bol použitý senzitívny cv. Dvoran bez génov rezistencie z *Ml-a* lokusu. Na inokuláciu sme použili dva patotypy múčnatky (*Blumeria graminis* DC *Speer f.sp. hordei* RU-3 a Sk-5/11) odlišujúce sa génmi virulence/avirulence a trvaním anamorfa (HLINKOVÁ et al., 2001). Ako senzitívny kontrolný variant bol použitý cv. Dvoran bez génov rezistencie z *Ml-a* lokusu. Po ôsmich dňoch

kultivácie pri $T=18\pm 2^{\circ}\text{C}$, osvetlení $800\mu\text{molm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a svetelnom režime 16/8 hodín sme rastliny vo fáze prvého listu inokulovali dvomi patotypmi múčnatky (*Blumeria graminis* DC Speer f. sp. *hordei*- RU-3 a Sk-5/11). Po ôsmich dňoch od inokulácie boli primárne listy zo zdravých a infikovaných rastlín odstránené a použité na izoláciu intercelulárnej kvapaliny podľa REPKU (1997) a ďalšie molekulárno-biochemické analýzy. Kvantitatívne a kvalitatívne analýzy v extrakte boli identifikované Bradfordovou metódou (1976). Bázické proteíny boli odseparované Reisfeldovou metódou (REISFELD et al., 1963). Proteíny s hydrolytickou funkciou: exo β -1,3- glukanázy a chitinázy boli identifikované podľa TRUDEL-a & ASSELIN-a (1989) a PAN-a et al. (1991). Ako štandard molekulových hmotností sme použili lyzozým a celulózu (Sigma, St. Luis, USA) Experimenty boli opakované tri krát.

Výsledky a diskusia

V spektre bázických intercelulárnych proteínov sme identifikovali v oblasti $M_r \approx 45\text{-}72\text{kDa}$ proteíny s glukanázovou aktivitou pri všetkých genotypoch jačmeňa (obr.1B). Kvantitatívne zastúpenie týchto glukanáz bolo mierne zvýšené iba v miestach infekcie. Rozdiely medzi genotypmi jačmeňa ako i použitými patotypmi neboli veľmi výrazné. Prítomnosť glukanáz v tejto časti spektra potvrdili obidve metódy používané na identifikáciu tohto enzýmu (PAN et al. 1991; TRUDEL, ASSELIN, 1989). Zvyškové proteínové spektrum je zobrazené na obr.1A. V období sporulácie patogénov boli *de novo* syntetizované iba dve nové bázické glukanázy a nachádzali sa iba v infikovanom mieste listov, ich M_r bola 42 a 45 kDa. Kvantitatívne zastúpenie *de novo* syntetizovaných glukanáz väčšmi ovplyvnil genotyp patogéna ako hostiteľa. Veľmi slabú glukanázovú aktivitu mali i niektoré PR-proteíny z nízkomolekulovej oblasti ($M_r \approx 25\text{-}30$ kDa).

Imunologické analýzy (Western blot obr.1B) s čiastočne špecifickou protilátkou pripravenou ku kyslej intercelulárnej chitináze Chi 14,4 ukázali, že nezávisle od genotypu je zastúpenie proteínov s chitinázovou aktivitou (pri zdravých rastlinách) ako u pri cv. Dvoran tak aj pri izogénnych líniiach cv. Pallas rovnaké a gény pre bázické chitinázy kódujú proteíny z intervalu $M_r \approx 42\text{-}72$ kDa . Infekcia múčnatkou v infikovaných miestach listov indukuje syntézu ďalšej chitinázy s $M_r \approx 42$ kDa. Táto chitináza je lokalizovaná na rovnakom mieste kde je aj bázická Glu42. V tomto prípade pri 1D-C-PAGE je vidieť typický hmotnostný prekryv. Koncentrácia Chi_B 42 je pri NIL cv. Pallas podstatne nižšia ako cv. Dvoran. Sérologicky nepríbuzná bázická chitináza Chi14,4 je syntetizovaná iba infikovaných častiach listov pri kompatibilných interakciách (farbené Calcoflour white, TRUDEL a ASSELIN 1989). Pri NIL jačmeňa P04B a P10 je pravdepodobné, že bázické proteíny z oblasti 35-50 kDa môžu patriť aj do kategórie chitín-viažucich proteínov (PR-3), pretože zmizli zo zvyškového proteínového spektra (obr. 1A).

Záver

Pri kompatibilných interakciách sa v bázickom proteínovom spektre mení kvantitatívne aj kvalitatívne zastúpenie glukanáz i chitináz. Zdravé rastliny jačmeňa nezávisle od genotypu obsahujú 3 paralogické gény pre bázické chitinázy, ktoré sú exprimované konštitutívne. Nie všetky bázické chitinázy vykazujú sérologickú príbuznosť s Chi_A 14,4. Intercelulárne PR a DR- proteíny majú odpovedajúce kanály v bunkových stenách a membránach, ktoré umožňujú ich transport do intercelulárneho priestoru.

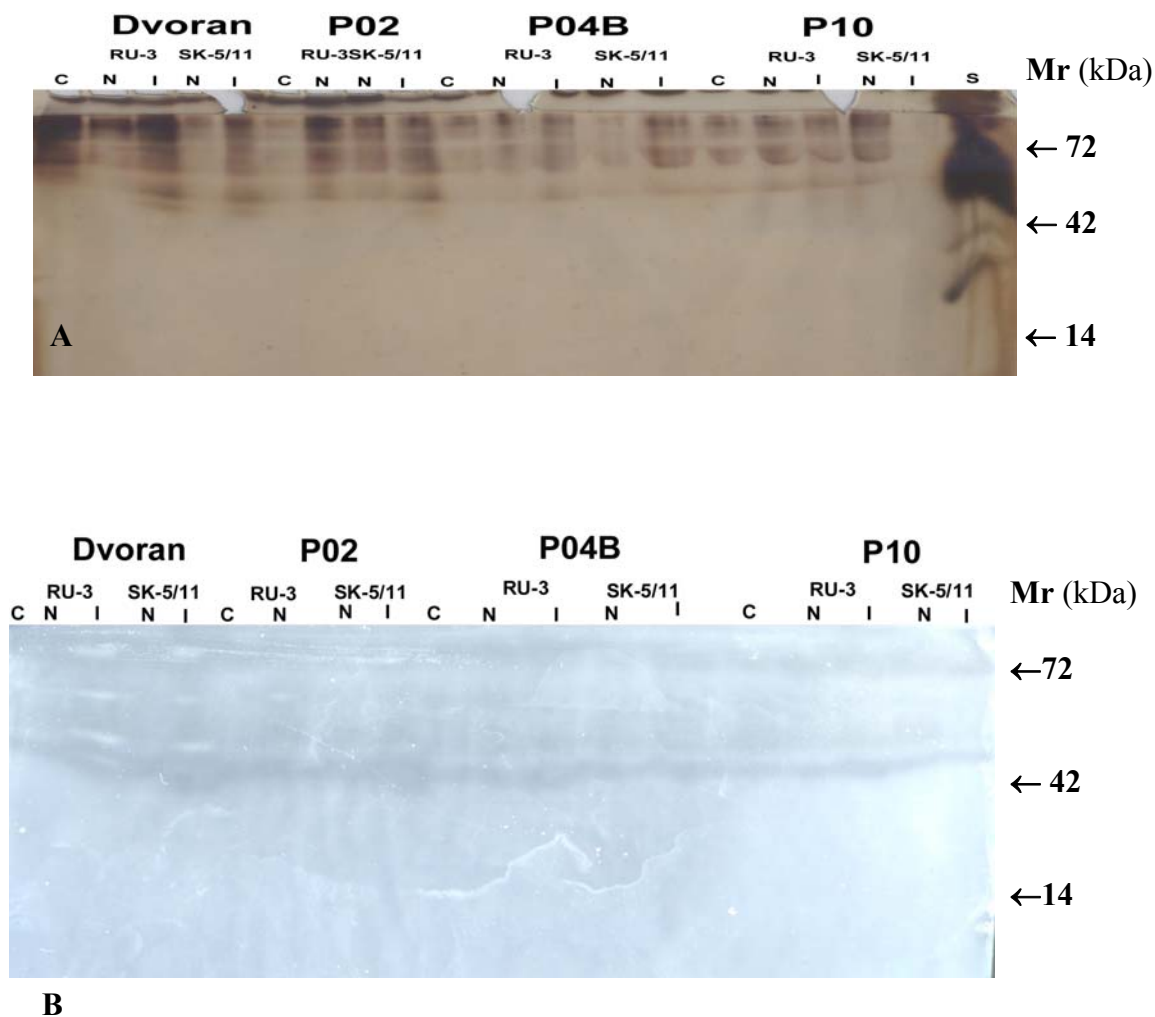
Pod'akovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Grantovej agentúry Vega MŠ SR, projekty : 1/2352/05, 1/2337/05,1/1311/04, agentúry APVT- 20-002604 a Štátnej úlohy výskumu a vývoja:Kvalita života - SP27/028 OD01/028 SE07.

Literatúra

1. BRADFORD, M. M.:A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein -dye binding. In: Analyt. Biochem., 72, 1976, s. 248-254.
2. HLINKOVÁ, E. - BOBÁK, M. - ILLEŠ, P.: Morphological characteristics of powdery mildew ontogenesis asexual phase by infection of barley primary leaves. In: Cell III (ed. J. Berger) Kopp Publ. České Budějovice, 2001, s. 225-226.
3. HLINKOVÁ, E. - BOBÁK, M. - HUDECOVÁ, M. - RAFAY, J. - PEREČKO, D.:PR-proteíny-potenciálny zdroj genetickej informácie na zvýšenie rezistencie hostiteľských rastlín voči patogénom. In: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín (Eds. M. Bežo, J. Kutíšová) BIOS 2003, Nitra : SPU, 2003, s. 35-41.
4. HLINKOVÁ, E. - BOBÁK, M. - REPKA, V. - RAFAY, J. - KOVÁČOVÁ, Z. - HUDECOVÁ, M.: Biochemické zmeny v bunkových stenách a membránach infikovaných listov jačmeňa nesúceho rôzne gény rezistencie v období sporulácie patogénov. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín (Ed.M. Užík), Piešťany : VÚRV, 2004, s. 40-44.

5. HLINKOVÁ, E. - BOBÁK, M. - KUTARŇOVÁ, Z. - HILOVSKÝ, R. - BLEHOVÁ, A.: Effect of different type growth regulators on the early phases of *Drosera rotundifolia* L. somatic embryogenesis. In: Biol. Plant. , 49 (Sup.), 2005, s23.
6. LEUBNER-METZGER, G. - MEINS, F. Jr.: Sense transformation reveals a novel role for class I β -1,3-glucanases (PR-2). In: (Eds.: Datta, S.K., Muthukrishnan, S.) Pathogenesis related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2000, s. 49-76.
7. MADSEN, L.H. - COLLINS, N.C. - RAKWALSKA, M. - BACKES, G. - SANDAL, N. - KRUSELL, L. - JENSEN, J. - WATERMAN, E.H. - JAHOR, A., et al. : Barley resistance genes analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping, Mol. Gen. and Genomics, Springer-Verlag, 10.1007/s00438/003-0823, 2003.
8. MATUŠÍKOVÁ, J. - SALAY, J. - MORAVČÍKOVÁ, J. - MLYNÁROVÁ, L. - NAP, J.-P. - LIBANTOVÁ, J.: Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. In: Planta, 2005 (in press).
9. MEINS, F. JR. - NEUHAUS, J. M. - SPERISEN, C. - RYALS, J.: The primary structure of plant pathogenesis related glucanhydrolases and their genes. In: Mechanism of plant defense response. (Eds: Fritig, B., Legrand, M.), Kluwer, AP, Dordrecht, 1993, s. 245-273.
10. OKINAKA, Y. - MIMORI, K. - TAKEO, K. - KITAMURA, S. - TAKEUCHI, Y. - YMAOKA, N. - YOSHIKAWA, M.: A structural model for the mechanism of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. In: Plant Physiol., 109 1995, (3), s. 839-845.
11. PAN, Q.S. - YE, S. - KUC, J.: A technique for detection of chitinase, β -1,3-glucanases and protein patterns after single separation using polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing. In: Phytopathology, 81, 1991, s. 970-974 .
12. REISFELD, R. A. - LEWIS, U.J. - WILLIAMS, D. E.: Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. In: Nature, 195, 1962, 281-283.
13. REPKA, V.: Intra and extra-cellular isoforms of PR-3 class chitinase in virus-infected cucumber plants. In: Acta Virol., 41, 1997, s. 71-75.
14. SELA-BUURLAGE, M. B. - PONSTEIN, A. S. - BRES-VLOEMANS, A.S. - MELCHERS, L.S. - VAN DEN ELZEN, P. J. M. - CORNELISSEN, B. J.: Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1, 3-glucanases exhibit antifungal activity. In: Plant Physiol., 101, 1993, s. 857-863.
15. SHINSHI, H. - NEUHAUS, J.M. - RYALS, J. - MEINS, F.Jr.: Structure of tobacco endochitinase gene: Evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cystein-rich domain. In: Plant Mol. Biol., 14, 1990, s. 11-116.
16. TRUDEL, J. - ASSELIN, A.: Detection of chitinase activity after polyacryl amide gel electrophoresis. In: Analyt. Biochem., 178, 1989, s. 362-366.
17. VAN LOON, L. C. - VAN STRIEN, E. A.: The families of pathogenesis-related proteins. In: Physiol. Mol. Plant Pathol., 55, 1999, s. 85-97.
18. WESSELS, J.H.G. - STIESMA, J.H.: Fungal cell walls: a survey. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Plant carbohydrates II. (Eds: Tanner, W., LÖwis, F. A.), NY, Springer Verlag, 1981, s. 352-394.
19. WU, CH. T. - LEUBNER-METZGER, G. - MEINS F. JR.: Class I β -1,3-glucanases and chitinases are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior radicle emergence. In: Plant Physiol., 126, 2001, s. 1299-1313.



Obr. 1: Selektované spektrá intercelulárnych bázičkových proteínov

A) zvyškové spektrum bázičkových proteínov po dvojíťom blote

B) Westernblot z elektroforetogramu extracelulárnych bázičkových proteínov izolovaných z primárnych listov rôznych kultivarov jačmeňa nesúcich rôzne gény rezistencie v období sporulácie patogénov charakteristických odlišnými génmi virulencie a avirulencie (biele pružky označujú proteíny s chitinázovou aktivitou, modré pružky s glukonázovou aktivitou; primárna protilátka pre chitinázy bola pripravená ku kyslej intercelulárnej Chi14,4; PR-3 proteín)

Adresy autorov

RNDr. E. Hlinková, CSc., Mgr. Zuzana Kováčová Katedra genetiky, PRIF UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, hlinkova@fns.uniba.sk

RNDr.D. Perečko, CSc., ÚMB SAV, Dúbravská 21, 842 51 Bratislava

Doc. J. Rafay, CSc. VÚŽV Nitra, Hlohovecká cesta 2, 949 92 Nitra

Prof. RNDr. M.Bobák, Mgr. Zuzana Kutarňová, Katedra fyziológia rastlín, PRIF UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4 .

REZISTENCIA A TOLERANCIA POPULÁCIÍ PŠENICE PROTI SEPTÓRII PLEVOVEJ A *FUSARIUM CULMORUM* RESISTANCE AND TOLERANCE OF WHEAT POPULATIONS AGAINST STAGONOSPORA NODORUM BLOTCH AND FUSARIUM HEAD BLIGHT

Štefan MASÁR¹ - Kvetoslava MASÁROVÁ¹ - Martin UŽÍK¹ - Darina MUCHOVÁ² -
František ONDREJČÁK² - Martin PASTIRČÁK¹ - Bernard VANČO¹

This study provides information about the resistance of F₃ wheat populations Rada x Arida, Rada x Armelis and Rada x SO997 against stagonospora nodorum blotch - SNB and fusarium head blight - FHB caused by Fusarium culmorum. The least reduction of number of seeds in spike (PZK) and weight of seeds in spike (HZK) has been in population Rada x Arida. The variance of AUDPC values for SNB and FHB have been quantitative character. The best population was Rada x Arida.

Key words: wheat, stagonospora nodorum blotch, fusarium head blight, resistance, tolerance

Úvod

Cieľom práce bola analýza rezistencie troch populácií pšenice letnej formy ozimnej proti *Stagonospora nodorum* (stagonospora nodorum blotch - SNB) a *Fusarium culmorum* (fusarium head blight - FHB). Šľachtenie na rezistenciu proti chorobám je zložitú. Zaznamenávané rozdiely v rezistencii genotypov pšenice ozimnej proti septórii plevovej sú vo väčšine prípadov výsledkom parciálnej rezistencie (DU et al., 1999). Všetky genetické štúdie rezistencie pšenice proti FHB sa týkajú rezistencie voči rozširovaniu huby (MESTERHAZY et al., 2002). Rezistencia proti FHB je často spojená s ďalšími morfológickými a agronomickými znakmi (HILTON et al., 1996).

Materiál a metódy

Výbery z 3 populácií F₃ generácie hybridov z VŠS Malý Šariš 1. Rada x Arida, 2. Rada x Armelis a 3. Rada x SO997 pozostávali z 50 klasových výberov v každej populácii vysiatych systémom klas - riadok v poľnom pokuse. Po 100 klasov z každej populácie sme infikovali SNB a FHB a zvyšok sme nechali ako neošetrenú kontrolu. Na infekciu klasov sa použila zmes sporulujúcich izolátov *Stagonospora nodorum*. Hodnotili sa v % napadnutia klasu v troch termínoch. Vizualne symptómy napadnutia *Fusarium culmorum* po umelej infekcii sa hodnotili každú dekádu v % napadnutia klasu. Z odporovaných údajov sa vypočítala hodnota AUDPC podľa vzorca $AUDPC = \sum(y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i)$ kde y_i je napadnutie a t_i je počet dní medzi hodnoteniami. Pred zberom sme odobrali vzorky 25 klasov z infikovaného a neinfikovaného materiálu pre stanovenie počtu zŕn v klase (PZK), hmotnosti 1000 zŕn (HTZ) a hmotnosti zrna v klase (HZK). Získané údaje sme vyhodnotili analýzou rozptylu (Statgraphics).

Výsledky a diskusia

Významný rozdiel v hodnotách AUDPC pre FHB boli medzi populáciami (tab.1). Najnižšie hodnoty AUDPC pre FHB na 95% hladine významnosti (tab. 6) boli v populácii Rada x Arida. V hodnotách AUDPC pre SNB vysoko preukazné boli rozdiely medzi populáciami (tab.2). Na 95% úrovni spoľahlivosti bola najnižšia AUDPC v populácii Rada x Arida (tab.7). Z tabuľky 3 vyplýva, že vysoko preukazné PZK mali populácie, ošetrenia a interakcie populácií s ošetrením. Najvyššie hodnoty PZK (tab.8) mala populácia Rada x Arida a v interakcii populácia Rada x Arida infikovaná septóriou. V znaku HZK vysoko preukazné boli ošetrenia a interakcia populácia x ošetrenie (tab.4). Najvyššie hodnoty HZK (tab.9) mali populácie Rada x Arida a Rada s Armelis. Najvyššie hodnoty HZK pri infekcii septóriou plevovou mala populácia Rada s Armelis. V znaku HTZ vysoko významné boli populácie a ošetrenia (tab.5). Najvyššie hodnoty HTZ boli v populácii Rada x Armelis. Najvyššie hodnoty znaku mali neošetrené a ošetrené varianty populácie Rada x Armelis (tab.10). Z frekvencií hodnôt AUDPC FHB a SNB (graf 1 a 2) vyplýva, že odroda Rada mala vyššie hodnoty AUDPC pre FHB a SNB. Odroda Rada v kontrolných rastlinách mala stredné hodnoty PZK a v rastlinách infikovaných mala PZK výrazne najnižšie. Podobne tomu bolo aj v znaku HZK. Najnižšiu redukciu PZK a HZK v infikovanom variante mala populácia Rada x Arida, v znaku HTZ populácia Rada x Armelis. Výsledky analýzy naznačujú, že z hľadiska tolerancie proti SNB a FHB boli populácie takmer rovnocenné, najhodnotnejšia bola populácia Rada x Arida. Variabilita hodnôt AUDPC pre FHB a SNB vo všetkých troch populáciách hybridov Rada x Arida, Rada x Armelis a Rada x SO997 mala kvantitatívny charakter, podobne ako kvantitatívne znaky PZK, HZK a HTZ. Toto indikuje, že obe choroby v týchto populáciách boli riadené polygénnym systémom a je možné robiť selekciu. Rezistencia pšenice proti FHB je riadená polygénmi na lokusoch a často je spojená s ďalšími agronomickými znakmi, ako je výška rastliny a doba kvitnutia aj z hľadiska ich vplyvu na pasívnu rezistenciu (BUERSTMAYR et al., 2002). Tieto populácie sú vzhľadom na použitých rodičov zaujímavé aj z pohľadu odolnosti proti hrdzi pšenicovej.

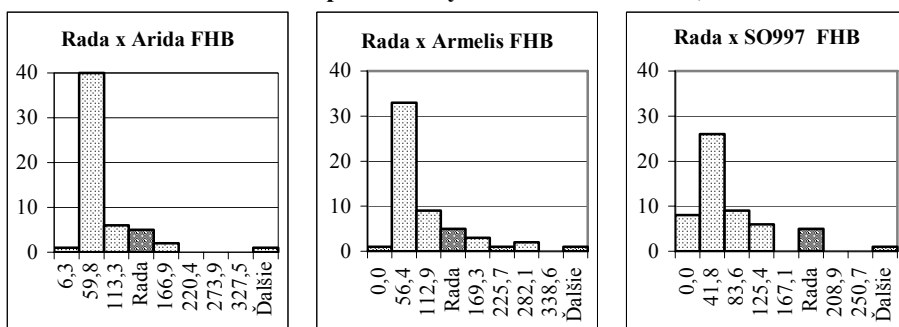
Závery

Analýzou populácií z VŠS Malý Šariš Rada x Arida, Rada x Armelis a Rada x SO997 bolo zistené, že najnižšiu redukciu PZK a HZK v infikovanom variante septóriou plevovou mala populácia Rada x Arida, v znaku HTZ populácia Rada x Armelis. Variabilita hodnôt AUDPC pre FHB a SNB vo všetkých troch populáciách hybridov Rada x Arida, Rada x Armelis a Rada x SO997 mala kvantitatívny charakter, podobne ako kvantitatívne znaky PZK, HZK a HTZ. Toto znamená, že obe choroby v týchto populáciách boli riadené polygénym systémom.

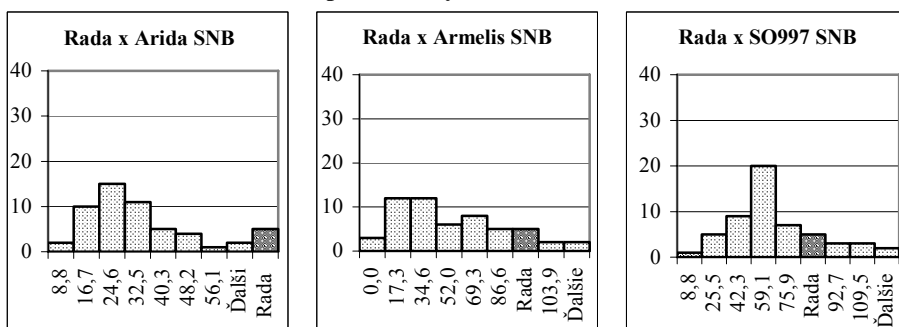
Literatúra

1. BUERSTMAYR, H - LEMMENS, M. - HARTL, L. - DOLDI, L. - STEINER, B. - STIERSCHNEIDER, M. - RUCKENBAUER, P.: Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor Appl Genet* (2002) 104:84–91
2. DU, C.G. - NELSON, L.R. - DANIEL, M.E.: Partial Resistance to Stagonospora nodorum in Wheat. Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals. A Compilation of Global Research, Mexico, 1999, 160 – 162.
3. HILTON, A.J. - JENKINSON, P. - PARRY, D.W. - HOLLINS, T.W.: Relationship between plant morphology and severity of *Fusarium* ear blight in eight cultivars of winter wheat. In Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference: pests and diseases, 1996, 4D-7, 419–20. Farnham, UK. British Crop Protection Council.
4. MESTERHAZY, A.: Theory and practice of the breeding for Fusarium head blight resistance in wheat. *J. Appl. Genet.*, 43A, (2002): 289 – 302.

Graf 1: Frekvencie AUDPC pre FHB hybridov Rada x Arida, Rada x Armelis a Rada x SO997



Graf 2: Frekvencie AUDPC pre SNB hybridov Rada x Arida, Rada x Armelis a Rada x SO997



Tabuľka 1: Analýza rozptylu AUDPC pre FHB populácie MS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Populácia	23985,70	2	11992,80	3,15	0,04
B:Ošetrenie	0,00	1	0,00	0,00	1,00
AB	0,00	2	0,00	0,00	1,00
RESIDUAL	1120000,00	294	3803,54		
TOTAL	1140000,00	299			

Tabuľka 2: Analýza rozptylu AUDPC pre SNB populácie MS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Populácia	35460,40	2	17730,20	31,22	0,00
B:Ošetrenie	0,00	1	0,00	0,00	1,00
AB	0,00	2	0,00	0,00	1,00
RESIDUAL	166961,00	294	567,90		
TOTAL	202422,00	299			

Tabuľka 3: Analýza rozptylu PZK populácie MS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Populácia	1273,76	2	636,88	17,20	0,00
B:Ošetrovanie	11670,20	1	11670,20	315,23	0,00
AB	2058,07	2	1029,04	27,80	0,00
RESIDUAL	10884,20	294	37,02		
TOTAL	25886,20	299			

Tabuľka 4: Analýza rozptylu HZK populácie MS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Populácia	0,27	2	0,13	0,93	0,40
B:Ošetrovanie	49,81	1	49,81	342,25	0,00
AB	3,97	2	1,98	13,63	0,00
RESIDUAL	42,79	294	0,15		
TOTAL	96,84	299			

Tabuľka 5: Analýza rozptylu HTZ populácie MS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Populácia	1409,05	2	704,53	28,70	0,00
B:Ošetrovanie	1712,53	1	1712,53	69,77	0,00
AB	175,65	2	87,83	3,58	0,03
RESIDUAL	7216,13	294	24,54		
TOTAL	10513,40	299			

Tabuľka 6: Najmenšie štvorce AUDPC pre FHB populácie MS na 95% hladine významnosti

Level	Count	Mean	Std.Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	300	45,63			
Populácia					
1	100	39,07	6,17	26,94	51,21
2	100	58,28	6,17	46,14	70,41
3	100	39,55	6,17	27,41	51,69
Ošetrovanie					
1	150	45,63	5,04	35,72	55,54
2	150	45,63	5,04	35,72	55,54
Populácia by Ošetrovanie					
1 1	50	39,07	8,72	21,91	56,24
1 2	50	39,07	8,72	21,91	56,24
2 1	50	58,28	8,72	41,11	75,44
2 2	50	58,28	8,72	41,11	75,44
3 1	50	39,55	8,72	22,38	56,72
3 2	50	39,55	8,72	22,38	56,72

Tabuľka 7: Najmenšie štvorce AUDPC pre SNB populácie MS na 95% hladine významnosti

Level	Count	Mean	Std.Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	300	39,43			
Populácia					
1	100	25,95	2,38	21,26	30,64
2	100	39,75	2,38	35,06	44,44
3	100	52,58	2,38	47,89	57,27
Ošetrovanie					
1	150	39,43	1,95	35,60	43,25
2	150	39,43	1,95	35,60	43,25
Populácia by Ošetrovanie					
1 1	50	25,95	3,37	19,32	32,58
1 2	50	25,95	3,37	19,32	32,58
2 1	50	39,75	3,37	33,12	46,38
2 2	50	39,75	3,37	33,12	46,38
3 1	50	52,58	3,37	45,94	59,21
3 2	50	52,58	3,37	45,94	59,21

Tabuľka 8: Najmenšie štvorce PZK populácie MS na 95% hladine významnosti

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	300	39,51			
Populácia					
1	100	42,35	0,61	41,15	43,55
2	100	37,52	0,61	36,32	38,72
3	100	38,66	0,61	37,46	39,86
Ošetrovanie					
1	150	45,75	0,50	44,77	46,72
2	150	33,27	0,50	32,29	34,25
Populácia by Ošetrovanie					
1 1	50	45,88	0,86	44,19	47,57
1 2	50	38,82	0,86	37,12	40,51
2 1	50	47,30	0,86	45,61	48,99
2 2	50	27,74	0,86	26,04	29,43
3 1	50	44,06	0,86	42,37	45,75
3 2	50	33,26	0,86	31,57	34,96

Tabuľka 9: Najmenšie štvorce HZK populácie MS na 95% hladine významnosti

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	300	1,95			
Populácia					
1	100	1,98	0,04	1,91	2,06
2	100	1,97	0,04	1,89	2,04
3	100	1,91	0,04	1,84	1,99
Ošetrovanie					
1	150	2,36	0,03	2,30	2,42
2	150	1,55	0,03	1,48	1,61
Populácia by Ošetrovanie					
1 1	50	2,27	0,05	2,16	2,37
1 2	50	1,69	0,05	1,59	1,80
2 1	50	2,53	0,05	2,42	2,64
2 2	50	1,41	0,05	1,30	1,51
3 1	50	2,29	0,05	2,18	2,39
3 2	50	1,54	0,05	1,43	1,64

Tabuľka 10: Najmenšie štvorce HTZ populácie MS na 95% hladine významnosti

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	300	49,18			
Populácia					
1	100	46,64	0,50	45,66	47,61
2	100	51,93	0,50	50,96	52,91
3	100	48,98	0,50	48,01	49,96
Ošetrovanie					
1	150	51,57	0,40	50,78	52,37
2	150	46,79	0,40	46,00	47,59
Populácia by Ošetrovanie					
1 1	50	49,74	0,70	48,36	51,12
1 2	50	43,53	0,70	42,15	44,91
2 1	50	53,26	0,70	51,88	54,64
2 2	50	50,60	0,70	49,23	51,98
3 1	50	51,72	0,70	50,34	53,10
3 2	50	46,25	0,70	44,87	47,63

Adresa autorov:

¹VÚRV, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

²VÚRV, Výskumná a šľachtiteľská stanica Malý Šariš

PROBLEMATIKA ŠLECHTĚNÍ CHMELE (*Humulus lupulus L.*) NA ODOLNOST K HOUBOVÝM CHOROBÁM HOP (*Humulus lupulus L.*) BREEDING AIMED AT RESISTANCE TO MYCOSIS

Vladimír NESVADBA - Josef PATZAK - Karel KROFTA

*Hop breeding aimed at resistance to mycosis seems to be a more difficult process due to the fact that hop (*Humulus lupulus L.*) is a dioecious plant. Mother plants selected for crossing are tested on resistance to downy mildew (*Peronosplasmopara humuli*) with the help of artificial infections. Saaz, Sládek, Zenith, Nugget, Silnyj or Magnus belong to the group of tolerant cultivars. On the contrary Target, Vojvodina, Talisman, Galena, Olympic and Hersbrucker Pure are more sensitive varieties. After crossing progenies are selected with the help of artificial infections by powdery mildew (*Sphaerotheca macularis* var. *humuli*). Nearly sixty percent of resistant plants within a crossing process are possible to obtain in dependence on parents. Some posterities are totally destroyed. Model crossings were carried out for determination of resistance transmission in the both above-mentioned pathogens. Four mother plants Target, Magnum, Yeoman and Premiant) and four father plants (known under denominations 82/6, 86/4, 87/3 and a degenerated male plant of Saaz Oswald clone no. 72) were selected. Results show that some progenies having their origin in mothers with higher susceptibility to mycosis prove higher resistance to these diseases on average.*

*Key words: hops, *Humulus lupulus L.*, resistance, downy mildew, *Peronosplasmopara humuli* Miy. et Tak), powdery mildew, *Sphaerotheca humuli* Burr., DNA, analyses.*

Úvod

Šlechtění chmele je vysoce komplikovaný proces. V současné době je šlechtění chmele zaměřeno na křížení vhodných rodičovských komponentů. Problematiku šlechtění chmele lze shrnout do tří bodů: chmel je dvoudomá rostlina, je vysoce heterozygotní a je nutné nové nadějně rostliny dlouhodobě testovat. Chmel je pěstován pro jeho generativní orgány, které jsou u samičích rostlin tvořeny chmelovými hlávkami. Tím samčí rostlina vstupuje do křížení jako neznámý opylovač. Z tohoto důvodu je nutné samičí rostliny testovat, jak přenášejí požadované znaky na potomstva. V posledních letech je šlechtění chmele zaměřeno na odolnost k významným houbovým chorobám – peronospora chmelová a padlí chmelové. V současné době jsou tvořeny metodiky umělých infekcí a jejich využití ve šlechtitelském procesu, je testován rozpracovaný šlechtitelský materiál a především je hodnocen výchozí materiál pro křížení, jak přenášejí odolnost či náchylnost na potomstva. V posledním období jsou využívány i metody studia DNA jak u hostitele, tak i patogena.

Jednou z nejlepších možností jak vzdorovat zvýšenému výskytu houbových patogenů je využití rezistentních rostlinných materiálů. Na základě nejnovějších poznatků bylo též zjištěno, že mechanismus rezistence a architektura jednotlivých genů rezistence rostlin k různým patogenům jsou velice podobné (TAKKEN, JOOSTEN, 2000; YOUNG, 2000; PAN et al., 2000). Rezistence rostlin proti různým patogenům je nejvíce založena na mechanismu genu proti genu. Specifický gen rezistence (R) rozpoznává patogenní gen virulence (Avr), čímž se rozbíhá mechanismus hypersenzitivní reakce (HR – hypersensitive response) vedoucí až k systematické získané rezistenci (SAR – systematic acquired resistance) a výrazné redukci infekce (TAKKEN, JOOSTEN, 2000). V poslední době bylo zjištěno, že většina R genů obsahuje určité konzervované oblasti nacházející se ve velkém počtu v rostlinných genomech. Jsou to především nukleotidové vazebné místo (NBS – nucleotide binding site) a doména bohatá na leucinové repetice (LRR – leucine-rich repeat), v některých případech ještě Toll/interleukin receptor (TIR) a leucinový zip (LZ) (YOUNG, 2000). Tyto genové mechanismy jsou velice podobné i u hmyzu a savců, a lze předpokládat, že jsou univerzální pro všechny živé organismy (PAN et al., 2000).

Materiál a metody

Testace šlechtitelského materiálu je prováděna pomocí umělých infekcí peronosporou chmelové (terčíková metoda). V červnu je proveden odběr listů chmele s povlakem peronosporou chmelové. Tyto listy se omyjí destilovanou vodou a získaná zoosporangiová suspenze se nastříkuje na listy testovaného materiálu. Po 6 až 7 dnech je hodnoceno poškození na listech (% plochy poškození).

Testace šlechtitelského materiálu na odolnost k padlí chmelovému bylo zahájeno v roce 2005 pomocí přírodních infekcí ve sklenicové kóji. Infekce jsou uchovány na původním rostlinném materiálu (zamrzeno). Tento materiál je použit pro infikaci náchylných chmelových rostlin. Po vytvoření bílých povlaků jsou k těmto rostlinám přeneseny semenáče jednotlivých potomstev. Po 7 až 10 dnech jsou patrné rostlinky napadené či nenapadené padlím chmelovým. Do současné doby se nepodařilo uměle uchovat infekce padlí chmelového.

Další metodou hodnocení odolnosti k peronospoře chmelové a k padlí chmelovému je stanovení poškození chmelových hlávek (bonitace chmele). Odolnost k peronospoře chmelové i k padlí chmelovému je hodnoceno vizuálně dle klasifikátoru chmele v 5 třídách: 1. odolné - bez poškození

3. slabě napadené - poškození hlávek do 10 % 5. středně napadené - poškození hlávek do 30 %

7. silně napadené - poškození hlávek do 50 % 9. velmi silně napadené - poškození nad 50 %

Základem pro šlechtění chmele je stanovení přenosu odolnosti na potomstva. Jedná se o dlouhodobou a především velmi náročnou činnost, ale získané výsledky jsou dlouhodobě využívány ve šlechtitelském

procesu. Pro modelové křížení ze kterých se získala potomstva F₁ generace byly vybrány rostliny, které se odlišovaly v genetickém původu. V genetických zdrojích chmele ve Chmelařského institutu s.r.o. Žatec je téměř 330 různých genotypů, z kterých byly vybrány tyto matečné rostliny: **Target** - anglická odrůda, která je charakteristická střední citlivostí k peronospoře chmelové (5. třída), ale vykazuje odolností k padlí chmelovému (1. třída). **Magnum** - německá odrůda, která je charakteristická střední citlivostí k peronospoře chmelové (5. třída) a vyšší citlivostí k padlí chmelovému (7. třída). **Yeoman** - anglická odrůda, která je charakteristická vyšší citlivostí k peronospoře chmelové (7. třída) a vyšší citlivostí k padlí chmelovému (5. třída). **Premiant** - česká odrůda, která je charakteristická střední citlivostí k peronospoře chmelové (5. třída) i k padlí chmelovému (5. třída) – hodnocení genetických zdrojů chmele. Samčí rostliny byly vybrány ze školky samců Chmelařského institutu s.r.o. Žatec, kde je zahrnuto téměř 110 různých genotypů. Opět vybrané samčí rostliny se odlišují svým původem. Jedná se o tyto samčí rostliny, které jsou označeny (bohužel nelze hodnotit poškození hlávek): **82/6** - hybridní genotyp po matečné rostlině odrůdy Bor, v původu je zastoupeno 24 % Žateckého poloraného červeňáku. **86/4** - hybridní genotyp po matečné rostlině odrůdy Sládek, v původu je zastoupeno 33 % Žateckého poloraného červeňáku. **87/3** - hybridní genotyp po matečné rostlině odrůdy Premiant, v původu je zastoupeno 50 % Žateckého poloraného červeňáku. **Kl. 72** - jedná se o samčí rostlinu, která byla nalezena v porostu Osvaldova klonu 72 v produkční chmelnici ve Smilovicích (došlo ke zvrhnutí původní samičí rostliny v samčí rostlinu). Pro stanovení přenosu odolnosti či náchylnosti k uvedeným houbovým chorobám byly vybrané samčí a samičí rostliny vzájemně kříženy (dialelní křížení). Z každého potomstva bylo hodnoceno minimálně 80 rostlin.

