



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

**PIEŠŤANY, 2006**

SLOVENSKÉ CENTRUM POĽNOHOSPODÁRSKEHO  
VÝSKUMU  
- Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany  
SEKCIA GENETIKY, ŠĽACHTENIA A SEMENÁRSTVA  
ODBORU RASTLINNEJ VÝROBY SLOVENSKEJ AKADÉMIE  
PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

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

Zborník z 13. vedeckej konferencie  
14.-15. november 2006

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

**Editor: Martin Užík**

**Recenzent: doc. Ing. Ján Brindza, CSc., SPU Nitra**  
**doc. Ing. Karol Kováč, CSc., SPU Nitra**

### **Autorský kolektív:**

Antalíková Gabriela  
Baranec Tibor  
Benediková Daniela  
Benková Michaela  
Bežo Martin  
Bežo Milan  
Bieliková Magdaléna  
Bleho Juraj  
Bojnanská Katarína  
Brestič Marián  
Brindza Ján  
Candráková Agáta  
Candráková Eva  
Civáň Peter  
Coufalová Olga  
Čechová Lydie  
Červená Viera  
Čičová Iveta  
Ďatko Miroslav  
Degma Petr  
Dokupil Tibor  
Domkářová Jaroslava  
Dragúň Marián  
Dragúňová Marta  
Drimal Jozef  
Drobná Jarmila  
Dunca Juraj  
Duncová Alena  
Dvončová Daniela  
Faragó Juraj  
Faragová Natália  
Ferencová Jana  
Forišeková Kvetoslava  
Gajdošová Alena  
Gajdová Jana  
Galliková Andrea  
Gašparová Diana  
Gavurníková Soňa  
Gregová Edita  
Greplová Marie  
Griga Miroslav  
Gubiš Jozef  
Hanáček Pavel  
Hanková Andrea  
Hauptvogel Pavol  
Havrlentová Michaela  
Heldák Ján  
Herzová Eva  
Holly László  
Horáčková Vendulka  
Hozlár Peter

Hricová Andrea  
Hrubíková Katarína  
Hudcovicová Martina  
Hunková Elena  
Chrpová Jana  
Jakábová Anna  
Jakešová Hana  
Jandurová Olga  
Ješko Dalibor  
Komínek Petr  
Kopačka Viktor  
Kopecký David  
Kováčová Zuzana  
Kraic Ján  
Kreuz Lukáš  
Križanová Klára  
Kříž Vlastimil  
Kurečka Radim  
Libantová Jana  
Libiaková Gabriela  
Lichtnerová Helena  
Macák Milan  
Málnási Csizmadia Gábor  
Martínek Petr  
Masár Štefan  
Matějová Eva  
Mátelová Lenka  
Matušíková Ildikó  
Mendel Lubomír  
Mihálik Daniel  
Michalík Ivan  
Mikulcová Jarmila  
Mlynárová Ludmila  
Mohl Jiří  
Moravčíková Jana  
Múdry Pavol  
Navrátil Milan  
Navrátilová Božena  
Nečasová Regina  
Nesvadba Vladimír  
Nováková Eva  
Obert Bohuš  
Olšovská Katarína  
Ostrolucká Mária Gabriela  
Pajurková Kateřina  
Pastirčák Martin  
Patzak Josef  
Piáková Zuzana  
Plačková Andrea  
Pokorný Radovan  
Polívka Ludovít

Polzerová Hana  
Porhajašová Jana  
Preťová Anna  
Psota Vratislav  
Pšenáková Ivana  
Reinöhl Vilém  
Repková Jana  
Rüschschloss Lubomír  
Ruman Tibor  
Salaj Ján  
Salaj Terézia  
Skálová Dagmar  
Smýkal Petr  
Suchánková Pavla  
Sýkorová Světlana  
Szépeová Martina  
Šafářová Dana  
Šajgalík Michal  
Šalomon Ivan  
Ševčíková Martina  
Šimová Zuzana  
Šíp Václav  
Šliková Svetlana  
Štefúnová Veronika  
Šudyová Valéria  
Švábová Lenka  
Švec Miroslav  
Švec Ondrej  
Švecová Renata  
Takáč Tomáš  
Uher Jiří  
Ullmannová Kamila  
Ťrgeová Eva  
Urmínská Dana  
Uvačková Ľubica  
Užík Martin  
Vaculková Eva  
Vančo Bernard  
Vinterová Miroslava  
Vlčková Marie  
Vooková Božena  
Voral Vratislav  
Vörösváry Gábor  
Vyhnánek Tomáš  
Zirkelbachová Katarína  
Žáková Mária  
Žiarovská Jana  
Živčák Marek  
Žofajová Alžbeta

© SCPV - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 80-88872-57-X

## Obsah

### Prednášky

UŽÍK, M., ŽOFAJOVÁ, A.: Využitie technologického a metodologického pokroku pri šľachtení pšenice.....	8
PSOTA, V.: Vliv šlechtění na zlepšování sladovnické kvality.....	13
MICHALÍK, I., URMINSKÁ, D.: Bielkovinové determinanty celiakálneho ochorenia.....	16
MARTINEK, P., GREGOVÁ, E., VINTEROVÁ, M. a kol.: Identifikace zdrojů tritikale se sníženou aktivitou amylasových enzymů a vhodnějším složením bílkovin pro zlepšení pekařské kvality.....	20
ŽOFAJOVÁ, A., MIHÁLIK, D., ŠAJGALÍK, M., UŽÍK, M.: Vplyv a využitie génov krátkosteblovosti v šľachtení pšenice na Slovensku v rokoch 1960 až 2005.....	24
PŠENÁKOVÁ, I., FARAGÓ, J.: Rastlinné flavonoidy a ich potenciál pre funkčné potraviny a nutraceutiká.....	27
URGEOVÁ, E., POLÍVKA, E.: Biocídne látky z rastlín použiteľné v poľnohospodárstve.....	31
MACÁK M., MENDEL L., PORHAJAŠOVA J.: Hodnotenie genetických zdrojov tabaku proti živočíšnym škodcom.....	35
HELDÁK, J., BEŽO, M., ŠTEFÚNOVÁ, V. a kol.: Analýza génov rezistencie proti vírusu Y zemiaka (PVY) a vírusu X zemiaka (PVX) v genetických zdrojoch ľuľka zemiakového ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) pomocou molekulových markerov.....	39
GRIGA, M., HANÁČEK, P., NAVRÁTIL, M. a kol.: Využití transgenoz ve šlechtění hrachu odolného voči virům.....	43
FARAGÓ, J., OHNOUTKOVÁ, L.: Mikrobalistická technika ako nástroj pre rastlinné biotechnológie a štúdium expresie génov.....	44
PATZAK, J., NESVADBA, V.: Využití molekulárních metod při šlechtění chmele ( <i>Humulus lupulus</i> L.) na rezistenci k houbovým patogénům.....	48
CANDRÁKOVÁ, E.: Adaptabilita odrôd jačmeňa jarného na pestovateľské podmienky prostredia.....	51
FARAGOVÁ, N., FARAGÓ, J.: Vplyv genetickej modifikovaných rastlín lucerny na bakteriálnu rhizosféru.....	54
JANDUROVÁ, O., KRÍŽ, V.: Klonové šlechtění u révy vinné – problémy a perspektívy.....	58
MÚDRY, P., DRAGŮŇ, M.: Proteomická klasifikácia samoopelivých línii a dvojlíniových hybridov kukurice siatej ( <i>Zea mays</i> L.) polymorfizmom enzýmov v rokoch 1990-2005.....	61
DRIMAL, J.: Kultivačné metódy v hodnotení fuzarióz šúľkov kukurice.....	65
CIVÁŇ, P., ŠVEC, M.: Mikrosatelitové markery <i>pm5</i> lokusu v českých a slovenských odrodách pšenice ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	70
MASÁR, Š., PASTIRČÁK, M.: Reakcia genotypov pšenice na <i>Fusarium culmorum</i> .....	74
UHER, J.: Genofond ostálek ( <i>Zinnia darwinii</i> Haage & Haage Schmidt.). 1. Předběžné deskriptory.....	78
UHER J., NEČASOVÁ, R.: Genofond ostálek ( <i>Zinnia darwinii</i> Haage & Haage Schmidt.). 2. Hodnocení domácích odrůd....	81
BENKOVÁ, M., ŽÁKOVÁ, M., KRAIC, J.: Diverzita morfológických znakov jarného jačmeňa.....	85

### Postery

HANKOVÁ, A., GREGOVÁ, E.: Kvalitatívne ukazovatele ako selekčné kritérium pri tvorbe genetických zdrojov pšenice.....	89
HOZLÁR, P., DVONČOVÁ, D.: Nutričný a zdravotne preventívny význam ovsa nahého.....	91
LIBANTOVÁ, J., MORAVČÍKOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I.: Izolácia génu glukonázy z rosičky okrúhloľstvej ( <i>Drosera rotundifolia</i> L.) pomocou Genome Walkingu.....	93
MARTINEK, P., COUFALOVÁ, O., KUREČKA, R. a kol.: Netradiční barva obilek pšenice ( <i>Triticum aestivum</i> L.), její genetická podmíněnost a možnost využití v potravinářství.....	95
RÜCKSCHLOSS, E.: Křmna kvalita odrôd pšenice letnej f. ozimnej Veldava a Pavlina testovaná na brojlerových kurčatách.....	99
ŽOFAJOVÁ, A., UŽÍK, M.: Produktivita a kvalita dihaploidných línii pšenice letnej f. ozimnej.....	101

BEŽO, M., HRUBÍKOVÁ, K., ŽIAROVSKÁ, J. a kol.: Hodnotenie genetickej vzdialenosti medzi populáciami/odrodami ľuľka zemiakového, ľanu siateho a jačmeňa siateho PCR-ISSR markérmí.....	103
BEŽO, M.ml., BRINDZA, J., BEŽO, M. a kol.: Genetická analýza populácií lipnice lúčnej ( <i>Poa pratensis</i> L.) PCR-ISSR markérmí.....	105
BLEHO, J., HRICOVÁ, A., PREŤOVÁ, A.: Transformácia ľanu siateho s cieľom zvýšenia kvality lignínových vlákien.....	107
FARAGÓ, J., FARAGOVÁ, N., GAŠPÁROVÁ, D.: Tvorba vysoko-embryogénnych genotypov lucerny siatej ( <i>Medicago sativa</i> L.) rekurentnou selekciou.....	109
FARAGOVÁ, N., FARAGÓ, J.: Hodnotenie nodulačnej schopnosti geneticky modifikovaných klonov lucerny siatej s vneseným AIMVcp génom.....	111
GREPLOVÁ, M., POLZEROVÁ, H., KOPECKÝ, D. A kol.: Polyplodizace a somatická hybridizace – alternativa šlechtění bramboru.....	113
GREPLOVÁ, M., POLZEROVÁ, H., NAVRÁTILOVÁ, B.: Úvod do studia asymetrické somatické hybridizace.....	115
LICHTNEROVÁ, H., JAKÁBOVÁ, A., DRAGUŇOVÁ, M., DOKUPIL, T.: Mikropropagácia vzácných hybridov rodu <i>Lilium</i> L. v podmienkach <i>in vitro</i> a ich aklimatizácia.....	117
KOVÁČOVÁ, Z., OBERT, B., PREŤOVÁ, A.: Porovnanie morfogénnej reakcie hypokotylových segmentov z rôznych oblastí hypokotyľu ľanu kultivovaných v <i>in vitro</i> podmienkach na tuhom a tekutom médiu.....	119
LIBIAKOVÁ, G., GAJDOŠOVÁ, A., OSTROLUCKÁ, M.G.: <i>In vitro</i> indukcia adventívnej regenerácie u malín.....	121
MORAVČÍKOVÁ, J., LIBANTOVÁ, J., VACULKOVÁ, E., MLYNÁROVÁ, E.: Odstránenie selekčného markerového génu z genómu transgénnych rastlín tabaku pomocou CRE/LOXP systému.....	123
NAVRÁTILOVÁ, B., GREPLOVÁ, M., GAJDOVÁ, J., SKÁLOVÁ, D.: Somatická hybridizace u rodu <i>Cucumis</i> .....	125
SALAJ, T., MORAVČÍKOVÁ, J., VOOKOVÁ, B., SALAJ, J.: Regenerácia embryogénnych pletív hybridných jedlí po kokultivácii <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	127
SZÉPEOVÁ, M., HRICOVÁ, A., PREŤOVÁ, A.: Genetická transformácia ľanu siateho ( <i>Linum usitatissimum</i> L.) pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	129
UVÁČKOVÁ, E., TAKÁČ, T., OBERT, B., PREŤOVÁ, A.: Biochemické analýzy peľnic jačmeňa siateho ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) počas predúpravy chladom.....	131
BOJNANSKÁ, K.: Poľná odolnosť novošľachtencov pšenice letnej voči múčnatke trávovej.....	133
ČERVENÁ, V., GUBIŠ, J., KRIŽANOVÁ, K., BENKOVÁ, M.: Hodnotenie rezistencie vybraných genotypov jačmeňa voči hnejkej škvrnitosti a múčnatke trávovej na jačmeni.....	135
DOMKÁŘOVÁ, J., ŠVECOVÁ, R., KOPAČKA, V. a kol.: Tvorba nových šlechtiteľských materiáľů s geny horizontální rezistence k plísni bramboru.....	137
GUBIŠ, J.: Hodnotenie odolnosti vybraných odrůd jačmeňa siateho f. jarnej proti hnejkej pruhovitosti jačmeňa.....	139
CHRPOVÁ, J., ŠÍP, V., SÝKOROVÁ, S. a kol.: Výsledky hodnocení rezistence k fuzarióze klasu u odrůd pšenice ozimé registrovaných v České republice.....	141
JANDUROVÁ, O., KOMÍNEK, P., KRÍŽ, V.: Infekce svinutkovým komplexem u tramínu červeného a její vlyv na vitalitu a výnos.....	143
MASÁR, Š., BOJNANSKÁ, K., HUDCOVICOVÁ, M. a kol.: Rezistencia <i>Triticum durum</i> proti múčnatke trávovej, hrdzi pšenicovej, septórii plevovej a klasovým fuzariózam.....	145
ŠLIKOVÁ, S., VANČO, B., ŠUDYOVÁ, V., RÜCKSCHLOSS, E.: Úroveň rezistencie šľachtencov pšenice proti hubovým pôvodcom klasových chorůb.....	149
ŠLIKOVÁ, S., VANČO, B.: Rezistencia obilnín proti hube <i>Stagonospora nodorum</i> Berk. pri testovacej metóde listových segmentov.....	151
ŠUDYOVÁ, V., ŠLIKOVÁ, Š., HERZOVÁ, E.: Mykotoxín deoxynivalenol vo vybraných registrovaných odrodách pšenice ozimnej v rokoch 2004 a 2005.....	153

ŠVEC, M., MÁTELOVÁ, L., DEGMA, P.: Agresivnosť regionálnych populácií múčnatky trávovej na pšenici z územia Slovenska.....	155
ANTALÍKOVÁ, G.: Charakteristika genetických zdrojov cícera baranieho pestovaných v rôznych podmienkach vodného stresu.....	158
ĎATKO, M., BRESTIČ, M., OLŠOVSKÁ, K.: Signalizácia stresu vo fotosyntetickom aparáte rastlín na úrovni proteínov....	160
NESVADBA, V., PATZAK, J.: Šlechtění chmele na odolnosť k padlí chmelovému ( <i>Podospaera macularis</i> ).....	162
REPKOVÁ, J. – BRESTIČ, M.: Hodnotenie tolerancie genotypov jačmeňa jarného k vysokej teplote využitím parametrov chlorofylu $\alpha$ .....	164
ŽIVČÁK, M., HUNKOVÁ, E., FERENCOVÁ, J. a kol.: Dynamika rastu súčasných a krajových odrôd pšenice letnej forma ozimná vo vzťahu k úniku pred suchom.....	166
ŽIVČÁK, M., OLŠOVSKÁ, K., BRESTIČ, M.: Kutikulárna transpirácia listov krajových a súčasných odrôd pšenice letnej f. ozimnej.....	168
BENEDIKOVÁ, D.: Pomologické hodnotenie vybranej skupiny odrôd marhúľ zaradených do Európskej Prunus databázy....	170
ČIČOVÁ, I.: Variabilita morfológických znakov <i>Panicum miliaceum</i> L.....	173
DROBNÁ, J.: Vzťahy medzi úrodou a kvalitou krmiva d'ateliny lúčnej.....	175
DUNCA, J., DUNCOVÁ, A., ŠVEC, O.: Fyzikálne vlastnosti jabĺk.....	178
DUNCA, J., DUNCOVÁ, A., ŠVEC, O.: Fyzikálne vlastnosti stebiel obilnín.....	181
GREGOVÁ, E., ZIRKERLBACHOVÁ, K., GAVURNÍKOVÁ, S. a kol.: Charakteristika 35 genetických zdrojov pšenice z hľadiska technologickej kvality.....	184
JAKEŠOVÁ, H., ČECHOVÁ, L.: Rozdíly ve fenotypu mezidruhových hybridů <i>T. pratense</i> x <i>T. medium</i> a rodičovských druhů.....	186
MARTINEK, P., ULLMANOVÁ, K., MIKULCOVÁ, J.: Vlastnosti pšenice ( <i>Triticum aestivum</i> L.) s mnohořadým klasem.....	188
MENDEL, E., ČIČOVÁ, I., DROBNÁ, J. a kol.: Vplyv prídavkov múk z minoritných plodín na fyzikálne a senzorické vlastnosti chleba.....	190
PLAČKOVÁ, A., ŠALAMON, I.: Nová odroda nechtíka lekárskeho „PLAMEN Plus“ – koncentrácia karotenoidov pred jednotlivými zbermi kvetných úborov počas pestovateľskej sezóny.....	192
RUMAN, T., ŠEVČÍKOVÁ, M.: Novo vyšľachtené odrody viniča hroznorodého na Slovensku.....	194
VÖRÖSVÁRY, G., HAUPTVOGEL, P., MÁLNÁSI CSIZMADIA, G. a kol.: Zber genetických zdrojov rastlín v rôznorodých oblastiach Maďarska, 2006.....	198
ŽÁKOVÁ, M., BENKOVÁ, M.: Použitie zhlukovej analýzy pri charakterizácii jarného jačmeňa.....	201
UŽÍK, M., RÜCKSCHLOSS, E., ŽOFAJOVÁ, A.: Restrospektívna analýza metódy selekcie línií na úrodu a kvalitu pri pšenici ozimnej.....	203

## VYUŽITIE TECHNOLOGICKÉHO A METODOLOGICKÉHO POKROKU PRI ŠĽACHTENÍ PŠENICE UTILIZATION OF TECHNOLOGICAL AND METHODOLOGICAL PROGRESS AT WHEAT BREEDING

Martin UŽÍK – Alžbeta ŽOFAJOVÁ

*Results from several experiments with sets of winter wheat varieties, realised in the last century, from the point of source of grain yield increasing and reasons of decreasing its quality are presented. Identification of reasons is important for formulation future breeding strategy. Unbalance between carbon and nitrogen metabolism and unbalance between nitrogen source and its sink capacity are considered as the main reasons of low grain quality.*

*Key words: winter wheat, variety, historical assortment, accumulation, translocation, biomass, nitrogen*

Úroda, kvalita, odolnosť voči chorobám a škodcom, stabilita voči nepriaznivým podmienkam prostredia sú trvalou výzvou pre šľachtiteľa. V druhej polovici minulého storočia sa dosiahol značný pokrok pri dosahovaní uvedených cieľov. Úrody pšenice sa zvýšili v celosvetovom meradle z 1 na 2,4 t.ha<sup>-1</sup> a to vďaka zlepšením odrôd a vyšším dávkam živín. Podobný trend rastu úrod bol na Slovensku i keď s určitým oneskorením (UŽÍK, 2000; UŽÍK, ŽOFAJOVÁ, 2003).

Odroda ako intenzifikačný faktor začala hrať rozhodujúcu úlohu až po druhej svetovej vojne, kedy boli vyšľachtené krátkosteblové odrody pšenice, jačmeňa, ryže, ktoré efektívnejšie využívali vyššie dávky živín. Dvojnásobné zvýšenie úrod za relatívne krátke obdobie sa označilo pojmom „zelená revolúcia“ (DONALD, HAMBLIN, 1976), ktorá sa pravdepodobne už nezopakuje.

Prax šľachtienia rastlín v minulom storočí vychádzala z empirie, z výsledkov veľkého počtu hybridných experimentov a z poznatkov genetiky a ďalších vedných odborov. Bolo vyhodnotených mnoho selekčných stratégií pre efektívnu tvorbu komerčných odrôd (ALARD, 1999).

Zákonnosti dedičnosti využívali sa pri znakoch podmienených jedným génom. Prínosom bolo poznanie že aj kvantitatívne znaky sa dedia mendelisticky. Sú kontrolované veľkým počtom génov s malým účinkom ako to dokázali Nilson Ehle pri štúdiu dedičnosti farby zrna pšenice (NILSSON – EHLE, 1909). Metodologické úsilie bolo venované problému separácie účinkov prostredia od účinku genotypu pri kvantitatívnych znakoch (MATHER, JINKS 1971; FALCONER, 1989; NYQUIST, 1991). Pre štúdium dedičnosti vlastností ozimnej pšenice a jej zlepšovanie sexuálnym prenosom génov prispela tvorba monozomických sérií. Genetické mapovanie a analýza dedičnosti pri hexaploidnej pšenici tradičným postupom konvenčnou metódou sú problematické, pretože lokusy pre ten istý znak môžu sa viac krát opakovať. Vďaka monosomickým sériám, ktoré vyvinul SEARS (1954) bolo možné spájať určitý znak s určitým chromozómom a využiť ich na substitúciu chromozómov z iných odrôd do štandardnej odrody.

Hybridizácia vnútri druhu a medzidruhovú bola široko využívaná na inkorporáciu génov do nových odrôd. V každej krajine sa vytvárali nové odrody, ktoré boli adaptované na rôzne agroekologické podmienky, čo rezultovalo do veľkej diverzity medzi odrodami. Šľachtitelia túto rozmanitosť plne využívali hybridizáciou pre ďalšie zlepšovanie odrôd a tak dochádzalo ku špirálovitému zlepšovaniu odrôd. Technologický pokrok sa vďaka voľnému využívaniu odrôd ako zdrojov nových génových kombinácií prenášal i do krajín s nižšou technologickou úrovňou, tak tomu bolo aj na Slovensku.

Genetické zlepšenie odrôd za posledných 100 rokov na Slovensku môžeme dokumentovať výsledkami z experimentu s odrodami pšenice povolenými od roku 1923 do roku 1995 (UŽÍK, ŽOFAJOVÁ, 2002), skúšaných pri troch hladinách závlahy a na 3 hladinách N hnojenia. Analýza ukázala, že:

- znížila sa výška rastliny čo bolo zdrojom (source) pre redistribúciu asimilátov z vegetatívnych orgánov do generatívnych orgánov, ale
- proces redistribúcie asimilátov bol umožnený vďaka zvýšenej úložnej kapacite (sink), zvýšením počtu zŕn na klas v dôsledku pleiotropného efektu Rht génov (FLINTHAM et al., 1997),
- moderné odrody mali vyššiu toleranciu voči suchu, keď pri optimálnej závlaha bola úroda zrna moderných odrôd voči starým dvojnásobná, avšak pri nedostatočnej závlaha (stres, sucho) bola vyššia, skoro štvornásobne,
- zvýšenie úrod zrna sa nedosiahlo zvýšením úrod celej biomasy, ale „len“ jej presunom z vegetatívnych orgánov (slamy) do zrna, čím sa zvýšil zberový index (AUSTIN et al., 1980),
- menili sa parametre príjmu a využitia dusíka a kvality zrna. S rokmi povolenia odrody sa znížoval obsah dusíka v zrne i v slame čo naznačuje, že nebol dostatočný príjem dusíka, avšak zvyšoval sa zberový index N čo naznačuje, že sa zlepšila efektívnosť využitia prijatého N. Ak by sa mal pri zvyšovaní HI dodržať pôvodný pomer úrody zrna ku obsahu dusíku v zrne mal by sa príjem dusíka zvyšovať lineárne pri rovnakej biomase a progresívne s rastom produkcie biomasy,

- nedostatočný príjem N rezultoval do zníženej kvality zrna keď v súbore 26 odrôd ozimnej pšenice povolených od roku 1912 do roku 1995 (ŽOFAJOVÁ, UŽÍK, 2004). V skupine odrôd povolených v rokoch 1992 až 1995, do ktorej patrili odrody Torysa, Astella, Barbara sa znížil obsah bielkovín na 81,1 %, obsah mokrého lepku na 74,8 % a tvrdosť zrna na 84,1 % oproti prvej skupine odrôd povolených v rokoch 1912 až 1923.

#### *Translokácia a redistribúcia asimilátov – genotypové diferencie*

Ako vidieť redistribúcia asimilátov a N boli základné fyziologické procesy geneticky determinované, ktoré zabezpečili zvýšenie úrod zrna. Poznanie zdrojov šľachtiteľského pokroku v minulom storočí pri obilninách je dôležité pre stanovenie stratégie šľachtenia pre ďalšie roky. Procesu redistribúcie a translokácie asimilátov a N sme venovali pozornosť v ďalších experimentoch.

Translokácia asimilátov má dva aspekty, aspekt mikroevolučný podmienený relatívne trvale zmenenou redistribúciou asimilátov z priebežnej asimilácie do vegetatívnych a generatívnych orgánov (zvýšenie HI) a aspekt ontogenetický, ktorý je podmienený translokáciou asimilátov dočasne uložených vo vegetatívnych orgánoch do generatívnych orgánov. Oba procesy môžu sa realizovať až po začiatku kvitnutia a preto sa ťažko od seba separujú. Pokúsili sme sa to urobiť na súbore desiatich odrôd ozimnej pšenice povolených v rokoch 1921 – 2003 skúšaných v pokuse pri 4 hladinách N hnojenia (0, 30, 60, 90 kg.ha<sup>-1</sup>). Cieľom práce bolo zistiť, aký je podiel asimilátov z nadzemnej biomasy a z koreňov vytvorených do klasenia a po klasení v priebehu nalievania zrna na zvýšení zberového indexu moderných a starých odrôd pšenice. Okrem toho doteraz výskum pre porovnanie starých a moderných odrôd bol väčšinou zameraný na nadzemnú hmotu, na úrodu zrna a jej komponenty (AUSTIN et al., 1980; CALDERINI et al., 1995; UŽÍK, ŽOFAJOVÁ, 2003; BRANCOURT HULMEL et al., 2003). Okrem asimilátov z nadzemnej biomasy zdrojom pre translokáciu a redistribúciu sušiny do zrna mohla byť sušina koreňov, avšak tie sa nepovažujú za tak významné ako z nadzemnej hmoty (BLUM, 1998). Získané výsledky potvrdili predchádzajúce, avšak získali sme ďalšie, ktoré umožnili urobiť určité závery pre selekciu.

- Moderné krátkosteblové odrody skôr klasili, korelačný koeficient medzi rokom povolenia odrôd a termínom klasenia bol záporný ( $r = -0,811^{++}$ ).
- Naakumulovali menej nadzemnej hmoty do kvitnutia, Medzi rokom povolenia odrody a akumulovanou suchou hmotou bol silný záporný vzťah ( $r = -0,859^{++}$ ),
- ale naakumulovali viac koreňovej hmoty. Najvyššiu produkciu koreňovej hmoty mala odroda Astella, nositeľka génu Rht 1. Pri odrodách bola jednoznačná tendencia zvyšovania produkcie koreňovej hmoty s rokom povolenia odrody (od 0,50 - Slovenská 777 do 0,85 g.rastlinu<sup>-1</sup> Astella) ( $r = -0,596$ ). Výnimkou bola odroda Košútka s najnižšou produkciou koreňov (0,42 g.rastlinu<sup>-1</sup>).
- Klasový index, ako ukazovateľ potenciálnej úložnej kapacity mal tendenciu čím neskoršie povolená odroda tým vyššia hodnota klasového indexu ( $r = 0,556$ ). Výnimkou boli odrody Solaris a Košútka, ktoré hoci boli povolené pred 30 rokmi (Solaris) mali najvyššiu hodnotu klasového indexu.
- Výška rastlín sa významne znižovala s rokom povolenia odrody ( $r = -0,804^{++}$ ), avšak len do roku 1976 (odroda Solaris). Potom boli povolené odrody s rôznou výškou - Vanda (82,4 cm), povolená v roku 2001 a odroda Astella (61,1 cm) povolená v roku 1995.
- Na dvojnásobnom zvýšení úrod zrna moderných odrôd sa viac podieľal počet zrn v klase ( $r = 0,907^{++}$ ), než hmotnosť zrna ( $r = 0,889^{++}$ ), pričom počet klasov na rastlinu ( $r = -0,512$ ) sa mierne znižoval s rokom povolenia odrody. Úroda zrna sa zvýšila v dôsledku zvýšenia zberového indexu, bez zvýšenia produkcie biomasy.
- Zatiaľ čo úroda zrna na rastlinu sa zvyšovala s rokom povolenia odrody ( $r = 0,889^{++}$ ), opačná situácia bola pri biomase koreňov, ktorá sa znížila ( $r = -0,455$ ).
- Výsledky umožnili odpovedť akú úlohu má proces translokácie na zvyšovanie úrody zrna. Translokácia, môže byť charakterizovaná viacerými kritériami a to najmä rozdielmi v dynamike narastania biomasy do kvitnutia a po kvitnutí a jej distribúciou medzi generatívne a vegetatívne orgány z priebežnej asimilácie a redistribúciou alebo translokáciou z vegetatívnych do generatívnych orgánov.
- Do začiatku klasenia staré odrody vyprodukovali cca o 20 % vyšší podiel biomasy z celkovej biomasy v zrelosti ako moderné odrody, avšak moderné odrody produkovali od klasenia do zrelosti viac biomasy. Prírastok biomasy od klasenia do zrelosti s rokom povolenia odrody sa významne zvyšoval ( $r = 0,759^{++}$ ).
- Pri väčšine odrôd nadzemná biomasa vytvorená od klasenia do zrelosti bola menšia ako bola úroda zrna. To znamená, že rozdiel sa musel nahradiť procesom translokácie, teda asimilátmi vytvorenými do klasenia. Iba dve moderné odrody Košútka a Viginta vytvorili od klasenia do zrelosti viac nadzemnej biomasy ako úrody zrna a ostatné odrody vyprodukovali od 1,19 do 2,25 g.rastlinu<sup>-1</sup>, čo v % úrody zrna predstavovalo od -6 % (Košútka) do 14 % (Vanda).



- Translokácia nadzemnej biomasy sa s rokom povolenia odrody zvyšovala, výnimkou bola najskoršia krátkosteblová odroda Košútka, ktorá vyprodukovala v dobe nalievania zrna viac biomasy ako bola úroda zrna.
- Pri všetkých odrodách od klasenia do zrelosti dochádzalo ku úbytku koreňovej hmoty od 0,19 (Slovenská 777) do 0,67 (g.rastlina<sup>-1</sup>) (Astella) čo v % (100% klasenie) predstavuje od 63,3 % do 21,8 % a v tom istom poradí ako v g na odrodu a rastlinu.
- Biomasa koreňovej hmoty sa pri všetkých odrodách od klasenia po zrelosť znižovala a jej podiel na translokovanej sušine v zrne bol trojnásobne vyšší ako z nadzemnej biomasy.
- Ak úbytok koreňovej hmoty od klasenia do zrelosti považujeme za translokáciu a neberieme do úvahy ich odumretie, potom translokácia suchej hmoty koreňov vyjadrená v hmotnosti úrody zrna bola trojnásobne vyššia ako z nadzemnej hmoty (7,1 %, 21,2 %). Medzi translokáciou suchej hmoty koreňov (úbytok od klasenia do zrelosti) a rokom povolenia odrody bol významný vzťah ( $r=-0,765^{**}$ ) a vyjadrené podielom v zrne  $r=0,370$ .

Medzi rokom povolenia odrody a translokáciou celkovej biomasy bola stredná korelácia ( $r=0,552$ ), avšak translokácia v % úrody zrna na rastlinu nebola s rokom povolenia v žiadnom vzťahu ( $r=0,120$ ) v dôsledku toho, že staršie odrody mali nižšiu translokáciu, ale mali aj nižšiu úrodu zrna a tak podiel bol podobný ako pri moderných odrodách. Medzi odrodami kolísal podiel translokovanej biomasy v zrne od 2,34 % pri odrode Košútka až po 41,51 % pri odrode Astella.

Medzi odrodami boli rozdiely v podiele translokovanej biomasy v zrne. Odrody Astella a Košútka sú krátkosteblové, avšak Košútka produkovala najmenej koreňovej biomasy v klasení a nemala takmer žiadnu translokáciu. Odroda Astella mala v klasení najvyššiu produkciu koreňovej biomasy a tiež najvyšší podiel translokovanej biomasy v zrne. Je potrebné detailnejšie analyzovať vplyv Rht génov na distribúciu a translokáciu asimilátov. V tomto smere prebiehajú prvé experimenty (ŽOFAJOVÁ et al., 2006).

#### *Akumulácia a translokácia N pri odrodách ozimnej pšenice povolených v rokoch 1921-2003.*

Uvedli sme, že s rokom povolenia odrody úroda zrna sa zvyšovala, ale obsah N v zrne a kvalita zrna sa znižovala, preto sme sa začali zaoberať genetickými diferenciami v procese príjmu, akumulácie a využitia N, teda procesmi, ktoré sú na začiatku koncovej kvality (end use quality). Akumulácia N úzko súvisí s translokáciou sušiny, s úrodou zrna a jeho kvalitou. Problém úrody zrna verzus kvalita má aspekt selekčný a aspekt geneticko-fyziologický. Z hľadiska fyziológie problém kvality začína príjmom a využitiem N.

Genetické príčiny nižšej kvality moderných odrôd oproti starým odrodám nie sú jasné. Prístupnosť N v pôde má rozhodujúcu úlohu v prejave tohto vzťahu, pričom nové odrody, ktoré majú vyššiu efektívnosť príjmu a využitia N majú slabší záporný vzťah medzi úrodou zrna a obsahom bielkovín (ORTIS-MONASTERIO, 1997; UŽÍK, ŽOFAJOVÁ, 2002).

Moderné odrody mali v klasení vyššiu koncentráciu N v nadzemnej hmote, t.j. vyššiu špecifickú efektívnosť príjmu N na jednotku biomasy, avšak pretože skôr kvitli vyprodukovali menej biomasy a tak i pri vyššej koncentrácii N, jeho príjem bol nižší ako pri starých odrodách (tab. 1, 2).

Moderné odrody mali vyššiu efektívnosť translokácie, pretože dokázali v období nalievania zrna, z vyššieho obsahu N vo vegetatívnej hmote znížiť ho na rovnakú úroveň ako mali staré odrody (tab. 3), napriek tomu mali nižšiu koncentráciu N v zrne, nižší obsah mokrého lepku a bielkovín (tab. 1), čo bolo spôsobené nevyváženosťou medzi zdrojmi N (source) a úložnou kapacitou zrna. Nedostatočná akumulácia N moderných odrôd do doby klasenia, nízka efektívnosť príjmu N počas nalievania zrna a vysoká úroda zrna, boli príčinou, že napriek efektívnejšej translokácii a využitiu N (zberový index N) kvalita zrna bola nižšia ako pri starých odrodách.

#### **Záver**

V príspevku sa analyzujú výsledky získané z viacerých súborov odrôd ozimnej pšenice, povolených v minulom storočí z hľadiska zdrojov rastu úrod zrna a príčin znižovania jej kvality. Poznanie príčin je dôležité pre stanovenie budúcich stratégií šľachtenia. Za hlavnú príčinu nízkej kvality zrna sa považuje nevyváženosť medzi uhlíkatým a dusíkatým metabolizmom a nevyváženosťou medzi zdrojmi N a jeho úložnou kapacitou.

#### **Literatúra**

1. ALARD, R. W : Principles of Plant Breeding . Second edition , New York 1999, 254
2. AUSTIN, R. B. - BINGHAM, R.D. - BLACKWELL, R.D. - EVANS, L.T. - FORD, M.A. - MORGAN, C.L. - TAYLOR, M.: Genetic improvements in wheat yields since 1900 and associated physiological changes. J. Agric. Sci. 94, 1980, 675-689.
3. BLUM, A. (1998): Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. Euphytica, 100, 77-83.

4. BRANCOURT-HULMEL, M. - DOUSSINAULT, G. - LECOMTE, C. - BÉRARD, P. - Le BUANEC, B. - TROTTE, M., 2003: Genetic improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992. *Crop Sci.* **43**, 37-45.
5. CALDERINI, D.F. - DRECCER M.F. - SLAFER, G.A.: Genetic improvement in wheat yield and associated traits. A re-examination of previous results and the latest trends. *Plant Breeding* **114**, 1995, 108-112.
6. DONALD, C.M. - HAMBLIN, J.: *Adv. Agron.* **28**, 1976, 361-405
7. FABRIZIUS, M.A. - COOPER, M. - BASFORD, K.E.: Genetic analysis of variation for grain yield and protein concentration in two wheat crosses. *Aust. J. Res.* **48**, 1997, 605-614
8. FALCONER, D.S., 1989: *Introduction to Quantitative Genetics*, 3<sup>rd</sup> Ed. Longman Press, London.
9. FEIL, B.: The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends Agron.* **1**, 1997, 103-119.
10. FLINTHAM, J.E. et al.: *Journal of Agric. Sci. Cambridge*, **128**, 1997, 11-25.
11. HALLORAN, G.M.: Genetic analysis of grain protein percentage in wheat. *Theor. And Appl. Genet.* **46**, 1975, 79-86.
12. MATHER, K. - JINKS, J.L.: *Biometrical Genetics* Chapman and Hall Ltd London 1971, 382
13. MOLL, R.H. - KAMPRATH, E.J. and JACKSON, W.A., (1982): Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. In: *Agron. J.*, **74**, s. 562-564.
14. NILSSON –EHLE, H: *Kreuzunguntersuchungen an Hafer und Weizen* 1909 Lund
15. NYQUIST, W.E., 1991: Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**, 235-322.
16. ORTIZ-MONASTERIO, R. - PEÑA, R.J. - SAYRE, K.D. - RAJARAM, S. (1997): CIMMYT's genetic progress in wheat grain quality under four nitrogen rates. *Crop Sci.* **37**, 892-898.
17. RAJARAM, S.(2000): Prospects and promise of wheat breeding in the 21st century. In: Abstracts of oral and posters presentations: 6th International wheat conference. Budapest, 24.
18. SEARS, E.R.: The aneuploids in common wheat. *Res. Bull. N 572*, Missouri Agric. Stn. Columbia, MO
19. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A. (2000): Chlorophyll and nitrogen content in leaves of winter wheat at different genotypes and fertilization. *Rostl. Výr.*, **46**, 2000 (6), 237-244.
20. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A. (2003): Pokrok v agronomických znakoch pri česko-slovenských odrodách pšenice letnej f. ozimnej povolených v rokoch 1923-1995. *Acta fytotechnica et zootechnica*, **6**, 4, 93-100.
21. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A.(2002): Niektoré aspekty selekcie na zvýšenie efektívnosti príjmu a využitia dusíka vo vzťahu k parametrom kvality pri ozimnej pšenici. Zb. Z 8. odborného seminára "Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Šľachtenie obilnín na kvalitu". VÚRV Piešťany, 32-41.
22. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A.: Genetický pokrok v úrode a kvalite zrna pšenice – In: *Progres v biológii* : Zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie 8. -9. september 2005 / Ed. M. Zima, P. Boleček, R. Omelka: Fakulta prírodných vied UKF, 2005. – S. 385 – 387,
23. UŽÍK, M.: Súčasný stav vo výskume a šľachtení pšenice. In: *Perspektívy genetiky, šľachtenia a semenárstva rastlín* : Zborník referátov k tematickým okruhom odbornej diskusie. Nitra : SPU, 2000. - S.71-79.
24. ŽOFAJOVÁ, A. - UŽÍK, M.: Historický sortiment odrôd pšenice letnej f. ozimnej - hodnotenie úrody a kvality - In: *Genofond.* - č. 8 (2004), s. 24 - 25.

**Tabuľka 1: Koncentrácia N (v % sušiny) v klasení a v zrelosti a ukazovatele kvality zrna**

Odroda	Klasenie		Zrelosť					
	nadzemná biomasa	koreň	koreň	slama	zrno	Obsah bielkovín (NIRS)	Obsah lepku (NIRS)	Tvrdosť zrna (NIRS)
1	1,101abc	0,785d	0,692	0,452	2,714ab	15,36	57,91	79,04
2	1,040a	0,680ab	0,734	0,518	2,703b	15,29	55,97	80,94
3	1,054ab	0,608a	0,595	0,476	2,760a	15,10	58,89	81,17
4	1,356de	0,709cb	0,694	0,579	2,268ab	13,12	44,12	78,72
5	1,531f	0,744cd	0,662	0,383	1,976ab	11,04	37,36	61,40
6	1,309de	0,694cb	0,598	0,436	2,224a	12,75	43,50	75,55
7	1,219cd	0,670ab	0,658	0,457	2,095ab	11,64	42,20	73,30
8	1,421cf	0,749cd	0,690	0,550	2,268ab	13,30	47,71	75,04
9	1,208bcd	0,716bcd	0,708	0,456	1,982ab	10,87	38,65	69,13
10	1,333de	0,701cb	0,678	0,423	1,988ab	11,56	38,73	78,53
$\bar{x}$	1,256	0,705	0,670	0,472	2,297	13,00	47,36	75,28

**Tabuľka 2: Príjem dusíka v mg na rastlinu v klasení a v zrelosti**

Odroda	Klasenie			Zrelosť			
	koreň	nadzemná biomasa	spolu	koreň	slama	zrno	spolu
1	3,966	52,809	56,775	2,15bc	20,64bcd	40,16ab	62,94a
2	3,564	48,811	52,376	1,72ab	23,72d	37,45a	62,90a
3	4,544	48,491	53,034	2,56c	21,45cd	44,56bcd	68,56a
4	4,645	50,411	55,056	1,31a	20,11bcd	42,52abc	63,94a
5	3,134	49,503	52,637	1,44ab	13,13a	50,52d	65,09a
6	5,542	45,011	50,553	1,72ab	15,56ab	47,32cd	64,61a
7	5,296	44,468	49,764	1,29a	15,92abc	45,63bcd	62,84a
8	6,304	45,530	51,834	1,23a	16,77abc	46,81cd	64,81a
9	4,821	43,614	48,436	1,41a	15,09ab	47,87cd	64,37a
10	5,172	47,105	52,277	1,39a	14,18a	49,01cd	64,58a
$\bar{x}$	4,698	47,57	52,27	1,620	17,65	45,18	64,46
LSD <sub>(0,05)</sub>	1,049	6,49	7,10	0,724	5,815	6,517	68,46

**Tabuľka 3: Translokácia dusíka**

Odroda	Translokácia N (mg.rastlina <sup>-1</sup> )		Podiel N v zrelosti (klasenie =100%)		EAN*		Zberový index N (NHI)	
	nadzemná biomasa	celková biomasa**	koreň	slama	celková biomasa**	nadzemná biomasa	z celkovej biomasy**	z nadzemnej biomasy
1	32,17abc	33,99abc	89,57ab	42,21bcd	88,66b	85,13c	0,636a	0,659a
2	25,09a	26,93a	107,96b	49,14d	83,35ab	79,65abc	0,601a	0,619a
3	27,04ab	29,03ab	97,01ab	43,82cd	77,22ab	73,15ab	0,663ab	0,690abc
4	30,30abc	33,64abc	98,29ab	41,96bcd	86,96ab	81,06bc	0,665ab	0,679ab
5	36,37c	38,07c	90,03ab	25,83a	79,80ab	76,57abc	0,775c	0,792d
6	29,45abc	33,27abc	85,72a	32,80ab	78,20ab	71,17ab	0,739c	0,760cd
7	28,55ab	32,55abc	99,19ab	37,05bc	81,73ab	74,44abc	0,727bc	0,743bcd
8	28,76ab	33,84abc	93,43ab	37,74bc	79,51ab	70,90ab	0,731bc	0,746bcd
9	28,52abc	31,94abc	98,11ab	36,93bc	75,53a	69,30a	0,751c	0,768d
10	32,92bc	36,71bc	97,07ab	31,56ab	80,87ab	74,20abc	0,762c	0,779d
$\bar{x}$	29,91	32,99	95,63	37,90	81,18	75,55	0,704	0,723
LSD <sub>(0,05)</sub>	7,81	8,120	18,97	10,99	11,84	11,22	0,073	0,073

\* Podiel naakumulovaného N v klasení z celkového N v zrelosti, \*\* vrátane koreňov

☒

☒

## VLIV ŠLECHTĚNÍ NA ZLEPŠOVÁNÍ SLADOVNICKÉ KVALITY THE EFFECT OF BREEDING ON IMPROVING MALTING QUALITY

Vratislav PSOTA

*Processing and evaluation of values of technological parameters of barley varieties followed over a fifty-year period (1955-2004) has brought an original view of the results of the breeding effort. During the followed period, extract content in the dry matter of malt increased from the values under 80 % to values over 82 %. Diastatic power increased with the exception of the second half of the 1980s and beginning of 1990s when it achieved values of ca 230 u.WK. At the end of the followed period the diastatic power value usually exceeded 300 u.WK. The value of Kolbach index gradually increased from 35 - 40 % to 43 % and more. Relative extract value (45 °C), followed for a forty-year period, increased from 36 - 38 % to 38 - 40 %. Also the values of final attenuation, followed since the end of the 1970s, increased from 78 - 79 % to 81 %. Level of cytolytical modification followed from the 1990s shows an increasing trend.*

*Key words: barley, breeding, malting quality*

### Úvod

Ječmen se pro výrobu alkoholických nápojů začal využívat asi 3000 až 5000 let před našim letopočtem. Dlouho před tím byl jistě využíván jako potravina. První sladaři získávali své zkušenosti pozorováním a experimentováním. Podobný přístup založený na pozorování byl využíván také při výběru zrna vhodného pro sladování.

Do 19. století byl výběr, místním podmínkám přizpůsobeného ječmene, jedinou používanou metodou pro zlepšování jeho vlastností. Ve více méně uzavřených oblastech vznikaly izolované krajové odrůdy. Čisté pěstitelské odrůdy dnešního typu neexistovaly a pěstovaný ječmen byl vysoce heterogenní. Výběr byl založen především na vzhledu zrna. Oblíbená byla oblá, dobře nalitá zrna s pěknou pluchou. Úroveň moučnatosti či sklovitosti byla zjišťována kousáním nebo žvýkáním zrna.

Některé oblasti se kvalitou svého ječmene proslavily. Ve Střední Evropě patřila k těmto oblastem Morava produkující ječmen s vynikající sladovnickou kvalitou (LEIN, 1964). Do šlechtitelských programů v různých částech Evropy byla zařazována odrůda Haná pedigree a další starohanácké odrůdy, které můžeme nalézt v rodokmenu řady známých odrůd (SKLÁDAL et al., 1967). S křížením dvou odrůd mezi sebou se v širším měřítku začalo až kolem roku 1920.

Na konci 19. století se začalo s laboratorními testy sladovnické kvality. Laboratorní sladování se stalo postupně prostředkem pro hodnocení linií vznikajících ve šlechtitelských programech. Šlechtitelé měli a mají vedle sladovnické kvality pochopitelně i další cíle, např. výnos zrna, podíl zrna nad sítím 2,5 mm, sílu klasu, odolnost proti řadě nemocí apod.

Sladařský ústav v Brně je specializovaným pracovištěm Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS), který se od svého vzniku v roce 1921 zabývá, kromě jiného testování sladovnické kvality nových odrůd ječmene. VÚPS úzce spolupracuje s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ) od jeho založení v roce 1951. Od roku 1954 je pro testování nových odrůd využíváno odrůdově čistého osiva, které je sklízeno v pokusných stanicích ÚKZÚZ. Každoročně je tak získáván velice rozsáhlý zdroj informací o nových odrůdách. Vedle odrůd, které jsou v registračním řízení je ve zkušebních stanicích pěstován i soubor nejrozšířenějších nebo nově registrovaných odrůd.

Šlechtění kulturních rostlin je dlouhodobý proces, jehož výsledek je možno spatřit teprve při zpracování víceletých řad. Obvykle je tímto způsobem sledován vliv šlechtění na výnos.

### Materiál a metody

Zpracovávaná data byla čerpána ze závěrečných zpráv Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně (TRKAN 1955 - 1957; SVĚDIROHOVÁ et al., 1958 - 1974; HLAVINKOVÁ et al., 1975 - 1991; PSOTA 1992 - 2004).

V letech 1955-1990 byly v závěrečných zprávách VÚPS v Brně uváděny výsledky rozborů vzorků ze všech zkušebních stanic bez ohledu na obsah dusíkatých látek (bílkovin) v zrně. Od roku 1991 se do závěrečných zpráv Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně zařazují pouze čtyři vybrané zkušební stanice, ve kterých je průměrný obsah dusíkatých látek (bílkovin) v zrně kontrolních odrůd sladovnického ječmene na optimální úrovni (10,7 - 11,2 %) nebo se těmto hodnotám v daném roce nejvíce přiblížil. Ve snaze dosáhnout objektivního porovnání dat za celé sledované období, byly tedy v letech 1955-1990 z dalšího zpracování vyloučeny zkušební stanice, jejichž průměrný obsah dusíkatých látek (bílkovin) v zrně ječmene se nacházel nejdále od optimálních hodnot.

Do sledování byly zařazeny pouze odrůdy již registrované respektive povolené. Každý rok byl tedy sortiment sledovaných odrůd trochu jiný, protože překonané odrůdy nebo odrůdy, které se nerozšířily z tohoto souboru vypadly a byly v následujícím roce nahrazeny novými odrůdami. Do roku 1996 byly v sortimentu odrůd až na výjimky pouze odrůdy vyšlechtěné českými a slovenskými šlechtiteli. Teprve

od tohoto roku se v sortimentu objevují zahraniční odrůdy. Zahraničními odrůdami je v současné době v České republice oseta většina ploch, které zaujímá jarní ječmen.

V průběhu 50 let byla sledována řada technologických parametrů. Jen několik z nich bylo sledováno po celé období. Zpracovány byly především znaky zajímavé z pohledu dnešních požadavků na sladovnickou kvalitu.

## Výsledky a diskuse

Pokrok v oblasti poznání základů určujících sladovnickou kvalitu a pokrok v oblasti laboratorní techniky se odrazil v mírných úpravách používaných metodik především ve směru jejich standardizace a automatizace.

Pravděpodobně nejstarší používanou metodou je stanovení extraktu. Tato metoda byla zavedena v 2. polovině 19. století. V průběhu času byla metoda postupně standardizována. Poslední významnou úpravou bylo přijetí metodiky přípravy laboratorní sladiny na kongresu EBC v roce 1975. Podobnými úpravami ve smyslu standardizace prošly i ostatní starší metody (diastatická mohutnost, Kolbachovo číslo apod.). V průběhu padesáti let byly některé metody nově zaváděny. Patří k nim dosažitelný stupeň prokvašení a relativní extrakt při 45 °C, které se začaly používat ve VÚPS pro testování nových odrůd v 60. letech minulého století. K nejnovějším, běžně sledovaným metodám patří stanovení friability a obsahu  $\beta$ -glukanů ve sladince, které se začaly běžně stanovovat až na přelomu 80. a 90. let minulého století.

Změnu systému hodnocení umožnilo především zavedení mikrosladovacích zkoušek. Nejprve byly vzorky testovaného ječmene vkládány do pytlíků ze silonového pletiva. Další vývoj byl pak zaměřen na konstrukci vlastních laboratorních automatizovaných mikrosladoven. Ve VÚPS se pro testování odrůd ječmene používala mikrosladovna fy Seeger od roku 1975. V roce 1995 byla tato mikrosladovna nahrazena mikrosladovnou fy KVM, která byla sestrojena na základě zkušeností a potřeb VÚPS. Všechny výše nastíněné změny se jistě určitým způsobem odrazilily i na hodnotách sledovaných znaků.

Obsah dusíkatých látek je jedním ze základních ukazatelů sladovnické kvality, který je však velmi snadno ovlivnitelný vnějšími podmínkami působícími na rostliny ječmene především v době tvorby zrna. Vysoké hodnoty nad 12,5 % nebo naopak nízké hodnoty pod 9,5 %, jsou považovány za neakceptovatelné. Úroveň dusíkatých látek ovlivňuje většinu dalších sladovnických znaků. Se zvyšováním obsahu dusíkatých látek se snižuje obsah extraktu, snižuje se hodnota Kolbachova čísla a zvyšují se hodnoty relativního extraktu při 45 °C a diastatické mohutnosti. V souvislé padesátileté časové řadě lze vysledovat jistou tendenci k postupnému snižování akumulace dusíkatých látek v zrně.

Obsah extraktu vypovídá o úrovni modifikace škrobu v průběhu sladování. U tohoto významného technologického a ekonomického znaku sledovaného po celé 50-ti leté období je vidět výrazný výsledek šlechtitelského pokroku. Zatímco ve 2. polovině 50. let byly naprosto normální hodnoty pod 80 % extraktu, na konci 70. let se již extrakty pohybují na úrovni 81 % a na konci sledovaného období jsou již běžně hodnoty kolem 82 %. Ze strany zpracovatelského průmyslu je zatím stále požadavek na zvyšování extraktivnosti. V odrůdových pokusech se začínají vyskytovat odrůdy s extraktem nad 83 %.