Na základě regresního koeficientu (b), popřípadě korelačního koeficientu lze stanovit koeficient heritability (h²) hodnoceného znaku u cizosprašných rostlin, kam patří i chmel (VEJL, SKUPINOVÁ, 1997):

- regrese mezi průměry rodičů a jejich potomstvem, h² = b
- regrese mezi jedním z rodičů a jejich potomstvem, h² = 2b
- korelace mezi sourozenci, h² = 4r.

Chmelová rostlina je dvoudomá a znaky se hodnotí pouze u samičích rostlin, tzn. že, v potomstvu F₁ generace se hodnotí dcery. K výpočtu regrese se používají pouze průměry mateřských rostlin (samičí rostliny - P₁) ve vztahu průměrných hodnot dcer a nikoliv k průměru celého potomstva (dcery a synové). Z tohoto důvodu byl výpočet heritability proveden na základě vzorce h² = b, který uvádí vztah matka a dcera (NESVADBA, 2001).

Výsledky a diskuse

Testování výchozího materiálu na citlivost k peronospoře chmelové je prováděno i pomocí umělých infekcí (terčíkovou metodou). Z dosažených výsledků (% poškozené plochy listu peronosporou chmelovou) lze matečné rostliny rozdělit do skupin:

Tolerantní (poškozeno do 10 % plochy listu): Žatecký poloraný červeňák, Sládek, Premiant, Northdown, Challenger, Zenith, Southern Brewer, Fuggle, Willamette Nugget, Chinook, Atlas, Blisk, Buket, Silnyj, Perle, Tradition, Magnum.

Citlivé (poškozeno 10 až 40 % plochy listu): Premiant, Agnus, Golding, Bramling Cross, Early Promise, Columbia, Comet, Bobek, Precoce de Bourgogne, Hallertau, Huller Bitterer, Spaltzer Select, Northern Brewer, Cascade, Ringwood Speciál.

Silně citlivé (poškozeno nad 40 % plochy listu): Target, Vojvodina, Talisman, Braustern, Galena, Olympic, Eroica, Hersbrucker Pure, White Bine, Izabela, Granit, A. Polesja, Stimul, Kumir, Smena, Zaklad, Marynka.

V roce 2005 byly provedeny infekce padlím chmelovým u potomstev šlechtitelského materiálu. Z dosažených výsledků (Tabulka 1) je patrné, některá potomstva vykazují vysokou citlivost k padlí chmelovému (Agnus x Li.) a naopak potomstva po matečné rostlině 4784 vykazují téměř 60 % odolných jedinců.

Tabulka 1: Podíl odolných a napadených rostlin padlím chmelovým u jednotlivých potomstev

Křížení (♀ x ♂)	Agnus x Li	4709 x 99	4715 x OP	Taurus x Sm	Zenith x OP	4784 x OP
Odolné	0	4	15	15	12	52
Slabě napadené	0	25	24	56	11	23
Napadené	102	37	137	98	44	12
% odolných	0	6,1	8,5	8,9	17,9	59,8

Potomstva odrůdy Target vykazují nejvyšší odolnost k peronospoře chmelové (3,39 bodů – slabě napadení), ale současně vykazují i nejvyšší variabilitu (V_k = 66,49 %), jak je patrné z tabulky 2. Střední napadení vykazují potomstva odrůd Premiant (5,26 bodů) a Magnum (5,79 bodů). Nejvyšší napadení chmelových hlávek vykazují potomstva odrůdy Yeoman. Potomstva odrůd Magnum, Yeoman a Premiant vykazují nízkou diferencí ve variabilitě znaku a to od 35,78 % (Magnum) do 38,02 % (Yeoman). Samčí rostliny vykazují nižší rozdíl průměrných bodů. Potomstva samčí rostliny 87/3 dosáhla nejvyšší průměrné hodnoty 5,71 bodů a naopak potomstva samčí rostliny 82/6 vykazují 4,91 bodů.

Tabulka 2: Průměr bodového hodnocení odolnosti k peronospoře chmelové u potomstev F₁ generace dle rodičů

♀	Target	Magnum	Yeoman	Premiant	x	s	Vk (%)	Pořadí průměru
♂ 82/6	3,15	4,65	7,57	4,28	4,91	2,418	49,25	1
86/4	1,80	5,64	6,86	5,42	4,93	2,710	55,02	2
87/3	4,04	6,86	6,18	5,77	5,71	2,128	37,26	4
Kl. 72	4,53	6,00	4,44	5,64	5,16	2,330	45,15	3
x	3,39	5,79	6,27	5,26	5,18			
s	2,254	2,070	2,384	1,934	2,425			
Vk (%)	66,49	35,78	38,02	36,70	46,85			
Pořadí	1	3	4	2				

Průkaznost rozdílu průměrné odolnosti k peronospoře chmelové mezi jednotlivými potomstvy byla stanovena t-testem. S 99 % pravděpodobností potomstva testovaných samičích rostlin vykazují odolnost. U potomstev hodnocených dle samčích rostlin, vykazují pouze potomstva samčí rostliny 87/3 s 99 % průkazností vyšší náchylnost k peronospoře chmelové než potomstva ostatních samčích rostlin.

V první filiální generaci potomstva odrůdy Target vykazují nejvyšší odolnost k padlí chmelovému (3,95 bodů – slabé napadení), ale vykazují nejvyšší variabilitu (Vk = 57,64 %). Z tabulky 3 je dále patrné, že téměř shodné průměrné bodové hodnocení (včetně variability) vykazují potomstva odrůd Premiant a Magnum. Potomstva odrůdy Yeoman a samčí rostliny 87/3 mají nejvyšší bodové hodnocení (nejvyšší náchylnost) a současně vykazují nejnižší variabilitu. Potomstva ostatních samčích rostlin vykazují nízkou diferencí mezi průměry.

Tabulka 3: Průměr bodového hodnocení odolnosti k padlí chmelovému u potomstev F₁ generace dle rodičů

♀/♂	Target	Magnum	Yeoman	Premiant	\bar{x}	s	Vk (%)	Pořadí průměru
82/6	3,92	4,65	6,90	4,44	4,97	2,276	45,85	1
86/4	2,20	5,71	6,43	5,25	4,89	2,548	52,15	2
87/3	4,48	6,14	6,41	6,38	5,85	1,862	31,83	4
Kl. 72	5,24	4,92	4,67	5,64	5,13	2,364	46,13	3
\bar{x}	3,95	5,35	5,60	5,42	5,08			
s	2,274	2,089	1,712	2,028	2,139			
Vk (%)	57,64	39,07	30,66	37,42	42,13			
Pořadí	1	2	4	3				

Průkaznost rozdílu průměrné odolnosti k padlí chmelovému mezi jednotlivými potomstvy byla stanovena t-testem. S 99 % pravděpodobností potomstva odrůdy Target vykazují vyšší odolnost než potomstva ostatních odrůd. Potomstva odrůdy Magnum vykazují s 90 % pravděpodobností vyšší odolnost než potomstva odrůdy Yeoman. Mezi ostatními potomstvy nebyla stanovena průkaznost rozdílu. U potomstev hodnocených dle samčích rostlin, vykazují pouze potomstva samčí rostliny 87/3 s 99 % průkazností vyšší náchylnost k padlí chmelovému než potomstva ostatních samčích rostlin.

Na základě dosažených výsledků byla vypočtena heritabilita u odolnosti k peronospoře chmelové ($h^2 = 0,64$) a u odolnosti k padlí chmelovému ($h^2 = 0,42$). Dosažené výsledky charakterizující heritabilitu je nutné chápat jako dílčí, protože byla vypočtena z omezeného počtu jedinců. Přesto lze dosaženou heritabilitu u odolnosti charakterizovat jako vyšší než např. u dalších znaků – hustota nasazení pazochů ($h^2 = 0,29$) a hustota nasazení hlávek ($h^2 = 0,13$) – dle výpočtů (NESVADBA, 2001).

Jelikož šlechtitelský proces je velice zdoluhavý a selekce velice obtížná, proto jsme začali studovat možnosti využití molekulárních metod. V molekulárně biologických analýzách jsme vycházeli z výše uvedených předpokladů, když na základě těchto sekvencí bylo připraveno 6 PCR primerů, které byly využity v kombinaci z AFLP k hledání asociovaných oblastí genů rezistence a jejich homologů podle HAYES a SAGHAI MAROOF (2000). V těchto experimentech byla provedena detekce polymorfismu DNA na základě segregační analýzy F1 populací (BSA – bulk segregant analysis) křížení rezistentních genotypů se senzitivními genotypy chmele. Z prvních experimentů bylo patrné, že bude možné nalézt amplifikované reprodukcibilní polymorfní produkty z dobrou korelací z rezistencí k padlí chmelovému. Silně korelující markery genů rezistence či asociovaných oblastí budou dále sekvenovány a jejich sekvence porovnány s dostupnými genovými bankami na sekvenční podobnost s jinými geny rezistence pomocí analyzačních softwarů. Z použitých molekulárně-genetických markerů bude vypracován systém selekce podle genetických markerů (MAS), jež výrazně zefektivní šlechtitelský proces. Dalším faktorem je významně ovlivňuje samotnou rezistenci rostliny vůči patogenovi, je samotný patogen. Populace rostlinných druhů jsou v lokalitách

v kontaktu s přirozenými patogeny, kde může pokračovat vývoj patogena (vznik nových virulentních ras) a dochází tak k vzájemné evoluci plodin (rekombinace genů k virulenci ras) s patogeny (Woods, 1987). V zahraničí se již podařilo stanovit jednotlivé rasy padlí chmelového - v Německu 7 ras, ve Francii 1 rasa, v Anglii 3 rasy a v USA 2 rasy (SEIGNER et al., 2001). V České republice nebyla problematika identifikace jednotlivých houbových patogenů, jejich ras a izolátů dříve studována. Využití molekulárně biologických technik je novou a vysoce efektivní metodou v determinaci jednotlivých patogenů, umožňující nejenom detekci jednotlivých druhů patogenu (HATSCH et al., 2002; REITHMÜLLER et al., 2002; SAENZ, TAYLOR, 1999), ale i jednotlivých ras a izolátů (PAAVANEN-HUHTALA et al., 1999; 2000; REHMANY et al., 2000). Současně se zabýváme studiem DNA patogena V našich experimentech se nám podařilo charakterizovat sekvenci rDNA padlí chmelového *Podosphaera humuli* (AF448224) a odvodit univerzální a specifické PCR primery pro rychlou detekci a determinaci jednotlivých houbových patogenů. Pomocí restriční analýzy PCR produktů (CAPS) se podařilo odlišit jednotlivé izoláty patogena z České a Slovenské republiky. V budoucnu se chceme věnovat podrobnějšímu studiu jednotlivých ras a izolátů padlí v ČR.

Závěr

Z dosažených výsledků je patrná vysoká náročnost na šlechtění chmele na odolnost. Základem pro šlechtění chmele je získat rodičovské komponenty, po kterých se budou získávat odolné nadějně genotypy. I když sledování přenosu odolnosti na potomstva je velmi náročné, jsou přesto dosažené výsledky základem pro šlechtění chmele na odolnost. Dále je nutné pro šlechtění chmele vytvořit a maximálně využívat umělé infekce pro selekci získaného šlechtitelského materiálu.

Literatura

1. HATSCH, D. - PHALIP, V. - JELTSCH, J.M.: Development of bipartite method for *Fusarium* identification based on cellobiohydrolase-C: CAPS and western blot analysis. FEMS Microbiology letters 213, 2002, s. 245-249.
2. HAYES, A.J. - SAGHAI MAROOF, M.A.: Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. Theoretical and Applied Genetics, 100, 2000, s. 1279-1283.
3. NESVADBA, V.: Dědičnost kvalitativních znaků chmele. Disertační práce, ČZU AF Praha, 2001.
4. PAAVANEN-HUHTALA, S. - HYVÖNEN, J. - BULAT, S.A. - YLI-MATTILA, T.: RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analysis in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. Mycol. Res. 103, 1999, s. 625-634.
5. PAAVANEN-HUHTALA, S. - AVIKAINEN, H. - YLI-MATTILA, T.: Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. In: Europ. J. Plant Pathol. 106, 1999, s. 187-188.
6. PAN, Q. - WENDEL, J. - FLUHR, R.: Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance homologues in dicot and cereal genomes. Journal of Molecular Evolution 50, 2000, s. 203-213.
7. REHMANY, A.P. - LYNN, J.R. - TÖR, M. - HOLUB, E.B. - BEYNON, J.L.: A comparison of *Perenospora parasitica* (downy mildew) isolates from *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* using amplified fragment length polymorphism and internal transcribed spacer 1 sequence analyse. Fungal Genetics and Biology 30, 2000, s. 95-103.
8. REITHMÜLLER, A. - VOGLMAYR, H. - GÖKER, M. - WEIß, M. - OBERWINKLER, F.: Phylogenetic relationships of the downy mildews (Perenosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. In: Mycologia 94, 2002, s. 834-849.
9. SAENZ, G.S. - TAYLOR, J.W.: Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. In: Can. J. Bot. 77, 1999, s. 150-160.
10. SEIGNER, E. - SEEFELDER, S. - HAUGG, B. - HESSE, H. - RÖSCH, H. - FELSENSTEIN, F.: Investigations on the virulence spectrum of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*). Proceedings of Scientific Commission of IHGC, Canterbury, Kent, England, 5-7.8., 2001, s. 33-37.
11. TAKKEN, F.L.W. - JOOSTEN, M.H.A.J.: Plant resistance genes: their structure, function and evolution. In: European Journal of Plant Pathology 106, 2000, s. 699-713.
12. VEJL, P. - SKUPINOVA, S.: Cvičení z obecné genetiky, ČZU v Praze, 1997
13. WOODS, T. A.: The preservation and interpretation of historical gerplasm. Living history farms and agricultural museums. Diversity 10, 1987, s. 35 – 38.
14. YOUNG, N.D.: The genetic architecture of resistance. In: Current Opinion in Plant Biology 3, 2000, s. 285-290.

Poděkování: Studium šlechtění chmele na odolnost k houbovým chorobám je řešeno v rámci výzkumného záměru „Výzkum a regulace stresových faktorů chmele“ (MSM 1486434701), který podporuje MŠMT ČR. Podklady pro tento příspěvek byly získány z GZ rostlin v rámci Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a biodiversity (MZe 33083/03-300 6.2.1.), které podporuje MZe ČR.

Address correspondence to:

Vladimír Nesvadba, Chmelářský institut, Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, Czech Republic. E-mail: v.nesvadba@telecom.cz

**POROVNÁNÍ VYBRANÝCH KLONŮ JABLONÍ VYŠLECHTĚNÝCH NA
REZISTENCI VŮČI *VENTURIA INAEQUALIS* (CKE.) WINT., PŮVODCI
STRUPOVITOSTI JABLONĚ**
**THE COMPARISON OF THE SELECTED APPLE TREE CLONES BRED FOR
RESISTANCE TO *VENTURIA INAEQUALIS* (CKE.) WINT., THE CAUSAL
AGENT OF APPLE SCAB**

Stanislav BOČEK

*During the period 2002–2004 we assessed the collection of 19 apple tree clones originating from Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd. The experimental plot was established in Brno (altitude 223 m, mean temperature 8.7 °C, mean precipitation 490 mm) in spring in 1999. The trained tree form was spindle-like scrub, spacing 2.2 x 0.6 m. We tested the level of resistance to *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. under the provocative conditions made by increased infectious pressure of the pathogen. We also observed the incidence of other fungal diseases (powdery mildew, brown rot) and physiological disorders (bitter pit) and we evaluated the properties of generative growth (yield, fruit weight). Out of the overall 19 clones we assessed the clones HL 783, HL 820, HL 1112 (Vf gene from *Malus floribunda* 821 progenitor) and HL 665 (Va gene or VA gene from the variety 'Antonovka') to be fully resistant to *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.. Out of the 13 clones with unknown polygenic factors of resistance the clones HL 121 and HL 1004 expressed the highest degree of resistance. Statistically positive correlation was found between the foliar and fruit scab severity, the relation was different among the clones, some discrepancies between foliar and fruit scab severity were found. The clones HL 130, HL 135 and HL 137 manifested very low scab severity in comparison to disease severity on leaves. The clone HL 121 showed high level of resistance to apple scab, powdery mildew and brown rot. The variety 'Produkta' and the clones HL 130, HL 1711 and HL 121 reached the highest yields.*
*Key words: *Venturia inaequalis*, apple scab, powdery mildew, brown rot, bitter pit, yield, fruit weight*

Úvod

Jednou z efektivních cest, jak ve výsadbách jabloní omezit škody působené houbou *Venturia inaequalis* (Cke. Wint., je pěstování rezistentních odrůd. Většina odrůd vyšlechtěných na rezistenci k *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. získala tuto rezistenci ze selekcí odvozených z klonu *Malus floribunda* 821 (monogenní základ – gen Vf). Existence fyziologických ras 6 a 7 houby *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., které tuto rezistenci překonávají (PARISI et al., 1993; ROBERTS, CRUTE, 1994) přiměla šlechtitele k hledání alternativních zdrojů rezistence a k jejich vzájemnému kombinování, s cílem trvanlivost rezistence zvýšit (SANSVINI et al., 2002). Současně je snahou v nových odrůdách sloučit rezistenci i k dalším houbovým nebo bakteriálním chorobám, případně živočišným škůdcům (FISCHER, 2000). Ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském v Holovousích s.r.o. zařazují do programu rezistentního šlechtění také zdroje, u kterých se předpokládá polygenní základ dědičnosti (BLAŽEK, PAPRŠTEIN, 1997). Od roku 1995 probíhá v rámci spolupráce s Mendelovou zemědělskou a lesnickou univerzitou v Brně hodnocení vybraných perspektivních klonů na Ústavu šlechtění a množení zahradnických rostlin Zahradnické fakulty v Lednici. V podmínkách jižní Moravy je u materiálu testován nejen stupeň rezistence k *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. a k dalším houbovým patogenům, ale současně jsou sledovány významné hospodářské znaky a vlastnosti, jako je růst, plodnost a kvalita plodů (BOČEK, ŘEZNÍČEK, 2005). Cílem této studie je prezentovat některé výsledky hodnocení kolekce založené v roce 1999 na pokusné ploše v Brně.

Materiál a metody

Pokus byl založen v areálu Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Lokalita se nachází v nadmořské výšce 223 m n. m., průměrná roční teplota v dlouhodobém normálu činí 8,7 °C, průměrný roční úhrn srážek 490 mm. Pozemek se nachází na rovině, půdním typem je antrozem humózní.

Materiál byl dodán VŠÚO Holovousy s.r.o. ve formě roubů. Přehled je uveden v tabulce 1. Po naroubování metodou anglické kopulace na podnož J–OH–A byly sazenice vypěstovány v kontejnerech o objemu 5 l ve vegetační kleci klasickým dvouletým způsobem. Na jaře roku 1999 byly stromky (dvouleté výpěstky s korunkou) vysazeny po třech kusech od každého klonu na pokusný pozemek v areálu MZLU v Brně. Jako kontrolní odrůda byla použita odrůda 'Golden Delicious'. Stromky byly vysazeny do sponu 2,2 x 0,6 m, každý k individuální opoře. Meziřadí byla zatravněna, příkmenné pásy o šířce 0,8 m byly udržovány v bezplevelném stavu okopávkou. Závlaha byla realizována systémem kapkové závlahy Nadir. Stromky byly zapěstovány jako větvenovitý zákrsek, prováděn byl pouze zimní řez, probírka plodů nebyla uplatňována.

Hnojení bylo prováděno 2 x ročně (při rašení a po červnovém propadu) vícesložkovým hnojivem Cererit v dávce 35 g.m⁻² individuálně ke každému stromku, počátkem července a počátkem srpna aplikací kapalného hnojiva Wuxal Kalcium (0,3 %) formou postřiku. Ve výsadbě nebyla prováděna žádná fungicidní ošetření. Ochrana vůči živočišným škůdcům byla prováděna na základě signalizace jejich výskytu podle platných metodik Státní rostlinolékařské správy České republiky.

Testování klonů na rezistenci k *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. probíhalo v provokačních podmínkách zvýšeného infekčního tlaku patogena v letech 2002–2004. Infekční tlak byl zvyšován rozmístěním silně napadených listů náchylných odrůd (na podzim roku 2001 a 2002 listy odrůd 'Golden Delicious', 'Jonathan', 'Šampion', 'Idared' získané z pokusných parcel ÚKZÚZ Lysice, v roce 2003 pouze listů sledovaných klonů) pod koruny stromků.

Na jaře roku 2004 byly na pokusné lokality umístěny kontejnerované rostliny diferenačních odrůd (genotypů) k fyziologickým rasám č. 1 – 7 *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Jednalo se o genotypy, respektive odrůdy 'Golden Delicious', 'Granny Smith' (rasa 1), 'Dolgo', D4811, D2250 (rasa 2), 'Geneva' (rasa 3), D2249 (rasa 4), D2225, 9AR2T128, OR45T132 (rasa 5), 'Prima' (rasa 6), 'Priscilla', *Malus floribunda* 821 (rasa 7). Materiál v podobě roubovanců dodal VŠÚO Holovousy s.r.o..

Tabulka 1: Přehled klonů, jejich rodičovské komponenty, založení rezistence uvedené šlechtitelem a rok křížení

Klon (odrůda)	Původ		Zdroj (gen) rezistence	Rok křížení
	Matka	Otec		
HL 67/83	Šampion	HL 2x57 (Oldenburgovo x McIntosh)	polygenní	1978
HL 121	Zvonkové	Nabella	polygenní	1978
HL 130	Lord Lambourne	Spartan	polygenní	1971
HL 135	Lord Lambourne	Spartan	polygenní	1971
HL 137	Lord Lambourne	Spartan	polygenní	1971
HL 141	Starkrimson Delicious	James Grieve	polygenní	1971
HL 158	Clivia	Rubín	polygenní	1977
HL 166A	Clivia	Rubín	polygenní	1977
HL 166B	Clivia	Rubín	polygenní	1977
HL 186A	Jonadel	Rubín	polygenní	1977
HL 547A	Quinte	Mio	polygenní	1977
HL 665	Spartan	HL A28/39 (Antonovka v.s.)	VA	1977
HL 783	Rubin	Priscilla	Vf	1980
HL 820	NJ 55	Coop 17	Vf	1973
HL 1004	Goldenspur	Zvonkové	polygenní	1977
HL 1112	Purdue 1083–206	Purdue 1947–108	Vf	1973
HL 1196	A 33/74 (Hedvábné pozděkvěté x Krátkostopka královská)	Trent	Vf	1975
HL 1711	Idared	Discovery	polygenní	1980
Produkta	HL A28/39 (Antonovka v.s.)	Goldspur	VA	1974

Výskyt strupovitosti jabloně na listech byl každoročně hodnocen devítibodovou stupnicí (Paprštein, Blažek, Lánský, 1999), výskyt padlí jabloně na listech a výhonech devítibodovou stupnicí (Blažek, 1999), kde hodnota 1 znamená nejvyšší výskyt choroby, hodnota 9 nejnižší (zcela bez symptomů). Hodnota 8 představuje rezistentní reakci (bodová reakce– "pin-point pits" nebo chlorotické léze bez sporulace patogena). Hodnocení napadení diferenačních genotypů fyziologických ras *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. bylo provedeno dle upravené stupnice Chevalier, Lespinasse, Renaudin (1991).

Dále byl zjišťován výnos na 1 strom (kg) a průměrná hmotnost 1 plodu (g). Intenzita výskytu strupovitosti jabloně na plodech byla vyjádřena jako plocha lézí na 1 plodu (mm²) podle vzorce:

$$S_s = \sum_{i=1}^n S_i \quad (\text{mm}^2) \quad S_i = \pi \cdot d_i^2 / 4 \quad (\text{mm}^2)$$

kde n ... počet lézí (ks),
d_i... průměr léze (mm),
S_i... plocha 1 léze (mm²) – byl uvažován tvar kruhu
S_s... celková plocha lézí na plodu (mm²)

U plodů byl hodnocen výskyt moniliové hniloby plodů (četnost napadených plodů – %), fyziologické skvrnitosti plodů (devítibodová stupnice, kde 9 – bez výskytu choroby, 1 – maximální výskyt).

Měřené hodnoty byly statisticky zpracovány analýzou rozptylu v počítačovém programu Unistat 5.1., následně testování bylo provedeno Tuckey HSD testem (P=0,05). Srovnání výskytu strupovitosti jabloně na listech a plodech a vztah mezi výskytem strupovitostí jabloně na listech a padlím jabloně bylo provedeno na základě korelačních koeficientů (program Microsoft Excel).

Výsledky a diskuse

Během tří let sledování výskytu strupovitosti jabloně na listech a plodech byla zjištěna úplná rezistence (bez příznaků choroby v podobě sporulujících lézí) u klonů HL 783, HL 820 a HL 1112, u kterých šlechtitel předpokládal gen rezistence *Vf*, a také u klonu HL 665. Na základě fenotypového projevu nelze určit, zda je rezistence u klonu HL 665 podmíněná polygenním základem – gen *VA*, který zmiňuje např. Fischer (2000) nebo monogenním (*Va*), který byl zjištěn v selekci 'Antonovka' PI 172623 (WILLIAMS, KUČ, 1969). Obdobná situace je u odrůdy 'Produkta', u které byl ovšem slabý výskyt strupovitosti jabloně zaznamenán (tabulka 2).

Silný výskyt strupovitosti jabloně na listech i plodech byl zaznamenán u klonu HL 1196, u kterého byl předpokládán gen rezistence *Vf*. Diferenční genotypy a indikátory fyziologických ras *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. neprokázaly v pokusné výsadbě přítomnost fyziologických ras 6 a 7, proto může být náchylnost námi sledovaného klonu pod označením HL 1196 vysvětlena záměnnou rostlinnou materiálu (BOČEK, ŘEZNÍČEK, 2005). BLAŽEK a PAPERŠTEIN (1997) hodnotili HL 1196 v Holovousích jako zcela rezistentní (stupeň 9).

Mezi intenzitou výskytu strupovitosti jabloně na listech a plodech byla zjištěna statisticky vysoce významná pozitivní korelace ($r = 0,794^{**}$, $P=0,01$, $df=18$). V rámci jednotlivých klonů byly ovšem rozdíly. Klony HL 67/87 a HL 186A se vyznačovaly vyšší citlivostí a klony HL 130, HL 135 a HL 137 naopak vyšší odolností plodů, než by odpovídalo danému výskytu choroby na listech. Tato skutečnost by mohla ukazovat na určité omezení umělých infekčních testů v raných fázích selekčního cyklu, kdy dochází k eliminaci náchylných jedinců na základě symptomů choroby u semenáčů ve fázi 2-3 pravých listů. Tento rutinní postup je ve šlechtění běžně využíván (KEMP et al., 2004)

Tabulka 2: Průměrné hodnoty výskytu strupovitosti jabloně, padlí jabloně, moniliové hniloby plodů, fyziologické skvrnitosti plodů, výnosů a hmotnosti plodu z let 2002-2004

Klon	Strupovitost jabloně			Padlí jabloně (9b)	Moniliová hniloba (%)	Fyziologická skvrnitost (9b)	Výnos (kg)	Hmotnost plodu (g)				
	listy (9b)	plody (mm ²)										
HL 67/83	6,3	22,19	ab	7,7	5,1	abc	8,89	b	3,37	abc	172,5	de
HL 121	7,3	0,04	a	7,0	3,2	a	8,98	b	6,58	bcd	181,9	def
HL 130	5,0	5,36	a	6,3	4,2	ab	8,93	b	8,30	cd	173,8	de
HL 135	6,3	0,52	a	6,0	12,5	abcd	8,75	b	5,00	abcd	200,9	fg
HL 137	6,3	0,17	a	6,7	11,8	abcd	8,45	a	5,22	abcd	205,0	g
HL 141	5,7	13,84	a	7,0	19,4	d	8,77	b	5,08	abcd	166,3	d
HL 158	6,3	4,58	a	4,0	5,6	abcd	8,98	b	5,28	bcd	189,3	efg
HL 166A	5,0	22,68	ab	7,7	18,2	cd	8,99	b	4,97	abcd	142,4	c
HL 166B	6,0	15,44	ab	6,0	12,5	abcd	8,98	b	3,30	abc	116,6	b
HL 186A	6,7	15,82	ab	3,7	10,0	abcd	9,00	b	5,27	bcd	237,0	h
HL 547A	4,7	39,95	b	5,7	4,6	abc	8,99	b	4,13	abc	94,6	a
HL 665	8,7	0,00	a	4,3	10,2	abcd	8,81	b	4,13	abc	141,0	c
HL 783	9,0	0,00	a	5,0	55,6	e	9,00	b	0,08	a	82,8	a
HL 820	9,0	0,00	a	2,0	4,8	abc	9,00	b	5,07	abcd	99,2	ab
HL 1004	7,0	0,26	a	6,0	5,5	abcd	8,93	b	5,85	bcd	90,6	a
HL 1112	9,0	0,00	a	6,0	6,6	abcd	9,00	b	6,10	bcd	191,3	efg
HL 1196		172,1										
	2,3	4	d	4,0	17,1	bcd	9,00	b	1,79	ab	230,3	h
HL 1711	5,7	15,84	ab	4,0	14,9	abcd	8,97	b	7,23	cd	164,8	d
Produkta	7,7	0,43	a	6,0	9,7	abcd	8,98	b	10,04	d	172,4	de
Kontrola		108,4										
	1,7	7	c	5,7	9,7	abcd	8,97	b	3,67	abc	138,6	c

Vysv.: Rozdílná písmena mezi řádky značí statisticky významný rozdíl ($P=0,05$, Tuckey HSD test) mezi klony.

Žádný ze sledovaných klonů nebyl zcela rezistentní k houbě *Podosphaera leucotricha*. Nejvyšším stupněm odolnosti se vyznačovaly klony HL 67/83, HL 166A, HL 121 a HL 141 (tabulka 2).

V daném souboru klonů byla vyšší odolnost k strupovitosti jabloně korelována s nižší odolností k padlí jabloně, tato korelace však byla velmi slabá, statisticky nevýznamná ($r = -0,168$, $P=0,05$, $df=18$).

Výskyt moniliové hniloby a fyziologické skvrnitosti u sklizených plodů je uveden v tabulce 2. Nejnižší výskyt moniliové hniloby plodů byl zaznamenán u klonů HL 121, HL 130, HL 547A a HL 820 (méně než 5

% plodů). Nejvyšší citlivostí k fyziologické skvrnitosti plodů se vyznačoval klon HL 137, který se od ostatních statisticky významně lišil (tabulka 2). Zcela bez poškození zůstaly plody klonů HL 783, HL 820, HL 1112 a HL 1196.

Ve sledovaném souboru klonů byly zjištěny statisticky významné rozdíly ve výši výnosů a průměrné hmotnosti plodu (tabulka 2). Nejvyšší průměrný výnos za sledované období dosáhla odrůda 'Produkta' (10,04 kg), následovaly klony HL 130 (8,3 kg), HL 1711 (7,23 kg) a HL 121 (6,58 kg). Velmi nízkou plodnost měly klony HL 783 (0,08 kg) a HL 1196 (1,79 kg). Klon HL 1196 se spolu s klonem HL 186 vyznačoval velmi velkými plody (230,3 g, respektive 237,0 g). Plody s průměrnou hmotností vyšší než 200 g měly klony HL 186A, HL 1196, HL 135 a HL 137, naopak plody o průměrné hmotnosti nižší než 100 g měly klony HL 547A (letní dozrávání), HL 783, HL 820 a HL 1004. U klonu HL 820 byl zaznamenán vysoký sklon k periodicitě plodnosti.

Závěr

Z celkového počtu 19 hodnocených klonů, respektive odrůd, vykázaly úplnou rezistenci k *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. klony HL 783, HL 820 a HL 1112, nesoucí pravděpodobně gen rezistence *Vf*, a klon HL 665, u kterého je rezistence založena na genu *Va* nebo *VA* z odrůdy 'Antonovka'. Žádný klon s předpokládaným neznámým polygenním základem rezistence se neukázal být zcela rezistentní k *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.. Mezi perspektivní z této skupiny patřily klony HL 121 a HL 1004 vykazující vysokou odolnost listů i plodů a také klony HL 130, HL 135 a HL 137, které vykázaly značnou odolnost plodů. Tyto klony představují cenný alternativní zdroj rezistence. Klon HL 121 vykázal při současně vysoké pravidelné plodnosti a ideální průměrné hmotnosti plodů i vysoký stupeň odolnosti k padlí jabloně a moniliové hnilobě plodů. Tento klon se může stát zajímavým zdrojem mnohonásobné rezistence. Z hlediska plodnosti vynikla odrůda 'Produkta' a klony HL 130, HL 1711 a HL 121.

Literatura

1. BLAŽEK, J.: Výběr genotypů jabloní s komplexní odolností proti strupovitosti a padlí. *Vědecké práce ovocnářské*, 1999, 16, s. 83–90. ISSN 0231–6900.
2. BLAŽEK, J. - PAPRŠTEIN, F.: Charakteristika genotypů jabloní s nejvyššími stupni odolnosti proti strupovitosti soustředěnými ve VŠÚO v Holovousích. *Vědecké práce ovocnářské*, 1997, 15, s. 125–141, ISSN 0231–6900
3. BOČEK, S. - ŘEZNÍČEK V.: Výsledky hodnocení vybraných genotypů jabloní z VŠÚO Holovousy v podmínkách jižní Moravy. *Vědecké práce ovocnářské*, 2005, 19, s. 121–133, ISSN 0231–6900.
4. FISCHER, C.: Multiple resistant apple cultivars and consequences for apple breeding in the future. *Acta Horticulturae*, 2000, 538, p. 229–234. ISSN 0567–7572.
5. CHEVALIER, M. - LESPINASSE, Y. - RENAUDIN, S.: A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology*, 1991, 40, p. 249–256, ISSN 0032–0862.
6. KEMP, H. - van der MAAS, M.P. - VOORRIPS, R.E. - GROENWOLD, R. - van de WEG, W.E.: An assessment of the durability and susceptibility of scab resistance in apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 2004, 663, p. 221–224, ISSN 0567–7572.
7. PAPRŠTEIN, F. - BLAŽEK, J. - LÁNSKÝ, M.: Differences in incidence of scab on apples planted as single cultivar plots and in mixed orchard of germplasm depository. *Zahradnictví– Hort. Sci.* (Prague), 1999, 26 (2), p. 41–44, ISSN 0862–867X.
8. PARISI, L. - LESPINASSE, Y. - GUILLAUMES, J. - KRÜGER, J.: A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology*, 1993, 83, p. 533–537, ISSN 0031–949X.
9. ROBERTS, A.L. - CRUTE, I.R.: Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (*Vf*) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. *Norw. J. Agric. Sci. Suppl.*, 1994, 17, p. 403–406.
10. SANSAVINI, S. - TARTARINI, S. - GENNARI, F. - BARBIERI, M.: Scab (*Venturia inaequalis*) Resistance in Apple: the *Vf*-Gene and Polygenic Resistance in the Breeding Strategy at DCA–Bologna. *Acta Horticulturae*, 2002, 595, p. 29–32, ISSN 0567–7572.
11. WILLIAMS, E.B. - KUČ, J.: Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1969, 7, p. 223–246.

Adresa autora:

Ing. Stanislav Boček, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici, Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin, Zemědělská 1, 61300 Brno, Česká republika, Telefon:+420545136010, Email: sbocek@centrum.cz

**VYUŽITIE METÓDY RAPD PRI ŠTÚDIU EVOLÚCIE PŠENICE DVOJZRNOVEJ
[*Triticum turgidum* sbsp. *dicoccum* (Schrank)]
APPLICATION OF RAPD METHOD IN THE STUDY OF EMMER WHEAT
[*Triticum turgidum* sbsp. *dicoccum* (Schrank)] EVOLUTION**

Peter CIVÁŇ – Miroslav ŠVEC – Katarína MIKULOVÁ – Tomáš KUČHTA – Peter SIEKEL

Emmer wheat [Triticum turgidum sbsp. dicoccum (Schrank)] is among the most ancient cereal crops of the Old World's agriculture. T. dicoccum is tetraploid, hulled and non-shattering wheat with a genome constitution AABB. Nowadays, the cultivation of emmer is restricted to only few marginal areas, it is a relic crop sporadically grown in some parts of Europe, Asia and Africa. In the present study RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular marker technique was used in an attempt to determine genetic diversity levels, phylogenetic relationships and evolutionary divergence of a set of T. dicoccum accessions originated from several countries of their traditional cultivation. The study demonstrated that RAPD analysis can be used for estimating phylogenetic relationships among different T. dicoccum accessions and surveying their genetic diversity levels. Our results have proved clear taxonomic identity of Slovakian emmers in convar. serbicum. In cluster analysis the European material was clearly separated in two main clusters that roughly shadow two major neolithic farming routes into Europe, one along the Mediterranean and Atlantic coasts and the other through the river valleys of central Europe.

Key words: emmer wheat, Triticum turgidum sbsp. dicoccum (Schrank), RAPD, genetic diversity, spread of agriculture

Úvod

Tetraploidná pšenica dvojzrnová [*Triticum turgidum* sbsp. *dicoccum* (Schrank)] sa radí medzi tzv. plevnaté pšenice, ktoré v minulosti patrili k základným poľnohospodárskym plodinám, no v súčasnosti je ich reliktné pestovanie v Európe obmedzené len na niekoľko poľnohospodársky okrajových regiónov. *T. dicoccum* bola prvou poľnohospodárskou plodinou domestikovanou v neolite v juhovýchodnej časti dnešného Turecka (ÖZKAN a kol., 2002), a iniciovala tak prechod ľudskej spoločnosti z lovecko-zberačského na usadlý, poľnohospodársky spôsob života. Dôsledkom tejto zmeny bol fenomén neolitickej revolúcie a následné migračné vlny obyvateľstva, ktoré postupne osídľovali územia v Európe, Afrike a Ázii, nesúc so sebou myšlienku poľnohospodárstva spolu s pšenice dvojzrnovou a ďalšími plodinami. *T. dicoccum* je zároveň ako donor AABB genómov predkom pokročilých foriem pšeníc (*Triticum aestivum* L.) (NESBITT a SAMUEL, 1996) a patrí teda medzi ich primárne genetické zdroje.

Cieľom tejto práce bolo diferencovať súbor genotypov *T. dicoccum* (pochádzajúcich z rôznych krajín ich tradičného pestovania) na základe DNA polymorfizmov, stanoviť hodnoty genetickej diverzity a tým odhaliť fylogenetické vzťahy medzi jednotlivými genotypmi pšenice dvojzrnovej. Zvláštnu pozornosť sme venovali slovenským zástupcom *T. dicoccum* a ich taxonomickej príslušnosti. Na tieto účely sme zvolili metódu RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ktorá bola úspešne použitá na stanovenie genetickej diverzity divých populácií *T. dicoccoides* (FAHIMA a kol., 1999).

Metóda RAPD (WILLIAMS a kol., 1990) je založená na polymerázovej reťazovej reakcii, pričom využíva krátke, iba 9-10 nukleotidové primery, ktorých sekvencia nie je odvodená od žiadnej známej DNA sekvencie skúmaného genómu. V jednej reakcii je použitý len jeden primer, ktorý pri aneláčnej teplote zníženej až na 36°C nasadá na neznáme lokusy v kódujúcich aj nekódujúcich regiónoch a v prípade, že dva primery nasadnú na templátovú molekulu DNA v amplifikovateľnej vzdialenosti, tvoria sa anonymné produkty rôznych dĺžok. Variabilita medzi jedincami v RAPD profiloch je väčšinou dôsledkom substitúcií alebo inzercii/delécií, ktoré modifikujú alebo eliminujú miesto pre hybridizáciu primeru. Ďalším zdrojom polymorfizmov môžu byť inzercie, ktoré posunú miesta pre primery do vzdialenosti, ktorá už nie je amplifikovateľná, alebo tiež inzercie/delécie, ktoré zmenia dĺžku DNA segmentu bez obmedzenia jeho amplifikácie (WILLIAMS a kol., 1990). Vo väčšine prípadov sú RAPD markery dominantné, tzn. fragment je buď prítomný (u dominantných homozygótov a heterozygótov), alebo nie je prítomný (u recesívnych homozygótov), heterozygótny stav teda nie je odlišiteľný.

Materiál a metódy

V tabuľke 1 sú uvedené vybrané genotypy *T. dicoccum*, ktoré boli podrobené RAPD analýzám. Z 5 – 10 dňových, v tme rastúcich klíčkov sme izolovali celkovú DNA použitím CTAB extrakčnej metódy podľa DOYLE and DOYLE (1990) s malými modifikáciami.

Optimalizovaná RAPD-PCR reakčná zmes (25 µl) pozostávala z 10 ng templátovej DNA, 1x PCR pufru (Qiagen), 25 mmol. l⁻¹ MgCl₂ (Qiagen), 100 ng 10-nukleotidového primeru (OPA-3, OPA-12, OPA-19, OPA-20 a OPF-15, Operon Biotechnologies), 0,4 mmol.l⁻¹ dNTP Mix (Fermentas) a 1,0 U Taq polymerázy (Hot Star, Qiagen). PCR program pozostával z 15 min úvodnej denaturácie pri 95°C, 45 cyklov (1 min denaturácia pri 94°C, 2 min annealing pri 37°C, 2 min polymerizácia pri 72°C) a 8 min záverečnej polymerizácie pri 72°C. Reakcie boli prevedené v termocykléri Whatman Biometra. 12 µl produktov PCR amplifikácie bolo separovaných na 1,4% agarózovom géli v elektrolyte TAE 3,5 h pri konštantnom prúde 70 V a fragmenty boli

detekované etídium bromidom. V snahe otestovať reprodukovateľnosť výsledkov bola PCR amplifikácia zopakovaná pre každý primer a každý genotyp minimálne dvakrát.

Výsledky získané z elektroforetogramov boli prevedené do binárnej matice. U každého genotypu bola prítomnosť jednotlivých bandov označená ako (1), ich neprítomnosť ako (0), tzn. boli hodnotené ako lokusy s dvoma alternatívnymi prejavmi. Stupeň genetickej podobnosti resp. evolučných odlišností pre všetky dvojice hodnotených genotypov bol vypočítaný v programe DistAFLP pomocou Jaccardovho koeficientu. Pri klastrovej analýze bola použitá metóda Neighbour-Joining (SAITOU a NEI, 1987) v programe PHYLIP (FELSENSTEIN, 1999-2000). Výstupné dáta boli v programe TreeView (PAGE, 2000) prevedené na kladogramy, fylogramy a radiálne stromy.

Výsledky a diskusia

V porovnaní s inými metódami detekcie polymorfizmov u blízko príbuzných taxónov je prednosťou techniky RAPD relatívne nízka cena analýz, rýchlosť, jednoduchosť a malé nároky na laboratórne vybavenie. Najzávažnejšou nevýhodou tejto metódy je slabá reprodukovateľnosť výsledkov (Jones a kol., 1997), ktorá môže byť ovplyvnená čistotou templátovej DNA, podmienkami PCR reakcie, typom polymerázy, typom termocykléra atď. Preto sme uskutočnili sériu optimalizačných experimentov v snahe (i) dosiahnuť čo najvyššiu reprodukovateľnosť výsledkov PCR amplifikácie a súčasne (ii) zachovať vysoký počet amplifikovaných fragmentov, ich intenzitu a vzájomnú rozlíšiteľnosť. Testované boli zmeny prakticky pri všetkých krokoch RAPD analýzy: (i) spôsob izolácie templátovej DNA, (ii) podmienky PCR (rôzne koncentrácie Taq polymerázy, templátovej DNA, kationov horčička, dNTP a primerov), (iii) počet cyklov RAPD reakcie a dĺžka jednotlivých krokov PCR, (iv) hustota agarózového gélu, výška elektrického prúdu a časový interval pri elektroforetickej separácii fragmentov. Optimalizáciou podmienok PCR sme dosiahli uspokojivú reprodukovateľnosť RAPD profilov.

Každý z piatich použitých primerov amplifikoval úseky z niekoľkých lokusov u každého analyzovaného genotypu *T. dicoccum*. Všetky primery produkovali v skúmanom súbore bandy monomorfné i polymorfné (obr. 1). Jednotlivé RAPD primery generovali v celom súbore 7-12 maximálne reprodukovateľných bandov, resp. 14-18 bandov s rôznou reprodukovateľnosťou, intenzitou a ostrosťou. PCR produkty variovali v dĺžkach od 110 bp po 2200 bp, pričom produkty s veľkosťou pod 350 bp a nad 2000 bp poskytovali väčšinou slabé bandy s nižšou reprodukovateľnosťou. Použitím piatich primerov sme získali produkty zo 79 RAPD lokusov, z ktorých bolo 45 polymorfných (56,96%) a 34 monomorfných (43,04%).

Pri vyhodnotení všetkých RAPD lokusov sme získali hodnoty genetickej vzdialenosti v rozsahu 0,018 – 0,344 (tab. 2). Najvyššiu genetickú vzdialenosť sme zistili medzi genotypmi TRI 9754 (India) a CGN08354 (Izrael), ale podobne vysoké genetické vzdialenosti (0,343) sú aj medzi genotypmi CGN10426 (býv. Juhoslávia) a TRI 17204 (Taliansko) a medzi TRI 11293 (Slovensko) a TRI 17204 (Taliansko). Najnižšie odhalené genetické vzdialenosti (0,018) boli medzi genotypmi TRI 11283 (Slovensko) a TRI A5100 (býv. Juhoslávia) a medzi TRI 5329 (Švajčiarsko) a CGN08104 (Izrael). Maximálne a minimálne hodnoty genetickej vzdialenosti slovenských dvojzrníkov vzhľadom k jednotlivým genotypom ukázali, že slovenské pšenice dvojzrnové nepatria k typicky európskemu materiálu a sú geneticky bližšie k suprakonvariete *asiaticum*.

Získané dendrogramy (obr. 2) je možné rozdeliť na dve časti, ktoré môžeme považovať za základné klastre. V prvom klastri nachádzame zástupcu supraconvar. *abyssinicum* (CGN07975) z Etiópie spolu s indickou dvojzrnkou TRI 9754 a zástupcov supraconvar. *asiaticum* TRI 6158 (Irán), TRI 17023 (Turecko) spolu s genotypom TRI 445 (USA). V rámci tohto klastra je vždy prítomný aj podklaster so slovenskými genotypmi (TRI 11283, TRI 11293) a dvojzrnkami z bývalej Juhoslávie (TRI A5100, CGN10426), čím sa potvrdzuje jednak príslušnosť slovenského materiálu ku konvariete *serbicum* a tiež príslušnosť konvariety *serbicum* k supraconvar. *asiaticum*. Tento klaster, ktorý môžeme označiť ako „východný“, zahŕňa dvojzrnky zdieľajúce relatívne vzdialených najbližších spoločných predkov a tvoriace najstaršie fylogenetické vetvy evolučných stromov, preto ich považujeme za pôvodnejšie. Z výsledkov je čitateľná nasledovná evolučná línia: najskôr došlo k odčleneniu materiálu, ktorý pretrval na území Iránu, vzápätí sa odčlenila ďalšia vetva, ktorá pokračovala až do Etiópie. Z toho istého spoločného predka sa odpájajú genotypy z Turecka a línia, ktorá dáva základ konvariete *serbicum*. Druhý klaster, ktorý sme označili ako „západný“, zahŕňa dvojzrnky zo supraconvar. *dicoccon*, ktoré predstavujú typický európsky materiál [TRI 2883 (Nemecko), TRI 18201 (Francúzsko), TRI 17700 (Španielsko), TRI 17204 (Taliansko), TRI 5329 (Švajčiarsko), TRI 11486 (Rakúsko), CGN08351 (Nemecko), CGN07976 (Nemecko)]. K nim sa však pomerne jednoznačne priradili aj genotypy z Izraela (CGN08354, CGN08104) a Kuvajtu (TRI 3432) a do tohto klastra spadá aj marocká dvojzrnka (CGN12281), zástupca supraconvar. *maroccanum*. Vo všeobecnosti, „západný“ klaster je mladší, obsahuje genotypy navzájom príbuznejšie a viac premiešané. Niektoré vzájomné vzťahy však naznačujú súvislosť stredomorských dvojzrníkov z Francúzska, Maroka, Španielska a Talianska.

Keďže slovenské dvojzrnky majú vzhľad pôvodných foriem z Malej Ázie a súčasne ich spoloční predkovia v získaných dendrogramoch sú relatívne vzdialení, považujeme oba slovenské genotypy za pôvodný materiál, ktorého reliktné pestovanie na našom území pretrvalo od obdobia neolitu až do druhej polovice minulého storočia.

Záver

Metóda RAPD je po dôkladnej optimalizácii vhodná na štúdium genetickej diverzity tetraploidných pšeníc. Požitím malého počtu primerov sa nám podarilo diferencovať celý súbor, potvrdiť taxonomické zaradenie slovenských genotypov a odhaliť vzájomné fylogenetické vzťahy v rámci poddruhu *dicoccum*.

Genetický základ v súčasnosti kultivovaných pšeníc je relatívne úzky. Dôvodom je extenzívny inbreeding spôsobený autogamným rozmnožovaním pšeníc, ale tiež pomerne nedávny vznik súčasných foriem a tzv. *bottleneck* efekt, ktorým prešli počas domestikácie. Redukovaná diverzita pestovaných pšeníc ich robí náchylnejšími k ochoreniam, pesticidom a rôznym environmentálnym stresom. (JOSHI a NGUYEN, 1993). Introgresia nových želaných vlastností z predkov moderných pšeníc je preto veľkým príslubom pre šľachtiteľstvo, pričom práve pšenica dvojnásobná môže prispieť niekoľkými cennými vlastnosťami. Potreba štúdia jej genetickej diverzity je zdôraznená aj tým, že dostupnosť genetickej variability vo vybranom materiáli je podmienkou pre každý šľachtiteľský program zameraný na zlepšenie produktivity pšenice.

Literatúra

1. DOYLE, J.J. – DOYLE, J.L.: Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15, 1990.
2. FAHIMA, T. – SUN, G.L. – BEHAREV, A. – KRUGMAN, T. – BEILES, A. – NEVO, E.: RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. In *Theor. Appl. Genet.* 98: 434-447, 1999.
3. FELSENSTEIN, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Manual Version 3.6 (Department of Genetics, Washington Univ., Seattle), 1999-2000. Distributed by the author. Available at <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/intro-uk.html>
4. JONES, C.J. – EDWARDS, K.J. – CASTAGLIONE, S. – WINFIELD, M.O. – SALA, F. – VAN DE WIEL, C. – BREDEMEIJER, G. – VOSMAN, B. – MATTHES, M. – DALY, A. – BRETTSCHEIDER, R. – BETTINI, P. – BUIATTI, M. – MAESTRI, E. – MALCEVSCHI, A. – MARMIROLI, N. – AERT, R. – VOLCKAERT, G. – RUEDA, J. – LINACERO, R. – VAZQUEZ, A. – KARP, A.: Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390, 1997.
5. JOSHI, C.P. – NGUYEN, H.T.: Application of random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. *Genome* 36: 602-609, 1993.
6. NESBITT, M. – SAMUEL, D.: From staple crop to extinction? The archeology and history of the hulled wheats. In: *Hulled wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.* 4. PADULOSI, S. – HAMMER, K. – HELLER, J. (eds). *Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats, 21-22 July 1995, Castelvecchio Pascoli, Tuscany, Italy.* International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, str. 40-99, 1996.
7. ÖZKAN, H. – BRANDOLINI, A. – SCHÄFER-PREGL, R. – SALAMINI, F.: AFLP analysis of collection of tetraploid wheats indicates the origin of emmer and hard wheat domestication in southeast Turkey. *Mol. Biol. Evol.* 19(10): 1797-1801, 2002.
8. PAGE, R.D.M.: TreeView for Win 16 (Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK), 2000. Distributed by the author. Available at <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
9. SAITOU, N. – NEI, M.: The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425, 1987.
10. WILLIAMS, J.G.K. – KUBELIK, R.A. – LIVAK, K.J. – RAFALSKY, J.A. – TINEY, S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535, 1990.

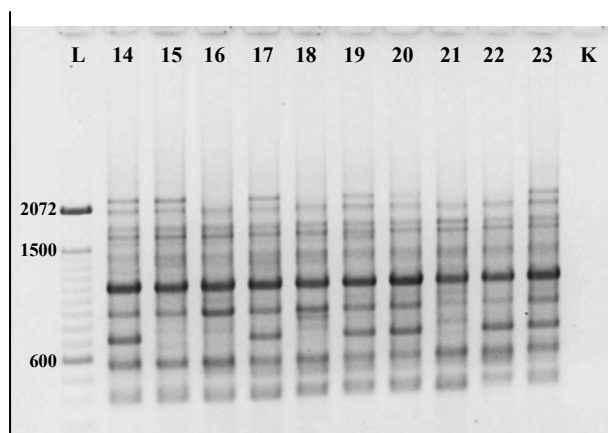
Adresy autorov:

Mgr. Peter Cíváň, RNDr. Miroslav Švec, CSc., RNDr. Katarína Mikulová, Katedra genetiky PriF UK, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, civomale@pobox.sk
RNDr. Tomáš Kuchta, CSc., RNDr. Peter Siekel, CSc., VÚP, Priemyselná 4, P.O.Box 25, 824 75 Bratislava 26

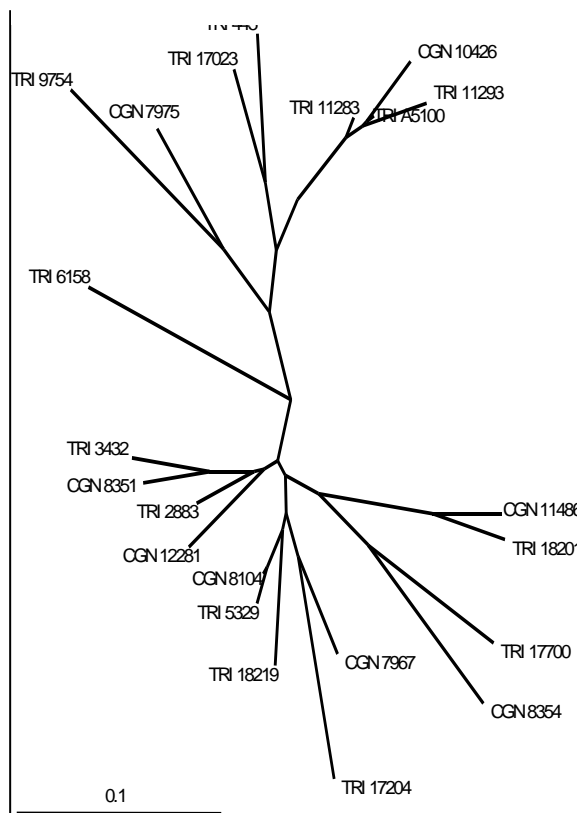
Tabuľka 1: Koefficienty genetických vzdialeností (Jaccard) pre všetky dvojice analyzovaných genotypov *T. dicoccum* pri hodnotení všetkých RAPD lokusov

	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.
1. TRI 11293	0.053	0.071	0.036	0.230	0.242	0.213	0.217	0.230	0.246	0.286	0.230	0.302	0.288	0.254	0.169	0.343	0.270	0.254	0.197	0.286	0.266
2. TRI 11283		0.053	0.018	0.210	0.194	0.222	0.226	0.180	0.197	0.266	0.180	0.281	0.242	0.206	0.119	0.299	0.250	0.234	0.148	0.238	0.219
3. CGN 10426			0.036	0.230	0.242	0.242	0.246	0.230	0.217	0.258	0.230	0.302	0.288	0.254	0.169	0.343	0.297	0.281	0.197	0.258	0.266
4. TRI A5100				0.197	0.210	0.210	0.213	0.197	0.213	0.254	0.197	0.297	0.258	0.222	0.136	0.313	0.266	0.250	0.164	0.254	0.234
5. CGN 8351					0.088	0.183	0.186	0.071	0.246	0.200	0.105	0.217	0.148	0.226	0.258	0.210	0.153	0.103	0.254	0.230	0.086
6. TRI 2883						0.167	0.169	0.088	0.230	0.183	0.088	0.200	0.131	0.180	0.213	0.164	0.103	0.086	0.210	0.153	0.069
7. CGN 11486							0.071	0.183	0.312	0.183	0.183	0.200	0.131	0.266	0.213	0.222	0.197	0.150	0.238	0.270	0.164
8. TRI 18201								0.186	0.290	0.217	0.186	0.203	0.164	0.242	0.217	0.226	0.200	0.153	0.242	0.246	0.167
9. TRI 3432									0.246	0.230	0.105	0.186	0.148	0.226	0.230	0.210	0.183	0.136	0.254	0.200	0.119
10. TRI 9754										0.302	0.246	0.344	0.303	0.153	0.186	0.333	0.258	0.270	0.213	0.274	0.254
11. TRI 17700											0.138	0.155	0.206	0.281	0.286	0.210	0.183	0.197	0.308	0.286	0.180
12. CGN 12281												0.155	0.148	0.197	0.200	0.180	0.121	0.136	0.254	0.200	0.119
13. CGN 8354													0.222	0.270	0.328	0.254	0.230	0.183	0.323	0.274	0.197
14. CGN 7967														0.231	0.206	0.129	0.131	0.083	0.231	0.206	0.067
15. CGN 7975															0.226	0.288	0.210	0.194	0.194	0.254	0.177
16. TRI 17023																0.266	0.242	0.254	0.103	0.230	0.238
17. TRI 17204																	0.164	0.148	0.288	0.238	0.131
18. TRI 18219																		0.086	0.238	0.213	0.069
19. TRI 5329																			0.222	0.197	0.018
20. TRI 445																				0.226	0.206
21. TRI 6158																					0.180
22. CGN 8104																					

Obrázok 1: Amplifikačné produkty generované primerom OPA-19. Dráhy: 14 CGN07967; 15 CGN07975; 16 TRI 17023; 17 TRI 17204; 18 TRI 11283; 19 TRI 18219; 20 TRI 5329; 21 TRI 445; 22 TRI 6158; 23 CGN08104; K negatívna kontrola; L štandard molekulových hmotností (100 bp)



Obrázok 2: Radiálny dendrogram získaný z dát na všetkých 79 RAPD lokusoch súboru *T. dicoccum*. Použitý bol Jaccardov koeficient a Neighbour-Joining klastrovacia metóda. Krajiny pôvodu jednotlivých genotypov *T. dicoccum* sú uvedené v texte.



STRUKOVINY AKO ZDROJ ZDRAVIU PROSPEŠNÉHO ŠKROBU LEGUMEN AS SOURCE OF HEALTH-PROMOTING STARCH

Daniela MIKULÍKOVÁ - Ján KRAIC - Oľga HORŇÁKOVÁ - Michaela BENKOVÁ

The content of retrograded resistant starch RS₃ and total starch has been determined in 74 accessions of 6 current legumen in human food. There were significant differences in individual crops and their accessions too. All analysed legumen besides soya bean are too suitable natural source of health-promoting RS₃. The supreme levels of RS₃ were found in peas. There were extensive differences in resistant and total starch in the later crop accessions. In wrinkle seed peas, higher resistant and lower total starch were found. Maximal RS₃ content was detected in Citrad, Dinara, Royal Salute and Elkan. In smooth seed peas, lower resistant and higher total starch was estimated. In lentils were also ascertained high RS₃ levels, especially in L.C.M.B. 12/58 and L.C.M.B. 1941 68/58. There were similar RS₃ values in chickpea, faba bean and kidney bean. The most of RS₃ was determined in kidney bean Ultima, Fabia, 545/97 47/2 and 545/97 453/2, chickpea Alfa, CM-7-1/85, BG 004233, PK 51814 and 88193 and faba bean Alfréd and Omar. No soya bean accession was suitable RS₃ source.

Key words: resistant starch, pea, lentil, kidney bean, faba bean, chickpea, soya bean

Úvod

Myšlienka, že strava ovplyvňuje zdravie človeka, je veľmi stará. Už Hippocrates (460-377 pred n.l.) vo svojich medicínskych spisoch píše: „Každá zložka potravy pôsobí na ľudské telo a mení ho. Od týchto zmien závisí celý ďalší život človeka – či bude zdravý, chorý alebo sa uzdraví. Nech je strava vašim liekom!”

Predstavy o funkcii potravy v ľudskom živote sa postupne menili. V minulosti sa zdôrazňovala funkcia utišenia hladu a zachovania života. Neskôr sa zistilo, že pri absencii alebo zníženom množstve klasických živín vznikajú choroby. V súčasnosti sa venuje pozornosť potravinám, ktoré upevňujú zdravie a dobrú kondíciu konzumenta.

Počas posledných desaťročí narástli poznatky o vplyve výživy na zdravie a dobrú kondíciu. Tieto vplyvy sa dávajú do súvislosti ku konkrétnymi zložkami potravy. Na základe nových poznatkov možno navrhovať nové zdravšie potraviny, tzv. *funkčné potraviny*. Funkčné potraviny dnes patria v Japonsku, USA, Kanade i v Európe k najdiskutovanejším témam v oblasti výživy. Myšlienka vyvíjať potraviny, ktorých pravidelnou konzumáciou by sa zamedzilo vzniku ochorení, vznikla v 80. rokoch minulého storočia v Japonsku. Európsky výskum sa nimi zaoberá v rámci výskumných programov sponzorovaných Európskou komisiou už asi 10 rokov. Výskum funkčných potravín sa zaoberá vedeckým zdôvodnením vplyvu ich konkrétnych funkčných zložiek na zdravie a výrobou funkčných potravín alebo funkčných potravinových zložiek. V rámci 4. a hlavne 5. rámcového programu Európskej komisie sa zahájilo riešenie viac než 50 rozsiahlych projektov, ktoré sa zaoberajú vplyvom funkčných potravín na civilizačné choroby, najmä na kardiovaskulárne a onkologické.

Funkčné potraviny sú definované ako potraviny, ktoré majú okrem svojej nutričnej (výživovej) hodnoty pozitívny vplyv na zdravie človeka, na jeho duševnú sviežosť alebo fyzickú výkonnosť. Sú to potraviny s vyšším obsahom zložiek s preukazne priaznivým účinkom na zdravie alebo s nižším obsahom zložiek s negatívnym účinkom. Funkčné potraviny musia ostať potravinami a priaznivé účinky musia vykazovať v dávkach, ktoré sa predpokladá bežne skonzumovať. Hlavné triedy ingrediencií s priaznivým účinkom patria celosvetovo (Food Group, Dánsko). Patria k nim probiotiká, prebiotiká, vitamíny, minerály, antioxidanty, proteíny, peptidy, aminokyseliny, masné kyseliny a fytochemikálie. K eliminovaným zložkám patria potravinové alergény, patogénne mikroorganizmy, mykotoxíny, zvyšky pesticídov a toxické kovy.

K novšie objaveným zložkám, ktoré prispievajú k upevneniu zdravia, patrí rezistentný škrob. Pre jeho priaznivý vplyv na fyziológiu trávenia sa zaraďuje medzi novú generáciu diétnej vlákniny ako prebiotikum. ENGLYST et al. (1992) ho definujú ako škrob a jeho degradačné produkty, ktoré zdravý človek nie je schopný absorbovať v tenkom čreve. Ne strávený škrob prechádza z tenkého čreva do hrubého, kde je fermentovaný črevnou mikroflórou. Vznikajú pri tom nasýtené monokarboxylové kyseliny s krátkym reťazcom (SCFAs) – butyrát, propionát a acetát a plyny – vodík, CO₂ a metán. RS je fermentovaný mnohými črevnými baktériami, najmä *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. a *Fusobacterium* spp. Pri optimalizovanej črevnej mikroflóre má RS prostredníctvom SCFAs priaznivé účinky na diabetes mellitus 2 typu (nezávislý od inzulínu), na fyziológiu trávenia, na karcinogénu a na koncentráciu cholesterolu a triacylglycerolov v krvi.

Existujú 4 typy rezistentného škrobu. Typ RS₁ je prirodzene fyzicky nedostupný degradácii amylytickými enzýmami tráviaceho traktu (napr. nahrubo pomleté semená). Typ RS₂ má primárnu štruktúru a konformáciu, ktoré spôsobujú jeho odolnosť proti degradácii (mutanty s vysokým obsahom amylozy alebo zelené banány a surové zemiaky). Typ RS₃ vzniká pri bežnej úprave potravín varením, pečením alebo zmrazovaním. Typ RS₄ je chemicky modifikovaný škrob esterifikáciou alebo priečnymi väzbami.

V zahraničí je rezistentný škrob dostupný buď ako samostatný výživový doplnok alebo vo funkčných potravinách (pekárenské výrobky, cestoviny, nutričné tyčinky, raňajkové cereálie, jogurty, nápoje, instantné

polievky a omáčky). Ako zdroj RS vo funkčných potravinách sa využíva typ RS₂ z geneticky modifikovaných odrôd jačmeňa alebo kukurice, prípadne chemicky modifikovaný typ RS₄.

U nás zatiaľ nie je rezistentný škrob dostupný ani ako výživový doplnok ani vo forme funkčných potravín. Vzhľadom na významný ochranný účinok RS proti onkologickým a kardiovaskulárnym chorobám sme hľadali jeho prirodzené prírodné zdroje. Pri ich hľadaní sme využili literárne údaje, podľa ktorých obsah RS závisí od množstva amylozy a práve strukoviny majú prirodzene vyšší obsah amylozy než obilniny alebo pseudoobilniny. Navyše sme zámerne vybrali kolekciu hrachu tak, aby obsahovala poľný aj záhradný hrach a aby sme ich mohli navzájom porovnať. Poľný hrach má guľatý tvar semien a záhradný hrach má zvráskavený povrch semien. Mutácia na *R* lokuse totiž spôsobuje stratu enzýmovej aktivity vetviaceho enzýmu škrobu (SBEIIb). Tieto mutanty majú v škrobe vyšší obsah amylozy. V dôsledku toho dochádza k zmene osmotického tlaku a k zvráskaveniu semien. Zmenená štruktúra škrobu sa prejaví aj v zmenených fyzikálno-chemických vlastnostiach.

Cieľom štúdie bol screening 6 druhov strukovín, ktoré sa bežne používajú v humánnej výžive a pri príprave pokrmov sa upravujú tak, že sú vytvorené podmienky pre retrogradáciu, pri ktorej rezistentný škrob typu RS₃ vzniká.

Materiál a metódy

Semená vzoriek 74 genotypov 6 druhov strukovín boli z oddelenia genetických zdrojov Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch. Boli dopestované r. 2003 v lokalite Piešťany. Analyzovalo sa 14 genotypov fazule záhradnej (*Phaseolus vulgaris* L.), 20 genotypov hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), 11 genotypov šošovice jedlej (*Lens esculenta* Moench), 16 genotypov cícera baranieho (*Cicer arietinum* L.), 5 genotypov bôbu obyčajného (*Vicia faba* L. partim) and 8 genotypov sóje fazuľovej (*Glycine max* (L.) Merrill).

Šrot sa hydrotermálne opracoval kvôli vytvoreniu rezistentného škrobu (SKRABANJA et al., 1998). Obsah rozpustného, rezistentného a celkového škrobu sa stanovil kitmi Resistant Starch Assay Kit a Resistant starch Control Kit (Megazyme Int., Ireland) podľa McCLEARY et al. (2002). Metóda je akceptovaná spoločnosťami AOAC a AACC. Ako kontrola sa použila firemná vzorka s obsahom 4,7% rezistentného škrobu a interné kontrolné vzorky pre každý rastlinný druh: fazuľa Fabia, hrach Gloriosa, šošovica Renka, cícer Slovák, bôb Omar a sója Balkan. Hodnoty obsahu jednotlivých škrobov sa v kontrolných vzorkách stanovili ako aritmetický priemer zo 6 paralelných stanovení v 2 rôznych dňoch. Presnosť a opakovateľnosť stanovení bola na dobrej úrovni.

Hodnoty škrobov v jednotlivých genotypoch sa určovali ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka. V rámci druhu sa genotypy štatisticky hodnotili analýzou rozptylu. Vzťah medzi obsahom rezistentného a celkového škrobu sa v hrachu siatom hodnotil pomocou korelačného koeficientu.

Výsledky a diskusia

Strukoviny (okrem sóje) majú v porovnaní s obilninami a pseudoobilninami viac rezistentného a menej celkového škrobu (MIKULÍKOVÁ et al., 2005). Aj v literatúre sa uvádza, že škroby strukovín obsahujú viac amylozy než škroby obilnín alebo pseudoobilnín. Obsah rezistentného škrobu v g/100g šrotu v nich bol nasledovný: hrach 8,27 ± 1,73, šošovica 6,27 ± 0,20, fazuľa 5,51 ± 0,28, bôb 5,44 ± 0,28, cícer 5,24 ± 0,29 a sója 0,28 ± 0,04. Množstvo celkového škrobu v g/100g dwb klesalo v poradí: šošovica 52,59 ± 1,61, cícer 47,46 ± 2,54, bôb 44,10 ± 1,03, fazuľa 43,50 ± 2,69, hrach 38,88 ± 8,45 a sója 5,73 ± 0,48. Podiel rezistentného k celkovému škrobu bol: hrach 21,27%, fazuľa 12,67%, bôb 12,34%, šošovica 11,92%, cícer 1,04% a sója 4,88%.

Hrach mal zo všetkých strukovín najviac rezistentného škrobu. V tomto rastlinnom druhu sa zistila veľká variabilita v obsahu rezistentného i celkového škrobu. Hrachy sa rozdelili do dvoch skupín: na guľatosemenné (hrach siaty) a na hrachy so zvráskaveným povrchom semien (hrach siaty pravý). Zistil sa medzi nimi významný rozdiel v obsahu RS i celkového škrobu. Divý typ hrachu s guľatým tvarom semien mal vyšší obsah celkového škrobu (47,92 ± 0,80 g/100g) a nižší obsah rezistentného škrobu (6,46 ± 0,55 g/100g). Podiel RS k celkovému škrobu v ňom bol 13,48 ± 1,09 %. Typ hrachu so zvráskaveným povrchom semien mal však podstatne vyšší obsah RS (9,76 ± 0,22 g/100g) a nižší obsah celkového škrobu (31,01 ± 0,95 g/100g). Podiel RS k celkovému škrobu v tomto súbore bol 31,01 ± 0,95 %. V kolekcii všetkých genotypov hrachu sa zistila významná negatívna korelácia medzi obsahom rezistentného a celkového škrobu. Hodnota korelačného koeficientu (*r*) bola *r* = - 0,9557. Výsledky sú v zhode s pozorovaniami iných autorov, ktorí zistili, že pokles podielu amylopektínu sa prejaví znížením množstva celkového škrobu (HÝBL et al., 2001).

Už r. 1865 Johann Gregor Mendel zistil, že divý typ hrachu je guľatosemenný a je homozygotom pre dominantnú alelu *R* (rugosus). Mutant obsahuje recesívnu alelu *r*, ktorá spôsobuje zvráskavenie semien hrachu. Guľatosemenné sú homozygoty *RR* alebo heterozygoty *Rr*, zvráskavené sú iba homozygoty *rr*. Až po vyše 100 rokoch sa zistilo, že mutanty *rr* majú modifikovaný škrob, preto dochádza k zmene osmotického tlaku. Dnes je známe, že mutácia na *R* lokuse spôsobuje stratu enzýmovej aktivity vetviaceho izoenzýmu SBEIIb, ktorý prednostne vetví amylopektín (BURTON et al., 1995). Mutácia na tomto lokuse spôsobuje zníženie množstva amylopektínu i celkového škrobu. Mutanty obsahujú viac amylozy, takmer iba

B-typ škrobových granúl a majú zvráskavené semená. Zmena v zložení škrobu sa prejaví aj vo fyzikálno-chemických vlastnostiach – najmä v zmenenej rozpustnosti, napučíavaní, želatinizácii, retrogradácii a stráviteľnosti škrobu (BOGRACHEVA et al., 1999; SKRABANJA et al., 1999).

Hrach je veľmi vhodným prirodzeným zdrojom zdraviu prospešného škrobu, najmä typ so zvráskaveným povrchom semien. Najvyšší obsah rezistentného škrobu sa zistil v genotypoch Ctirad, Dinara, Royal Salute a Elkan.

Vysoký obsah RS sa zistil aj v šošovici, najmä v kultivaroch L.C.M.B.12/58 a L.C.M.B.1941/68/58. Šošovica obsahuje najviac celkového škrobu zo všetkých hodnotených strukovín. Variabilita v obsahu rezistentného i celkového škrobu v šošovici je pomerne nízka.. Výsledky so zrovnateľné s pozorovaniami iných autorov (TOVAR et al., 1992). JENKINS et al. (2000) opísali zdraviu človeka prospešné účinky šošovice, aké sa pripisujú rezistentnému škrobu.

Množstvo RS vo fazuli je nižšie ako v hrachu a v šošovici Je však podobné ako v bôbe a ciceri. Vo fazuli sa zistila vyššia variabilita obsahu RS než v šošovici, bôbe a ciceri. Najvyšší obsah RS sa našiel v týchto genotypoch fazule: Ultima, Fabia, 545/97 47/2 a 331/97 453/2.

Z genotypov bôbu mali najviac rezistentného škrobu genotypy Alfréd a Omar.