Dalším technologickým znakem sledovaným po celé 50-ti leté období, je diastatická mohutnost. Vývoj šlechtitelského pokroku u diastatické mohutnosti, tj. aktivity amylolytických enzymů (především  $\beta$ -amylázy) je velice zajímavý. Zdá se, že zatímco do konce 70. let minulého století nebyl s hodnotami diastatické mohutnosti významnější problém, v 80. a 90. letech byla diastatická mohutnost nízká. V 2. polovině 90. let minulého století a na začátku tohoto století došlo k zlepšení této situace a hodnoty diastatické mohutnosti se běžně pohybují nad 280 j. WK. Požadavky na vyšší hodnotu u tohoto znaku jsou především ze strany pivovarů používajících škrobnaté surogáty.

Proteolytické rozluštění vyjádřené hodnotou Kolbachova čísla bylo ve VÚPS sledováno od roku 1956. I u této vlastnosti došlo k významnému šlechtitelskému pokroku, tj. k postupnému zlepšování modifikace dusíkatých látek. V první polovině 60. let byla aktivita proteolytických enzymů u sledovaných odrůd výrazně nízká. Od druhé poloviny 60. let dochází u sledovaných odrůd k postupnému zlepšování proteolytického rozluštění. V současné době se průměrné hodnoty u sledovaných odrůd pohybují kolem 43 %. U některých vzorků jsou zaznamenávány hodnoty kolem 50 %. Zdá se však, že již vysoké hodnoty nejsou zcela příznivé pro sensorickou kvalitu finálního výrobku. Vzdávající aktivita proteolytických enzymů je provázána nárůstem obsahu rozpustného dusíku ve sladu.

Od roku 1963 byl sledován i relativní extrakt při 45 °C. Tento znak vyjadřuje aktivitu proteolytických enzymů a  $\alpha$ -amylázy. Koreluje do určité míry s hodnotou Kolbachova čísla. Po celé sledované období docházelo k postupnému zvyšování hodnot relativního extraktu při 45 °C. Hodnoty byly ovlivněny jednak odrůdovou skladbou a jednak průběhem počasí v daném roce. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo v letech 1997 a 1998. V České republice je snaha zachovat sensorický charakter národního nápoje (KOSAŘ et al. 2004). Proto se v poslední době uplatňují v odrůdové skladbě České republiky i odrůdy u nichž se relativní extrakt pohybuje na úrovni max. 38 %.

Od roku 1968 je získávána informace o předpokládaném průběhu kvašení v provozních podmínkách metodou založenou na prokvašení laboratorně připravené sladiny. Jedná se o japonskou metodu z roku 1967. Po celou dobu sledování tohoto znaku je vidět značný šlechtitelský progres. V prvních letech

sledování se hodnota dosažitelného stupně prokvašení pohybovala kolem hodnot 78 - 79 %. V posledních letech se průměrná hodnota ve sledovaném souboru pohybuje již kolem 81 %. Odrůdy ječmene vhodné pro české pivo se vyznačují nižším stupněm prokvašení sladiny (max. 80 %) a odolností proti přelušťování sladu během klíčení (KOSAR et al. 2004).

Od 80. let minulého století byla sledována kvalita sladu pomocí měření jeho křehkosti na přístroji friabilimetr. Pro test odrůd v rámci registračního řízení byla tato metoda uplatněna od roku 1992 spolu se stanovením obsahu  $\beta$ -glukanů ve sladině. Oba tyto parametry hodnotí cytolytické rozluštění sladu. Friabilita vypovídá přímo o fyzikálních vlastnostech sladu. Optimální hodnota friability je 86 %. Obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině je odrazem úrovně destrukce buněčných stěn a v nich obsažených  $\beta$ -glukanů. Oba tyto parametry jsou v úzké korelaci. Obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině je dnes považován za důležitý ekonomický parametr, protože ovlivňuje filtrovatelnost meziproduktů při výrobě piva a tím spotřebu drahého filtračního materiálu. Oba znaky jsou ovlivněny nejen odrůdovou skladbou, ale i průběhem počasí v daném ročníku. Za optimální obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině jsou považovány hodnoty pod 250 mg/l. Jako jedna z prvních se dostala pod tuto hranici slovenská odrůda Kompakt.

### Závěr

Zpracováním a vyhodnocením hodnot technologických znaků odrůd ječmene sledovaných za padesátileté období (1955-2004) byl získán originální pohled na výsledky šlechtitelského úsilí. Obsah extraktu v sušině sladu v průběhu sledovaného období narůstal z hodnot nižších než 80 % až po hodnoty nad 82 %. Diastatická mohutnost také postupně stoupala kromě období druhé poloviny 80. let a počátku 90. let, kdy dosahovala hodnot kolem 230 j.WK. Na konci sledovaného období se hodnota diastatické mohutnosti pohybovala běžně nad 300 j.WK. Hodnota Kolbachova čísla postupně stoupala z 35 - 40 % na úroveň 43 a více %. Hodnota relativního extraktu při 45 °C, sledovaná po dobu 40ti let, vzrostla z 36 - 38 % na 38 - 40 %. Také hodnoty dosažitelného stupně prokvašení, sledované od konce 70. let, vzrostly ze 78 - 79 % na 81 %. Úroveň cytolytického rozluštění, sledovaná od 90. let vykazuje mírně vrůstající trend.

Prezentovaná práce byla zpracována za podpory MŠMT ČR (MSM6019369701) v rámci řešení výzkumného záměru VÚPS, a. s.

### Literatura

1. HLA VINKOVÁ, M.: Výzkum odrůd a nových šlechtění sladovnického ječmene. Závěrečná zpráva VÚPS, Brno, 1976-1992.
2. KOSAR, K. - PSOTA, V. - MIKYŠKA, A.: Barley varieties suitable for production of the Czech-type Beer. In: Czech J. Genet. Plant Breed., 40, 2004, 4, s. 137-139.
3. LEIN, A.: Breeding for malting quality. In Barley Genetics I, 1st Proceedings of the first international barley genetics symposium, eds. S. Broekhuizen, G. et al. Pudoc, Wageningen: Centre for Agrucultural Publications and Documentation, 1964, s. 310-324.
4. PSOTA, V.: Hodnocení odrůd sladovnického ječmene sklizeň 1995. Závěrečná zpráva VÚPS, Brno, 1993-2004.
5. SEJKOROVÁ, Š.: Vývoj sladovnické kvality českých odrůd jarního ječmene. Diplomová práce, MZLU Brno, 2005.
6. SKLÁDAL, V. et al.: Sladovnický ječmen, SZN Praha 1967.
7. SVĚDIROHOVÁ, M.: Výzkum a výběr odrůd sladovnických ječmenů podle jejich pivovarských vlastností se zřetelem na další zkvalitňování rajonizace a výrobu exportních sladů. Závěrečná zpráva, VÚPS, Brno, 1959-1967.
8. SVĚDIROHOVÁ, M. - HLA VINKOVÁ, M.: Výzkum odrůd a nových šlechtění sladovnického ječmene. Závěrečná zpráva VÚPS, Brno, 1968-1975.
9. TRKAN, M.: Výzkum a výběr vhodných odrůd pivovarských surovin se zřetelem k jejich amylolytické účinnosti a event. její umělé zvyšování pěstováním plísni na sladu. Závěrečná zpráva, VÚPS, Brno, 1956.
10. TRKAN, M.: Výběr odrůd pivovarských ječmenů a zhodnocení jednotlivých pěstitelských oblastí ČR se zvláštním zřetelem k výrobě sladu plzeňského a bavorského typu. Závěrečná zpráva, VÚPS, Brno, 1957.
11. TRKAN, M.: Výzkum a výběr nejvýkonnějších odrůd sladovnických ječmenů se zřetelem na další zkvalitňování rajonizace. Závěrečná zpráva, VÚPS, Brno, 1958.

✉

✉

Vratislav PSOTA, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika

## BIELKOVINOVÉ DETERMINANTY CELIAKÁLNEHO OCHORENIA PROTEIN DETERMINANTS OF COELIAC DISEASE

Ivan MICHALÍK - Dana URMINSKÁ

*Present results give the new experimental information in opinions on the former explanation of toxicity prolamin proteins (gliadins, hordeins, secalins, avenins) and causes of coeliac disease.*

*Key words: coeliac disease, gluten-sensitive enteropathy, cereals, pseudocereals, Elisa-method.*

Intolerancia na lepkové bielkoviny spôsobuje u časti populácie neinfekčné ochorenie známe pod názvom celiakia alebo gluténsenzitívna enteropatia.

Vo všeobecnosti sa traduje názor, že prírodné zdroje potravín (rastlinného, či živočíšneho pôvodu) sú pre zdravie ľudí neškodné. Avšak existujú evidentné dôkazy o tom, že viaceré prírodné látky v potravinách môžu pri ich konzumácii vyvolávať nežiadúce účinky (toxicita, intolerancia, metabolické poruchy a pod.)

Prevažná väčšina antinutritívnych alebo aj toxických látok v procese ich úpravy a spracovania sa inaktivuje. Už starí indiáni vedeli, že namáčaním zrna strukovín dochádza ku čiastočnej alebo úplnej strate ich toxicity. Neplatí to však pre intoleranciu na lepkové bielkoviny. Ani termická, či iná úprava zrna obilnín a z nej pripravených segmentov neznižuje reaktivitu lepkových bielkovín. Je to dané tým, že toxicitu spôsobujú nielen lepkové bielkoviny, ale aj ich štiepne produkty. Treba konštatovať, že časť ľudskej populácie je permanentne intolerantná na lepkové bielkoviny.

Intoleranciu (neznášanlivosť, anafylaxia, precitlivenosť, averzia, intoxikácia) môžeme definovať ako ľubovoľnú fyziologickú negatívnu reakciu organizmu vyvolanú konzumáciou potravín.

Frekvencia výskytu intolerancie na lepkové bielkoviny v slovenskej populácii je 1 osoba na 500 – 1 000 ľudí. Na Slovensku sa predpokladá okolo 3 000 – 5 000 chorých na celiakiu. Prítomnosť lepkových bielkovín v potrave spôsobuje ochorenie známe pod rôznymi pojmami: celiakálne ochorenie (celiakia), Geeova – Herterova – Heubnerova choroba, infantilizmus, celiakálna sprue, netropická sprue, gluténsenzitívna enteropatia (gluténová enteropatia), ideopatická sprue dospelých, maloabsorpčný syndróm a ďalšie.

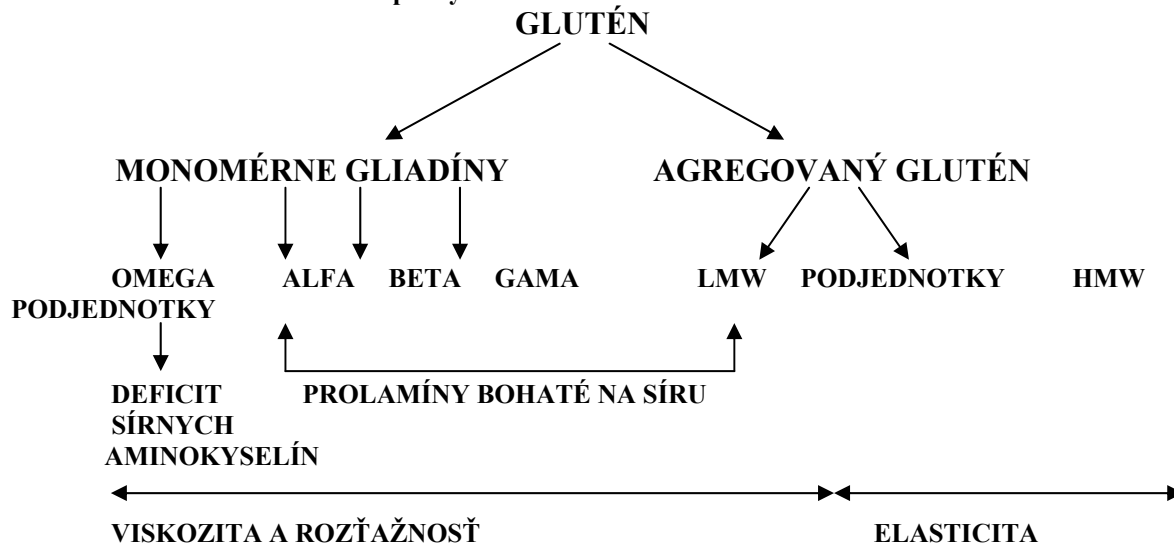
Celiakálne ochorenie bolo známe už v 2. storočí pred Kristom (príznaky popísal rímsky lekár Galenos). Klinický popis ochorenia podal Samuel Gee ešte v roku 1888.

Celiakia je považovaná za metabolické ochorenie poškodenia štruktúry malej intestinálnej sliznice tenkého čreva, ktoré spôsobuje disfunkciu buniek sliznice. Ochorenie vyvolávajú predovšetkým prolaminové bielkoviny týchto obilnín (%-álny podiel prolaminovej frakcie z celkového obsahu bielkovín zrna): pšenica – gliadíny cca 40 %, raž – sekalíny cca 30 %, jačmeň – hordeíny cca 34 %, ovos – aveníny cca 14 %.

Prolamíny sú prítomné aj v zrne iných obilnín, resp. pseudoobilnín, ktoré nevykazujú alergénne vlastnosti. Medzi takéto plodiny patria tieto: cirok – cca 47 %, bar vlašský – cca 38 %, kukurica – cca 28 %, proso – cca 13 %, rosička krvavá – cca 11 %, ježatka obilná – cca 8 %, pohánka – cca 6 %, ryža – cca 4 % a láskavec – cca 3 %.

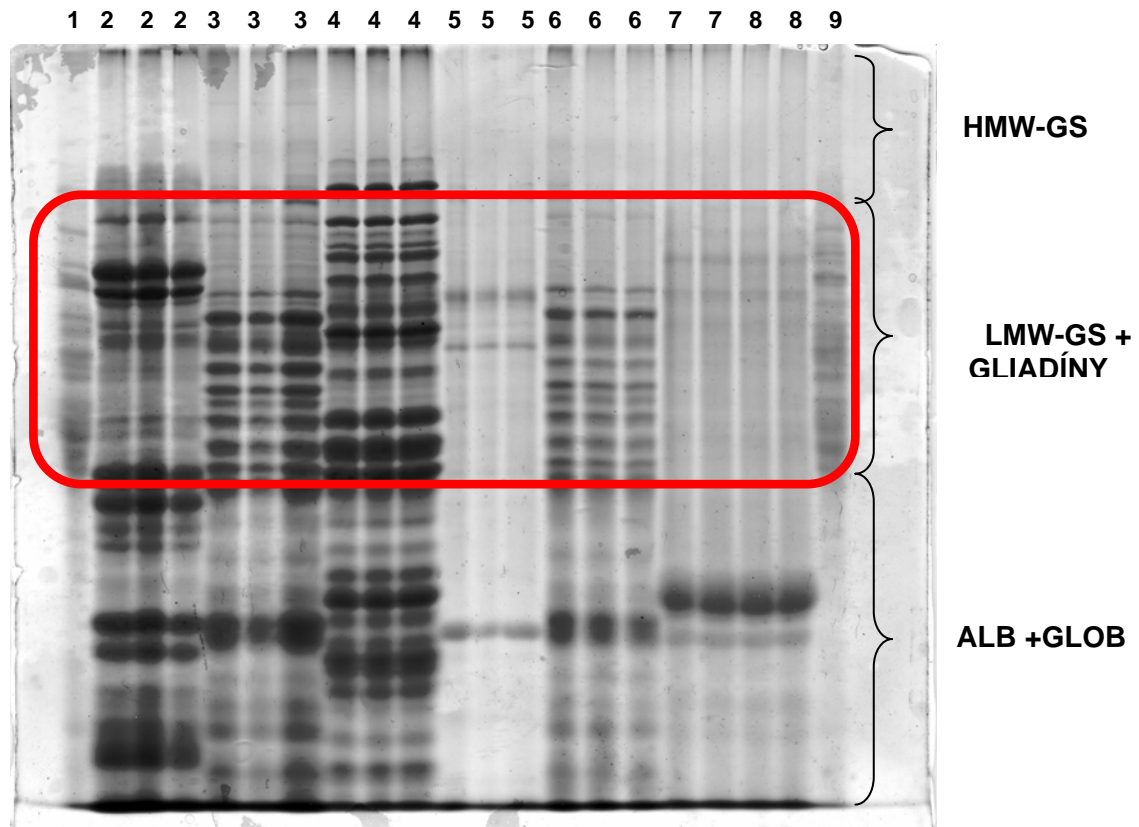
Prolaminové bielkoviny tvoria súčasť zásobných bielkovín, tzv. lepkových bielkovín zrna obilnín, lokalizovaných v endosperme, ktoré sú uvedené na obrázku 1.

**Obrázok 1: Frakčná štruktúra lepkových bielkovín**



Komponentná skladba lepkových bielkovín (gluténu) určuje pekársku kvalitu zrna pšenice. Jednotlivé frakcie gluténu môžeme separovať elektroforetickou metódou v PAGE (obr. 2). Pásmo bielkovín ohraničené rámečkom predstavuje monoméne gliadíny a LMW-subjednotky, ktoré sú bezprostredne alebo sprostredkované zodpovedné za ochorenie. Podstata intolerancie lepkových bielkovín sa rieši z aspektu primárnej a sekundárnej štruktúry predovšetkým prolaminových bielkovín, ich reaktivity (alergénneho efektu), klinického prejavu a patogenézy ochorenia na úrovni zmien látkového metabolizmu, narušenia homeostázy a štruktúry buniek sliznice tenkého čreva. Okrem toho sa riešia aj otázky skladby surovín a produktov pre bezlepkovú diétu, ale aj uplatnenia kontrolného systému kvality a bezpečnosti potravín. Riešenie naznačeného problému je zložité a vyžaduje komplexný interdisciplinárny a medziodborový prístup.

**Obrázok 2: Elektroforeogram lepkových bielkovín zrna obilnín a pseudoobilnín**



1. Marquis – štandard, 2. Amaran PI 60 45 72, 3. Pohánka FAG 120/82, 4. Cícer Slovák, 5. Proso ABY – BS H091 – 00, 6. Pohánka Špačinská, 7. Cirok zrnový, 8. Cirok zrnový, 9. Chinese Spring-štandard

Na odštartovanie celiakálneho ochorenia vplyvajú viaceré vlastnosti zásobných bielkovín zrna obilnín (exogénne príčiny), ale aj endogénne príčiny dané receptivitou organizmu na príjem lepkových bielkovín. Medzi exogénne príčiny treba zaradiť najmä faktor množstva a faktor primárnej a sekundárnej štruktúry prolaminových determinant.

1. *Faktor množstva* = koncentračný tlak reaktívnych gliadínov, ktorý rozhoduje o pravdepodobnosti interakcie medzi alergénnou bielkovinou (alergén) a receptormi epitelových buniek sliznice tenkého čreva

Limit obsahu lepkových bielkovín (frakcie prolaminov a glutelínov) je  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  produktu a limit pre gliadíny je  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  produktu.

Predpokladáme, že rozdiely v obsahu alergénnych lepkových bielkovín v zrne ovsa (stanovené metódou ELISA) sú pravdepodobne determinované aj faktorom množstva (?).

Naproti tomu, je známa negatívna reakcia pšeničného škrobu v potravinách (0,5 % obsah lepkových bielkovín), ktorú nemôžeme vysvetliť iba faktorom množstva (?).

2. *Faktor primárnej štruktúry*, t.j. frekvencie špecifických reaktívnych peptidových fragmentov.

Primárna štruktúra gliadínových bielkovín sa vyznačuje vysokou frekvenciou zvyškov Glu + Gln a Pro, ktorá zrejme podmieňuje sekundárnu štruktúru a reaktivitu oligopeptidov (tab. 1).



**Tabuľka 1: Aminokyselinová skladba purifikovaných frakcií zásobných bielkovín v prepočte na lyzínové zvyšky (AA zvyšky.1 mol<sup>-1</sup> lyzínu) (podľa Michalík I., Peťovský P. (1995) )**

Amino acid	Gluten	Gliadin	Glutenin	gama-Gliadin-3 <sup>x</sup>
Lys	1	1	1	1,0
His	3	3	1	2,2
Arg	3	3	2	1,9
Asp	7	8	4	2,7
Thr	6	6	3	3,4
Ser	10	9	5	7,0
<b>Glu</b>	63	71	23	61,7
<b>Pro</b>	27	28	9	29,4
Gly	6	5	6	4,2
Ala	4	5	3	5,2
Cys	-	3	-	3,0
Val	7	8	3	6,5
Met	-	-	-	1,7
Ilu	5	7	2	7,1
Leu	10	11	4	10,0
Tyr	4	3	2	0,6
Phe	6	7	2	8,8

<sup>x</sup> – HEUBNER, ROTHFUS, WALL (1967)

V súčasnej dobe nepoznáme jednoznačnú odpoveď na podstatu mechanizmu patogenézy celiakie, ale ani na otázky:

- prečo prolamíny kukurice, ktoré majú porovnateľnú primárnu štruktúru s gliadínmi, nie sú alergénne?
- prečo niektoré odrody ovsa vykazujú obsah alergénnych bielkovín < 0,02 %?

Vychádzame z poznania existencie imunodominantných peptidových epitopov, ktoré sú rozpoznávané T-lymfocytmí. Tieto fragmenty sú lokalizované v oblasti 57-75 AA zvyškov  $\alpha$ -gliadínu a vykazujú nasledovnú primárnu štruktúru:

- Pro – Phe – **Pro – Gln – Pro – Gln** – Leu – Pro – Tyr
- Pro – Gln – **Pro – Gln** – Leu – Pro – Tyr – **Pro – Gln**
- Pro – Tyr – Pro – Gln – Pro – Gln – Leu – Pro – Tyr

Je pozoruhodné, že aj syntetické tetrapeptidy indukujú tvorbu protilátok (imunitná odpoveď na prítomnosť gliadínov):

- Pro – Ser – Gln – Gln a - Pro – Gln – Gln – Gln a ďalšie. Analogické fragmenty sú lokalizované v N-koncovej oblasti gliadínového polypeptidu (AA – zvyšky 3-55, 3-19 a 39-45) a v C-koncovej oblasti (fragmenty 211-217); predpokladáme, že gliadínová frakcia obsahuje viacej alergénnych gliadínových fragmentov.

Medzi endogénne príčiny intolerancie na gliadíny a odštartovanie celiakálneho ochorenia patria predovšetkým tieto:

1. supersenzitívny imunitný systém,
2. prítomnosť receptorov v epitelových bunkách sliznice tenkého čreva pre interakciu s gliadínovými fragmentami a ich štiepnymi produktmi,
3. nedostatočná enzymatická výbava degradácie gliadínových bielkovín a toxických produktov enzymatickej hydrolýzy v zažívacom trakte je príčinou poškodenia enterocytov,
4. schopnosť T-lymfocytov produkovať protilátky (indukované prítomnosťou gliadínových epitopov) ako proti gliadínovým, tak aj proti vlastným antigénom enterocytov.

Mechanizmus patogenézy zahŕňa hydrolýzu lepkových bielkovín endopeptidázami počas ich trávenia, pričom vznikajú štiepne produkty (oligopeptidy) tvorené 33 aminokyselinovými zvyškami (pochádzajú z oblasti 57 – 75), ktoré sú rezistentné na trypsín. V dôsledku uvedeného dochádza v tenkom čreve ku akumulácii týchto polypeptidov. Imunodominantné epitopy tvorené „Pro – **Gln** – Pro – **Gln** –

Leu – Tyr“ po ich deaminácii vytvárajú imunoaktívny oligopeptid zložený z nasledovných zvyškov aminokyselín:

„Pro – **Glu** – Pro – **Glu** – Leu – Tyr“. Tento fragment bezprostredne prostredníctvom interakčných väzieb s T-lymfocytmi iniciuje tvorbu špecifických protilátok zo skupiny IgA, IgG a IgE. Okrem toho je možná aj autoimúnna reakcia a vznik HLA antigénov (markéry D8, DR3, DQW2, TK8 a iné), ktoré účinkujú na T-lymfocyty a spôsobujú tvorbu protilátok proti de facto bunkám sliznice tenkého čreva.

V dôsledku týchto zložitých procesov dochádza ku nasledovným patologickým zmenám:

- narušenie aktivity enzýmov v tenkom čreve a látkového metabolizmu,
- deformácia štruktúry pletiva tenkého čreva,
- imunopatologické reakcie: tvorba špecifických protilátok a nešpecifických mediátorov imunitnej odpovede,
- maloabsorpčný syndróm, ktorý je zodpovedný za deficit metabolitov, vitamínov a bioorganických látok.

Čo sa týka kontroly kvality produktov a potravín pre potreby bezlepkovej diéty, zistili sme určité rozdiely vo výsledkoch medzi používanými ELISA kitmi od jednotlivých výrobcov. Taktiež sme stanovili, že niektoré komerčné výrobky z obchodnej siete presahujú limit < 0,02 lepkových bielkovín, čo poukazuje na evidentné nedostatky v oblasti kontrolnej činnosti príslušných štátnych orgánov.

Analýza svetového sortimentu odrôd ovsu potvrdila rozdiely v prítomnosti alergénnych lepkových bielkovín. Tým je možné aj vysvetliť rozdielne názory jednotlivých autorov na používanie ovsu pre potreby bezlepkovej diéty. I napriek tomu naďalej zastávame názor, že ovos je rizikový produkt pre celiatikov a nie je vhodný pre bezlepkovú diétu. Na základe výsledkov analýzy širokého sortimentu plodín pre potreby bezlepkovej diéty môžeme odporučiť nasledovné pseudoobilniny: pohánka, láskavec, rosička krvavá, ježatka obilná, proso, cirok, quinoa a bar vlašský.

☒

☒

## IDENTIFIKACE ZDROJŮ TRITIKALE SE SNÍŽENOU AKTIVITOU AMYLASOVÝCH ENZYMŮ A VHODNĚJŠÍM SLOŽENÍM BÍLKOVIN PRO ZLEPŠENÍ PEKAŘSKÉ KVALITY IDENTIFICATION OF TRITICALE GENETIC RESOURCES WITH LOW AMYLASE ACTIVITY AND BETTER STORAGE PROTEIN COMPOSITION FOR BREAD-MAKING QUALITY IMPROVEMENT

Petr MARTINEK - Edita GREGOVÁ - Miroslava VINTEROVÁ - Kateřina  
PAJURKOVÁ - Tomáš VYHNÁNEK

*To improve bread-making quality of triticale (*X Triticosecale* Wittmack;  $2n = 6x = 42$ , AABBRR), the glutenin allele *Glu-D1d* encoding HMW subunits 5+10 is used. *Glu-D1d* is on chromosome 1DL and positively affects bread-making quality in wheat. The two donor types of winter triticale with translocated chromosome 1R were used: Presto 1D.1R<sub>5+10</sub>-2 and Presto Valdy. These were developed by Professor A.J. Lukaszewski from the Univ. of California, USA. Single translocation 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 carries on the long arm of 1R the wheat segment from 1DL with the *Glu-D1d* replacing the secalin locus *Sec-3*, double translocation 'Valdy' carries on the long arm of 1R the translocation 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 and on the short arm a segment from 1DS with wheat loci *Gli-D1* and *Glu-D3*. Both types of donors were crossed with important European triticale cultivars. The offsprings of  $F_2 - F_5$  single plants were selected for the presence of *Glu-D1d* using DNA markers. In  $F_5$  generation, lines homozygous in *Glu-D1d* and in some cases even in the whole spectrum of HMW proteins were found using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. The triticale line M-4/2 with improved bread-making grain quality has been developed. A possibility of improving bread-making grain quality in triticale is limited by low values of Hagberg falling number (FN), which are usually markedly lower than those in wheat. From this point of view, it is necessary to combine suitable glutenin alleles with the genes controlling low  $\alpha$ -amylase activity.*

*Key words: triticale, bread-making quality, Hagberg falling number, *Glu-D1d**

Článek se zabývá možností zlepšení některých technologických charakteristik u tritikale (*X Triticosecale* Wittmack). Tritikale jako pšenično-žitný hybrid s genetickou výbavou  $2x = 6x = 42$ ; AABBRR se vyznačuje oproti pšenici lepší snášenlivostí k horším půdním a povětrnostním podmínkám a k horší předplodině. V horších půdních podmínkách může dosahovat lepší výnosy než pšenice a je považováno za nejvíce přizpůsobivý obilní druh. Vzhledem k tomu, že tritikale je šlechtěno poměrně krátkou dobu, lze předpokládat, že jeho intenzivní šlechtění na výnos a krátkostébelnost bude mít podobně rychlý vzestupný průběh jako tomu bylo u pšenice, kdy zkracování délky stébla bylo provázeno výrazným zvyšováním sklizňového indexu a výnosového potenciálu. Tato skutečnost logicky ukazuje na perspektivu tritikale jako plodiny, která má reálnou šanci stát se plodinou využitelnou i pro intenzivní pěstitelské technologie a v budoucnu výnosově konkurovat pšenici. Proto je třeba se rovněž zabývat možností využití tritikale pro lidskou výživu. Oproti pšenici má tritikale nevýhodu v tom, že současné odrůdy se nedají uspokojivě využít pro pečení chleba. Zrno tritikale se od pšeničného liší: (1) menším obsahem lepku, který je méně kvalitní, (2) vyšší aktivitou  $\alpha$ -amylasy a dalších enzymů, (3) lepším aminokyselinovým složením bílkovin (především vyšší obsah lysinu) a tím jejich lepší nutriční hodnotou, (4) vyšším obsahem rozpustné potravní vlákniny a minerálů, (5) příjemnou mírně oříškově-žitnou vůní. Tyto odlišné vlastnosti jsou podmíněny přítomností žitného R genomu, kterým je nahrazen D genom pšenice obecné (*T. aestivum* L.,  $2x = 6x = 42$ ; AABBDD).

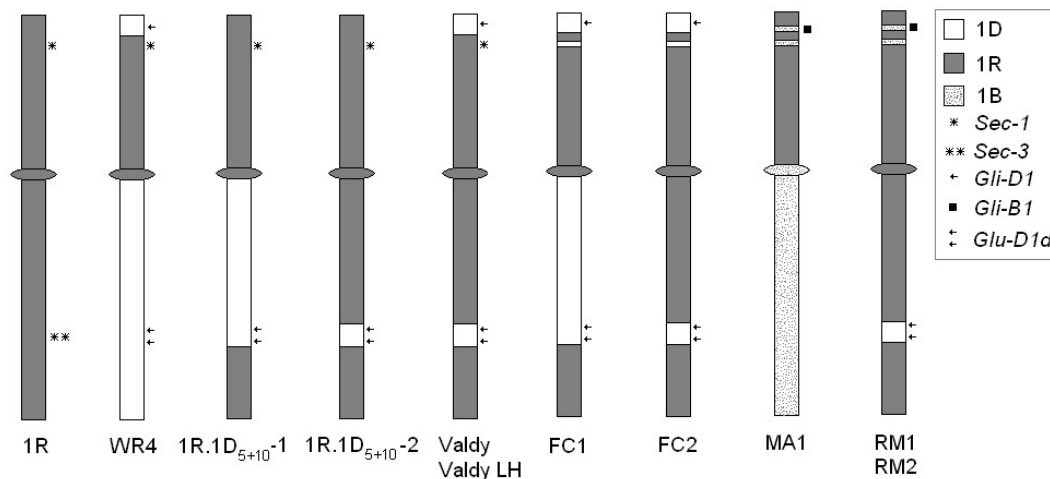
Různé odrůdy pšenice mohou mít velmi různorodou technologickou kvalitu z hlediska využitelnosti pro výrobu pekárenských výrobků z kynutého těsta. Tomu odpovídá systém jejich zařazení do skupin kvality (E, A, B a C). Technologická jakost je u pšenice podmíněna řadou genů kódujících syntézu zásobních bílkovin zrna, z nichž významnou úlohu mají vysokomolekulární (HMW) bílkovinné podjednotky, nacházející se na chromozomech první (1A, 1B, 1D) a šesté (6A, 6B, 6D) homeologické skupiny. Mezi HMW podjednotky patří u pšenice gliadiny a některé gluteniny, přičemž zvláště HMW gluteniny mají rozhodující význam. Míru, jakou jednotlivé HMW podjednotky ovlivňují kvalitu lepkových bílkovin lze vyjadřovat pomocí tzv. 'skóre' (PAYNE a LAWRENCE, 1983). Zajímavé je, že téměř všechny odrůdy pšenice s nejlepší pekařskou kvalitou (E a A) obsahují na chromosomu 1D gluteninový lokus *Glu-D1* s alelickým blokem *d*, který kóduje vysokomolekulární (HMW) podjednotky 5+10. Podjednotky 5 a 10 jsou ve velmi těsné genetické vazbě (bloku) a fungují jako jediný gen. Proto se pro ně používá jeden genetický symbol *Glu-D1d* (syn. *Glu-D1 5+10*). *Glu-D1d* významně přispívá k dobré pekařské kvalitě u pšenice (má vysoké GLU-skóre). Na rozdíl od pšenice se u tritikale genom D nevyskytuje, proto se tato významná HMW gluteninová alela *Glu-D1d* u běžných odrůd tritikale rovněž nevyskytuje.

Přenos vhodných alel, zvláště *Glu-D1d* z chromozomu 1D do tritikale a eliminace působení sekalinových lokusů (*Sec-1*, *Sec-3* na chromosomu 1R) dává předpoklady pro zlepšování technologických ukazatelů kvality. Potvrzuje to výrazné zlepšení Zeleného sedimentační hodnoty pokud 1D s *Glu-D1d* je u tritikale přítomen. To bylo prokázáno studiem substitucí 1D(1A), 1D(1B) a 1D(1R), avšak 1D(1B) a

1D(1R) současně vykazovaly výrazně nižší výnos (LAFFERTY a LELLEY, 2001). Substitucí 1D za chromosomy genomu 1B a 1A však nelze eliminovat vliv sekalinových lokusů na 1R. Proto se jako perspektivní jeví využití translokací chromosomu 1R, který by nesl *Glu-D1d* (případně *Gli-D1* a *Gli-B1*), současně sekaliny *Sec-1*, *Sec-3* by byly odstraněny a translokovaný chromosom 1R by nenesl geny působící negativně na výnos.

### Materiál a metody

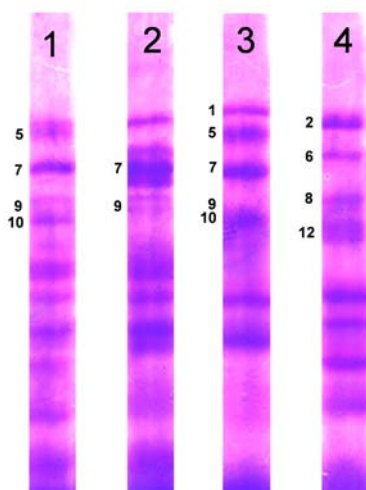
V USA (Univ. of California) se Prof. Adamu J. Lukaszewskému podařilo postupně vytvořit technikou centrické zlomové fúze celou sérii translokací chromozomu 1R (LUKASZEWSKI, 2006), většina byla odvozena u odrůdy tritikale Presto. Jejich přehled je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: Chromosom 1R (vlevo) a jeho translokace. *Sec-3* byl postupně nahrazen segmentem nesoucím *Glu-D1d*, případně celým ramenem 1B (MA1); negativní vliv *Sec-1* se v poslední době podařilo odstranit u translokací FC1, FC2, MA1, RM1 a RM2; rovněž se podařilo přenést *Gli-D1* (společně s alelou pro nízkomolekulární glutenin *Glu-D3*) na krátké rameno 1R (u translokací Valdy, Valdy LH, FC1 a FC2)

V Zemědělském výzkumném ústavu v Kroměříži, s.r.o. (ZVÚ) byl studován v letech 2002-2005 význam translokací u odvozených linií z Presto 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 a Presto Valdy (MARTINEK et al., 2007); od roku 2000 bylo s nimi prováděno rovněž křížení, od roku 2003 bylo prováděno křížení s translokací Presto 1R.1D<sub>5+10</sub>-1 a od roku 2005 s Presto Valdy LH.

Šlechtění probíhalo v ZVÚ a na pracovišti SELGEN, a.s. – šlechtitelská stanice Úhřetice, kam byla předána část rozpracovaných materiálů z Kroměříže. Potomstva kříženců byla podrobena běžnému šlechtitelskému postupu, byla u nich průběžně hodnocena přítomnost *Glu-D1d*. Sklizené zrno bylo vizuálně posouzeno, byla stanovena celková hmotnost zrn, hmotnost 1000 semen (HTS), obsah N-látek, SDS-sedimentační test ze šrotu. V F<sub>5</sub> a vyšších generacích byla potomstva (linie) hodnocena ve výnosových zkouškách (parcely o velikosti 10 m<sup>2</sup>) a bylo u nich prováděno podrobnější hodnocení včetně hodnocení čísla poklesu. Po vyřazení nevhodných linií (nízký výnos, choroby, poléhání, porůstání v klase) byly provedeny základní posklizňové rozborů. Přítomnost *Glu-D1d* ve vzorku byla studována pomocí dvou metod:

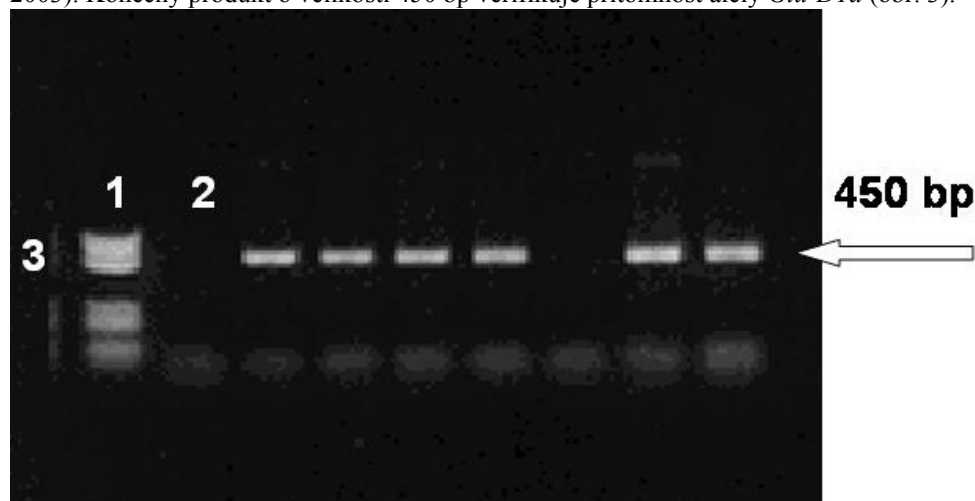


Obrázek 2: Ukázka SDS-PAGE: 1 – Presto Valdy s *Glu-B1c* (s podjednotkami 7 a 9) a *Glu-D1d* (podj. 5 a 10); 2 – kontrolní odrůda Presto (bez translokace) jen s *Glu-B1c* (podj. 7 a 9); 3 – kontrolní odrůda ozimé pšenice Rexia s *Glu-A1a* (podj. 1), *Glu-B1c* (podj. 7 a 9), *Glu-D1d* (podj. 5 a 10), 4 – kontrolní odrůda ozimé pšenice Estica s *Glu-A1c* (0), *Glu-B1d* (podj. 6 a 8), *Glu-D1a* (podj. 2 a 12).

(1) pomocí elektroforetické separace bílkovin polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) za přítomnosti dodecylsiranu sodného, podle metodiky WRIGLEY (1992). HMW podjednotky gluteninů byly určeny podle PAYNE a LAWRENCE (1983) a BRANALD et al. (1991). Metodika vyžaduje extrakci zásobních bílkovin z endospermu obilky, přípravu gelu, aplikaci vzorků do jamek v gelu, elektroforetickou separaci zásobních bílkovin, fixaci a barvení gelu, konečnou úpravu gelů pro jejich uchování a vyhodnocení. Projev *Glu-D1d* (podjednotky 5 a 10) je znázorněn na obrázku 2.

(2) pomocí DNA markerů podle modifikovaného PCR protokolu (D'OVIDIO a ANDERSON 1994) s využitím (5') GCC TAG CAA CCT TCA CAA TC (3'), (5') GAA ACC TGC TGC CGA CAA G (3') primerů. Hodnocení bylo prováděno na

Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně. DNA byla izolována horizontální elektroforézou (Biometra - agagel standard) v 1% agarozovém gelu a fixována ethidium bromidem (VINTEROVÁ et al., 2003). Konečný produkt o velikosti 450 bp verifikuje přítomnost alely *Glu-D1d* (obr. 3).



Obrázek 3: Výsledek elektroforetické separace: 1 – velikostní marker *pBR322 Hae III*; 2 – chybějící produkt; 3 – produkt o velikosti 450 bp potvrzuje přítomnost *Glu-D1d*

Aktivita hydrolytických enzymů (především  $\alpha$ -amylasy) významně ovlivňuje hodnotu čísla poklesu (Hagberg falling number – FN). FN bylo stanoveno podle ČSN ISO 3093, ze šrotu na mlýnku Falling Number LM 3100. Stanovení FN je založeno na měření viskozity vodní suspenze šrotu (nebo mouky) v lázni s horkou vodou. FN vyjadřuje dobu v sekundách za jakou propadne míchadlo ve speciální zkumavce naplněné vodní suspenzí vzorku o určité viskozitě (dané stupněm narušení škrobového gelu hydrolytickými enzymy) ke dnu zkumavky.

### Výsledky a diskuse

Výnos linií, které byly odvozeny od odrůdy Presto s 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 dosahoval v průměru let 2002-2005 6,60 t.ha<sup>-1</sup> (= 84 % na kontrolu Presto bez translokace /100 % = 9,25 t.ha<sup>-1</sup>), u linií Presto s translokací Valdy však jen 5,99 t.ha<sup>-1</sup> (= 76 % na kontrolu Presto), což ukazuje, že u Valdy translokace existuje určitá negativní vazba na krátký klas. Tento nedostatek se podařilo překonat vyšlechtěním linií s Valdy LH (long head, s normální délkou klasu). Obsah mokrého lepku (podle Perten) byl u obou typů translokací 12 % u kontrolní odrůdy Presto 8 % a u kontrolních odrůd pšenice (Sulamit, Ebi, Samanta, Šárka, Rialto, Mladka) v průměru 24 %. Translokace vedly ke zvýšení Zeleného sedimentačního indexu (Valdy – 27 ml, 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 – 25 ml, kontrola Presto - 23 ml). Tritikale má obecně velmi nízké FN, které se u odvozených linií Presto s translokacemi i bez nich pohybovalo v rozmezí 62 - 70 s bez průkazných mezigenotypových rozdílů, u kontrolních odrůd pšenice bylo FN v průměru 301 s. Translokace průkazně neovlivnily objem pokusného bochníku, avšak zlepšovaly jeho tvar (poměr: výšky ku šířce): Valdy – 0,61; 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 – 0,56; odrůda Presto – 0,44, kontrolní odrůdy pšenice v průměru 0,70. U linií Presto s translokací Valdy bylo těsto nelepivé, zatímco u translokace 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 bylo mírně lepivé a u kontrolní odrůdy Presto lepivé.

Z kombinace Presto 1R.1D<sub>5+10</sub>-2 (linie 1)/Moreno se podařilo vybrat ozimé tritikale 'M-4/2' se zajímavými zlepšenými výsledky kvality (tab. 1). V porovnání s jakostními parametry kontrolních odrůd pšenice Samanta (A) a Rheia (B) se linie M-4/2 vyznačovala poměrně vysokým objemem pečiva, vysokým indexem mixogramu (vyjadřujícím odpor těsta během míšení na mixografu po stanovenou dobu) i vyšším obsahem N-látek, který byl v některých případech vyšší než u potravinářské pšenice. Je zajímavé, že výsledky pekařského testu neovlivnila výrazně negativně ani nízká hodnota čísla poklesu.

S pomocí metody SDS-PAGE se podařilo v souboru 40 analyzovaných F<sub>5</sub> potomstvech kříženců najít 9 homozygů v *Glu-D1d* a z nich bylo 5 homozygotů v celém spektru gluteninů. Jsou to: KM 155-06 a KM 156-06 (původ: Presto 1R1.D<sub>5+10</sub>-2: linie 1/Binova), KM 146-06 (Presto Valdy: linie 8/Binova), KM 101-06 (Presto 1R1.D<sub>5+10</sub>-2: linie 3/SG-U 137) a KM 104-06 (Presto 1R1.D<sub>5+10</sub>-2: linie 3/SG-U 204). Těmto liniím je věnována zvýšená pozornost.

Vysoká aktivita hydrolytických enzymů (především  $\alpha$ -amylasy) nepříznivě ovlivňuje pekařskou kvalitu. U pšenice se geny pro aktivitu  $\alpha$ -amylasy nacházejí rovněž na chromosomu 6D. Průkazné zvýšení hodnot FN nastalo u odrůdy tritikale Presto se substitucí 6D(6R) (MASOJC, 1997; RYBKA, 2003). Nízká aktivita  $\alpha$ -amylasy zvyšuje odolnost k porůstání a rovněž ovlivňuje funkci genů odpovědných za dormanci.

Aktivita hydrolytických enzymů a složení gluteninů jsou u tritikale ovlivňovány odlišnými genetickými systémy. Proto vhodnou kombinací některých vytvořených translokací chromosomu 1R s donory odolnosti k porůstání (s vysokými hodnotami FN) by mělo jít dosáhnout pekařské kvality u

tritikale. U pšenice je hodnota FN nižší než 120 s považována za nepřijatelnou pro pečení a FN linií tritikale pro pekařské využití by měla být vyšší než tento limit. Poměrně vysoké hodnoty FN se například vyskytují u polských odrůd Krakowiak a Sekundo. Výsledky ÚKZÚZ, uvádějí FN u odrůdy Sekundo 154 s ve srovnání s průměrem ostatních odrůd tritikale (115 s) v průměru tří let 2003-2005. Z literatury jsou známy donory odolnosti k porůstání: Anoa z (CIMMYT – Mexiko) a ozimá forma Mungis (Lochow-Petkus, Germany), která je známá velmi vysokým a stabilním FN. V Krasnodarském výzkumném zemědělském institutu v Rusku byla vyšlechtěna odrůda Valentin, která je pravděpodobně první komerčně využitelnou odrůdou tritikale pro pekařské účely. V roce 2006 dosáhla FN 123 s SDS-sedimentační test 56 ml oproti kontrole Presto (FN 75 s, SDS-sedimentační test 40 ml).

**Tabulka 1: Kvalitativní ukazatele linie tritikale M-4/2 (výsledky ze sklizně 2005)**

Ukazatel kvality	Plodina	Tritikale			Pšenice		
		M-4/2	Presto 1R.1D <sub>5+10</sub> -2	Presto Vadly	Presto (kontrola)	Samanta (kvalita A)	Rheia (kvalita B)
<i>Mlynářský pokus</i>							
Výtěžnost mouky [%]		63,5				55,0	68,0
Šrotová mouka [%]		7,5				3,0	5,5
Luštěná mouka [%]		56,0				52,0	62,5
Výtěžnost otrub [%]		36,5				45,0	32,0
<i>Pekařský pokus</i>							
Objem pečiva [cm <sup>3</sup> ]		1700				1850	1610
Hmotnost pečiva [g]		424				431	423
Subjekt. hodnocení chleba [body]*)		2				1-2	1-2
<i>Technologické ukazatele</i>							
SDS test - mouka [ml]		64				69	61
SDS test - šrot [ml]		45	43	37	32	52	45
Zelenýho test [ml]		24	23	20	20	32	35
Obsah lepku - šrot [%]		19,3				24,6	29,6
Obsah N-látek (N·5,7) [%]		13,4	13,8	14,1	12,9	12,7	13,4
Mixogram index [MI]		171	132	126	95	160	201
Číslo poklesu [s]		97	62	62	63	372	357
Objemová hmotnost [kg·m <sup>-3</sup> ]		772				775	770
HTS [g]		37	50	43	52	45	50

\*1 je nejlepší hodnota, 3 je nejhorší hodnota

## Literatura

- BRANLARD, G., ROUSSET, M., LOISER, W., AUTRAN, J.C.: Comparison of 46 technological parameters used in breeding for bread duality evaluation. *Journal of Genetic and Breeding*, 45, 1991: 263-280.
- D'OVIDIO, R., ANDERSON, O.D. PCR analysis to distinguish between alleles of member of a multigene family correlated with bread-making quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 1994: 759-763.
- 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.
- LUKASZEWSKI, A.J.: Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale. *Crop Sci.* 46, 2006: 2183-2194.
- MARTINEK, P., VINTEROVÁ, M., BUREŠOVÁ, I., VYHNÁNEK, T.: Agronomic and quality characteristics of triticale (*X Triticosecale* Wittmack) with HMW glutenin subunits 5+10. *Journal of Cereal Sciences*, 2007 (in press)
- MASOJC, P.: Genetic control of high alpha-amylase activity in triticale grain. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolnictwa w Szczecinie, Rolnictwo* 65, part I, 1997: 259-263.
- PAYNE, P.I. - LAWRENCE, G.J.: Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-1A, Glu-1B, Glu-1D*, which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, 11, 1983: 29-35.
- RYBKA, K.: An approach to identification of rye chromosomes affecting the preharvest sprouting in triticale. *Journal of Applied Genetics* 44, 2003: 491-496.
- WRIGLEY, C.W.: Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Heidelberg, Springer Verlag, 1992: 17-41.

## Poděkování

Děkujeme Prof. A. J. Lukaszewskému za poskytnutí výchozích vzorků a za možnost spolupráce. Článek navazuje na řešení projektu GAČR 521/03/0113 (2003 - 2005) a je v současnosti podpořen projektem MŠMT: QF 4190.

✉

✉ Ing. Petr Martinek, CSc., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika, tel.: (+420)573317158, martinek@vukrom.cz;  
Ing. Edita Gregová, PhD., Slovenské centrum polnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, tel.: (+421)33722311, gregova@vuvr.sk; Ing. Miroslava Vinterová, PhD., Kateřina Pajurková, Ing. Tomáš Vyhnanek, PhD., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav biologie rostlin AF, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, tel.: (+420)545133185, vinterova@email.cz, vyhnanek@mendelu.cz

## VPLYV A VYUŽITIE GÉNOV KRÁTKOSTEBLOVOSTI V ŠĽACHTENÍ PŠENICE NA SLOVENSKU V ROKOCH 1960 AŽ 2005 EFFECT AND UTILIZATION OF DWARF GENES IN SLOVAK WHEAT BREEDING IN THE YEARS 1960 – 2005

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Daniel MIHÁLIK – Michal ŠAJGALÍK - Martin UŽÍK

*In the set of 55 winter wheat varieties (from them 40 bred in Slovakia) gibberellic acid insensitive dwarfing gene *Rht 1* and gibberellic acid responsive dwarfing gene *Rht 8* were detected by molecular markers. At 25 varieties plant height was determined by *Rht 8* and at 16 varieties by both genes *Rht 1* + *Rht 8*. Plant height was determined in pot experiment established in three replications by randomised block design. Varieties with the lowest plant height possess genes *Rht 1* + *Rht 8*. 165 bp allele was detected at 5 varieties with plant height comparable with varieties 174 bp allele (4 varieties). Plant height was significantly decreased with the year of variety registration, but only till 1976.*

*Key words: wheat, varieties, dwarf genes, *Rht 1*, *Rht 8**

### Úvod

V priebehu ostatných 100 rokov šľachtitelia v Európe a v iných častiach sveta sa zamerali na zvýšenie úrody pšenice a to redukciou výšky rastlín, čím sa zvýšila odolnosť voči poliehaniu v podmienkach intenzívneho poľnohospodárstva. Na základe fenotypového prejavu boli vyberané rastliny s krátkou a pevnou slamou, buď z prírodných populácií pšenice alebo z populácií, ktoré boli vytvorené krížením s krátkosteblovými odrodami. Analýzou rodokmeňov pšenice sa zistilo, že väčšina európskych krátkosteblových odrôd má vo svojom genetickom základe japonskú odrodu Akakomugi (BOROJEVIČ, 1990). V poslednej štvrtine 20. storočia bolo dokázané, že odroda Akakomugi je donorom génu, ktorý redukuje výšku a je označený ako *Rht 8* a tiež génu necitlivosti na fotoperiódou, označený ako Ppd-D1, ktoré sú oba lokalizované na chromozóme 2D. Ich pôsobením je redukovaná výška o 10 cm, zvyšuje sa fertilita klásku a urýchľuje kvitnutie o 8 dní (GALE, YOUSSEFIAN, 1985). Tieto 2 gény sú v úzkej väzbe a boli prenesené prostredníctvom kríženia do mnohých talianskych odrôd pšenice na začiatku 20. storočia. Z talianskych odrôd boli ďalej prenesené do mnohých krátkosteblových vysokoúrodných odrôd bývalej Juhoslávie a odtiaľ do južnej a strednej Európy (WORLAND, 2000).