Nezistili sa významné rozdiely v obsahu RS ani celkového škrobu medzi Kabuli, Desi a Intermediate cicerom. Najviac RS mali genotypy Alfa, CM-7-1/85, BG 004233, PK 51 814 a 88 193.

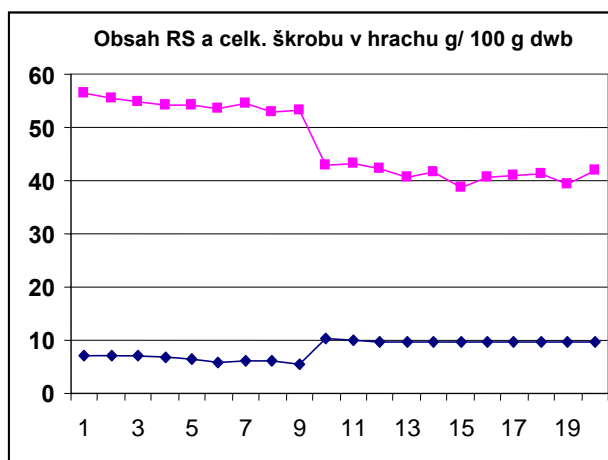
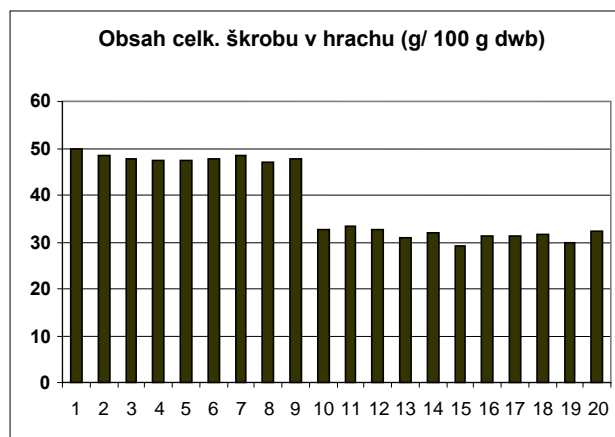
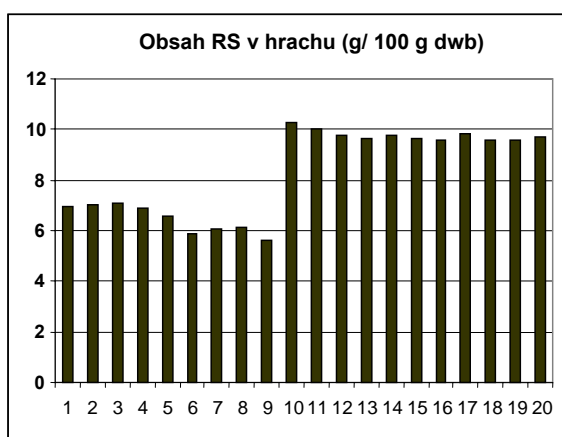
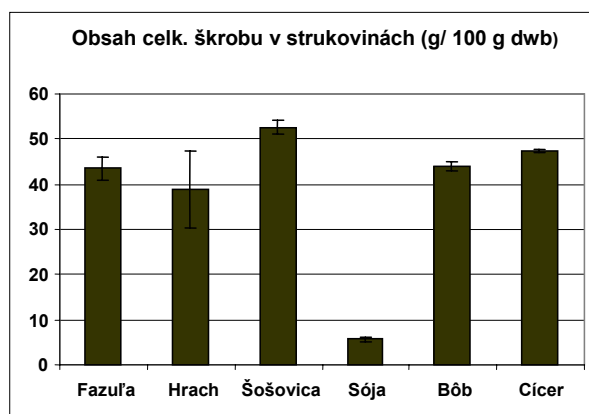
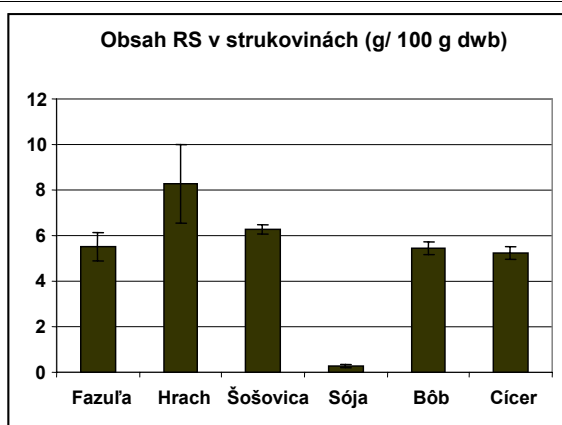
Sója sa obsahom i zložením škrobu veľmi líši od ostatných hodnotených strukovín. Množstvo celkového škrobu je veľmi nízke, menej než 10 g/100g šrotu. Obsah rezistentného škrobu v sóji je zanedbateľný - pohybuje sa na dolnej hranici citlivosti stanovenia kitu. Prevažnú časť semien sóje tvoria bielkoviny a lipidy.

Záver

Strukoviny možno hodnotiť ako veľmi vhodný prírodný zdroj zdraviu prospešného rezistentného škrobu. Ich škroby majú vysoký obsah amylózy, z ktorej RS retrogradáciou vzniká. Najvyšší obsah RS sa zistil v týchto druhoch a ich genotypoch: **hrach** - všetky so zvráskaveným povrchom semien, najmä však Ctirad a Dinara, **šošovica** L.C.M.B.12/58, L.C.M.B.1941 68/58, **fazuľa** Ultima, Fabia, 545/97 47/2 a 331/97 453/2, **cícer** CM-7-1/85, Alfa, PK 51 814, BG 004233 a 88 193 a **bôb** Alfréd a Omar.

Literatúra

1. BOGRACHEVA, T.Y. – CAIRNS, P. – NOEL, T.R. – HULLEMAN, S. – WANG, T.L. – MORRIS, V.J. – RING, S.G. – HEDLEY, C.L.: The effect of mutant genes at the *r*, *rb*, *rug3*, *rug4*, *rug5* and *lam* loci on the granular structure and physico-chemical properties of pea seed starch. Carbohydr. Polymers, 39, 1999, s. 303-314.
2. BURTON, R.A. – BEWLEY, J.D. – SMITH, A.M. – BHATTACHARYYA, M.K. – TATGE, H. – RING, S. – BULL, V. – HAMILTON, W.D.O. – MARTIN, C. (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. In: Plant J., 7, 1995, s. 3-15.
3. ENGLYST, H.N. – KINGMAN, J.H. – CUMMINGS, J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fraction. In: Eur. J. Clin. Nutr., 46, 1992, s. 33-50.
4. HÝBL, M. – URBAN, J. – VÁCLAVÍKOVÁ, J. – GRIGA, M.: Evaluation of a collection of pea genetic resources for seed starch, amylose/amylopectin and protein content. In: Czech J. Genet. Plant Breed., 37, 2001, s. 114-123.
5. JENKINS, D.J. – AXELSEN, M. – KENDALL, C.W.C. – AUGUSTIN, L.S.A. – VUKSAN, V. – SMITH, U.: Dietary fibre, lente carbohydrate and insulin-resistant disease. In: Br. J. Nutr., 83 (suppl.1), 2000, s. 157-163.
6. McCLEARY, B.V. – McNALLY, M. – ROSSITER, P.: Measurement of resistant starch by enzymic digestion in starch and selected plant materials: collaborative study. J. AOAC Internat., 85, 2002, s. 1003-1111.
7. MIKULÍKOVÁ, D. – ČIČOVÁ, I. – ANTALÍKOVÁ, G. – KRAIC, J. (2005). Content of resistant starch in grains of six undervalued plant species. In: Czech J. Genet. Plant Breed., 41, 2005, s. 96-104.
8. SKRABANJA, V. – LAERKE, H.N.: Effect of hydrothermal processing of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats on starch enzymatic availability in vitro and in vivo in rats. In: J. Cereal Sci., 28, 1998, 209-214.
9. SKRABANJA, V. – LILJEBERG, H.G.M. – HEDLEY, C.L. – KREFT, I. – BJÖRCK, I.M.E. : Influence of genotype and processing on the in vitro rate of starch hydrolysis and resistant starch formation in peas (*Pisum sativum* L.). In: J. Agricult. Food Chem., 47, 1999, s. 2033-2039.
10. TOVAR, J. – BJÖRCK, I.M. – ASP, N.G. (1992). Incomplete digestion of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fraction. In: J. Nutr., 122, 1992, s. 1500-1507.



Vypracovanie štúdie bolo umožnené v rámci štátnej úlohy výskumu a vývoja SP 27/028OE02/028OE02 „Kvalita, bezpečnosť a funkčnosť primárnych potravinových zdrojov.“

Adresa autora:
RNDr. Daniela Mikulíková, CSc., Doc. RNDr. Ján Kraic, PhD., Ing. Oľga Hornáková a Ing. Michaela Benková, Výskumný ústav rastlinnej výroby, 921 68 Piešťany, Bratislavská cesta 122. Telefón: 033/77 223 11, fax: 033/77 263 06.
(e-mail: mikulikova@vurv.sk, kraic@vurv.sk, hornak@vurv.sk, benkova@vurv.sk)

ROZŠÍRENIE CHARAKTERIZÁCIE GENETICKÝCH ZDROJOV FAZULE POMOCOU MIKROSATELITOV INCREASING OF CHARACTERIZATION OF GENETIC RESOURCES OF BEAN BY MICROSATELLITES

Michal ŠAJGALÍK - Oľga HORŇÁKOVÁ

We used microsatellite DNA markers to increase the characterization of genetic resources of bean maintained in Genebank of Slovak Republic, Piešťany. Plants are usually characterized by morphological markers which are limited by number of descriptors and level of polymorphism. Recently hundreds of microsatellites are known in many plant species and their number increases every day. Some of microsatellites are linked with agronomic traits as well as important genes.

Key words: microsatellites, common bean, genetic resources

Úvod

Čiastočné samozásobovanie obyvateľstva fazuľou zabezpečilo značné zachovanie jej genetickej diverzity ako v jednej z mála poľnohospodárskych plodín na Slovensku. V mnohých lokalitách sa dedia krajové odrody fazule z generácie na generáciu, čím popri ich využívaní dochádza ku konzervácii genetických zdrojov. Do kolekcie genetických zdrojov fazule udržiavanej na VÚRV Piešťany bolo k 31. 6. 2005 prijatých 1892 vzoriek a z toho je 955 vzoriek uchovaných v Génovej banke semenných druhov rastlín Slovenskej republiky, Piešťany. Vzorky sú charakterizované pomocou 33 morfológických a agronomických charakteristík rastlín a semien podľa deskriptoru *Phaseolus* L. (HORŇÁKOVÁ et al., 1991). Cenným rozšírením charakterizácie genotypov sú molekulárne analýzy. Polymorfizmus zásobných bielkovín a izoenzymov vo fazuli je nedostatočný a preto je efektívnejšie využívanie DNA analýz. V súčasnej dobe sú dostupné stovky mikrosatelitných markerov (SSR) pre rôzne druhy rastlín, pričom mnohé z nich sa nachádzajú v kódujúcej oblasti DNA, je známa ich chromozómová lokalizácia, úroveň polymorfizmu a v mnohých prípadoch sú vytvorené väzbové mapy s hospodársky významnými znakmi. Lokalizácia mikrosatelitov v EST (expressed sequence tags) a UTR (untranslated regions) oblastiach génov môže ovplyvňovať funkciu génu resp. jeho produktu (LI et al., 2004).

U človeka sú známe mnohé choroby zapríčinené zvýšením alebo znížením počtu repetícií v mikrosatelitoch. U rastlín nie sú tieto mechanizmy dostatočne preštudované. Súčasná charakterizácia rastlinných genotypov je prevažne založená na hodnotení anatomicke-morfologických znakov. Táto metóda je spoľahlivá, finančne nenáročná, ale čiastočne obmedzená počtom deskriptorov a polymorfizmom jednotlivých znakov. Výhoda využitia mikrosatelitných markerov na charakterizáciu genotypov spočíva v skutočnosti že mikrosatelity sú polymorfné, hojne sa vyskytujúce po celom genóme, ľahko hodnotiteľné, prístupné laboratóriám prostredníctvom publikovaných sekvencií primerov. V neposlednom rade výhodou DNA je nezávislosť od prostredia, možnosť identifikácie, diferenciacie, charakterizácie genotypov v každom ontogenetickom štádiu rastliny. Slabé využívanie genetických zdrojov v šľachtiteľských programoch je spôsobené nedostatočnou charakterizáciou jednotlivých vzoriek a preto treba úsilie v tejto oblasti zintenzívniť.

Materiál a metódy

Z kolekcie genetických zdrojov fazule, ktorá je udržiavaná na VÚRV Piešťany sme získali 88 genetických zdrojov fazule záhradnej (*Phaseolus vulgaris* L.), ktoré pochádzali zo zberových expedícií. Celkovú DNA sme izolovali z čerstvých mladých listov 10 rastlín kombináciou dvoch izolačných postupov DELLAPORTA et al. (1983) a GRANER et al. (1990). V databáze nukleotidových sekvencií GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sme vyhľadali DNA sekvencie fazule obsahujúce mikrosatelity (Tab. 1). On-line programom Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) sme navrhli špecifické primery pre analýzu dĺžkového polymorfizmu mikrosatelitov. Z literatúry YU et al. (1999, 2000) sme použili 7 párov publikovaných sekvencií mikrosatelitných primerov. Amplifikáciu sme uskutočnili v termocykleri PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, USA) v objeme 15 µl. Zloženie reakčnej zmesi: 10 mmol.l⁻¹ TRIS-HCl, pH 8,3, 50 mmol.l⁻¹ KCl, 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,15 µmol.l⁻¹ primery, 0,2 mmol.l⁻¹ zmes dNTP, 0,8 U Taq DNA polymeráza, 25 ng DNA. Úvodná denaturácia trvala 3 min. pri 94° C, po nej nasledovalo 30 cyklov: 1 min. denaturácia pri 94° C, 1 min. hybridizácia pri 48° C, 1 min. polymerizácia pri 72° C. Záverečná polymerizácia trvala 8 min. pri 72° C. Separáciu amplifikovaných fragmentov DNA sme uskutočnili v 6% močovinate denaturovaných PAGE. DNA sme vizualizovali striebrom. Dokumentáciu sme zabezpečovali pomocou Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 a programom Kodak 3D. Získané DNA profily sme previedli do binárnej sústavy a použili na výpočet Jaccardovho koeficientu genetickej podobnosti pre všetky párové kombinácie, ktoré sme uskutočnili modulom SPSS v. 6.0.1. Takto získanú maticu genetickej podobnosti sme použili na konštrukciu dendrogramu. Pre jednotlivé mikrosatelitné markery sme stanovili index diverzity (WEIR, 1990), pravdepodobnosť identity (PAETKAU

et al., 1995), polymorfickú informačnú hodnotu (WEBER, 1990) a percento heterozygotov (počet genotypov s 2 alelami na lokus / celkový počet genotypov * 100).

Výsledky a diskusia

Charakterizáciu 88 genetických zdrojov fazule sme rozšírili analýzou dĺžkového polymorfizmu mikrosatelitov. V 12 mikrosatelitoch sme detekovali polymorfizmus s celkovým počtom 64 alel, 2-17 alel na lokus (priemer 5,3). V jednom lokuse v genotype Viola sme detekovali nulovú alelu. Vo vzorke 365/97 480/1 sme v lokusoch BNG-4, BNG-91 a PVGLND5 detekovali 3 alely na lokus, čím sme potvrdili hodnotenie pomocou anatomicke-morfologických znakov, že sa jedná o zmes genotypov. V určitých lokusoch (BNG-4, PVME1G, PDX1, BNG-6) sme zistili vysokú mieru heterozygotných profilov (2 alely/lokus/genotyp). Najviac heterozygotných profilov (78,4%) sme detekovali v lokuse BNG-4 – mikrosatelit sa nachádza v promótorovej oblasti YPr-10 génu. Kóduje PR-10 proteín, ktorý patrí medzi vnútrobunkové PR (pathogenesis-related) proteíny kódované vysoko polymorfnou rodinou minimálne 20 génov. Vysoké percento heterozygotných genotypov v danom lokuse je pravdepodobne spôsobené tlakom prostredia na rastliny a zvýhodnením rastlín obsahujúcich širšie spektrum PR proteínov, alebo rôznou úrovňou ich expresie.

Klastrovou analýzou sme rozdelili genotypy do siedmich skupín. V prvej skupine (50 vzoriek) prevládajú genotypy s kričkovým habitusom a zelenou farbou nezrelých strukov, v piatej skupine (21 vzoriek) sa nachádzajú genotypy s ovijavým habitusom a zelenou farbou nezrelých strukov. V málopočetných skupinách 2., 4., 6. a 7. prevládajú resp. sa vyskytujú iba genotypy s indeterminantným vrcholom, zelenou farbou nezrelých strukov a v 3. skupine genotypy s determinantným vrcholom a zelenou farbou nezrelých strukov. V prvej skupine genotypov sme detekovali dve dvojice a jednu štvoricu s rovnakými mikrosatelitnými DNA profilmi. Dvojica 412/97_5/3 a 497/97_13/5 má podobný fenotyp, druhá dvojica 331/97_453/2 a KP_Vrbovce výrazne odlišný (kričkový/ovijavý habitus). Štvoricu genotypov môžeme rozdeliť podľa HTS (hmotnosť tisíc semien) na 2 podskupiny 476/97_53/4 a KP_Sovinec_II; 363/97_479/1 a 474/97_53/2. V prípadoch genotypov s odlišným fenotypom, ale identickým mikrosatelitným DNA profilom sme zachytili zhodné oblasti génomu medzi odlišnými genotypmi.

Záver

Analýzou dĺžkového polymorfizmu sme rozšírili charakterizáciu genetických zdrojov fazule. Získané informácie je možné využiť pri diferenciacii genotypov nerozlišiteľných anatomicke-morfologickými znakmi, pri markermi podporovanom výbere (MAS) v šľachtení a efektívnom manažmente genetických zdrojov rastlín (GZR) v génových bankách, na odstránenie duplicit vo vzorkách zo zberových expedícií. Dve dvojice a jednu štvoricu genotypov sme použitými markermi nedokázali rozlíšiť. Presnejšiu diferenciaciu a podrobnejšiu charakterizáciu je možné uskutočniť širším spektrom mikrosatelitných DNA markerov,

Literatúra

1. DELLAPORTA, S. L. - WOOD, J. - HICKS, J. B.: A plant DNA miniprep Version II. Plant Molecular Biology Reporter, vol. 1, 1983, no. 1, pp. 19-21.
2. GRANER, A. - SIEDLER, H. - JAHOOOR, A. - HERMANN, G. - WENZEL, G.: Assessment of the degree and type of restriction fragment length polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). Theoretical and Applied Genetics, vol. 80, 1990, no. 6, p. 826-832.
3. HORNÁKOVÁ et al.: Deskriptor list, Genus *Phaseolus* L., VÚRV Praha, 1991, 34 s.
4. LI, Y. CH. - KOROL, A. B. - FAHIMA, T. - NEVO, E.: Microsatellites within genes: structure, function and evolution. Molecular Biology and Evolution, vol. 21, 2004, no. 6, p. 991-1007.
5. PAETKAU, D. - CALWERT, W. - STIRLING, I. - STROBECK, C.: Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bear. Molecular Ecology, vol. 4, 1995, no. 3, pp. 347-354.
6. WEBER, J. L.: Informativeness of human (dC-dA)_n x (dG-dT)_n polymorphism. Genomics, vol. 7, 1990, no. 4, pp. 524-530.
7. WEIR, B. S.: Genetic data analysis. II. Methods for discrete population genetic data. 2. vydanie, Sunderland: Sinauer Associates, 1990. 376 p. ISBN: 0-87893-902-4
8. YU, K. - PARK, S. J. - POYSA, V.: Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). Genome, 1999, no. 42, pp. 27-34.
9. YU, K. - PARK, S. J. - POYSA, V. - GEPTS, P.: Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The Journal of Heredity, 2000, no. 91, pp. 429-434.

Tabuľka 1: Použité polymorfne mikrosatelity fazule

Názov	GenBank záznam	Mikrosatelit	Počet alel	DI	PI	PIC	%Het
BNG4	X96999	(AT) ₉	12	0,736	0,010	0,731	78,4
BNG5	AZ301615	(CAC) ₃ CAA CAC	2	0,086	0,839	0,082	0,0
BNG6	AZ301605	(AT) ₆	3	0,262	0,528	0,262	11,0
BNG91	AZ301561	(TAT) ₉	3	0,588	0,217	0,541	5,7
PDX1	AY007525	(TC) ₆ (AC) ₈	2	0,568	0,304	0,470	11,4
PHVPVPK*	J04555	(CTT) ₃ (T) ₃ (CTT) ₆	5	0,574	0,280	0,479	6,8
PVGLND5*	X61293	(AT) ₁₈	12	0,850	0,037	0,834	8,0
PVGSR1*	X04001	(AG) ₈	2	0,463	0,386	0,356	0,0
PVME1G*	X80051	(AT) ₁₂	17	0,929	0,009	0,925	15,0
YU-1**	U77935	(GCC ACC) ₅	2	0,513	0,360	0,401	3,4
YU-2**	X53603	(TTTC) ₄	2	0,391	0,443	0,321	1,1
YU-3**	X74919	(AT) ₅	2	0,524	0,345	0,420	5,7

* mikrosatelity podľa Yu et al. (1999), ** mikrosatelity podľa Yu et al. (2000), DI –index diverzity, PI – pravdepodobnosť identity, PIC – polymorfická informačná hodnota, %Het – percento heterozygotov.

Adresa autorov:

Mgr. Michal Šajgalík¹, Ing Oľga Horňáková²

¹ Oddelenie aplikovanej biochémie a molekulárnej biológie, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: sajgalik@vurv.sk

² Oddelenie génovej banky, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: hornak@vurv.sk

SOUČASNÝ STAV V UDRŽOVÁNÍ STARÝCH RŮŽÍ PRO POTŘEBY ŠLECHTĚNÍ PRESENT STATUS OF THE OLD ROSES MAINTENANCE FOR BREEDING USE

Běla SVITÁČKOVÁ - Anna KUČEROVÁ

The old roses represent the important group of the roses for breeding process. From historical view all modern rose cultivars have in their pedigree some species of the old roses. Only 11 species are important for breeding process. They vary in flower shape, flower colour, time of blooming and growth habit. The old roses collections can be found in several prestigious botanical and rose gardens.

Key words: old roses, species, cultivar, breeding, rose garden

Růže provází člověka po celou dobu jeho existence. Za kolébku pěstování růží se pokládá Čína, kde se pěstovaly čínské růže před více než 2000 let. Historie pěstování je velmi dlouhá, v období dynastie Han (141-84 před n.l.) nesměly růžové keře chybět v žádné zahradě císařských paláců. Nalezené fosílie dokládají, že existence růží je starší 40 milionů let. V provincii Shandong byly nalezeny zkamenělé zbytky divoké růže, která byla pojmenovaná *Rosa Shanwangensis* a její stáří se odhaduje na 25 milionů let. Botanické druhy růží se ze svého genocentra v centrální Asii se postupně rozšířily po celé severní polokouli, s výjimkou oblasti subtropů a arktické oblasti.

Staré růže mají velmi zajímavou historii svého vzniku a jejich stáří se odhaduje na 6000 až 8000 let. Jejich důkladné poznání je důležité pro dnešní uplatnění starých růží v podobě komponentů pro šlechtění a záměrnou tvorbu nových odrůd tohoto typu růží nebo k udržení původních odrůd.

Systém třídění růží je velmi složitý a poměrně i nejednotný. Mezi dnes používanými systémy existují podstatné rozdíly. Mnohé skupiny růží nemají ve všech třídících systémech adekvátní protějšky a při jejich klasifikaci je třeba dohledávat znaky podle rodokmenů. Dělení skupiny starých růží je možno provést podle časového hlediska. V literatuře jsou uváděny určité letopočty, které výrazně ovlivnily vývoj zahradních růží. Jako první se udává rok 1809, kdy se v Anglii objevila *Rosa x odorata* Sweet., která významně přispěla k vývoji čajových růží a čajohybridů. Oddělení čajových růží od ostatních skupin starých růží je opodstatněné, podobají se spíše moderním čajohybridům.

Druhý časový údaj je rok 1773, kdy záměrným křížením vznikl první kultivar *Rosa gallica* 'Perle von Weisstein'.

Hranice mezi starými růžemi a ostatními skupinami růží se snažila definovat řada autorů. KEAYS (1953) navrhoval rok 1880, BAYARD (1936) rok 1880 a TESTU (1984) rok 1920. V současné době se mezi staré růže řadí kultivary, pokud patří do třídy, která existovala již před rokem 1867 a vykazují její typické znaky.

Znalost genetických poměrů u starých růží je důležitá pro jejich využití v současném šlechtění. Polyploidní řada u starých růží a jejich rodičovských kombinací vychází ze základního počtu chromozomů, kde $n=7$. Botanické růže mají v genocentru nejnižší stupeň ploidie. Počet chromozomů v somatických buňkách roste se vzdáleností pěstitelského areálu.

Diploidní počet chromozomů mají důležité botanické druhy, ze kterých staré růže vznikaly. Jsou to např. nejstarší kultivary čínských růží, *Rosa chinensis* 'Minima', 'Mutabilis', 'Old Blush', 'Viridiflora' nebo noisetka 'Maréchal Niel'.

Triploidní růže představují první čajovky a další velmi známé kultivary jiných skupin, např. 'Souvenir de la Malmaison', 'La France', 'Slater's Crimson China'.

Tetraploidní růže tvoří nejrozšířenější skupinu. Vyskytují se zejména u skupiny portlandek, remontantek, bourbonek, floribundek, čajohybridů a u kultivarů *Rosa x centifolia* 'Muscosa'.

Hexaploidní stará růže je *Rosa x alba* L.

Původní druhy *Rosa x damascena* L., *Rosa x alba* L., *Rosa x centifolia* L. představují přirozené hybridy. U starých růží se poměrně často vyskytovaly mutace. Od kultivaru 'Souvenir de la Malmaison' vznikla řada mutací, které se označovaly jako sporty, např. 'Kronenprinzessin Victoria', 'Lewesan Gower', 'Souvenir de St. Armé s'. Zvláštní typ mutací představují chiméry, které prezentují kultivary *Rosa x damascena* 'Versicolor' a *Rosa gallica* 'Versicolor'.

Pro objasnění problematiky identifikace růží se používají nejmodernější genetické metody. RAPD analýza umožní určit původ kultivaru, pokud jsou známe rodičovské kombinace nebo ověřit, zda jsou totožné dvě sobě si podobné rostliny. Příkladem je ověření původu *Rosa moschata* Herrm., dvou prvních kultivarů noisetek a ověření vnesení červené barvy do většiny moderních růží kultivarem 'Slater's Crimson China'.

Přehled nejdůležitější skupin starých růží.

1. *Rosa gallica* L.

Nejstarší pěstovaná okrasná i léčivá růže, představuje jediný původní druh v Evropě a východní Asii.

2. *Rosa x damascena* Mill.

Vznikla pravděpodobně křížením *Rosa gallica* L. a *Rosa phoenicia* Boiss., kvete pouze jednou za vegetaci, v létě.

Rosa damascena semperflorens Rowley.

Vznikla z křížení *R. gallica* L. x *R. moschata* L., kvete v létě a na podzim.

3. *Rosa x alba* L.

Vznikla pravděpodobně křížením určité růže ze sekce *Caninae* (pravděpodobně *R. canina* subs.*corymbifera*) a *Rosa x damascena* Mill..

4. *Rosa centifolia* L.

Mnohonásobný hybrid *Rosa gallica* L., *Rosa phoeniciana* Boiss., *Rosa moschata* Herrm., *Rosa canina* L.

5. *Rosa x centifolia* 'Muscosa'.

Pupenová mutace *Rosa x centifolia* L..

6. *Rosa chinensis* Jacq.

Pro šlechtění jsou významné mutace původní formy, příp. hybridy *Rosa gigantea* Coll., významně se podílely na vzniku bourbonek, portlandek, noisetek a čajovek.

7. *Rosa x noissetkiana* Thorg.

Bohatá a významná skupina růží, vznikla okolo roku 1800 křížením *Rosa chinensis* Jacq. x *Rosa moschata* Herrm..

8. *Rosa Bourboniana* Desp.

Významná skupina, vznikla na počátku 19.stol. křížením *Rosa chinensis* Jacq. a *Rosa x damascena semperflorens* Rowley..

9. Portlandky

Původ není jasný, skupina vznikla na počátku 19.stol., jedná se o mnohonásobné křížení mezi *Rosa x chinensis* Jacq., *Rosa x damascena semperflorens* Rowley., a *Rosa gallica* L..

10. *Rosa x odorata* Sweet.

Velmi významná skupina růží, jedna z rodičovských komponent všech evropských čajovek, základem je křížení *Rosa gigantea* Coll. x *Rosa chinensis* Coll., nejelegantnější a nejchoulostivější růže.

11. Remontantky

Velmi bohatá skupina starých růží, mnohonásobné hybridy s těžko zjištěným původem. Za základ je považováno křížení portlantky 'Rose du Roi' a 'Glorie de Rosomare', která je hybrid bourbonky a růže čínské.

Rod *Rosa* má více než 100 botanických druhů a samotný podrod *Eurosa* představuje více než 120 skupin zařazených do 10 sekcí. Nejvhodnější kombinaci pro křížení dnes představují kříženci původních evropských a čínských růží. Splňují současné požadavky, které jsou kladeny na nové kultivary růží z pohledu kvality květu a kvetení, habitu, rezistence i pěstitelských technologií.

Současné studie ukázaly, že pouze 11 druhů je dnes využíváno pro šlechtění. Nejvýznamnějšími druhy jsou *Rosa canina* L., *Rosa chinensis* Jacq., *Rosa foetida* Herrm., *Rosa gallica* L., *Rosa gigantea* Coll. ex Murr., *Rosa moschata* Herrm., *Rosa multiflora* Thumb. ex Murr., *Rosa rugosa* Thumb., *Rosa wichuriana* Crép. a *Rosa rubra* Blackw.

Ostatní druhy nejsou pro šlechtění příliš důležité, např. *Rosa bracteata* Wendl., *Rosa indica odorata* Andr. a *Rosa persica* (Michx.) Bormm.

Pro praktické šlechtění je nutno mít k dispozici kompletní pěstitelské a okrasné hodnoty šlechtitelského materiálu, včetně dostatečného množství fertilních samčích a samičích komponent vysoké kvality.

Z pohledu genetických zdrojů představují rosaria hodnoty, které jsou prakticky nenahraditelné. V současné době má řada velmi významných světových rosarií ve svých kolekcích zastoupeny původní staré růže. Staré růže se stávají v současnosti velmi zajímavou záležitostí a dnešní nové kultivary si zachovávají krásu růží vzniklých v 18. a 19. století, doplněné však o vlastnosti, které na ně klade moderní doba.

Nevýznamnější rosarium, kde se nachází největší sbírka starých růží je v Sangerhausenu v SRN. Rosarium bylo založeno v r.1898 a dnes představuje největší sbírku růží na světě. Staré růže jsou zde zastoupeny 160 kultivary *Rosa gallica* L., 30 kultivary *Rosa x damascena* Mill., 25 kultivary *Rosa alba* L., 40 kultivary *Rosa x centifolia* L., 130 mechovek, 55 noisetek, 65 bourbonek, 16 portlandek a 500 remontantek. Řada kultivarů je dnes zcela unikátních, nejsou nikde jinde pěstovány.

Další velmi významné rosarium je Roseraie du Parc de Bagatele v Paříži, kde se nachází velmi významná sbírka starých růží. Další sbírky mají rosaria v Lyonu a v L'Hay-les-Roses ve Francii.

Velmi bohaté kolekce starých růží se nachází v rosariích v Belgii, Dánsku, Švýcarsku, Velké Británii, na Novém Zélandě, Japonsku a samozřejmě v Itálii, a Řecku.

Velmi známé a významné jsou rosaria David Austin, Allrighton a Hidcote Manor Garden Chippingcampan ve Velké Británii, Portland International Rose Test Garden v Portlandu, USA a Prado Municipal Rose Garden Montevideo.

Dnes v ČR jsou staré růže zastoupeny zejména v genofondových sbírkách Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích, kde jsou vysázeny keře *Rosa x centifolia* L., *Rosa x centifolia* 'Muscosa', bourbonky, remontanky a několik původních růží šlechtitele Geswinda.

Některé staré růže je možno najít i ve sbírkách VÚKOZ v Průhonicích, v Botanické zahradě v Liberci, v zámeckém parku v Častolovicích.

Na Slovensku je kolekce starých růží v Arborétu Borová Hora.

Růžové školky v ČR se nevěnují množení starých růží, jelikož zájem je o ně malý. Jedinou školkou, která množí a nabízí staré růže je Růžová školka Michaely a Luboše Pelcových v Sobotce u Mladé Boleslavi. Školky byly založeny v roce 1992 a nabízí poměrně bohatý sortiment. Ze starých růží jsou k dispozici kultivary *Rosa x centifolia* L., *Rosa x alba* L., *Rosa chinensis* 'Viridiflora', 'Mutabilis', 'Felicité et Perpetue', 'Paul's Himalayan Musk', 'R. a P. de Grasse aus dem Orient'. Tyto kultivary prozatím nelze nikde jinde v ČR získat.

Staré růže v současné době se mohou uplatnit jako šlechtitelský materiál při tvorbě nových kultivarů starých růží. V celé řadě evropských zemí nastala nová doba jejich renesance. Jejich vlastnosti v porovnání s dalšími skupinami růží nevykazují zvýšenou náchylnost k chorobám, ani nevyžadují zvláštní péči při pěstování. Vyznačují se však neobvyklými tvary květů, které vynikají bohatostí kvetení a intenzivní vůní. Tyto vlastnosti byly využity dnes při šlechtění skupiny anglických růží i dalších skupin.

Jelikož skupina starých růží je velmi variabilní, je jejich uplatnění ve veřejné i soukromé zeleni perspektivní.

Literatura

1. AUSTIN, D.: *David Austin's English Roses*. Conran Octopus Limited, London, 1.vyd., 1993, 160 s., ISBN 1 85029 784 3.
2. HÖGER, I.: *Von Zauber der Alten Rosen*. BLV Verlagsgesellschaft, München, 1991, 98 s. KRAUSCH, H.D. *Kaiserkrone und Päonien rot...* Dölling und Galitz Verlag, 1.Auflage, 2003, 532 s., ISBN 3-935549-23-7
3. KRÜSSMANN, G.: *Rosen, Rosen, Rosen*. Paul Parey, Berlin, 1974, 447 s., ISBN 3-489717-22-8
4. MANNERS, M.M. - MORVILLO, N. - FREDERICK, C. - WAGNER, A.: RAPD-PCD answers some long-standing questions about rose identification, *Acta-Horticulturae*, 634, 2004, s.85-89, ISBN 9066056479.
5. MÜTZE, W. - SCHNEIDER, C.: *Das Rosenbuch*. Verlag der Gartenschönheit, Berlin, 1924, 136 s.
6. ROBERTS, A. - DEBENER, T. - GUDIN, S.: *Encyclopedia of Rose Science*. Elsevier Ltd. UK, 2003, 837 p., ISBN 0-12-227620-5

Adresa autorov:

Ing. Běla Svitáčková, CSc., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici, Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin, Valtická 337, 69144 Lednice, Česká republika, Telefon: +420519367303, E-mail: svitackova@zf.mendelu.cz
Bc. Anna Kučerová, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici, Valtická 337, 69144 Lednice, Česká republika, Telefon: +420519367303, E-mail: xkucero8@node.mendelu.cz

HODNOCENÍ A ŠLECHTĚNÍ SVĚTLICE BARVÍŘSKÉ (*CARTHAMUS TINCTORIUS* L.) NA MZLU V BRNĚ SAFFLOWER EVALUATION AND BREEDING AT MZLU BRNO

Jiří UHER

*In the 1995-2005 years were at Horticultural Faculty of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno collected and observed nearly 140 samples of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Collected varieties and landraces were evaluated in 40 morphological and phenological characters, in consideration of a correlations among them. A number of evaluated landraces seems to show a more valuable combinations of preferred characters than cultivars which are offered commercially for a floricultural practice. Contrary to existence of high correlations between a yellow flower colour and spiny bracts formation, nearly spineless yellow-flowered genotypes was recognised as well, and together with a newly located medium-early lines with a deep vermilion florets were used like a initial material to selection of new ornamental varieties.*

*Keywords: safflower, varieties, landraces, descriptors, evaluation, cultivars breeding; *Carthamus tinctorius*.*

Úvod

Světlice barvířská (*Carthamus tinctorius* L.) je starým kulturním druhem, pěstovaným nejméně tři tisíciletí jako rostlina barvířská, léčivá nebo olejodárná. Teprve v posledních desetiletích je však docenována její hodnota okrasná - světlice se ustálila zhruba na padesáté příčce řebříčku nejpěstovanějších květin k řezu a byla nabízena v bezmála šedesáti okrasných kultivarech. Úměrně s rostoucím počtem okrasných odrůd vrostla však nejen potřeba jejich konzervace, ale i důslednějšího hodnocení - tomu byla světlice dosud vystavena jen z hlediska konzervace genových zdrojů (ASHRI, 1973; LI & al., 1993 a další) a se zřetelem k potřebám olejářských koncernů.

S přihlédnutím k dosud postaveným ideotypům pro olejné kultivary (BUZZA, 1978; SAWANT, 1985), především ale na základě porovnání charakteristik dostupných odrůd a jejich konfrontací s potřebami květinářské praxe byly stanoveny ideotypy pro odrůdy pěstované k sušení (UHER, 2003). Tomu ovšem předcházela nutná úprava stávajících IPGRI deskriptorů (ASHRI & al., 1983) tak, aby lépe odpovídaly potřebám květinářské praxe (UHER, 1995), a následně vypracování deskriptorů zohledňujících potřeby praxe olejářské i květinářské (HOFBAUER & al., 2000). Na základě podchycení znaků v květinářské praxi upřednostňovaných (absence ostnů na úhledných a sušením nedeformovaných zákrovních listenech, syté zbarvení květů nepřecházejících při sušení do nežádoucích odstínů, veliké, pomalu odkvétající úbory nesené kratším nebo přitisklým větvením lokalizovaným v horních třetinách stonků, rychlé vzházení a schopnost kompetice s pleveli, odolnost houbovým a chromistogenním chorobám) bylo pak přistoupeno k výběru vzorků vhodných pro další šlechtitelské zpracování.

Materiál a metodika

Na 60 komerčně nabízených odrůd okrasných, olejných i barvířských a téměř 80 krajových odrůd bylo v letech 1995-2005 vyhodnoceno ve 40 morfologických a fenologických znacích prostřednictvím upravených IPGRI deskriptorů. Vybrané hodnoty byly použity ku stanovení korelací sledovaných znaků a dále dosazeny do vzorců sestavených k objektivnějšímu posouzení uplatnitelnosti kultivarů k produkci suchých i živých květin (UHER, 2003). Z vytypovaných vzorků dva byly využity pro další šlechtění: vzhledem k charakteristikám jejich populací byly voleny metody hromadné selekce (CART 9/82) a směšného (bulk) šlechtění (CART 67/83).

Výsledky a diskuse

Data pro komerční kultivary byla již diskutována (UHER, 1995, 2003): vysoce oceňované vlastnosti jako jsou absence ostnů, přitisklé větvení anebo syté červené zbarvení kvítků bývají u světlice zpravidla spojeny s vyšším vzrůstem a pozdním kvetením. Skutečně téměř všechny vzrůstné a pozdní odrůdy obdržely vysoká bodová ohodnocení. Na druhé straně ale velmi dobře obstály některé ze středně vzrůstných a v nakvétání spíše ranějších selekcí ('Tangerine' a níže zmiňované linie podchycené ze štěpení GER-10-CT), vedle relativní absence ostnů také díky sytě rumělkově červeným květům; podobné byly v celé kolekci nalezeny už jen u inermního pozdního kultivaru 'Donkeroranje Select' s vůbec nejvyšším bodovým hodnocením v rámci odrůd k sušení. S výjimkou výše zmiňované 'Tangerine' a vybraných GER-10-CT linií neobstál však žádný z vysoce hodnocených pozdních kultivarů v oceňování pro produkci živých květenství k možnému obohacení trhu s řezanými květinami.

Na základě diskutovaných hodnocení byly prostřednictvím ZF MZLU v Brně vyvinuty a registrovány dva inermní, středně rané kultivary. Rumělkově kvetoucí 'Vierka' je směsí (bulk) GER-10.6-CT a GER-10.7-CT linií odvozených ze slibného, avšak extrémně nesourodého CART 67/83 (GER-10-CT) z IPK Gatersleben, žlutokvětá 'Brněnka' povstala hromadnými selekcemi staré moravské olejné odrůdy 'Brněnský Bezostnatý' (CART 9/82).

Závěr

V našich zemích, kde se okrasné odrůdy světlice pěstují v podstatě jen k sušení, patří k nejrozšířenějším 'Feuerschopf' a 'Goldschopf' (Benary, Hann. Münden). Perspektivními se v těchto ohledech jeví také mnohé ze sledovaných krajových odrůd, jmenovitě SLK-07-CT a SLK-10-CT (VÚRV Piešťany), GER-10-CT, SDN-01-CT, POL-01-CT, MAR-07-CT a MAR-08-CT (IPK Gatersleben), CHN-01-CT a CHN-04-CT (Institute of Botany CAS, Beijing) nebo IRN-01-CT, IRN-04-CT, IRN-05-CT, AFG-01-CT, AFG-02-CT, CND-05-CT, CND-06-CT a CND-08-CT (Res.St.Agriculture, Pullman). Ranost u odrůd pro sušení nedosahuje sice významu, jakému se těší u odrůd pro skleníkové kultury - časnější kvetení může ale přesouvat sklizně do měsíců méně náročných na sklizňové práce u jiných taxonů uplatňujících se na trhu suchých květů. Případné zohlednění průběhu reprodukčních stadií může pak hodnocení posunout ve prospěch ranějších odrůd typu 'Tangerine' anebo 'Vierka'.

Uznání a poděkování: Osivo pro sledování bylo poskytnuto semenářskými firmami Benary (Hannover-Münden, Německo), Walz Samen (Stuttgart, Německo), H. Meisert Samenzucht (Hannover-Buchholz, Německo), Hammer Bloemzaden (Zwijndrecht, Holandsko), Leen de Mos Bloemzaden (s'Gravenzande, Holandsko), Kieft Bloemzamen (Venhuizen, Holandsko), Wyss Samen und Pflanzen (Zuchwil-Solothurn, Švýcarsko), Petunia Černý (Jaroměř, ČR), Seva (Valtice, ČR), genobankami VÚRV Piešťany (SR), IPK Gatersleben (Německo), Res.St. Agriculture Canada (Lethbridge, Kanada) a několika botanickými zahradami - především Institute of Botany CAS (Beijing, Čína), Gruga Park (Essen, Německo) a Medicinal Plant Research Station (Tsukuba, Japonsko). Hodnocení sledovaných odrůd probíhalo za podpory projektu MzeČR E - 97/01 - 3160 - 0200 a projektu MSM 435100002 MŠMT ČR.

Souhrn

V letech 1995-2005 bylo na zahradnické fakultě Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně soustředěno a sledováno 140 položek světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.). Kolekce byly hodnoceny ve 40 znacích s přihlédnutím k jejich korelacím u sledovaných vzorků. Vedle odrůd selektovaných pro květinářskou praxi a několika olejných kultivarů byla více než polovina těchto položek představována krajovými odrůdami, přičemž některé z nich se zdají vykazovat výhodnější kombinace preferovaných znaků (absence ostnitosti, vybarvení květů, resistance houbovým patogenům) než odrůdy komerčně nabízené. Podobné ekotypy mohou být v květinářské praxi uplatněny přímo (homogenita současných komerčně nabízených odrůd v přesevech naznačuje podobný původ) nebo lépe při šlechtění dalších v květinářství uplatnitelných odrůd; vybrané vzorky byly již využity ve šlechtění registrovaných odrůd 'Brněnka' (1997) a 'Vierka' (1998).

Literatura

1. ASHRI, A.: Divergence and evolution in the safflower genus, *Carthamus* L. Final Research Report P.L.480, U.S.D.A.Project No.A10-CR-18, Grant FG-IS-234, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 1973 (180 p.)
2. ASHRI, A. – KNOWLES, P.F. – SINGH, R.B. – YU, S.X., & al: Safflower descriptors. IBPGR, Rome 1983
3. BUZZA, G.C.: An ideotype of safflower for the Australian wheat belt. Proc. Eucarpia Oil Crops Meeting 11-13, Upsala 1978
4. HOFBAUER, J. - UHER, J. - FABEROVÁ, I.: Klasifikátor (descriptor list) *Carthamus tinctorius* L. Genetické zdroje 74, VÚRV Praha, VÚP Troubsko, MZLU ZF Lednice, 2001 (8 p.)
5. LI, D.J. – ZHOU, M.D. - RAMANATHA-RAO, V.: Characterization and evaluation of safflower germplasm. Geological Publishing House, Beijing 1993 (260 p.)
6. LI, D.J. – MÜNDEL, H.-H.: Safflower. *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops (7). IPK Gatersleben, IPGRI Rome, Rome 1996 (83 p.)
7. SAWANT, A.R.: Safflower breeding methodologies, ideotypes and handling of early generation material. Oil Crops Newsletter 2: 33-37, 1985
8. UHER, J.: Srovnání vybraných kultivarů světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.) z hlediska květinářského využití. Zahradnictví 22 (3): 89-94, 1995
9. UHER, J.: Olejníny jako zdroj výchozího materiálu k rozšiřování květinových sortimentů: světlice (*Carthamus* L.) In: LACKO-BARTOŠOVÁ M., KOVÁČ K.: Udržitel'né pol'nohospodárstvo a rozvoj vidieka, 327-332, Nitra 2003

vysvětlivky k tabulkám

- AHS: velikost úborů (1: drobný; 2: střední; 3: velký)
IBM: tvar zákrovních listenů (postupně zaokrouhlovaný, 1: kopinatý; 3: elipčitý; 5: opakvejčitý)
IBD: velikost zákrovních listenů (1: kratší a 2: delší než průměr zákrovu)
IBS: ostnitost zákrovních listenů (1: příležitostná; 3: slabá; 5: střední; 7: silná)
FCF: barva živých květů (od bílých 1 přes žluté a oranžové, v postupně tmavnoucích odstínech po červené 9)
FCD: barva suchých květů (od bílých 1 přes žluté a oranžové, v tmavnoucích odstínech, po červené 9)
FCU: uniformita zbarvení kvítků, kresba na petalech (1: nevyvinutá; 2: slabá; 3: výrazná)
TPH: výška rostlin k počátku kvetení (zaokrouhlený průměr z deseti typicky vyvinutých rostlin)
HFU: uniformita, dynamika nakvétání (1: náhlé, 2: postupné nakvétání kvítků v celém úboru)
LBN: počet větví s vyvinutými úbory (zaokrouhlený průměr z deseti typicky vyvinutých rostlin)
LBL: délka postranního větvení (1: krátké; 2: střední; 3: dlouhé)
LBA: úhel větvení (1: 15-20°; 3: 20-60°; 5: 60-90°)
ISC_D: index vhodnosti odrůdy pro sušení; v ideálu se blíží hodnotě 1.0

Adresa autora:

Dr. Ing. Jiří Uher, Department of Floriculture and Vegetable Crops Production, Faculty of Horticulture, Mendel University of Agriculture and Forestry at Brno, Valtická 344, 69144 Lednice na Moravě, Czech Republic, uher@zf.mendelu.cz

Tabulka 1: sledované komerčné kultivary (dubnové výsevy, 40 rastlín.m⁻²)

ISC _D		AHS	IBM	IBD	IBS	FCF	FCD	FCU	HFU	TPH	LBL	LBA	LBN	DTF
0.254	AC Stirling	4	1	2	5	3	4	0	2	0.70	2	5	12	81
0.286	Lesaf 34C	4	2-3	2	3	1	2	0	2	0.70	2	5	9	78
0.217	Toupet Jaune Or.	2	1	2	5	4	4	2	2	0.85	3	5	12	84
0.346	Orange Pinsel	4	2-3	2	2	5	8	0	1	0.70	2	5	6	69
0.294	Toupet Orange	5	1	2	5	5	7	1	1	0.70	3	5	8	78
0.204	Weisser Pinsel	4	2	2	2	1	2	0	1	0.70	2	4	6	69
0.313	Finch	4	1	2	6	3	5	0	2	0.75	3	4	16	84
0.404	Sironaria	5	1	2	3	3	4	0	2	0.80	3	4	17	81
0.569	Taškentskij 51	5	3	2	0	9	9	0	2	0.90	3	4	16	90
0.577	Miljutinskij 114	5	3	2	0	9	9	0	2	1.10	3	5	18	93
0.606	Oranžová	5	5	1	0	8	8-9	1	2	1.00	2	5	16	90
0.380	Žlutá	4	2-3	1	1	3	4	0	2	0.80	2	5	11	81
0.476	Červená	4	1	2	1	6	7	0	1	0.85	2	5	12	84
0.277	Lasting Yellow	4	2-3	2	2	3	5	0	1	0.70	2	4	6	69
0.202	Lasting White	4	2	2	2	1	2	0	2	0.70	2	5	7	72
0.456	Sabina	3	2-3	1	1	3	6	0	2	0.85	2	5	15	81
0.393	Brněnka	3	2-3	1	1	3	4	0	2	0.85	2-3	5	12	84
0.596	Vierka	4	2-3	2	1	9	9	0	2	0.80	2	4	12	81
0.345	Sepassa 320	3	1	2	3	4	5-6	0	2	0.75	2	5	12	78
0.315	Saffola P202	4	1	2	5	4	5-6	0	2	0.70	2	5	13	78
0.295	SM 8	4	1	2	4	3	6	0	2	0.70	2	5	12	84
0.277	SM 9	4	1	2	5	3	5-6	0	2	0.75	2	5	11	81
0.218	Alcaidia	2	1	2	5	4	6	0	2	0.65	2	5	9	78
0.279	Alarosa	3	1	2	5	4	5-6	0	2	0.80	2	5	12	81
0.595	Feuerschopf	5	5	1	0	8	8-9	1	2	1.10	2-3	4	14	90
0.376	Kinko	5	2-3	2	2	5	8	0	1	0.70	2	5	8	69
0.508	Goldschopf	5	5	2	0	5	8	2	1	1.00	2	4	14	90
0.376	Treibgold	4	2-3	2	2	5	7	0	1	0.70	2	5	9	69
0.614	Goldköpfchen	4	1	1	0	7	8	0	2	0.85	2	5	21	87
0.324	Orange Köpfchen	4	2	2	1	7	7	0	2	0.75	2	3	8	90
0.206	Zitronenköpfchen	2	1	2	5	2	4	0	2	0.80	3	4	11	81
0.148	Treibgelb	2	1	2	5	2	4	0	2	0.85	4	6	11	81
0.343	Treiborange	5	2-3	2	2	5	7	0	1	0.70	2	5	6	69
0.219	Treibweiss	4	2-3	2	3	1	2	0	1	0.70	2	5	9	72
0.295	Treibgold	4	2-3	2	2	5	2	0	1	0.70	2	5	7	69
0.277	Orangefeuer	4	2	2	2	5	4	0	1	0.70	2	5	6	69
0.348	Espo S&G 1001	4	2-3	2	3	5	7	0	1	0.70	2	5	8	72
0.195	Selektion Weiss	4	2-3	2	2	1	2	0	1	0.70	2	5	6	72
0.292	Selektion Gelb	4	2-3	2	2	3	5	0	1	0.70	2	5	7	72
0.442	Nebraska 8	4	1	2	3	5	8	0	2	0.80	3	5	17	84
0.444	Mogami	5	1	2	4	5	9	0	2	0.80	3	5	15	78
0.387	Draa Basse Tige	3	1	2	3	3	6	0	2	0.75	3	5	16	81
0.387	Draa Haute Tige	5	3	2	2	5	8	0	2	0.80	3	5	10	84
0.285	Inerm Marrakech	3	1	2	5	3	5	0	2	0.80	3	4	12	78
0.395	Inerme du Draa	4	1	2	1	5	7	0	2	0.80	3	4	12	84
0.378	Inerme R.A.	3	3-4	1	1	3	5	0	2	0.75	2	4	9	81
0.230	Moyen du Draa	3	1	1	4	5	7	0	2	0.80	3	5	12	84
0.445	S-8 Select R.A.	4	1	2	0	6	8	0	2	0.80	2	4	11	87
0.202	Alba	4	2-3	2	2	1	2	0	1	0.70	2	4	7	72
0.526	Ingrid	3	4-5	1	1	4	9	1	2	1.00	2	3	14	84
0.332	Sophia	4	2-3	2	2	5	7	0	1	0.70	2	4	6	69
0.426	Vogro	3	1	2	5	2	5	0	2	0.85	3	4	22	81
0.174	Cremewit	4	2	2	2	1	2	0	1	0.70	2	6	6	69
0.697	Donkeroranje S.	3	4-5	1	0	8	8-9	2	2	1.10	3	5	21	81
0.362	Oranje	3	2-3	2	2	5	8	0	1	0.70	2	4	8	69
0.508	Tangerine	4	3	1	0	9	9	1	1	0.80	2	5	9	78
0.316	Orange Grenade	4	2	2	2	6	8	0	1	0.70	2	4	8	69
0.343	Oranjegeel	4	2	2	2	5	7	0	1	0.70	2	4	6	69
0.203	White Grenade	4	2	2	2	1	2	0	1	0.70	2	5	6	72
0.262	Yellow Grenade	4	2	2	2	3	5	0	1	0.70	2	5	6	69
0.231	Shiro	4	2	2	2	1	2	0	1	0.70	2	5	7	72
0.591	Gladki Borowski	4	3-4	1	0	7	8-9	2	2	1.10	3	4	22	90

Tabuľka 2: vybrané krajové odrúdy (dubnové výsevy, 40 rastlín.m⁻²)

ISC _D		AHS	IBM	IBD	IBS	FCF	FCD	FCU	HFU	TPH	LBL	LBA	LBN	DTF
0.697	CHN-01-CT	3	5	1	0	8	8-9	2	2	0.90	3	5	21	81
0.395	CHN-02-CT	4	1	2	1	5	7	0	2	0.80	3	4	12	84
0.378	CHN-03-CT	3	3-4	1	1	3	5	0	2	0.75	2	4	9	81
0.526	CHN-04-CT	5	3	2	0	8	9	0	2	1.10	3	4	14	90
0.404	CHN-05-CT	5	1	2	3	3	4	0	2	0.80	3	4	17	81
0.569	CHN-06-CT	5	3	2	0	9	9	0	2	0.90	3	4	16	90
0.569	CHN-08-CT	5	3	2	0	9	9	0	2	0.90	3	4	16	90
0.595	GER-01-CT	5	5	1	0	8	8-9	1	2	1.10	2-3	4	14	90
0.376	GER-11-CT	4	2	2	2	5	7	0	1	0.70	2	5	9	69
0.595	GER-12-CT	5	5	1	0	8	8-9	1	2	1.10	3	4	14	90
0.376	GER-22-CT	5	2-3	2	2	5	8	0	1	0.70	2	5	8	69
0.508	GER-26-CT	5	5	2	0	5	8	2	1	1.00	2	4	14	90
0.376	GER-27-CT	4	2-3	2	2	5	7	0	1	0.70	2	5	9	69
0.614	GER-28-CT	4	1	1	0	7	8	0	2	0.85	2	5	21	87
0.324	GER-30-CT	4	2	2	1	7	7	0	2	0.75	2	3	8	90
0.206	GER-31-CT	2	1	2	5	2	4	0	2	0.80	3	4	11	81
0.569	GER-32-CT	5	3	2	0	9	9	0	2	0.90	3	4	16	90
0.577	IRN-01-CT	5	3	2	0	9	9	0	2	1.00	3	5	18	93
0.606	IRN-04-CT	5	5	1	0	8	9	1	2	1.00	2	5	16	90
0.508	IRN-05-CT	5	5	2	0	5	8	2	1	1.00	2	4	14	90
0.395	IND-06-CT	4	1	2	1	5	7	0	2	0.80	3	4	12	84
0.508	AFG-01-CT	5	5	2	0	5	8	2	1	1.00	2	4	14	90
0.595	AFG-02-CT	5	5	1	0	8	9	1	2	1.00	3	4	14	90
0.508	CND-02-CT	5	5	2	0	5	8	2	1	1.00	2	4	14	90
0.393	CND-04-CT	3	3	1	1	3	4	0	2	0.85	3	5	12	84
0.596	CND-05-CT	4	2-3	2	1	9	9	0	2	0.80	2	4	12	81
0.595	CND-06-CT	5	5	1	0	8	9	1	2	1.00	3	4	14	90
0.595	CND-08-CT	5	5	1	0	8	9	1	2	1.00	3	4	14	90
0.395	CND-09-CT	4	1	2	1	5	7	0	2	0.80	3	4	12	84
0.378	CND-10-CT	3	4	1	1	3	5	0	2	0.75	2	4	9	81
0.508	CND-12-CT	5	5	2	0	5	8	2	1	1.00	2	4	14	90
0.343	JPN-03-CT	5	1	2	4	5	9	0	2	0.80	3	5	15	78
0.343	JPN-04-CT	5	1	2	4	5	9	0	2	0.75	3	5	18	78
0.295	JPN-06-CT	5	1	2	4	5	9	0	2	0.75	3	5	18	78
0.277	JPN-07-CT	5	1	2	5	5	9	1	2	0.80	3	5	18	81
0.348	JPN-08-CT	5	1	2	4	5	9	0	2	0.80	3	5	15	81
0.343	JPN-10-CT	5	1	2	4	5	9	0	2	0.80	3	5	15	78
0.292	JPN-11-CT	3	3	2	2	8	9	2	2	1.00	4	5	22	93
0.445	JPN-12-CT	3	1	2	5	3	5	2	2	0.85	3	4	20	81
0.526	GER-10.1-CT	5	5	2	0	3	6	0	2	1.80	3	4	10	90
0.445	GER-10.2-CT	5	2	2	1	9	9	0	2	0.85	2	5	12	69
0.508	GER-10.3-CT	5	2	2	1	4	6	0	2	0.80	2	4	14	90
0.376	GER-10.4-CT	5	2	1	3	4	6	0	2	0.80	2	5	9	69
0.445	GER-10.5-CT	5	2	1	2	9	9	0	2	0.85	2	5	11	87
0.614	GER-10.6-CT	5	4	1	0	9	9	0	2	0.80	2	3	12	90
0.595	GER-10.7-CT	4	3	2	1	9	9	0	2	0.80	3	4	11	81
0.395	GER-10.8-CT	5	2	1	3	8	8	0	2	0.80	3	4	10	90
0.348	JPN-12.1-CT	5	1	2	4	5	9	0	2	0.80	3	5	15	81
0.343	JPN-12.2-CT	5	1	2	5	5	9	0	2	0.80	3	5	15	78
0.404	JPN-12.4-CT	3	1	2	5	3	5	2	2	0.85	3	4	20	84
0.445	JPN-12.4-CT	3	1	2	4	3	5	2	2	0.85	3	4	20	81
0.343	GER-22.1-CT	4	2	2	2	5	7	0	1	0.70	2	4	6	69
0.343	GER-22.2-CT	5	2-3	2	2	5	7	0	1	0.70	2	5	6	69
0.316	GER-22.3-CT	4	2	2	2	6	8	0	1	0.70	2	4	8	69
0.343	GER-22.4-CT	4	2	2	2	5	7	0	1	0.70	2	4	6	69
0.343	GER-22.5-CT	5	2-3	2	2	5	7	0	1	0.70	2	5	6	69
0.295	GER-22.6-CT	4	2-3	2	2	5	2	0	1	0.70	2	5	7	69
0.277	GER-22.7-CT	4	2	2	2	5	4	0	1	0.70	2	5	6	69
0.348	GER-22.8-CT	4	2-3	2	3	5	7	0	1	0.70	2	5	8	72

GENOVÉ ZDROJE PRO VÝZKUM A ŠLECHTĚNÍ OLEJNÉHO LNU GENETIC RESOURCES FOR LINSEED RESEARCH AND BREEDING

Eva TEJKLOVÁ - Bohumila MATYSOVÁ - Jiří HORÁČEK - Michal ONDŘEJ - Lenka ODSTRČILOVÁ - Martin PAVELEK

Some new genotypes from the Agritec linseed collection are described. Inheritance of yellow-green shoot mutation was characterized. Genetic analysis confirmed two-alleles monogenic determination of the leaf and stem colour. Allele controlling yellowish shoots is recessive to allele for standard, green shoots. Genetic resources of Oidium lini resistance in linseed were found. French variety Jupiter is completely resistant to Oidium lini but very sensitive to Alternaria linicola. Chinese linseed line K 88-12 gave O. lini and A. linicola-resistant combination after crossing with Atalante. Lines with significant changes in fatty-acid composition of seed oil were detected after mutagenesis. High-yielding lines resistant to Oidium lini and Alternaria linicola were detected in field trials. Negative correlation between Oidium lini and Alternaria linicola were proved in high-linolenic and low-linolenic breeding lines.

Key words: Linum usitatissimum L., linseed, genetic resources, mutation, fatty acids, Alternaria linicola, Oidium lini, resistance

Úvod

Šlechtitelská práce u lnu ve firmě Agritec s.r.o. vychází z vlastní kolekce genových zdrojů, která svým rozsahem patří k největším v Evropě. Kolekce lnu v současné době obsahuje 2041 položek, z toho je 519 krajových odrůd, 1024 odrůd a 498 vzorků šlechtitelského materiálu. Kolekce je udržována a dále rozvíjena díky mezinárodní spolupráci při výměně genových zdrojů a také díky materiálům nově vznikajícím v průběhu řešení výzkumných projektů a díky šlechtitelským aktivitám firmy samotné.

Materiál a metody

1) Linie lnu se žlutozeleným prýtem NLN 14C2 vznikla v pokusech s inzerční mutagenezí v r. 1999 (RAKOUSKÝ et al., 2003), transgen však u něho nebyl prokázán. V r. 2002 byl mutantní genotyp křížen s výchozí linií NLN 245 se standardním zeleným prýtem (obr. 1). Barva prýtlů byla sledována v F1 a F2 generaci. V F2 byla testována χ^2 testem (v tabulkovém procesoru Excell) shoda štěpných poměrů barvy prýtlů s teoretickým poměrem 3:1 a byla testována identita reciprokých křížení.

2) Materiály olejného lnu testované ve školce pocházejí z křížení zaměřeného na vytvoření výnosné a k chorobám rezistentní odrůdy jednak s klasickým zastoupením mastných kyselin, jednak s redukováným obsahem kyseliny linolenové pod 5%. K získání žádaných kombinací a ke stabilizaci genotypu jsou používány pozitivní a negativní selekce a prašnicková kultura. Jednotlivé genotypy jsou vysévány secím strojem Hege: na šestiřádkové parcelky 1 m dlouhé, řádky 10 cm od sebe, na řádek 100 semen, do hloubky 1 cm. Odolnost k chorobám byla hodnocena bodovou stupnicí 1-5: 1 – bez napadení, 5 – totálně napadené. Byly vyhledávány genotypy vyznačující se kombinovanou odolností k *Alternaria linicola* (čern lnu) a *Oidium lini* (padlí). Rostliny v plné zralosti byly ručně vytrhány, ve svazcích dosušeny a odsemeněny na drhlíku, semena zvážena. Byly vybírány genotypy s relativně vyššími výnosy semene ve srovnání s odrůdou Atalante, která v podmínkách ČR dlouhodobě vyniká odolností k chorobám a současně i výnosem semene.

3) Pět linií odvozených z mutantní rostliny po indukované mutagenezí etylmetansulfonátem (TEJKLOVÁ, 1995) s rozšířenou variabilitou ve skladbě mastných kyselin (MK) bylo kmenovým šlechtěním v obsahu MK stabilizováno. Stanovení procentuálního zastoupení MK v semenném oleji bylo prováděno na plynovém chromatografu. U jednotlivých linií byl stanoven obsah MK ve 20 jednotlivých rostlinách (z každé rostliny byl použit vzorek z 10 semen). Jako kontrola byla použita odrůda olejného lnu Areco s klasickým obsahem MK. U 15 jednotlivých rostlin vybraných ze všech linií dohromady byl stanoven obsah MK vždy v 5 jednotlivých semenech. Získané výsledky byly zhodnoceny programem Unistat.

4) Na parcelách o ploše 10 m² bylo v r. 2005 testováno 34 genotypů ve skupině vysokolinolenových a 32 genotypů ve skupině nízkolinolenových olejných lnů spolu s kontrolními odrůdami Flanders pro vysokolinolenové (klasické) a Lola pro nízkolinolenové typy lnu a to ve 4 opakováních. Setí bylo provedeno secím strojem Oyord, řádky 12,5 cm od sebe, hustota výsevu 1000 semen na 1 m², do hloubky 1 cm. Odolnost genotypů k chorobám byla hodnocena v období přechodu z fáze zelené do fáze žluté zralosti. K hodnocení byla použita bodová stupnice od 1 (bez napadení) do 5 (rostliny zcela napadené). V pozdně žluté až plné zralosti byl porost desikován a sklizen maloparcelkovým kombajnem Wintersteiger. Po dosušení na 9% vlhkost byla semena přečištěna a zvážena. Byly vyhledávány genotypy s kombinací vysokého výnosu a odolností k *Alternaria linicola* a *Oidium lini* a ke komplexu dalších chorob způsobujících hnědnutí stonku.

Výsledky a diskuse

1) Po křížení linií lnu se zeleným (NLN 245) a žlutozeleným (NLN 14C2) prýtem byly v F1 generaci v obou reciprokých kříženích nalezeny jen rostliny se zelenými prýty. Tab. 1 uvádí štěpné poměry zjištěné v F2 generaci.

Tabulka 1: Štěpné poměry a výsledky χ^2 testu v F2 generaci reciprokých křížení mutantní linie se žlutozeleným prýtem a linie výchozí - standardní

	Zjištěný počet rostlin s prýty		Celkem rostlin	Výsledek χ^2 testu	
	zelenými	žlutozelenými		štěpného poměru 3:1 $p_{(1)}$	identity reciprokých křížení $p_{(1)}$
NLN 245 x NLN 14C2	105	32	137	0,657	0,1255
NLN 14C2 x NLN 245	118	41	159	0,819	

Výsledky χ^2 testu dokazují, že získané štěpné poměry zelených a žlutozelených prýtů v F2 generaci odpovídají teoretickému poměru 3:1 a že reciproká křížení jsou identická. Z toho vyplývá, že znak žlutozelený prýt je řízen monogenně a že je recesivní vůči zelenému prýtu. Barva prýtu je zřejmě dána sníženou schopností tvorby chlorofylu v listech a stoncích. Ve srovnání s výchozí linií je mutantní linie o 4 dny pozdnější, rostliny jsou nižší, linie dosahuje nižšího výnosu semene (91,88 %). V ostatních znacích se obě linie neliší. Tato mutace je zajímavá především tím, že je spolehlivě odlišitelná od standardního fenotypu již ve fázi stromečku. Možnosti rané detekce hybridů mezi recesivními homozygoty bylo například využito ke stanovení frekvence nekontrolovaného cizosprašení při studiu přenosu pylu hmyzem ve lnu v rámci řešení projektu NAZV QC 1362 a v současnosti v rámci výzkumného záměru MŠMT MSM 2678424601. Tato mutace může být také dobrým markerem v genetických studiích.

2) Mezi odrůdami použitými v křížení olejních lnů vynikala jako zdroj ranosti a odolnosti k padlí francouzská odrůda Jupiter. Obr. 2 ukazuje štěpící populaci vzniklou křížením Atalante x (Laura 1/1/1 x Jupiter) po 3 opakovaných selekcích na odolnost k padlí. Jupiter je však současně nositelem náchylnosti k *Alternaria linicola*. Dalším zdrojem odolnosti k padlí je čínská linie K 88-12, která sama v odolnosti k padlí štěpí.

Zkombinovat v jednom genotypu vysoký výnos a odolnost k více chorobám je šlechtitelsky obtížný úkol. Materiály vynikající po zdravotní stránce často nedosahují výnosů genotypů náchylných k některé z chorob. Orientační výsledky z testování novošlechtění ve školce v r. 2005 však ukazují, že je možné zkombinovat odolnost k *Oidium* s odolností k *Alternaria* a že je možné dosáhnout i u rezistentních genotypů vysokých výnosů (Tab. 2). Linie 496/2005, vzniklá křížením K 88-12 x Atalante, je odolná jak k padlí, tak k černi lnu a dosahuje výnosu Atalante. Linie 583/2005, vzniklá z odrůdy Areco mutagenezí, je po zdravotní stránce srovnatelná s Atalante, ale výnosem semene ji překonává.

Tabulka 2: Nadějná novošlechtění ve školce v r. 2005

Genotyp	Původ	Výnos semen		Odolnost	
		z parcelky 0,6m ² (g)	přepočteno (t.ha ⁻¹)	k <i>Alternaria linicola</i>	k <i>Oidium lini</i>
Atalante		156	2,6	1,52	3,25
496/2005	K 88-12 x Atalante	177	2,9	1,15	1,00
583/2005	Areco po mutagenezí	216	3,6	1,35	3,30

3) Selekcí v materiálu po chemomutagenezí byly získány linie se změněným obsahem MK v semenném oleji (obr. 3). Linie 1193 vykazuje zvýšený obsah kyseliny palmitové, linie 1192, 1993, 1195, 1196 a 1197 zvýšený obsah kyseliny olejové, linie 1192, 1196, 1197, 1198 a 1199 zvýšený obsah kyseliny linolové a snížený obsah kyseliny linolenové. Na analýzách jednotlivých semen (obr. 4) je patrná vyrovnanost hodnot pro jednotlivé MK v rámci jednotlivých vybraných rostlin. Tab. 3 ukazuje, u kterých z 15 testovaných jednotlivých rostlin jsou odchylky v obsahu jednotlivých mastných kyselin statisticky významné.

Tabulka 3: Průkazné odchylky v obsahu mastných kyselin ve vybraných rostlinách od kontrolní odrůdy se standardní skladbou mastných kyselin v semenném oleji

Č. linie	Původ	Č. testovaných rostlin	Číslo rostlin s průkaznými odchylkami (p=0,05) od standardního obsahu MK				
			palmitová	stearová	olejová	linolová	linolenová
1192	Te 60/69k/3/1/3	1-20			12,17	12	12,17
1193	Te 60/69k/3/1/6	21-39	21-23, 25,30,33, 34	23	21,22,23,25,30, 34	21	21-23, 25,30,34
1195	Te 60/71k/625/91/1	41-60			48,52		48,52
1196	Te 60/100/652/5	61-80			63,78	63,77,78,96	63,77,78
1197	Te 60/100/652/10	81-100					96

Genotypy s různou skladbou MK v semenném oleji jsou vhodné ke studiu dědičnosti tvorby MK v semenném oleji lnu setého.

4) Výnosové zkoušky dovolují vybrat z novošlechtění linie perspektivní a vyřadit linie s horšími parametry než u kontrolních odrůd. Část výsledků z roku 2005 ukazují obr. 5 a 6. Genotypy s nejnižšími výnosy nejsou do grafů zahrnuty.

Z porovnání grafů znázorňujících výnos semen s grafy odolnosti k chorobám (obr. 7 až 10) vyplývá, že genotypy s vyšší odolností k *A. linicola* dávaly výnosy na úrovni kontrol nebo vyšší (kromě jediné), zatímco genotypy odolné k *O. lini* dosahovaly jak nižších, tak srovnatelných i vyšších výnosů než kontrolní odrůdy.

Všechny linie s vyšší odolností k uvedeným chorobám (zahrnuté do grafů na obr. 7 až 10) byly zahrnuty i do grafů výnosu semene. Linie s nejnižšími výnosy, do grafů výnosů nezahrnuté, byly silně náchylné k některé ze sledovaných chorob. Naproti tomu však linie AGT 984/02 nebo AGT 987/02, vykazovaly poměrně silné napadení *O. lini* a slabé i *A. linicola*, přesto dosahovaly mezi nízkolinolenovými nejvyšších výnosů. Zřejmě se u nich uplatňuje tolerance k těmto chorobám.

Z obr. 7 až 10 vyplývá, že u sledovaných genotypů existuje záporná korelace v odolnosti k *A. linicola* a k *O. lini*. Genotypy nejodolnější k *A. linicola* nevykazovaly vyšší odolnost k *O. lini* a naopak. Tab. 4 ukazuje korelační koeficienty pro celou testovanou skupinu vysokolinolenových a celou skupinu nízkolinolenových linií.

Tabulka 4: Vztah mezi odolností k *Alternaria linicola* a *Oidium lini* v testovaných souborech genotypů vyjádřená korelačním koeficientem r_{OA}

Linie	r_{OA}	t	$t_{(0,01)}$	$t_{(0,001)}$	významnost
Vysokolinolenové	-0,444	2,889	2,75	3,65	**
Nízkolinolenová	-0,887	11,035	2,75	3,65	***

Přesto však již byly získány genotypy s kombinovanou odolností k oběma chorobám, jak již bylo uvedeno výše. Tyto materiály budou využity ke kombinačnímu křížení s genovými zdroji odolnosti k *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*, - další významnou chorobou olejného lnu v ČR i ve světě.

Literatura

1. RAKOUSKÝ, TEJKLOVÁ, E. - OHNOUTKOVÁ, L. - KOCÁBEK, T. - ŠERHANTOVÁ, V., HALÁMKOVÁ, E.: Transformation for flax breeding. In: Abstr. from 5th Int. Symp. Seri. Recent Advances in Plant Biotechnology: Plant Biotechnology: Progress and Developments, Stará Lesná, Slovak Rep., Sept. 7-13, 2003, p. 78., IPGB SAS Nitra. 2003.
2. TEJKLOVÁ, E.: Induced mutagenesis in flax (*Linum usitatissimum* L.). In: Breeding for Fiber and Oil Quality in Flax. Proc. 3rd Meeting of Internat. Flax Breeding Res. Group, St. Valéry en Caux, France, 1995, pp. 42-50.

Tento příspěvek vznikl za podpory NAZV a MŠMT při řešení projektů QE 1123, ME 210, ME 703 a výzkumného záměru MSM 2678424601.