V práci BOROJEVIC, BOROJEVIC (2005) je popisovaná aj druhá „cesta génu *Rht 8*“ (z odrody Akakomugi) do Európy a to z Japonska do Talianska a odtiaľ už z nej odvodených odrôd do Argentíny pred a počas 2. svetovej vojny (1940-1945). A z Argentíny do Európy a do bývalého Sovietskeho zväzu po 2. svetovej vojne. Tento transfer génu *Rht 8* bol pre naše šľachtenie zvlášť významný nakoľko v roku 1959 bola v Krasnodare Lukjanenom vyšľachtená odroda Bezostaja 1, ktorá pre svoju kvalitu a zimuvzdornosť bola rozšírená vo východnej a v strednej Európe. Odroda je tiež nositeľom génu *Rht 8*, hoci v čase vyšľachtenia odrody to nebolo známe. Bezostaja 1 sa nachádza v rodokmeni viac ako 200 odrôd pšenice (SOZINOV, 2000).

Mikrosatelitné analýzy naznačili, že v japonských odrodách na začiatku 20. storočia boli 3 hlavné mikrosatelitné alely na WMS 261, čo je lokus diagnostický pre gény krátkosteblovosti. Odroda Akakomugi (zdroj *Rht 8* pre väčšinu európskych odrôd) má WMS 261-192 bp, odroda Saitama 27 nesie WMS 261-165 bp, a Norin 10 nesie 261-174 bp (WORLAND et al., 1998).

Gény krátkosteblovosti *Rht 1*, *Rht 2* (terajšie označenie *Rht-B1b*, *Rht-D1d*, jednotlivo) pochádzajú z japonskej odrody Norin 10. Táto odroda bola donesená z Japonska do USA po 2. svetovej vojne a neskôr jednak samotná odroda ale aj jej deriváty do CIMMYT v Mexiku. Tieto odrody boli distribuované po celom svete a niekoľko krát zvýšili produkciu pšenice. Gény krátkosteblovosti *Rht 1*, *Rht 2* redukovujú výšku asi o 18 % a majú pleiotropné efekty na zvýšenie fertilitu klásku a úrodu, ktorá v optimálnych podmienkach je vyššia o 15 % (FLINTHAM et al., 1997). *Rht* gény boli identifikované a klasifikované v odrodách pšenice v mnohých krajinách a to pomocou gibberelínového testu, genetických štúdií a DNA markerových analýz. ELLIS et al. (2002) vytvorili PCR markery na rozlíšenie alel *Rht-B1b*, *Rht-D1d*, predpokladajú ich využitie pri markermi asistovanej selekcii.

V roku 2005 sme analyzovali dĺžkový polymorfizmus mikrosatelitného markera WMS 261 pri 30 odrodách ozimnej pšenice, ktoré pochádzali prevažne zo slovenského šľachtenia (ŽOFAJOVÁ et al. 2005). Vo výskume sme pokračovali s cieľom využiť molekulárne markery pre detekciu génov krátkosteblovosti *Rht 1* a *Rht 8* v súbore prevažne domácich odrôd povolených v rokoch 1960 až 2005 a analyzovať tiež ich výšku rastlín.

### Materiál a metódy

V roku 2005 bol zostavený súbor 55 odrôd ozimnej pšenice (povolených v bývalom Československu a na Slovensku), ktorý pozostával z:

- 40 odrôd vyšľachtených na Slovensku od roku 1976 (Solaris) do roku 2005 (Stanka, Verita, Markola, Veldava, Pavla),

- 4 odrôd vyšľachtených v ČR a pestovaných na Slovensku – Diana I, Slávia, Vala, Hana,
- 11 zahraničných odrôd a to z bývalého Sovietskeho zväzu (Bezostaja 1, Mironovská 808, Jubilejná, Aurora, Kavkaz, Ijičovka), z bývalej Juhoslávie (Sáva, Zlatná dolina, Baranjanka, Super Zlatná) a z Nemecka (Jubilar).

Vo vegetácii 2005/06 boli odrody hodnotené v nádobovom pokuse, v troch opakovaniach, pokus založený metódou znáhodnených blokov. V črepníku s hmotnosťou zeminy 4,7 kg bolo vysiatych 10 zrn. V pokuse, ktorý bol vedený štandardným spôsobom (hnojivá, závlaha) boli hodnotené úrodnotvorné znaky, z ktorých analyzujeme iba výšku rastlín meranú v zrelosti.

Pri analýze dĺžkového polymorfizmu mikrosatelitného markera WMS 261 sme postupovali podľa KORZUN et al. (1998), čo bolo podrobne uvedené v práci (ŽOFAJOVÁ et al., 2005).

Detekcia Rht 1. Pre každú vzorku sme izolovali zmesnú DNA z mladých listov 10 rastlín. Na detekciu mutantnej alely (Rht-B1b) a divej alely (Rht-B1a) Rht1 génu sme použili páry primerov BF + MR1 a BF + WR1 (ELLIS et al., 2002). Vysoká špecifita PCR reakcie je podmienená jednonukleotidovým rozdielom v primeroch detekujúcich mutantnú a divú alelu. Teplotný režim a zložky PCR reakcie podľa ELLIS et al. (2002) ani po optimalizácii neposkytli spoľahlivé výsledky. Pomocou nového primeru NH-BF2 (miesto primeru BF), zmeneného teplotného režimu a zmenou pomeru zložiek PCR reakcie ELLIS (2005, ústna informácia) bolo možné v 1,5 % agarózových géloch spoľahlivo detekovať Rht-B1b a Rht-B1a alely.

Údaje o výške rastlín boli spracované programom Statgrafics for Windows.

### Výsledky a diskusia

Priemerná výška rastlín odrôd po jednotlivých dekádach je uvedená v tabuľke 1. S rokom povolenia postupne klesala výška rastlín, pričom rozdiel za roky 1960 až 2000 predstavoval redukciu o 20 cm. Iná situácia je pri odrodách povolených po roku 2000, ktoré sú v porovnaní s predchádzajúcou dekádou vyššie o 8,8 % a sú porovnateľné s výškou odrôd povolených na rozhraní 70. a 80. rokov minulého storočia. Aj v inej práci sme zistili, že výška sa významne znižovala s rokom povolenia odrody ( $r = -0,804^{**}$ ), avšak len do roku 1976 (odroda Solaris) (ŽOFAJOVÁ, UŽÍK, 2003). Podobná tendencia nárastu výšky rastlín je pozorovaná aj v susedných štátoch, napr. v Maďarsku (PAUK, 2006, ústna informácia).

Najnižšiu výšku rastlín mala odroda Baranjanka (1981) 68,9 cm a zo slovenských odrôd Lívia (1991) 71,6 cm (priemerné hodnoty odrôd neuvádzame v tabuľke). Viac ako 100 cm mali odrody Diana I (1960), Mironovská 808 (1966), Ijičovka (1975), Viginta (1984). Prvou slovenskou odrodou ktorej výšku determinoval gén Rht 1 bola odroda Solaris (1976) a kombináciu génov krátkosteblovosti Rht 1 a Rht 8 ako prvá mala odroda Iris (1983). Všetky odrody z bývalej Juhoslávie majú oba detekované gény (Rht 1 + Rht 8), avšak iné výsledky sme získali pri odrodách z bývalého Sovietskeho zväzu, kde pri 4 (z 5 hodnotených odrôd) sme zistili iba GA citlivý gén Rht 8. Pri českých odrodách (Slávia, Vala a Hana) výšku rastlín determinuje gén Rht 8 a pri odrode Diana I sme zistili alelický variant 165 bp. Pri odrodách Roxana, Pastor a Verita bol detekovaný alelický variant 198 bp, výsledky je však potrebné opakovane overiť. Pri odrode Pastor bol však spoľahlivo určený GA necitlivý gén krátkosteblovosti Rht 1. Uvedené tri odrody sme nezradili do celkového hodnotenia.

Zo súboru hodnotených odrôd pri 25 bol detekovaný gén Rht 8, pričom najviac ich bolo registrovaných v rokoch 2001 až 2005 (10) (tab. 2). Z hľadiska početnosti v poradí druhú skupinu predstavovali odrody, ktorých výšku determinujú gény Rht 1 + Rht 8, pričom najviac takýchto odrôd bolo registrovaných v rokoch 1981 až 2000 (12). Alelický variant 165 bp, ktorý je charakteristický pre odrody vyšľachtené v CIMMYT Mexiko, bol detekovaný pri 5 odrodách. Pri odrodách Solaris (1976) a Istra (1979) okrem alely 165 bp na lokuse WMS-261 bol detekovaný tiež gén Rht 1. Alelický variant 174 bp prevalentný pri odrodách zo západnej Európy bol zistený pri 4 odrodách a to jednak starších, ale aj súčasných (Torysa, Pavla).

Najnižšia priemerná výška rastlín ( $\bar{x} = 79,4$  cm) odrôd povolených od roku 1971 do roku 2005 bola pri odrodách s génmi krátkosteblovosti Rht 1 + Rht 8, pričom výška rastlín odrôd povolených od roku 1971 do roku 2000 bola takmer identická (cca 77 cm). V ostatných rokoch aj pri tejto skupine odrôd je tendencia nárastu výšky, čo zrejme podmieňuje aj genetické pozadie rodičovských odrôd. S rokmi povolenia znižoval sa tiež rozdiel vo výške rastlín odrôd s Rht 8 verzus Rht 1 + Rht 8, ktorý v rokoch 1971 – 1980 bol 17 cm a od roku 1991 je v priemere len 4 cm. V poradí druhú najnižšiu výšku rastlín ( $\bar{x} = 88,6$  cm) mali odrody s Rht 1 + alelický variant 165 bp na lokuse WMS-261, avšak rozdiel medzi odrodami 165 bp verzus Rht 1 + 165 bp nebol významný. V hodnotenom sortimente odrôd nebola detekovaná taká, ktorej výšku by podmieňovali Rht 1 + alelický variant 174 bp na lokuse WMS-261. Odrody s alelickým variantom 174 bp boli vo výške porovnateľné s odrodami s alelickým variantom 165 bp.



## Záver

Pomocou molekulárnych markerov boli v súbore 55 odrôd ozimnej pšenice (z nich 40 vyšľachtených na Slovensku) detekované gény krátkosteblovosti GA necitlivý Rht 1 a GA citlivý Rht 8. Pri 25 odrodách bola výška rastlín podmienená génom Rht 8 a pri 16 odrodách oboma génmi Rht 1 + Rht 8, ktoré mali najnižšiu priemernú výšku rastlín. Alelický variant 165 bp na lokuse WMS 261 bol zistený pri 5 odrodách, ktoré mali výšku rastlín porovnateľnú s alelickým variantom 174 bp (4 odrody).

## Literatúra

1. BOROJEVIC, K. – BOROJEVIC, K.: The transfer and history of “reduced height genes” (Rht) in wheat from Japan to Europe. *Journal of Heredity*, 96, 2005, 4, 455-459
2. BOROJEVIC, S.: Genetic improvement in wheat yields potential. *Savremena poljoprivreda*, Novi Sad, 38, 1990, 1-2, 25-47
3. ELLIS, M.H. - SPIELMEYER, W. - GALE, K. R. - REBETZKE, G. J. - RICHARDS, R. A.: "Perfect" markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *TAG*, 105, 2002, 6-7, 1038-1042
4. FLINTHAM, J.E. - BORNER, A. - WORLAND, A.J. - GALE, M.D. (1997): Optimising wheat grain yield: effects of Rht (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J. of Agric. Sci., Cambridge* 128, 11-25.
5. GALE, M.D. – YOUSSEFIAN, S.: Dwarfing genes in wheat. In: *Progress in plant breeding* (Russell, G.E., ed.). London: Butterworth, 1-35
6. KORZUN, V. - RODER, M. - GANAL, M. - WORLAND, A.J. (1998): Genetic analysis of the dwarfing gene Rht 8 in wheat 1. Molecular mapping of Rht 8 on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum*). *TAG*, 96, 1104-1109
7. SOZINOV, A. A.: The contribution of the Strampelli's methodology and varieties to wheat breeding in the former Soviet Union. In: *Wheat from Rieti worldwide* (Atti Convegno, ed.). Rieti
8. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A.: Pokrok v agronomických znakoch pri česko-slovenských odrodách pšenice letnej f. ozimnej povolených v rokoch 1923-1995. *Acta fyt. et zoot.*, 6, 2003, 4, 93-100
9. WORLAND, A. J.: Chromosome 2D, the key to Strampelli's wheat improvement programme. In: *Wheat from Rieti worldwide* (Atti Convegno, ed.). Rieti
10. WORLAND, A.J. - KORZUN, V. - GANAL, M.W. - RODER, M. - LAW, C.N. (1998): Genetic analysis of dwarfing gene Rht 8 in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the Rht 8 locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *TAG*, 96, 1110-1120.
11. ŽOFAJOVÁ, A. – UŽÍK, M. - MIHÁLIK, D. – ŠAJGALÍK, M.: Vplyv a využitie génov krátkosteblovosti v šľachtení pšenice. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : Zborník z 12. odborného seminára 23. - 24. novembra 2005 / Ed. M. Užík. Piešťany : VÚRV, 2005, 23 - 26.*

**Tabuľka 1: Priemerná výška rastlín odrôd ozimnej pšenice podľa dekád povolenia odrôd**

Roky	Počet odrôd	$\bar{x}$	SE	Hranica	
				dolná	horná
1960 – 1970	4	101,9	1,983	98,0	105,9
1971 – 1980	9	91,3	1,245	88,8	93,7
1981 – 1990	12	81,9	1,078	79,8	84,0
1991 – 2000	13	80,6	1,076	78,4	82,7
2001 – 2005	17	87,7	0,905	85,9	89,5
$\bar{x}$	-	88,7	0,587	87,5	89,8

**Tabuľka 2: Priemerná výška rastlín odrôd ozimnej pšenice podľa dekád povolenia odrôd, alelických variant na lokuse WMS 261 a génu krátkosteblovosti Rht 1**

Roky	WMS 261-165 bp		WMS 261-165 bp + Rht 1		WMS 261-192 bp		WMS 261-192 bp + Rht1		WMS 261-174 bp	
	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$
1960-1970	1	104,8	-	-	1	97,2	-	-	2	102,8
1971-1980	-	-	2	88,6	7	95,0	2	77,9	-	-
1981-1990	1	73,2	-	-	2	90,	6	77,9	-	-
1991-2000	1	93,6	-	-	5	81,4	6	77,4	1	82,6
2001-2005	2	88,8	-	-	10	88,0	2	84,3	1	89,8
$\bar{x}$	5*	90,1	2*	88,6	25*	90,4	16*	79,4	4*	91,7

\* spolu

☒

☒

# RASTLINNÉ FLAVONOIDY A ICH POTENCIÁL PRE FUNKČNÉ POTRAVINY A NUTRACEUTIKÁ

## PLANT FLAVONOIDS AND THEIR POTENTIAL FOR FUNCTIONAL FOODS AND NUTRACEUTICALS

Ivana PŠENÁKOVÁ<sup>1</sup> - Juraj FARAGÓ<sup>1,2</sup>

*Traditional agricultural crops such as bread wheat, barley, oat, buckwheat, and hops, are becoming sources for manufacturing of so called functional foods and/or nutraceuticals, due to the physiological activities and health promoting activities of their constituents. One of such most important compounds of nutraceutical value are polyphenols and flavonoids. Breeders have several possibilities to improve the contents of these biologically active molecules in crop plants using traditional breeding methods, by modifying agricultural practices or by exploitation of modern biotechnological methods, such as metabolic engineering. The general aims are to lower the contents of undesirable components, to increase the contents of physiologically active compounds or introduction of foreign genes into plant genomes for altering the secondary metabolic pathways. However, even functional foods and nutraceuticals represent one of the fastest growing markets mainly in the developed world, it remains much to be done to fully exploit the potential of these crops to benefit health-conscious consumers.*

*Key words: cereals, functional foods, nutraceuticals, breeding, metabolic engineering*

### Úvod

V poslednom období sa mení prístup a pohľad poľnohospodárov k šľachteniu poľnohospodárskych plodín. Kým v minulosti boli pri šľachtení hlavnými požiadavkami hektárová výťažnosť, odolnosť proti chorobám spôsobených fytopatogénmi resp. poveternostným zmenám v súčasnosti popri nich stále viac vstupujú do pozornosti aj kvalitatívne parametre ako je obsah vlákniny vo forme  $\beta$ -glukánov a arabinoxylánov, minerálov, vitamínov, proteínov, ale aj sekundárnych metabolitov s biologickými účinkami (ÖTLES a CAGINDI, 2006). Vďaka obsahu týchto cenných zložiek poľnohospodárske plodiny základom pre výrobu tzv. funkčných potravín a nutraceutík.

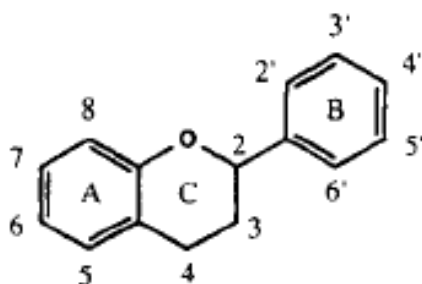
Funkčné potraviny sú potraviny, ktoré majú okrem svojej nutričnej (výživovej) hodnoty aj pozitívny vplyv na zdravie, fyzickú výkonnosť alebo duševný stav (KWAK a JUKES, 2001). Na rozdiel od funkčných potravín za nutraceutikum sa považuje ktorákoľvek zložka potraviny alebo časti potraviny, ktorá má fyziologický účinok a poskytuje ochranu pred chronickými a civilizačnými ochoreniami ako sú srdcovo-cievne choroby, rakovina, diabetes, osteoporóza ai. (DeFELICE, 1992).

Funkčné potraviny by mali tvoriť akýsi medzistupeň medzi obyčajnými potravinami a liekmi. Nie sú určené na liečenie chorôb, mali by posilňovať obranné mechanizmy alebo napomáhať uzdravovaniu. Mnohé epidemiologické štúdie jednoznačne preukázali súvis medzi výživou a vznikom tzv. civilizačných chorôb (LÓPEZ-VARELA et al., 2002). Niektoré potraviny, určité druhy zeleniny, ovocia, cereálií a korenín sú prirodzene bohaté na zložky, ktoré majú ochranné účinky pred niektorými chorobami napríklad lykopén, nachádzajúci sa v rajčinách pomáha redukovat' riziko vzniku rakoviny prostaty, vápnik v mlieku a mliečnych výrobkoch má priaznivý vplyv na stavbu kostí a chráni pred vznikom osteoporózy. Konzumácia ovocia a zeleniny ako aj cereálií súvisia so znížením rizika kardiovaskulárnych chorôb, rakoviny, cukrovky, Alzheimerovej choroby, katarov ako aj chorôb súvisiacich s vekom. Obsahujú významné množstvo bioaktívnych fytochemikálií a poskytujú žiadané zdravotné výhody (TEMPLE, 2000; KOVÁČ, 2000). Pre ochranu zdravia sa teda všeobecne odporúča konzumovať potraviny, ktoré obsahujú takéto účinné funkčné zložky (TYTYKAL, 2004). Pri výrobe funkčných potravín sa v podstate vychádza z bežných surovín a potravín, ktoré sa upravujú tak, aby sa v nich znížil podiel zložiek nežiadúcich a zvýšil prirodzený podiel fyziologicky účinných látok.

### Flavonoidy ako bioaktívne zlúčeniny.

Poľnohospodárske plodiny a výrobky z nich majú pozitívne fyziologické účinky. Okrem vysokého množstva vlákniny obsahujú látky s antioxidantnými účinkami, vrátane fenolových zlúčenín (PIRJO et al., 2003). Polyfenolové látky sú aromatické zlúčeniny s jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami a ich deriváty. V potravinách sa nachádzajú tri hlavné skupiny polyfenolov a to fenolové kyseliny, kyselina škoricová a jej deriváty a početná skupina flavonoidov.

Atraktívnou skupinou látok so širokým spektrom pozitívnych fyziologických účinkov, ktorej výrobcovia potravín venujú stále viac pozornosti sú flavonoidy. Flavonoidy sú sekundárne metabolity nachádzajúce sa vo väčšine suchozemských rastlín. Patria do skupiny



Obrázok 1: Základná chemická štruktúra flavonoidov

prírodných fenolických zlúčenín s rôznorodou chemickou štruktúrou. Flavonoidy sú všeobecne charakterizované 15-uhlíkatým skeletom, ktorý tvoria dve fenylové jadrá (A-kruh a B-kruh) spojené trojuhlíkatým mostíkom (C-kruh) (obr. 1).

Podľa chemickej štruktúry sa flavonoidy triedia do podskupín, ktorými sú antokyjanidíny, flavonoly, flavóny, flavonoly, flavanóny, chalkóny, dihydrochalkóny, dihydroflavonoly, auróny a izoflavonoidy. Pôvodne boli flavonoidy identifikované ako pigmenty zodpovedné za jesenné sfarbenie listov listnatých stromov a spôsobujúce rôzne odtiene žltej, oranžovej a červenej farby kvetov a plodov (TIMBERLAKE a HENRY, 1986). Vyskytujú sa v rôznych častiach rastlín v stonkách, kvetoch, kôre, koreňoch, zrnách, v ovoci alebo zeleniny a taktiež v čaji a víne (HARBORNE a WILLIAMS, 2000). Dodnes bolo identifikovaných viac ako 6000 rôznych druhov flavonoidov. V minulosti boli často považované za odpadové produkty metabolizmu či evolučné pozostatky bez významných funkcií, alebo púhe koncové metabolické produkty toxické pre rastlinu a preto skladované bunkami vo vakuolách (TREUTTER, 2006).

Zistilo sa však, že flavonoidy sa vyznačujú širokým spektrom biologických účinkov. Jedným z najdôležitejších z nich je ich pozitívny vplyv na ľudské zdravie, vďaka čomu sa v posledných 10-15 rokoch dostali do stredobodu pozornosti najmä vo svete (PARR a BOLWELL, 2000). Sú známe napr. antialergické, protizápalové, antikancerogénne, antidiabetické, kardioprotektívne a antivírusové účinky rôznych flavonoidov (MIDDLETON et al., 2000; MOJŽIŠ a MOJŽIŠOVÁ, 2001; NARAYANA et al., 2001). Mnohé flavonoidy sú aktívnymi zložkami liečivých rastlín s farmakologickými účinkami (YILMAZ a TOLEDO, 2004). Okrem toho sú flavonoidy prospešné aj pre rastliny ako také ako fyziologicky aktívne zlúčeniny, ako ochranné faktory pred stresom, ako atraktanty alebo antinutričné látky pre hmyz a škodcov, t.j. všeobecne pre ich dôležitú úlohu v odolnosti rastlín voči rôznym stresorom (TREUTTER, 2006). Mnohé z uvedených účinkov flavonoidov súvisia s ich antioxidantným efektom (MIDDLETON et al., 2000; YAO et al., 2004).

#### *Poľnohospodárske plodiny ako východisko funkčných potravín a nutraceutík.*

Vo všeobecnosti rastliny obsahujú biochemický aparát potrebný pre syntézu rôznych skupín flavonoidov, na rozdiel od živočíchov (s výnimkou morského koralu *Echinophora lamellosa*) a húb (s výnimkou *Aspergillus candidus* a *Phallus impudicus*) (IWASHINA, 2000). Najjednoduchšou rastlinou, pri ktorej boli identifikované flavonoidy, je zelená riasa *Nitella hookeri*, ktorá obsahuje C-glykozyflavóny (MARKHAM a PORTER, 1969). Väčšina hlavných poľnohospodárskych plodín však obsahuje v svojich jedlých častiach malé množstvá flavonoidov, alebo produkujú flavonoidy, ktoré nemajú optimálne antioxidantné charakteristiky (SÉVENIER et al., 2002). Odhady dennej spotreby flavonoidov u človeka sa pohybujú od 23 mg/deň (HERTOG et al., 1993) po 1 g/deň (KÜHNAU, 1976). Podľa Hertogovej štúdie najväčší podiel z konzumovaných flavonoidov tvoril kvercetin a najbohatšími zdrojmi konzumovaných flavonoidov boli čaj, cibuľa a jablká.

Z potravinárskych plodín za vhodný základ pre funkčné potraviny a nutraceutiká môžeme považovať niektoré hlavné potravinárske, ako aj technické plodiny akými sú pšenica, pohánka, jačmeň, ovos, sója, strukoviny chmeľ a výrobky z nich odvodené.

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je vo svete najdôležitejšou poľnohospodárskou plodinou z hľadiska produkcie a konzumácie. Napriek tomu je považovaná za nutritívne chudobnú, najmä na proteíny a esenciálne aminokyseliny. Otruby vykazovali vyššiu antioxidantnú aktivitu ako pšeničné zrno. Z fenolových kyselín bola zistená najmä kyselina ferulová v množstve 50 µg/g v pšeničnej múke a 500 µg/g tejto kyseliny v celej pšenici. V extraktoch pšeničných otrúb boli identifikované kyselina prokatechinová, kyselina gentisinová, kyselina kávová, kyselina ferulová. V podmienkach gastrointestinálneho pH a enzymovej hydrolyzy vzrástla rozpustnosť a antioxidantná aktivita pšeničných polyfenolov, vďaka čomu možno považovať pšenicu za dôležitý antioxidantný doplnok (BAUBLIS et al., 2000). V klíčkoch pšenice sa zistila koncentrácia 1947-4082 µg/g tokoferolov. Zložky nájdené v pšenici obsahujú aj zložky schopné inhibovať lipidickú peroxidáciu.

Jačmeň (*Hordeum vulgare* L.) je významným zdrojom tokoferolov a tokotrienolov. Najviac tokoferolov bolo determinovaných v klíčkoch jačmeňa (206 mg/kg), kým celé zrno obsahovalo 40 mg/kg, šupky 29 mg/kg a endosperm 33 mg/kg. Celkový obsah tokoferolov v jačmeni dvakrát vyšší ako v ovse. Izoflavonoid izovitexín nájdený v listoch jačmeňa má porovnateľnú antioxidantnú aktivitu s  $\alpha$ -tokoferolom. Odrody jačmeňa obsahujú rôznu obsah  $\beta$ -glukánov, ktoré sú dôležitou zložkou rozpustnej vlákniny.  $\beta$ -glukány pozitívne ovplyvňujú hypoglykémiu, znižujú hladinu cholesterolu, znižujú riziko vzniku rakoviny čreva (TRUSWELL, 2002). Z flavonoidov boli v jačmeni identifikované antokyjaníny, proantokyjaníny a flavonoly. Z fenolových kyselín sú to kyselina sinapová, kyselina ferulová, kyselina o-kumarová, kyselina vanilová (POKORNÝ, 2002).

Ovos (*Avena sativa* L.) je už dlho známa ako zdraviu prospešná a nutričná potravina. Je zdrojom viacerých prírodných antioxidantov. V ovse sú najviac zastúpené tokoferoly, kyselina fytová a fenolové zlúčeniny. Je jedinečným zdrojom avenantramidov, ktoré nie sú zastúpené v iných obilninách. Avenantramidy sú charakterizované ako skupina nových alkaloidov, ktorá obsahuje deriváty kyseliny antranilovej spojené s derivátmi kyseliny hydroškoricovej pseudopeptidovou väzbou (PETERSON et al., 2002). V zrne ovsa boli identifikované tri flavóny – asperigín, luteolín a tricín a steroly. Okrem toho je ovos spomedzi obilnín najbohatším zdrojom  $\beta$ -glukánov. Významne vyšší je obsah minerálnych látok hlavne železa, zinku a mangánu, proteínov a vitamínov (DEMIBRAS, 2005). Bielkoviny ovsa majú spomedzi obilnín najvyššiu biologickú hodnotu. Svojím zložením sa blížia ideálnemu proteínu a to vďaka vynikajúcej skladbe aminokyselín a vysokému obsahu esenciálnych aminokyselín (MOUDRÝ, 1999). Ovos ovplyvňuje hladinu LDL cholesterolu v plazme a hladiny glukózy v rakoviny (MÄLKKI et al., VIRTANEN, 2001; ZWER, 2004). Je dôležitou súčasťou stravovania pre hypercholesterolemických pacientov (CZERWIŃSKI et al., 2004).

Pohánka (*Fagopyrum esculentum* Moench L.) sa stáva dôležitou surovinou pre výrobu funkčných potravín kvôli svojim vlastnostiam a zloženiu a to obsahu proteínov, flavonoidov, flavónov, fytosterolov. Bielkoviny pohánky majú unikátne zloženie esenciálnych aminokyselín so špeciálnymi biologickými aktivitami. Podieľajú sa na znižovaní hladiny cholesterolu, znižovaní krvného tlaku, pomáhajú pri liečbe zápchy, pozitívne

ovplyvňujú peristaltiku čriev. Inhibitory trypsínu izolované z pohánky sú termostabilné (LI a ZHANG, 2001). Pohánka je tiež zdrojom vlákniny, lipidov, antioxidantov a to tokoferolov, fenolových kyselín a flavonoidov. Tieto zlúčeniny majú protizápalový, hypotenzný účinok a redukujú krehkosť krvných ciev a tak sa spájajú s prevenciou niektorých koronárnych chorôb (SUN a HO, 2005). Listy pohánky sú známe 3-8% obsahom rutínu a predstavujú možný zdroj priemyselnej extrakcie tejto zlúčeniny. Rutín a jeho deriváty sa uplatňujú pre svoje farmakologické účinky ako inhibitory hyaluronidáz, antioxidanty. Pohánka sa dáva do súvisu s potláčaním vývoja rakoviny hrubého čreva redukciou bunkovej proliferácie a rakoviny prsníka (BONAFACCIA et al., 2003; ÖTLES a CAGINDI, 2006; QUETTIER-DELEN et al., 2000). Pohánka patrí k obilninám, ktoré neobsahujú lepok a preto je môžu používať ľudia trpiaci na celiakiu (PRÉSTAMO et al., 2003). Pohánkové otruby je možné použiť ako zdroj zinku a selénu.

Okrem spomínaných tradičných poľnohospodárskych plodín, ktoré môžu byť základom pre výrobu funkčných potravín sú známe aj ďalšie technické plodiny, ktoré sú zdrojom hlavne sekundárnych metabolitov s pozitívnymi účinkami na zdravie využiteľných ako aditíva do potravín. K týmto plodinám patrí okrem iných aj chmeľ obyčajný.

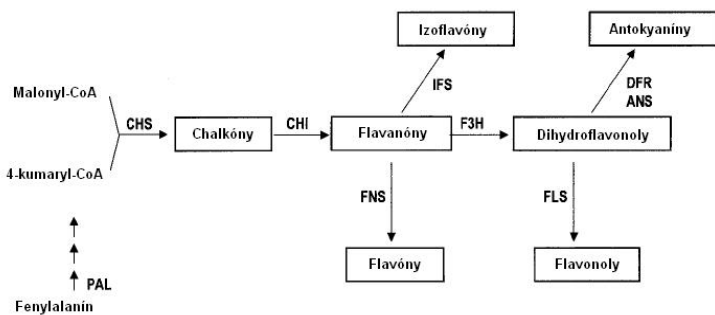
Chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus* L.) je zaujímavou plodinou, ktorú v súčasnosti môžeme považovať za tradičnú plodinu s netradičným použitím (Faragó et al., 2004). V lupulínových žliazkach chmeľových šištič sa nachádza lupulín, ktorý sa vyznačuje rôznymi farmakologickými účinkami. Pôsobí utišujúco na nervovú sústavu pri nespavosti, zvýšenej nervovej podráždenosti, zlepšuje chuť do jedla. Pozorovaný bol inhibičný vplyv chmeľového humulónu na resorpciu kostí, pričom už pri nízkej koncentrácii tejto zlúčeniny vykazuje táto zlúčenina vysokú aktivitu voči osteoporóze. Na mnohých biologických účinkoch chmeľu sa podieľajú prenylované flavonoidy a to xantohumulol, desmetylxantohumulol, izoxantohumulol, 6-prenylnaringenín a 8-prenylnaringenín. Xantohumulol a ďalšie prenylflavonoidy majú schopnosť inhibovať oxidáciu ľudského LDL, pričom xantohumulol má antioxidačnú aktivitu vyššiu ako  $\alpha$ -tokoferol (RODRIGUEZ et al., 2001). Pri xantohumole bola popísaná aj protivírusová aktivita proti HIV-1 (GERHAUSER, 2005). Okrem už uvedených účinkov sa zistilo, že hlavný flavonoid chmeľu xantohumulol inhibuje proliferáciu buniek rakoviny prsníka, hrubého čreva a vaječníkov *in vitro* (COLGATE, 2006).

#### Možnosti zvýšenia zdraviu prospešných zlúčenín v poľnohospodárskych plodinách.

Vzhľadom k trhovému potenciálu funkčných potravín a nutraceutík a množiacim sa experimentálnym dôkazom prospešného účinku flavonoidov na ľudské zdravie a pre ochranu rastlín pred škodcami a patogénmi vyvstáva otázka, či je možné aktívne stimulovať biosyntézu a akumuláciu týchto látok v rastlinách, t.j. vytvárať genotypy inherentne schopné vyššej syntézy flavonoidov.

Jednou z možností zvýšenia zdraviu prospešných zlúčenín v poľnohospodárskych plodinách sú klasické šľachtiteľské metódy, nevýhodou ktorých je však ich zdĺhavosť. Inou možnosťou je využitie takých agrotechnických postupov, pri ktorých je produkcia flavonoidov v plodine najvyššia. Aké sú to agrotechnické postupy, o tom sa dnes vie veľmi málo. Pre zvýšenie tvorby flavonoidov v poľnohospodárskych plodinách sa dá využiť aj poznatok, že nielen patogény, ale aj nepatogénne mikroorganizmy môžu elicitovať sekundárny metabolizmus. Bolo iniciovaných veľké množstvo výskumných programov, ktorých cieľom je odpovedať na otázku, ktoré faktory kontrolujú hladinu nutraceutík, vrátane flavonoidov, v poľnohospodárskych plodinách. Bolo napríklad zistené, že zvýšené hnojenie dusíkom znižuje obsah flavonoidov, zatiaľ čo hnojenie draslíkom viedlo k zvýšenej koncentrácii flavonoidov.

Šľachtitelia využívajúc moderné biotechnologické metódy môžu cielene ovplyvňovať podiel nežiadúcich zložiek ako sú napr. potravinové alergény, zvýšiť podiel fyziologicky účinných látok alebo vnášať do rastliny gény, ktoré sa v nej nevyskytujú. Vďaka pokroku v oblasti metabolického a génového inžinierstva predstavujú v súčasnosti biotechnologické metódy veľmi perspektívnu možnosť produkcie cenných fytochemikálií. Metabolické inžinierstvo rastlín je definované ako riadená zmena metabolizmu rastlín prostredníctvom



Obrázok 2: Schematické znázornenie biosyntetických dráh rôznych skupín flavonoidov

a bioinformatiky (WECKWERTH a FIEHN, 2002). Zmena existujúcich metabolických dráh a zavedenie nových je možná štyrmi hlavnými spôsobmi: i) cieleňou mutagénzou, ii) použitím vírusových vektorov, iii) transformáciou plastidov, iv) transformáciou jadrového genómu. Predpokladom pre využitie metabolického inžinierstva pre zvýšenie obsahu flavonoidov v poľnohospodárskych plodinách je dokonalá znalosť biosyntézy (obr. 2) a metabolizmu flavonoidov.

Metabolickým inžinierstvom je možné pripraviť novú generáciu plodín s novými zlepšenými vlastnosťami pre agronomické, medicínske, potravinárske a priemyselné využitie. Od nesmierneho potenciálu tejto modernej metódy k jeho úplnému využitiu však zrejme povedie ešte dlhá cesta dláždená prekážkami technickými, metabolickými ako aj legislatívnymi.

## Literatúra

1. BAUBLIS, A. - DECKER, E.A., CLYDESDALE, F.M.: Food Chem. 68, 1 (2000).
2. BONAFACCIA, G. - GAMBELLI, L. - FABJAN, N.: Food Chem. 83, 1 (2003).
3. COLGATE, E.C. - MIRANDA, C.L. - STEVENS, J.F. - BRAY, T.M. - HO, E.: Cancer Lett. 38, (2006 in press)
4. CZERWIŃSKI, J. - BARTNIKOWSKA, E. - LEONTOWICZ, H. J.: Nutr. Biochem 15, 622 (2004)
5. DeFELICE, S.L.: Gen. Eng. News 12, 13 (1992).
6. DEMIBRAS, A.: Food Chem. 90, 773 (2005)
7. FARAGÓ, J. - ŠRÁMKOVÁ, Z. - PŠENÁKOVÁ, I. - FARAGOVÁ, N. - MÚČKOVÁ, M.: Zb. 11 odb. sem. „Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, VÚRV Piešťany, 62-65 (2004)
8. GERHAUSER, C.: Mol. Nutr. Food Res. 49, 827 (2005)
9. HARBORNE, J.B. - WILLIAMS, C.A.: Phytochemistry 55, 481 (2000).
10. HERTOOG, M.G.L. - HOLLMAN, P.C.H. - KATAN, M.B. - KROMHOUT, D.: Nutr. Cancer 20, 21 (1993)
11. IWASHINA, T. J.: Plant Res. 113, 287 (2000)
12. KOVÁČ, M.: Potravinový výskum na prahu 21.storočia. Zborník Nové výživové trendy a výskum potravín. VÚP Bratislava, 1-5 (2000)
13. KÜHNAU, J.: World Rev. Nutr. Diet. 24, 117 (1976)
14. KWAK, N.S. - JUKES, D.J.: Food Control 12, 109 (2001)
15. LI, S.Q. - ZHANG, Q.H.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 41, 451 (2001)
16. LÓPEZ-VARELA, S. - GONZÁLES-GROSS, M. - MARCOS, A.: Eur. J. Clinical Nutr. 56, 29 (2002).
17. MÄLKKI, Y. - VIRTANEN, E.: Lebensmittel-Wissenschaft Technol. 34, 337 (2001)
18. MARKHAM, K.R. - PORTER, L.J.: Phytochemistry 8, 1777 (1969).
19. MIDDLETON, E. - KANDASWAMI, C. - THEOHARIDES, T.: Pharm. Rev. 52, 673 (2000).
20. MOJŽIŠ, J. - MOJŽIŠOVÁ, G.: Flavonoidy a ich biologické účinky. Viena, Košice, 2001.
21. MOUDRÝ, J.: Výživa a potraviny 54, 77 (1999)
22. NARAYANA, R.K. - REDDY, S.M. - CHALUVADI, M.R. - KRISHNA, D.R.: Ind. J. Pharmacol. 33, 2 (2001).
23. ÖTLES, S. - CAGINDI, Ö.: Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 5, 107 (2006).
24. PARR, A.J. - BOLWELL, J.: Sci. Food. Agric. 80, 985 (2000).
25. PETERSON, D.M. - HAHN, M.J. - EMMONS, CH. L.: Food Chem. 79, 473 (2002).
26. POKORNÝ, J.: Výživa a potraviny 2, 39 (2002).
27. PIRJO, M. - JARKKO, H. - PILHAV, M. - MATTI, J.: The content of phenolic acid in some grain products. In Abstract books, 1st International Conference on Polyphenols and Health, Clermont-Ferrand: Institut National de la Recherche Agronomique (2003).
28. PRÉSTAMO, G. - PEDRAZUELA, A. - PÉÑAS.E.: Nutr. Res. 23, 803 (2003).
29. QUETTIER-DELEN, CH. - GRESSIER, B. - VASSEUR, J.: J. Ethnopharmacol. 72, 35 (2000).
30. RODRIGUEZ, R.J. - MIRANDA, C.L. - STEVENS, J.F. - DEINZER, M.L. - BUHLER, D.R.: Food Chem. Toxicol. 39, 437 (2001).
31. SEVENIER, R. - Van der MEER, I.M. - BINO, R. - KOOPS, A.J.: J. Am. Coll. Nutr. 21, 199 (2002).
32. SUN, T. - HO, CH.T.: Food Chem. 91, 743 (2005).
33. TEMPLE, N.J.: Nutr. Res. 449 (2000).
34. TIMBERLAKE C.F. - HENRY, B.S.: Plant pigments as natural food colours. Endeavour, 10, 31 (1986).
35. TREUTTER, D.: Environ. Chem. Lett. 4, 147 (2006).
36. TRUSWELL, A.S.: Eur. J. Clinical Nutr. 56, 1 (2002).
37. TYTYKAL, B.: Spravodaj 6, 7 (2004).
38. VERPOORTE, R. - MEMELINK, J.: Curr. Op. Biotechnol. 13, 181 (2002).
39. WECKWERTH, W. - FIEHN, O.: Curr. Op. Biotechnol. 13, 156 (2002).
40. YAO, L.H. - JIANG, Y.M. - SHI, J. - TOMÁS-BARBERÁN, F.A. - DATTA, N. - SINGANUSONG, R. - CHEN, S.S.: Plant Foods Human Nutr. 59, 113 (2004).
41. YILMAZ, Y. - TOLEDO, R.T.: Trends Food Sci. Technol. 154, 22 (2004).
42. ZWER, P.K. In Encyklopedia of grain science, 1. ed., Oxford: Elsevier Academic Press, 2, 365-368 (2004).

✉

✉

Ivana Pšenáková<sup>1</sup>, Juraj Faragó<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko

<sup>2</sup> Oddelenie šľachtiteľských metód, Výskumný ústav rastlinnej výroby, SCPV, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovensko

## BIOCÍDNE LÁTKY Z RASTLÍN POUŽITEĽNÉ V POĽNOHOSPODÁRSTVE BIOCIDES FROM PLANTS UTILISE FOR AGRICULTURE

Eva ŪRGEOVÁ - Ľudovít POLÍVKA

*This work is focused on obtain of crude plant extracts with biocide effect. For the study of biocide effect have been prepared the methanolic crude extracts. The antimicrobial effect was determinate by disc diffusion method. There are interesting, the antibacterial activities against all tested bacteria, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Erwinia mallotivora* and *Xanthomonas* sp., were detected using extracts of hop and tomato range vegetation period. The interesting biocide activities were found using extracts from pepper and cone of hop. The strongest effect had these extracts on the strain *Erwinia mallotivora*.*

*Key words: biocide effect, crude extracts, phytopathogen bacteria, onion, garlic, hop, tomato, pepper, petunia, violet, daisy*

### Úvod

Biopesticídy sú biologicky aktívne látky – produkty sekundárneho metabolizmu. Z hľadiska životného prostredia sú menej škodlivé než konvenčné pesticídy, pôsobia špecificky, sú často efektívne už v malých množstvách a účinkujú rýchlo. Sú to látky prírodného pôvodu, prirodzene degradovateľné a neznamenajú dlhodobú záťaž pre prírodu (HUTTON a SJOBLAB, 2002). Naša práca bola prioritne orientovaná na biocídne látky rôznych rastlín, resp. odpadov zo spracovania v potravinárskom priemysle.

Cesnak, resp. jeho extrakty vykazujú široké spektrum antimikrobiálnej aktivity voči mnohým rodom baktérií, vláknitých húb a vírusom. BENKEBLIA et al. (2005) skúmali antimikrobiálnu aktivitu extraktov fenolových zlúčenín cibule a cesnaku. Extrakty týchto rastlín vykazovali antibakteriálnu aktivitu, pričom účinok cesnakového extraktu bol silnejší ako extrakty z cibule.

Mnohé sekundárne metabolity chmeľu majú biocídny alebo biostatický účinok na rozličné druhy Gram pozitívnych i Gram negatívnych baktérií a vláknitých húb. Tetrahydroizohumulón a horké kyseliny, predovšetkým  $\beta$ -kyseliny a ich deriváty, vykazovali vysokú inhibičnú aktivitu proti baktériám mliečneho kvasenia, proti *Streptococcus mutans*, potravinovým patogénom rodov *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* a *Clostridium*, baktériám spôsobujúcim kožné infekcie rodov *Propionobacter*, *Staphylococcus* a baktérii spôsobujúcej syndróm toxického šoku *Staphylococcus aureus* (BARNEY et al., 2001). SAKAMOTO a KONINGS (2003) zistili, že  $\beta$ -kyseliny, izoxantohumul, izo- $\alpha$  kyseliny a tetra-izo- $\alpha$  kyseliny inhibovali rast streptokokov. Z chmeľu boli vyizolované aj oligoméne proantokyandíny pozostávajúce z polyfenolových tanínov, katechínu a epikatechínu, ktoré majú potenciálne antimikrobiálne účinky (TAYLOR, 2003).

Celý rod *Capsicum*, druh *Capsicum annuum* nevynímajúc, produkuje široké spektrum sekundárnych metabolitov, medzi ktorými sa nachádzajú karotenoidové pigmenty (kapsantín, kapsorubín), karotén, luteín, zeaxantín, kukurbitaxantín a kapsaicín (DWECK, 2002). Antimikrobiálne vlastnosti paprikových extraktov, resp. samotného kapsaicínu boli testované na rôznych mikroorganizmoch: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* a *Streptococcus pyogenes* (CHICHEWICZ, 1996), *Helicobacter pylori* (JONES, 1997), *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (CAREAGA, 2003).

Rajčiak jedlý (*Lycopersicon esculentum*), patriaci medzi ľuľkovité (*Solanaceae*), produkuje množstvo sekundárnych metabolitov, najmä fenolové látky, fytoalexíny, nízkomolekulové peptidy, inhibítory proteáz a glykoalkaloidy (FRIEDMAN, 2002). Tomatín je steroidný glykoalkaloíd, ktorý má antifungálne a antibakteriálne vlastnosti (FRIEDMAN, 2002; KOZUKUE, 2004; PERÉZ-ESPINOZA, 2001).

### Materiál a metódy

#### Použité mikroorganizmy

V práci boli použité modelové fytopatogénne baktérie druhov *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Erwinia mallotivora* a *Xanthomonas* sp.

#### Príprava rastlinných extraktov

Na testovanie sme zozbierali rôzne časti rastlín, pri ktorých boli dokázané antimikrobiálne vlastnosti, počas vegetačného obdobia. Boli to časti cibule, cesnaku, papriky, chmeľu, rajčiaku a okrasných rastlín fialky, petúnie a chryzantémy. Extrakty boli pripravené z 5 g usušeného rastlinného materiálu. Po 72 hodinovej macerácii v 125 ml 80 % (v/v) metanolu bol macerát odparený do sucha. Odparok bol rozpustený v 5 ml DMSO a uskladnený pri 1 - 4°C.

Zoznam rastlín, ich častí a charakteristika rastliny v čase zberu sú uvedené v tabuľke 1.

#### Sledovanie antimikrobiálneho účinku rastlinných extraktov

Bola použitá difúzna disková metóda, pri ktorej bola meraná veľkosť inhibičnej zóny okolo diskov napustených rastlinným extraktom. Ako štandard slúžili papierové disky napustené pesticídom s deklarovaným antibakteriálnym účinkom KUPRIKOL 50, ako slepý pokus slúžili disky napustené čistým DMSO bez rastlinných extraktov.

## Výsledky a diskusia

### Účinnosť extraktov divo rastúceho chmeľu obyčajného na rast fytopatogénnych baktérií

Extrakt z rôznych plietiev divo rastúceho chmeľu obyčajného mali biocídny účinok na všetky testované fytopatogénne baktérie (tab. 2). Pri testovaní antibakteriálneho účinku sa potvrdil fakt popísaný De KEUKELEIREOM (2003), že najviac sekundárnych metabolitov sa akumuluje v rastline chmeľu v čase kvitnutia. Extrakt z listov chmeľu v čase kvitnutia mali dokázateľne silnejší inhibičný účinok ako extrakt z listov na konci vegetačného obdobia. Najväčšie inhibičné zóny boli zaznamenané pri extraktoch zo šišťice chmeľu, čo je pravdepodobne dané vysokým obsahom horkých kyselín a prenylovaných flavonoidov. Pri dlhodobejšej kultivácii baktérií v prítomnosti rastlinných extraktov sme pozorovali nielen bakteriostatický, ale v prípade účinkov extraktov na *Xanthomonas sp.* tiež baktericídny efekt.

### Účinnosť extraktov papriky ročnej na rast fytopatogénnych baktérií

Pri skúmaní účinnosti sekundárnych metabolitov vo forme metanolových extraktov získaných z papriky (tab. 3) sme zistili, že extrakt najúčinnšie pôsobil na rast *Erwinia mallotivora*, kde extrakt z listu v čase kvitnutia vytvoril inhibičnú zónu až 8 mm. Pri ďalších bakteriálnych kmeňoch bol biocídny efekt menší, inhibičná zóna sa však výrazne v čase nezmenila, extrakt pôsobil bakteriostaticky.

### Účinnosť extraktov rajčiaka jedlého na rast fytopatogénnych baktérií

Z tab. 4 vyplýva, že rovnako ako extrakt z chmeľu obyčajného aj extrakt získaný z častí rajčiaka jedlého boli účinné na všetky testované baktérie. Porovnateľný biocídny účinok mali extrakt, získaný zo sadenice a listov rastliny v čase kvitnutia. Pri pôsobení extraktov na *Acidovorax avenae subsp. avenae* a *Erwinia mallotivora* bol účinok baktericídny, pri pôsobení na *Xanthomonas sp.* bakteriostatický.

### Účinnosť extraktov cibule kuchynskej a cesnaku kuchynského na rast fytopatogénnych baktérií

Extrakt z nadzemných častí cibule kuchynskej ani cesnaku kuchynského neinhibovali rast *Acidovorax avenae subsp. avenae*. Druh *Erwinia mallotivora* bol inhibovaný extraktom z listu cibule v čase kvitnutia a cesnakovými extraktmi z výhonkov a listov, počas 5 dní bol zaznamenaný len mierny pokles inhibičného účinku. *Xanthomonas sp.* bol najcitlivejší na pôsobenie extraktov získaných z cibule kuchynskej, najsilnejší účinok mal extrakt z listu na začiatku vegetačného obdobia. Porovnateľný účinok mali extrakt z listov cesnaku. V tab. 5 a 6 je porovnaný inhibičný účinok extraktov plietiev cibule kuchynskej a cesnaku kuchynského.

### Účinnosť extraktov izbových rastlín

Extrakt listov fialky a petúnie a chryzantémy v čase kvitnutia inhibovali rast dvoch modelových bakteriálnych druhov. Extrakt z listu fialky a petúnie mali biocídny účinok na rast druhu *Xanthomonas sp.* Extrakt z listu chryzantémy na druh *Erwinia mallotivora* mal pozitívny účinok počas 144 hodín kultivácie. Extrakt izbových rastlín neúčinkovali na druh *Acidovorax avenae subsp. Avenae* (tab. 7).

## Záver

Aj napriek intenzívnemu záujmu v oblasti nových technológií a ich zavádzaní do poľnohospodárstva je stále veľa možností aj v základných otázkach, akými nepochybne choroby kultúrnych plodín spôsobené mikroorganizmami sú. Jednou z možností, ktoré sa otvárajú v boji proti mikrobiálnym pôvodcom rastlinných chorôb sú rastlinné sekundárne metabolity s antibakteriálnymi a antifungálnymi vlastnosťami. Na základe výsledkov uvedených vyššie možno poznamenať, že rastlinné metabolity v úlohe pesticídov, či už ako baktericidy, fungicidy, herbicidy, alebo insekticidy, majú budúcnosť.

Testované extrakt z divo rastúceho chmeľu obyčajného (*Humulus lupulus*) a rajčiaka jedlého (*Lycopersicon sculentum L.*) inhibovali rast všetkých druhov baktérií, ktoré sme používali pri testovaní. Najsilnejší účinok mali extrakt z listu papriky v čase kvitnutia a šišťice chmeľu, v oboch prípadoch bol najsilnejší inhibičný efekt zaznamenaný na rast baktérie *Erwinia mallotivora*.

V prípade pozitívnych výsledkov testovania na širší okruh fytopatogénnych mikroorganizmov je možné využiť tieto plodiny ako surovinu pre prípravu environmentálne prijateľných biopesticídov.

## Oznámenie

Táto práca vznikla za finančnej podpory ŠP VaV SR „Využitie domácich surovín a zdrojov“, úlohy Komplexné využitie rastlinných surovín, VE 5.4. Sekundárne metabolity rastlín s biocídnym účinkom.

## Literatúra

1. BARNEY, M. - SEABROOKS, J. - RYDER, D.: Hop acids: Their antimicrobial properties. their uses in brewing and their potential use as bacteriocides in other applications. [cit. 2005-12-10]. Dostupné z: <http://www.asbcnet.org/Meetings/2001/Abstracts/O-8.htm>
2. BENKEBLIA, N. - ONODERA, S. - YOSHIHIRA, T. - KOSAKA, S. - SHIOMI, N.: Effect of Long-term Storage on Saccharides and Fructooligosaccharides (FOS) of Onion Bulb *Allium Cepa L.* Var. Tenshin. In: J. Food Technol., Vol. 3, 2005, No.1, p. 35-40.

3. CAREAGA, M. - FERNANDEZ, E. - DORANTES, L. - MOTA, L. - JARAMILLO, M. E. - HERNANDEZ-SANCHEZ, H.: Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. In: Int. J Food Microbiol., Vol. 83, 2003, No. 3, p. 331-335.
4. CICHEWICZ, R. H. - THORPE, P. A.: The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum species*) and their uses in Mayan medicine. In: J. Ethnopharmacol., Vol. 52, 1996, No. 2, p. 61-70.
5. DE KEUKELEIRE, J. - OOMS, G. - HEYERICK, A. - ROLDAN-RUIZ, I. - VAN BOCKSTAELE, E. - DE KEUKELEIRE, D.: Formation and accumulation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). In: J. Agric. Food. Chem., Vol. 51, 2003, No. 15, p. 4436-4441.
6. DWECK, A. C.: Natural ingredients for colouring and styling. In: Int. J. Cosmet. Sci., Vol.24, 2002, No. 5, p.287 – 302.
7. FRIEDMAN, M.: Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. In: J Agric Food Chem., Vol. 50, 2002, No. 21, p. 5751-5780.
8. JONES, N. L. - SHABIB, S. - SHERMAN, P. M.: Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol. Lett., Vol. 146, 1997, No. 2, p. 223–227.
9. KOZUKUE, N. - HAN, J. S. - LEE, K. R. - FRIEDMAN, M.: Dehydrotomatine and alpha-tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. In: J Agric Food Chem., Vol. 52, 2004, No. 7, p.2079-2083.
10. SAKAMOTO, K. - KONINGS, W. N.: Beer spoilage bacteria and hop resistance. In: Int. J. Food Microbiol., Vol. 89, 2003, No. 2-3, p.105-124.
11. TAYLOR, A. W. - BAROFSKY, E. - KENNEDY, J. A. - DEINZER, M. L.: Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. J. Agric. Food. Chem., 2003, Vol. 51, No.14, p.4101-4110.

**Tabuľka 1: Zoznam rastlín a ich častí použitých na prípravu metanolových extraktov**

Slovenský názov rastliny	Latinský názov rastliny	Odobratá časť rastliny	Charakteristika rastliny v dobe zberu
divo rastúci chmeľ obyčajný	<i>Humulus lupulus</i>	list	kvitnúca
		šišťice	plodiaca
		list	plodiaca
paprika ročná	<i>Capsicum annum</i>	list + stonka	sadenica
		list	kvitnúca
		list	plodiaca
rajčiak jedlý	<i>Lycopersicon sculentum</i>	list + stonka	sadenica
		list	kvitnúca
		list	plodiaca
cibuľa kuchynská	<i>Allium cepa</i>	výhonky	nekvitnúca
		kvet	kvitnúca
		list	kvitnúca
cesnak kuchynský	<i>Allium sativum</i>	výhonky	nekvitnúca
		list	nekvitnúca
fialka voňavá	<i>Viola odorata</i>	list	nekvitnúca
petúnia	<i>Petunia</i>	list	kvitnúca
chryzantéma	<i>Chrysanthemum</i>	list	nekvitnúca
		list	kvitnúca

**Tabuľka 2: Inhibičný účinok extraktov chmeľu obyčajného na rast fytopatogénnych bakteriálnych kmeňov. Kultivácia prebiehala na MPA pri 30±2 °C 24 hodín.**

Bakteriálny kmeň	časť rastliny / priemerná veľkosť inhibičnej zóny [mm]			
	list v čase kvitnutia	šišťica	list v čase plodu	KUPRIKOL
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> CCM 2761	3	5	1	0
<i>Xanthomonas species</i> CCM 2888	3,5	2,5	2,5	0
<i>Erwinia mallotivora</i> CCM 2890	4	8	1	0



**Tabuľka 3: Inhibičný účinok extraktov papriky ročnej na rast fytopatogénnych bakteriálnych kmeňov. Kultivácia prebiehala na MPA pri 30±2 °C 24 hodín**

Bakteriálny kmeň	časť rastliny / priemerná veľkosť inhibičnej zóny [mm]/			
	sadenica	list v čase kvitnutia	list v čase plodu	KUPRIKOL
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> CCM 2761	0	4	2	0
<i>Xanthomonas species</i> CCM 2888	0	0	3	0
<i>Erwinia malloivora</i> CCM 2890	2	8	2	0

**Tabuľka 4: Inhibičný účinok extraktov rajčiaka jedlého na rast fytopatogénnych bakteriálnych kmeňov. Kultivácia prebiehala na MPA pri 30±2 °C 24 hodín**

Bakteriálny kmeň	časť rastliny / priemerná veľkosť inhibičnej zóny [mm]			
	sadenica	list v čase kvitnutia	list v čase plodu	KUPRIKOL
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> CCM 2761	4	3	2	0
<i>Xanthomonas species</i> CCM 2888	3	3	3	0
<i>Erwinia malloivora</i> CCM 2890	4,5	4	2	0

**Tabuľka 5 Inhibičný účinok extraktov cibule kuchynskej na rast fytopatogénnych bakteriálnych kmeňov. Kultivácia prebiehala na MPA pri 30±2 °C 24 hodín.**

Bakteriálny kmeň	časť rastliny / priemerná veľkosť inhibičnej zóny [mm]			
	výhonky	kvet	list v čase kvitnutia	KUPRIKOL
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> CCM 2761	0	0	0	0
<i>Xanthomonas species</i> CCM 2888	6	4	4	0
<i>Erwinia malloivora</i> CCM 2890	0	0	2	0

**Tabuľka 6: Inhibičný účinok extraktov cesnaku kuchynského na rast fytopatogénnych bakteriálnych kmeňov. Kultivácia prebiehala na MPA pri 30±2 °C 24 hodín.**

Bakteriálny kmeň	časť rastliny / priemerná veľkosť inhibičnej zóny [mm]		
	výhonky	list	KUPRIKOL
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> CCM 2761	0	0	0
<i>Xanthomonas species</i> CCM 2888	0	4	0
<i>Erwinia malloivora</i> CCM 2890	5	4	0

**Tabuľka 7: Inhibičný účinok extraktov izbových rastlín na rast fytopatogénnych bakteriálnych kmeňov. Kultivácia prebiehala na MPA pri 30±2 °C 24 hodín.**

Bakteriálny kmeň	rastlina / priemerná veľkosť inhibičnej zóny [mm]/			
	list fialky	list petúnie	list chryzantémy	KUPRIKOL
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> CCM 2761	0	0	0	0
<i>Xanthomonas species</i> CCM 2888	3	2	0	0
<i>Erwinia malloivora</i> CCM 2890	0	0	4	0

✉

✉

## HODNOTENIE GENETICKÝCH ZDROJOV TABAKU PROTI ŽIVOČÍŠNYM ŠKODCOM THE EVALUATION OF GENETIC RESOURCES OF TOBACCO AGAINST PESTS

Milan MACÁK - Ľubomír MENDEL - Jana PORHAJAŠOVÁ

*The green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer is the most important insect pest on many important crops. The development of varieties resistant to green peach aphid faces some difficulties when doing accurate identification of resistant genotypes. The field test under natural strong infestation pressure shows the most suitable way for identification of resistant tobacco genotypes against green peach aphid. The infestation was evaluated twice - the first during high pressure in June and the second after maturity of main capsule in September by yes no method of whole plant and particularly stem. During 2003 -2005, on the base of screening 78 genetic resources maintain on Research Institute of Crop Production Piešťany the resistant genotypes of tobacco V.A.M, F225, NC744, CV 288 and Vyx32 were identified. The resistant genotypes revealed resistance on level of standards genotypes TI 1028 and TI 1112 against alate aphid (*migrantes alatae*) and apterous aphid without using insecticides control. 71 tested tobacco genotypes were very heavy infested by alate forms and colonies of apterous green peach aphid.*  
Key words: tobacco, green peach aphid, screening, host plant resistance, genetic resources

### Úvod

Voška broskyňová *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera : Aphididae) patrí k významným polyfágny druhom vošiek ako aj k poddruhu adaptovanému na tabak., *Myzus persicae nicotianae* (VARGAS a iní 2005). Vošky ako vektory viróz každoročne spôsobuje priame škody kolonizáciou rastlín a nepriame škody ako vektory viróz napríklad Y vírusu zemiaka hlavne na plodinách z čeľade *Solanaceae*. Na priamu kontrolu vošiek kolonizujúcich rastliny sú potrebné 2-3 postreky insekticidom. Ochrana proti alátnym formám - vektorom viróz je pri klasickej insekticídnej ochrane finančne náročnejšia, zaťažujúca životné prostredie s nižšou efektívnosťou. Dôkazom sú výsledky poľného pokusu 7 viržinských odrôd pestovaných v závlahových podmienkach s odkvetovaním, v regióne Nitry. Po aplikácii granulovaného insekticídu a štyroch následných postrekov bolo zistené vysoké percento napadnutých rastlín vírusom PVY - od 19% - 23% v silnom stupni napadnutia (hodnotených 2000 rastlín s každej odrody). Kontrolný genotyp s genetickou odolnosťou proti voške broskyňovej bol bez príznakov napadnutia (MACÁK, 1997).

BURK a STEWARD (1969) otestovali 45 druhov rodu *Nicotiana* a 12 odrôd a polyploidov na odolnosť proti voške broskyňovej v skleníkových podmienkach. Štyri týždne po umelej infestácii dosiahli silný stupeň zamorenia zodpovedajúci až 3500 kusov vošiek na rastlinu pri náchylnom druhu *Nicotiana glauca*. Detekovali 6 odolných druhov so 100 násobne nižším zamorením ako pri citlivých genotypoch. Odolné druhy *N. glauca*, *N. glauca*, *N. glauca*, *N. glauca*, *N. glauca*, *N. glauca* patria do skupiny austrálskej sekcie *Suaveolentes*, kde autori predpokladali spoločný mechanizmus toxicity z glandulárnych trichómov. Pri druhoch *N. glauca* (západné USA) a *N. glauca* (Argentína) predpokladali odlišný mechanizmus odolnosti. Autori rozpracovali problematiku interšpecifickej hybridizácie a poukázali na prekážky využitia zdrojov odolnosti divých druhov do komerčne akceptovateľných genotypov, ktoré sú spôsobené nepriaznivým efektom na kvalitu sušených listov.

Význam problematiky a trendy hľadania alternatívnych zdrojov ochrany kultúrnych rastlín proti živočíšnym škodcom vedú k snahe hodnotenia genotypov tabaku na odolnosť proti hmyzu, hľadania mechanizmu odolnosti genotypov tabaku proti voškám ako aj insekticídna ochrana (JOHNSON, 2005), ako aj vývoj odrôd s viacnásobnou rezistenciou pri využití konvenčného spätného kríženia pre prenos genetickej odolnosti proti voškám (BRANDLE, 2005). Očakávaným prínosom je odstránenie aplikácie insekticídov z produkčného pestovania plodín.

Rod *Nicotiana*, do ktorého patria aj dva kultúrne druhy *N. tabacum* a *N. glauca* s počtom chromozómov  $2n = 48$ , sa delí na 3 podrody a 14 sekcií. Pôvodný počet 65 druhov bol rozšírený o novoobjavený druh *N. glauca*, ktorý sa začal využívať ako zdroj odolnosti proti vírusovým chorobám (SMITH, 1979).

Z pestovateľského a šľachtiteľského hľadiska má význam rozlíšenie celosvetovo rozšíreného druhu *N. tabacum* na agroekotypy. Najrozšírenejšie agroekotypy pestované v Európe sú typ viržinsky (flue-cured), typ burley (prírodne sušený) a typ orientálny. V Poľsku sa okrajovo pestuje typ cigarový vo Francúzsku typ tmavý prírodne sušený (SHILTZ, 1991). Druh *N. glauca* - machorka sa okrajovo pestuje napr. v Poľsku a na Ukrajine.

Problematika alternatívnej ochrany a nehostiteľskej rezistencie má významné miesto v udržateľných poľnohospodárskych systémoch. Zavádzanie odolných genotypov poľnohospodárskych plodín zvyšuje biodiverzitu sprievodnej bioty v agroekosystémoch v dôsledku menšej insekticídnej kontroly.

Predložená práca je zameraná na screening genetických zdrojov tabaku v kolekcii SCPV-VÚRV Piešťany proti savým živočíšnym škodcom (voška broskyňová *Myzus persicae* Sulzer) s cieľom

identifikovať nové zdroje podporujúce biodiverzitu rastlín a alternatívne postupy udržateľného pestovania plodín.

## Materiál a metódy

Genetické zdroje tabaku z kolekcie VÚRV boli v rokoch 2003-2005 v rámci regenerácie genetických zdrojov hodnotené aj na základe genetickej odolnosti proti živočíšnym škodcom (voška broskyňová) v poľných podmienkach. Pre hodnotenie infestácie bola použitá alternatívna stupnica infestácie celých rastlín tabaku okrídlenými (*migrantes alatae*) a bezkridlymi formami celých rastlín ako aj metóda hodnotenia infestácie byle (MACÁK, 1996) dva krát za vegetáciu v čase najsilnejšieho náletu na sekundárnych hostiteľov v štádiu ružice (jún) a v čase dozrievania terminálnej tobolky (september). Genetické zdroje boli zatriedené do dvoch kategórií na náchylné genotypy a odolné genotypy na úrovni kontrolných druhov tzn. výskyt ojedinelých okrídlených jedincov v počte 1-2 kusy bez tvorby kolónií. Ako kontrolné odrody boli použité genotypy Ti 1028 (2003-2004) a Ti 1112 (2003-2005), ktorých odolnosť proti voškám popísal ELSEY, CHAPLIN (1978). Priesady boli dopestované v skleníku a vysadené na pokusné políčka v areáli VÚRV v Piešťany v rokoch 2003-2005 v tretej dekáde mája v počte 5 - 6 rastlín v sponě 1 x 0,4 m bez opakovania. V rámci periodického presevu a regenerácie genetických zdrojov bolo 78 genetických zdrojov tabaku vrátane kontroly otestované na napadnutie voškami v prirodzenom silnom infekčnom tlaku bez aplikácie insekticidov.

Výskum bol riešený v účelovej činnosti MP SR „Zhromažďovanie, hodnotenie a uchovávanie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo“ a screening genetických zdrojov bol podporený s VEGA projektu „Integrovaný manažment produkčných a ekologických funkcií poľnohospodárstva Podunajskej nížiny“ č. 1/1343/04.

## Výsledky a diskusia

Testovanie odolnosti proti voškám v prirodzených podmienkach závisí od rozvoja populácie vošiek a vytvorenia dostatočného tlaku a infestácie okrídlenými formami vošiek. Poveternostné podmienky stanovišťa uvádzame v tabuľke 1. V pokusnom roku 2003 boli teploty v mesiacoch máj a jún o 4,6 °C, resp. 8 °C vyššie, ako je dlhodobý priemer zodpovedajúci danému obdobiu. Mimoriadne teplý a suchý máj a mimoriadne teplý a veľmi suchý jún vytváral podmienky pre rozvoj populácie vošiek. Pokusný rok 2004 bol poveternostne pre rozvoj vošiek taktiež priaznivý. Bol charakterizovaný teplým a veľmi suchým mesiacom apríl (33,5 % DP) a teplotne normálnym, ale veľmi suchým mesiacom máj (28,5 % DP). V teplotne a zrážkovo normálnom roku 2005 spadlo 616 mm zrážok, čo predstavuje 89,9 % dlhodobého priemeru. Rozdelenie zrážok v jednotlivých mesiacoch bolo veľmi nerovnomerné. Zatiaľ čo vo veľmi suchom mesiaci jún (42,1 % DP) bol vysoký deficit zrážok, vo veľmi vlhkom apríli úhrn zrážok dosiahol 212 % dlhodobého priemeru. Na základe poveternostných údajov možno konštatovať že boli vytvorené vhodné podmienky na rozvoj populácie vošiek vo všetkých sledovaných rokoch čo sa prejavilo vysokým stupňom infestácie náchylných odrôd okrídlenými formami a tvorbou kolónií.

**Tabuľka 1: Poveternostné podmienky v pokusných rokoch 2003 - 2004**

Mesiac	LTA 30 (1951-1980)		2003		2004		2005	
	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm
I.	-1,8	32	-1,65	40,9	-3,06	50,6	-0,48	39,9
II.	0,2	33	-1,06	9,4	1,28	27,4	-2,36	51,6
III.	4,2	32	5,17	0,9	4,42	49,4	3,01	7,0
IV.	9,4	43	9,94	16,5	11,65	14,4	11,45	91,2
V.	14,1	54	18,73	28,7	14,05	15,4	15,62	33,5
VI.	17,7	80	22,26	33,9	17,94	72,9	18,18	33,7
VII.	18,9	76	21,67	95,7	20,06	15,9	20,44	90,3
VIII.	18,4	68	22,94	16,0	20,70	44,6	18,93	98,8
IX.	14,5	38	15,88	19,3	15,01	38,9	16,41	42,3
X.	9,6	42	8,00	57,9	12,22	61,4	10,89	10,2
XI.	4,6	51	6,68	34,5	5,20	46,5	3,68	48,0
XII.	0,3	46	0,88	30,6	0,96	33,3	-0,33	69,5
$\bar{x}$ I - XII.	9,2	-	10,85	-	10,06	-	9,62	-
$\bar{x}$ IV - IX	15,5	-	18,61	-	16,60	-	16,84	-
$\Sigma$ I - XII	-	593	-	384,3	-	470,7	-	616,0
$\Sigma$ IV - IX	-	359	-	210,1	-	202,1	-	389,8

LTA – dlhodobý priemer

Výsledky screeningu testovaných genetických zdrojov tabaku sú uvedené v tabuľke 2 a 3. Na základe hodnotenia rastlín tabaku pri prirodzenom infekčnom tlaku vošky broskyňovej v poľných podmienkach

bola pri 71 genotypoch tabaku zistená silná infestácia okridlených vošiek s následnou tvorbou kolónii bezkrídlych vošiek.

**Tabuľka 2: Testované genotypy rodu *Nicotiana* Piešťany 2003 -2005**

Rok 2003		Rok 2004		Rok 2005	
Genet. zdroj	Pôvod	Genet.zdroj	Pôvod	Genet.zdroj	Pôvod
Cooper 254	USA	Bonanza	S.I.T.	Beerwah GG	Austrália
Nyiersegi 139	Maďarsko	Canbera 719	Austrália	Beerwah H	Austrália
Speight G-70	USA	Coker 48	USA	Bell 110	USA
Virginia Jendrzejowska	Poľsko	Coker 86	USA	Bell 61-10	USA
Virginia 31	Poľsko	Delgold	Kanada	Burford special	USA
V-123	S.I.T.	Gold Dollar	S.I.T.	C 6 Cospaia	Taliano
Linia 348	Poľsko	Hicks Broadleaf	USA	Coker 139	USA
Virginia 362	Poľsko	Hicks Resistant	Austrália	Coker 258	USA
Linia 277	Poľsko	NC 12	USA	Coker 319	USA
Souffi cap bon	S.I.T.	NC 13	USA	Coker 347	USA
Dreta	Nemecko	One Sucker	Austrália	Coker 354	USA
B.B.A. 46	S.I.T.	Speight G 23	USA	Coker 411	USA
Burley SH	Slovensko	Speight G 41	USA	Coker 187- Hicks	USA
Kentucky W39 M29	USA	Speight G 52	USA	Coker 187	USA
Texana F	S.I.T.	Virginia Broniszowska	Polsko	Delhi 34	Kanada
<i>N. clevelandi</i>	S.I.T.	Virginia Kazimierska	Polsko	Delhi 76	Kanada
<i>N. rustica</i> Babor	S.I.T.	Virginia Krakowska I	Polsko	Delcrest 57	Maďarsko
		Virginia Gold	GZ Báb	GV 3	Juhoslávia
		Stamm S 49	Nemecko	F212	Japonsko
		Stamm S 53	Nemecko	Hicks 55	USA
		Machorka Zoltaja 109	Ukraina	Hicks 101	USA
		Immunnyj 580	Ukraina	Kutsaga E 1	Zimbabwe
		Virginia Izyda	Polsko	Kutsaga E 2	Zimbabwe
		Burley 282	Polsko	LAFC 53	USA
		Burley Skroniowski70	Polsko	Linia 71	Poľsko
		Forchmeier A	Nemecko	Linia 81	Poľsko
		Forcheimer B	Nemecko	Linia 177	Polsko

S.I.T. - z kolekcie S.I.T. Bratislava

V tabuľke 3. uvádzame genotypy s odolnosťou proti voškám na úrovni kontrolných genotypov TI 1028 a TI 1112. Uvedené genotypy a úroveň ich odolnosti zdokumentoval JOHNSON (1980) ktorý v 3 ročných poľných pokusoch hodnotil 29 najodolnejších genotypov a kontroly NC95 a NC2326. Všetky odolné genotypy mali v čase hodnotenia minimálne 1 vošku na rastline, no vošky sa nerozmnožovali a netvorili kolónie. Naopak v skleníkových podmienkach boli niektoré genotypy s poľnou odolnosťou silne kolonizované. Zaujímavé bolo zistenie zvýšenej citlivosti niektorých genotypov proti skočke tabaku. Testovanými odolnými genotypmi boli aj TI 1028 a TI 1112 ktoré sme použili ako kontrolné odrody hodnotenia infestácie (tab. 3). Kontrolné genotypy potvrdili vysoký stupeň odolnosti proti alátnym a bezkrídlym voškám počas celej vegetačnej sezóny.

V zhode literárnymi údajmi a pokusmi BEDNÁŘA a i. (2003) bola potvrdená pretrvávajúca genetická odolnosť kontrolných genotypov a genetických zdrojov V.A.M, F225, Vy 32, CV 288, NC 744 počas všetkých rokov testovania (tab. 3).

**Tabuľka 3: Testovania genotypov tabaku s odolnosťou proti voške broskyňovej, VÚRV Piešťany 2003-2005**

Genetický zdroj	Štát pôvodu	Roky testovania		
		2003	2004	2005
TI 1028	USA	T	T	-
TI 1112	Venezuela	T	T	T
V.A.M.	Nemecko	T	T	T

Genetický zdroj	Štát pôvodu	Roky testovania		
		2003	2004	2005
F225	Japonsko	T	T	-
VY32	Zimbabwe	T	T	T
CV 288	USA	T	-	-
NC 744	USA	T	T	-

T- testovanie odolnosti v poľných podmienkach

Detekované rezistentné genotypy môžu byť vzhľadom na celkový habitus a vzrast vhodným východiskovým materiálom pre ďalšie využitie.

Tolerovanie výskytu ojedinelých jedincov na odolných odrodách je v súlade s pozorovaniami správania vošiek, ktoré uvádzajú ELSEY a CHAPLIN (1978), ktorí skúmali faktory odolnosti tabaku proti *M.persicae* a *H. virescens*. V poľnom pokuse zistili odolnosť TI 1112 proti okridleným i bezkrídlým voškám i keď v laboratórnych podmienkach sa bezkrídle vošky lepšie reprodukovali na TI 1112 než na náchylných kontrolách. Poľnú odolnosť proti voškám autori vysvetľovali správaním okridlených vošiek. Vyše 50 % okridlených vošiek opustilo po umelej infestácii TI 1112 do 2 hodín a 60-90 % do 6 hodín. Vzhľadom na veľké rozdiely v infestácii rastlín sa javí metóda screeningu na odolnosť proti voškám v poľných podmienkach ako vhodnejšia. Vhodná screeningová metóda hodnotenia infestácie rozhodujúcou mierou verifikuje dosiahnuté výsledky.

### Záver

- Na základe poľného testovania genetických zdrojov tabaku v rokoch 2003-2005 možno konštatovať, že silný infekčný tlak zaznamenaný v mieste hodnotenia genetických zdrojov (VURV Piešťany) umožnil verifikáciu detekcie odolných genotypov vhodných aj pre praktické šľachtenie.
- Na základe screeningu bolo detekovaných 5 zdrojov odolnosti kultúrneho druhu *Nicotiana tabacum* ako vhodného východiskového šľachtiteľského materiálu na odolnosť proti voške broskyňovej *Myzus persicae*. Odolnosť genotypov bola na úrovni kontrolných genotypov TI 1028 a TI 1112.
- Hľadanie alternatívnych zdrojov ochrany rastlín proti živočíšnym škodcom je významným prínosom pre ochranu sprievodnej biodiverzity v udržateľných agroekosystémoch.

### Literatúra

1. ELSEY, K.D. - CHAPLIN, J.F. 1978. Resistance of tobacco introduction TI 1112 to the tobacco budworm and green peach aphid. J.Econ. Entomol., č. 71, 1978, s.723-725.
2. BEDNÁŘ, J. - MACÁK, M. - MENDEL, E. 2003. The screening of tobacco genetic resources against pests. In.: Udržateľné poľnohospodárstvo a rozvoj vidieka. Nitra : SPU v Nitre, 2003, s. 226- 227.
3. BRANDLE, J. 2005. Tobacco cultivars with multiple insect resistance using a combination of genetic transformation and conventional breeding techniques. Food System 2002 - Pest management Research program. <http://www.gov.on.ca:8088/OMAFRA/english/research/archives/researchfund/fs2docs/fs7115.htm> , 20.5.2005.
4. BURK, L.G. - STEWARD, P.A. 1969. Resistance of *Nicotiana* species to the green peach aphid. J.Econ.Entomol., č. 62, 1969, s. 1115-1117.
5. JOHNSON, A. W. Resistance in Tobacco to the Green Peach Aphid. J.Econ. Entomol., č.73, 1980 s. 707-709.
6. JOHNSON, A. W. Management of insect pests of tobacco. Clemson University, South Carolina, State project 2001-2006, [www.clemson.edu/scg/field/johnson2.htm](http://www.clemson.edu/scg/field/johnson2.htm), 20.5.2005.
7. MACÁK, M. 1996. Genetické a šľachtiteľské zdroje odolnosti *Nicotiana tabacum* proti voške broskyňovej *Myzus persicae* : Dizertáčná práca. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1996. 145s.
8. MACÁK, M. - MAJERNÍK, F. - CIGLAR, J. 1997. Možnosti pestovania zahraničných odrôd tabaku v podmienkach Slovenska, z hľadiska ochrany proti Y-vírusu zemiaka. Zb. XIV. Slovenskej a Českej konferencie o ochrane rastlín v Nitre, 3.-4. september 1997. s. 90 -91.
9. SHILTZ, P. - DELON, R. - BARDON, J.C. Les Nicotianees en collection a L'Institut du Tabac. Bergerac: France, 1991, 2eme Ed., 69s.
10. SMITH, C. M. 1989. Plant resistance to insect a fundamental approaches. John Wiley and Sons, 1989, 286 s. ISBN 0-471-84938-3
11. VARGAS, R. R. - TRONCOSO, A.J. - TAPIA, D.H. - OLIVERAS-DONOSO, R. - NIEMEYER, M. Behavioural differences during host selection between alate virginoparae of generalist and tobacco-specialist *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata 116, 2005, č.1., s. 43.

✉

✉

Milan MACÁK, Katedra udržateľného poľnohospodárstva a herbológie, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra [milan.macak@uniag.sk](mailto:milan.macak@uniag.sk), Lubomír Mendel, SCPV-VÚRV Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Jana Porhajašová, Katedra environmentalistiky a zoológie, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

**ANALÝZA GÉNOV REZISTENCIE PROTI VÍRUSU Y ZEMIAKA (PVY)  
A VÍRUSU X ZEMIAKA (PVX) V GENETICKÝCH ZDROJOCH ĽUĽKA  
ZEMIAKOVÉHO (*SOLANUM TUBEROSUM*, L.) POMOCO  
MOLEKULOVÝCH MARKEROV**  
**ANALYSIS OF RESISTANCE GENES AGAINST POTATO VIRUS Y (PVY)  
AND POTATO VIRUS X (PVX) IN GENETIC RESOURCES OF POTATO  
(*SOLANUM TUBEROSUM*, L.) USING MOLECULAR MARKERS**

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

*This study consisted of screening potato genotypes collected from potato gene bank for resistance against two potato viruses – PVY and PVX. Varieties with extreme resistance against PVY and PVX were selected on the basis of infection tests and application of molecular markers. Variety San possessing extreme resistance against both viruses – PVY and PVX – was used in crossing with the genotype C2264 susceptible to both viruses. Progeny was analysed using two DNA markers: GPI22718 for extreme resistance against PVY and M221 for extreme resistance against PVX. Distribution of symptoms and ELISA readings confirmed extreme resistance against PVY and PVX respectively. DNA markers for extreme resistance against both viruses was found in 54.5% of resistant genotypes, single marker for extreme resistance against PVY was detected in 24% resistant genotypes and 21.2% of total amount of resistant genotypes showed single marker for extreme resistance to PVX.*

*Key words: potato, extreme resistance against viruses, PVY, PVX,*

### Úvod

V poľnohospodárstve patria vírusy medzi najdôležitejších patogénov. Ochorenia vyvolané vírusmi, spôsobujú vážne ekonomické straty, na ktorých má rozhodujúci podiel redukcia úrody a zníženie kvality. Plesň zemiaková a rôzne typy ochorenia spôsobené vírusom Y zemiaka (PVY) sú patogénmi, ktoré dlhodobo v rozhodujúcej miere ovplyvňujú pestovanie ľuľka zemiakového v miernom klimatickom pásme (GEBHARDT, VALKONEN, 2001).

V množstve prístupov ako ochrániť poľnohospodárske plodiny pred infekciou vírusmi, má dominantné postavenie rezistencia, ktorá spolu s ďalšími postupmi ochrany vytvára podmienky pre minimalizáciu prenosu vírusov. Šľachtenie nových odrôd ľuľka zemiakového s rezistenciou proti ekonomicky významným vírusom predstavuje najefektívnejšiu formu ochrany za predpokladu, že sa využívajú extrémne formy rezistencie.

Gény extrémnej rezistencie proti PVY môžu pochádzať z viacerých divorastúcich foriem *Solanum stoloniferum*, *Solanum hougasii* a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (SWIEZYNSKI, 1994). V Európe sa v šľachtení ľuľka zemiakového najviac uplatnil gén extrémnej rezistencie proti PVY pochádzajúci zo *Solanum stoloniferum* -  $R_{y_{sto}}$ , ktorý bol introdukovaný do viacerých odrôd vyšľachtených v Holandsku, Nemecku, Poľsku a Maďarsku. Gén extrémnej rezistencie pochádzajúci zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* –  $R_{y_{adg}}$ , sa využíval v mnohých šľachtiteľských programoch, ale získať nové odrody sa podarilo len v niektorých krajinách južnej Ameriky a Japonsku.

Extrémna rezistencia proti vírusu X zemiaka (PVX) bola detegovaná v divorastúcich druhoch *Solanum acaule*, *Solanum sucrose*, *Solanum vernei* a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Gén extrémnej rezistencie proti PVX pochádzajúci zo *Solanum acaule* –  $R_{x_{acl}}$ , bol využívaný v nemeckom šľachtení, z ktorého pochádza viacero odrôd s extrémnou rezistenciou proti PVX. Na druhej strane, americké, holandské a poľské odrody s extrémnou rezistenciou proti PVX majú gén  $R_{x_{adg}}$ , pochádzajúci zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (SWIEZYNSKI, 1994). Hoci PVX ako taký nie je rozhodujúcim problémom pri pestovaní ľuľka zemiakového, je viacero dôvodov pre štúdium génu rezistencie  $R_x$ . Doterajšie genetické analýzy poukazujú na fakt, že vzájomný vzťah ľuľka zemiakového a PVX sa riadi podľa modelu gén proti génu, a preto poznatky z rezistencie kontrolovanej génom  $R_x$  môžu sa využiť aj pri iných typoch patogénov. Génové manipulácie s rezistenciou kontrolovanou génom  $R_x$  potvrdili, že v obrannej fáze môže potlačiť rozširovanie viacerých vírusov, nielen PVX (KANYUKA et al., 1999). Zefektívnenie získavania nových poznatkov o rezistencii ľuľka zemiakového proti chorobám umožnili najmä dve techniky: redukcia ploidity a molekulové markery. Cieľom tejto práce bolo identifikovať vhodné genetické zdroje s rezistenciou proti PVY a PVX a zhodnotiť prenos tejto vlastnosti do potomstva pomocou molekulových markerov.

### Materiál a metódy

#### a) Rastlinný materiál a mechanická infekcia.

Odrody s extrémnou rezistenciou proti PVX a PVY a náchylné odrody a náchylný kríženec (Agria, Fanal, Forelle, Bobr, Boda, San, Desirée, Impala, Santé, C2264, Viola, White Lady) boli získané z génovej banky VŠÚZ - Výskumného a šľachtiteľského ústavu zemiakárskeho, a.s., Veľká Lomnica. In vitro

rastliny sa vysadili do rašelinového substrátu a v štádiu 4 pravých listov sa infikovali suspenziou s obsahom izolátov PVY alebo PVX podľa metodiky ZADINA, JERMOLJEV (1976). Hodnotili sa vizuálne prejavy primárnych infekcií v týždňových intervaloch, prítomnosť PVY a PVX v rastlinách sa overovala testom ELISA. Rovnakým spôsobom sa postupovalo aj v prípade infikovania semenáčovej populácie San x C2264.

b) *Zdroje infekcie.*

Na infekcie boli použité izoláty vírusov PVY a PVX zo zbierky vírusov VŠÚZ - Výskumného a šľachtiteľského ústavu zemiakárskeho, a.s., Veľká Lomnica.

c) *Detekcia extrémnej rezistencie proti PVY a PVX pomocou molekulových markerov.*

Z uvedeného spektra odrôd sa vyzislovala DNA podľa metodiky ROGERS, BENDICH (1994) a použila na detekciu odrôd s extrémnou rezistenciou proti PVY a PVX. V PCR reakciách sa použili primery podľa BRIGNETI et al. (1997), BRYAN et al. (2002), FLIS et al., (2005), SONG, SCHWARZFISHER (2005) pre  $R_{y_{sto}}$  a KANYUKA et al. (1999) pre  $R_x$ .

Amplifikácia prebiehala v 25  $\mu$ l reakčnej zmesi obsahujúcej 30 ng genomickej DNA, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,3 mM z oboch primerov, 0,625 U Taq DNA polymerázy a alikvotné množstvo reakčného pufru a vody. Reakčné podmienky boli nasledovné: 1 x (94°C, 3 minúty), 40 x (94°C 30 s; annealingová teplota podľa použitého primeru 30 s; 72°C 2 minúty) and 1 x (72°C 5 minút). PCR produkty sa analyzovali v 1,5% agarózovom géli s použitím 1 x TBE pufru a farbili sa ethidium bromidom. Malé PCR produkty sa delili v PAGE géloch s obsahom 6% močoviny a farbili striebrom.

Segregačné pomery medzi rezistentnými a náchylnými odrodami a krížencami sa vyhodnotili  $\chi^2$  testom.

### Výsledky a diskusia

Odrody a kríženc C2264, boli infikované v štádiu štyroch pravých listov, v jednom súbore s inokulom obsahujúcim PVY ako infekčné agens, v druhom súbore s inokulom obsahujúcim PVX a v treťom súbore sa aplikoval len čistý pufer. Vizualne hodnotenie prejavov na novo vyvinutých listoch potvrdilo očakávané rozdelenie do dvoch skupín – na skupinu rezistentných a náchylných genotypov. Testom ELISA s použitím monoklonálnych protilátok sa potvrdila prítomnosť vírusového antigénu v infikovaných rastlinách a výsledky korelovali s vizuálnym hodnotením infekcií rezistentných a náchylných odrôd (tab. 1).

**Tabuľka 1: Detekcia PCR produktov v genotypoch rezistentných a náchylných k PVY a PVX**

Odroda	Krajina pôvodu	Rezistencia proti vírusom	ELISA*		marker*		
			PVY	PVX	STM003	GP122-718	M221
Agria (S)	D	PVX	+	-	-	-	+
Fanal (R)	D	PVX, PVY	-	-	+	+	+
Forelle (R)	D	PVY	-	+	+	+	-
Bobr (R)	PL	PVX, PVY	-	-	+	+	+
Boda (R)	PL	PVX, PVY	-	-	+	+	+
San (R)	PL	PVX, PVY	-	-	+	+	+
Desirée (S)	NL	-	+	+	-	-	-
Impala (S)	NL	-	+	+	-	-	-
Santé (R)	NL	PVX, PVY	-	-	-	-	+
C2264 (S)	SK	-	+	+	-	-	-
Viola (S)	SK	-	+	+	-	-	-
White Lady(R)	H	PVX, PVY	-	-	+	+	+

\* + označuje pozitívny test ELISA/prítomnosť PCR produktu očakávanej veľkosti; - označuje negatívny test ELISA/absencia PCR produktu očakávanej veľkosti

Celé spektrum genotypov bolo testované setom primerov v PCR pre detekciu dominantnej  $R_{y_{sto}}$  resp.  $R_x$  alely. Pre detekciu  $R_{y_{sto}}$  alely sa použilo celkom 12 kombinácií primerov, pričom len kombinácie primerov STM003 a GP122-718 poskytovali produkty PCR reakcií, ktoré korelovali s výsledkami vizuálneho hodnotenia a testu ELISA. Markery pre detekciu genotypov s extrémnou rezistenciou proti PVY založené na  $R_{y_{sto}}$ , ktoré identifikovali BRIGNETI et al. (1997) a BRYAN et al. (2002), sa nezistili v žiadnej z odrôd s extrémnou rezistenciou proti PVY, ktoré sa hodnotili v horeuvedenom súbore. Tieto rozdiely mohli vyplývať z použitia iných genetických zdrojov s extrémnou rezistenciou proti PVY odvodených zo *Solanum stoloniferum*, ako použili FLIS et al. (2005) a SONG, SCHWARZFISHER (2005) a ktoré boli použité aj v tejto práci.

Žiadnym z použitých markerov sa nepodarilo detegovať extrémnu rezistenciu proti PVY v odrode Santé, hoci zdrojom rezistencie bol tiež *Solanum stoloniferum*. Na základe výsledkov získaných pri

použití markerov STM003 a GP122-718 je možné predpokladať, že odroda Santé má pôvod v inom východiskovom materiáli ako ostatné európske odrody s extrémnou rezistenciou proti PVY.

Extrémna rezistencia proti PVX bola introdukovaná do kultúrnych odrôd ľuľka zemiakového zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Celkom 12 kombinácií primerov bolo použitých pri hodnotení extrémnej rezistencie proti PVX, pričom produkty amplifikácie bolo potrebné štiepiť reštrikčnými endonukleázami v šiestich prípadoch. Z hľadiska možnosti využitia v šľachtení ľuľka zemiakového na rezistenciu proti PVX bol najvhodnejší marker M221 a PCR produkt bol prítomný vo všetkých odrodách, ktoré po infekcii PVX zostali bez prítomnosti vírusového antigénu v nových listoch (tab. 1).

Pre hodnotenie prenosu oboch génov rezistencie –  $R_{y_{sto}}$  a  $R_x$  - do potomstva v generácii  $F_1$  sa použila odroda San, ktorá disponuje obomi génmi rezistencie. Druhým genotypom bol kríženec, ktorý je náchylný k obom vírusom. Na základe vizuálneho hodnotenia a testu ELISA celého súboru genotypov  $F_1$  semenáčovej generácie sa potvrdila simplexná konfigurácia dominantných aliel  $R_{y_{sto}}$  a  $R_x$  (tab. 2).

**Tabuľka 2: Segregácia rezistentných a náchylných genotypov po mechanickej infekcii semenáčov vírusmi PVY a PVX**

a) PVY

Kríženie	Skutočný segregáčny pomer		Teoretický segregáčny pomer	hodnota Chí-kvadrát
	Počet rastlín po infekcii			
	rezistentných	náchylných		
San x C2264	58	38	1:1	2,08

b) PVX

Kríženie	Skutočný segregáčny pomer		Teoretický segregáčny pomer	hodnota Chí-kvadrát
	Počet rastlín po infekcii			
	rezistentných	náchylných		
San x C2264	59	37	1:1	2,52

Kritická hodnota chí-kvadrát je 3,84 pre  $P_{0,05}$  a 6,635 pre  $P_{0,01}$

Pre analýzy DNA pomocou molekulových markerov bolo zo skupiny genotypov rezistentných aj náchylných k PVY vybratých po 30 genotypov, ktoré sa použili v PCR s použitím markerov STM003 a GP122-718. Tieto dve skupiny genotypov sa zároveň analyzovali aj pomocou markera M221 pre určenie prítomnosti alely  $R_x$ . Segregačné pomery, určené pomocou molekulových markerov potvrdili simplexnú konfiguráciu oboch dominantných aliel  $R_{y_{sto}}$  a  $R_x$  (tab. 3).

**Tabuľka 3: Segregácia rezistentných a náchylných genotypov k PVY a PVX na základe PCR s použitím špecifických primerov**

a) STM003 – marker pre extrémnu rezistenciu proti PVY

Kríženie	Skutočný segregáčny pomer		Teoretický segregáčny pomer	hodnota Chí-kvadrát
	Počet rastlín po PCR (n)			
	marker prítomný	marker chýbajúci		
San x C2264	28	32	1:1	0,13

b) GP122-718 - marker pre extrémnu rezistenciu proti PVY

Kríženie	Skutočný segregáčny pomer		Teoretický segregáčny pomer	hodnota Chí-kvadrát
	Počet rastlín po PCR (n)			
	marker prítomný	marker chýbajúci		
San x C2264	28	32	1:1	0,13

c) M221 – marker pre extrémnu rezistenciu proti PVX

Kríženie	Skutočný segregáčny pomer		Teoretický segregáčny pomer	hodnota Chí-kvadrát
	Počet rastlín po PCR (n)			
	marker prítomný	marker chýbajúci		
San x C2264	29	31	1:1	0,03

Kritická hodnota chí-kvadrát je 3,84 pre  $P_{0,05}$  a 6,635 pre  $P_{0,01}$

Odroda San, ako jeden z východiskových rodičovských partnerov v krížení, disponuje extrémnou rezistenciou proti PVY pochádzajúcou zo *Solanum stoloniferum* a extrémnou rezistenciou proti PVX, pochádzajúcou zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, pričom oba gény boli lokalizované na chromozóme XII. Pri analýze skupiny len rezistentných genotypov v potomstve generácie  $F_1$  sa identifikovalo 54,5% genotypov s rezistenciou proti PVY a PVX, 24,1% genotypov disponovalo extrémnou rezistenciou proti PVY a 21,2% genotypov bolo rezistentných len k PVX. Selekcia pomocou markerov (MAS), tak ako to bolo realizované pre vírusy PVY a PVX s overenými molekulovými markermi, predstavuje vysoký potenciál pre zefektívnenie šľachtenia nových odrôd ľuľka zemiakového.

V šľachtiteľskom procese sa využívajú genetické zdroje, v ktorých gény rezistencie pochádzajú z rôznych divorastúcich druhov, preto nie je možné univerzálne využívať doteraz identifikované markery.



Extrémna rezistencia proti PVY môže byť introdukovaná zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* a gén – *Ry<sub>adg</sub>* – bol lokalizovaný na chromozóme XI. Marker pre tento gén spoľahlivo identifikoval všetky genotypy, ktoré majú extrémnu rezistenciu odvodenú zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* a s úspechom sa používa vo viacerých šľachtiteľských programoch (RUIZ DE ARCAUTE et al., 2002). Pre detekciu extrémnej rezistencie odvodenej zo *Solanum stoloniferum* bolo publikovaných niekoľko molekulových markerov. BRIGNETI et al. (1997) a BRYAN et al. (2002), lokalizovali *Ry<sub>sto</sub>* na chromozóme XI, FLIS et al. (2005) a SONG, SCHWARZFISHER (2005) na chromozóme XII. Ale ako vyplýva z hore uvedených výsledkov, žiaden z nich nemá univerzálne uplatnenie.

MAS je najčastejšie citovanou a aj používanou aplikáciou PCR technik, pretože významne prispieva k potenciálnemu zefektívneniu novošľachtenia, umožňuje zlepšiť efektívnosť selekcie a to najmä v tých prípadoch, keď sa testy rezistencie vykonávajú na celistvých rastlinách a je potrebné takéto testy vykonávať s použitím viacerých patogénov. Na druhej strane je potrebné zdôrazniť, že sa musí ešte experimentálne zhodnotiť veľké množstvo genetických zdrojov a molekulových markerov, aby mohli tieto metódy významne ovplyvniť šľachtiteľský proces.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a vývoja prostredníctvom finančnej podpory č.APVT-99-027104"

## Literatúra

1. BRIGNETI, G. - GARCIA-MAS, J. – BAULCOMBE, D.C.: Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry<sub>sto</sub>* in potato. In: Theor. Appl. Genet., 94, 1997, s. 198-203.
2. BRYAN, G. J. – MCLEAN, K. – BRADSHAW, J. E. - DE JONG, W. S. – PHILLIPS, M. – CASTELLI, L. – WAUGH, R.: Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globobera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. In: Theor. Appl. Genet., 105, 2002, s. 68-77.
3. GEBHARDT, C. – VALKONEN, J. P. T.: Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. In: Annu. Rev. Phytopathol., 39, 2001, s.79 – 102.
4. FLIS, B. – HENNIG, J. – STRZELCZYK-ZYTA, D. – GEBHARDT, C. – MARCZEWSKI, W.: The *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122<sub>718</sub> in PVY resistant cultivars. In: Molecular Breeding, 15, 2005, s. 95 – 101.
5. KANYUKA, K. – BENDAHMANE, A. – ROUPPE VAN DEN VOORT, J. N. A. M. – VAN DER VOSSEN, E. A. G. – BAULCOMBE, D.C.: Mapping of intra-locus duplications and introgressed DNA: aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the Rx locus in tetraploid potato. In: Theor. Appl. Genet., 98, 1999, s. 679 – 689.
6. ROGERS, S. O. – BENDICH, A. J.: Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: GELVIN, S. B. – SCHILPEROORT, R. A.: Plant Molecular Biology Manual D1. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994, p. D1/1–D1/8. ISBN 0-7923-2858-2
7. RUIZ DE ARCAUTE, R. – ISLA, S. – CARRASCO, A.: New strategies on breeding for PVY resistance. In: 15th EAPR conference papers, Potato today and tomorrow, Hamburg, Vortr. Pflanzzüchtung p.16.
8. SONG, Y-S. – SCHWARZFISHER, A.: Development of *Ry<sub>sto</sub>* marker: mapping of extreme resistance to PVY (*Ry<sub>sto</sub>*) on chromosome XII and site target sequence marker development. In: In: Book of abstract 2<sup>nd</sup> Solanaceae genome workshop 2005, 25-29.9.2005, Ischia, Italy, PS-92.
9. ŚWIEŻYŃSKI, K. M.: Inheritance of Resistance to Viruses. In: Eds: BRADSHAW, J. E. – MACKAY, G. R. Potato Genetics. Wellington: CAB International. ISBN 0 85198 869 5.
10. ZADINA, J. - JERMOLJEV, E.: Šlechtění bramboru. Praha: Academia, 1976, 359s.

✉

✉

VŠÚZ – Výskumný a šľachtiteľský ústav zemiakársky, a.s., Popradská 518, 05952 Veľká Lomnica, e-mail: Ing. J. Heldák, PhD., e-mail: [heldak@sinet.sk](mailto:heldak@sinet.sk); Ing. K. Forišeková, e-mail: [forisek@sinet.sk](mailto:forisek@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.Bezo@uniag.sk](mailto:Milan.Bezo@uniag.sk); Ing. V. Štefánová, e-mail: [Veronika.Stefanova@uniag.sk](mailto:Veronika.Stefanova@uniag.sk).

## VYUŽITÍ TRANSGENOZE VE ŠLECHTĚNÍ HRACHU ODOLNÉHO VŮČI VIRŮM TRANSGENOSIS AS A TOOL IN BREEDING PEA LINES RESISTANT TO VIRAL PATHOGENS

Miroslav GRIGA<sup>1</sup> - Pavel HANÁČEK<sup>2</sup> - Milan NAVRÁTIL<sup>3</sup> - Zuzana PIÁKOVÁ<sup>4</sup> -  
Radovan POKORNÝ<sup>2</sup> - Vilém REINÖHL<sup>2</sup> - Petr SMÝKAL<sup>1</sup> - Dana ŠAFÁŘOVÁ<sup>3</sup> -  
Lenka ŠVÁBOVÁ<sup>1</sup>

*The field screening of occurrence of pea infecting viruses followed by serological tests was done in period 2003-2005 in growing conditions of the Czech Republic. Pea enation mosaic virus (PEMV) and Pea seed mosaic virus (PSbMV) were evaluated as the most spread pathogens. As the creation of resistant lines by conventional methods is problematic, the genetic engineering represents the alternative way to get the virus tolerant/resistant peas.*

*The aim of our work was to obtain transgenic pea plants showing resistance/tolerance to PEMV, and PSbMV by the incorporating of viral coat protein cDNA. The transcription products could induce pathogen-derived resistance (PDR) based on blocking the disassembly of the infecting virus due to the presence of transgenically expressed CP or sense post-transcriptional gene silencing (S-PTGS), where the transcripts are detected as aberrant (ab)RNA and used as templates by an RdRP (RNA dependent RNA polymerase) to form double-stranded (ds)RNA and processed by the posttranscriptional gene silencing mechanism.*

*The set of PEMV and PSbMV isolates collected in five locations in CZ was characterised by biological and molecular (sequencing) tools. The most severe isolates were selected for the development of construct for pea transformation. The full-length CP cDNA was inserted into plasmid pWell105b containing CaMV 35S promoter, uidA reporter gene and bar selectable marker gene and cloned into Agrobacterium tumefaciens strain EHA 105. The function of the vector and expression of transgenes were proved in tobacco transformation scheme, then the pea plants were transformed via cotyledonary-node in vitro technique or „non-tissue culture“ approach. The putative T0 transformants after phosphinotricine selection were transferred ex vitro and leaf samples were analyzed by GUS histochemical tests and PCR analysis. Individual GUS/PCR positive transgenic plants were selected. The expression of inserted transgenes as well as the reaction of transgenic peas (T1-generation) to viral infection are recently under investigation.*

*Key words: pea, coat protein, Pea enation mosaic virus (PEMV), Pea seed mosaic virus (PSbMV), resistance, transformation*

✉

✉

<sup>1</sup> Agritec – Research, Breeding and Services, Ltd., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk

<sup>2</sup> Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno

<sup>3</sup> Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

<sup>4</sup> Research Institute for Fodder Crops, Ltd., Zahradní 1, 664 41 Troubsko

# MIKROBALISTICKÁ TECHNIKA AKO NÁSTROJ PRE RASTLINNÉ BIOTECHNOLÓGIE A ŠTÚDIUM EXPRESIE GÉNOV PARTICLE BOMBARDMENT AS A TOOL IN PLANT BIOTECHNOLOGY AND FOR STUDY OF GENE EXPRESSION

<sup>1</sup>Juraj FARAGÓ – <sup>2</sup>Ludmila OHNOUTKOVÁ

*Particle bombardment technology uses physical processes to deliver exogenous nucleic acids into living cells (microorganisms, insects, mammals and plants). This technique, due to several its advantages, is widely employed in plant science and agricultural biotechnology. Since the late 1980s particle bombardment has become a powerful tool for transient gene expression studies, production of stable genetically transformed plants, inoculation with viral pathogens and plastid transformation.*

*Key words: biolistics, plant science, transient gene expression, transgenic plants, plastid transformation, research tools*

## Úvod

Na začiatku a v polovici 80-tych rokov sa na genetickú transformáciu tých rastlinných druhov, ktoré neboli vnímavé voči transformácii prostredníctvom pôdnej baktérie *Agrobacterium tumefaciens* používala protoplastová metóda. Priamy príjem cudzorodej DNA rastlinnou bunkou bol totiž možný iba vtedy, ak sa táto zbavila celulóznej bunkovej steny. Na dočasnú a krátkodobú permeabilizáciu cytoplazmatickej membrány sa používal polyetylénglykol (PEG), alebo krátkodobé pulzy elektrického prúdu, tzv. elektroporácia.

Veľkou nevýhodou protoplastovej metódy bola a je samotná príprava protoplastov, ktorá je prácna a technicky náročná. Pre úspešnú genetickú transformáciu je tiež potrebné pripraviť vysoko kvalitné protoplasty schopné prijať cudzorodú DNA. Navyše, hoci protoplasty ako prvý kultivoval ešte E.C. Cocking v r. 1960, dodnes je známych len pomerne málo protoplastových systémov, ktoré vedú k regenerácii celistvých rastlín vo vysokom počte. Aj keď k takejto regenerácii dochádza, výsledné regeneranty sú často genotypovo odlišné od donorovej rastliny a fenotypovo nesú morfológické zmeny a majú zníženú fertilitu v dôsledku vysokej nestability genómu na ceste od bunky cez kalus po regenerovanú rastlinu.

Ani ďalšie metódy priameho vnášania cudzorodej DNA do rastlinných buniek, ako napr. mikroinjekčná metóda (CROSSWAY et al., 1986) a metóda využívajúca mikrovláčna karbidu kremičitého (FRAME et al., 1994) sa na stabilnú genetickú transformáciu rastlín z rôznych dôvodov všeobecne neujali.

Na rozdiel od vyššie uvedených metód sa mikrobalistická metóda (angl. *particle bombardment method*) ukázala ako veľmi úspešná a od začiatku 1990-tych rokov sa rýchlo rozšírila medzi biotechnológmi. Mikrobalistická technika prelomila hrádzu neúspechov pri genetickej transformácii tzv. rekalcitrantných rastlinných druhov, medzi ktoré patrili sója, väčšina jednoklíčnolistových rastlín, vrátane obilnín a mnohé dreviny, najmä ihličnany. Z tohto výpočtu je zrejme, že v 80-tych rokoch minulého storočia medzi rekalcitrantné druhy patrila väčšina poľnohospodársky a lesnícky významných plodín.