Adresa autorů:

RNDr. Eva Tejklová* **, Ing. Bohumila Matysová*, Mgr. Jiří Horáček* **, Ph.D., Ing. Lenka Odstřčilová* **, Ing. Martin Pavelek, CSc.*

*Agritec, výzkum, šlechtění a služby s.r.o. Šumperk, Zemědělská 16, 787 01 Šumperk

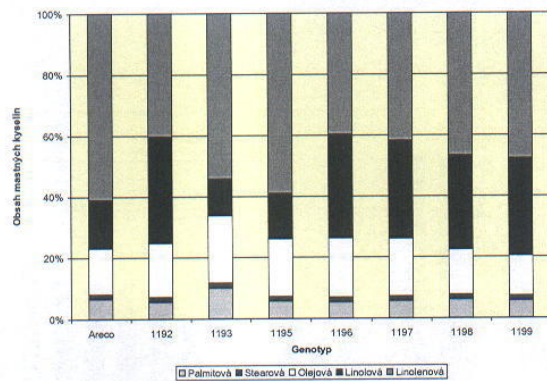
**Agritec, Plant Research s.r.o. Šumperk, Zemědělská 16, 787 01 Šumperk

Obr. 1. Rodičovské línie použité pro stanovení dědičnosti žlutozelené barvy prýtu: línie NLN 14C2 s mutantním žlutozeleným prýtem (vlevo), výchozí línie olejného lnu NLN 245 se standardním zeleným prýtem (vpravo). →

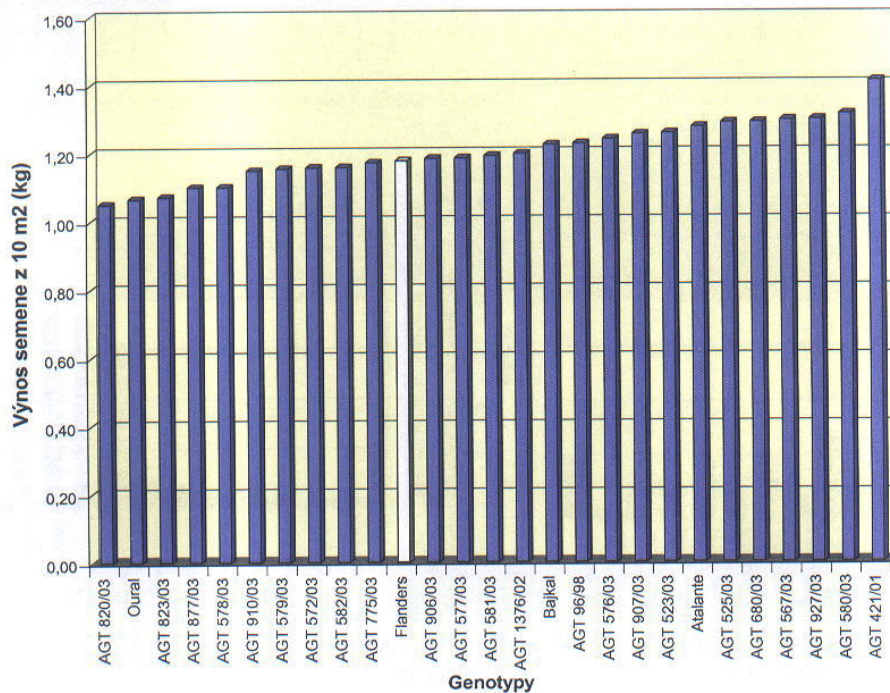
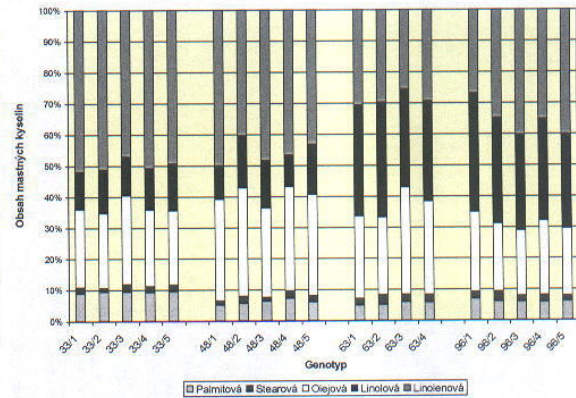


← Obr. 2. Potomstvo 503/2005 (Atalante x (Laura 1/1/1 x Jupiter)) štěpící v odolnosti k padlí. Vlevo odolné rostliny, vpravo rostlina silně napadená padlím.

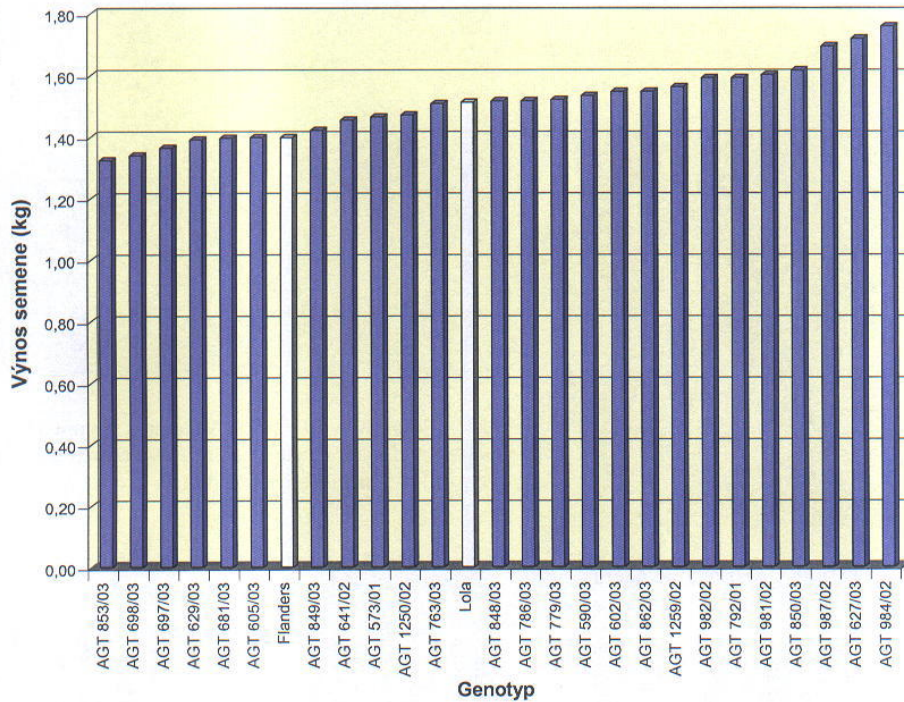
Obr. 3. Obsah mastných kyselin v klasické odrůdě lnu Areco a liniích odvozených z materiálu po mutagenezi.



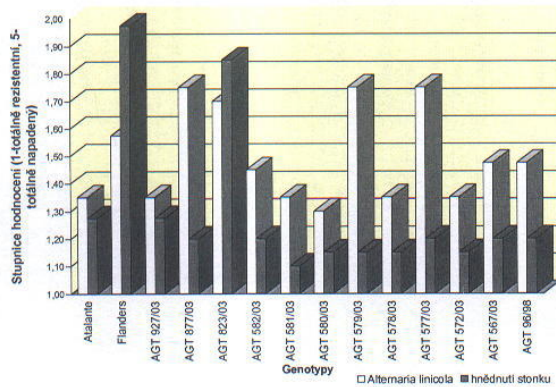
Obr. 4. Obsah mastných kyselin v semenném oleji v jednotlivých semenech jednotlivých rostlin



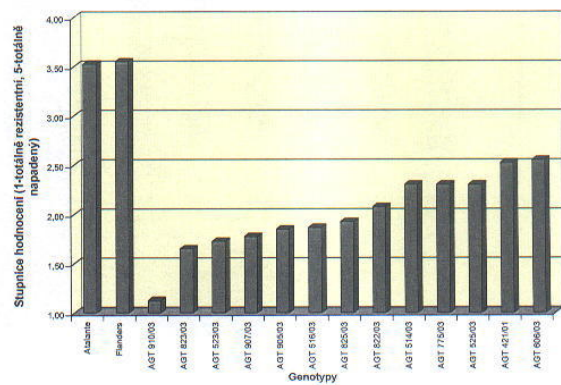
Obr. 5. Výnos semene u vysokolinolenových olejních lnů z plochy 10m². Kontrolní odrůda Flanders.



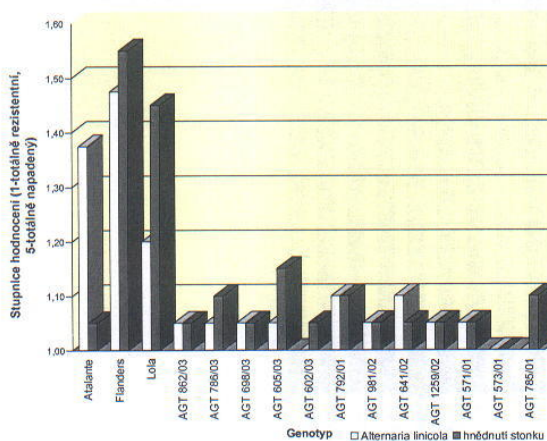
Obr. 6. Výnos semene u nízkolinolenových olejních lnů z plochy 10m². Kontrolní odrůda vysokolinolenová Flanders, nízkolinolenová Lola.



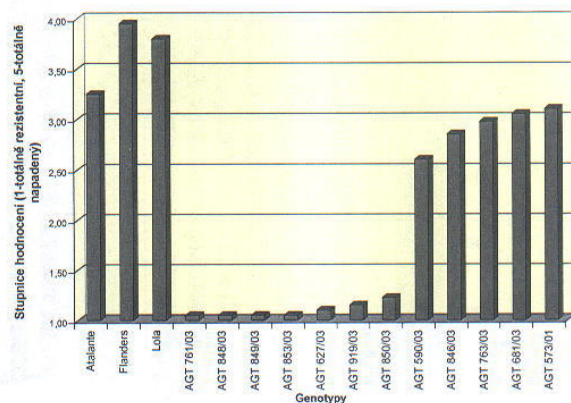
Obr. 11. Odolnosť vysokolinolenových olejních lnů k *Alternaria linicola* a hnědnutí stonků.



Obr. 12. Odolnosť vysokolinolenových olejních lnů k *Oidium lini*.



Obr. 13. Odolnosť nízkolinolenových olejních lnů k *Alternaria linicola* a hnědnutí stonků.



Obr. 14. Odolnosť nízkolinolenových olejních lnů k *Oidium lini*.

HODNOCENÍ GENOFONDU LÉKOŘICE (*GLYCYRRHIZA L.*, *FABACEAE*) Z HLEDISKA OBSAHU GLYCYRRHIZINU EVALUATION OF GENE RESOURCES COLLECTION OF LIQUORICE (*GLYCYRRHIZA L.*, *FABACEAE*) - CONTENT OF GLYCYRRHIZIN

Jarmila NEUGEBAUEROVÁ

Glycyrrhiza L. is a perennial medicinal plant and a genetic resources collection of this genus is maintained at the Horticultural Faculty in Lednice, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno since 1995. The dried roots and stolones, whole or cut and peeled, have many uses mainly in pharmacy and food technology. In the years 2001, 2002 and 2005 a total of 5 genotypes (two accessions of *Glycyrrhiza glabra L.*, *G. echinata L.*, *G. uralensis Fish.*, *G. pallidiflora Maxim.*) were classified by using of selected economical characters according the Czech descriptor list. Along with 25-30% of starch, 3-10% of glucose and sucrose, coumarins, triterpenoids, sterols and other compounds, the drug contains also flavonoids and saponins, whose pharmacological activity is attributed. The saponins are mainly represented by glycyrrhizin (also know as glycyrrhizic acid) in liquorice and a HPLC method for its identification and calibration were used in this experiment.

Key words: *Glycyrrhiza L.*, content matters, genotypes, glycyrrhizin (glycyrrhizic acid), HPLC

Úvod

Rod *Glycyrrhiza L.* je zařazen mezi vytrvalé léčivé rostliny a jeho genofond je udržován na Zahradnické fakultě v Lednici, Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně od roku 1995. Podle navrženého klasifikátoru jsou hodnoceny znaky hospodářské, mezi které patří i hodnocení drogy – lékořicového kořene (*Liquiritiae radix*). Rozdílné hodnoty v obsahu glycyrrhizinu (kyselině glycyrrhizové) jsou jedním z kritérií při posuzování jednotlivých položek genofondu. Minimální množství glycyrrhizinu pro *Glycyrrhiza glabra L.* jsou 4% (Český lékopis 2002) v *Glycyrrhiza echinata L.* bylo zjištěno množství 0,5% (KAŠPAROVÁ, 2003).

Materiál a metody

V letech 2001, 2002 a 2005 bylo hodnoceno pět položek genofondu lékořice. Dvě položky *Glycyrrhiza glabra L.*, po jedné položce *Glycyrrhiza echinata L.*, *Glycyrrhiza uralensis Fish.* a *Glycyrrhiza pallidiflora Maxim.* Oddenky a kořeny byly sklizeny v termínech září až říjen. Podle navržené stupnice klasifikátoru byl hodnocen povrch a barva kořenů, barva kořenů na příčném řezu, procento sušiny a glycyrrhizinu. Celkový obsah sušiny byl stanoven gravimetricky jako rozdíl hmotnosti vzorků sušených při 105⁰ C (JAVORSKÝ et al., 1987). Stanovení obsahu glycyrrhizinu bylo provedeno dle Českého lékopisu 2002. Kořeny byly po usušení pomlety na jemný prášek, z něj bylo odebráno předepsané množství (1g) a převedeno do roztoku amoniaku (17,5%).

Obsah kyseliny glycyrrhizové byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) při použití režimu s obrácenými fázemi, s detekcí v ultrafialové oblasti (UV) spektra. Kvalitativní stanovení bylo provedeno z retenčních dat, kvantitativní stanovení z ploch (výšek) píků vzorku a standardu. Kapalinový chromatograf ECOM (CZ) sestává z částí: analytické čerpadlo LCP 4000.1 (ECOM), dávkovací analytický smyčkový ventil (ECOM), vnější smyčka 20 µl (ECOM), UV-VIS detektor LCD 2082.2 (ECOM), 254 nm a analytické kolony CGC 3x150 Separon SGX C 18,7 µm (TESSEK). Mobilní fázi je kyselina octová, acetonitril a voda 6:30:64 (v:v:v).

Výsledky a diskuze

Na základě zjištěných hodnot byly jednotlivé položky genofondu hodnoceny stupnicí pro povrch kořene 1 (rozpraskaný) až 2 (korkovitý); barva kořenů na povrchu 3 (hnědožlutá) až hnědá, na průřezu 1 (žlutobílá) až 2 (jasně žlutá); procento sušiny 1 (malé) až 4 (vysoké); procento glycyrrhizinu 1 (malé) až 3 (vysoké). Obsah glycyrrhizinu se pohyboval v rozmezí 0,4-4,2%. *Glycyrrhiza glabra L.*, která může být jediným matečným druhem pro získání drogy (*Liquiritiae radix*) vyhovuje podmínkám Českého lékopisu 2002 na rozdíl od ostatních položek genofondu.

Závěr

Vizuálním hodnocením byly zjištěny rozdíly v charakteru povrchu a barvě čerstvých kořenů lékořice. Položky genofondu *Glycyrrhiza glabra L.* mají kořeny na povrchu barvu hnědou, na příčném řezu jsou jasné žluté, sytost barvy není závislá na rozdílném původu těchto položek (Lednice, Simferopol). Vyšší procento sušiny bylo rovněž zjištěno u položek *Glycyrrhiza glabra L.* Stejně jako obsah glycyrrhizinu (kyselině glycyrrhizové). *Glycyrrhiza glabra L.* spolu s *Glycyrrhiza uralensis Fisch.* patří do sekce *Euglycyrrhizae* BOISS., druhy *Glycyrrhiza echinata L.* a *Glycyrrhiza pallidiflora Maxim.* patří do sekce odlišné - *Pseudoglycyrrhizae* KURG., druhy této sekce podle KRUGANOVÉ (1966) glycyrrhizin neobsahují.

Literatura

1. BRUNETON, J.: Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants, Lavoisier Publishing, Paris, 1999, ISBN2-7430-0316-2
2. Český lékopis 2002, Grada Publishing, Praha, ISBN 80-247-0464-1
3. EVIGEZ: Evidence genetických zdrojů rostlin v ČR: Český informační systém [online]. Praha: VÚRV Praha-Ruzyně, [cit. 2005-15-10]. Aktualizováno 7.12.2004. Dostupné na WWW: <http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/default.htm>
4. JAVORSKÝ, P. et al.: Chemické rozbory v zemědělských laboratořích I. díl MZVž ČSR, České Budějovice, 1987
5. KAŠPAROVÁ, P.: Hodnocení a rozšíření genofondu lékořice (*Glycyrrhiza* L.) Diplomová práce, ZF MZLU Lednice, 2003.
6. KRUGANOVA, E. A.: Voprosy izučeniija i ispolzovaniija solodky v SSSR, Meteor, Leningrad, 1966.
7. PETŘÍKOVÁ, K. – HOLÁ, Z. - KAŠPAROVÁ P.: Minimální sada deskriptorů pro lékořici *Glycyrrhiza* L., MZLU Brno ZF Lednice, 2003

Výsledky byly získány s finanční podporou MZe ČR v rámci "Národního programu konzervace a využití genofondu rostlin a agro-biodiversity"

Adresa autora

Jarmila Neugebauerová, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, Zahradnická fakulta Lednice, Ústav zelinářství a květinářství, Valtická 337, 691 44 Lednice, Česká republika, neugebj@zf.mendelu.cz

EVIDENCE VÝSKYTU STARÝCH A KRAJOVÝCH ODRŮD VE VYBRANÝCH LOKALITÁCH ČR RECORDING THE OCCURRENCE OF OLD AND REGIONAL VARIETIES IN SELECTED LOCALITIES OF THE CZECH REPUBLIC

Vojtěch ŘEZNÍČEK

It is beyond dispute that concentrated genetic resources of old vanishing varieties and of regional varieties connected with a specific area have an economic and cultural value given by their authentic quality and irretrievability. This is a topic carried out at the Department of Breeding and Propagation of Garden Plants, Faculty of Horticulture Lednice, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, in the form of final-year, bachelor and PhD theses.

Besides own records we also evaluate growth data (height of tree, width of crown etc.), harvesting data (quantity and quality), overall health of harvest (susceptibility to diseases and pests). Attention has so far been paid to the following regions: Hranice – 310 apple trees, 81 pear trees; Kladruby nad Labem – 220 apple trees, 2 pear trees; Kunštát – 852 apple trees, 55 pear trees; Tišnov – 780 apple trees, 121 pear trees; Opava – 430 apple trees, 22 pear trees; Šumperk – 116 pip-fruit trees; Třeboň – 630 fruit trees; Walachia region in Moravia – 950 trees evaluated on two dates. The most frequently occurring varieties of apples trees were: Jadernička moravská, Panenské české, Strymka; and of pear trees: Charneuská, Muškátelka šedá, Konference. Pomological characteristics were elaborated for the as yet not described varieties (apple trees: Lecar, Šarlatka boračská, Kanefl; pear trees: Neznámka, Fajfka, Knížatka, Mendlovka, Šedulka, Špidlenka).

Keywords: old and regional varieties, pomology, records of varieties, apple trees, pear trees.

Úvod

Ovocné stromy jsou neodmyslitelnou součástí venkovské i městské krajiny. Ovocné zahrady u domu, ovocné sady navazující na selská hospodářství, ovocné aleje či stromořadí se vyskytují v našich regionech již od středověku. Svědčí o tom značný počet starých a krajevých odrůd, které se v hojné míře pěstovaly ještě na začátku minulého století a dodnes se s nimi setkáváme v řadě lokalit. Vznik těchto odrůd byl procesem samovolným, který vyplýval především z vysoké plošné hustoty a tradice pěstování. Většinou u těchto odrůd neznáme jejich původ, vznikly často náhodně a vzhledem ke svým kvalitám se dále šířily do okolí. Jejich předností je nejen dokonalá přizpůsobivost k půdně klimatickým podmínkám, ale i vysoká odolnost k celé řadě škodlivých činitelů. Mnohé z těchto odrůd se i v současné době jeví zajímavě ve šlechtitelských programech jako donory rezistence (odolnost vůči houbovým chorobám, nízké teplotě, zamokření, zasolení, suchu apod.). Vysazují se v marginálních oblastech, některé se přímo uplatňují v ekologických systémech pěstování.

Soustředěvané genetické zdroje jak starých zanikajících odrůd tak i krajevých vázících se k určité oblasti mají nespornou ekonomickou i kulturní hodnotu, která je dána jejich originalitou a nenahraditelností, jsou součástí kulturního dědictví lidstva, svědčí o bohatosti krajiny. Přímý ekonomický efekt z využívání genetických zdrojů nelze zatím přesně finančně vyčíslit, avšak společensko-hospodářské využívání a ochrana genofondu je strategickým úkolem lidstva.

Materiál a metody

Získávání informací o existenci výskytu starých a krajevých odrůd ovocných dřevin je základem záchranářských prací. Zadanými bakalářskými, diplomovými a doktorandskými pracemi na Ústavu šlechtění a množení zahradnických rostlin Zahradnické fakulty Lednice MZLU v Brně jsou postupně zpracovávány vybrané oblasti. Do současné doby byla pozornost věnována těmto oblastem: Hranicko, Kladruby nad Labem, Kunštátsko, Olomoucko, Opavsko, Šumpersko, Tišnovsko, Třebíčsko, Třeboňsko, Valašsko. Evidence v těchto oblastech byla zaměřena na ovocné zahrady u domů či selských hospodářství, na aleje, stromořadí a polní sady.

Ke zjišťování výskytu bylo použito metod historického a etnografického bádání včetně odborného terénního výzkumu. Mimo vlastní evidence byly hodnoceny růstové údaje (výška stromu, šířka koruny, průměr kmene, objem koruny), sklizňové hodnoty (velikost sklizně, pomologické hodnocení, hospodářské využití), celkový zdravotní stav (9 bodová stupnice, modifikace metodiky UPOV-VŠÚO Holovousy), citlivost k chorobám a škůdcům (stupnice VŠÚO Holovousy), návrh vhodnosti využití stromů pro záchranu genofondu.

Závěrečné hodnocení uvedené lokality shrnuje experimentální výsledky v návaznosti na možnost dalšího uplatnění a využití odrůd ve šlechtění, doporučení odrůd pro nenáročnou pěstování v alternativním zemědělství, ozelenění krajiny, při realizaci projektů biokoridorů, skupinových výsadeb, alejí, polních cest a silnic nižších řádů.

Dosažené výsledky

HRANICKO (Hranice na Moravě)

Historie a současný stav: Krajská ovocná školka založená v Hranicích roku 1903 a ustanovení okresního zahradníka vedly k rozvoji ovocnářství, byly konány ovocnářské přednášky, kurzy. Evidence byla zaměřena na zbytky starých sadů, sledováno bylo 15 lokalit v katastru města Hranice na Moravě.

Výsledky evidence: Celkem bylo zaevidováno 310 stromů jableň a 81 stromů hrušň. Největšího zastoupení dosáhla u jableň odrůda 'Jadernička moravská', dále pak 'Croncelské', 'Citrónové zimní', 'Banánové zimní', 'Boskoopské červené', 'Gdáňský hranáč', 'Kaselská reneta', 'Panenské české', 'Matčino', 'Strýmka'. Z hrušň pak odrůda 'Pchavka', 'Williamsova', 'Konference', 'Charneuská', 'Solnohradka', 'Pařížanka', 'Špinka' a místní odrůda 'Ploštica'.

KLADRUBY NAD LABEM (areál Národního hřebčína s.p. Kladruby nad Labem)

Historie a současný stav: Historie samotného hřebčína sahá do 16. století a souvisí s existencí andaluského koně na pardubickém panství. V roce 1992 vznikl Národní hřebčín Kladruby nad Labem s.p. a v roce 1995 se stal areál včetně rasy starokladrubského koně státní kulturní památkou. Ovocné sady byly v areálu hřebčína vysazeny ve 30. letech 20. století. Hlavní alej (původně trojřadá, dnes dvojřadá), příjezdová cesta k Josefovou dvoru i třetí alej mezi padokem a Josefovým dvorem slouží jako výběh pro koně, všechny aleje jsou zatravněny a pravidelně koseny.

Výsledky evidence: V alejích se nachází 220 jableň a 2 hrušně. Nejčastěji se vyskytují odrůdy 'Vilémovo', 'Ribstonské', 'Parména zlatá zimní', 'Boskoopské', 'Boikovo', 'Blenheimská reneta', 'Strýmka', 'Hájkova muškátová reneta', 'Parkerovo', 'Baumannova reneta' a 'Croncelské'.

KUNŠTÁTSKO

Historie a současný stav: Ovocnictví v této oblasti je spojeno s bohatou historií Brněnského kraje, zejména vznikem spolků, které šířily ovocnářskou osvětu, ale i s řadou významných osobností (prof. Miloslav Vávra). Velký vliv lze připsat ovocné škole ve Vanovicích a šlechtitelské práci školkaře Vlka. V poválečném období pak zkušebně ÚKZÚZ v Lysicích. Evidence probíhala v katastrech obcí Kunštát, Rozseč nad Kunštátem, Zbraslavce, Sebranice, Vřesice, Žerůtky, Crhov, Olešnice.

Výsledky evidence: Celkem bylo zaevidováno 852 jableň a 55 hrušň. Z jableň se nejčastěji vyskytují 'Panenské české', 'Boskoopské', 'Baumannova reneta', 'Parména zlatá zimní', 'Boikovo obrovské', 'Boikovo', 'Landsberská reneta', 'Sudetská reneta', 'Gascoygného šarlatové', 'Harbertova reneta', 'Croncelské', 'Blenheimská reneta', 'Strýmka', 'Grávštýnské', 'Jadernička moravská', 'Smiřické', 'Kmínová reneta', 'Vilémovo', 'Gdáňský hranáč'. Z hrušň jsou nejvíce zastoupeny odrůdy 'Hardyho', 'Pařížanka', 'Dielova', 'Boscova', 'Drouardova', 'Merodova', 'Špinka'.

TIŠNOVSKO (Lomnice, Nedvědice)

Historie a současný stav: Archivní prameny uvádějí, že tišnovský region byl proslaven pěstováním ovocných stromů nejen pro prodej stolního ovoce, ale i pro různé způsoby zpracování – lisování, sušení, výroba vína, povidla apod. Pro průzkum stávajících výsadeb byla vybrána katastrální území obcí Borač, Deblín, Doubravník, Husle, Jilmoví, Lomnice, Nedvědice, Podolí, Tišnov, Újezd, Železná a Žernůvka.

Výsledky evidence: Celkem bylo zaevidováno 780 stromů jableň a 121 stromů hrušň. Pro sledovanou oblast jsou nejtýpější následující odrůdy jableň: 'Vilémovo', 'Panenské české', 'Blenheimská reneta', 'Lecar', 'Smiřické vzácné', 'Baumannova reneta', 'Kaselská reneta', 'Boikovo', 'Boskoopské', 'Boskoopské červené', 'Ribstonský jadernáč', 'Parména zlatá zimní', 'Kardinál žiháný', 'Šarlatka boračská', 'Gdáňský hranáč', 'Strýmka', 'Landsberská reneta'. Z hrušň: 'Neznámka', 'Muškátelka šedá', 'Knížatka', 'Clappova', 'Charneuská', 'Křivice', 'Williamsova', 'Šedá letní'.

OLOMOUCKO (Velký Týnec)

Historie a současný stav: Stromořadí vysazené v katastru obce Velký Týnec je poměrně mladší, výsadba byla uskutečněna až po 2. světové válce. Stromy nejsou pravidelně ošetřovány, prosychají a jsou zanedbané.

Výsledky evidence: Ve stromořadí se nachází 61 jableň a 6 hrušň. Z jableň se vyskytují odrůdy 'Ananasová reneta', 'Baumannova reneta', 'Bernské růžové', 'Červené tvrdé', 'Gdáňský hranáč', 'Gustavovo trvanlivé', 'Malinové holovouské', 'Jadernička moravská', 'Jonathan', 'Matčino', 'Ochranovské', 'Strýmka', 'Vilémovo'.

OPAVSKO (Raduň, Vršovice, Komárov, Opava)

Historie a současný stav: O rozvoj ovocnictví v regionu se v 19. století zasloužil dobroslavský rodák Karel Buček, jehož zásluhou se šířily ušlechtilé odrůdy po celém okolí. Staré ovocné dřeviny se nyní nacházejí především v menších soukromých zahradách, alejích, stromořadích. Věk těchto stromů se pohybuje mezi 80 – 120 lety.

Výsledky evidence: Celkem bylo zaevidováno 430 jableň a 22 hrušň. Z jableň se nejčastěji vyskytují odrůdy 'Boikovo', 'Strýmka', 'Boskoopské', 'Croncelské', 'Jadernička moravská', 'Ontario', 'Průsvitné letní', 'Panenské české', 'Studničné', 'Rederova reneta', 'Landsberská', 'Gdáňský hranáč', 'Knížecí zelené', 'Krasokvět žlutý'. Významný je výskyt hrušň 'Charneuská', 'Pařížanka', 'Konference', 'Hájka', 'Křivice'.

ŠUMPERSKO (Bludov, Velké Losiny)

Historie a současný stav: Ovocnářství v této oblasti je spojeno se šlechtitelským rodem pánů ze Žerotína. Významnou ovocnářskou osobností byl zámecký zahradník a šlechtitel Jan Marek působící v Bludově koncem 19. století. Vyšlechtil odrůdu Sudetská reneta, která byla rozmnožována ještě v 60. letech 20. století. Do současné doby se ucelenější zbytky výsadby zachovaly v zemědělsky méně využívaných místech ve vyšších polohách, ve stromořadích silnic, polních cest, ale i v menších soukromých zahradách a areálech historických objektů.

Výsledky evidence: V katastru obce Bludov (Františkova alej, Matušková hráz – ve středu obce) bylo zaevidováno 116 stromů jaderovin. Nejvíce jsou zastoupeny odrůdy jabloní 'Banánové zimní', 'Berlepschova', 'Boskoopské', 'Boskoopské červené', 'Gdánský hranáč', 'Hedvábné pozděkvěté', 'Jadernička moravská', 'Parména zlatá zimní', 'Sudetská reneta'. Z hrušní odrůda 'Špinka'.

Stáří stromů v katastru obce Velké Losiny se pohybuje od 50 do 80 roků. Hodnoceno bylo 17 lokalit a zjištěno 31 odrůd jabloní. Nejčastěji se vyskytují odrůdy 'Bernské růžové', 'Gustavovo trvanlivé', 'Kardinál žiháný', 'Kaselská reneta'.

TŘEBÍČSKO (Brtnice – Uhřínovice)

Historie a současný stav: Alej byla vysazena ve 30. letech 20. století v době, kdy Brtnici vlastnil Manfred Collalto. Uhřínovská alej je jednostranná, tvořena především jabloněmi. V roce 2000 byl pod patronací Centra ekologické výchovy – Chaloupky u Kněžic – proveden odborný řez a podsadba v chybějících partiích.

Výsledky evidence: Celkový počet evidovaných stromů byl 95 a nejvíce zastoupeny odrůdy jabloní 'Coulonova reneta', 'Studničné', 'Strýmka', 'Karinál žiháný', 'Boikovo', 'Parména zlatá zimní', 'Šampaňská reneta', 'Baumannova reneta', 'Jadernička moravská'.

TŘEBOŇSKO

Historie a současný stav: Na utváření krajiny Třeboňska se již od 12. století podílel člověk úpravami vodních poměrů této močalovité krajiny. Důmyslná síť umělých stok a uměle zakládané rybníky budované v několika etapách od středověku do současnosti představují dokonalý systém postupných, koordinovaných krajinářských úprav. Inventarizace byla provedena v katastru obcí Dunajovice, Lišov, Lomnice nad Lužnicí a v alejích mezi obcemi Lišov – Hůrky a Hůrky – Slověnice.

Výsledky evidence: Celkem bylo hodnoceno 630 stromů jaderovin: 595 jabloní, 35 hrušní a 81 stromů slivoní. U jabloní se nejčastěji vyskytovaly odrůdy 'Strýmka', 'Jonathan', 'Croncelské', 'Parména zlatá zimní', 'Boikovo', 'Landsberská reneta' a 'Průsvitné letní'. Z hrušní 'Clappova', 'Esperenova', 'Muškateľka turecká', 'Nelisova zimní'.

VALAŠSKO (Bílá Karpaty)

Historie a současný stav: Ovocnictví na Valašsku mělo převážně extenzivní charakter. Ovoce se pěstovalo k přímé spotřebě, ale známé jsou i různé způsoby zpracování: výroba destilátů, sušení apod. Evidence starých odrůd probíhala v katastru obcí Brumov, Bylnice, Sidonie, Svatý Štěpán a Štítná nad Vláří převážně v soukromých zahradách. V návaznosti bylo přistoupeno k pokračování a vybráno 9 lokalit v obcích Lidečko, Horní Lideč a Študlov.

Výsledky evidence: Při první evidenci (Brumov, Bylnice, Sidonie, Svatý Štěpán, Štítná nad Vláří) bylo zaevidováno 361 stromů jabloní a 19 stromů hrušní. Z jabloní se nejčastěji vyskytují odrůdy 'Jadernička moravská', 'Kožená reneta podzimní', 'Landsberská reneta', 'Panenské české', z hrušní 'Děkanka šedá podzimní', 'Charneuská', 'Muškateľka šedá', 'Špinka', 'Pařížanka'.

V rámci druhé evidence bylo hodnoceno 589 stromů: 312 jabloní, 43 hrušní, 211 švestek a 17 durancí.

Závěr

Ve vybraných lokalitách byla hodnocena mimo růstových, sklizňových, zdravotních údajů také hospodářská využitelnost – organoleptické posouzení plodů včetně skladovatelnosti a určení pro stolní či průmyslové využití. U odrůd zařazených pro záchranu genofondu byla respektována pravost odrůdy a výběr nejkvalitnějšího klonu. Navrhované stromy jsou v evidenci podchyceny tak, aby byly schopné pro odběr množitelského materiálu.

Ze statistického hodnocení vybraného souboru vyplývá:

- výška stromu byla statisticky významně ovlivněna lokalitami a vysoce významně odrůdami
- variabilita šířky koruny byla statisticky významně ovlivněna lokalitami a vysoce významně odrůdami, vzájemné působení odrůd a lokalit vykazovalo vysoce významný vliv na variabilitu šířky koruny
- průměr kmene nebyl významně ovlivněn lokalitami, ale vysoce významně odrůdami
- variabilita zdravotního stavu byla statisticky vysoce ovlivněna lokalitami a odrůdami.

Změnou vlastnických vztahů k půdě a priorit zemědělské výroby dochází v nynějším období k výrazné likvidaci starých sadů a stromořadí. Tím se zvyšuje nebezpečí ztráty krajových forem ovocných druhů na našem území. Vzniklou situaci si řada odborníků uvědomuje a snaží se informovat odbornou i širokou veřejnost a aktivizovat různé iniciativy pro záchranu stávajících a pro obnovu soliterně rostoucích i alejových

stromů, jakož i extenzivních sadů českého a moravského venkova vzhledem k jejich mnohostrannému ekologickému, sociálnímu, estetickému i symbolickému významu. Žádný jiný dřevinný ovocný druh nemůže být lepší pro rozvoj biologické diverzity v konkrétní lokalitě než ten, který z ní pochází.

Literatura

1. BOČEK, S.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Kunštátska. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 87 s.
2. DOKOUPIL, L.: Studium genofondu starých a krajových odrůd jaderovin v oblasti Lomnicka, Tišnovska, Nedvědice a možnosti jejich využití ve šlechtění. Disertační práce MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2000, 186 s.
3. HORÁKOVÁ, I.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Olomoucka. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 66 s.
4. KNAPOVÁ, M.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti CHKO a BR Bílé Karpaty. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 71 s.
5. KUBICA, J.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Valašska. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2004, 78 s.
6. ONDRÁČEK, Z.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Velkých Losin. DP MZLU Brno, AF Brno 2001, 67 s.
7. OTRUBA, Z.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v zájmovém území města Hranice na Moravě. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 90 s.
8. MIČANOVÁ, Z.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Třeboňska. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2003, 88 s.
9. ŠIMONOVÁ, E.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Olomoucka. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 66 s.
10. ŠKARKOVÁ, L.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v areálu Národního hřebčína s.p. Kladruby nad Labem. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 61 s.
11. VAVERKOVÁ, M.: Evidence výskytu dřívě pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Třebíčska. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 52 s.
12. VĚNTUSOVÁ, K.: Evidence výskytu pěstovaných odrůd ovocných dřevin v oblasti Opavska. DP MZLU Brno, ZF Lednice na Moravě 2001, 83 s.