Mikrobalistická technika (syn. mikrobalistika, biobalistika, mikroprojektilové bombardovanie) je metóda, pomocou ktorej sa mikroskopické častice obalené fragmentmi DNA akcelerujú do cieľových buniek rýchlosťou, ktorá je dostatočná na penetráciu bunkovej steny, ale pod úrovňou, ktorá môže letálne poškodiť bunku. Týmto spôsobom sa môže želaná molekula DNA vnieť do vnútorného priestoru bunky, kde sa táto môže (ale nemusí) integrovať do jadrového genómu, alebo genómu organel.

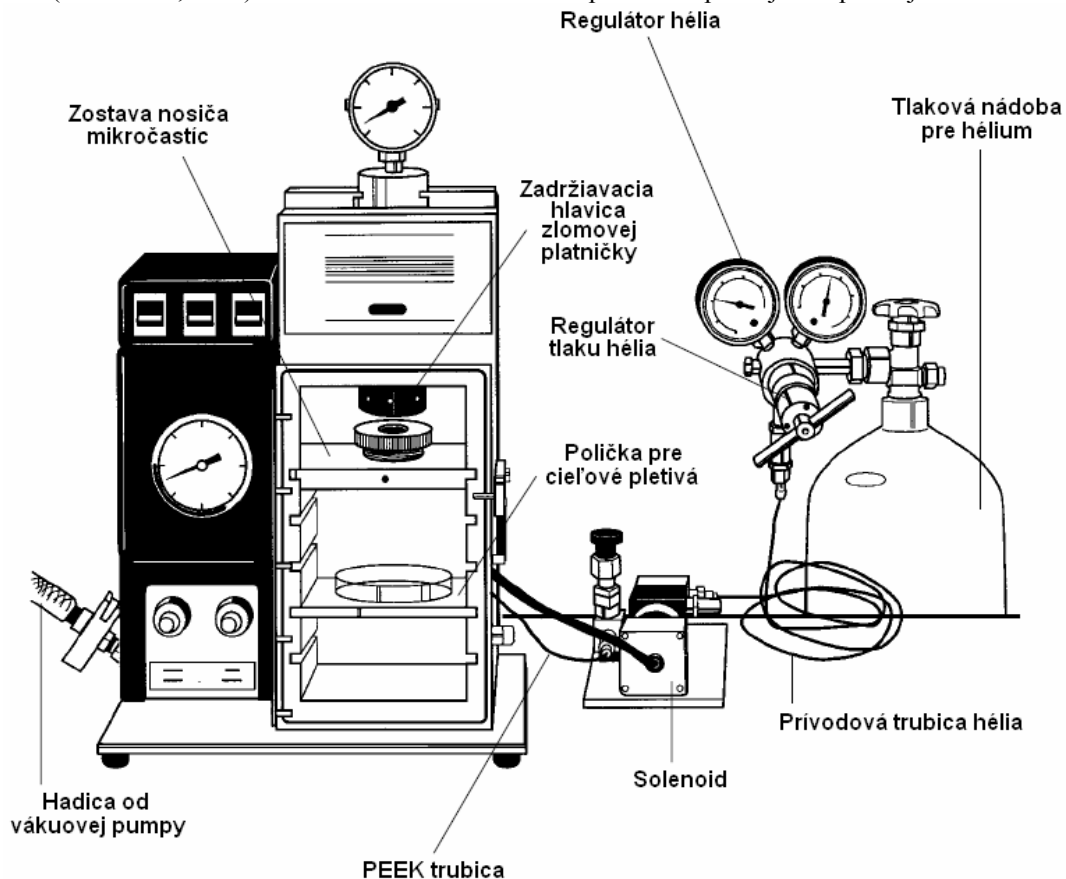
Mikrobalistická technika bola už v prvej polovici 90-tych rokov 20. Storočia použitá na genetickú transformáciu širokej palety organizmov, napr. baktérii (KLEIN et al., 1992), húb (ARMALEO et al., 1990), rias (MAYFIELD & KINDLE, 1990), hmyzích (KLEIN et al., 1992) a cicavčích buniek (CHENG et al., 1993) pre štúdie expresie génov ale aj genóvu terapiu (YANG & SUN, 1995).

## PDS-1000/He a biobalistický systém

Prvý prístroj na mikrobalistické vnášanie cudzorodých molekúl DNA zostrojili Sanford a jeho spolupracovníci (SANFORD et al., 1987; SANFORD, 1988). Hoci bola ich „génová puška“ úspešná, bola čoskoro nahradená mikrobalistickou aparátúrou druhej generácie, ktorá znížila poškodenia buniek častejšie pri použití Sanfordovej „génovej pušky“ a obchádzala používanie pušného prachu tým, že na akceleráciu „mikroprojektilov“ (kovových častíc obalených DNA) používala stlačený inertný plyn, napr. hélium.

Na zrýchlenie mikročastíc používa stlačený plyn, hélium. Ten je kontinuálne privádzaný hadičkovým systémom do hornej časti prístroja, kde je zadržovaný plastickou zlomovou platničkou (angl. *rapture disc*). Zlomová platnička je z kaptónovej membrány a rôzne druhy platničiek sú laminované tak, aby zadržali tlak hélia v rozmedzí od 450 do 2200 psi.

Plazmidová DNA, obsahujúca vnášaný(-é) gén(-y) je pricpitovaná na povrchu kovových mikročastíc (tzv. mikronosiče, či „mikroprojektily“, angl. *microcarrier*) veľkosti od 0,6 - 3,0  $\mu\text{m}$ . používajú sa buď wolfrámové (lacnejšie, ale pre bunku čiastočne toxické) alebo zlaté (drahšie, ale pre bunku inertné) mikročastice. Tieto mikročastice sa rozprestrú na povrch kruhového plastického filmu (tzv. makronosič, angl. *macrocarrier*), ktorý sa ukladá pod zlomovú platničku do zostavy nosiča mikročastíc (angl. *microcarrier launch assembly*) vo vákuovej komore prístroja. Prístroj funguje na tom princípe, že keď tlak hélia presiahne v zadržiavacej komôrke krytickú hodnotu, dochádza k náhlemu prelomeniu zlomovej platničky a generovaná tlaková vlna pohne makronosičom smerom dole, kde v určitej vzdialenosti sa nachádza cieľové „terčové“ pletivo. Makronosič preletí krátku vzdialenosť, kde v spodnej časti zostavy nosiča mikročastíc naráža na kovovú, tzv. zastavovaciu sieťku (angl. *stopping screen*). Po náraze do zastavovacej sieťky sa z makronosiča uvoľňujú mikročastice a pokračujú v lete dole smerom k terčovému pletivu (KIKKERT, 1993) uloženému v Petriho miske na poličke v spodnej časti prístroja.



Obrázok 1: Prístroj BioRad PDS-1000/He pre mikrobalistické vnášanie cudzorodej DNA do buniek rastlín, živočíchov a mikroorganizmov.

## Aplikácie mikrobalistickej techniky

### a) Prechodná expresia génov.

Mikrobalistická metóda ponúka jednoduchý a účinný spôsob pre vnášanie molekúl DNA do rastlinných buniek. Preto sa ako jednou zo štyroch hlavných aplikácií stala experimentálnym prostriedkom na štúdium prechodnej expresie génov a génových konštruktov v rastlinných bunkách, ale aj bunkách iných živých organizmov. Tieto štúdie umožňujú veľmi rýchlo (obyčajne v rozmedzí 24-48 hod.) hodnotiť úroveň expresie vnesených génov. Pre vizualizáciu expresie sa často používajú tzv. reportérové gény ako napr. *uidA* (JEFFERSON et al., 1987), *luc* (MILLAR et al., 1992) alebo v súčasnosti najviac používaný *gfp* (DAVIS & VIERSTRA, 1998). Použitie reportérových génov umožňuje kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie úrovne expresie študovaného génu.

Výhodou je, že prechodná expresia sa vyskytuje takmer okamžite po transfere príslušného génu a nevyžaduje regeneráciu celistvých rastlín. Navyše prechodná expresia sa vyskytuje v oveľa vyšších frekvenciách než stabilná integrácia transgénu.

Štúdium prechodnej expresie génov sa využíva pri analýze mutantných génov, identifikácii kontrolných elementov génov, zisťovaní „sily“ a špecificity promótorov a štúdie vplyvov použitia kodónov a niektorých elementov génov ako intrónov, zavádzacích sekvencií, enhancerov a iných na úroveň expresie študovaného génu. Prechodná expresia po mikroprojektilovom bombardovaní je vhodná aj na prípravu menších množstiev rekombinantných bielkovín určených na testovanie.

Štúdie prechodnej expresie génov často predchádzajú produkcii stabilne transformovaných rastlín, kde sa overuje funkčnosť konštruktu, prípadne sa porovnávajú rôzne expresné vektory.

#### **b) Produkcia stabilne transformovaných rastlín a pletív.**

Hoci v povedomí väčšiny ľudí sú transgénne rastliny spájané hlavne s tzv. geneticky modifikovanými plodinami, ktoré u časti verejnosti vyvolávajú dokonca averziu, v odborných kruhoch je známe, že okrem poľnohospodárskeho využitia sú transgénne rastliny a pletivá veľmi dôležitým laboratórnym nástrojom pre skúmanie regulácie génov, vývoja rastlín, vplyvov biotických a abiotických faktorov na rastliny, mechanizmov obrany rastlín voči nepriaznivým podmienkam a patogénom a komplexných metabolických pochodov v rastlinných bunkách.

Produkcia stabilne geneticky transformovaných rastlín v súčasnosti je možná použitím viacerých metód prostredníctvom biologických vektorov (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*) alebo priamych metód vnášania cudzorodej DNA (napr. mikrobalistická technika, elektroporácia, mikroinjekcia, použitie vlákien karbidu kremičitého ai.). Väčšina stabilne transformovaných rastlín pre biologický výskum a komerčné pestovanie ako transgénne plodiny sa však produkuje iba dvomi metódami a to prostredníctvom *A. tumefaciens* a mikrobalistickou technikou. Pre produkciu stabilne transgénnych rastlín majú obe metódy svoje výhody aj nevýhody, ktoré sú detailne popisované (GELVIN, 2003; ALTPETER et al., 2005).

#### **c) Inokulácia vírusovými patogénmi.**

Schopnosť mikrobalistickej techniky vniesť cudzorodú nukleovú kyselinu do intaktných rastlinných buniek sa využíva aj na inokuláciu celistvých rastlín a bunkových kultúr vírusovou nukleovou kyselinou. Výhodou použitia mikrobalistickej techniky je väčšia kontrola faktorov, ktoré môžu modifikovať výsledky inokulačných experimentov (a viesť tak k „falošným“ výsledkom) a obídenie potreby použitia virifilných populácií hmyzích a iných vektorov na prenos vírusov (BRIDDON et al., 1998).

Mikrobalistická inokulácia rastlín chimérickou vírusovou DNA s fúzovanými vizuálnymi markerovými génmi (najmä *gfp*) umožňuje jedinečným spôsobom študovať replikáciu a pohyb vírusu v rastline, mechanizmy rezistencie rastliny voči vírusom a identifikovať patogénne komponenty vírusov. Mikroprojektilové bombardovanie sa v súčasnosti už rutinne používa na inokuláciu celistvých rastlín a listových pletív vírusmi, ktoré je obtiažne prenášať konvenčne mechanickou inokuláciou. Atraktívnou možnosťou mikrobalistických systémov je možnosť ko-infekcie rôznymi vírusovými kmeňmi, resp. ich genómovými komponentmi pre štúdium mechanizmov patogenicity vírusov a rezistencie hostiteľských rastlín (CHELLAPPAN et al., 2005).

#### **d) Genetická transformácia plastidov.**

Rastlinné bunky obsahujú plastidy, ktoré majú vlastný genóm. Sú ním kruhové dvojitoplávkové molekuly DNA veľkosti približne 120-160 kb. Plastidový genóm kóduje približne 100-120 génov. Na rozdiel od jadrového genómu, ktorý sa u diploidných organizmov nachádza v dvoch „kópiách“, rastlinné bunky obsahujú 50-60 plastidov a v každom plastide môže byť niekoľko desiatok molekúl plastidovej DNA. To umožňuje potenciálne veľmi vysokú, až do 45% celkových rozpustných bielkovín, expresiu transgénu vneseného do plastidového genómu (MALIGA, 2002).

Na rozdiel od jadrového genómu, transformácia plastidov sa nedá uskutočniť prostredníctvom *A. tumefaciens*, pretože T-DNA komplex je smerovaný do jadra.

Podobne ako transformácia plastidov, aj transformácia mitochondrií je možná len prostredníctvom mikrobalistickej techniky, hoci na rozdiel od transplastomických rastlín (s transgénom zabudovaným do chloroplastového genómu), transchondriómové rastliny ešte neboli získané (HAVEY et al., 2002).

### **Mikrobalistická technika versus *Agrobacterium tumefaciens***

Genetická transformácia prostredníctvom *A. tumefaciens* je preferovaná pri druhoch, ktoré sú vnímavé pre infekciu touto pôdnou baktériou. Medzi hostiteľov *A. tumefaciens* však nepatria obilniny, mnoho strukovín a ani ihličnany. Mikrobalistická technika bola pôvodne vyvinutá pre preklopenie problémov s inkompatibilitou medzi pletivami mnohých rastlinných druhov a vektorom *A. tumefaciens*.

Mikrobalistická technika ostáva veľmi atraktívnym nástrojom rastlinného výskumu a poľnohospodárskych biotechnológií z niekoľkých dôvodov. Po prvé, mikrobalistická genetická transformácia je genotypovo nezávislá, lebo využíva fyzikálne prostriedky na vnášanie cudzorodých génov do rastlinných buniek, navyše nie je závislá od vnímavosti hostiteľa. Po druhé, pomocou mikroprojektilového bombardovania je možné vnášať cudzorodú DNA do akýchkoľvek súborov buniek, či pletív rastlín, bez ohľadu na organizáciu pletiva a jeho diferenciáciu. Po tretie, možnosť cieľne nastreľovať mikročastice do organizovaných štruktúr, jeho meristémov, potenciálne umožňuje obísť *in vitro* kultúru a tak obmedziť potenciálny výskyt somaklonálnej variability. Po štvrté, mikrobalistická technika umožňuje ko-transformáciu 2 a viac transgénov súčasne, t.j. potenciálne je možné modifikovať komplexnejšie vlastnosti, resp. celé biosyntetické dráhy. A po piate, mikrobalistická technika umožňuje vnášať cudzorodé gény okrem jadra aj do ostatných genómov rastliny, t.j. plastidov a mitochondrií, čo

dáva potenciál vývoja rastlinných expresných systémov pre lacnú a „veľkokapacitnú“ produkciu rekombinantných bielkovín s biologickou aktivitou a fytofarmakologickým využitím.

## Literatúra

1. ALTPETER, F. – BAISAKH, N. – BEACHY, R. – BOCK, R. – CAPELL, T. – CHRISTOU, P. – DANIELL, H. – DATTA, K. – DATTA, S. – DIX, P.J. – FAUQUET, C. – HUANG, N. – KOHLI, A. – MOOIBROEK, H. – NICHOLSON, L. – NGUYEN, T.T. – NUGENT, G. – RAEMAKERS, K. – ROMANO, A. – SOMERS, D.A. – STOGER, E. – TAYLOR, N. – VISSER, R.: Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: námyths and realities. In: Mol. Breed., 15, 2005, s. 305-327.
2. ARMALEO, D. – YE, G.N. – KLEIN, T. – SHARK, K. – SANFORD, J. – JOHNSTON, S.: Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. In: Curr. Genet., 17, 1990, s. 97-103.
3. BRIDDON, R. – LIU, S. – PINNER, M. – MARKHAM, P.: Infectivity of *African cassava mosaic virus* by biolistic inoculation. In: Arch. Virol., 143, 1998, s. 2487-2492.
4. CROSSWAY, A. – OAKES, J.V. – IRVINE, J.M. – WARD, B. – KNAUF, V.C. – SHEWMAKER, C.K.: Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. In: Mol. Gen. Genet., 202, 1986, s. 179-185.
5. DAVIS, S. – VIERSTRA, R.: Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. In: Plant Mol. Biol., 36, 1998, s. 521-528.
6. FRAME, B.R. – DRAYTON, P.R. – BAGNALL, S.V. – LEWNAU, C.J. – BULLOCK, W.P. – WILSON, H.M. – DUNWELL, J.M. – THOMPSON, J.A. – WANG, K.: Production of fertile transgenic maize plants by silicon-carbide whisker-mediated transformation. In: Plant J., 6, 1994, s. 941-948.
7. GELVIN, S.B.: *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the „gene-jockeying“ tool. In: Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67, 2003, 16-37.
8. HAVEY, M.J. – LILLY, J.W. – BOHANEK, B. – BARTOSEWSKI, G. – MALEPSZY, S.: Cucumber: a model angiosperm for mitochondrial transformation? In: J. Appl. Genet., 43, 2002, s. 1-17.
9. CHELLAPPAN, P. – MASONA, M.V. – VANITHARANI, R. – TAYLOR, N.J. – FAUQUET, C.M.: Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. In: Plant Mol. Biol., 56, 2004, s. 601-611.
10. CHENG, L. – ZIEGELHOFFER, P. – YANG, N.S.: In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, s. 4455-4459.
11. JEFFERSON, R. – KAVANAGH, T. – BEVAN, M.: GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. In: EMBO J., 6, 1987, s. 3901-3907.
12. KIKKERT, J.: The Biolistic PDS-1000/He device. In: Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33, 1993, s. 221-226.
13. KLEIN, T. – ARENTZEN, R. – LEWIS, P. – FITZPATRICK-McELLIGOTT, S.: Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. In: Bio/Technology, 10, 1992, 286-291.
14. MALIGA, P.: Engineering the plastid genome of higher plants. In: Curr. Op. Plant Biol., 5, 2002, s. 164-172.
15. MAYFIELD, S. – KINDLE, K.: Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1990, s. 2087-2091.
16. MILLAR, A. – SHORT, S. – HIRATSUKA, K. – CHUA, N. – KAY, S.: Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. In: Plant. Mol. Biol. Rep., 10, 1992, s. 324-327.
17. SANFORD, J.: The biolistic process. In: Trends Biotech., 6, 1988, s. 299-302.
18. SANFORD, J. – KLEIN, T. – WOLF, E. – ALLEN, N.: Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. In: J. Part. Sci. Tech., 5, 1987, s. 27-37.
19. YANG, N.S. – SUN, W. : Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. In: Nat. Med., 1, 1995, s. 481-483.

✉

✉

<sup>1</sup>RNDr. Juraj Faragó, CSc., Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav rastlinnej výroby v Piešťanoch, Odd. poľnohospodárskych biotechnológií, 921 01 Piešťany, e-mail: [farago@vury.sk](mailto:farago@vury.sk)

<sup>2</sup>Ing. Ludmila Ohnoutková, PhD., Ústav experimentálnej botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc, Česká republika

## VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH METOD PŘI ŠLECHTĚNÍ CHMELE (*HUMULUS LUPULUS* L.) NA REZISTENCI K HOUBOVÝM PATOGENŮM UTILIZATION OF MOLECULAR METHODS IN HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.) BREEDING FOR RESISTANCE TO FUNGAL DISEASES

Josef PATZAK - Vladimír NESVADBA

*Hop (Humulus lupulus L.) is a dioecious perennial climbing plant without tendrils, bines twining round support in a clockwise direction, cultivated for female inflorescences. Hop downy mildew (Pseudoperonospora humuli) and hop powdery mildew (Podosphaera macularis) are the most important fungal plant diseases of hop. Resistance breeding is the best chance to eliminate economical losses. Hop breeding is very time-consuming. The use of molecular methods is very effective tool for breeders. Recently, it has been also researched, that majority of R genes contain exact conserve regions, multiple distributed in plant genomes. They are mainly nucleotide binding site (NBS) and leucine-rich repeat (LRR), also Toll/interleukin receptor (TIR) and leucine zip (LZ) in some cases. These motifs can be used directly for searching of resistance genes and their homologues (Yu et al., 1996) or associated regions (Hayes and Saghai Maroof, 2000). In this work, we use this method for the detection of close sequences to resistance genes against fungal diseases. In our experiments, we found four amplified polymorphic PCR products, which partially correlated with hop resistance to fungal disease. These sequences can be transferred to marker-assisted selection (MAS) in the future.*

*Keywords: breeding; hop (Humulus lupulus L.); resistance to fungal diseases; molecular methods; resistance gene analog (RGA); AFLP; marker-assisted selection (MAS).*

### Úvod

Chmel (*Humulus lupulus* L.) je dvoudomá, dlouhodobní, mnohaletá bylina, s každoročním odumíráním nadzemní části, s dvouvrstevnými pěti- až sedmilaločnatými listy, s pnoucí se pravotočivou lodyhou bez úponek, dorůstající délky až 9 m v (NEVE, 1991). Patří svou rozlohou, 80 tisíc hektarů ve světovém měřítku, k minoritním hospodářským plodinám, přesto patří k plodinám s dlouholetou pěstitelskou minulostí. Jeho pěstování v České republice má nejméně tisíciletou historii a vždy znamenalo vysoký ekonomický podíl na celkovém hospodářství státu. V současné době je chmel pěstován přibližně na 6 tisících hektarech, což nás řadí na třetí místo, společně s Čínou, za USA a SRN. Hospodářským produktem chmele jsou samičí květenství (hlávky), jež obsahují rozsáhlou škálu organických sloučenin, využitelných ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, ale především v pivovarnictví.

Stejně tak jako ostatní plodiny i chmel je pod infekčním tlakem patogenních organismů, které mohou způsobit výrazné ztráty hospodářského výnosu. Mezi nejzávažnější patří houbové patogeny perenospora chmelová (*Pseudoperonospora humuli*) a padlí chmelové (*Podosphaera macularis*). *Pseudoperonospora humuli* napadá mladé stonky, listy, květy i hlávky, v jarním období tvoří tzv. „klasové výhony“. Dalšími symptomy jsou hranaté černé skvrny na listech a hnědé diskolorizace hlávek. Oospory se tvoří na infikovaných stoncích a hlávkách (NEVE, 1991). *Podosphaera macularis* infikuje listy a hlávky, tvoří hrboly, puchýřky, bledé skvrny, distorze hlávek a bílé povlaky. Asexuální konidie se tvoří na povrchovém myceliu (SEIGNER et al., 2001). V naší laboratoři se podařilo vypracovat detekční a diagnostickou metodu molekulární analýzy interních transkribovaných mezerníků (ITS) rDNA regionu (PATZAK, 2005).

Jednou z nejlepších možností jak vzdorovat zvýšenému výskytu houbových patogenů je využití rezistentních rostlinných materiálů. Základem pro získání takovýchto materiálů je šlechtění chmele na rezistenci k houbovým chorobám. Předpokladem pro úspěšný šlechtitelský proces jsou genové zdroje. Na základě nejnovějších poznatků bylo též zjištěno, že mechanismus rezistence a architektura jednotlivých genů rezistence rostlin k různým patogenům jsou velice podobné (TAKKEN a 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 a 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). 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 a využity kombinaci konzervovaných sekvencí analogů genů rezistence (RGA) a AFLP k hledání asociovaných oblastí genů rezistence a jejich homologů podle HAYES a SAGHAI MAROOF (2000). Z nalezených molekulárně-

genetických markerů bude v budoucnu vypracován systém selekce podle genetických markerů (MAS), jež výrazně zefektivní šlechtitelský proces.

## Materiál a metody

### *Výchozí materiál a DNA izolace*

Výchozím materiálem byly samičí rostliny rezistentních kultivarů Nugget, Target, Serebjanka, Zenith a Challenger a samičí rostliny 99/1, 99/11, 99/16, 01/2, 01/3 a 01/9 z genetických zdrojů Chmelařského institutu s.r.o. v Žatci. Pro experimenty byla provedena modelová křížení a jejich populace, byla hodnocena na rezistenci k houbovým chorobám v polních podmínkách. DNA byla izolována z mladých listů podle SAGHAI-MAROOF et al. (1984) modifikované pro chmel PATZAKEM (2001).

### *Molekulární analýza*

Molekulárně genetická analýza byla prováděna na DNA vzorcích podle HAYES and SAGHAI MAROOF (2000). Šest PCR primerů, odvozených podle konzervovaných úseků RGA, bylo použito v kombinaci s AFLP metodou (ZABEAU a VOS, 1993). Genomová DNA byla rozštěpena restričními endonukleázami *TaqI* a *ApaI* nebo *EcoRI* a *MseI*. AFLP adaptory byly ligovány na rozštěpené fragmenty. Celkem bylo použito třicetšest různých kombinací primerů v PCR reakcích. Taq PCR master mix kit (Qiagen, FRG) byl použit v PCR dle firemního protokolu. PCR amplifikace probíhaly v Genius thermocykleru (Techne, UK). Po 3 min denuraci při 95°C, následovalo 35 cyklů amplifikace (94°C 30s, 54°C 60s, 72°C 90s) s následnou 10 min elongací při 72°C. Sekvenční vertikální polyakrylamidová (5% gel, 8M urea) elektroforéza byla použita pro separaci PCR produktů při 45W. Polyakrylamidové gely byly barveny stříbrem podle protokolu firmy Promega (USA). Obarvené gely byly sušeny a přefoceny na pozitivní fotografický papír (Promega, USA).

## Výsledky a diskuze

V našich experimentech byla provedena detekce polymorfismu DNA na základě segreganční analýzy F1 populací (BSA - bulk segregant analysis) realizovaných křížení rezistentních genotypů se senzitivními genotypy chmele. Rostliny byly hodnoceny v polních podmínkách na míru rezistence a rozděleny do dvou skupin na rezistentní a senzitivní, DNA byla vyizolována ze souhrnného vzorku všech jedinců populace. V molekulární analýze RGA-AFLP byly použity dvě dvojice restričních endonukleáz *ApaI* + *TaqI* a *EcoRI* + *MseI*. Pro první dvojici bylo v PCR reakcích využito celkem 24 různých primerových kombinací. Zjištěný polymorfismus amplifikovaných produktů reakcí nebyl vysoký, když většinou šlo o „single“ genotypové odlišnosti. U dvou kombinací, RGA3+T-ACC a RGA5+ A-AC, byly nalezeny produkty částečně korelující s rezistencí k padlí chmelovému. Oba fragmenty byly sekvenovány a pomocí BLAST analýzy nebyla zjištěna žádná homologie s již známou sekvencí v genové bance. Získané sekvence byly použity k přípravě vhodných specifických primerů. Pomocí PCR byla otestována jejich prevalence v různých genotypech chmele a možnost použití k markerování rezistence. Bohužel docházelo k amplifikaci ve všech použitých genotypech a nebyla tak potvrzena specifita těchto fragmentů. U druhé dvojice restričních endonukleáz bylo celkem vyzkoušeno 16 různých primerových kombinací v PCR reakcích. Zjištěný polymorfismus amplifikovaných produktů reakcí byl u některých kombinací vysoký s vysokým počtem amplifikovaných produktů, na rozdíl od předchozí dvojice restriktáz. Bohužel většinou šlo opět o „single“ genotypové odlišnosti. U kombinace RGA3+M-CTC byly nalezeny produkty částečně korelující s rezistencí k padlí chmelovému (obr. 1). Na obrázku je patrné, že u jednoho z markerů jde zřejmě o sekvenční polymorfismus jedné sekvence, když dochází k posunu o jednu bázi mezi genotypy rezistentních a citlivých rostlin. Právě takovéto sekvence, tzv. SNP (Single Nucleotide Polymorphism), jsou v dnešní době jedním z nejpřesnějších markerovacích systémů funkčnosti jednotlivých alel genu. Tyto fragmenty bude nutné ještě sekvenčně charakterizovat.

## Závěr

Podařilo se nám pomocí molekulárních metod nalézt polymorfismní amplifikované PCR produkty částečně korelující s rezistencí k houbovým chorobám chmele. Z nalezených molekulárně-genetických markerů bude možné v budoucnu vypracovat systém selekce podle genetických markerů (MAS) pro zefektivnění šlechtitelského procesu.

## Poděkování

Tato práce byla podporována MŠMT ČR ve výzkumném záměru MSM1486434701 a MZe ČR v dotačních titulech na šlechtění a genetické zdroje.

## Literatura

1. HAYES, A.J. - SAGHAI MAROOF, M.A., (2000): Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 1279-1283.



2. NEVE, R.A. (1991): Hops. Chapman and Hall, London.
3. PAN, Q. - WENDEL, J. - FLUHR, R., (2000): Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.* 50: 203-213.
4. PATZAK, J. (2001): Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121: 9-18.
5. PATZAK, J. (2005): PCR detection of *Pseudoperonospora humuli* and *Podosphaera macularis* in *Humulus lupulus*. *Plant. Protect. Sci.* 41: 141-149.
6. SEIGNER, E. - SEEFELDER, S. - HAUGG, B. - HESSE, H. - RÖSCH, H. - FELSENSTEIN, F., (2001): Investigations on the virulence spectrum of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*). *Proceedings of Scientific Commission of IHGC, Canterbury, Kent, England, 5-7.8., 33-37.*
7. TAKKEN, F.L.W - JOOSTEN, M.H.A.J., (2000): Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Pl. Pathol.* 106: 699-713.
8. YOUNG, N.D., (2000): The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 285-290.
9. YU, Y.G. - BUSS, G.R. - SAGHAI MAROOF, M.A.(1996): Isolation of superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of National Academy of Science USA* 93: 11751-11756.
10. ZABEAU, M. -VOS, P., (1993): Selective restriction fragment amplification. A general method for DNA fingerprinting. European patent application no. 924026297. Publication no. 0534858.

**Obrázek 1:** Analýza amplifikovaných NBS-AFLP produktů reakce primerů RGA3+M-CTC v 5% polyakrylamidovém denaturačním (8M močovina) gelu. Označení vzorků: R - rezistentní a S - citlivé rodiče a souhrnné vzorky ze segregáční analýzy (BSA) jejich F1 populace. Korelující polymorfní produkty označeny šipkou.



✉

✉

Ing. Josef Patzak, PhD., Ing. Vladimír Nesvadba PhD.  
Chmelařský Institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, Česká republika.  
Tel: +420 415732109, Fax: +420 415732150, E-mail: j.patzak@telecom.cz  
Tel: +420 415732144, Fax: +420 415732150, E-mail: v.nesvadba@telecom.cz

## ADAPTABILITA ODRÔD JAČMEŇA JARNÉHO NA PESTOVATEĽSKÉ PODMIENKY PROSTREDIA ADAPTABILITY OF SPRING BARLEY ON CROPPING CONDITION

Eva CANDRÁKOVÁ

*The field trials of spring barley varieties Nitran, Ezer, Poprad was conducted during 2005 -2006 on sugar beet growing region. The influence of nitrogen fertilization (LAV, DAM 390) used during vegetation period of spring barley on technological and qualitative parameters of grain was evaluated. The year condition and fertilization significantly influenced the yield of grain. The yield of grain was higher up to 34 % in the year 2005 with comparison to 2006. No significant differences between evaluated varieties have been noted. The Slovak standard of technological quality: volume weight, share of grain on the sieve 2.5 mm, TKW) have been reach in variety Ezer and Poprad. The variety Nitran has favourable content of protein and extract.*

*Key words: spring barley, yield, variety, fertilization, quality*

### Úvod

Jačmeň jarný je na Slovensku významnou obilninou. Približne 20-25 % produkcie zrna sa využíva na výrobu sladu, ktorý je základnou surovinou pri výrobe piva, veľmi obľúbeného nápoja. Výťažky z jačmenného sladu sa využívajú na rôzne farmaceutické výrobky, pretože sú zdrojom vitamínov skupiny B, minerálnych látok (najmä železa) a bielkovín. Z naklíčeného zrna jačmeňa sa získavajú enzýmy (peptidázy). Na potravinárske účely sa využívajú jačmenné krúpy a v menej rozvinutých krajinách aj jačmenná múka. V ostatných rokoch sa pestovateľské plochy jačmeňa jarného na Slovensku pohybujú od 185 do 220 tisíc ha s priemernou úrodou od 3,00 do 4,00 t.ha<sup>-1</sup> (4,13 t.ha<sup>-1</sup> v roku 2004).

### Materiál a metódy

Pokus bol založený v repárskej výrobnjej oblasti, na Vysokoškolskom poľnohospodárskom podniku závod Oponice, v rokoch 2005 a 2006. Nadmorská výška lokality je 168 m n. m., s úhrnom zrážok za rok 607 mm, priemernou ročnou teplotou vzduchu 9,5 °C. Pôdny typ je hnedozem na spraši, pôdny druh stredne ťažká, hlinitá pôda.

Maloparcelkové polyfaktorové pokusy boli založené blokovou metódou s náhodným usporiadaním pokusných členov v 3 opakovaníach po predplodine repe cukrovej hnojenej maštalným hnojom v dávke 35 t.ha<sup>-1</sup> bez zaorania pozberových zvyškov. Orba bola urobená do hĺbky 220 až 250 mm. Na jarnú prípravu pôdy bol použitý smyk a kompaktor. Veľkosť parceliek bola 14 m<sup>2</sup>. Vysiate boli odrody Nitran, Ezer a Poprad s výsevkom 4,5 mil. klíčivých zŕn na ha sejačkou Pneusej do hĺbky 40 mm pri medziriadkovej vzdialenosti 125 mm. Z vyláteného zrna boli odobraté vzorky na zisťovanie technologických a kvalitatívnych ukazovateľov.

*Variety hnojenia:*

1. nehnojená kontrola,
2. dávka dusíka 20 kg.ha<sup>-1</sup> (liadok amónny s vápencom) na začiatku odnožovania,
3. dávka dusíka na hektár vypočítaná na predpokladanú úrodu 7 t (liadok amónny s vápencom) na začiatku odnožovania,
4. dávka dusíka 20 kg.ha<sup>-1</sup> (DAM 390) na konci odnožovania.

Pri hnojení variantov sme vychádzali z agrochemického rozboru pôdy, ktorý bol robený zo vzoriek pôdy odobraných pred sejbou a na začiatku odnožovania z hĺbky 0,30 a 0,60 m. Nakoľko zásoba fosforu a draslíka bola dostatočná, hnojenie týmito živinami sme nerobili.

Na 1 tonu úrody zrna a príslušného množstva slamy jačmeňa jarného sme počítali s potrebou dusíka 24 kg.ha<sup>-1</sup>.

*Charakteristika odrôd:*

Odrody Nitran, Ezer a Poprad pochádzajú z domáceho šľachtenia (Sládkovičovo). Sú zaradené medzi odrody so sladovníckou kvalitou.

Odroda Nitran je stredne skorá odroda. Odroda Ezer stredne neskorá. Sú stredne vysokého vzrastu s dobrou odolnosťou proti poliehaniu. Odroda Poprad je skorá, nízkeho typu, s dobrou odolnosťou proti poliehaniu.

Zdravotný stav majú odrody dobrý. Odolnosť proti múčnatke trávovej, rynchospóriovej škvrnitosti a hrdzi jačmennej je dobrá. Citlivé sú na hnedú škvrnitosť. V podmienkach silnejšieho výskytu hnejšej škvrnitosti kladne reagujú na použitie fungicídov.

Vhodné sú na pestovanie do všetkých výrobných oblastí.

Odporúčaný výsevok je medzi 3,5 až 4,5 mil. klíčivých zŕn na hektár, podľa výrobných oblastí. Hnojenie dusíkom sa odporúča do 40 kg.ha<sup>-1</sup>, po obilninách a v horších pôdno klimatických podmienkach do 60 kg.ha<sup>-1</sup>.

## Výsledky a diskusia

V Listine registrovaných odrôd v SR je zapísaných 30 odrôd jačmeňa jarného, z ktorých 43 % je so sladovníckou akosťou A a 40 % so sladovníckou akosťou B. Pre konkrétnu pestovateľskú lokalitu je potrebné odrody otestovať. V pokuse sme porovnávali tri odrody z domáceho šľachtenia Nitran, Ezer a najnovšiu odrodu Poprad. Okrem adaptability na prostredie, dôležitú úlohu zohrávajú intenzifikačné faktory. Pre kvalitu zrna jačmeňa jarného, využívaného na sladovnícke účely, je základom hnojenie. Najproblematickejším prvkom je množstvo a termín aplikácie dusíka.

Podľa autorov (BIZÍK, MALÁ, 2001) úspešnosť hospodárenia na pôde závisí od mnohých faktorov, medzi ktorými významné miesto má úroveň výživy rastlín. Živiny z pôdnej zásoby a hnojív formujú výšku a kvalitu produkcie a ich sústavná úhrada sa podstatne podieľa na stabilizovaní vyšších úrod.

Jačmeň jarný citlivo reaguje na všetky pestovateľské zásahy. Citlivosť na výživu a hnojenie spočíva v tom, že jačmeň jarný má menej vyvinutú a plytšiu sa nachádzajúci koreňový systém a krátke obdobie výživy, počas ktorého musí prijať pomerne veľké množstvo živín (KUBINEC, KOVÁČ, 1998; LOŽEK, 2001).

V pokuse sme sa zamerali na aplikáciu dusíkatých hnojív počas vegetačného obdobia a ich vplyvu na úrodu a kvalitu zrna. Pri úrode zrna bol zaznamenaný štatisticky preukazný vplyv hnojenia a ročníka (tab. 2). Medzi variantmi hnojenia boli rozdiely nepreukazné. Znaky technologickej kvality zrna jačmeňa boli vyhodnotené korelačnou analýzou. Priama korelačná závislosť bola zistená medzi úrodou a HTZ, ročníku a odrode. Nepriama korelačná závislosť bola zaznamenaná pri objemovej hmotnosti a podiely zrna nad sitom 2,5 mm. Hnojenie pozitívne ovplyvnilo HTZ a podiel zrna nad sitom 2,8 mm.

KRAUSKO a i., (1980), v pokusoch so stupňovanými dávkami dusíka nezaznamenali zvyšovanie objemovej hmotnosti a HTZ. Vyššie dávky pôsobili negatívne na podiel zrna nad sitom 2,5 mm a na obsah bielkovín v zrne jačmeňa, čo sa v našom pokuse neprejavilo.

ZIMOLKA et al. (2006), odporúča v repárskej výrobní oblasti po hnojenej predplodine repe cukrovej používať dusík v množstve 30 kg.ha<sup>-1</sup>. Prihnojenie tekutými hnojivami počas vegetácie má podľa neho význam tam, kde nie je vyvážený pomer medzi prístupnými živinami. V našom pokuse sa neprejavili rozdiely na úrode a kvalite medzi použitými formami dusíkatých hnojív (LAV, DAM 390).

FECENKO, LOŽEK (2000) odporúčajú použiť celú dávku dusíka pred sejbou a v prípade hnojenia počas vegetácie vo fáze 3 – 4 listov. My sme aplikovali hnojivá do konca odnožovania a nebol zaznamenaný negatívny vplyv na kvalitu zrna jačmeňa jarného.

Kvalitu jačmeňa jarného v značnej miere ovplyvňujú agroekologické faktory. Pozornosť treba venovať výberu vhodného typu pôdy, príprave na sejbu, aplikácii hnojív, zaradeniu do osevného postupu, skorého výsevu vhodnej odrody, termínu zberu a jeho spôsobu, a napokon aj optimálnemu skladovaniu (PECHOVÁ, 2000).

Obsah bielkovín a extraktu bol najpriaznivejší v roku 2005 pri odrode Nitran. Pri odrodách Ezer a Poprad bol obsah bielkovín tesne nad normovanými požiadavkami (tab. 1).

**Tabuľka 1: Technologické a kvalitatívne ukazovatele zrna vybraných odrôd jačmeňa jarného v roku 2005 a 2006**

Vybrané ukazovatele kvality	Odrody					
	Nitran		Ezer		Poprad	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006
Podiel zrna nad sitom 2,8 mm (%)	79,27	63,12	93,08	89,32	89,82	86,36
Podiel zrna nad sitom 2,5 mm (%)	16,91	29,70	5,52	8,55	7,64	9,98
Objemová hmotnosť (g.l <sup>-1</sup> )	635,16	662,48	657,31	679,90	676,92	689,89
HTZ (g)	48,00	47,67	51,23	47,95	48,35	44,90
Bielkoviny (%)	10,78	-	11,35	-	11,30	-
Extrakt (%)	82,70	-	82,50	-	82,40	-

**Tabuľka 2: Vplyv skúmaných faktorov na úrodu zrna jačmeňa jarného (viacfaktorová analýza rozptylu)**

Zdroj variability	f	Úroda	
		P 0,05	P 0,01
Rok: 2005 2006	1	7,88 b 5,19 a	7,88 b 5,19 a
Odroda: Nitran Ezer Poprad	2	6,22 a 6,70 a 6,68 a	6,22 a 6,70 a 6,68 a
Hnojenie: 1 2 3 4	3	5,54 a 6,59 b 7,07 b 6,94 b	5,54 a 6,59 b 7,07 b 6,94 b

P 0,05 rok = 0,346, odroda = 0,510, hnojenie = 0,649  
P 0,01 rok = 0,463, odroda = 0,648, hnojenie = 0,804

### Záver

Pestovateľské ročníky 2004 a 2005 boli z hľadiska poveternostných podmienok charakterizované ako normálne, avšak v priebehu vegetačného obdobia boli jednotlivé mesiace vlhkostne nevyrovnané. Ročník sa na úrode zrna jačmeňa jarného prejavil štatisticky preukazne. Priemerné úrody zrna pestovaných odrôd v roku 2005 boli vyššie o 34 % ( $7,88 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) ako v roku 2006 ( $5,19 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ ).

Medzi variantmi hnojenia a použitými formami hnojív neboli zaznamenané štatisticky preukazné rozdiely, ale úroda zrna jačmeňa jarného bola ovplyvnená pozitívne.

Medzi úrodou, ročníkom, odrudou a hnojením a HTZ bola priama korelačná závislosť. HTZ bola nižšia v roku 2006 v priemere o 2,35 g ( $46,84 \text{ g}$ ). Nepriama korelačná závislosť bola zaznamenaná pri objemovej hmotnosti zrna.

Aplikácia dusíkatých hnojív v priebehu vegetačného obdobia do konca odnožovania nemala negatívny vplyv na úrodu a kvalitu zrna jačmeňa jarného.

### Literatúra

1. BIZÍK, J.: Možnosti racionálnejšieho využitia hnojovice v rastlinnej výrobe. In: *Výživa rastlín tekutými organickými hnojivami a technika ich regulácie*, Nitra : SPU, 2002, s. 5-33.
2. BIZÍK, J. – MALÁ, Š.: Nutnosť racionálnejšieho využitia tekutých organických hnojív. In: *Zborník prednášok z odborného seminára O výžive rastlín tekutými organickými hnojivami a technike na ich aplikáciu, a využitia možnosti financovania z Európskych fondov*, Aplitec, s.r.o. Záhorská Ves, 2004, s. 3.
3. FECENKO, J. – LOŽEK, O.: Výživa a hnojenie poľných plodín. Nitra : SPU, 2000, 452 s. ISBN 80-7137-777-5
4. KUBINEC, S. – KOVÁČ, K. a kol.: Progresívne technológie pestovania jačmeňa jarného. Piešťany : VÚRV, 1998, 82 s.
5. KRAUSKO, A. a i.: Jarný jačmeň. *Príroda*, 1980, 136 s.
6. LOŽEK, O.: Optimálne hnojenie je ekonomické aj ekologické. In: *Agrochémia* 1, 41, 2001, s. 11-16.
7. PECHOVÁ, B.: Možnosti ovplyvňovania kvality jarného jačmeňa. In: *Agrochémia*, 40, 2000, s. 7-10.
8. ZIMOLKA, J. a kol.: Ječmen- formy a úžitkové smery v Českej republike. Praha, 2006, 199 s. ISBN 80-86726-18-5.

✉

✉

Ing. Eva Candráková, PhD., SPU v Nitre, Katedra rastlinnej výroby, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

## VPLYV GENETICKY MODIFIKOVANÝCH RASTLÍN LUCERNY NA BAKTERIÁLNU RIZOSFÉRU EFFECT OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS OF ALFALFA ON BACTERIAL RHIZOSPHERE

Natália FARAGOVÁ – Juraj FARAGÓ

*In a laboratory experiment we compared abundance of culture groups of aerobic bacteria in the rhizosphere of 14 genotypes of genetically modified alfalfa containing the Ov gene coding for ovalbumine from the japanese quail, 5 genotypes containing the AIMVcp gene for the capsid protein of AIMV and 5 genotypes containing the marker gene gus. Plants were grown in sterile and non-sterile substrate. Abundance of aerobic bacteria from the rhizosphere of transgenic plants was compared with that of donor isogenic non-transgenic line and randomly chosen genotypes of the cultivar Lucia. Comparing the abundance of bacterial colonies isolated from soil samples from the rhizosphere of transgenic and non-transgenic lines of alfalfa, we only observed statistically significant differences between transgenic lines containing Ov gene, namely in total numbers of colony-forming microorganisms and between transgenic lines containing the AIMVcp gene in total numbers of cellulolytic bacteria.*

*Key words:* GMO, *Medicago sativa*, rizosféra

### Úvod

Rozvoj poľnohospodárskych biotechnológií a techník genetického inžinierstva viedlo v posledných 10 rokoch k tvorbe nových transgénnych plodín s vysokými úrodami a vylepšenými takými vlastnosťami ako sú rezistencia k hmyzím škodcom a fytopatogénom, odolnosťou k herbicidom a zvýšenou schopnosťou odolávať environmentálnym stresom. Táto nová technológia má enormný potenciál ponúknuť ekonomické a agronomické výhody, ale na duhej strane ostáva v mnohých krajinách kontroverzná v dôsledku obáv pred potenciálnymi škodlivými vplyvmi geneticky modifikovaných rastlín na ľudské zdravie a životné prostredie (WOLFENBARGER a PHIFER, 2000). Medzi hlavné obavy patria možnosť vytvorenia invazívnych rastlinných druhov, nežiadúce následky toku transgénov do indigénnych rastlinných druhov a mikroorganizmov, vznik tzv. „superškodcov“, a vplyv transgénnych rastlín na necieľové organizmy vrátane pôdných mikrobiálnych spoločenstiev (WOLFENBARGER a PHIFER, 2000). Tieto obavy vyžadujú, aby boli vplyvy transgénnych rastlín na životné prostredie starostlivo hodnotené, zvlášť keď sa uvažuje o vplyve transgénnych rastlín na pôdne zdroje a funkcie ekosystémov (BUCKLEY a SCHMIDT, 2003).

V súčasnosti existuje veľké množstvo rôznych metód, ktoré sa používajú na hodnotenie vplyvov transgénnych rastlín na pôdne mikroorganizmy (LYNCH et al., 2004). Napriek veľkým pokrokom vo vývoji týchto metód, každá z nich má určité limitácie, ktoré stále bránia úplnému a vyčerpávajúcemu pochopeniu komplexity vzťahov medzi rastlinami, vrátane transgénnych, a pôdnymi mikrobiálnymi spoločenstvami (OGRAM, 2000). V princípe sa všetky v súčasnosti používané metódy analýzy pôdných mikrobiálnych spoločenstiev dajú klasifikovať do štyroch rôznych skupín, z ktorých dve sú závislé na kultivácii mikroorganizmov a dve sú od kultivácie nezávislé.

Kultivačná metóda, použitá aj v našom výskume, poskytuje jednoduchý ale užitočný prostriedok na identifikáciu a charakterizáciu zmien špecifických skupín mikroorganizmov v čase a priestore v rizosfére rastlín (DONEGAN et al., 1995; SAXENA a STOTSKY, 2001; WU et al., 2004). Limitáciou tejto metódy je že väčšina mikroorganizmov v prostredí ostane neidentifikovaná pretože sú nekultivovateľné pri použití štandardných kultivačných metód (WARD et al., 1990). Kultivačná metóda (angl. *plating method*) a metóda najpravdepodobnejšieho počtu (angl. *most probable number method*) sa používajú na detekciu transgénnych rastlín na špecifické pôdne mikroorganizmy ako symbiotické N<sub>2</sub>-fixujúce baktérie, mikroorganizmy rozkladajúce rôzne organické substráty, nitrifikačné baktérie a pod. V našom výskume sa kultivačná metóda ukázala byť vhodná na detekciu a sledovanie zmien v populačných hustotách rôznych skupín aeróbných baktérií rizosféry transgénnej a netransgénnej lucerny satej, napr. amonizačných, celulolytických, denitrifikačných, nitrifikačných a N-fixujúcich baktérií.

Medzi kultivačné metódy patrí aj test využitia substrátov (angl. *substrate utilization assay*) využívajúci Biolog GN mikrotitračné platničky na metabolický fingerprinting pôdných mikroorganizmov (DONEGAN et al., 1995; DONEGAN et al., 1999; DI GIOVANNI et al., 1999; HEUER et al., 2002; DUNFIELD a GERMIDA, 2003; TESFAYE et al., 2003).

Čoraz širšie využitie získavajú metódy nezávislé na kultivácii mikroorganizmov. Najpopulárnejšie sú analýzy DNA fingerprintov (angl. *DNA fingerprint analysis*) založené na PCR amplifikácii rRNA génu z DNA extrahovanej z pôdných vzoriek. Dodnes bolo vyvinutých a používa sa viac rôznych techník analýzy DNA fingerprintov, napr. DGGE, RFLP, ARDA a SSCP (DONEGAN et al., 1995; DONEGAN et al., 1999; DI GIOVANNI et al., 1999; LOTTMAN a BERG, 2001; HEUER et al., 2002; DUNFIELD a GERMIDA, 2003).

Na aktivitách založené metódy, napr. stanovenie substrátom indukovanej respirácie a analýza pôdných enzýmov poskytujú informáciu o všeobecných mikrobiálnych aktivitách ale nie o špecifických skupinách

mikroorganizmov ktoré v skutočnosti prispievajú k rôznym typom enzýmových aktivít pôdy (DONEGAN et al., 1999; DI GIOVANNI et al., 1999; WU et al., 2004).

Je zrejme, že pre presnejší a extenzívnejší odhad možných vplyvov transgénnych rastlín lucerny sietej exprimujúcich gény kódujúce vtáči ovalbumín (*Ov*), plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny (*AlMVcp*) a markerový gén *gus*, na mikrobiálne spoločenstvá rizosféry, bude potrebné v budúcnosti použitie viacerých metód, ktoré poskytujú odlišné informácie o procesoch a vlastnostiach mikrobiálnej bioty asociovanej s koreňovou sústavou rastlín. Je to o to aktuálnejšie, že lucerna siata je najvýznamnejšou krmovinou v Európe a Severnej Amerike a okrem poľnohospodárskeho významu veľkou mierou prispieva k funkčnosti pôdných ekosystémov a je významným viazačom atmosférického dusíka.

Transgénne rastliny môžu ovplyvňovať pôdne mikroorganizmy rôznymi spôsobmi, ktoré zahŕňajú priame a nepriame efekty (DUNFIELD a GERMIDA, 2004). Priame efekty závisia od spektra aktivít transgénnych bielkovín a kvantít týchto bielkovín akumulujúcich sa v prostredí. Nepriame efekty sú na rozdiel od priamych efektov sprostredkované zmenami rastlinných bielkovín a zloženia koreňových exudátov, ku ktorým dochádza v dôsledku modifikácie metabolických procesov transgénom, či produktom transgénu v rastlinných bunkách.

Priame efekty sú najčastejšie spojené s introdukciou takých génov do rastlinného genómu, ktoré vyvolávajú rezistenciu k škodcom alebo patogénom, napr. génov pre Bt toxín (DONEGAN et al., 1995; SAXENA a STOTZKY, 2001; WU et al., 2004), lektíny (DONEGAN et al., 1997), antimikrobiálne bielkoviny (VIERHEILIG et al., 1993; AHRENHOLZ et al., 2000) alebo herbicídy (napr. SICILIANO a GERMIDA, 1999; DUNFIELD a GERMIDA, 2001). Priame efekty vyvolávajú väčšie obavy, pretože introdukcia horeuvedených typov transgénov do genómov hostiteľských rastlín môže vyvolať tvorbu chemických zlúčenín, ktoré budú potenciálne toxické pre necieľové pôdne organizmy, vrátane mykoríznych húb a pôdnej mikrofauny.

Nepriame efekty spôsobené zmenami koreňových exudátov môžu byť dôsledkom expresie transgénov v geneticky modifikovaných rastlinách, ich účinky je však oveľa ťažšie odhadnúť, pretože na zloženie koreňových exudátov môže vplývať veľké množstvo rôznych faktorov (TESFAYE et al., 2001).

Počas genetickej manipulácie rastlinných buniek môžu techniky *in vitro* kultivácie rastlín (použitie vysokých koncentrácií rastových regulátorov, proces selekcie transformovaných buniek, zvlášť ak sa použije antibiotikum kanamycín) vyprovokovať nežiaduce zmeny vlastností regenerovanej rastliny. Napr. tzv. polohový efekt z miesta integrácie transgénu(-ov) môže zmeniť expresiu niektorých génov parentálnej rastliny a viesť k neočakávaným zmenám v charakteristikách rastliny (napr. ZHANG et al., 2001; CURTIS et al., 2002). Neočakávané charakteristiky sa môžu vyskytnúť tiež v pletivách koreňov transgénnych rastlín a v koreňových exudátoch (TESFAYE et al., 2001). V dôsledku komplexného zloženia a diverzity mikrobiálnych spoločenstiev pôdy, ktoré sú asociované s koreňmi rastlín a sú selektívne ovplyvňované exudáciou koreňov, zmeny v zložení koreňových exudátov medzi transgénnymi rastlinami a netransgénnymi rastlinami môžu vyvolať odlišné efekty na mikrobiálne spoločenstvá. Takéto odlišné efekty môžu čiastočne vysvetliť zistené rozdiely v sledovaných parametroch medzi transgénnymi a netransgénnymi rastlinami v našich experimentoch.

Okrem toho mnohí autori referujú o tom, že mikrobiálne spoločenstvá pôdy sú veľmi plastické v zložení a štruktúre v závislosti rôznych koreňových zón, agrotechnických praktík a iných environmentálnych faktorov (napr. BUCKLEY a SCHMIDT, 2003). Taktiež napr. FANG et al. (2005) zistili, že bakteriálne spoločenstvá v rizosfére kukurice sú viac ovplyvnené textúrou pôdy než kultiváciou transgénnych odrôd. Navyše, v mnohých prípadoch rozdiely medzi rizosférymi mikrobiálnymi spoločenstvami spojenými s transgénnymi rastlinami a parentálnymi netransgénnymi rastlinami sa ukázali byť dočasné a závislé na prítomnosti živých rastlín (DUNFIELD a GERMIDA, 2003).

Všetky uvedené príklady svedčia o tom, že súčasné poznatky o vzťahoch medzi štruktúrou a dynamikou rizosférymi mikrobiálnych spoločenstiev a rastom a zdravotným stavom rastlín, zvlášť keď sa jedná o geneticky modifikované rastliny, sú limitované, avšak použitie viacerých metód štúdia mikrobiálnych spoločenstiev v kombinácii môže v budúcnosti priniesť zásadné poznatky dôležité ako pre šľachtiteľov, tak aj pre mikrobiológov. Je tiež zrejme, že hodnotenie vplyvu transgénnych rastlín na pôdne mikroorganizmy je dôležité pre determináciu potenciálnych rizík spojených s uvoľňovaním transgénnych rastlín do životného prostredia.

## Materiál a metódy

V experimente boli použité:

1. geneticky modifikované klony lucerny sietej (*Medicago sativa* L.), pochádzajúce

z vysokoregenerujúceho genotypu Rg 9/I-14-22, izolovaného z odrody Lucia (FARAGÓ a kol., 1997) s:

- vneseným génom *Ov* z prepelice japonskej (*Coturnix coturnix*) kódujúcim bielkovinu ovalbumín (MUCHA et al., 1991)
- vneseným génom *AMVcp* pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny (KÚDELA a kol., 1995)
- vnesenými markerovými génmi (*npt II* a *gus*)

## 2. východiskový nemodifikovaný klon: SE/22-GT2

### 3. odroda Lucia.

Rastliny sa pestovali v dvoch substrátoch, a to v sterilnej a v nesterilnej zemine, z ktorej sa pred výsadbou klonov vykonal mikrobiologický rozbor. Počas kultivácie sa odoberali pôdne vzorky z okolia koreňov (od hĺbky 0,02 m od vrhnej časti) v dvoch termínoch (na začiatku a na konci kvitnutia). Mikrobiologické analýzy: a.) prítomnosť *Azotobacteria* na Ashbyho agare agregátovou metódou stanovením fertílých zrníčok z celkového počtu v %, b.) celkový počet aeróbných mikroorganizmov tvoriacich kolónie na Thorntonovom agare vyjadrením počtu kolónietvoriacich jednotiek (KTJ) v prepočte na 1 g sušiny pôdy, c.) početnosť celulólytických baktérií využitím filtračného papiera ako zdroja uhlíka v živnom médiu vyjadrenú v KTJ/ 1 g sušiny pôdy, d.) početnosť amonizačných baktérií kultivovaných na MPA (mäsovopeptónový agar) v KTJ/ 1 g sušiny pôdy, e.) početnosť nitrifikačných a denitrifikačných baktérií v KTJ/ 1 g pôdy, f.) množstvo bakteriálnych spór po pasterizácii vzorky v KTJ/ 1 g suchej pôdy.

## Výsledky a diskusia

Medzi klonmi obsahujúcimi *Ov* gén a použitými variantmi pestovateľského substrátu (sterilná a nesterilná pôda) boli zistené štatisticky významné rozdiely (ANOVA,  $p < 0,01$ ) v početnosti aeróbných baktérií pri oboch odrodách. Podobné štatistické rozdiely v početnosti kultivačných skupín (s výnimkou amonizačných baktérií) medzi substrátmi a klonmi boli sledované pri modifikovaných rastlinách s vnesenými AIMVcp a markerovými génmi. Klony lucerny s vneseným *Ov* génom, pestované v nesterilnom substráte sa vyznačovali vyššou populačnou úrovňou pri všetkých sledovaných skupinách aeróbných mikroorganizmov pri oboch odberoch. Výnimkou bola skupina nitrifikačných baktérií pri klonoch s vnesenými markerovými génmi a amonizačná mikroflóra pri klonoch obsahujúcich AIMVcp gény, pri ktorých bola zistená vyššia početnosť v substráte upravenom sterilizáciou.

Prítomnosť *Azotobacter* spp. Bola zistená len v rizosfére rastlín, bez ohľadu na typ genetickej modifikácie, pestovaných v nesterilnej pôde, pričom najviac fertílých zrníčok (97 %) z celkového počtu bolo pozorovaných pri transgénnych klonoch s *Ov* génom SE/22-9-1-12 a SE/22-11-1-1sl.1.

Rizosféra geneticky modifikovaných klonov lucerny obsahujúcich *Ov* gén sa vyznačovala vyššou početnosťou amonizačných baktérií, celulólytických baktérií, bakteriálnych spór a denitrifikačných baktérií a naopak nižšou početnosťou nitrifikačných baktérií a celkového počtu kolónietvoriacich mikroorganizmov v porovnaní s východiskovým počtom týchto kultivačných skupín v pôdnych vzorkách odobraných pred vysádzaním klonov.

V rizosfére geneticky modifikovaných klonov s vnesenými AIMVcp a markerovými génmi sa v porovnaní s predkultivačným rozborom zvýšila početnosť amonizačných baktérií a bakteriálnych spór v 1. odbere a amonizačných a celulólytických baktérií v 2. odbere. Najvyššou početnosťou amonizačných baktérií sa vyznačovala rizosféra klonov s vneseným *Ov* génom: SE/22-10-5-3; SE/22-11-1-1; SE/22-11-1-1sl.1; SE/22-1-1-12sl.1; SE/22-13-4-1; SE/22-13-4-1sl.1 a SE/22-15-1-1 (1. odber), resp. SE/22-9-1-12; SE/22-11-1-1; SE/22-11-1-1sl.1; SE/22-13-4-1; SE/22-13-4-1sl.1; SE/22-15-3-2 (2. odber) v porovnaní s celkovým priemerom.

Ak porovnáme rizosfére baktérie z okolia koreňov rastlín lucerny podľa typu genetickej modifikácie zistíme, že pri klonoch s vneseným *Ov* génom bola sledovaná najvyššia početnosť všetkých detekovaných kultivačných skupín okrem amonizačných baktérií, ktoré sa pri týchto klonoch vyznačovali najnižšou početnosťou. Najnižšia početnosť celulólytických baktérií, denitrifikačných a nitrifikačných baktérií, celkového počtu mikroorganizmov a *Azotobacteria* bola sledovaná v rizosfére klonov obsahujúcich markerové gény a najnižšia početnosť bakteriálnych spór bola zistená pri klonoch s vneseným AIMVcp génom.

Pri celkovom porovnaní bakteriálnej rizosféry z okolia koreňov netransgénnych a transgénnych klonov obsahujúcich *Ov* gén bolo zistené vyššie zastúpenie bakteriálnych spór (o 14 %) a celkového počtu kolónietvoriacich mikroorganizmov (o 15 %) v prospech rizosféry transgénnych klonov a nižšie zastúpenie celulólytických baktérií v rizosfére transgénnych klonov. Početnosti baktérií, zúčastňujúcich sa kolobehu dusíka v pôde, sa v rizosfére týchto transgénnych klonov zvýšili a v rizosfére netransgénnych znížili, a to pri amonizačných baktériách o 7 %, nitrifikačných baktériách o 5 % a denitrifikačných baktériách o 12 % oproti celkovému priemeru.

Rizosféra transgénnych klonov s génmi AIMVcp, *nptII* a *gus* sa vyznačovala vyšším celkovým počtom kolónietvoriacich mikroorganizmov (o 96 %), amonizačných (o 4 %) a celulólytických (o 50 %) baktérií a nižším počtom bakteriálnych spór (o 7 %), *Azotobacteria* (o 1 %), nitrifikačných (o 135 %) a denitrifikačných (o 5 %) baktérií v porovnaní s ich početnosťami v rizosfére parentálnych netransgénnych klonov.

Pri celkovom porovnaní početností bakteriálnych kolónií izolovaných z pôdnych vzoriek z okolia geneticky modifikovaných a nemodifikovaných klonov lucerny satej boli štatisticky významné rozdiely pozorované len pri rastlinách s vneseným *Ov* génom v celkovom počte kolónietvoriacich mikroorganizmov a pri rastlinách obsahujúcich AIMVcp gén pri celulólytických baktériách (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Na Slovensku sa objavujú prvé štúdie týkajúce sa posudzovania rizika transgénnych rastlín. Napríklad v roku 2002 sa na pracovisku Výskumného ústavu živočíšnej výroby v Nitre porovnávali nutričné charakteristiky transgéennej a netransgéennej kukurice a ich stráviteľnosť v pokusoch s potkanmi (CHRENEKOVÁ et al., 2002). V tom istom roku sme sa na pracovisku Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch zaoberali monitoringom aeróbných baktérií v rizosfére geneticky modifikovaných klonov lucerny siatej, s vneseným génom Ov z Prepelice japonskej (*Coturnix coturnix*) kódujúcim bielkovinu ovalbumín. Zistili sme, že pri geneticky modifikovaných klonoch lucerny SE/22-11-1-1 a SE/22-14-4-1 bola na selekčných médiách zistená nižšia početnosť amonizačných baktérií a kolónietvoriacich mikroorganizmov a naopak vyššia početnosť celulolytických baktérií a *Azotobacteria* v porovnaní s izogénnym nemodifikovaným klonom SE/22GT2 (FARAGOVÁ a FARAGÓ, 2002).

## Záver

Variabilita všetkých testovaných znakov bola štatisticky významne ovplyvnená rastlinným genotypom aj inokulačnou suspenziou. Štatisticky významné rozdiely v znakoch boli zaznamenané ako medzi geneticky modifikovanými klonmi, tak aj medzi ich izogénnymi líniami a genotypmi selektovanými z odrody Lucia.

## Literatúra

1. AHRENHOLTZ, I. – HARMS, K. – DE VRIES, J. – WACKERNAGEL, W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2000, s. 1862-1865
2. BUCKLEY, D.H. – SCHMIDT, T.M.: *Environ. Microbiol.*, 5, 2003, s. 441-452.
3. CURTIS, I.S. – NAM, H.G. – JUN, J.Y. – SEO, K.H.: *Transgenic Res.*, 11, 2002, s. 249-256.
4. DI GIOVANNI, G. D. – WATRUD, L. S. – SEIDLER, R. J. – WIDMER, F.: *Microb. Ecol.* 37, 1999, s. 129-139.
5. DONEGAN, K.K. – PALM, C.J. – FIELAND, V.J. – PORTEOUS, L.A. – GANIO, L.M. – SCHALLER, D.L. – BUCAO, L.Q. – SEIDLER, R.J.: *Appl. Soil Ecol.*, 2, 1995, s. 111-124
6. DONEGAN, K.K. – SEIDLER, R.J. – FIELAND, V.J. – SCHALLER, D.L. – PALM, C.J. – GANIO, L.M. – CARDWELL, D.M. – STEINBERGER, Y.: *J. Appl. Ecol.*, 34, 1997, s. 767-777.
7. DONEGAN, K. K. – SEIDLER, R. J. – DOYLE, J. D. – PORTEOUS, L. A. – DI GIOVANNI, G. D. – WIDMER, F. – WATRUD, L. S.: *Journal of Appl. Ecol.* 36, 1999, s. 920-936.
8. DUNFIELD, K.E. – GERMIDA, J.J.: *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38, 2001, s. 1-9.
9. DUNFIELD, K.E. – GERMIDA, J.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2003, s. 7310-7318
10. DUNFIELD, K.E. – GERMIDA, J.J.: *J. Environ. Qual.*, 33, 2004, s. 806-815.
11. FANG, M. – KREMER, R.J. – MOTAVALLI, P.P. – DAVIS, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2005, s. 4132-4136.
12. FARAGÓ, J. – HAUPTVOGEL, P. – KRAIC, J.: In: *Chloupek, O. – Simon, U. (Eds.): Seed Production of Lucerne. Academia Prague, 1997, s. 38-39.*
13. FARAGOVÁ, N. – FARAGÓ, J.: In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín: Zborník z 9. odborného seminára. Piešťany: VÚRV Piešťany, 2002, s. 95-97.*
14. HEUER, H. – KROPFENSTEDT, R. M. – LOTTMANN, J. – BERG, G. – SMALLA, K.: *Appl. And Environ. Microbiol.* 68., 2002, s. 1325-1335.
15. CHRENEKOVÁ, M. – SOMMER, A. – ČEREŠŇÁKOVÁ, Z. – NITRAYOVÁ, S. – PROSTREDNÁ, M.: In: *Arch. Anim. Nutr.* 56, 2002, s. 229-235.
16. KÚDELA, O. – GALLO, J.: *Acta Virologica*, 39, 1995, s. 131-135.
17. LOTTMANN, J. – BERG, G.: *Microbiol. Res.* 56, 2001, s. 75-82.
18. LYNCH, J.M. – BENEDETTI, A. – INSAM, H. – NUTI, M.P. – SMALLA, K. – TORSVIK, V. – NANNIPIERI, P.: *Biol. Fertil. Soils*, 40, 2004, s. 363-385
19. MUCHA, J. – KLAUDINY, J. – KLAUDINYOVÁ, V. – HANES, J. – ŠIMÚTH, J.: *Nucleic Acids Res.* 18, 1991, s. 5553.
20. OGRAM, A.: *Soil Biol. Biochem.*, 32, 2000, s. 1499-1504
21. SAXENA, D. – STOTZKY, G.: *Soil Biol. Biochem.*, 33, 2001, s. 1225-1230
22. SICILIANO, S. D. – GERMIDA, J. J.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 1999, s. 263-272.
23. TESHAYE, M. – DUFAULT, N.S. – DOMBUSCH, M.R. – ALLAN, D.L. – VANCE, C.P. – SAMAC, D.A.: *Soil Biol. Biochem.*, 35, 2003, s. 1103-1113
24. VIERHEILIG, H. – ALT, M. – NEUHAUS, J.M. – BOLLER, T. – WIEMKEN, A.: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 1993, s. 261-264.
25. WARD, D.M. – WELLER, R. – BATESON, M.M.: *Nature*, 345, 1990, s. 63-65
26. WOLFENBARGER, L.L. – PHIFER, P.R.: *Science*, 290, 2000, s. 2088-2093
27. WU, W.X. – YE, Q.F. – MIN, H. – DUAN, X.J. – JIN, W.M.: *Soil Biol. Biochem.*, 36, 2004, s. 289-295.
28. ZHANG, Y. – SHEWRY, P.R. – JONES, H. – BARCELO, P. – LAZZERI, P.A. – HALFORD, N.G.: *Plant J.*, 28, 2001, s. 431-441.

✉

✉

Natália Faragová, Juraj Faragó, SCPV – VÚRV Piešťany, Oddelenie poľnohospodárskych biotechnológií, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: faragova@vurv.sk, farago@vurv.sk



## KLONOVÉ ŠLECHTĚNÍ U RÉVY VINNÉ – PROBLÉMY A PERSPEKTIVY CLONAL SELECTION IN GRAPEVINE - PROBLEMS AND PROSPECTS

Olga JANDUROVÁ - Vlastimil KRÍŽ

*Clonal selection in vegetatively propagated plants represent an efficient breeding tool and its success is basically dependent on the selection strategy and heritability of desirable traits. Fruit trees seems to be an particular case, due to well known high frequency of somatic mutations, which are the reason of increasing phenotypic variability in clonal populations. The selection of clones with improved quality is due to that never ended process, which has to be continued during maintaining and renewal of maternal elite plantation. The selection strategy should be found on individual screening in desirable traits measured in different seasons. The selection of best individuals with lowest standard deviation can not only improve performance of selected population but also make this character more stable. Our results demonstrate this effect in clonal selection of Pinot blanc, but similar results were obtained in other varieties.*

*Key words: Clonal selection, Pinot blanc, yield stability*

### Úvod

Klonová selekce u révy vinné byla v dřívější době uplatňována u všech komerčně pěstovaných moštových odrůd a selektované materiály byly testovány na všech šlechtitelských stanicích v Čechách, na Moravě i Slovensku. Rozsáhlá práce končila v šedesátých letech minulého století bez výrazného úspěchu a to bohužel proto, že ve finálním hodnocení byly upřednostněny materiály, které dosahovaly dobrého výnosu na všech šlechtitelských stanicích. Zde nebyl doceněn význam klonové selekce, která může být úspěšná především ve výběru genotypů pro specifické mikroklimatické a půdní podmínky malé oblasti, což je zvláště významné pro českou oblast. Evropské vinařské státy se nyní znovu vrací ke svým klonovým selekcím a hledají jejich využití pro produkci regionálně specifických vín. Prioritou už dávno není vysoký výnos, ale spíše kvalita moštu a výnosová stabilita.

### Materiál a metody

Základní principy a selekční možnosti v klonové selekci jsme ověřovali u všech sedmi odrůd, které Výzkumná stanice vinařská udržuje (MT, RB, SZ, TČ, Ke, PM, SV), ale konkrétní údaje v tomto příspěvku se týkají odrůdy Rulandské bílé.

U této odrůdy stanice vyselekovala šest klonů, které prošly uznávacím řízením UKZUZ. Kritéria, která jsme individuálně sledovali u těchto klonů byl výnos na keři v letech 2000 – 2002, a zvláštní důraz jsme kladli na stabilitu výnosu. Počet hodnocených keřů byl 1605 celkem, nejnižší u klonu 31-25 (150), nejvyšší u klonu 20-19 (333). Výsadba pochází z r. 1977. Všechny sledovaný materiál je vysázen v Karlštejně, trať Vrše II, 260 m n.m. na dvou sousedících terasách. Výsledky byly zpracovány analýzou rozptylu s využitím programu STATISTICA 6.

### Výsledky a diskuse

První předběžná analýza se týkala variability mezi sledovanými klony a měla ověřit významnost rozdílů mezi jejich výnosy. Z vyhodnocení vychází statisticky významné rozdíly u klonu RB 10-10, který je s průměrným výnosem 2353,638 g/keř nejlepší. Naopak nejhorší výsledek výnosu 1899,043 g/keř je klon RB 12-31. Ostatní klony se ve výnosu významně neliší.

Rozbor individuální variability mezi keři téhož klonu přinesl bez výjimky nejen kolísání průměrného výnosu u jednotlivých keřů, ale i významné rozdíly v intervalech spolehlivosti. Tento výsledek byl velmi podobný u všech sledovaných klonů. Vzhledem k velmi sjednoceným podmínkám pěstování lze těžko tuto variabilitu vysvětlovat podmínkami prostředí. Naopak je vysoce pravděpodobné, že je tato variabilita výsledkem somatických mutací ve vegetativních pletivech pupenů, které jsou při roubování základem další rostliny. Zajímalo nás zda keře s nadprůměrnými výnosy si udrží svůj vysoký výnos i v dalších letech a jak se změní jejich individuální variabilita. Výsledky těchto měření jsou v grafu průměrů vybraných keřů u klonu RB 10-10.

Výsledky u všech sledovaných klonů shodně dokazují, že mezi jedinci téhož klonu jsou až dvojnásobné rozdíly ve stabilitě výnosu v průběhu stejných ročníků. To znamená, že když při selekci uplatníme stabilitu sklizně jako výběrovou charakteristiku je možné v selektované populaci zlepšit nejen průměr výnosu, ale i snížit jeho variabilitu. S ohledem na požadavky pěstitele je tato korelace nadprůměrných výnosů s nižší variabilitou mezi ročníky pozitivní. Poslední histogram dokumentuje výnosové průměry u skupiny selektovaných keřů v sezónách 1999, 2000, 2001, 2002 a 2005. Pro nízký počet vybraných keřů a selekci na nadprůměrný výnos soubor nespĺňuje podmínky normálního rozdělení, histogram pouze dokládá možnosti selekčního posunu ve výběrové populaci.

### Závěr

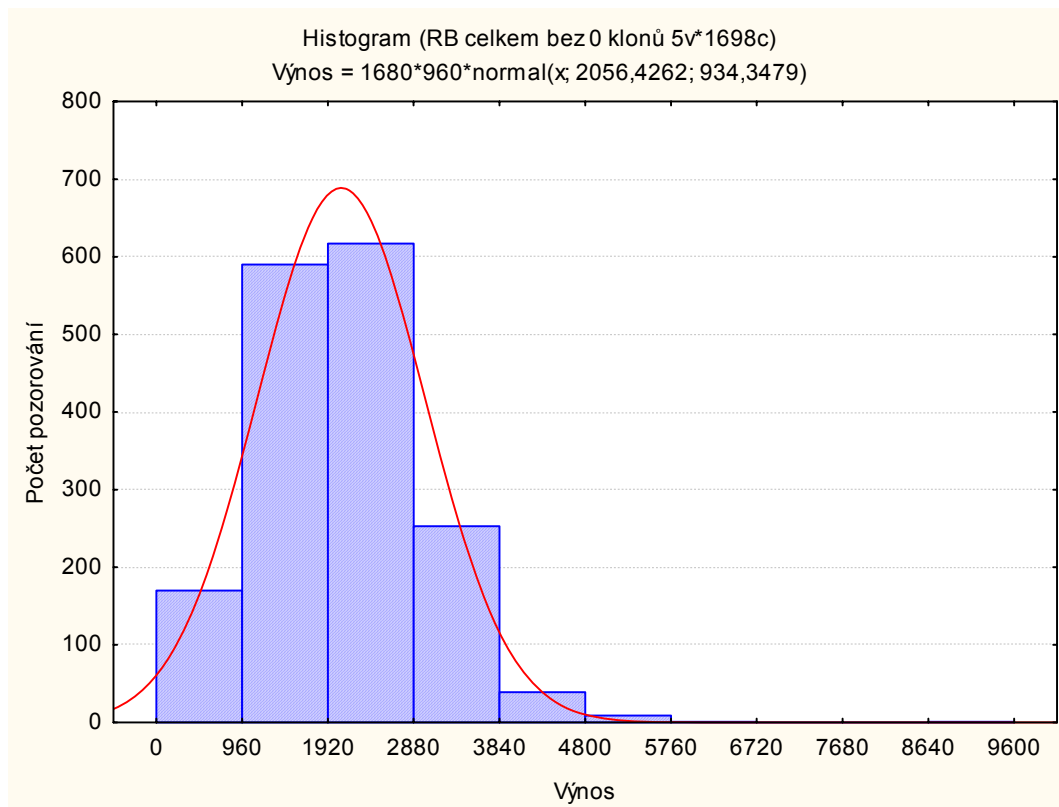
Výsledky průběžného sledování výnosu hrozňů u klonových populací moštových odrůd révy dokazují efektivní využití opakovaného výběru na stabilitu a nadprůměrný výnos, který by měl být spolu

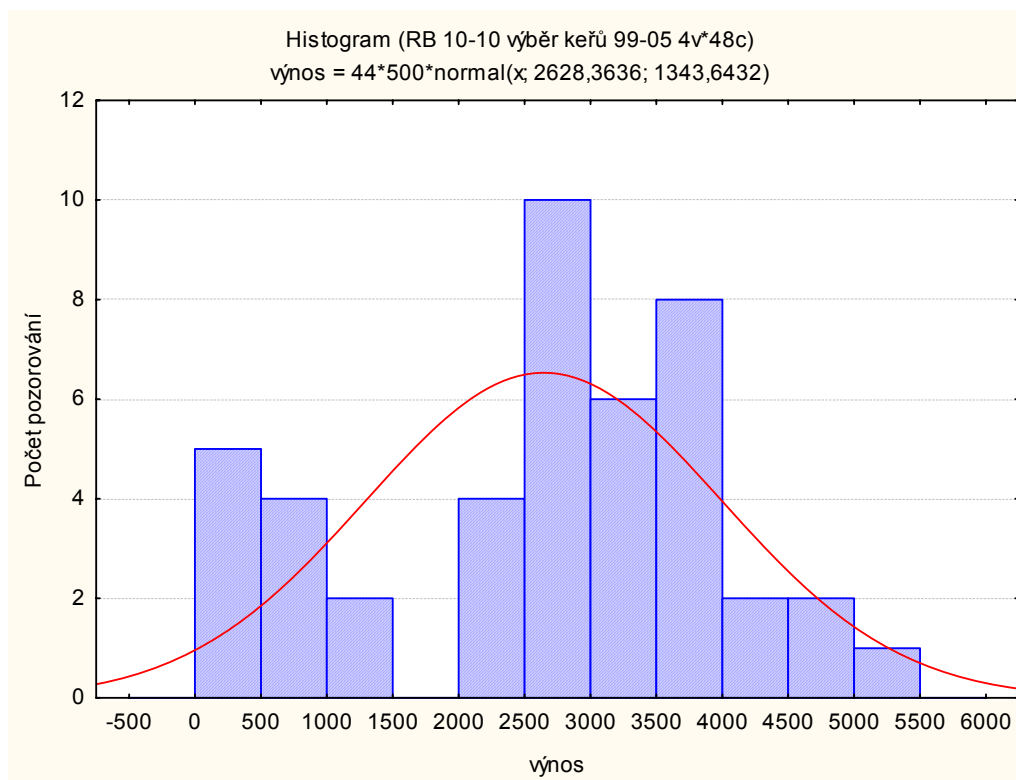
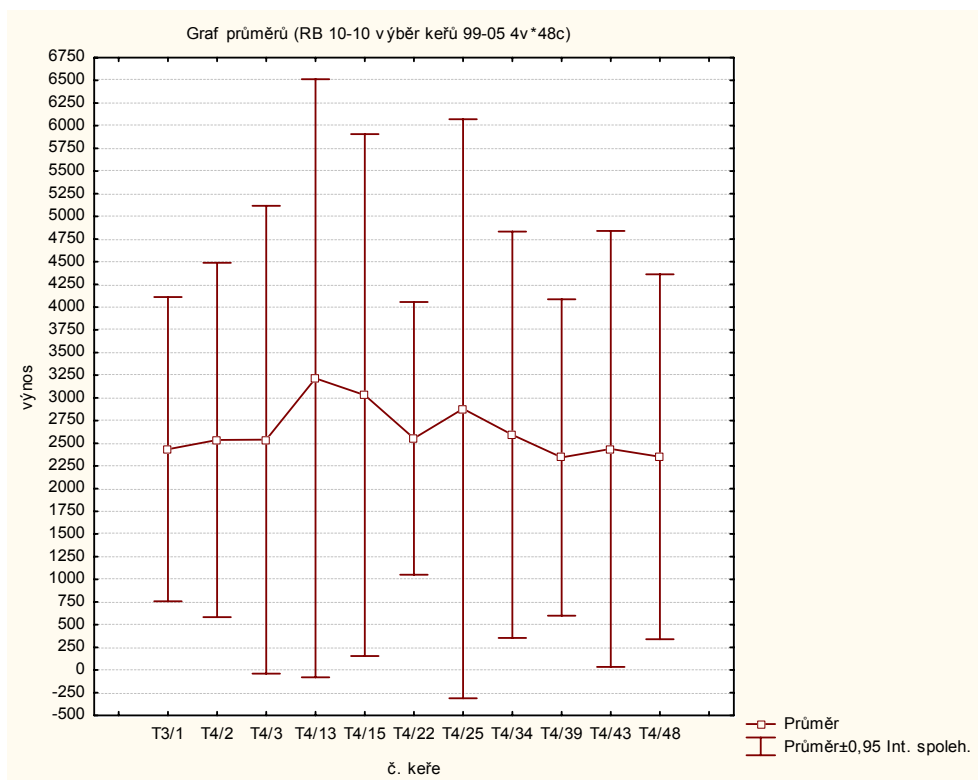
s testováním zdravotního stavu prováděn v průběhu udržovacího šlechtění. Bohužel nutno konstatovat, že v současné situaci je takový experimentální přístup mimo možnosti udržovatelů odrůd révy v ČR.

Poděkování: Výzkum byl finančně podpořen a řešen v rámci výzkumného záměru „Studium a využití genetické diversity zemědělských plodin, dotovaným Mze ČR.

### Literatura:

1. PÉREZ-HUGALDE, C. et al., 2004: Statistical Procedure for Clonal Preselection of *Vitis vinifera* L: cv. Tempranillo. In the Duero Halley, Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 4, 335-345
2. TROSHIN, L.P., 1990: Selection of highly productive grape variations usány methods of multidimensional analysis *Vitis* special issue 539-544





✉

**PROTEOMICKÁ KLASIFIKÁCIA SAMOOPELIVÝCH LÍNIÍ A  
DVOJLÍNIOVÝCH HYBRIDOV KUKURICE SIATEJ (*ZEА MAYS L.*)  
POLYMORFIZMOM ENZÝMOV V ROKOCH 1990 - 2005  
PROTEOMIC CLASSIFICATION OF SELF-POLLINATED LINES AND  
THEIR SINGLE CROSSES OF MAIZE (*ZEА MAYS L.*) BY ENZYME  
POLYMORPHISM IN THE YEARS 1990 - 2005**

Pavol MÚDRY - Marián DRAGŮŇ

*During years 1990 - 2005 86 self pollinated lines (L) of maize (Zea mays L.) and their 53 single crosses (Sc) have been analysed by electrophoretic profiling of 11 enzymes – acid phosphatase (ACP), alcohol dehydrogenase (ADH), catalase (CAT), diaphorase (DIA),  $\beta$ -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), besides Sc 3103 x 3045, were homogeneous. In the first stage of analysis (1990 – 1994) self-pollinated lines 3003, 3004 and 4102; 3023, 4014 and 3036; 4008 and 4139; single crosses Sc 4004 x 4012 and Sc 4012 x 4004 and in the second stage (1999-2005) - self pollinated lines 3068, 3114, 4029 and 4501; 4005 and 4112; 3070 and 3119; 4020 and 4022; 3154 and 3162; 3036 and 3155 and single crosses Sc 3154 x 3119 and Sc 3162 x 3119 had the same fingerprints. By means of this proteomic classification 50 from 53 Sc, male component, female component and their Sc were distinguishable each other. Eleven from the thirteen Sc and fourteen from the eighteen lines had original fingerprints. Loci: Dia2:4, Got1:4, Got2:4, Got3:4, Mdh4:12 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 – Acp1:2, 3, 4 and 6; Adh1:4 and 6; Cat3:9 and 12; Dia1:8 and 12; Dia2:4; Glu1:2 and 6-7; Got1:4, Got2:4; Got3:4; Idh1:4 and 6; Idh2:4 and 6; Mdh1:1, 6 and 10.5; Mdh2:3, 4.5 and 6; Mdh3:16 and 18; Mdh4:12; Mdh5:12 and 15; Mmm:M and m; Pgd1:2 and 3.8; Pgd2:2.8, 5 and n, ; Pgi1:4 and 5; Pgm1:9 and Pgm2:1, 3, 4 and 8. New, unique allele/alleles were not identified. In this article aplicability of proteomic classification of maize by enzyme polymorphism are confirmed as very efficient tool for checking genotypic identity and homogeneity of Slovak maize genotypes for genetic, breeding, seed improvement, ecophysiology, environmental biotechnology and other research purposes.*

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

## Úvod

Polymorfizmus enzýmov vo výskume a v poľnohospodárskej praxi je známy už takmer päť desaťročí. Jeho praktické využitie pri jednotlivých poľnohospodárskych plodinách je však limitované predovšetkým rozsahom jeho variability a distribúciou tejto variability v analyzovanom súbore odrôd. Kukurica je plodinou, kde polymorfizmus enzýmov je po stránke teoretickej, experimentálnej aj praktickej najlepšie preštudovaný. Polymorfizmu enzýmov kukurice siatej (*Zea mays L.*) sme sa začali venovať v roku 1990 vo Výskumnom ústave kukurice, ktorý sa privatizáciou transformoval na Zeainvent a. s., neskôr na Sempol Holding a. s. Trnava a posledné tri roky výskum pokračoval na Katedre biológie, Pedagogickej fakulty, Trnavskej univerzity v Trnave.

Na poli polymorfizmu enzýmov do roku 1990 bola známa genetická interpretácia polymorfizmu študovaných druhov enzýmov, štandardizovaná metodológia jeho analýzy, významní producenti kukurice mali zmapovaný rozsah variability polymorfizmu zárodočnej plazmy kukurice, známe boli práce zamerané na výskum šľachtenia na polymorfizmu enzýmov a praktická realizácia polymorfizmu enzýmov v hodnotení identity a homogenity vzoriek odrôd kukurice, vrátane právnej ochrany a ich patentovania. Tieto skutočnosti, ale aj úspešné šľachtenie kukurice v Čechách a na Slovensku, efektívnejšie využívanie biologického produkčného potenciálu hybridov, tvorba hybridov s vyšším produkčným potenciálom, zosúladenie našej legislatívy pri uznávaní a právnej ochrane odrôd kukurice (hlavne línie a hybridy) v prípravnej fáze vstupu do Európskej únie, zvýšený záujem zo strany našich šľachtiteľov o testovanie nových hybridov na testovacích pracoviskách v zahraničí, zmapovanie a ochrana šľachtiteľsky cenného genofondu s nástupom testovania a neskôr aj pestovania geneticky modifikovaných hybridov kukurice. Takéto široké zameranie štúdia polymorfizmu enzýmov kukurice a neskôr aj iných poľnohospodárskych plodín nás viedlo hlavne v prvej etape výskumu k užšej spolupráci s ÚKSÚP Bratislava (RNDr. Ľubomír Horváth) a s VÚRV Piešťany (RNDr. Ján Kraic, RNDr. Mária Žáková).

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 známou 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 polymorfizmu enzýmov v rokoch 1990 až 2005 bolo: zmapovať a určiť rozsah polymorfizmu enzýmov najaktuálnejšieho súboru línií a ich dvojlíniových hybridov zo slovenského šľachtiteľského programu spomenutých organizácií, určiť mieru homogenity ich vzoriek a posúdiť možnosť využitia variability polymorfizmu enzýmov v rôznych teoretických a aplikačných rovinách, zistiť či všetky dvojlíniové hybridy spĺňajú aj biochemické kritérium, ktoré má spĺňať hybrid, komparáciou izozymogramov vyčleniť samoopelivé línie, resp. dvojlíniové hybridy so zhodnými izozymogramami, vypočítať a porovnať so zahraničnými zdrojmi frekvenciu výskytu alel v polymorfných lokusoch za celý analyzovaný súbor línií a hybridov a vytypovať lokusy a alely s veľmi malou frekvenciou výskytu, zaujímavé pre obohatenie zárodočnej plazmy šľachtiteľského materiálu. Výsledky analýz - fingerprinty, resp. ich genetickú interpretáciu odovzdať Sempol Holding - u a. s., Trnava a Génovej banke vo VÚRV Piešťany pre tvorbu databázy údajov genetických zdrojov kukurice.

### **Materiál a metódy**

V rokoch 1990 - 2005 sme uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov 86 samoopelivých línií (L) a ich 53 dvojlíniových hybridov (Sc) kukurice siatej (*Zea mays* L.), ktorých biologickú identitu garantovali a pre experimentálnu prácu poskytli Ing. Miloslav Masnica, PhD. a Ing. Rudolf Izakovič, CSc. (Zeainvent a. s., neskôr Sempol Holding a. s., Trnava). Analýzy sme zrealizovali v dvoch etapách. Prvá etapa analýz prebehla v rokoch 1990 - 1994 a zahŕňala 27 línií a 16 hybridov. Biologický materiál bol analyzovaný na báze polymorfizmu siedmich druhov enzýmov, a to: kyslej fosfatázy (ACP, E.C. 3.1.3.2), alkoholdehydrogenázy (ADH, E.C. 1.1.1.1), izocitrátdehydrogenázy (IDH, E.C. 1.1.1.42), malátdehydrogenázy (MDH, E.C. 1.1.1.37), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD, E.C. 1.1.1.44), fosfoglucoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1). Druhá etapa analýz sa zrealizovala v rokoch 1999 - 2005 a zahŕňala 59 samoopelivých línií a 37 dvojlíniových hybridov. V tejto etape sa uskutočnili analýzy polymorfizmu jedenástich druhov enzýmov. K uvedeným enzýmom pribudli kataláza (CAT, E.C. 1.11.1.6), diaforáza (DIA, E.C. 1.6.99.2),  $\beta$ -glukozidáza (GLU, E.C. 3.2.1.21) a glutamát-oxaloacetáttransamináza (GOT, E.C. 2.6.1.1). Použili sme štandardizovaný metodologický postup horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle (CARDY et al., 1980; STUBER et al., 1988; BOURGOIN-GRENECHE et al., 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 číslo vyššej hodnoty zodpovedá zóne rýchlejšej migrácie k anóde. Pre iné enzýmy vyššia číselná hodnota zodpovedá pomalšej migrácii. Symbolom pre recesívnu nulovú alelu je *n*. *Mmm* je označenie modifikujúceho lokusu, alely ktorého ovplyvňujú rýchlosť migrácie istých pásov MDH. Pre lokalizáciu zón aktivity enzýmov sme používali kontrolu, ktorú reprezentoval dvojlíniový hybrid INKA so stanoveným polymorfizmom enzýmov. Avšak hlavne v prvej etape analýz sme používali líniový materiál so známymi fingerprintami, písomne vyžiadané hlavne z univerzitných pracovísk v USA (tzv. public lines - verejnosti dostupné línie) a línie z Francúzska. Využili sme aj skúsenosti zo zahraničných krátkodobých pobytov v testovacích laboratóriách v semenárskom závode v Rakúsku a v biochemických laboratóriách testovania identity a homogenity odrôd na báze molekulárnych markerov vo Francúzsku. V prvej etape analýz boli izozymogramy tiež fotograficky dokumentované pre tvorbu katalógu fingerprintov samoopelivých línií a hybridov.

### **Výsledky a diskusia**

Počas rokov 1990 - 2005 sme uskutočnili proteomickú klasifikáciu 86 samoopelivých línií (L) s excelentnou kombinačnou schopnosťou a ich 53 dvojlíniových hybridov (Sc) proveniencie SEMPOL Holding a. s., Trnava na báze analýzy a genetickej interpretácie polymorfizmu enzýmov. Vyhodnotením analýz vyplynulo, že iba v 2. etape meraní bola jedna analyzovaná vzorka biologického materiálu na báze polymorfizmu enzýmov nehomogénna (Sc 3103 x 3045). Z toho vyplýva, že až na vzorky jedného hybridu je šľachtiteľský materiál kukurice aj po stránke molekulárno-biochemickej v sledovaných znakoch čistý a homogénny. V prvej etape analýz zhodné fingerprinty mali línie: 3003, 3004 a 4102; 3023, 4014 a 3036; 4008 a 4139 a dvojlíniové hybridy Sc 4004 x 4012 a Sc 4012 x 4004. V druhej etape analýz zhodné fingerprinty mali línie: 3068, 3114, 4029 a 4501; 4005 a 4112; 3070 a 3119; 4020 a 4022; 3154 a 3162; 3036 a 3155 a dvojlíniové hybridy Sc 3154 x 3119 a Sc 3162 x 3119. Temer vo všetkých prípadoch sa izozymogramy rodičovských komponentov a ich dvojlíniových hybridov navzájom odlišujú, z čoho vyplýva, že ich na báze polymorfizmu 7 resp. 11 druhov enzýmov možno od seba odlišiť a v tom

případe uvedené dvojlíniové hybridy majú v jednom alebo viacerých lokusoch heterozygotnú konštitúciu. Z tabuľky 1 vyplýva, že Sc 3003 x 3004, Sc 4112 x 4005 a Sc 4020 x 4022 majú zhodné fingerprinty s rodičovskými komponentami, pretože nemajú ani jeden polymorfny lokus s heterozygotnou konštitúciou. Počet heterozygotných lokusov polymorfizmu siedmich (1. etapa) a jedenástich druhov enzýmov (2. etapa) v dvojlíniových hybridoch kukurice analyzovaných v rokoch 1990 – 2005 je uvedený v tabuľke 1. Dvojlíniové hybridy kukurice s dvoma a viac heterozygotnými lokusmi spĺňajú aj biochemické kritérium, ktoré sa kladie na hybridy na báze polymorfizmu enzýmov.

Z pohľadu šľachtienia môžu byť zaujímavé línie v izozymogramoch, v ktorých sa vyskytujú štatisticky vzácné izoformy, napr. : 1. etapa meraní – 3027 (Mdh1:10.5), 3002 (Mdh5:15), 4012 (Mmm:m), 3002 (Pgm2:1), 4007, 3024 a 4105 (Pgm2: 3), 2. etapa meraní – 3041, 3103 (Acp1:6), 4165 (Mdh1:1), 3136 (Mdh2:4.5), 3037 (Pgd2:2.8), 3106, 3107 a 3061(Pgm2:1). Frekvencie alel v jednotlivých izoenzymových lokusoch vypočítané zo súboru analyzovaných 86 samoopelivých línií kukurice (frekvencie lokusov CAT, DIA, GLU a GOT sú vypočítané iba za analýzy 2. etapy) sú: 0,570; 0,058; 0,349; 0,023 (Acp1:2, 3, 4 a 6); 0,884 a 0,116 (Adh1: 4 a 6); 0,889 a 0,101 (Cat3: 9 a 12); 0, 813 a 0,117 (Dia1:8 a 12); 1,000 (Dia2:4); 0,102 a 0,898 (Glu1:2 a 6-7); 1,000 (Got1:4); 1,000 (Got2:4); 1,000 (Got3:4); 0,756 a 0,244 (Idh1:4 a 6); 0,395 a 0,605 (Idh2:4 a 6); 0,012; 0,976 a 0,012 (Mdh1:1, 6 a 10.5 ); 0,523; 0,465 a 0,012 (Mdh2:3, 6 a 4.5); 0,884 a 0,116 (Mdh3:16 a 18); 1,000 (Mdh4:12); 0,919 a 0,081 (Mdh5:12 a 15); 0,988 a 0,012 (Mmm:M a m); 0, 256 a 0,744 (Pgd1:2 a 3.8); 0,047; 0,942 a 0,012 (Pgd2:2.8; 5 a n); 0,918 a 0,082 (Pgi1:4 a 5); 1,000 (Pgm1:9); 0,047; 0,140; 0,698 a 0,116 (Pgm2:1; 3; 4 a 8). Z hodnôt vyplýva, že lokusy Dia2:4, Got1:4, Got2:4, Got3:4, Mdh4:12 a Pgm1:9 s frekvenciou 1,0 sú monomorfne 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, 4 a 6; Adh1:4 a 6; Cat3:9 a 12; 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; Mdh1:1, 6 a 10.5; Mdh2:3, 4.5 a 6; Mdh3:16 a 18; Mdh4: 12; Mdh5:12 a 15; Mmm:M a m; Pgd1:2 a 3.8; Pgd2:2.8, 5 a n, ; Pgi1:4 a 5; Pgm1:9 a Pgm2:1, 3, 4 a 8.

Variabilita polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín publikovaná vo vedeckej a odbornej literatúre a aj podľa našej dlhoročnej experimentálnej práce je všeobecne nepostačujúca na absolútnu identifikáciu všetkých genotypov, ale to nebráni využívaniu fingerprintov pri určovaní genotypovej identity a homogenity partií osiva, posudzovaní kvality šľachtiteľských a semenárskych prác, nadštandardnému hodnoteniu líniového materiálu atď. Absolútnu identifikáciu možno zabezpečiť využitím spojenia niektorej z techník proteomiky a genomiky tak, ako sme už uviedli v minulosti (MÚDRY, DRAGŮŇ 2005) a ako sa uvádza aj v zahraničných prácach. Naše výsledky potvrdzujú aj skutočnosť, že vzhľadom na malú variabilitu polymorfizmu sa nedá očakávať, že bude možné šľachtiteľ 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 xenobiótik a participácia týchto interakcií v ontogenéze rastliny, resp. porastu. Súčasné vedecké 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 vedných disciplínach.

Moderné trendy v oblasti výskumu a využitia poznatkov polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín vo svete poukazujú na smerovanie k rozvoju environmentálnych biotechnológií, či už na úrovni skringingu explantátových kultúr alebo na úrovni odrôd pre šľachtiteľskú prax. Dobrým štartom pre pripojenie sa k tomuto trendu vo výskume je metodologické zvládnutie analýz polymorfizmu enzýmov a jeho najaktuálnejšej genetickej interpretácie na svetovej úrovni a poznanie rozsahu variability, obzvlášť šľachtiteľsky hodnotného biologického materiálu. K tomu smeroval aj náš dlhoročný výskum polymorfizmu enzýmov genofondu kukurice sietej aj iných poľnohospodárskych plodín.

## Záver

Práca prináša výsledky z oblasti hodnotenia samoopelivých línií a hybridov kukurice na báze analýzy a genetickej interpretácie polymorfizmu siedmich a jedenástich druhov enzýmov v rokoch 1990 - 2005. Potvrdzuje na základe analyzovaného súboru 86 samoopelivých línií a ich 53 dvojlíniových hybridov vhodnosť metodologického postupu na 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 (MÚDRY, DRAGŮŇ 2005).

**Pod'akovanie: Výskum bol podporený MP SR – Výskumná úloha (1990 – 1994): N 05 – 529 – 913, Výskumná úloha (1999 – 2002): RVT 27 -11 a Projekt (2003 – 2005) podporený MP SR (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. – DRAGŮŇ, M.: Proteomická klasifikácia samoopelivých línií a ich dvojlíniových hybridov kukurice siatej (*Zea mays* L.). Zb. Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. VÚRV Piešťany, 2005, s. 19-22. ISBN 80-88790-43-3.
4. MÚDRY, P. – JURÁČEK, Ľ.: 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.
5. 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.

**Tabuľka 1: Počet heterozygotných lokusov polymorfizmu siedmich alebo jedenástich druhov enzýmov v dvojlíniových hybridoch kukurice siatej (*Zea mays* L.) analyzovaných v rokoch 1990 – 2005**

Etapa meraní	Dvojlíniový hybrid	Počet heterozygotných lokusov
I. 1990-1994	Sc 3003 x 3004	0
	Sc 3026 x 3027, Sc 4004 x 4012, Sc 4012 x 4004	1
	Sc 4008 x 4007	2
	Sc 4005 x 4014, Sc 4006 x 4001, Sc 4002 x 4003, Sc 4101 x 4102,	3
	Sc 4139 x 4107, Sc 3001 x 4001, Sc 4106 x 4003	
	Sc 4004 x 4005, Sc 4104 x 4105	4
	Sc 3037 x 3036	5
	Sc 3024 x 3002	7
II. 1999-2005	Sc 4112 x 4005, Sc 4020 x 4022	0
	Sc 3106 x 3107, Sc 3103 x 3045, Sc 3064 x 3098, Sc 3006 x 3097	1
	Sc 3048 x 3068, Sc 3105 x 3070, Sc 3032 x 3034, Sc 4001 x 3114,	2
	Sc 3157 x 3119	
	Sc 3098 x 3037, Sc 3053 x 3047, Sc 3048 x 4165, Sc 3097 x 3098,	3
	Sc 3117 x 3118, Sc 4023 x 3151, Sc 3155 x 3163	
	Sc 3048 x 4005, Sc 3075 x 3074, Sc 3041 x 3040, Sc 4165 x 3095,	4
	Sc 4020 x 3127, Sc 3154 x 3119, Sc 3148 x 3163, Sc 3061 x 3098,	
	Sc 3162 x 3119, Sc 3098 x 3159, Sc 3150 x 3036	
	Sc 3052 x 4501, Sc 3079 x 3068, Sc 4001 x 3042, Sc 3122 x 3119	5
	Sc 4149 x 3119	
Sc 3158 x 3119, Sc 3171 x 3161	6	
Sc 3098 x 3153		

## KULTIVAČNÉ METÓDY V HODNOTENÍ FUZARIÓZ ŠŤLŤKOV KUKURICE CULTIVATION METHODS IN MAIZE FUSARIUM EAR ROT EVALUATION

Jozef DRIMAL

*Fusarium species frequency were evaluated after inoculation maize ears of seven maize hybrids differing in earliness. As a test filamentous fungus were used *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* pathogenic on maize ears. For ears inoculation liquid inoculum was used with content of  $10^6$  spores.ml<sup>-1</sup> in dosage 0.5 ml of inoculum per ear. Inoculum was applied by fine spray applicator on the silks at silking stage. Kernels at the harvest time ( 30 – 35 % moisture ) from the different of ear part were analysed by using cultivation method of analysis.*

*The results from kernel cultivation analysis enabled to count frequency of *Fusarium spp.*, in different parts of maize ear and to state measure of *Fusarium spp.*, ability to penetrate into inner parts of ear. Differences in pathogenity were find between tested *Fusarium species*. The most pathogenicity showed *Fusarium culmorum* second *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum*. Tested maize hybrids showed differences in ears sensitivity against *Fusarium species*. According to interaction hybrid x frequency of *Fusarium spp.*, occurrence the high resistance against to all tested *Fusarium species* showed hybrid Quintal. Biological treatment of maize ears with preparate TRICHOMIL was effective against all tested *Fusarium species* in all tested maize hybrids.*

*Key words : Food safety, Fusarium species, Maize ears, Artificial infection, Inokulum*

### Úvod

Výroba zrna kukurice sa v súčasnosti viac orientuje na možnosti širšieho využitia tohoto produktu pri výrobe potravín. Priemyselným spracovaním zrna kukurice sa získava široká škála produktov pre ľudskú výživu, produktov pre výživu hospodárskych zvierat a produktov pre papierenský priemysel.

Pre ľudskú výživu sa lisovaním kukuričných klíčkov, ktoré obsahujú 45 % tuku získava vysokovýživný olej s vysokým obsahom vitamínu E. Enzymatickým štiepením škrobového mlieka sa získavajú sirupy. Dextrózový sirup sa ďalej využíva pri výrobe kyseliny citrónovej. Glukózový a maltózový sirup sa využívajú ako sladidlá. Izoglukóza, fruktózový sirup má široké uplatnenie. Sušený maltodextrát sa využíva pre detskú výživu a športovcov.

Pre výživu zvierat sa zo zrna kukurice získava glutén s obsahom 60 % bielkovín, vláknina, kukuričné proteínovo-škrobové krmivo s obsahom 20 % bielkovín.

Zrno kukurice je vhodným substrátom pre fytopatogénne huby, ktoré výskytom mycélia a najmä produktmi metabolizmu toxického charakteru - toxínmi ako sú zearalenone a ďalšie znižujú hodnotu dopestovaného produktu pre priemyselné spracovanie a môžu byť z pohľadu bezpečnosti potravín a potravinových zdrojov nebezpečné.

Medzi dominantné toxikogénne vláknité huby s vysokou frekvenciou výskytu patria druhy z rodu *Fusarium*. Na kukurici parazituje niekoľko druhov z rodu *Fusarium*, ktoré sa vyznačujú rozdielnou bionómiou. Na zisťovanie ich prítomnosti na šľťku kukurice sa najčastejšie používajú vizuálne metódy hodnotenia. Tieto metódy, ktoré umožňujú vyhodnotiť prítomnosť mycélia huby na povrchu perikarpu zrna a vyjadriť stupeň napadnutia pomocou bodových stupníc však neumožňujú zaznamenať vývoj huby na a vo vnútri vretena šľťka. Vývoj mycélia huby vo vretene šľťka sa prejaví napadnutím spodnej embryonálnej časti zrna, pričom oplodie – perikarp a aleurónová vrstva zrna nenesú známky prítomnosti huby, čím sa pri vizuálnom hodnotení napadnutia šľťka nezaznamenávajú hodnoverné výsledky výskytu fuzariózy.

Metódy povrchovej alebo submerznej kultivácie analyzovaného materiálu na špecifických živných pôdach umožňujú zistiť prítomnosť vláknitých húb a determinovať ich.

### Materiál a metódy

Vývoj na šľťkoch kukurice patogénnych druhov *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* sa sledoval v subvariantoch umelej infekcie šľťkov hybridov kukurice a v dvoch rozdielnych variantoch ošetrovania šľťkov.

Vo variante 1 sa šľťky infikovali tekutým inokulom pripraveným v laboratórnych podmienkach submerznou kultiváciou jednotlivých druhov *Fusarium*. Inokulum obsahovalo pri každom druhu koncentráciu  $10^6$  konidií.ml<sup>-1</sup> a aplikovalo sa postrekom, jemným sprejom v konštantnej dávke 0,5 ml na šľťok v čase kvitnutia šľťkov na blizny.

Vo variante 2 sa šľťky v čase začiatku kvitnutia (objavenie blizien) najprv ošetrili biologickým prípravkom TRICHOMIL v koncentrácii  $10^8$  spór.ml<sup>-1</sup>, ktorý sa aplikoval postrekom jemným sprejom v dávke 0,5 ml na šľťok v čase kvitnutia šľťkov na blizny. Po 72 hodinách sa šľťky ošetrované biologickým prípravkom inokulovali *Fusarium spp.*, rovnakým spôsobom ako vo variante 1

Na zisťovanie senzitivity šľťkov k jednotlivým druhom z rodu *Fusarium* sa vybrali hybridy kukurice domáceho šľachtienia perspektívne obsahom zrna na priemyselné spracovanie pre potravinárske účely.