Tabulka 1: Přehled výskytu ovocných druhů a odrůd v ks

Hodnocené oblasti	Jádroviny celkem	Jabloně	Počet odrůd	Hrušně	Počet odrůd	Slivoně
Hranicko	391	310	52	81	5	-
Kladruby nad Labem	222	220	44	2	2	-
Kunštátsko	907	852	95	55	19	-
Tišnovsko	901	780	68	121	28	-
Olomoucko	116	107	60	9	6	-
Opavsko	452	430	29	22	15	-
Šumpersko	116	107	60	9	6	-
Třebíčsko	95	92	59	3	3	-
Třeboňsko	630	595	31	35	5	81
Valašsko	380	361	38	19	6	
	355	312	46	43	5	216
	4565	4166	582	399	100	

17 durancie

Adresa autora:

prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc., Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin, MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PRO IDENTIFIKACI MEZIDRUHOVÝCH HYBRIDŮ RODU *TRIFOLIUM* USE OF A FLOWCYTOMETRY FOR THE IDENTIFICATION OF INTERSPECIFIC HYBRIDS IN THE GENUS *TRIFOLIUM*

Hana JAKEŠOVÁ - Barbara JUNGMANNOVÁ - Jana ŘEPKOVÁ

*Red clover is a high quality fodder crop for high protein, water soluble carbohydrates (WSC), tannins, polyphenoloxidase (PPO), polyunsaturated fatty acids (PUFA) content. As a disadvantage we consider lower persistency in contrast with both *Medicago sativa* L. and *Trifolium repens* L. It could be improved by hybridisation with *Trifolium medium* L., more persistent species, which creates rhizomes. To identify hybrids between *T. pratense* L. $4n$ ($2n=4x=28$) and *T. medium* L. ($2n=$ from $6x$ to $10x=$ from 48 to 80) in F_4 generation, we used flowcytometry as one of the possible methods (PA Partec, Germany). Variety Start $2n$ ($2n=2x=14$) was used as the reference plant, after it had been analysed for the number of chromosomes by classical cytology. 7342 plants were analysed altogether. It has been found that there are differences between individual interspecific hybrids with respect of genome size, that is the number of chromosomes, respectively.*

On the basis of the results obtained, the whole population was divided into 5 groups according to the number of chromosomes:

1. 22 – 27 (65 plants - 0,87 %)
2. 29 – 30 (300 plants - 4,09 %)
3. 30 – 33 (64 plants - 0,86 %)
4. 35 – 57 (12 plants - 0,16 %)
5. 28 (6901 plants - 93,9 %)

*According to the parents' number of chromosomes, the plants of the 4th group could be considered an interspecific hybrids. The flowcytometry is able to powerful for the identification of the interspecific hybrids between *Trifolium pratense* L. and *Trifolium medium* L. It is more precise and faster compared to the cytological methods.*

*Key words: *Trifolium pratense* L., *Trifolium medium* L, interspecific hybrids, flowcytometry*

Úvod

Na našem území patří mezi nejrozšířenější druhy rodu *Trifolium* jetel luční (*Trifolium pratense* L.). Jde o pícninu velmi dobré kvality jak z hlediska obsahu živin, tak z hlediska konzervace silážováním pro vysoký obsah bílkovin, vodorozpustných cukrů (WSC), taninů, polyfenoloxidáz (PPO), nenasycených mastných kyselin (PUFA) ap. K nevýhodám patří menší vytrvalost ve srovnání s vojtěškou setou (*Medicago sativa* L.) a jetelem bílým (*T. repens* L.). Tato by mohla být odstraněna hybridizací s jetelem prostředním (*T. medium* L.), vytrvalejším druhem tvořícím rhizomy. Jednou z metod identifikace hybridních rostlin po tomto křížení je průtoková cytometrie, při níž se měří intenzita fluorescence jaderné DNA, v níž se na páry bází adeninu a thyminu váže fluorescenční barvivo DAPI (DOLEŽEL, 1998). Čím je genom větší, tím silnější je měřený signál. V roce 1992 byly v rámci Osevy předány na Šlechtitelskou stanici Hladké Životice s.r.o. hybridy mezi *T. pratense* ($2n=4x=28$) a *T. medium*. ($2n=6x$ až $8x=48$ až 80) v F_2 generaci, které byly získány na tehdejší VŠÚP Troubsko u Brna. Byly zařazeny do šlechtitelských školek.

Materiál a metody

Všechny hybridní rostliny F_3 generace, postupně vysazovány do šlechtitelských školek byly v generaci F_4 testovány na velikost genomu průtokovým cytometrem PA od firmy Partec, Německo a srovnávány s diploidní rostlinou jetele lučního odrůdy Start ($2n=2x=14$), u níž byl potvrzen počet chromozomů klasickou cytologií.

Byla analyzována potomstva 94 rostlin F_3 generace, u každého bylo měřeno 70 až 100 rostlin ve stadiu prvního pravého lístku.

Výsledky a diskuse

Testováním průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že jsou rozdíly mezi jednotlivými rostlinami ve velikosti genomu odpovídající různému počtu chromozomů. Ten se pohyboval u měřených hybridních rostlin od 22 do 57. Celkem bylo analyzováno 7342 rostlin. Na základě získaných výsledků byla celá populace rozdělena do 5 skupin:

1. 22 až 27 chromozomů (65 rostlin - 0,87 %),
2. 29 až 30 chromozomů (300 rostlin - 4,09 %),
3. 31 až 33 chromozomy (64 rostlin - 0,86 %),
4. 35 až 57 chromozomů (12 rostlin - 0,16 %),
5. 28 chromozomů (6901 rostlin - 93,9 %).

Rostliny s 28 chromozomy pravděpodobně nebyly hybridní (5. skupina), stejně tak rostliny 2. skupiny s malými odchylkami v počtech chromozomů. Rostliny ve 3. a 4. skupině měly sníženou fertilitu, mohutnější habitus a poléhavější tvar nadzemní části. Z hlediska počtu chromozomů byla nejzajímavější 4. skupina, která bude dále analyzována.

Závěr

Průtoková cytometrie 1) dokáže identifikovat mezidruhové hybridy mezi *Trifolium pratense* L. a *Trifolium medium* L., 2) je nedestruktivní a identifikované hybridy je možné použít k další šlechtitelské práci, 3) jde o rychlou metodu, která umožní 80 až 100 analýz denně, 4) nedokáže identifikovat ty hybridy, které mají stejný genom jako referenční rostlina.

Poděkování

Děkujeme za finanční podporu Ministerstvu zemědělství České republiky (grant NAZV č. 1G46034) a Grantové agentuře České republiky (grant č. 204/05/H505).

Literatura

1. DOLEŽEL, J.: Flow cytometry, its application and potential for plant breeding.
- In: Lelley, T. (ed.): Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement.
Universitätsverlag, Vienna, 1998, Pp. 80-90.

Adresy autorů:

Ing. Hana Jakešová, CSc, šlechtění jetelů a trav, 742 47 Hladké Životice 100, Česká republika e-mail:hana.jakesova@tiscali.cz

Barbara Jungmannová, VÚP Troubsko u Brna, Zahradní 1, 664 41 Troubsko u Brna, Česká republika

Jana Řepková, Masarykova univerzita Brno, PF, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

MOŽNOSTI POUŽITIA TRITORDEA PRE ROZŠÍRENIE GENETICKEJ VARIABILITY PŠENICE POSSIBILITIES OF TRITORDEUM USE FOR ENLARGEMENT OF GENETIC DIVERSITY IN WHEAT

Kvetoslava MASÁROVÁ - Štefan MASÁR

*Hexaploid tritordeum is the fertile amphiploid ($2n=6x=42$, $AABBH^chH^ch$) between *Hordeum chilense* and durum wheat. Tritordeum is a potential source for the translocation of some important properties of barley to wheat and in some cases, also into other cereal species. Tritordeum is resistant to *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Blumeria graminis*, *Septoria tritici*, *Tilletia caries*, *Ustilago tritici*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Septoria nodorum*. Hexaploid tritordeum has a very high content of proteins and its supply to tolerance against drought and salination. Nine of genotypes hexaploid tritordeum (HTC 1380, HTC 1331, HTC 324, HTC 1323, HT 129, HT 119, HT 31-1, HT 31-2, HT31-4) has been cross with tetraploid and hexaploid wheat. The crossability was relatively small, from 0-12.5%. The differences between individual combinations and of direction cross were detected. Hybrid combinations with number of chromosomes $2n=33-35$ they are probably addition lines by tetraploid wheat. Combinations by hexaploid wheat with tritordeum $2n=42$, will be necessary to analyze for possible substitution of D genome hexaploid wheat onto genome *H. chilense*- H^ch or the translocations.*

Key words: hexaploid tritordeum, Hordeum chilense, tetraploid wheat, hexaploid wheat, crossability

Úvod

Hexaploidné tritordeum je amfiploidný druh vytvorený medzirodovou hybridizáciou divorastúceho jačmeňa *Hordeum chilense* (Roemer et Schultese) $2n=2x=14$ s genómovým symbolom H^chH^ch s tetraploidnou pšeniceou *Triticum turgidum* conv. *durum* Desf. s genómovým symbolom AABB cv. Cocorit. Hexaploidné formy tritordea majú ($2n=6x=42$) genómovú zostavu $AABBH^chH^ch$. Táto plodina je významným donorom vysokého obsahu bielkovín, karoténov a rezistencie proti viacerým hubovým chorobám, hlavne proti *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *Septoria tritici*, *Septoria nodorum*, *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* a *Tilletia caries*. Genóm *H. chilense* spôsobuje u tritordea zvýšenú odolnosť na sucho a zasolenie. Tieto vlastnosti by mohli byť využité pre prenos do niektorých obilnín, hlavne pšenice a tritikale metódou vzdialenej hybridizácie.

V našej práci sme sa pokúsili o hybridizáciu hexaploidného tritordea s tetraploidnou a hexaploidnou pšeniceou.

Materiál a metódy

Do hybridizácie s hexaploidným tritordeom bola vybraná odroda tetraploidnej pšenice Soldur a translokovaná línia 4204 s translokáciou 1BL/1RS vytvorená na našom pracovisku (MASÁR, MASÁROVÁ, 1992). Z genotypov hexaploidnej pšenice bola použitá odroda Hana, Corsaire a hybridná kombinácia (Corsaire x Brea) F_1 x Ebi. 9 genotypov hexaploidného tritordea HT 31-1, HT 31-2, HT31-4, HT 119, HT 129, HT 1323, HT 1324, HT 1331, HT 1380 bolo použitých v oboch smeroch kríženia. Hexaploidné tritordea boli získané zo ZVÚ Kroměříž. Počty chromozómov boli stanovené z koreňových špičiek v metafáze mitózy všeobecne platnými postupmi. Krížiteľnosť jednotlivých kombinácií bola vyhodnotená v %.

Výsledky a diskusia

Z výsledkov hybridizácie tetraploidnej a hexaploidnej pšenice s hexaploidným tritordeom vyplýva variabilita v krížiteľnosti medzi oboma druhmi pšeníc, ako aj medzi smermi kríženia (tab.1). Najúspešnejšie bolo kríženie hexaploidnej pšenice s tritordeom s priemerným % krížiteľnosti 3,83% v porovnaní s tetraploidnou pšeniceou s 2,14 %. Kríženie tritordea s hexaploidnou pšeniceou, genotypom Hana nebolo úspešné a s tetraploidnou pšeniceou bola priemerná krížiteľnosť 0,85%. Hybridy s počtom chromozómov $2n=33-35$ možno považovať za aditívne línie s 5-7 chromozómami *H. chilense*. Pri hybridoch $2n=42$ budú musieť byť urobené ďalšie analýzy na zistenie prípadných substitúcií, alebo translokácií. Ako z uvedeného vyplýva hybridizácia tritordea s pšeniceou nie je jednoduchá. Záleží od použitého genotypu a smeru kríženia. MARTINEK (20001) uvádza možnosť použitia tritordea ako prostredníka k prenosu niektorých významných vlastností jačmeňa do pšenice, prípadne do iných druhov obilnín s ktorými sa podarí urobiť vzdialenú hybridizáciu. LIMA-BRITO et al. (1998) urobili hybridizáciu medzi tromi genotypmi tritordea, (materský genotyp) a 4 genotypmi tritikale. Dosiahli diferencie v krížiteľnosti od 6,58-29,62%. Úspešne bola urobená chromozómová substitúcia 1 $H^ch/1D$ a 1A/1D a translokácia 1DL na 1 H^chS ako aj transfer alely Glu D1 (5 + 10) do hexaploidného tritordea (BALLESTEROS et al., 2003).

Záver

Pri hybridizácii tetraploidnej a hexaploidnej pšenice s hexaploidným tritordeom bola zistená variabilita v krížiteľnosti medzi použitými genotypmi a medzi smermi kríženia od 0-12,5 %. Hybridizácia bola

úspešnejšia pri použití cytoplazmy pšenice ako tritordea. Hybridy s počtom chromozómov $2n=33-35$ možno považovať za aditívne línie tetraploidnej pšenice s pridanými 5-7 chromozómami *H. chilense*.

Literatúra

1. BALLESTEROS, J. - ALVARES, B. - GIMENEZ, J. - RAMIREZ, C. - CARBERA, A. - MARTIN, A.: Introgression of 1Dx5 + 1Dy10 into Tritordeum. In: Theor. Appl. Genet., 2003, 106, 644-648.
2. LIMA-BRITO J. - GUEDES-PINTO, H.: Crossability between tritordeum and triticales. In: Euphytica 1998, 104, 107-115.
3. MARTINEK, P.: Tritordeum - nově vytvořená obilnina. Úroda 2000, 10, 20.
4. MASÁR, Š. - MASÁROVÁ, K.: Translokácia 1B/1R v tetraploidnej pšenici. Genet. a Šlecht., 1992, 28, 95-102.

Tabuľka 1: Krížiteľnosť tetraploidnej a hexaploidnej pšenice s tritordeom

Kombinácia kríženia	Počet opelených kvietkov	Počet získaných zŕn	Percento krížiteľnosti	Počet chromozómov 2n
Tritordeum x tetraploidná pšenica				
HT 119 x Soldur	292	0		
HTC 1380 x Soldur	232	1	0,4	35
HT 31-2 x Soldur	272	0		
HT 31 - 4 x Soldur	116	1	0,9	35
HT 119 x Soldur	57	0		
HT 129 x Soldur	104	1	0,96	34
HTC 1331 x Soldur	96	12	12,5	35
HTC 1323 x Soldur	72	0		
HTC 1324 x Soldur	91	0		
HTC 1331 a 4204	31	0		
HT 31-2 x 4204	109	0		
HT 31-4 x 4204	114	0		
HT 31-1 a 4204	63	0		
HTC 1324 a 4204	124	0		
Spolu	1773	15	0,85	
Tetraploidná pšenica x tritordeum				
Soldur x HT 129	152	3	2,0	33
4204 a HTC 1380	59	0		
4204 x HTC 1324	95	1	1,05	34
4204 x HTC 1331	61	1	1,6	
4204 x HT 31 - 4	25	0		
4204 x HT 129	213	8	3,75	35
Spolu	605	13	2,14	
Tritordeum x hexaploidná pšenica				
HT 31-4 x Hana	252	0		
HTC 1331 x Hana	235	0		
HT 31-1 x Hana	69	0		
Spolu	556	0		
Hexaploidná pšenica x tritordeum				
Corsaire x HTC 1380	74	9	12,2	42
Cortez x HT 31 - 1	149	3	2,0	42
(Corsaire x Brea)F ₁ x Ebi x HT 31-1	40	0		
(Corsaire x Brea)F ₁ x Ebi x HT 31-4	50	0		
Spolu	313	12	3,83	

Adresa autorov:

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

VÝSLEDKY DETEKCE POLYMORFIZMU DNA TRITIKALE POMOCÍ RAPD A SSR MARKERŮ* THE RESULTS OF DETECTION OF POLYMORPHISM OF DNA OF TRITICALE USING RAPD AND SSR MARKERS*

Tomáš VYHNÁNEK – Jan BEDNÁŘ

*Genetic diversity was detected in 15 varieties of triticale (*XTriticosecale* Wittmack., $2n = 2x = 42$, AABBRR) registered in the Czech Republic by means of polymorphism of DNA using the RAPD method and the SSR method.*

Key words: triticale, polymorphism of DNA, RAPD, SSR

Úvod

Pro detekci genetické variability (diverzity) je v současné době k dispozici mnoho metod, např. morfologická charakteristika, analýza rodokmenů, biochemické markery především bílkoviny a jejich různé izoenzymové varianty, molekulární (DNA) markery atd.

Materiál a metody

Genetická variabilita byla detekována u 15 genotypů tritikale (*XTriticosecale* Wittmack.). Jednalo se o následující genotypy: ozimá forma – Disco, Kitaro, Kolor, Lamberto, Lupus, Marko, Modus, Presto, Sekundo, Ticino, Tornádo, Triamant, Tricolor; jarní forma – Gabo a Legalo. Směsné vzorky certifikovaného osiva byly získány z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, zkušební stanice Hradec nad Svitavou. Jako genetických markerů bylo využito polymorfizmu DNA, který byl detekován metodou RAPD a metodou SSR. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu DNAeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen) z napěstovaných rostlin ve fázi 1. pravého listu. Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna spektrofotometricky. Před vlastními RAPD analýzami byla templátová DNA naředěna v poměru 1:1-2, tak aby výchozí množství DNA do reakce odpovídalo $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro RAPD analýzy bylo použito 80 RAPD primerů. Složení „master mixu“ bylo následující: 10x reakční pufr (koncentrace 1x), dNTP (c-0,1 mM), testovaný primer ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), *Taq* DNA polymerasa (Finnzymes) $2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, 2x deionizovaná voda; teplotní a časový profil reakce byl: 1 cyklus $94^\circ\text{C} - 60 \text{ s}$; $45 \times (94^\circ\text{C} - 60 \text{ s}, 35^\circ\text{C} - 120 \text{ s}, 72^\circ\text{C} - 60 \text{ s})$, 1 cyklus $72^\circ\text{C} - 600 \text{ s}$. Elektroforetická separace RAPD produktů byla provedena na 1,5 % agarozovém gelu a vizualizace byla provedena pomocí ethidiumbromidu. Pro SSR analýzy byly použity 2 SSR markery. Reakční směs o celkovém objemu 25 μl obsahuje: 30 ng templátové DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5 μM každého primeru a 0,1 mM každého dNTP. Teplotní a časový profil reakce byl: 1 cyklus $93^\circ\text{C} - 120 \text{ s}$; $30 \times (93^\circ\text{C} - 60 \text{ s}, 54^\circ\text{C} - 120 \text{ s}, 72^\circ\text{C} - 120 \text{ s})$. Pro vizualizaci produktů bylo použito barvení stříbrem ($0,2 \%$ AgNO_3) po proběhlé vertikální elektroforéze (při 300 V) na 15 % denaturovaném polyakrylamidovém gelu v TBE pufru. Výsledky molekulárních analýz byly vyhodnoceny pomocí 1 (přítomnost produktu) a 0 (nepřítomnost produktu). Následně byly tyto hodnoty statisticky zpracovány pomocí programu FreeTree a graficky zpracovány do podoby dendrogramu pomocí programu TreeView.

Výsledky a diskuse

GARG et al. (2001) vyhodnotili metodu RAPD jako druhou nejvhodnější, po metodě SSR a před metodou AFLP, pro mapování genetické diverzity u tritikale. V našem případě poskytovali jednotlivé RAPD primery rozdílný polymorfizmus získaných DNA produktů. Z použitých 80 RAPD primerů poskytovalo 8 primerů uniformní spektrum produktů pro všech 15 odrůd tritikale. Zbývající primery výrazně rozlišily odrůdy Kolor, Modus a Tornádo od ostatních odrůd, které tvoří čtyři skupiny (obr. 1a). V jedné z těchto skupin se vyskytují jarní odrůdy Gabo a Legalo společně s ozimými odrůdami Tricolor a Triamant. Využití RAPD primerů neumožnilo, vzhledem k použití směsného vzorku (miniprep), detekovat genetickou variabilitu v rámci jednotlivých genotypů na rozdíl od prolaminových bílkovin obilky tritikale (VYHNÁNEK, BEDNÁŘ, 2003).

Byla otestována metodika detekce SSR markerů pšenice u tritikale. Na základě sestaveného dendrogramu se podařilo odlišit za pomoci 2 SSR markerů odrůdu Trimaran a ostatních analyzovaných odrůd (obr. 1b). V dendrogramu lze pozorovat klastr jarních forem tritikale (Gabo a Legalo). Detekci variability DNA s využitím 80 RAPD primerů bylo rozlišení jarních forem tritikale od ozimých nižší. SSR markery jsou lokalizovány na krátkém rameni 1A chromozomu [*Xpsp2999*, motiv $(\text{CAG})_5 (\text{CAA})_8$] a krátkém rameni 1B chromozomu [*Xpsp3000*, motiv $(\text{CAA})_{15}$]. SSR marker *Xpsp2999* využili BOUGOT et al. (2002) k rozlišení alel *Pm3* rezistence k *Blumeria graminis*. DEVOS et al. (1995) uvádějí vazbu tohoto markeru s LMW gluteniny a gliadinovým genem *Gli 1-1*. V našem případě se velikost produktů pohybovala v rozmezí 140-160 bp. Byly detekovány 4 alelické varianty. MANIFESTO et al. (2001) při použití tohoto SSR markeru u pšenice detekovali produkty s obdobnou velikostí (133-157 bp) a popsali 11 alelických variant včetně nulové alely. Nulová alela u analyzovaných odrůd tritikale nebyla detekována. U SSR markeru *Xpsp3000* byla popsána vazba s γ -gliadiny (DEVOS et al., 1995) a produkt o velikosti 285 bp je ve vazbě s genem

Yr10_{var}, rezistence ke rzi plevové (BARIANA et al., 2002). MANIFESTO et al. (2001) uvádějí u pšenice 13 alelických variant (213-285 bp) včetně nulové. U námi analyzovaných odrůd se velikost produktů pohybovala v rozmezí 200-260 bp. Alela o velikosti 260 bp byla detekována jen u odrůdy Triamant.

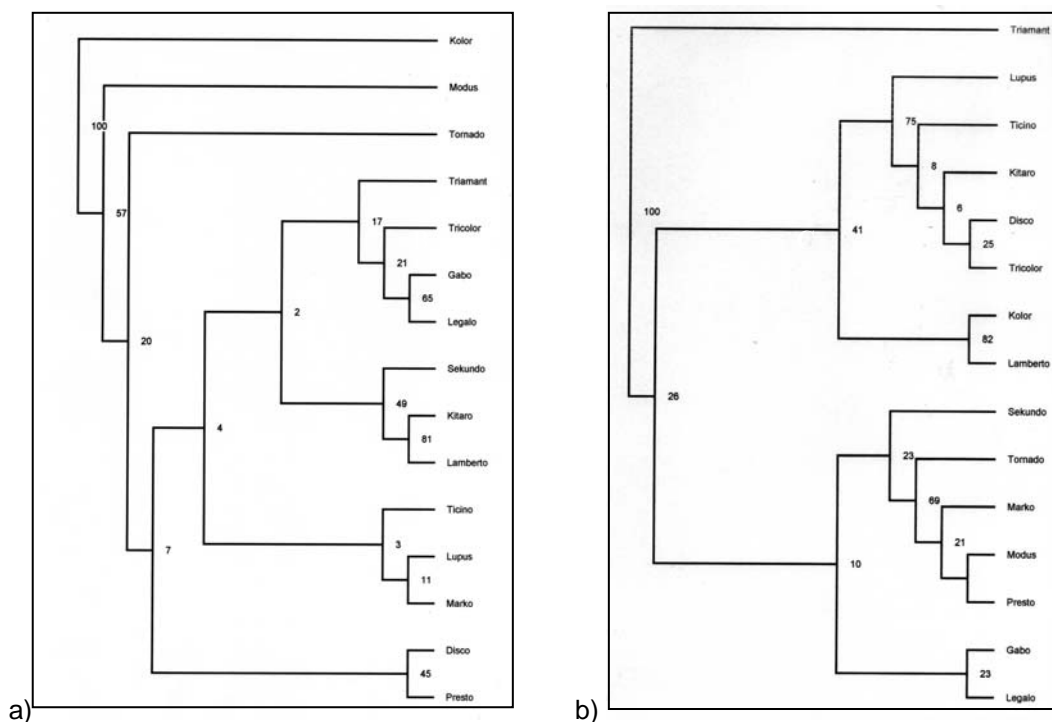
Závěr

V práci jsou prezentovány výsledky RAPD a SSR analýz u 15 genotypů tritikale, které je možné využít pro detekci genetické variability a rozlišení jednotlivých analyzovaných genotypů tritikale.

Literatura

1. BARIANA, H.S. - BROWN, G.N. - AHMED, N.U. - KHATKAR, S. - CONNER, R.L. - WELLINGS, C.R., HALEY, S. - SHARP, P.J. - LAROCHE A. (2002): Characterisation of *Triticum vavilovii*-derived stripe rust resistance using genetic, cytogenetic and molecular analyses and its marker-assisted selection. In: Theor. Appl. Genet., 104, 2002, 2-3, s. 315-320.
2. BOUGOT, V. - LAMOINE, J. - PAVOINE, M.T. - BARLOY, D. - DOUSSINAULT, G. (2002): Identification of a microsatellite marker associated with Pm3 resistance alleles to powdery mildew in wheat. In: Plant Breed., 121, 2002, s. 325-329.
3. DEVOS, K.M. - BRYAN, G.J. - COLLINS, A.J. - STEPHENSON, P. - GALE, M.D. : Applications of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. In: Theor. Appl. Genet., 90, 2, 1995, s. 247-252.
4. GARG, M. - SINGH S. - SINGH B. - SINGH, K. - DHALIWAL, H. S.: Estimates of genetic similarities and DNA fingerprinting of wheats (*Triticum* species) and triticale cultivars using molecular markers. Indian J. Agric. Sci., 71, 2001, s. 438-433.
5. MANIFESTO, M.M. - SCHLATTER, A.R. - HOPP, H.E. - SUAREZ, E.Y. - DUBCOVSKY, J.: Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. In: Crop Sci., 41, 2001, s. 682-690.
6. VYHNÁNEK T. - BEDNÁŘ J.: Detection of the varietal purity in sample of harvested wheat and triticale grains by prolamin marker. In: Plant Soil Environ., 49, 2003, s. 95-98.

*Práce vznikla za finanční podpory projektu GA ČR č. 521/03/P173.



Obr. 1 Dendrogramy podobnosti analyzovaných genotypů tritikale (Jaccard, P=99%)

a) RAPD primery, b) SSR markery

Adresa autora:

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Doc. Ing. Jan Bednář, CSc., Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

VYUŽITÍ RAPD A SCAR MARKERŮ PRO PREDIKCI ODOLNOSTI VŮČI FHB U VYBRANÝCH GENOTYPŮ JEČMENE JARNÍHO USING OF RAPD AND SCAR MARKERS FOR FHB RESISTANCE PREDICTION IN SPRING BARLEY

Ivana JEŽIŠKOVÁ - Zdeněk NESVADBA - Tomáš VYHNÁNEK - Lenka HELLEBRANDOVÁ

Fusarium Head Blight (FHB) is a world spread fungal disease of cereals caused by Fusarium species. The infection of plant can lead to reduction in yields and accumulation of toxic secondary metabolites (mycotoxins) of fungi in kernels. The mycotoxins can exhibit strong adverse effects on malting quality and health safety of the grain. The objective of this study was to use RAPD markers to predict resistance of susceptibility to FHB in 7 selected parental spring barley genotypes. Based on results of analysis to identify SCAR marker, which is characterised for resistance or susceptibility genotypes. We tested the following parental genotypes: Chevron, Zao Zhou 3, 6NDRFG-1, PI 383933, Foster, PEC 210 and CI 4196. Resulting dendrogram, based on result of RAPD analysis, divides tested genotypes into 2 main groups. The first group includes only genotype PI 383933. The second group is divided into two subgroups. The first subgroup contains the genotypes 6NDRFG-1, PEC 210 and CI 4196 and the second subgroup comprises the genotypes Chevron, Zao Zhou 3 and Foster. Identified RAPD primer H30 will be used for identification SCAR marker.

Key words: RAPD, SCAR, barley, FHB

Úvod

Fusariové vadnutí klasů (FHB) je celosvětově rozšířené houbové onemocnění obilovin způsobené několika druhy rodu *Fusarium*. Infekce rostlin může vést k redukcí výnosů a také ke kumulaci sekundárních metabolitů hub (mykotoxinů) v obilcích. Tyto látky mohou mít negativní vliv na zdravotní nezávadnost a také technologickou jakost zrna. V případě ječmene jsou jedním z faktorů, který vyvolává nežádoucí přepěňování piva (tzv. gushing) (SÝKOROVÁ, 2003). Jednou z významných možností jak omezit ztráty a škody způsobené FHB, je identifikovat genotypy ječmene, které by vykazovaly vyšší rezistenci vůči tomuto onemocnění. K tomuto účelu mohou být velmi dobře využity RAPD markery (Random Amplified Polymorphic DNA), jako jeden z typů DNA markerů.

Materiál a metody

Materiál: Pro analýzy bylo vybráno 7 genotypů ječmene setého - jarní formy, s deklarovanou rezistencí, resp. náchylností vůči FHB (tab. 1).

Tabulka 1: Původ výchozích rodičovských materiálů

genotyp	Pedigree	Původ	FHB reakce	*
CHEVRON	CIho 1111 (PI38061)= Landrace from Luzerne	CHE	rezistentní	6
PEC 210	Embrapa 128	BRA	rezistentní	2
CI 4196	PI 64275 (hang wang ta mai)= Landrace from Beijing	USA	stř. rezistentní	2
ZAO ZHOU 3	Cultivar in East China, Zhejiang University, Hangzhou	CHIN	stř. rezistentní	2
6NDRFG-1	PI 615583; North Dakota Agric. Experiment Station, USA	USA	stř. rezistentní	6
FOSTER	Robust/ 3/ Hanzen/Glenn/Karl	USA	velmi náchylná	6
PI 383933	Kanto Nijo2= Ko. 1018/Kyoto Nakate from Japan	USA	velmi náchylná	6

Izolace DNA: Celková genomová DNA byla izolována z mladých rostlin ve fázi 1. pravého listu pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, GE). Koncentrace DNA byla ověřována spektrofotometricky.

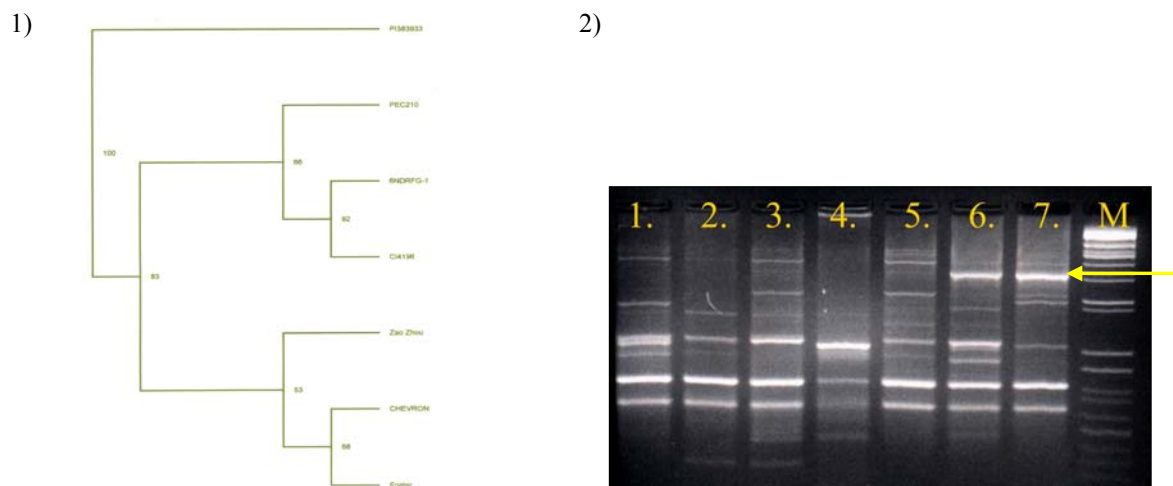
PCR reakce: Složení reakční směsi pro PCR analýzu o celkovém objemu 25μl: 0,4 U polymerázy (Finnzymes, FIN), 1x alikvotního PCR pufu, 0,25 mM každého dNTP, 20 ng primeru a 30 ng templátové DNA. Reakční podmínky PCR: 1 min. počáteční denaturace při 94 °C, následuje 45 cyklů - 1 min. při 94 °C, 2 min. při 35 °C, 1 min. při 72 °C a závěrečná elongace 10 min. při 72 °C.

Vizualizace PCR produktů: PCR produkty byly vizualizovány na horizontálním 1,5% agarózovém gelu barveném ethidiumbromidem při 70 V.

Výsledky a diskuse

Pro testování genetické diverzity rodičovských materiálů bylo použito 80 RAPD markerů. 72 z nich poskytlo při analýzách celkem 135 polymorfních alel, zbylých 8 RAPD markerů poskytlo monomorfní spektrum. Výsledky analýz byly upraveny do podoby binární matice tvořené sadami 1 a 0, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 jeho nepřítomnost. Binární matice byla vyhodnocena statistickým softwarem FreeTree s využitím konstrukční metody UPGMA a podobnostního koeficientu dle Jackarda. Pro grafické vyjádření matice do podoby dendrogramu byl využit software TreeView. Dendrogram (obr. 1) rozlišuje testované genotypy do

dvou hlavních skupin. První - samostatnou skupinu tvoří náchylný genotyp PI 383933. Druhá hlavní skupina se dělí na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří genotypy 6NDRFG-1 (stř. rezistentní), PEC 210 (rezistentní) a CI 4196 (stř. rezistentní). Druhou podskupinu tvoří genotypy Chevron (rezistentní), Zao Zhou 3 (stř. rezistentní) a Foster (náchylný). Při analýzách byl v elektroforetickém profilu RAPD markeru H30 (5'GGA GTA ACG G 3') identifikován produkt o velikosti 1300 bp pomocí kterého je možné odlišit genotypy náchylné od genotypů rezistentních (obr. 2). V současné době je cílem převést tento produkt o velikosti 1300 bp na specifický SCAR marker, který by byl využitelný pro predikci rezistence či náchylnosti vůči FHB u DH linií vzniklých z křížení testovaných rodičovských genotypů



Obr. 1 Dendrogram charakterizující genetickou příbuznost testovaných genotypů

Obr.2 Elektroforeogramy 7 rodičovských genotypů RAPD primerem H30, (1) – Chevron, (2) – PEC 210, (3) CI 4196, (4) – Zao Zhou 3, (5) – 6 NDRFG-1, (6) Foster, (7) PI 383933. Šipka naznačuje produkt o velikosti 1 300 bp charakteristický pro skupinu genotypů náchylných

Literatura

SÝKOROVÁ, S.: Monitoring obsahu fusariových mykotoxinů ve vzorcích pšenice, ječmene a žita (2000 – 2002). Sborník (CD) z konference Jakost obilovin 2003, ZVÚ Kroměříž, 2003.

Práce vznikla za finanční podpory GA ČR č. 521/03/0938 a IGA MZLU v Brně č. 34/2005.

Adresy autorů:

Ing. Ivana Ježíšková, Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Lenka Hellebrandová - Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno, www.mendelu.cz

Ing. Zdeněk Nesvadba, Ph.D., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s r. o., Havlíčkova
2787, 767 01 Kroměříž, www.vukrom.cz

APLIKÁCIA RADIČNEJ MUTAGENÉZY V ŠĽACHTENÍ LÁSKAVCA APPLICATION OF RADIATION MUTAGENESIS IN AMARANTH BREEDING

Alena GAJDOŠOVÁ - Gabriela LIBIAKOVÁ - Jozef FEJÉR

Goals in improving cultivars of grain amaranth are similar to those in other grain crops – improvement and stabilization of the yield, increasing pest resistance, and improving harvestability. The aim of this work was by γ radiation to improve selected *Amaranthus* cultivars - *Amaranthus cruentus* “Ficha” and hybrid “K-433”. M_5 mutation generations were established. In *A. cruentus* 48 samples with WTS > 0.85 g and in K-433 hybrid 18 samples with WTS > 0.75 g were selected and used for establishment of M_5 generation. In several samples of *A. cruentus*, the WTS reached 0.9 – 1.0 g and in K-433 0.8 – 0.9 g with an obvious tendency to stabilization of this trait when comparing these samples with the mother plants of the previous generation. This tendency was confirmed at 12 plants of *Amaranthus cruentus* in which WTS > 0.9675 g and 4 plants of K-433 with WTS > 0.8014 g (WTS higher as experiment mean + standard deviation) when seed progeny of M_5 generation was evaluated. At those selected plants, where WTS was significantly higher at least in two last generations (M_4 and M_5) genetically fixed WTS can be expected.

Key words: *Amaranthus* sp., γ radiation

Úvod

Ako časť súčasného obnovenia záujmu o nutričný a ekonomický potenciál málo využívaných a podceňovaných plodín, bol opätovne iniciovaný výskum týkajúci sa pestovania kultúrnych druhov láskavca (*Amaranthus* sp.) s vytvorením predpokladu pre agronomické zlepšenie a úspešnú reintrodukcii. Ciele v šľachtení láskavca sú podobne ako pri iných obilninách - zlepšenie a stabilizácia úrodu, zvýšenie rezistencie k biotickým a abiotickým faktorom a optimalizácia zberu [1]. Cieľom práce bolo zlepšiť vybrané odrody láskavca pomocou γ radiácie.