Vybrané hybridy kukurice Nova, Omeral, Viera, Norika, Tina, Jozefína, Quintal sa navzájom líšili dobou skorosti.

Stav šúľkov po umelom infikovaní rozdielnymi druhmi z rodu *Fusarium* sa v oboch variantoch hodnotil v čase zberovej zrelosti pri 30 – 35 % -nej vlhkosti zrna tak, že sa zo šúľkov kukurice získaných z jednotlivých variantov a subvariantov odoberalo zrno z prvej, druhej a z tretej tretiny šúľka . Zrno sa v steriných podmienkach kultivovalo na pevných agarových živných pôdach ( PGA ), pri teplote 18 – 20<sup>0</sup> C za prístupu denného svetla, pričom sa zaznamenávala frekvencia výskytu kolónií *Fusarium* spp., v 24 hodinových intervaloch.

## Výsledky a diskusia

Zvolená metóda umelého infikovania šúľkov tekutým inokulom s definovanou koncentráciou infekcieschopných konidií zabezpečila v prírodných podmienkach dostatočný stupeň infekcie a umožnila vyhodnotiť prejavy jednotlivých sledovaných druhov z rodu *Fusarium* na šúľku kukurice. V porovnaní s metódami inokulácie ako ich uvádzajú SMILJAKOVIČ (1972 ), DRIMAL (1989) a metódami hodnotenia podľa CHRISTENSEN -WILKOXONA (1966) nedochádza pri nami navrhovanej a skúšanej metóde k mechanickému poškodeniu šúľka a tým nežiadúcemu ovplyvneniu hodnotenia prejavu fuzariózy na šúľku. Nami navrhovaná metóda umelej infekcie *Fusarium* spp., je viac blízka natívnej infekcii.

Hybridy kukurice prejavili rozdielnu citlivosť šúľkov k jednotlivým druhom *Fusarium*. Výsledky kultivačnej analýzy výskytu sledovaných druhov *Fusarium* pri jednotlivých hybridoch kukurice sú uvedené v grafoch 1 – 3.

Frekvencia výskytu druhov *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* na zrne z prvej tretiny šúľka je pomerne vyrovnaná v porovnaní s ostatnými hybridmi nižšia pri hybride Nova (graf 1). Výrazne vyššia frekvencia výskytu *Fusarium moniliforme* sa zaznamenala pri hybridoch Tina a Quintal. Pri druhu *Fusarium culmorum* sa vyššie hodnoty frekvencie výskytu zistili na zrne hybridov Omeral a Viera. Hodnoty frekvencie výskytu druhu *Fusarium culmorum* vykázali v rámci testovaných hybridov najnižšiu variabilitu čo sa prejavilo v priemernej hodnote za hybridy, ktorá je v porovnaní s výskytom druhov *Fusarium moniliforme* a *Fusarium graminearum* vyššia.

Analýza zrna z druhej tretiny šúľka poukázala na schopnosť testovaných druhov *Fusarium* prenikať do vnútra šúľka. Frekvencia výskytu jednotlivých druhov *Fusarium* bola pri jednotlivých hybridoch rozdielna (graf 2). Podobný priebeh frekvencie výskytu ako pri analýze zrna z prvej tretiny šúľka avšak s nižšími hodnotami sa prejavil pri hybride Nova. Pri hybride Omeral sa zaznamenal vysoký výskyt druhu *Fusarium culmorum*, čo svedčí o výraznej schopnosti druhu prenikať a vyvolať infekciu vo vnútorných štruktúrach šúľka. Vyššie hodnoty frekvencie výskytu *Fusarium moniliforme* v druhej tretine šúľka sa zaznamenali tak ako pri hodnotení zrna z prvej tretiny šúľka pri hybridoch Tina a Quintal.

Výsledky kultivačnej analýzy zrna z tretej tretiny šúľka vykázali prítomnosť druhov *Fusarium* v analyzovanom zrne. Zmenil sa však podiel výskytu druhov *Fusarium* v porovnaní s hodnotami predchádzajúcich analýz zrna z prvej a z druhej tretiny šúľka. Vysoké hodnoty frekvencie výskytu sa zaznamenali pri druhu *Fusarium culmorum* na zrne hybrida Omeral. Vysoký výskyt druhu *Fusarium culmorum* potvrdil schopnosť druhu dosiahnuť v priebehu druhej polovice vegetácie maximálnych hodnôt stupňa napadnutia šúľka. Vysoké hodnoty frekvencie výskytu druhu *Fusarium moniliforme* sa zaznamenali pri hybride Tina (graf 3).

Po ošetrení šúľkov biologickým prípravkom TRICHOMIL došlo k zmene mykologických pomerov na šúľku. Supresívny účinok prípravku sa prejavil vo významne nižšom vývoji *Fusarium* spp., po umelom infikovaní šúľkov kukurice.

Pri hodnotení frekvencie výskytu *Fusarium* spp., na zrne z prvej tretiny šúľka malo ošetrenie šúľkov na začiatku kvitnutia efektívny účinok proti aplikovaným druhom *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* pri hybridoch Nova, Omeral, Norika, Tina, Jozefína, Quintál. Pri hybride Viera sa zaznamenali vysoké hodnoty frekvencie výskytu *Fusarium culmorum*. Druhy *Fusarium culmorum* a *Fusarium moniliforme* sa nevyskytli na zrne pri hybride Quintal (graf 4).

Na zrne z druhej tretiny šúľka sa v priemere za hybridy kukurice znížila frekvencia výskytu *Fusarium* spp. Nezaznamenal sa výskyt *Fusarium moniliforme* pri hybridoch Omeral a Quintal a výskyt druhu *Fusarium graminearum* pri hybridoch Jozefína a Quintal. Schopnosť prieniku mycélia huby do vnútorných štruktúr šúľka sa zaznamenala pri druhu *Fusarium culmorum*. Zvlášť vysokým stupňom senzitivity šúľkov na tento druh sa vyznačoval hybrid Viera pri ktorom sa vyskytol vo vyšších hodnotách aj druh *Fusarium graminearum*. Druhy *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum* sa nevyskytli na zrne hybrida Quintal (graf 5).

Výsledky kultivačnej analýzy zrna z tretej tretiny šúľka (graf 6) poukázali na v priemere za súbor skúšaných hybridov nižšie hodnoty frekvencie výskytu všetkých testovaných druhov *Fusarium* v jednotlivých

častiach šúľka. Na zrne z tretej tretiny šúľka sa pri hybridoch Omeral, Viera, Norika, Quintal nevyskytol druh *Fusarium moniliforme*. Schopnosť prieniku do vnútorných štruktúr šúľka sa potvrdila pri druhu *Fusarium culmorum* a to najmä pri senzitívnom hybride Viera, pri ktorom sa zaznamenala aj vysoká frekvencia výskytu druhu *Fusarium graminearum*. Tento druh sa vyskytol tiež na zrne z tretej tretiny šúľka aj pri hybride Quintal, pričom na zrne v prvých dvoch tretinách šúľka sa nevyskytol. Výskyt druhu *Fusarium culmorum* v rozdielnom stupni sa zaznamenal tiež pri hybridoch Nova, Omeral, Norika a Jozefína.

## Záver

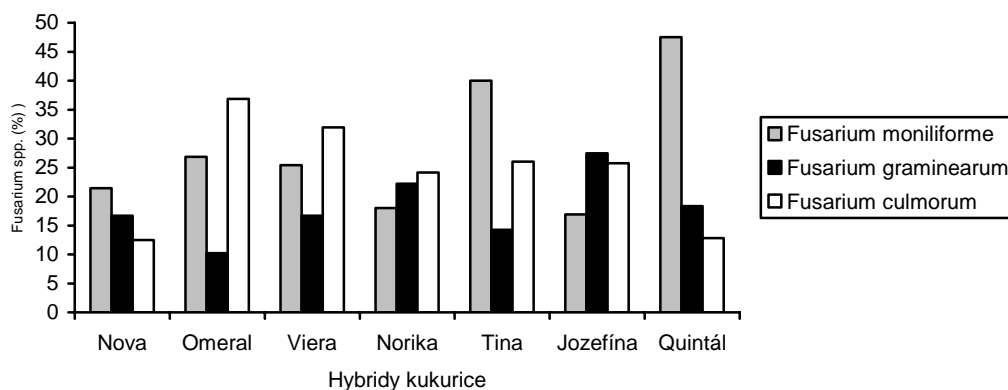
Rozdielnosť bionómie druhov z rodu *Fusarium* patogénnych na kukurici si vyžaduje tvorbu nových metód na hodnotenie patogenity jednotlivých druhov a tvorbu metód na hodnotenie senzitivity východiskových materiálov pre šľachtenie kukurice na rezistenciu šúľkov. Šľachtenie na rezistenciu predpokladá používať vhodné metódy inokulácie a kultivačné metódy hodnotenia stupňa napadnutia po umelom infikovaní, ktoré umožnia efektívny výber vhodných východiskových materiálov na tvorbu homozygotných zdrojov rezistencie, analýzu ich kombinačnej schopnosti pri získavaní hybridných materiálov.

Dosiahnuté výsledky predstavujú prehľad o reakcii a citlivosti šúľkov vybraného súboru hybridov kukurice domáceho šľachtienia na dominantné druhy z rodu *Fusarium*, ktoré sú patogénne na kukurici. Pomocou použitých kultivačných metód sa získali poznatky o prejavoch patogenity druhov *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* na zrne v rozdielnych častiach šúľka.

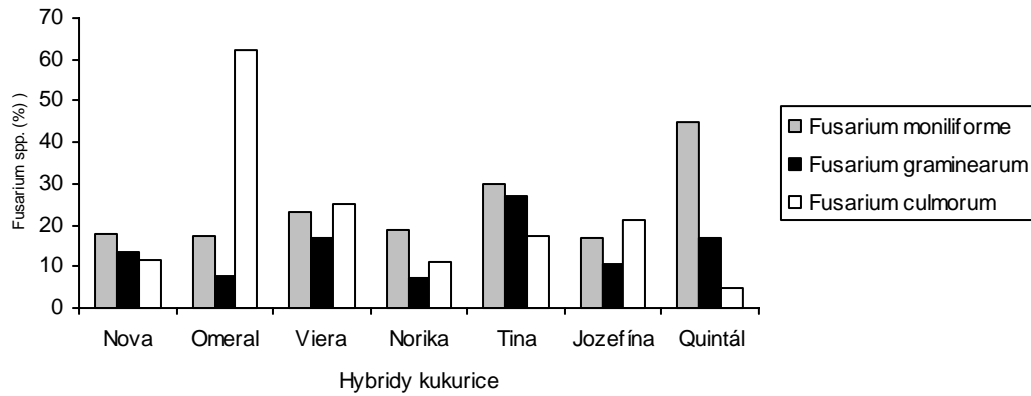
Aplikované metódy inokulácie šúľkov kukurice rozdielnymi druhmi z rodu *Fusarium* a kultivačné metódy na stanovenie frekvencie výskytu patogénneho druhu v rozdielnych častiach šúľka umožnilo vyhodnotiť účinnosť biologickej ochrany šúľkov. Aplikovaný biologický prípravok TRICHOMIL efektívne pôsobil proti všetkým testovaným druhom z rodu *Fusarium*.

## Literatúra

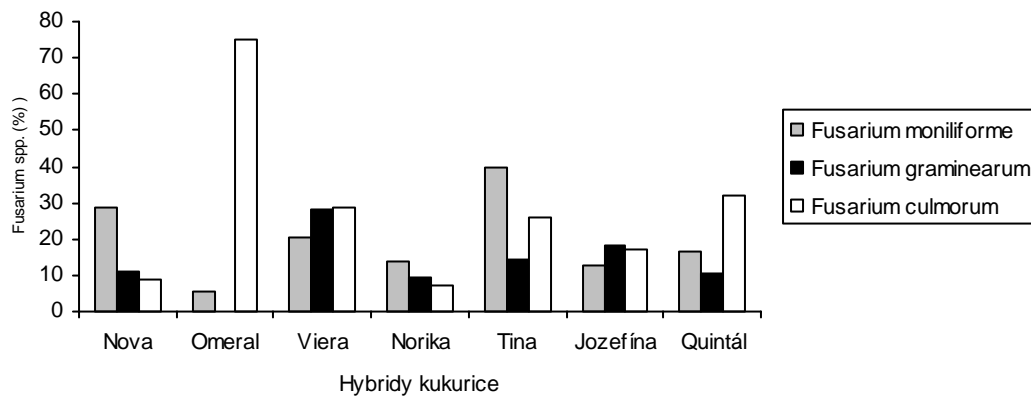
1. DRIMAL, J. ( 1989 ): Zvyšovanie odolnosti genotypov kukurice proti hubovitým chorobám. Záverčná správa VÚKu Trnava, 1989, 93s.
2. SMILIAKOVIČ, H. ( 1972 ) : Maize rot in Yugoslavia. Actas III. Congr., na fitopat.medit.oeiras, okt., 1972, s. 22 – 28.
3. CHRISTENSEN, J.J.- WILCOXON, R.D. ( 1966 ) : Stalk rot of corn.Monograph.No3.The American Phytopathological Society, 1966, 58s.



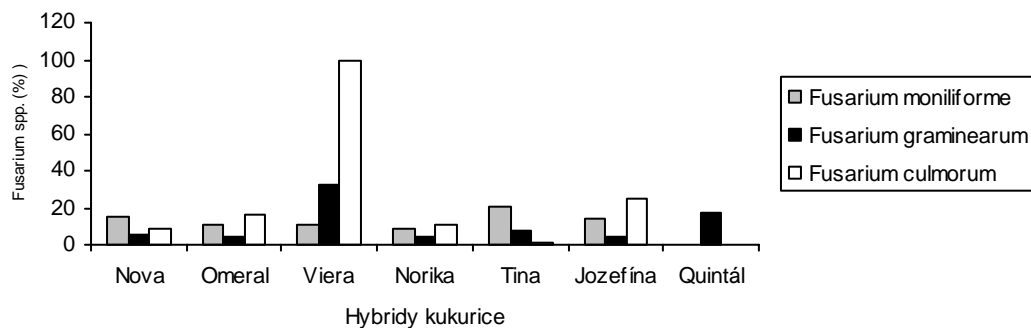
**Graf 1: Frekvencia výskytu *Fusarium* spp. v prvej tretine šúľka po umelom infikovaní šúľkov**



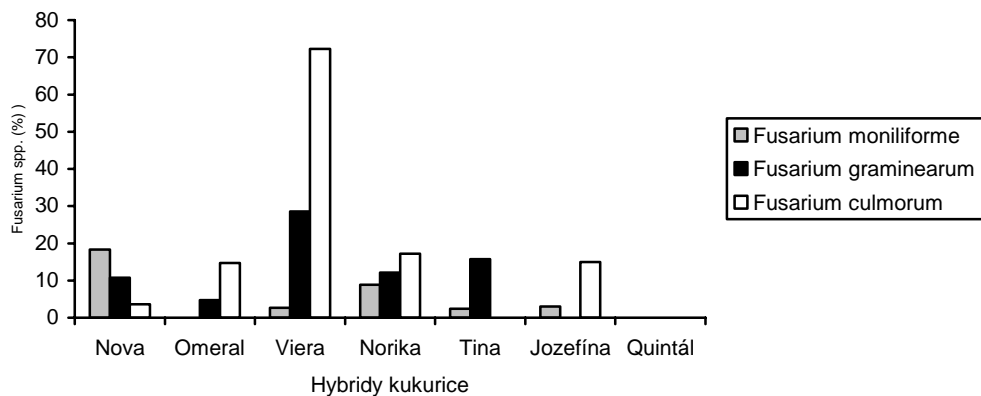
**Graf 2: Frekvencia výskytu *Fusarium* spp. v druhej tretine šúľka po umelom infikovaní šúľkov**



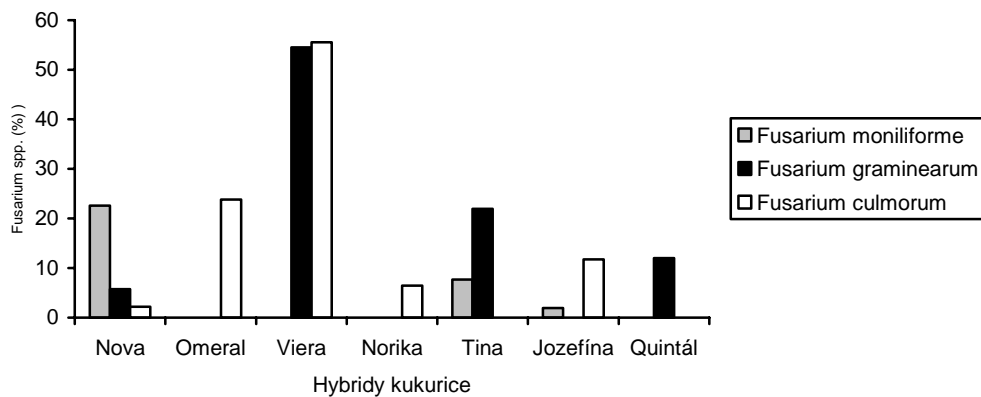
**Graf 3: Frekvencia výskytu *Fusarium* spp. v tretej tretine šúľka po umelom infikovaní šúľkov**



**Graf 4: Frekvencia výskytu *Fusarium* spp. v prvej tretine šúľka po umelom infikovaní šúľkov ošetrených biologickým prípravkom TRICHOMIL**



**Graf 5: Frekvencia výskytu Fusarium spp. v druhej tretine šúľka po umelom infikovaní šúľkov ošetrených biologickým prípravkom TRICHOMIL**



**Graf 6: Frekvencia výskytu Fusarium spp. v tretej tretine šúľka po umelom infikovaní šúľkov ošetrených biologickým prípravkom TRICHOMIL**

☒

☒

## MIKROSATELITOVÉ MARKERY *pm5* LOKUSU V ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH ODRODÁCH PŠENICE (*Triticum aestivum* L.) MICROSATELLITE MARKERS OF *pm5* LOCUS IN CZECH AND SLOVAK WHEAT CULTIVARS (*Triticum aestivum* L.)

Peter CIVÁŇ – Miroslav ŠVEC

*Powdery mildew caused by Blumeria graminis DC. f. sp. tritici is one of the most important fungal disease in common wheat (Triticum aestivum L.) worldwide. Recessive powdery mildew resistance gene pm5 seems to be multiallelic and cultivars possessing this gene exhibit relatively high levels of resistance in field conditions, even though virulent races of pathogen have been stabilised in populations already. Slovak common wheat cultivar Ilona and Czech cultivars Regina and Zdar carry recessive powdery mildew resistance alleles pm5b, pm5a and unspecified pm5 allele, respectively. Two microsatellite markers, namely Xgwm1267 and Xgwm783, closely linked to pm5 locus were used to distinguish different alleles in these cultivars. Highly polymorphic microsatellite marker Xgwm783 amplified various products in all tested cultivars and hence, it could be beneficial for marker-assisted selection and gene pyramiding in breeding programs. By means of bulked segregants, it was also demonstrated that new recessive powdery mildew resistance gene in Texas wheat variety TAM110 is not allelic with pm5 locus.*

*Key words: pm5 alleles, microsatellite markers, Regina, Ilona, Zdar, TAM110, marker assisted selection, bulked segregants*

### Úvod

Jedným z celosvetovo najzávažnejších ochorení pšenice je múčnatka trávová, ktorú spôsobuje huba *Blumeria graminis* DC. f. sp. *tritici*. Múčnatka je ektoparazit vegetujúci na listoch a stebľoch, ktorý pri rozsiahlom napadnutí oslabuje celú rastlinu a zapríčiňuje tak každoročné straty na úrode. Účinným spôsobom boja proti tomuto ochoreniu pšenice je využívanie génov rezistencie, čo je ekonomický a zároveň ekologický prístup redukujúci aplikáciu fungicidov. Životný cyklus múčnatky trávovej a spôsob jej šírenia však umožňuje vysokú variabilitu a dynamiku populácií patogéna, ktorý vstupuje s hostiteľom do koevolúcie. Gény špecifickej rezistencie pšenice tak môžu byť rýchlo prekonané selekciou nových rás patogéna disponujúcich príslušnými génmi virulencie. Z tohto dôvodu je nevyhnutné hľadať stále nové genetické zdroje voči tomuto ochoreniu.

V súčasnosti je známych a chromozomálne lokalizovaných 31 tzv. *Pm* (powdery mildew) génov špecifickej rezistencie pšenice voči múčnatke, pričom pre gény *Pm1*, *Pm3*, *Pm4*, *pm5* a *Pm8* bola preukázaná existencia viacerých alel (McINTOSH et al., 2003). Spomedzi všetkých *Pm* génov bol iba pre gén *pm5* preukázaný recesívny spôsob dedičnosti. Gén *pm5* pochádza z Jaroslavskej dvojzrnky (*T. dicoccum* Schübl) a prvýkrát bol prenesený do kultivaru Hope. Tento recesívny gén bol následne lokalizovaný na chromozomálnom ramienku 7BL. Podobnou reakciou na izoláty múčnatky sa prejavovali aj odrody ako Aquila, Ibis a i., nesúce gén rezistencie dočasne označený ako *Mli*. Analýza rodokmeňov nemeckých odrôd nesúcich gén *Mli* odhalila pôvod tohto génu rezistencie v materiáli zozbieranom v Hindukush v tridsiatych rokoch min. st. (HSAM et al., 2001). HSAM et al. (2001) pomocou testov alelizmu dokázali, že sa jedná o rôzne alely génu *pm5* a označili ich ako *pm5a* (Hope, Selpék), *pm5b* (Ibis, Kormoran). Ďalšími alelami *pm5* lokusu sú *pm5c* (*T. sphaerococcum* var. *rotundatum* – odroda Kolandi), *pm5d*, alela *pm5e* (HUANG et al., 2003) a alely dočasne označené ako *mljy* a *mlsy* (HUANG et al., 2002).

Techniky molekulárnych markerov, najmä RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) a mikrosatelity (SSR – Simple Sequence Repeats) sú široko využívaným nástrojom na označenie génov rezistencie pšenice. Práve mikrosatelity sa javia ako najperspektívnejšia z uvedených metód, a to vďaka niekoľkým prednostiam: (i) odhaľujú vyšší stupeň polymorfizmu v pšenici než akýkoľvek iný systém, (ii) sú multialelické a (iii) kodominantne dedené (RÖDER et al., 1998). RÖDER et al. (1998 a nepublikované dáta) vyvinuli veľké množstvo mikrosatelitových markerov a skonštruovali prvú mikrosatelitovú mapu hexaploidnej pšenice. HUANG et al. (2003) nedávno identifikovali mikrosatelitové markery vo väzbe s génom *pm5e*, pričom vzdialenosť markerov *Xgwm783* a *Xgwm1267* od tohto génu bola 11,0; resp. 6,6 cM.

Hlavným cieľom tejto práce bola mikrosatelitová charakterizácia česko-slovenských odrôd Regina, Ilona a Zdar, vlastniacich alely génu *pm5*, s využitím spomínaných markerov *Xgwm783* a *Xgwm1267*. Zároveň sme chceli pomocou tých istých markerov testovať americkú odrodu TAM110. V tejto odrode sme totiž identifikovali nový gén rezistencie, pre ktorý sme potvrdili recesívny charakter (nepublikované výsledky). Keďže TAM110 má vo svojom rodokmeni *T. dicoccum*, primárnou otázkou bolo, či táto odroda nevlastní novú alelu lokusu *pm5*.

## Materiál a metódy

### Rastlinný materiál

Ozimné odrody pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) Regina, Ilona, Zdar, ako aj odrodu TAM110 sme získali z génovej banky VÚRV (Výskumný ústav rastlinnej výroby) Piešťany. Odroda Regina bola vyšľachtená v šľachtiteľskej stanici Uhřetice a bola v nej identifikovaná alela *pm5a*. Analýzou rodokmeňa sme zistili, že zdroj *pm5* rezistencie tejto odrody pochádza pravdepodobne z rodičovskej odrody Tadorna, ktorá má vo svojom rodokmeni líniu Heine2167 vyvinutú z materiálu zozbieraného v Hindukush v 30-tych rokoch min. st. V odrode Ilona (šľachtiteľská stanica Bučany) bola identifikovaná alela *pm5b*. Z jej rodokmeňa, ako ani z rodokmeňa odrody Zdar nie je možné dedukovať donora *pm5* génu. Pre odrodu Zdar (Šľachtiteľská stanica Uhřetice) nebola bližšie špecifikovaná alela *pm5* lokusu. Línia odrody Chinese Spring nuli-tetrazomická pre chromozómy 7B-7D (CS 7B-7D) bola poskytnutá prof. Endom, Kyoto University, Japonsko. Odroda TAM110 bola vyšľachtená v TEAS (Texas Agricultural Experiment Station). V jej rodokmeni sa nachádza odroda Largo, ktorá vznikla krížením *Triticum dicoccum* s *Aegilops tauschii*. Odrodu TAM110 sme krížili s náchylnou odrodou Košútka a F<sub>2</sub> generáciu tohto kríženia sme testovali izolátmi múčnatky avirulentnými k novému génu rezistencie odrody TAM110.

### Extrakcia genómovej DNA

Celková genómová DNA bola izolovaná z etiolizovaných klíčkov odrôd Zdar, Ilona, Regina, Košútka, Chinese Spring (euploid), TAM110, línie CS 7B-7A, z desiatich náchylných a desiatich rezistentných jedincov F<sub>2</sub> generácie kríženia Košútka x Tam110 podľa DOYLE a DOYLE (1990) s malými modifikáciami. Koncentrácia extrahovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky. Zmiešaním ekvimolárných množstiev DNA desiatich rezistentných a desiatich náchylných jedincov F<sub>2</sub> generácie Košútka x Tam110 sme získali rezistentný a senzitívny „bulk“ („R-bulk“, „S-bulk“) (MICHELMORE et al., 1991).

### Mikrosatelitová analýza

Použité boli dva mikrosatelitové markery *Xgwm1267* a *Xgwm783*, ktoré sú vo väzbe s *pm5* lokusom vo vzdialenostiach 6,6; resp. 11,0 cM (HUANG et al., 2003). Sekvenciu primera *Xgwm1267* nám poskytol Dr. Ganai z TraitGenetics (Gatersleben, Nemecko) a sekvenciu primera *Xgwm783* Dr. Röder z IPK Gatersleben. Primery boli použité na hľadanie polymorfizmov v uvedených odrodách a medzi oboma „bulkmi“. PCR reakčná zmes (25 µl) pozostávala z 20 ng templátovej DNA (50-100 ng v prípade „R-bulk“ a „S-bulk“), 250 nM ľavého a pravého primeru, 1U *Taq* DNA polymerázy (HotStar plus, Qiagen), 2,5 µl 10 x PCR tlmivého roztoku (obsahuje 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) a 0,2 mM dNTP (Fermentas). PCR program pozostával z 5 min úvodnej denaturácie pri 95°C, 45 cyklov (1 min denaturácia pri 94°C, 1 min anelácia pri 65°C pre primer *Xgwm1267* a 54°C pre primer *Xgwm783*, 1 min polymerizácia pri 72°C) a 8 min záverečnej polymerizácie pri 72°C. PCR produkty boli separované na „ready-to-use“ géloch Spreadex EL500 mini (Elchrom Scientific) v 35 mM TAE tlmivom roztoku pri konštantnom napätí 10 V/cm počas 2 h (*Xgwm1267*) resp. 1,75 h (*Xgwm783*). Následne boli farbené etídium bromidom a vizualizované UV svetlom.

## Výsledky a diskusia

Primer *Xgwm1267* generoval v analyzovanom súbore odrôd niekoľko polymorfnych PCR produktov v oblasti 125 – 155 bp a navyše pri odrodách Košútka, TAM110 a v F<sub>2</sub> generácii ich kríženia šmuhu v oblasti 155 – 190 bp. HUANG et al. (2003) uvádzajú, že 136-bp dlhý produkt tohto primera v odrode „Fuzhuang 30“ je vzdialený od *pm5e* alely 6,6 cM. Rovnaký produkt však detegovali aj pri odrode Chinese Spring, ktorá nedisponuje *pm5* génom rezistencie. V našich experimentoch sme pri Chinese Spring tiež pozorovali 136-bp dlhý produkt (tab. 1), ktorý absentoval v nuli-tetrazomickej línii Chinese Spring CS 7B-7D (chromozómový pár 7B je nahradený ďalším párom 7D chromozómov), čo dokazuje lokalizáciu tohto markera na chromozóme 7B. 136-bp dlhý produkt bol však pozorovaný aj pri odrode Regina (alela *pm5a*) a tiež Ilona (alela *pm5b*) (tab. 1), z čoho vyplýva, že tento marker, hoci je v relatívne tesnej väzbe ku génu *pm5*, nie je schopný odlišovať jednotlivé *pm5* alely, pravdepodobne kvôli nízkemu stupňu polymorfizmu tohto mikrosatelitového lokusu. Pre odrodu Zdar, ktorej alela *pm5* génu dosiaľ nebola bližšie určená, sme detegovali produkt s dĺžkou 141 bp, čo naznačuje, že táto odroda by mohla niesť inú alelu *pm5* génu než odrody Regina a Ilona, príp. by odroda Zdar mohla mať iného donora *pm5* rezistencie ako odrody Regina a Ilona.

Primer *Xgwm783*, ktorého 105-bp dlhý produkt bol v odrode „Fuzhuang 30“ zmapovaný do vzdialenosti 11,0 cM od alely *pm5e* (HUANG et al., 2003), generoval pri všetkých analyzovaných odrodách jeden hlavný PCR produkt zväčša sprevádzaný dvoma slabšími produktmi líšiacimi sa v dĺžke o +2, resp. -2 bp (obr. 1 a 2). Keďže nejde o nešpecifické produkty (aneláčna teplota pre primer bola určená na základe priemeru T<sub>m</sub> pre pravý a ľavý primer, bola vyššia o 4°C než akú pre daný primer uvádza HUANG et al. (2003) a jej zvýšenie o ďalší stupeň malo za následok výrazné oslabenie signálu), môže ísť o artefakty chybnej amplifikácie v samotnej PCR reakcii. Prítomnosťou 103-bp dlhého produktu pri Chinese Spring a absenciou akéhokoľvek produktu v línii CS 7B-7D (tab. 1) sme aj v tomto prípade potvrdili lokalizáciu tohto mikrosatelitového lokusu na chromozóme 7B. Navyše, primer *Xgwm783*

produkoval pri každej odrode inú alelu, takže sa zdá, že tento marker môže byť diagnostický pre jednotlivé alely *pm5* lokusu.

Gén *pm5* je často zastúpený v čínskych a európskych kultivaroch, avšak frekvencia virulencie voči tomuto génu sa v európskych populáciách patogéna blíži k hodnote 100% a táto virulencia bola stabilizovaná (ŠVEC et al., 1993; ŠVEC a MIKLOVIČOVÁ, 1998). Napriek tomu, odrody nesúce gén *pm5* sa prejavujú tzv. reziduálnou rezistenciou a ich odolnosť voči múčnatke je v poľných podmienkach relatívne vysoká (ŠVEC a MIKLOVIČOVÁ, 1998). Význam génu *pm5* zvyšujú tiež jeho nové alely identifikované v posledných rokoch (HUANG et al., 2002; HUANG et al., 2003). Kodominantné mikrosatelitové markery schopné rozlišovať prítomnosť jednotlivých alel *pm5* lokusu môžu byť preto veľmi užitočné pri markeri-sprostredkovanvej selekcii v šľachtiteľských programoch.

Primery *Xgwm1267* a *Xgwm783* amplifikovali pri odrode TAM110 veľkostne odlišné produkty v porovnaní s odrodami Regina, Ilona a Zdar, čo hneď naznačuje, že recesívny gén rezistencie odrody TAM110 je odlišný od *pm5* alieli česko-slovenských odrôd (obr. 1 a 2, tab. 1). Prítomnosť génu *pm5* sme pri odrode TAM110 jednoznačne vyvrátili prostredníctvom „bulked segregant analysis“ (MICHELMORE et al., 1991). Z tabuľky 1 je zrejmé, že v odrode Košútka, ktorá nenesie žiadne gény rezistencie voči múčnatke, sme detegovali nulové alely pre použité mikrosatelitové markery. V odrode TAM110 boli zistené produkty pri oboch markeroch. Keďže použité mikrosatelitové markery sú v tesnej väzbe s lokusom *pm5*, očakávali by sme, že „R-bulk“ a „S-bulk“ zostavený z DNA rezistentných, resp. senzitivných homozygotných jedincov F<sub>2</sub> generácie kríženia Košútka x TAM110, sa bude líšiť v mikrosatelitových profiloch. Keďže mikrosatelitové profily rezistentného a senzitivného „bulku“ sa pri oboch markeroch nelíšili (obr. 1), nový recesívny gén rezistencie odrody TAM110 nie je alelou *pm5* lokusu.

SINGRÜN et al. (2004) nedávno identifikovali nový recesívny gén rezistencie pšenice voči múčnatke, ktorý dočasne označili *mlRD30* a lokalizovali ho pomocou mikrosatelitov do terminálneho regiónu chromozómu 7AL. Tieto výsledky spolu s našimi zisteniami ukazujú, že *pm5* nie je jediným génom rezistencie s recesívnymi alelami.

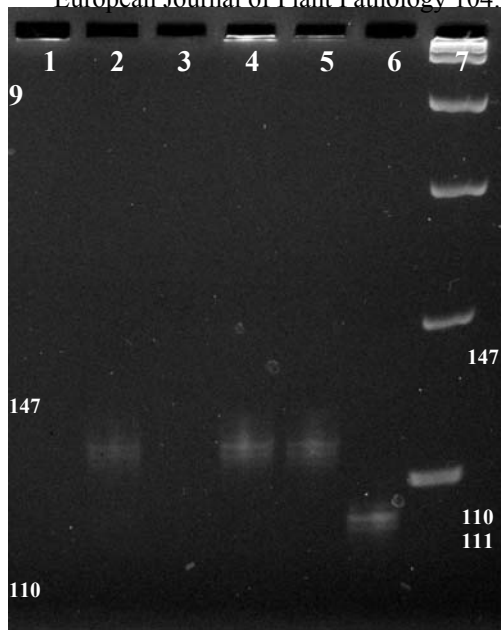
## Závery

1. Mikrosatelitový marker *Xgwm1267* nevykazuje dostatočný polymorfizmus na odlišovanie jednotlivých alel *pm5* génu.
2. Mikrosatelitový marker *Xgwm783* vzájomne odlišil odrody Regina, Ilona a Zdar, je teda využiteľný pre markeri-sprostredkovanú selekciu, no pravdepodobne nie je diagnostický pre všetky *pm5* alely, keďže v odrode Regina (*pm5a*) amplifikoval rovnako dlhý produkt ako v odrode Fuzhuang 30 (*pm5e*).
3. Nový recesívny gén rezistencie v odrode TAM110 nie je alelický s *pm5* lokusom.

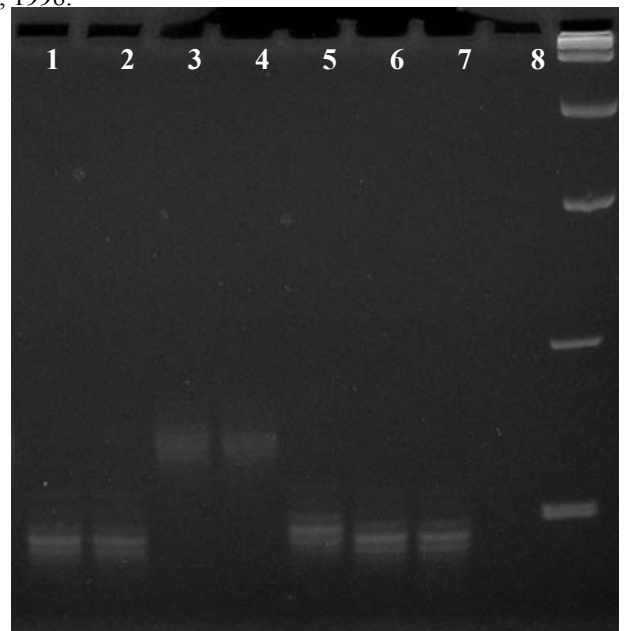
## Literatúra

1. DOYLE, J.J. – DOYLE, J.L.: Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15, 1990.
2. HSAM, S.L.K. – HUANG, X.Q. – ZELLER, F.J.: Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. Thell.) 6. Alleles at the *Pm5* locus. Theor Appl Genet 102: 127-133, 2001.
3. HUANG, X.Q. – HSAM, S.L.K. – ZELLER, F.J.: Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in Chinese wheat lines Jieyan 94-1-1 and Siyan 94-1-2. Hereditas 136: 212-218, 2002.
4. HUANG, X.Q. – WANG, L.X. – XU, M.X. – RÖDER, M.S.: Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm5e* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 106: 858-865, 2003.
5. MCINTOSH, R.A. – YAMAZAKI, Y. – DEVOS, K.M. – DUBCOVSKY, J. – ROGERS, W.J. – APPELS, R.: Catalogue of gene symbols for wheat. Proceed. 10<sup>th</sup> Intern. Wheat Genet. Symposium, Paestum, Italy 1.-6. Sept. 2003, Vol.4, 2003.
6. MICHELMORE, R.W. – PARAN, I. – KESSELI, R.V.: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Genetics 88: 9828-9832, 1991.
7. RÖDER, M.S. – KORZUN, V. – WENDEHAKKE, K. – PLASCHKE, J. – TIXIER, M. – LEROY, P. – GANAL, M.W.: A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007-2023, 1998.
8. SINGRÜN, CH. – HSAM, S.L.K. – ZELLER, F.J. – WENZEL, G. – MOHLER, V.: Localization of a novel recessive powdery mildew resistance gene from common wheat line RD30 in the terminal region of chromosome 7AL. Theor Appl Genet 109: 210-214, 2004.
9. ŠVEC, M. – MIKLOVIČOVÁ, M. – SÝKORA, M.: Virulence Analysis of Wheat Powdery Mildew Population (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) from the Region of Slovakia and Hungary. Folia Microbiol. 38 (6): 497-500, 1993.

10. ŠVEC, M. – MIKLOVIČOVÁ, M.: Structure of populations of wheat powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC f.sp. *tritici* Marchal) in Central Europe in 1993-1996: I. Dynamics of virulence. European Journal of Plant Pathology 104: 537-544, 1998.



Obrázok 1: Primer *Xgwm783*. Dráhy: 1 Košútka, 2 TAM110, 3 CS 7B-7D, 4 „R-bulk“, 5 „S-bulk“, 6 CS-euploid, 7 štandard molekulových hmotností pUC19 DNA/*MspI*.



Obrázok 2: Primer *Xgwm783*. Dráhy: 1 Regina, 3 Ilona, 8 neg. kontrola, 9 štandard molekulových hmotností pUC19 DNA/*MspI*. V dráhach 2, 4, 5, 6 a 7 sú rôzne odrody s *pm5* génom.

Tabuľka 1: Polymorfizmus produktov mikrosatelitových markerov v testovanom súbore.

Odroda/línia/„bulk“	<i>pm5</i>	Veľkosť fragmentov (bp)	
		<i>Xgwm1267-7B</i>	<i>Xgwm783-7B</i>
Chinese Spring (euploid)	-	136	103
CS 7B-7D	-	-	-
Regina	<i>pm5a</i>	136	105
Ilona	<i>pm5b</i>	136	127
Zdar	<i>pm5</i>	141	83
TAM110	?	140-146 (šmuha)	117
Košútka	-	-	-
„R-bulk“	?	140-146 (šmuha)	117
„S-bulk“	-	140-146 (šmuha)	117
Fuzhuang 30*	<i>pm5e</i>	136	105
Nongda*	-	142	103

\* dáta podľa HUANG et al., 2003

✉

✉

Mgr. Peter Civiň, RNDr. Miroslav Švec<sup>1</sup>, CSc., Katedra genetiky PriF UK, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava  
<sup>1</sup>korešpondenčná adresa: [mšvec@fns.uniba.sk](mailto:mšvec@fns.uniba.sk)



## REAKCIA GENOTYPOV PŠENICE NA *FUSARIUM CULMORUM* REACTION OF WHEAT GENOTYPES TO *FUSARIUM CULMORUM*

Štefan MASÁR - Martin PASTIRČÁK

*Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. one of causal organisms of fusarium head blight (FHB) has become a major pathogen of wheat. This study was conducted to examine disease assessment parameters used to assess FHB disease levels to identify the parameters most useful in discerning resistance and predicting losses in grain yield. The second objective was to evaluate wheat genotypes to have resistance or tolerance to FHB to experimental exploitation genotypes express resistance to FHB. Genotypes were inoculated by conidial suspension in the flowering stage (Zadoks 65). Mean squares and interactions were determined using the ANOVA procedure. A wide range in level of resistance was observed among genotypes and hybrids. The cultivars such as GK Héja, GK Szálka, Istar, Holiday, Idol and Dream and hybrids Rada x Arida, Sana x Stoa and Solida x Sumai 3 had low scores for FHB assessment according to AUDPC value.

Keywords: *Fusarium culmorum*, AUDPC, wheat

### Úvod

Klasové fuzariózy (FHB, fusarium head blight), reprezentované druhmi rodu *Fusarium* ssp. (*F. graminearum* Schwab - *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch), *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc., a *F. avenaceum* (Fr.:Fr.) Sacc.) poškodzujú mnohé kultúrne rastliny. Patogén napáda mnohé druhy obilnín, najviac však pšenicu. Rezistencia proti FHB je často spojená s ďalšími agronomickými znakmi, t.j. úrodnosť, kvalita a rezistencia proti ostatným dôležitým chorobám (MESTERHAZY, 1995; BUERSTMAYR et al., 1996; HILTON et al., 1996; SIP a STUHLIKOVA, 1997; MILUS a WEIGHT, 1998). Medzi mnohými zdrojmi rezistencie voči pôvodcom fuzariózy klasov pšenice sú uvádzané jarné pšenice z Číny a Japonska (Sumai 3), alebo z Južnej Ameriky (Frontana). Odroda Ning 7840 pochádza zo Sumai 3, má aj rezistenciu voči múčnatke trávovej a niektorým hrdziam a lepšie agronomické vlastnosti (YE et al., 1996).

### Materiál a metódy

Od roku 2005 sme na odolnosť proti *Fusarium culmorum* analyzovali genetické zdroje a hybridné populácie pšenice letnej formy ozimnej. Výbery z 3 populácií F<sub>3</sub> generácie hybridov 1. Rada x Arida, 2. Rada x Armelis a 3. Rada x SO997 z VŠS Malý Šariš pozostávali v každej populácii z 50 klasových výberov pripravených na VŠS Malý Šariš vo vegetácii roku 2003/2004. Analyzovali sme aj populácie F<sub>2</sub> generácie hybridov odrôd Rada, Sana, Solida, Torysa a Vanda s donorami rezistencie proti FHB genotypmi Stoa a Sumai 3.

Rastliny pšenice boli inokulované spórmi *Fusarium culmorum* s koncentráciou 2.10<sup>6</sup> spór v ml. Klasy boli inokulované na začiatku kvitnutia (Zadoks 65). Použitý izolát *Fusarium culmorum* bol izolovaný zo zrna pšenice z lokality Spišská Belá. Vizuálne symptómy sa hodnotili a zaznamenávali v % napadnutia (WANG et al., 1982). Z odpozorovaných údajov sa vypočítala hodnota, plocha pod úrovňou rozvoja napadnutia chorobou - AUDPC. AUDPC sme vypočítali podľa vzorca  $AUDPC = \sum(y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i)$  kde y je napadnutie a t je počet dní medzi hodnoteniami. Výsledky sme spracovali v programe SPSS for Windows.

### Výsledky a diskusia

V súbore GZA05 bolo 15 genotypov: Z tabuľky analýzy rozptylu vyplýva, že medzi odrodami boli významné rozdiely v hodnotách AUDPC (tab. 1). Priemerné hodnoty AUDPC sú v tabuľke 2. Najnižšie hodnoty AUDPC pre FHB mali genotypy GK Héja, GK Szálka a Istar. Významné rozdiely boli medzi odrodami s najvyššími hodnotami AUDPC Biscay, Centrum, Karpos, Eclipse a Orton a najnižšími hodnotami AUDPC Cubus, Grandios, GK Forrás, GJK Héja, GK Szálka a odrodou Istar.

V súbore genetických GZB05 bolo tak isto 15 genotypov: Medzi odrodami boli významné rozdiely (tab. 3). Najnižšie hodnoty AUDPC pre FHB mali genotypy Holiday, Idol a Dream (tab. 4). Významné rozdiely boli oba medzi genotypmi s vysokými hodnotami AUDPC Gremlin a Athlet a genotypmi s nízkymi hodnotami AUDPC Dream, Holiday a Idol.

Genotypy z najnižšími hodnotami AUDPC boli do pokusov zaradené len v ostatnom období, preto nie sú o nich väčšinou známe žiadne podrobnosti. Predpokladáme, že sú výsledkom selekcie na šľachtiteľských pracoviskách v krajinách ich pôvodu (Rakúsko, SRN, Slovensko, Maďarsko), kde rezistentné šľachtenie má dlhú tradíciu ako aj podporu vo výskumnej sfére.

Napadnutie klasov populácií F<sub>3</sub> generácie hybridov Rada x Arida, Rada x Armelis a Rada x SO 997 FHB uvádzame v tabuľkách 5 a 6. Z analýzy rozptylu možno usúdiť, že významný rozdiel v hodnotách AUDPC pre FHB boli medzi populáciami. Z tabuľky najmenších štvorcov na 95% hladine spoľahlivosti vyplýva, že najnižšie hodnoty AUDPC pre FHB boli v populácii F<sub>3</sub> generácie hybridov Rada x Arida a v populácii Rada x SO997 rovnocenné a najvyššie hodnoty AUDPC mala populácia Rada x Armelis.

Klasové výbery boli vytvorené vo VŠS Malý Šariš. Najlepšie boli populácie hybridov odrody Rada s odrodami z Istropol Solary (Arida, SO 997).

V F<sub>2</sub> generácii hybridov na hodnoty AUDPC významne vplývali oba rodičovské komponenty, ako aj ich interakcia. Najnižšie individuálne hodnoty AUDPC mali materská odroda Sana a otcovská Sumai 3, v interakcii v kombinácii Sana x Stoa. Významne najnižšie AUDPC mali hybridy so všetkými materskými odrodami okrem hybridov s odrodou Vanda (tab. 7-11).

Hybridy sme získali krížením odrôd pšenice pôvodom z VOOD ŠS Radošina (Rada), HORDEUM Sládkovičovo (Sana), ISTROPOL Solary (Solida), Torysa (SCPV VÚRV, VŠS Malý Šariš) a Vanda (SCPV VÚRV, VŠS Vígľaš–Pstruša) s donormi rezistencie Stoa pôvodom zo Severnej Dakoty a Sumai 3, ktorá vznikla krížením talianskej odrody Funo x Taiwan-Xiaomai (<http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>). Odrody Sana, Solida a Vanda sú genotypy s vyššou kvalitou. Známa negatívna korelácia medzi kvalitou a rezistenciou voči chorobám sa pravdepodobne prejavila iba v hybridoch s odrodou Vanda. Najznámejšie zdroje rezistencie proti FHB sú jarné pšenice z Číny, Japonska a Brazílie. Sú výsledkom prevažne prirodzeného výberu v prostredí, ktoré je každoročne atakované silným infekčným tlakom patogéna (WANG a WANG, 1991; BAI a SHANER, 1994).

### Záver

Zistili sme veľké rozdiely medzi hodnotami AUDPC v skúmaných genotypoch a hybridoch. Genotypy GK Héja, GK Szálka Istar, Holiday, Idol a Dream, ako aj hybridy Rada x Arida, Sana x Stoa and Solida x Sumai 3 mali najnižšie hodnoty AUDPC, ktoré sme použili ako charakteristiku pre klasové fuzariózy zapríčinené hubou *Fusarium culmorum*.

### Literatúra

1. BAI, G.H. - SHANER, G.: Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease* 1994, 78:760-765.
2. BAN, T. and SUENAGA, K.: Genetic analysis of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in Chinese wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. *Euphytica* 113, 2000: 87-99.
3. BUERSTMAYR, H. - LEMMENS, M. - GRAUSGRUBER, H. - RUCKENBAUER, P.: Scab resistance of international wheat germplasm. *Cereal Research Communications* 24, 1996, 195-202.
4. 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.
5. <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree>
6. MILUS, E.A. - WEIGHT, C.T. : Transferring scab resistance to Southern soft red winter wheat. In P. Hart, R. Ward, R. Bafus and K. Bedford (eds.), *Proceedings of the 1998 National Fusarium Head Blight Forum*, 89-90. US Wheat and Barley Initiative, Michigan State University. East Lansing, MI. University Printing.
7. SIP, V. - STUCHLIKOVA, E.: Evaluation of the response of winter wheat varieties to artificial infection with *Fusarium culmorum* in field conditions. *Cereal Research Communications* 25, 1997: 977-83.
8. WANG, Y. - WANG, J.: Genetical studies on the resistance to scab spread in wheat varieties. *Jilin Academy of Agricultural Sciences* 1991, 1:21-28.
9. WANG, Y.Z. - YONG, X.N. - XIAO, Q.P.: The improvement of identification technique of scab resistance of wheat and the development of resistant sources. *Scientia Agricultura Sinica*, 1982:67-77.
10. YE, D.S. - ZHANG, S.N. - ZHANG, Q.Y. - YU, J.H. - TU, Z.R.: Evaluation of new lines with the Taigu male-sterile gene for wheat head scab resistance. *Fujian Rice and Wheat Science and Technology*, 14, 1996, 44 - 45.
11. ZADOKS, I. C. - CHANG, T. T. - KONZAK, C. F.: A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14:415-21, 1974.
12. ZHENG D.: Use of Italian wheat varieties in China. *Genet. Resour. Crop Evol.* 1993. Vol. 40 (3): 137-142.