Materiál a metódy práce

Pre experimenty boli použité dva genotypy zrnového typu láskavca – *Amaranthus cruentus* “Ficha” a hybrid “K-433”, produkt medzidruhovej hybridizácie medzi *A. hypochondriacus* x *A. hybridus*. Semená boli ožiarené dávkou 175 Gy. V poľných experimentoch bolo založených 5 mutačných generácií (M_1 - M_5). M_4 a M_5 generácia boli založené na dvoch vzdialených lokalitách Slovenska (Nitra a Malý Šariš). Počas všetkých vegetačných období boli uskutočňované fenologické pozorovania a od M_2 generácie bola vykonávaná pozitívna selekcia rastlín pre žiadané morfológické vlastnosti a HTS.

Výsledky a diskusia

Ako výsledok hodnotenia semenného potomstva M_4 generácie, 48 vzoriek *A. cruentus* (ožiarených) s HTS > 0,85g a 18 vzoriek K-433 (ožiarených) s HTS > 0,75g bolo vyselektovaných a použitých pre založenie M_5 generácie. Pri niekoľkých vzorkách *A. cruentus* HTS dosiahla 0,9 – 1,0 g a pri K-433 0,8 – 0,9 g s jasnou tendenciou k stabilizácii tejto črty, pri porovnaní týchto vzoriek s materskými rastlinami predchádzajúcej generácie. Táto tendencia bola potvrdená v semennom potomstve M_5 generácie pri 12 rastlinách *A. cruentus*, pri ktorých HTS > 0,9675 g a 4 rastlinách K-433 s HTS > 0,8014 g (HTS vyššia ako priemer experimentu + štandardná odchýlka). Pri týchto selektovaných rastlinách, kde HTS bola signifikantne vyššia najmenej v dvoch posledných nasledujúcich generáciách (M_4 a M_5) je očakávaná geneticky fixovaná zvýšená hmotnosť tisíc semien (Tab. 1,2).

Tabuľka 1: Genotyp *A. cruentus*, vybrané mutanty s HTS (g) signifikantne vyššou v troch po sebe nasledujúcich generáciách (M_3 - M_5)

<i>A. cruentus</i> Číslo rastl.	HTS (g) 2001 – M_3 gen.	HTS (g) 2002 – M_4 gen.	HTS (g) 2003 – M_5 gen.
15/3 15/3/1 15/3/1-1	0.9054 *	0.8720 **	0.9692 **
26/2 26/2/1 26/2/1-1	0.8646	0.8545 **	1.0005 **
26/3 26/3/1 26/3/1-1 26/3/1-1 26/3/1-2	0.9338 **	0.8765 **	0.9689 ** 1.0140 ** 1.0597 **
27/5 27/5/1 27/5/1-1 27/5/1-2	0.9070 **	0.9566 **	0.9778 ** 1.0480 **

<i>A. cruentus</i> Cislo rastl.	HTS (g) 2001 – M ₃ gen.	HTS (g) 2002 – M ₄ gen.	HTS (g) 2003 – M ₅ gen.
27/5/1-3			1.0043 **
81/2	0.8470		
81/2/1		0.9705 **	
81/2/2		0.8818 **	
81/2/3		0.9407 **	
81/2/3-1			1.0069 **
82/1	0.8808 *		
82/1/1		0.8745 **	
82/1/1-1			0.9750 **
236/1	1.0226 **		
236/1/1		0.9130 **	
236/1/1-1			1.0857 **
236/1/1-2			1.0365 **
Ctrl. mean	0.8503	0.8213	0.8488
Exp. mean	0.8894	0.8117	0.9469
Minimum	0.8222	0.6820	0.7994
Maximum	1.0226	1.0152	1.0857
Stand.dev.	0.0291	0.0433	0.0784

*/** HTS (g) signifikantná/vysoko signifikantná v porovnaní s priemerom experimentu + štand. odchýlkou

Tabuľka 2: Genotyp K-433, vybrané mutanty s HTS (g) signifikantne vyššou v troch po sebe nasledujúcich generáciách (M3 - M5)

K-433 Cislo rastl.	HTS (g) 2001 – M ₃ gen.	HTS (g) 2002 – M ₄ gen.	HTS (g) 2003 – M ₅ gen.
54/1	0.8000 **		
54/1/1		0.8435 **	
54/1/1-1			0.8963 **
192/1	0.7988 **		
192/1/1		0.8806 **	
192/1/1-1			0.8166 **
279/1	0.8698 **		
279/1/1		0.8259 **	
279/1/1-1			0.8044 **
282/1	0.7648 **		
282/1/1		0.8248 **	
282/1/1-1			0.8106 **
Ctrl. mean	0.7304	0.5461	0.7286
Exp. mean	0.8016	0.6559	0.7828
Minimum	0.6234	0.4785	0.6793
Maximum	0.9296	0.9000	0.8963
Stand.dev.	0.0484	0.0513	0.0492

** HTS (g) vysoko signifikantná v porovnaní s priemerom experimentu + štand. odchýlkou

Záver

Introdukcija láskavca do poľnohospodárskej produkcie je v súlade s podporovaním trvalo udržateľného poľnohospodárstva a svetovým dohovorom o biodiverzite a trvalo udržateľnom rozvoji pre jeho všeobecnú nenáročnosť, ekologickú vhodnosť-ako C4 rastlina môže prispieť k zníženiu CO₂ koncentrácie v atmosfére, vysoký produkčný potenciál a možnosť využitia ako obnoviteľného zdroja energie a pestovania na kontaminovaných a okrajových pôdach nižšej kvality [2].

Táto práca bola finančne podporovaná MAAE vo Viedni, Rakúsko (Koordinovaný výskumný projekt) a grantovou agentúrou VEGA, č.p.2/5078/25.

Literatúra

1. WEGERLE, N. - ZELLER, F.J.: Grain amaranth (*Amaranthus ssp.*): cultivation, breeding and properties of an Old Indian plant, *J. Agronomy & Crop Science* 174 (1995), ISBN: 0931-2250, 63-72.
2. COOPER, H.D. - SPILLANE, CH. - KERMALI, I. - ANISHETTY, N.M.: Harnessing plant genetic resources for sustainable agriculture, *Plant Genetic Resources Newsletter* 114 (1998), 1-8.

Adresa autorov:

Alena Gajdošová, Gabriela Libiaková, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, POB 39A, 950 07 Nitra
Tel/Fax: 037 73 366 61 / 037 73 366 60, e-mail: alena.gajdosova@savba.sk
Jozef Fejér, Výskumno-šľachtiteľská stanica, Malý Šariš, 080 01 Prešov e-mail: vss@stonline.sk

PEKAŘSKÁ KVALITA TRITIKALE S HMW PODJEDNOTKAMI *GLU-D1 5+10* BREAD-MAKING QUALITY OF TRITICALE WITH HMW SUBUNITS *GLU-D1 5+10*

Iva BUREŠOVÁ - Petr MARTINEK

Bread-making quality of triticale (x Triticosecale Wittmack) lines is assessed using HMW glutenin subunits Glu-D1 5+10. HMW glutenin subunits Glu-D1 5+10 were transferred from wheat chromosome 1D to triticale chromosome 1R. Two groups of triticale sample lines derived from the variety Presto were examined: (a) group of sample lines with simple translocation 1R.1D₅₊₁₀-2 on the long arm of 1R carry the segment from 1DL with Glu-D1 5+10 where it replaced Sec-3 and (b) group of sample lines with the double translocation "Valdy" (1R.1D₅₊₁₀-2/WR4) where both arms of 1R carry segments of wheat chromosome 1D (on the long arm the translocation 1R.1D₅₊₁₀-2 and on the short arm 1R the translocation WR4 with a segment from 1DS, which carries Gli-D1 and Glu-D3). The lines with Glu-D1 5+10 were selected from the original samples obtained from Prof. A. J. Lukaszewski (Univ. of California, Riverside, USA). Multiplied materials were tested for bread-making quality in 2002-2004. The presence of Glu-D1 5+10 was verified using DNA markers. Bread-making quality of tested samples was compared with the variety Presto without translocation and with wheat varieties of various bread-making quality (E-C groups). The quality of samples was evaluated in accordance with standards approved for wheat. The increased number of translocations negatively correlated with grain yield and specific weight and positively correlated with protein content, Zeleny sedimentation index, machinability (no stickiness), and loaf volume of bread. There is still a problem of high amylase enzyme activity and related low values of Hagberg falling number (mean value of 62 s without significant differences). Higher bread-making quality can be influenced by appropriate combination with donors of low alpha-amylase activity.

Key words: triticale, bread-making quality, HMW glutenin subunits

Úvod

Běžně používané odrůdy tritikale (x *Triticosecale* Wittmack) jsou hexaploidy ($2n = 6x = 42$, AABBRR). Od pšenice seté (*T. aestivum* L. em Thell.) ($2n = 6x = 42$, AABBDD) se liší přítomností žitného genomu R, kterým je nahrazen genom D pšenice, původně pocházející z *Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal. ($2n = 2x = 14$, DD). Kvalitativní rozdíly mezi pšenicí a tritikale jsou způsobeny rozdíly v zastoupení R a D genomů. Mimořádnost postavení pšenice seté mezi ostatními obilovinami spočívá v tom, že se jedná o jediný druh, který se dá uspokojivě využívat pro výrobu kynutých cereálních výrobků (např. chleba evropského typu), k jejichž výrobě je zapotřebí surovina s vhodnými viskoelastickými vlastnostmi těsta. Geny pro tyto vlastnosti se nacházejí především v genomu D. To lze dokumentovat rozdíly v charakteristikách těsta pšenice seté ($2n = 6x = 42$, AABBDD) a pšenice tvrdé *T. durum* Desf. ($2n = 4x = 28$, AABB). Kvalita zrna současných odrůd tritikale (AABBRR) tedy nemá obdobné vlastnosti jako směs zrna pšenice (AABBDD) a žita (RR) pro výrobu pšenično-žitného chleba. Oproti pšenici se však tritikale vyznačuje některými jinými významnými hospodářskými vlastnostmi. Jedná se především o schopnost produkovat větší množství sušiny nadzemní biomasy na jednotku plochy. Jelikož v současnosti mají odrůdy tritikale nižší hodnoty sklizňového indexu než pšenice, lze předpokládat, že šlechtění na krátkou délku stébla povede u tritikale k rychlejšímu zvyšování výnosového potenciálu než u pšenice, kde délka stébla již dosáhla optimálních hodnot. Významná je schopnost tritikale odolávat některým nepříznivým biotickým a abiotickým činitelům prostředí a v souvislosti s tím i dosahovat dobré výnosové výsledky v marginálních oblastech. Tyto důvody vedou k orientaci některých směrů výzkumu u tritikale na možnosti zlepšování jeho využitelnosti pro pekařské účely cestou zabudování některých genů z genomu D pšenice do genomu R žita. Příspěvek uvádí výsledky hodnocení pekařské kvality zrna u tritikale.

Materiál a metody

Pro analýzy byly použity formy tritikale odvozené od odrůdy Presto, s přenesenou částí chromosomu dlouhého ramene 1D do chromosomu žita 1R. Přenesený segment pšeničného chromosomu nesl HMW gluteninové podjednotky *Glu-D1 5+10*, které významnou měrou přispívají ke zlepšení viskoelastických vlastností lepkové bílkoviny (a jsou přítomny v převážné většině pšenic pro pekařské využití) (PAYNE et al., 1991). Tento cílený přenos uskutečnil Prof. A.J. Lukaszewski (University of California, Riverside, USA) pomocí centrické zlomové fúze (LUKASZEWSKI, 1994, 1998; LUKASZEWSKI a CURTIS, 1994). Pro odvození analyzovaných linií byly použity výchozí vzorky zaslané z USA, obsahující následující dva typy translokací:

- jednoduchá translokace 1R.1D₅₊₁₀-2 (oproti obdobné translokaci 1R.1D₅₊₁₀-1 translokace 1R.1D₅₊₁₀-2 nese kratší segment chromosomu 1DL). Přenesený segment s *Glu-D1 5+10* nahrazuje současně na dlouhém rameni 1R sekalinový lokus *Sec-3*,
- dvojitá translokace 1R.1D₅₊₁₀-2/WR4 označená pro zjednodušení názvem "Valdy", kde na dlouhém rameni 1R je translokace 1R.1D₅₊₁₀-2 a současně na krátkém rameni 1R translokace označovaná jako WR4, která nese segment z 1DS, nesoucí gliadinový lokus *Gli-D1* a gluteninový lokus *Glu-D3*. Segmentem z 1DS se nepodařilo nahradit sekalinový lokus *Sec-1*, který se nachází na 1RS v blízkosti centromery.

Potomstva rostlin byla v Zemědělském výzkumném ústavu Kroměříž, s.r.o. (ZVÚ) použita pro odvození linií použitých pro hodnocení kvality zrna. Pro vlastní analýzy byly vybrány jen ty linie, u kterých byla pomocí molekulárních v MZLU Brno (VINTEROVÁ et al, 2003) potvrzena přítomnost *Glu-D1 5+10*. (Zajímavé bylo, že ne u všech získaných potomstvech se vyskytovala *Glu-D1 5+10*, což naznačuje, že výchozí materiál zasláný z USA nebyl geneticky homogenní.). Pro analýzy bylo použito pět linií tritikale s jednoduchou translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 (označených čísly 1, 2, 3, 4 a 5), tři linie s dvojitou translokací Valdy (označené čísly 7, 8, a 10). Jako kontrolní odrůdy byla použita standardní odrůda Presto (bez translokace) a odrůdy pšenice s různou kvalitou zrna - Ebi (E), Sulamit (E), Samanta (A), Šárka (B), Rialto (B) a Mladka (C).

Použité genotypy tritikale a pšenice byly pěstovány v ZVÚ v roce 2001/02, 2002/03 a 2003/04 po předplodině ozimé řepce. Ve všech případech bylo provedeno hnojení na podzim - 30 kg·ha⁻¹ N, 36 kg·ha⁻¹ P₂O₅, 36 kg·ha⁻¹ K₂O; na jaře - 40 kg·ha⁻¹ N (v ledku vápenatém). Pro hodnocení kvality zrna byly použity postupy obvyklé pro pekařenskou pšenici. Objemová hmotnost (OH) byla stanovena podle ČSN ISO 7971 část 2. Obsah dusíkatých látek v sušině (NL) byl stanoven Dumasovou spalovací metodou podle ICC standardu č. 167. Číslo poklesu (FN) bylo určováno podle ČSN ISO 3093. Šrot byl připraven na mlýnku Falling Number LM 3100. Sedimentační index (SEDI) byl stanoven podle ČSN ISO 5529. Zrno bylo navlhčeno a semleto na mlýnku Brabender Sedimat. Vaznost vody a reologické vlastnosti na farinografu byly určeny podle ČSN ISO 5530-1. Pekařský pokus byl proveden podle ICC standardu č. 131 s mírnou modifikací, spočívající v tom, že k pekařskému pokusu bylo použito 300 g mouky. V průběhu pekařského pokusu byla hodnocena lepivost těsta. Zrno bylo navlhčeno a semleto na mlýnku Brabender Junior. Získané výsledky byly hodnoceny programem STATISTICA CZ společností StatSoft. Statistické rozdíly jsou vypočítány při P > 95%.

Výsledky

Průměrné hodnoty základních parametrů pekařské kvality zrna hodnocených vzorků tritikale a pšenice jsou v Tab. 1. Průměrná objemová hmotnost a průměrný obsah dusíkatých látek v sušině byly statisticky odlišné od translokace Valdy. Zatímco objemová hmotnost vzorků Presto a Presto 1R.1D₅₊₁₀-2 byla v průměru 78,4 kg·hl⁻¹, resp. 76,0 kg·hl⁻¹, průměrná objemová hmotnost vzorků Presto Valdy byla 71,7 kg·hl⁻¹. Také obsah dusíkatých látek v sušině byl statisticky průkazně ovlivněn translokací. Průměrná hodnota obsahu dusíkatých látek byla u Valdy (16,6 %) byla průkazně vyšší než u odrůdy Presto bez translokace (15,2 %) a u forem s translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 (15,6 %). Rovněž sedimentační index byl statisticky průkazně ovlivněn translokacemi tak, že počet translokací zvyšoval jeho hodnotu. Průměrná hodnota sedimentačního indexu u odrůdy Presto bez translokace byla 23 ml, u vzorků s jednou translokací Presto 1R.1D₅₊₁₀-2 byla 25 ml a vzorků se dvěma translokacemi Presto Valdy byla 27 ml. Číslo poklesu nebylo přítomnosti translokací ovlivněno a ve všech třech případech dosahovalo stejné hodnoty 62 sekund.

Fyzikální charakteristiky těsta a objemu pečiva naznačují rovněž některé rozdíly. Průměrná vaznost mouky byla vyšší u vzorků s translokací Valdy (55,6 %), oproti odrůdě Presto bez translokace (54,2 %) a s jednou translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 (54,1 %). Rozdíly v charakteristikách těsta (vývin, stabilita, změknutí) nebyly u hodnocených vzorků průkazné. Významné rozdíly však byly v charakteristice lepivosti těsta. Těsto z odrůdy Presto bez translokace bylo lepivé, z Presto s translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 bylo mírně lepivé a těsto připravené z forem Presto Valdy bylo nelepivé. Tomu odpovídají i charakteristiky změknutí těsta (poklesu farinografické křivky). Objem pečiva byl přítomnými translokacemi ovlivněn jen mírně a neprůkazně. Zajímavé bylo, že průměrný objem pečiva byl nejvyšší u vzorků Presto s jednou translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 (364 ml) a nejnižší u vzorků Presto Valdy (316 ml). To je v určitém rozporu s publikovanými výsledky (WOŠ et al., 2002). Na rozdíl od tohoto zjištění vzhled, tvar a struktura upečených bochníků byly podstatně lepší u forem s translokacemi než u kontrolní odrůdy Presto. Výsledky pekařských testů u vybraných vzorků ze sklizně 2004 jsou na obrázku 1. Zajímavé je, že mezi hodnocenými analyzovanými vzorky s jednoduchou translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 a dvojitou translokací Valdy byly zjištěny rovněž rozdíly. Například vyšší objem pečiva oproti průměru uváděnému v tabulce byl dosažen u vzorku Presto 1R.1D₅₊₁₀-2 označeném číslem 5 a nižší u vzorku označeném číslem 1. U vzorků Presto Valdy byl nejvyšší objem pečiva u vzorku č. 10 a nejnižší u vzorku č. 7.

Porovnáme-li výsledky rozborů pšenice a tritikale navzájem, je zřejmý největší rozdíl v čísle poklesu (FN) a v objemu pečiva. Rozdíl mezi pšenicí a tritikale v čísle poklesu je podmíněn rozdílnou aktivitou alfa-amylasy, která je na rozdíl od HMW podjednotek gluteninů a gliadinů geneticky založena odlišně. Tato skutečnost nepochybně rovněž ovlivňuje fyzikální charakteristiky těsta, například ukazatel jeho stability a změknutí (pokles farinografické křivky).

Tabulka 1: Kvalita zrna hodnocených vzorků tritikale a pšenice (průměry let 2002, 2003 a 2004)

Název	Počet vzorků	O.H. [kg·hl ⁻¹]	NL [%]	SEDI [ml]	FN [s]	Vaznost (14,0%) [%]	Vývin [min]	Stabilita [min]	Změknutí [FU]	Lepivost	Objem pečiva [ml]
Tritikale:											
Presto	1	78,4 a	15,2 a	23 a	62 a	54,2 a	1,9 a	2,7 a	140 a	lepivé	345 ab
Presto 1R.1D ₅₊₁₀ -2	5	76,0 a	15,6 a	25 b	62 a	54,1 a	1,8 a	3,8 a	128 a	mírně lepivé	364 b
Presto Valdy	3	71,7 b	16,6 b	27 c	62 a	55,6 b	2,0 a	2,5 a	113 b	nelepivé	316 a
Pšenice:											
Sulamit, Ebi (kvalita E)	2	82,0	13,3	43	299	59,5	4,3	6,5	50	nelepivé	683
Samanta (kvalita A)	1	80,8	14,5	36	293	57,6	3,8	6,8	63	nelepivé	636
Šárka, Rialto (kvalita B)	2	81,4	12,7	29	274	56,3	2,0	4,0	78	nelepivé	513
Mladka (kvalita C)	1	76,7	12,3	17	318	52,3	0,5	3,5	100	mírně lepivé	408



Obrázek 1. Ukázky pekařského testu: vlevo - kontrolní odrůda Presto bez translokace (poměr výšky /h/ : šířky /w/ bochníku je 1 : 2,28; objem pečiva 300 ml), uprostřed - linie č. 5: Presto s translokací 1R.1D₅₊₁₀-2 (h : w = 1 : 1,79; objem 360 ml), vpravo - linie č. 10: Presto s translokací Valdy (h : w = 1 : 1,64; objem 290 ml)

Diskuse

Přes některé pozitivní vliv studovaných translokací na jakost zrna je evidentní, že vysoká aktivita alfa-amylasy a s ní spojené nízké číslo poklesu (FN) negativně ovlivňuje možnost dosažení parametrů u tritikale srovnatelných s pšenicí. Nízké číslo poklesu negativně ovlivňuje možnost dosažení uspokojivého objemu pečiva, který by se vyrovnal pšenici seté. Lze předpokládat, že podstatnějšího zlepšení pekařské kvality tritikale bude možné dosáhnout kombinací zlepšujících genů pro viskoelastické vlastnosti lepkové bílkoviny a současně genů pro nízkou aktivitu alfa-amylasy (WOS et al., 2002). Zajímavá je existence určitých rozdílů v charakteristikách jakosti mezi jednotlivými liniemi uvnitř skupin genotypů s jednou a dvojitou translokací. Lze se domnívat, že tyto rozdíly mohly být způsobeny určitou heterogenitou vzorků. Může to být pravděpodobně z důvodu, že výchozí materiál, ze kterého byly použité linie vyselektovány, byl heterogenní v přítomnosti alely *Glu-D1 5+10*, což se ukázalo na základě analýz potomstev rostlin pomocí molekulárních markerů. Z důvodu potřeby dostatečného množství DNA pro analýzy byla izolace DNA prováděna z několika různých rostlin odvozených z analyzovaného potomstva. To umožnilo sice vzájemně rozlišit od sebe vzorky obsahující nebo neobsahující *Glu-D1 5+10*, nebylo však možné tímto způsobem od sebe odlišit heterozygoty a homozygoty v *Glu-D1 5+10*. Proto bude nezbytné u vzorků s odlišnou kvalitou zrna provést elektroforetickou analýzu zásobních bílkovin (SDS-PAGE) pro posouzení případné heterogenity analyzovaných vzorků.

Skutečnost, že v objemu pečiva nebylo zaznamenáno průkazné zlepšení u forem s translokacemi, by se možná dala vysvětlit jinou technologií pečení oproti publikovaným výsledkům v zahraničí, které obvykle vycházejí z pekařských testů prováděných ve formě. Naše pekařské testy byly prováděny bez formy, což oproti zahraničním testům umožnilo posuzovat i tvarové charakteristiky pokusných bochníků.

V literatuře, týkající se pekařské kvality tritikale, jsou uváděny rovněž velmi slibné výsledky, způsobené záměnou celého chromosomu 1D za chromosom 1R. Nevýhoda těchto substitučních forem tritikale 1D(1R) však spočívá v podstatně nižším výnosu (LAFFERTY a LELLEY, 2001). Proto větší naději na využití mají tritikale s translokovanými chromosomy. Nevýhodou translokace 1R.1D₅₊₁₀-2 a translokace Valdy je skutečnost, že obě nesou na krátkém rameni v blízkosti centromery sekalinový lokus *Sec-1*, který má negativní vliv na pekařskou kvalitu. Proto je vyvíjena nová translokace, která by neobsahovala tento sekalinový lokus. Z kalifornské university se nám podařilo v roce 2005 získat zatím heterogenní vzorek, kde translokovaný 1R by měl obsahovat *Gli-D1*, *Glu-D3* a *Glu-D1 5+10*, přičemž oba sekalinové lokusy *Sec-1* a *Sec-3* jsou odstraněny (LUKASZEWSKI, osobní sdělení).

Závěry

- U dvojité translokace Valdy byl prokázán statisticky průkazný pozitivní vliv na obsah dusíkatých látek v sušině, vaznost vody, sedimentační index, lepivost a změknutí těsta.
- Translokace neměly vliv na číslo poklesu a rovněž na některé fyzikální charakteristiky těsta (vývin, stabilita).
- Číslo poklesu bylo u všech skupin vzorků tritikale velmi nízké oproti pšenici. Proto předpokladem pro zlepšení pekařské kvality zrna tritikale je rovněž využití vhodných donorů s nízkou aktivitou alfa-amylasy.

Poděkování

Děkujeme spoluřešitelům Ing. Vyhnánkovi, PhD. a Ing. Vinterové z MZLU Brno za detekci *Glu-D1 5+10* pomocí molekulárních markerů, Doc. RNDr. Vagerovi, CSc. z AV ČR - ÚEB Olomouc za tvorbu dihaploidního materiálu a zvláště Prof. A. J. Lukaszewskému za poskytnutí výchozích vzorků a za možnost spolupráce. Výzkum byl financován v rámci výzkumného projektu GA ČR 521/03/0113.

Literatura

1. LAFFERTY, J. – LELLEY, T.: Introduction of high molecular weight glutenin subunits 5+10 for the improvement of the breadmaking quality of hexaploid triticale. *Plant Breeding*, 120, 2001, 33-38.
2. LUKASZEWSKI, A. J.: Genetic mapping in the 1R.1D wheat-rye translocated chromosome. *Genome*, 37(6), 1994, 945-949.
3. LUKASZEWSKI, A. J.: Improvement of breadmaking quality of triticale through chromosome translocations. Proc. 4th *International Triticale Symp.* Red Deer, Alberta, Canada, July 26-31, 1998, 102-110.
4. LUKASZEWSKI, A. J. – CURTIS, C. A.: Transfer of the *Glu-D1* gene from chromosome 1D of breadwheat to chromosome 1R in hexaploid triticale. *Plant Breeding*, 109, 1994, 203-210.
5. PAYNE, P. I. – SEEKINGS, J. A. – HARRINDER-KAUR – KRATTIGER, A. F. – ROGERS, W. J. – KAUR, H. – BUSHUK, W.(ed.) – TKACHUK, R.(ed.): Contribution of allelic variation of glutenin subunits and gliadins to bread-making quality. *Gluten proteins 1990, 1991*, 504-511.
6. VINTEROVÁ, M. – BEDNÁŘ, J. – JEŽÍŠKOVÁ, I. – MARTINEK, P.: DNA markers for high molecular weight glutenin subunits 5+10 used in wheat and triticale breeding (DNA markery vysokomolekulárních podjednotek gluteninů 5+10 ve šlechtění pšenice tritikale) *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39, 2003, 69-72 .
7. WOŚ, H. – METZGER, R. J. – LUKASZEWSKI, A. J. – CYGANKIEWICZ, A.: The effect of the D-genome chromosome substitutions and translocations of chromosome 1D on some quality and agronomic parameters of winter triticale. 5th *International Triticale Symposium*, June 30 - July 5., 2002, Radzików, Poland, Proceedings Volume II - Poster presentations, 2002, 59-70.

Kontaktní adresa

Mgr. Iva Burešová, Ing. Petr Martinek, CSc., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, tel. (+420) 573 317 126, (+420) 573 317 158, e-mail: buresova@vukrom.cz, martinek@vukrom.cz

ŠLECHTĚNÍ HRACHU PROTI HUBOVÝM PATOGÉNŮM PEA BREEDING TO FUNGI PATHOGENS

Radmila DOSTÁLOVÁ - Michal ONDŘEJ - Rudolf TROJAN - Ivana HASALOVÁ -
Roman TYLLER

*The aim of the work was the creation of pea genotypes with complex resistance to several pathogens (*Erysiphe pisi*, *Fusarium oxysporum* race 1 and 2, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*). Unique sources with cumulated genes of resistance were obtained for increasing and stabilisation of tolerance to broad pathogens spectrum of pea. Declared resistance were verified in field and glasshouse tests. Suitable materials with high level of biological characteristic were used in hybridisation process. Control susceptible genotypes were surpassed by majority new resistant bred lines.*

Key words: Pisum sativum, resistance, fungi pathogens, breeding

Úvod

Hrách setý (*Pisum sativum*) patří k nejvýznamnějším a nejrozšířenějším luskovinám v ČR. Na hrachu setém se vyskytuje několik desítek chorob, z nichž pouze některé jsou ekonomicky významné. V posledních letech se šlechtění hrachu orientovalo na zvýšení odolnosti ke komplexu houbových chorob. Padlí hrachu (*Erysiphe pisi*) je celosvětově nejrozšířenější patogenní houbou hrachu. Povrch nadzemní části rostlin se pokrývá charakteristickým moučnatým povlakem. Padlí způsobuje ztráty na výnosech semen v rozmezí 10 – 60 %. Silněji bývají napadeny *afila* typy hrachu, pozdní odrůdy, porosty pozdě seté, přehoustlé a přehnojené dusíkem (ONDŘEJ, 2003). Spolu s chorobami nadzemních částí působí na kořenové části rostlin soubor patogenů obecně označovaný jako komplex kořenových chorob (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* a další). Napadené rostliny trpí růstovou a výnosovou depresí. Semena v luscích fyziologicky nedozrávají, scvrkávají se a snižují svou hodnotu HTS. Nutriční hodnota semen se zhoršuje a klesá obsah N-látek.

Materiál a metody

Zdroje rezistence: Highlight, Melfort, Mozart, Stalwarth, Lu 390-R2, SGL 1977, SGL 2024, Consort R, Ceb 1171- (*er-1*), linie B 99-/98 – 118/ (WEEDEN N.F., 1999), s odolností proti padlí (*er-1*) a *F. oxysporum* rasa 1,2 (*Fw, Fnw*).

Zdroje odolnosti proti *F. solani* f. sp. *pisi* :- linie 96-2068, 96-2198, 96-2154, 97-2162 (KRAFT J.M., COFFMAN M.Z., 2000) a genotypy Lifter, Franklin, Fallon, Novella II a Starling.

Soubor registrovaných odrůd hrachu z genové banky Agritec, ŠS Selgen a SEMO Smržice.

Izoláty hub: soubor ras *F. oxysporum* rasy 1,2 – standardy (USA, NL), vlastní izoláty *F. oxysporum* rasy 1,2, *R. solani* (AG-4), *F. solani* a *F. solani* f. sp. *pisi*

Inokulační test na odolnost k *F. oxysporum* rasa 1, 2 (HAGLUND, 1989)

Sterilovaná semena hrachu byla vyseta v agroperlitu do sadbovačů. Semenáčky byly po předpěstování vyjmuty a kořeny byly zkráceny o 30 %, následně máčeny v suspenzi propagul (*F. oxysporum* rasa 1, 2), a zpět vysazeny do agroperlitu. V každém testovaném vzorku hodnoceno celkem 20 rostlin. Kontrola vzorek se zkrácenými kořeny, máčený ve vodě.

Inokulační test na odolnost k *Rhizoctonia solani*, a *F. solani*

Semena byla máčena ve vodě (24 hod.), nabobtnalá semena potom v suspenzi propagul houby *R. solani* nebo *F. solani*. Inokulovaná semena byla vyseta na povrch agroperlitu v truhlících (á 40 semen na truhlík) a převrstvena agroperlitem.

Hodnocení inokulačních testů

Po 20- 30 dnech byly rostliny vyjmuty a rozděleny do skupin podle stupně nekrotizace kořenů (stonkových bází, nadzemních částí – žloutnutí a odumření spodních listů, vadnutí). Bonitační stupnice 0-4 (0- bez symptomů, 4 – 100% napadení). Výpočet DI (disease index)

$DI = (0.a + 1.b + 2.c + 3.d + 4.e) / n$

Inokulační test rostlin na odolnost k padlí (*Erysiphe pisi*)

Ve skleníku byla provedena umělá inokulace padlím rozptýlením konidií (z napadených rostlin) nad rostlinami určenými k testu. Optimální termín inokulace je na počátku květu.

Výsledky a diskuze

Před započítáním šlechtitelské práce byla zmapována situace ve výskytu druhového spektra patogenní mykoflory hrachu kořenových chorob na 13 lokalitách ČR. Nejvyšší zastoupení bylo zjištěno u houby *F. solani* (45 %), poměrně nízký podíl byl u *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (14,5 %). V letech 2001-2004 byly proti kořenovým chorobám (*F. oxysporum*, rasa 1, 2, *R. solani*, *F. solani*) otestovány všechny rodičovské linie a odrůdy. Na základě výsledků skleníkových inokulačních testů byly využity pro rezistentní šlechtění genotypy s relativně vyšší odolností jak proti houbě *Rhizoctonia*, tak i proti houbě *F. oxysporum* (rasa 1 a 2): SGL 1997, SGL 2024, LPKE 36, Herold, Gotik, Zekon a Fallon. Využívání zdrojů Highlight, R2, Melfort, Lifter, Franklin a linie B/99-106, B/99-114, B/99-118 aj. je z hlediska vyšší citlivosti ke *R. solani*

problematické. Byl proveden rozsáhlý screeningový test proti patogenní houbě *F. solani*. K nejodolnějším genotypům patřily: Sponzor, Gotik, Novela II, Starling, LPKE 36 a linie 97-2162 a GHC. Z výsledků inokulačních testů byl vybrán soubor genotypů s vyšší tolerancí ke kořenovým chorobám pro následné kombinační křížení hrachu. Na tyto genotypy pak byly nakříženy zdroje odolnosti proti padlí nebo zdroje s kumulovanou rezistencí proti více patogenům. Perspektivní hybridní kombinace byly namnoženy, selektovány na požadované znaky a vlastnosti. Po opakovaných selekcích inokulačních testů potomstev proti padlí, které byly prováděny v F2 - F4 generaci byly získány homozygotní linie hrachu rezistentní proti padlí. Všechny vytvořené linie jsou rezistentní i k *F. oxysporum* rasa 1. V reakci na rasu 2 (*F. oxysporum*) byly zaznamenány rozdíly, k *F. solani* je většina těchto linií velmi citlivá. V polních podmínkách byla ověřována výkonnost získaných populací a selektovaných kmenů a porovnávána s výchozími zdroji rezistence a náchylnými kontrolami. Veškeré získané homozygotní linie jsou rezistentní k padlí. Kořenové choroby se na těchto materiálech v polních podmínkách neprojeví. Kombinace B99/106 x Highlight dosáhla nejvyššího výnosu – 13,7 g na rostlinu, tato kombinace měla i nejvyšší počet semen v lusku (6,8). Nevýhodou je nižší HTS (180), větší poléhavost a vyšší citlivost k *Phoma*, *Mycosphaerella* a *Uromyces pisi*, ta se projevila u všech kombinací odvozených od linií B99/106 a B99/118. Výsledky výnosových zkoušek těchto materiálů potvrzují literární údaje o nízkém výnosovém potenciálu a zvýšené citlivosti zdrojů rezistence k ostatním chorobám (WARKENTIN *et al.* 2000). Kombinace s využitím nových výkonných zdrojů rezistence (SGL 1977 x Franklin, GHC x Mozart, SGL 1977 x Lifter) poskytly velmi vysoký výnos, při zachování požadovaných vlastností na dobrý zdravotní stav, odolnost k poléhání a odpovídající HTS. Tyto perspektivní materiály budou využívány jako základ pro tvorbu nových odrůd.

Závěr

Omezení negativního vlivu všech zmiňovaných chorob na produkci hrachu vyžaduje integrovaný přístup k pěstování této plodiny. Ten zahrnuje nejen využívání rezistentních odrůd, které by mohly být v budoucnosti zaregistrovány, ale i správné dodržování technologie pěstování. Posouzení úrovně zdravotního stavu genetických zdrojů pomocí účinných testačních metod umožňuje výběr vhodných materiálů pro rezistentní šlechtění a pro jejich následné zavedení do pěstitelské praxe. Šlechtění na rezistenci hrachu je neúčinnější, nejpřirozenější a nejrozšířenější ochranou před patogeny při pěstování rostlin.

Literatura

1. HAGLUND W. A.: A rapid method for inoculating pea seedlings with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. In: Plant Dis., 73, 1989, 457-458.
2. KRAFT J.M. - COFFMAN M.Z.: Registration of pea germplasm. In: Crop science, 40, 2000, 301– 303.
3. ONDŘEJ, M. - DOSTÁLOVÁ, R. - HÝBL, M. - ODSTRČILOVÁ, L. - TYLLER, R. - TROJAN, R.: Utilization *afila* types of pea (*Pisum sativum* L.) resistant to powdery mildew (*Erysiphe pisi* DC.) in the breeding programs. In: Plant Soil Environ., 49, 2003, 481-485.
4. WEEDEN N.F. - PROVIDENTI R.: Availability of seed from breeding lines containing genes for resistance to powdery mildew, Fusarium wilt races 1 and 2 and least nine virus disease. In: Pisum genetics, 30, 1999, 33.
5. WARKENTIN A. - XUE A.G. - AL SLOAN, RASHID K.: AC Melfort field pea. In: Can. J. Plant Sci., 80, 2000, 117 – 119.

Příspěvek byl vypracován za podpory z projektů NAZV, QF 3071 a MSM 2678424601.

Adresa autorov:

Ing. Radmila Dostálová, AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Zemědělská 16, 78701 Šumperk, dostalova@agritec.cz