**Tabuľka 1: Analýza rozptylu AUDPC FHB GZA**

Zdroj premenlivosti	Stupne voľnosti	Priemerné štvorce	F	P
Odroda	14	110978,5	609,7	0,000
Chyba	135	31700,4		
Spolu	150			

**Tabuľka 2: Porovnanie AUDPC odrôd GZA**

Tukey	Priemer AUDPC	Odrody															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Komfort	289,50	1															
Rhein	292,00	2															
Biscay	314,75	3															
Centrum	349,75	4													*	*	
Cubus	249,75	5															
Grandios	243,75	6							*								
Karpos	466,75	7						*	*				*		*	*	
Coxswain	287,00	8															
Eclipse	382,50	9										*		*	*	*	
Orton	407,25	10										*	*	*			
GK Forrás	171,00	11							*		*	*					*
GK Héja	106,50	12			*	*			*		*	*					*
GK Szálka	143,25	13				*			*		*	*					*
Istar	149,50	14				*			*		*	*					*
Vendur	390,50	15										*				*	

\* významnosť 0,05

**Tabuľka 3: Analýza rozptylu AUDPC FHB GZB**

Zdroj premenlivosti	Stupne voľnosti	Priemerné štvorce	F	P
Odroda	14	110978,5	3,501	0,000
Chyba	135	31700,4		
Spolu	150			

**Tabuľka 4: Porovnanie AUDPC odrôd GZB \* významnosť 0,05**

Tukey	Priemer AUDPC	Odrody															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Granat	286,250	1															
SG-S 1365	304,000	2															
Aspirant	339,000	3															
Athlet	477,000	4								*							
Dream	253,750	5							*								
Exsept	447,500	6															
Gremlin	542,000	7					*			*	*						
History	288,750	8															
Holiday	186,500	9				*			*								
Idol	249,000	10							*								
Kidos	269,250	11															
Maximus	456,250	12															
Redford	401,250	13															
Sepstra	426,000	14															
Skater	457,750	15															

\* významnosť 0,05

**Tabuľka 5: Analýza rozptylu AUDPC pre FHB populácie MS**

Zdroj premenlivosti	Df	Priemerné štvorce	F	P
Populácia	2	11992,8	3,15	0,040
Ošetrovanie	1	2,33	0,00	1,000
Populácia x Ošetrovanie	2	1,16	0,00	1,000
Chyba	294	3803,54		
Spolu	299			

**Tabuľka 6: Najmenšie štvorce AUDPC pre FHB populácie MS**

Úroveň	Priemer AUDPC	Dolný limit	Horný limit
Priemer	45,63		
Populácia			
Rada x Arida	39,07	26,9354	51,2106
Rada x Armelis	58,28	46,1374	70,4126
Rada x SO 997	39,55	27,4124	51,6876

**Tabuľka 7: Analýza rozptylu AUDPC F<sub>2</sub> hybridov**

Zdroj premenlivosti	df	Priemerné štvorce	F	P
Model	9	152253,501	5,424	0,000
Matka	4	126052,954	4,490	0,003
Otec	1	188520,766	6,715	0,012
Matka x Otec	4	148714,433	5,297	0,001
Chyba	74	28072,680		
spolu	84			

**Tabuľka 8: AUDPC - materské genotypy**

Matka	Priemer AUDPC	95% interval spoľahlivosti	
		Dolná hranica	Horná hranica
Rada	69,196	-17,195	155,588
Sana	15,754	-68,368	99,876
Solida	66,833	-9,863	143,530
Torysa	67,722	-25,384	160,828
Vanda	231,250	156,599	305,901

**Tabuľka 9: AUDPC - otcovské genotypy**

Otec	Priemer AUDPC	95% interval spoľahlivosti	
		Dolná hranica	Horná hranica
Stoa	138,579	87,289	189,870
Sumai3	41,723	-12,273	95,719

**Tabuľka 10: AUDPC Interakcia materských a otcovských genotypov**

Matka	Otec	Priemer AUDPC	95% interval spoľahlivosti	
			Dolná hranica	Horná hranica
Rada	Stoa	23,750	-94,283	141,783
	Sumai 3	114,643	-11,540	240,826
Sana	Stoa	14,286	-111,897	140,469
	Sumai 3	17,222	-94,061	128,505
Solida	Stoa	119,167	7,884	230,450
	Sumai 3	14,500	-91,072	120,072
Torysa	Stoa	109,444	-1,838	220,727
	Sumai 3	26,000	-123,302	175,302
Vanda	Stoa	426,250	320,678	531,822
	Sumai 3	36,250	-69,322	141,822

**Tabuľka 11: Porovnanie AUDPC materských genotypov**

Tukey		Priemer AUDPC	Matka				
Matka			1	2	3	4	5
1	Rada	69,196					*
2	Sana	15,754					*
3	Solida	66,833					*
4	Torysa	67,722					*
5	Vanda	231,250	*	*	*		

\* významnosť 0,05

☒

☒

# GENOFOND OSTÁLEK (ZINNIA DARWINII HAAGE & SCHMIDT). 1. PŘEDBĚŽNÉ DESKRIPTORY GENEPOOL OF ZINNIA CULTIVARS (ZINNIA DARWINII HAAGE & SCHMIDT). 1. A PRELIMINARY DESCRIPTORS

Jiří UHER

*Classification schedule for zinnias (Zinnia L.) were proposed to evaluation of Zinnia gene pool, in consideration of coordinate, facilitate and support the collecting, breeding and exchange of information and documentation related to other therophytic genera of the Asteraceae family. Classification schedule contain 26 morphological descriptors, some phenological descriptors, and descriptors for evaluation of sensitivity of Zinnia cultivars to diseases, pests and other stress factors.*

Keywords: *Zinnia, gene pool, classification, evaluation, morphology, descriptors*

## Úvod

*Zinnia darwiniana* HAAGE & SCHMIDT (*Zinnia elegans* HORT.PLUR.-non L.) je pozapomenutým produktem křížení mezi *Z. peruviana* L. a *Z. haageana* REGEL. Zaměňována s rodičovskou »*Z. elegans*« byla za 130 let existence prošlechtěna v nepřeberné množství odrůd a s rody *Carthamus*, *Tagetes* nebo *Callistephus* patří dnes k nejvysévanějším therofytním letničkám. Ekonomické významnosti posledně zmiňovaných taxonů však nedosáhla a tomu odpovídá zájem zahradnických institucí: byly-li čínské astrý a aksamitníky opakovaně podrobovány evaluačnímu srovnávání z hlediska zahradnického, nebo světlice z hlediska hospodářského využití, ostálky byly dosud hodnoceny jen zběžně v několika málo znacích (SLOAN & HARKNESS, 2004). Se záchranou mizejícího genofondu domácích květinových odrůd v rámci *Národního programu konzervace a využití genofondu* vyvstává proto potřeba jejich podrobnější deskripce o to naléhavěji.

### *Vývoj deskriptorů pro rod Zinnia*

Na zahradnické fakultě Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně jsou desítky odrůd rodu *Zinnia* udržovány v rámci záchraný genofondu zanikajících odrůd. Dochované původní české odrůdy jsou postupně doplňovány srovnávacím materiálem ze zahraničí a v této souvislosti je absence deskriptorů zvlášť pocítována.

S přihlédnutím ke stávajícím deskriptorům pro rody *Carthamus* (ASHRI et al., 1980; HOFBAUER et al., 2001) a *Callistephus* (UHER & NOVÁKOVÁ, 1997) bylo proto (spolu s návrhem k upřesnění fenologických záznamů) na podkladě víceletého sledování kolekcí předběžně navrženo 28 morfologických deskriptorů k podchycení habituálních dat a morfologie vegetativních i generativních orgánů. Po praktickém ověření v dalším sledování udržovaných kolekcí (NEČASOVÁ, 2001) byly navržené deskriptory podrobeny kritické revizi; po této zůstává 26 přepracovaných morfologických deskriptorů, které byly s ohledem na kompatibilitu s klasifikátory vydanými dříve v edici EVIGEZ upraveny do níže představené podoby. Pasporní data byla pro veškeré plodiny publikována separátně (ROGALEWICZ et al., 1989) a v deskriptorech proto zahrnuty nejsou. Jakkoli se však navrhované deskriptory vysoce osvědčily v mapování znaků u kulturních hybridů, systematické revize rodu (TORRES, 1963) naznačují v našich kolekcích dosud nepozorované směry diversibility u planých taxonů. Pro posílení univerzální platnosti deskriptorů jsou proto nyní soustřeďovány dostupné nativní druhy, nezúčastněné na vzniku hybridních odrůd, a budou ještě zahrnuty do dalšího hodnocení (očekávány jsou dílčí úpravy bez podstatného vlivu na systém dosavadního hodnocení). Poté mohou být deskriptory připraveny pro dokumentaci v rámci koncepce *Národního programu konzervace a využití rostlinných genetických zdrojů*.

## Uznání a poděkování

Deskriptory byly vyvíjeny za podpory projektu Mze ČR E - 97/01 - 3160 - 0200 (Konzervace a využití genofondu teplomilných ovocných dřevin, révy vinné, vytrvalých zelenin a okrasných rostlin).

## Literatura

1. ASHRI, A. - ANISHETTY, N.M. - KNOWLES, P.F. & al.: Safflower descriptors. IBPGR execut.secretariat, Rome 1983
2. HOFBAUER, J. – UHER, J. – FABEROVÁ, I.: Klasifikátor (Descriptor list) *Carthamus tinctorius* L. VÚP Troubsko 2001
3. MAATSCH, R. – SCHULZE, G.M.: Versuch einer typenmässigen Gliederung der Körbchen- und Blütenformen gärtnerisch wichtiger *Compositae* und ihrer Kulturformen. Die Gartenbauwissenschaft 23(5):1-5, 1958
4. NEČASOVÁ, R.: Hodnocení domácích odrůd rodu *Zinnia* a jejich vztahů k zahraničnímu sortimentu. Diplomová práce, MZLU v Brně, 2001

5. SLOAN, R.C.–HARKNESS, C.C.: *Zinnia* cultivar evaluation. Mississippi Agr.&Forest. Exp.St.Bull.405:386-391,2004
6. TORRES, A.M.: Taxonomy of *Zinnia*. Brittonia 15 (1):1-25, 1963
7. UHER, J. – NOVÁKOVÁ, A.: Study on the descriptors of *Callistephus chinensis* NEES. Biological and technical development in horticulture (Proc.International Horti.Sci.Conference) 362 (9.-12.Sept.1997), MZLU Brno 1997

EVIGEZ č. znaku	číslo znaku	znak (descriptor)	stupnice	hodnoty (values)	(scale)	poznámka (note)
1. morfologické znaky / morphological descriptors						
1.1 habituelní znaky / whole plant character						
1	1.1.1	habitus rostliny plant habit	1 vpřímený 2 vystoupavý		1 erect 2 prostrate	
2	1.1.2	výška rostliny plant height (m)	1 velmi nízká 3 nízká 5 průměrná 7 vysoká 9 velmi vysoká	do 0.2 m 0.2 – 0.4 m 0.4 – 0.6 m 0.6 – 0.8 m 0.8 m a více	1 very low 3 low 5 intermediate 7 high 9 very high	k počátku kvetení (beginning of flowering)
3	1.1.3	lokalizace větvení branch pattern	0 nevětvená 1 převažující bazální větvení 2 větvení od báze k vrcholu 3 v horních dvou třetinách 4 jen ve svrchní třetině		0 no branches 1 predominantly basal branches 2 branches from base to apex 3 on upper two thirds of plant 4 on upper third of plant only	
4	1.1.4	úhel větvení branch angle	1 do 20° 2 20°-40° 3 40°a více		1 to 20° 2 20°-40° 3 40°or more	
5	1.1.5	barva stonku stem color	1 žlutozelená 2 temně zelená 3 anthokyanové zbarvení		1 yellowish-green 2 soft green 3 reddish-green	
6	1.1.6	počet internodií na terminálu terminal stem inter-node number	3 nízký 5 průměrný 7 vysoký	vyžaduje sledování širšího sortimentu	3 low 5 intermediate 7 high	k počátku kvetení (beginning of flowering)
1.2 znaky v olistění / leaf character						
7	1.2.1	tvár listu leaf shape	1 lineární 2 úzce elipčitý 3 kopinatý 4 ostře vejčitý		1 linear 2 narrow elliptic 3 lanceolate 4 sharp ovate	
8	1.2.2	okraj listu leaf margin	1 hladký 2 jemně pýřitý 3 drsně pýřitý 4 štětinatý		1 glabrous 2 pilose 3 hispid 4 strigose	
9	1.2.3	odění listu leaf pubescence	1 lysý 2 žláznatý 3 jemně pýřitý 4 vlnatý 5 drsně pýřitý 5 štětinatý		1 glabrous 2 glandular 3 pubescent 4 tomentose 5 hirsute 6 strigose	
10	1.2.4	zbarvení čepele leaf blade color	1 žlutozelený 2 sytě zelený 3 šedozelelý 4 červenozelelý		1 yellowish-green 2 soft green 3 greyish-green 4 reddish-green	
1.3 květenství / inflorescence						
11	1.3.1	tvár úboru head shape	1 cylindrický 2 úzce zvonkovitý 3 široce zvonkovitý 4 hemisferický		1 narrowly cylindric 2 narrowly campanulate 3 broadly campanulate 4 hemisphaerical	
12	1.3.2.	velikost úboru head size (mm)	1 drobný 2 střední 3 veliký	alternativně: průměr z 6 úborů	1 small 2 moderate 3 large	six head average
13	1.3.3.	počet úborů heads number	1 nízký 2 střední 3 vysoký	alternativně: průměr z 6 úborů	1 low 2 intermediate 3 high	six head average
14	1.3.4	listeny zákrovu involucral bracts	1 podlouhlé 5 vejčité		1 oblong 2 ovate	

		(phyllaries)	3 oválné 4 opakvejčité		3 elliptic 4 obovate	
15	1.3.5	okraj listenu phyllaries margin	1. celistvý 2. roztrpepený		1 entire 2 erose	
16	1.3.6	pigmentace obvodu listenu summit band color	1 bez pigmentace 2 slámově žlutá 3 hnědopurpurová 4 odbarvená		1 none 2 yellowish 3 brownish-purple 4 discoloured	
1.4 základní květní data / basic flower data						
17	1.4.1	úbor - kategorie head - class	1 simplices 2 semipleni 3 pauciseriati 4 imbricati 5 revoluti 6 subundulati		1 simplices 2 semipleni 3 pauciseriati 4 imbricati 5 revoluti 6 subundulati	
18	1.4.2	počet paprsků rays number	průměr z šesti úborů		six heads average	
19	1.4.3	tvár paprsku ray shape	1 lineární 2 vejčitý 3 oválný 3 opakvejčitý		1 linear 2 ovate 3 elliptical 4 obovate	
20	1.4.4	barva paprsků ray basic color	dle tabulek RHS		RHS table	
21	1.4.5	kresba paprsků ray second. color	dle tabulek RHS		RHS table	
22	1.4.6	stálost zbarvení color fastness				
23	1.4.7	povrch paprsku ray texture	1 hladký 2 žebernatý		1 flat 2 ribbed	
24	1.4.8	zbarvení disku disc flower color	dle tabulek RHS (v případě nedostupnosti §1)		RHS table (alternative: §1)	
1.5 nažky / cypsellas						
25	1.5.1	zbarvení nažek color of cypsellas	1. slámová 2. světle hnědá 3. hnědopurpurová 4. černopurpurová		1. straw-coloured 2. pale brown 3. brown-purple 4. black-purple	
26	1.5.2	počet nažek cypsellas number	průměr z šesti úborů		six heads average	
2. biologické znaky / biological descriptors						
27	2.1.1	počet dní do vzejití days to emergence				
28	2.1.2	počet dní do počátku větvení days to branching				od vzcházení from emergence
29	2.1.3	počet dní do kvetení days to flowering				od vzcházení do 10% kv. rostlin from emergence
30	1.1.4	počet dní do zralosti nažek days to seeds matu- rity				od vzcházení do 10% kv. rostlin from emergence
3. citlivost vůči chorobám a škůdcům / diseases and pests susceptibility						
scored on a scale 1-3, with disease or pest specified where: 1. low susceptibility, 3. high susceptibility						
3.1 viry a fytoplasmatické nákazy / virus and phytoplasma diseases						
3.2 chromistální a houbové patogeny / chromista and fungal diseases						
3.3 živočišní škůdci / pests						



## GENOFOND OSTÁLEK (ZINNIA DARWINII HAAGE & SCHMIDT). 2. HODNOCENÍ DOMÁCÍCH ODRŮD GENEPOOL OF ZINNIA CULTIVARS (ZINNIA DARWINII HAAGE & SCHMIDT). 2. EVALUATION OF INLAND VARIETIES

Jiří UHER - Regina NEČASOVÁ

*18 varieties of Zinnia with imbricate head pattern were evaluated of thirty morphological and phenologic characters, and of flower keeping properties. Only few of the characters does appear linked: most notable seems correlations within leaf blade size and days to flowering. No correlations between plant height and days to flowering were recorded. 'Small-flowered' cultivar group begin to flowering at earliest. Heads of major part of 'Oklahoma' cultivars were more small as originally described, and may be compared with 'Small-flowered' varieties. 'Dahliaeflora' cultivar groups have largest flowers of slight improved keeping properties.*

Keywords: zinnias, varieties, morphology, phenology, evaluation, correlations; *Zinnia darwiniana*

### Úvod

Ostáčkám (*Zinnia darwiniana* HAAGE & SCHMIDT) se v porovnání s jinými květinářsky významnými therofytními letničkami co do hodnocení odrůdově typických znaků dostalo jen málo pozornosti: zatímco čínské astry nebo aksamitníky byly evaluačnímu srovnávání podrobovány opakovaně z hlediska zahradnického (MAATSCH & NOLTING, 1971; NOLTING & ZIMMER, 1975; 1981; 1987), nebo světlice z hlediska květinářského (UHER, 1995) i z hlediska hospodářského využití (ASHRI, 1975; LI et al., 1993), ostálky byly dosud hodnoceny jen okrajově v několika málo znacích (SLOAN & HARKNESS, 2004). V souvislosti se záchranou mizejícího genofondu domácích květinových odrůd v rámci *Národního programu konzervace a využití genofondu* bylo vyhodnoceno prozatím alespoň 18 dosud komerčně nabízených domácích odrůd s úbory typu *Imbricati* a *Pauciseriati* v 26 morfologických a čtyřech fenologických znacích na základě nově navrhovaných deskriptorů.

### Materiál a metodika

Hodnoceny byly rostliny vysévané v letech 2000, 2002 a 2005 vždy k počátku 15. kalendářního týdne (18°C, dopěstování sadby min.12°C) ve skleníku a ku konci 20. týdne vysazované na hlinitojílovitých půdách v hustotě zhruba 1250 rostlin na ar, v klimatických podmínkách středoevropského termofytika; vybrané odrůdy byly pro zjištění vlivu zvyšujících se teplot a světelné intenzity na některé ze sledovaných charakteristik ostálek vysévány ještě přímo na stanoviště koncem 16. a 20. kalendářního týdne. Sledovány byly: výška a habitus rostlin; počet internodií, zabarvení, lokalizace, úhel a délka větvení stonku; tvar, velikost, zabarvení a odění listů; tvar, velikost a zabarvení vnějších listenů zákrovu; velikost úborů včetně výšky a šířky lůžka disku; počet, tvar, textura, barva a kresba paprsků; stálost zbarvení paprsků při sušení (60°C); zbarvení trubkovitých kvítků (v případě nedokonale plných úborů); počet a zabarvení nažek; počet dní od výsevu do vzejití a od vzejití do počátku větvení, počátku kvetení a zralosti nažek terminálního úboru. Pro nedostupnost RHS tabulek v době hodnocení barvy paprskových a trubkovitých květů byla alternativně postavena zjednodušená stupnice odstínů v pořadí 1: bílá; 2: krémová; 3: žlutá; 4: oranžová; 5: šarlatová; 6: růžová; 7. karmínová; 8: purpurová; 9: fialová. Mimo deskriptory byla hodnocena trvanlivost řezaných květenství ve vodě a v roztoku prodlužujícím trvanlivost květů. Zaznamenané hodnoty byly dosazeny do vzorců pro výpočet korelativních závislostí.

### Výsledky a diskuse

Jen málo ze sledovaných znaků se ukázalo být svázáno korelačními závislostmi, k nejvýraznějším patřily korelace v barvě trubkovitých a paprskových květů nebo korelace listové plochy a počtu dní do kvetení. Překvapivě však nebylo shledáno průkazných korelací ve výšce rostlin a počtem dní do počátku větvení, stadia viditelného poupěte, kvetení. V širším odrůdovém spektru zůstaly neprokázány též vztahy mezi plností úborů a typem paprskových květů, formulované rumunskými autory (SELARU & COSTEA, 1991). Napříč skutečnosti, že ostálky jsou fakultativně krátkodenními rostlinami (ARMITAGE, 1975), klesal s opožděním výsevu počet dní potřebných do vykvetení (tabulky zaznamenávají data odpovídající výsadbě rostlin z předpěstované sadby a tedy vysévaných k počátku 15. kalendářního týdne) - jako u jiných therofytů zde množství srážek a suma teplot hrají nejspíše srovnatelně významnou roli. Všechny sledované odrůdové skupiny se ukázaly být překvapivě heterogenními - značné rozdíly byly u jednotlivých odrůd série zjištěny v ranosti kvetení, v průměrné výšce rostlin, velikosti a plnosti úborů (tedy v počtu jejich paprsků). Extrémně nevyrovnané se zdají být v tomto ohledu odrůdy skupin 'Oklahoma' a 'Drobnokvětá' - u poslední byly podchyceny odrůdy s vůbec nejvyšším i nejnižším počtem paprsků v celém sledování, rozdíl byl téměř trojnásobný. Plnost úborů i jejich velikost může však být ovlivněna dobou květní iniciace (LIM et al., 2003) a tedy i rozdílnou raností různých odrůd v sérii. Odrůdy skupiny 'Oklahoma' bývají prohlašovány za nejranější v současném sortimentu, v našich sledováních nakvétaly však dříve kultivary série 'Drobnokvětá'. Většina odrůd ve skupině 'Oklahoma' nedosáhla ani obecně



proklamované velikosti úborů, zůstávaly na úrovni domácích odrůd skupiny 'Drobnokvětá'. Velkokvěté kultivary z odrůdové série 'Jířinkokvětá' patří k nejvzrůstnějším a překvapivě dosáhly i nejvyšší trvanlivosti řezaných květenství.

## Závěr

Navzdory evidentně zanedbávanému udržovacímu šlechtění ob stojí domácí selekce ostálék v porovnání s odrůdami zahraničními, především u skupiny 'Drobnokvětá' byl však zaznamenán nárůst v počtu nedostatečně plných a poloplných úborů. Přesto zůstávají odrůdy této skupiny plně srovnatelné s odrůdami proslulé série 'Oklahoma' (udržovanými však rovněž domácími podniky) a v některých znacích je dokonce předčí. Poměrně vysoká heterogenita, nestejná kvalita zastoupených odrůd se ukázala být vlastní všem odrůdově bohatším sériím ve sledování - příčin však může být více a vyžadují dalších sledování.

(Hodnocení sledovaných odrůd probíhalo za podpory projektu Mze ČR E - 97/01 - 3160 - 0200).

## Literatura:

1. ARMITAGE, A.M.: *Zinnia elegans* and *Zinnia angustifolia*. In Halevy, A.H. (ed.): CRC Handbook of Flowering, vol.4. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985, 548-552. (0-84933-910-3)
2. ASHRI A.: Evaluation of the world collection safflower, *Carthamus tinctorius* L. 5. Distribution and divergence for morphological characters. Euphytica 24 (3): 651-659, 1975
3. LI D.J., ZHOU M.D., RAMANATHA-RAO V.: Characterization and evaluation of safflower germplasm. Geological publishing house, Beijing 1993 (7-116-01398-9/R.08)
4. LIM, K.B., SON, K.C., CHUNG, J.D.: Influences of different day and night temperatures on growth of plug seedlings and flowering of *Zinnia hybrida*. In: Journ. Korean Soc. Hort. Science, 44 (2003) 1: 92-96
5. MAATSCH, R., NOLTING, G.: Sortenliste von *Callistephus chinensis* NEES (Internationale Registerliste). 3.Folge. Institut für Zierpflanzenbau der Technischen Universität Hannover, 1971
6. MAATSCH, R., SCHULZE, G.M.: Versuch einer typenmässigen Gliederung der Körbchen und Blütenformen gärtnerisch wichtiger Compositae und ihrer Kulturformen. Die Gartenbauwissenschaft 23 (1958) 1: 160-166.
7. NOLTING, G., ZIMMER, K.: Sortenliste von *Callistephus chinensis* NEES (Internationale Registerliste). Universität Hannover, 4.Folge (1975), 5.Folge (1981), 6.Folge (1987).
8. NOLTING, G., ZIMMER, K.: Sortenliste von *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L., und *Tagetes tenuifolia* CAV. (Internationale Registerliste). Universität Hannover, 2.Folge (1975), 3.Folge (1981), 4.Folge (1987).
9. NECHANSKÝ, F., JIRÁSEK, V.: Systematische Studie über kultivierte Sommerastern – *Callistephus chinensis* (L.) NEES (Asteraceae). Preslia 39 (1967) 2: 122-150
10. SCHOELLHORN, R., EVERETT, E., ERIN, A.: Specialty cut flower production guidelines for Florida - *Zinnia*. University of Florida, IFAS Extension 2004 (ENH 953)
11. SELARU, E., COSTEA, M.: Analiza caracterelor calitative inlantuine » *gradul de involtaj* « si » *forma florilor ligulate* « la *Zinnia elegans* L. soiul 'Raza de Soare'. In: Lucrari stiintifice, IANB seria B., 34 (1991) 2: 103-113
12. SLOAN, R.C., HARKNESS, S.S.: *Zinnia* cultivar evaluation. In: Annual Report 2003, Mississippi Agric. & Forestry Experiment Station Information Bulletin 405, North Mississippi Research & Extension Center, 2004, 386-391
13. STEVENS, S., STEVENS, A.B., BAUERFEIND, R.: Commercial specialty cut flower production: *Zinnias*. Manhattan, Kansas: Cooperative extension service, Kansas State University, 1993 (MF-1079, JH8-93-2M)
14. UHER J.: Srovnání vybraných kultivarů světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.) z hlediska květinářského využití. Zahradnictví (Hort.Sci.Prague) 22 (3): 89-94, 1995

## Původ sledovaných odrůd a vysvětlivky ke kódům v tabulkách 1-4:

Drobnokvětá - Semena Veleliby a.s. (35: Říjen, 36: Červen, 37: Zář, 38: Květen, 39: Bílá, 40: Sírově Žlutá)

Oklahoma - Černý, Jaroměř (41: Šarlatová, 42: Lososová, 43: Růžová, 56: Ivory, 57: Zlatožlutá, 69: Bílá)

Jířinkokvětá - Semena Veleliby a.s. (12: Julka, 14: Tm.Červená, 15: Oranžová, 16: Žlutá, 17: Bílá, 70: Růžová)

✉

✉

Jiří Uher, Ústav zelinářství a květinářství, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, fakulta zahradnická, Valtická 337, 69144 Lednice na Moravě, Česká Republika;  
e-mail: uher@zf.mendelu.cz

**Tabulka 1: Přehled vybraných charakteristik u sledovaných odrůd ostálek (deskripty 1-7)**

skupina	kód	1	2	3	4	5	6	7
Drobnokvětá	CZE.35.ZD	1	0.52	2	2	3	6	4
Drobnokvětá	CZE.36.ZD	1	0.52	1	2	3	4	4
Drobnokvětá	CZE.37.ZD	1	0.46	1	2-3	3	3	4
Drobnokvětá	CZE.38.ZD	1	0.51	1	2	3	4	4
Drobnokvětá	CZE.39.ZD	1	0.53	1	2	1	5	4
Drobnokvětá	CZE.40.ZD	1	0.56	1	2	1	5	4
Oklahoma	CZE.41.ZD	1	0.44	2	2	3	5	4
Oklahoma	CZE.42.ZD	1	0.50	1	2	3	5	4
Oklahoma	CZE.43.ZD	1	0.44	1	2	3	3-4	4
Oklahoma	CZE.56.ZD	1	0.46	1	2	1	5	4
Oklahoma	CZE.57.ZD	1	0.42	1	2	1	4	4
Oklahoma	CZE.69.ZD	1	0.47	1	2	1	4	4
Jiřinkokvětá	CZE.12.ZD	1	0.54	1	2	3	4	4
Jiřinkokvětá	CZE.14.ZD	1	0.56	1	2	3	4-5	4
Jiřinkokvětá	CZE.15.ZD	1	0.54	1	2	3	6	4
Jiřinkokvětá	CZE.16.ZD	1	0.58	1	2	2	4-5	4
Jiřinkokvětá	CZE.17.ZD	1	0.46	1	2	2	6	4
Jiřinkokvětá	CZE.70.ZD	1	0.60	1	2	3	4	4
Scabiosaeflora	CZE.13.ZD	1	0.54	1	2	3	5	4
Scabiosaeflora	DEU.71.ZD	1	0.58	1	2	3	5	4

**Tabulka 2: Přehled vybraných charakteristik u sledovaných odrůd ostálek (deskripty 8-14)**

skupina	kód	8	9	10	11	12	13	14
Drobnokvětá	CZE.35.ZD	3	3	1	4	62.3	4.6	2
Drobnokvětá	CZE.36.ZD	3	3	2	4	56.3	5.2	2-3
Drobnokvětá	CZE.37.ZD	3	3	4	4	49.1	4.2	2
Drobnokvětá	CZE.38.ZD	3	3	2	4	51.6	3.8	3
Drobnokvětá	CZE.39.ZD	3	3	2	4	68.3	4.2	2-3
Drobnokvětá	CZE.40.ZD	3	3	2	4	52.5	4.5	3
Oklahoma	CZE.41.ZD	3	3	2	4	54.0	5.1	3
Oklahoma	CZE.42.ZD	3	3	4	4	46.6	5.0	2-3
Oklahoma	CZE.43.ZD	3	3	4	4	46.8	4.9	2-3
Oklahoma	CZE.56.ZD	3	3	2	4	42.4	3.6	3
Oklahoma	CZE.57.ZD	3	3	2	4	61.8	5.2	3
Oklahoma	CZE.69.ZD	3	3	2	4	61.5	5.1	2-3
Jiřinkokvětá	CZE.12.ZD	3	3	2	4	87.8	3.8	3
Jiřinkokvětá	CZE.14.ZD	3	3	4	4	99.5	3.5	3
Jiřinkokvětá	CZE.15.ZD	3	4	4	4	80.3	3.2	2
Jiřinkokvětá	CZE.16.ZD	3	4	2	4	85.3	3.6	2
Jiřinkokvětá	CZE.17.ZD	3	4	2	4	79.2	3.9	2
Jiřinkokvětá	CZE.70.ZD	3	4	4	4	88.3	3.2	3
Scabiosaeflora	CZE.13.ZD	3	3	4	4	52.6	5.6	3
Scabiosaeflora	DEU.71.ZD	3	3	4	4	58.0	5.2	3

**Tabulka 3: Přejhled vybraných charakteristik u sledovaných odrůd ostálek (deskripty 15-21)**

skupina	kód	17	18	19	20	21	22	23
Drobnokvětá	CZE.35.ZD	4	92	3	6	0	3	1
Drobnokvětá	CZE.36.ZD	4	70	3	9	0	3	1
Drobnokvětá	CZE.37.ZD	4	77	3	3	0	4	1
Drobnokvětá	CZE.38.ZD	4	50	3	6	0	3	1
Drobnokvětá	CZE.39.ZD	4	144	3	1	0	4	1
Drobnokvětá	CZE.40.ZD	4	112	3	3	0	3	1
Oklahoma	CZE.41.ZD	4	121	3	5	0	3	1
Oklahoma	CZE.42.ZD	4	65	3	6	0	3	1
Oklahoma	CZE.43.ZD	4	125	3	6	0	3	1
Oklahoma	CZE.56.ZD	4	82	3	2	0	4	1
Oklahoma	CZE.57.ZD	4	118	3	3	0	3	1
Oklahoma	CZE.69.ZD	4	73	3	1	0	4	1
Jiřinkokvětá	CZE.12.ZD	4	96	3	3	0	3	2
Jiřinkokvětá	CZE.14.ZD	4	106	3	5	0	3	2
Jiřinkokvětá	CZE.15.ZD	4	75	3	4	0	3	2
Jiřinkokvětá	CZE.16.ZD	4	104	3	3	0	1	2
Jiřinkokvětá	CZE.17.ZD	4	83	3	1	0	4	2
Jiřinkokvětá	CZE.70.ZD	4	106	3	6	0	1	2
Scabiosae flora	CZE.13.ZD	3	32	3	e	0	1	2
Scabiosae flora	DEU.71.ZD	3	36	3	e	0	1	2

**Tabulka 4: Přejhled vybraných charakteristik u sledovaných odrůd ostálek (deskripty 22-29)**

skupina	kód	24	25	26	27	28	29	30
Drobnokvětá	CZE.35.ZD	8	2	63	4	56	75	131
Drobnokvětá	CZE.36.ZD	8	1	52	4	56	66	134
Drobnokvětá	CZE.37.ZD	8	1	72	4	52	85	134
Drobnokvětá	CZE.38.ZD	8	1	85	4	54	62	136
Drobnokvětá	CZE.39.ZD	1	1	68	4	58	72	128
Drobnokvětá	CZE.40.ZD	3	1	58	4	58	67	136
Oklahoma	CZE.41.ZD	8	1	52	4	62	88	122
Oklahoma	CZE.42.ZD	8	2	66	6	58	78	136
Oklahoma	CZE.43.ZD	8	2	62	4	56	70	136
Oklahoma	CZE.56.ZD	2	1	56	4	60	78	139
Oklahoma	CZE.57.ZD	3	2	46	4	55	69	126
Oklahoma	CZE.69.ZD	1	1	58	4	52	70	136
Jiřinkokvětá	CZE.12.ZD	8	2	42	4	62	94	149
Jiřinkokvětá	CZE.14.ZD	8	2	50	4	62	75	125
Jiřinkokvětá	CZE.15.ZD	8	2	56	4	60	86	139
Jiřinkokvětá	CZE.16.ZD	8	2	44	4	62	84	147
Jiřinkokvětá	CZE.17.ZD	8	2	36	4	76	76	134
Jiřinkokvětá	CZE.70.ZD	8	1	52	4	58	75	131
Scabiosae flora	CZE.13.ZD	8	1	48	4	54	66	124
Scabiosae flora	DEU.71.ZD	8	1	62	6	54	64	124

## DIVERZITA MORFOLOGICKÝCH ZNAKOV JARNÉHO JAČMEŇA DIVERSITY OF MORFOLOGICAL TRAITS IN SPRING BARLEY

Michaela BENKOVÁ - Mária ŽÁKOVA - Ján KRAIC

*This study was conducted to assess the impact of breeding on morphological traits of spring barley cultivars and to identify the related changes in plant characteristics. A set of 106 spring barley genetic resources of Slovak origin and former Czechoslovakia origin was tested on experimental basis of RIPP in 2004-2005 to characterize variability of the accessions based on morphological data using multivariate analyses. The multivariate analyse (PCA) was utilised for the evaluation of our collection too. PCA based on morphological traits divided the whole collection in the two groups corresponding to the two different periods (1900-1971 and 1972-2003). The study revealed the existence of variability among periods and separated accessions with the most different morphological characters in individual period. Significant breeding progress was observed especially for plant height.*

*Key words: spring barley, variation, evaluation, PCA analysis*

### Úvod

Pri štúdiu historického vývoja jarného jačmeňa na území bývalého Československa zistíme, že skoro všetky domáce sladovnícke odrody boli výsledkom rekombinácií vlastností pôvodných krajových odrôd. Hanácky jačmeň ovplyvnil rozhodujúcim spôsobom šľachtenie a vývoj pestovania sladovníckeho jačmeňa v celej strednej Európe. Okrem dobrej produktívnosti a kvality sa vyznačoval jemnejším zrnom a stebлом, ktoré bolo náchylné na poliehanie; vyššou rastlinou s rýchlym odnožovaním; typickým háčkovaním klasov pri dozrievaní, vyznačujúcim sa jemnými dlhými osinami; zvlášť dlhým tvarom zrna (okrem Kneiflovho jačmeňa) a jemnou vráskovanou plevou. LEKEŠ (1997) na základe analýzy genealógie domácich odrôd vzniknutých od začiatku šľachtania až po súčasnosť na našom území určil rozhodujúce vplyvy na šľachtenie sladovníckeho jačmeňa. V rokoch 1900–1929 sa začalo s krížením odrôd vzniknutých individuálnym výberom z krajových odrôd. Proskowetzcom vyšľachtená a viac ako 70 rokov vylepšovaná hanácka krajová odroda nemá vo svetovom sortimente sladovníckeho jačmeňa ako šľachtiteľský a genetický východzí materiál pre svoju cennosť a množstvo z nej vyšľachtených odrôd obdoby. V 30.-40. rokoch sa veľmi často používal do kríženia Kneiflův jačmeň, predstaviteľ plnozrnného buclatého typu a neskôr dlhosteblová intenzívna odroda Valtický. Od roku 1965 dochádza k aplikácii náročných šľachtiteľských metód. Najvýznamnejším úspechom v tomto období bolo vyšľachtenie krátkosteblovej vysokoproduktívnej odrody Diamant, vzniknutej metódou mutagenézy. Na základe tejto odrody vznikala séria krátkosteblových odrôd tzv. Diamantova rada (1972-1985). Od roku 1986 vznikali vysokoproduktívne krátkosteblové odrody, ktoré spĺňajú podmienky intenzívneho pestovania.

Cieľom práce bolo zhodnotenie variability jačmeňa siateho, formy jarnej v pôvodnom a súčasnom genofonde, z hľadiska fenotypového prejavu a poskytnúť obraz o zmenách morfológie počas jeho vývoja od roku 1900 až po dnes.

### Materiál a metódy

Genofond jarného jačmeňa bol vysiaty v lokalite Borovce, ktorá sa nachádza v kukuričnej výrobnjej oblasti. Hodnotený materiál predstavuje 106 genotypov jačmeňa jarnej formy, pestované, resp. povolené na území bývalého Československa od roku 1900 až po súčasnosť. Zhromaždený súbor 106 genotypov jarného jačmeňa sme rozdelili do šiestich časových období vývoja selekcie jačmeňa, ktoré boli ovplyvnené rozhodujúcimi donormi (LEKEŠ, 1997): I. *genotypy z rokov 1900-1926* (krajové hanácke populácie) s počtom 14; II. *genotypy z rokov 1933 - 38* (obdobie Valtického jačmeňa) – 13; III. *genotypy z rokov 1946 - 1964* (odrody vzniknuté po roku 1946) – 16; IV. *genotypy z rokov 1965 - 1971* (obdobie Diamantu) – 8; V. *genotypy z rokov 1972 - 1985* (Diamantova rada) – 19 a VI. *genotypy z rokov 1986 - doteraz* (krátkosteblové odrody), s počtom 36.

Súbor genotypov bol vysiaty v rokoch 2004-2005 do maloparcelkových pokusov, v troch opakovaníach v znáhodnených blokoch na parcelky veľkosti 2,5 m<sup>2</sup>. Hodnotil sa v znakoch morfológických podľa príslušného klasifikátora (LEKEŠ et al., 1996; IPGRI, 1994). Sledovali sa znaky: chĺpkatosť brušnej ryhy na zrne (BR), výška rastliny (VR), dĺžka horného internódia (ID), výskyt jazýčka (J), dĺžka (KD) a farba klasu (FK), postavenie klasu (KP), typ klasu (KT), tvar klasu (KTV), druhý horný list-dĺžka (LD), druhý horný list-šírka (LS), farba listu (LF), postavenie vlajkového listu (LP), antokyanové sfarbenie špičiek osín (OA), dĺžka osiny v porovnaní na klas (OD), intenzita sfarbenia špičiek osín (OI), chĺpkatosť listovej pošvy (PCh), farba stebľa (SF), dĺžka chĺpkov štetičky na zrne (STD), tvar trsu (TTV), antokyanové sfarbenie ušíek vlajkového listu (UA), veľkosť ušíek vlajkového listu (UV), farba zrna (ZF), plevnatosť zrna (ZP) a tvar zrna (ZT). Výsledky boli zhodnotené štatistickými analýzami ANOVA, analýzou hlavných komponentov (PCA) (HOTELLING, 1993), ktoré sú súčasťou rôznych štatistických balíkov, SPSS 8.1 a STATGRAPHIC.

## Výsledky a diskusia

Variabilitu kvalitatívnych a kvantitatívnych morfológických znakov sme sledovali v celom súbore, ako aj v rámci jednotlivých období vzniku.

### Hodnotenie kvalitatívnych morfológických znakov s bodovým ohodnotením

Pri analýze morfológických znakov s bodovým ohodnotením, v súbore rozdeleného do jednotlivých období sme zistili, že niektoré znaky boli v celom súbore pri jednotlivých genotypoch rovnaké. Boli to znaky: chlpkatosť listovej pošvy, typ klasu, tvar klasu, plevnatosť zrna a chlkatosť brušnej ryhy. Všetky hodnotené genotypy boli bez chlpkov na pošve, mali dvojradowý typ klasu, ihlanovitý tvar klasu a plevnaté zrno s chlpkatou brušnou ryhou, preto sme tieto znaky ďalej neanalyzovali. Variabilitu znakov s bodovým ohodnotením sme zaznamenali pri ostatných sledovaných znakoch. Najväčšiu variabilitu sme zaznamenali pri znakoch farba listu (LF), farba stebľa (SF) a farba klasu (KF). Tvar trsu (TTV) má väčšiu variabilitu v poslednom období, čo je zrejme zapríčinené vplyvom rôznorodosti genotypov vstupujúcich do kríženia pri vzniku genotypov v tomto období. Výskyt jazýčka (J), je pri jačmeni dôležitý popisný znak. V našom súbore sa vyskytoval pri viac ako polovici genotypov. Antokyanové zafarbenie ušíek (UA) sa vyskytovalo iba v posledných dvoch obdobiach, od roku 1972 a to vo veľmi malom počte. Podobne vzpriamené a polovzpriamené postavenie klasu (KP) sa vyskytovalo len od roku 1965. Antokyanové zafarbenie osín (OA) sa vyskytovalo v každom období pri väčšej polovici genotypov. Na prejav tohto znaku vplývala zrejme krajová odroda Valtický, ktorá sa vyznačovala typickými načervenanými osinami. Vo všetkých obdobiach prevažoval polodlhý tvar zrna (ZT), teda zrno strednej dĺžky.

### Hodnotenie kvantitatívnych morfológických znakov

Analýzou morfológických kvantitatívnych znakov (tab. 1) pri genotypoch rozdelených do 6 období svojho vzniku sme zistili vyššiu variabilitu pri znakoch šírka listu (LS) 10,9-19,9% a dĺžka horného internódia (ID) 11,0 – 18,4%. Štatisticky preukazné rozdiely ( $P < 0,05$ ) priemerov znakov medzi obdobiami preukázali znaky: výška rastliny (VR), dĺžka horného internódia (ID) a dĺžka klasu (KD). Rozdiely priemerov týchto znakov sme zaznamenali medzi prvými tromi obdobiami [1900-1964] a obdobím V. a VI. [1965 – 2003]. Pri znaku dĺžka horného internódia sa priemery štvrtého obdobia, tzv. obdobia vzniku Diamantu [1965-1971] odlišovali od prvého a šiesteho obdobia, čo dokazuje, že toto obdobie bolo pre dĺžku horného internódia prelomovým.

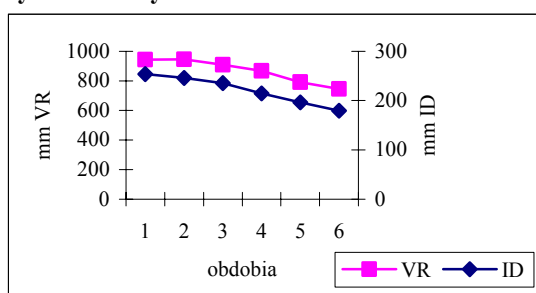
**Tabuľka 1: Základné štatistické charakteristiky kvantitatívnych znakov a preukaznosť<sup>a</sup> jednotlivých období vzniku genotypu**

Obdobie	Poč.GZ	Znaky	LD (mm)	LS (mm)	VR (mm)	ID (mm)	KD (mm)
I. 1900-1929	14	priemer	213,8	11,7	866 <sup>56</sup>	253,5 <sup>56</sup>	95,2 <sup>6</sup>
		min	190,0	9,0	768	182,8	86,6
		max	241,0	14,0	979	292,4	104,8
		v %	12,7	12,6	7,45	11,0	6,4
II. 1930-1940	13	priemer	220,9	11,8	902 <sup>56</sup>	245,6 <sup>56</sup>	96,3 <sup>5</sup>
		min	190,0	9,0	847	188,4	86,4
		max	293,0	16,0	980	291,6	109,2
		v %	12,1	18,8	4,29	12,9	7,4
III. 1944-1964	16	priemer	218,0	11,3	864 <sup>56</sup>	235,3 <sup>56</sup>	93,7 <sup>6</sup>
		min	180,0	10,0	737	159,2	76,1
		max	293,0	14,6	927	304,8	111,6
		v %	8,6	10,9	4,98	18,4	8,2
IV. 1965-1971	8	priemer	221,6	12,4	856 <sup>56</sup>	214,7 <sup>16</sup>	91,5
		min	195,0	10,0	807	173,8	76,3
		max	292,0	16,0	903	235,4	105,7
		v %	14,4	19,5	4,15	10,1	9,3
V. 1972-1985	19	priemer	207,3	12,0	787 <sup>12346</sup>	196,2 <sup>123</sup>	88,7
		min	172,0	9,0	722	164,8	78,7
		max	252,0	15,0	862	241,0	102,6
		v %	8,6	13,7	4,73	10,2	7,4
VI. 1986-2003	36	priemer	209,5	11,8	730 <sup>12345</sup>	179,7 <sup>1234</sup>	83,8 <sup>123</sup>
		min	176,0	7,0	557	139,0	70,7
		max	271,0	17,0	842	232,8	104,4
		v %	10,7	19,9	7,67	10,8	9,2
I.-VI. Celý súbor	106	priemer	211,3	11,8	810	211,5	89,8
		min	172,0	7,0	557	139,0	70,7
		max	293,0	17,0	980	304,8	111,6
		v %	10,9	16,6	11,26	18,7	9,7

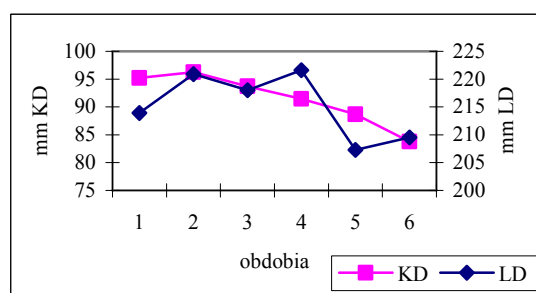
<sup>a</sup> horný index 1-6 označuje, že priemer v danom období sa štatisticky významne líši ( $P < 0,05$ ) od priemerov v obdobiach I.-VI.

Pri hodnotení zmien znakov v jednotlivých obdobiach sme zistili, že znak šírka listu (LS) sa nemenil vôbec, alebo len minimálne. Naopak pri znaku dĺžka klasu, dĺžka horného internódia a výška rastliny sme zaznamenali klesajúcu tendenciu (graf 1). Rozhodujúci vplyv na skrátenie horného internódia a zároveň výšky rastliny, ktoré mali súbežnú klesajúcu tendenciu mal vznik odrody Diamant (1965) a na základe nej vzniknuté odrody tzv. „Diamantovej rady“ [1972 – 1985], ktorých výška stebľa sa skrátila v porovnaní s pôvodnými genotypmi až o štvrtinu (LEKEŠ, 1997). V hodnotenom súbore bola najvyššia priemerná výška pri genotypoch z obdobia „Valtického jačmeňa“ [1930-1940] a to 902 mm, najnižšia v najnovších odrodách [1986-2003] a to 730 mm. Obdobie „Valtického jačmeňa“ zahŕňa dlhosteblové intenzívne odrody, ktoré sa vyznačovali výbornou sladovníckou kvalitou, ale značne poliehajú. Maximálnu priemernú výšku rastliny 980 mm mala krajová odroda Janovický [1933] a najnižšiu výšku 557 mm odroda Heran [1992]. Podobne priemerná dĺžka horného internódia bola najdlhšia (253,5 mm) v období krajových hanáckych odrôd [1900 – 1929] a najnižšia (179,7mm) v období súčasných genotypov, čo predstavuje 74 mm zníženie za približne 100 rokov. Najdlhšie horné internódium 304,8 mm počas sledovaných rokov mal genotyp Víglašský polojemný [1958] a najkratšie (139 mm) genotyp Ludan [2002].

**Graf 1: Vývoj zmien morfológických znakov výška rastliny a dĺžka horného internódia**



**Graf 2: Vývoj zmien morfológických znakov dĺžka klasu a dĺžka listu**



Najväčšiu priemernú dĺžku klasu (96,3 mm) mali genotypy z obdobia Valtického [1930 – 1940] a najmenšiu (83,8 mm) genotypy z obdobia rokov 1986 – 2003 (tab.1, graf 2). Najdlhší klas v priebehu sledovaných rokov (111,6 mm) mal genotyp Diosecký 802 (1946) a najkratší (70,7 mm) genotyp Akcent (1992). Analýzou súboru sme zistili, že priemerná dĺžka klasu medzi prvým a posledným obdobím poklesla o 13 mm. Podobnú, ale nie tak výraznú tendenciu sme zaznamenali aj pri znaku dĺžka listu (Graf 2), ktorá sa výrazne skrátila v období vzniku Diamantu a v období Diamantovej rady (1965 – 1985). Podobné výsledky boli zistené pri pšenici, kde porovnávaním moderných a starších odrôd preukázali moderné odrody v priemere kratšie listy ako staršie odrody (UŽÍK, ŽOFAJOVÁ, 2003).

#### Hodnotenie morfológických znakov kvantitatívnych PCA analýzou

Analýzou hlavných komponentov - PCA sme zistili, že variabilita vybraných morfológických znakov v súbore je sústredená do dvoch komponentov, ktoré tvoria 70,23% celkovej variability. Prvý komponent pozitívne koreloval so znakmi: výška rastliny (VR), dĺžka horného internódia (ID) a dĺžka klasu (KD) a prispieval 44,05% k celkovej variabilite. Tieto znaky sa vyznačovali najväčšou variabilitou. Druhý komponent pozitívne koreloval s dĺžkou (LD) a šírkou (LS) druhého horného listu a prispieval 26,18% k celkovej variabilite (tab. 2, tab. 3).

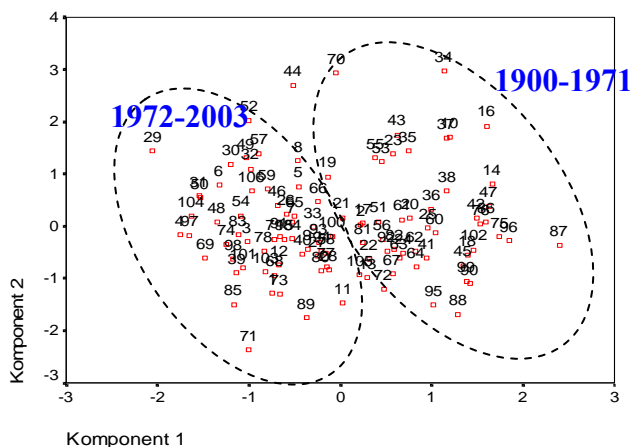
**Tabuľka 2: Celkový rozptyl v komponentoch**      **Tabuľka 3: Matica komponentných skóre**

Komponent	% rozptylu	Kumulované %
1	44,05	44,05
2	26,18	70,23
3	14,51	84,74
4	10,41	95,15
5	4,85	100,00

	Komponent	Komponent
	1	2
VR	,911	,079
ID	,850	,060
KD	,754	-,085
LS	-,169	,799
LD	,094	,795

**Obrázok 1:** znázorňuje rozmiestnenie 106 genotypov jačmeňa na prvých dvoch hlavných komponentoch. Genotypy sa rozložili vzhľadom k dvom komponentným osiam tak, že môžeme načrtnúť dve skupiny, z ktorých prvá zahŕňa genotypy vzniknuté väčšinou v období rokov 1900 – 1971 [I. – IV. obdobie], vyznačujúce sa vyšším vzrastom a druhú skupinu tvoria genotypy vzniknuté väčšinou v období rokov 1972 – 2003 [V. – VI. obdobie] a boli nižšieho vzrastu s kratším klasom. Genotypy IV. obdobia, tzv. „obdobie vzniku Diamantu“ sa nachádzajú na spoločnej hranici týchto skupín, čo potvrdzuje ich význam pri tvorbe nového krátkosteblového morfotypu.

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



Zobrazené dve skupiny genotypov sa vysoko preukazne líšia ( $P < 0,01$ ) v znakoch výška rastliny (VR), dĺžka horného internódia (ID) a dĺžka klasu (KD). Podobné výsledky sledovania variability agromorfologických znakov jačmeňa PCA analýzou dosiahol ATANASSOV (2001).

### Záver

Analýza genotypov ukázala vysoko preukazný vplyv obdobia vzniku genotypov, resp. vplyv šľachtiteľského procesu na variabilitu sledovaných morfológických znakov. Výsledky analýzy hlavných komponentov ukázali, že najväčšou variabilitou prispievali k celkovej variabilite súboru znakov: výška rastliny (VR), dĺžka horného internódia (ID) a dĺžka klasu (KD). Genotypy sa separovali vzhľadom k dvom komponentným osiam na dve skupiny, z ktorých prvá zahŕňa genotypy vzniknuté väčšinou v období rokov 1900 – 1971 [I. – IV. obdobie], vyznačujúce sa vyšším vzrastom a druhú skupinu tvoria genotypy nižšieho vzrastu s kratším klasom, vzniknuté väčšinou v období rokov 1972 – 2003 [V. – VI. obdobie]. Genotypy pochádzajúce z „obdobia vzniku Diamantu“ sa nachádzajú na spoločnej hranici týchto skupín, čo potvrdzuje ich význam pri tvorbe nového krátkosteblového morfortypu jačmeňa.

### Podakovanie

Vykonanie tejto práce bolo podporené projektom č. 2003 SP27/0280D01/0280D01, získaným z MP SR a projektu č. 20-017002 získaného z Agentúry pre podporu vedy a techniky (APVT).

### Literatúra

1. ATANASSOV, P. et al.: Hordein polymorphism and variation of agromorphological traits in a collection of naked barley. In: Genetic Resources and Crop Evolution, 48, 2001, s. 353-360
2. IPGRI: Descriptors for Barley (*Hordeum vulgare* L.) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1994, s. 45. ISBN 92-9043-222-5
3. LEKEŠ, J.: Šľachtení obilovín na území Československa. Praha : Nakl. Brázda, 1997, s. 94 -96. ISBN 80-209-0271-6
4. HOTELLING, H.: Analysis of a Complex of Statistical Variables into Principal Components. In: Journal of Educational Psychology, 24, 1933, p. 417 -441.
5. UŽÍK, M. - ŽOFAJOVÁ, A.: Pokrok v agronomických znakoch pri česko-slovenských odrodách pšenice letnej f. ozimnej povolených v rokoch 1923-1995. In: Acta fytotechnica et zootechnica, 6, 2003, 4, 93-100

✉

✉

## KVALITATÍVNE UKAZOVATELE AKO SELEKČNÉ KRITÉRIUM PRI TVORBE GENETICKÝCH ZDROJOV PŠENICE QUALITY INDICATORS AS SELECTIVE CRITERION FOR CREATING OF WHEAT GENETIC RESOURCES

Andrea HANKOVÁ<sup>1</sup> - Edita GREGOVÁ<sup>2</sup>

*Cereals are important source of proteins, they have wide exertion in food and also non-food industry. Wheat storage proteins (gliadins, glutenins) are the main components of gluten, which is the main contributor to the bread-making properties of wheat flour. In research work were used populations with HMW-Glu subunits 17+18 and 13+16, which contribute to the bread-making quality. At the base of the results of analyses were selected to the breeding program homozygous individual, in which were evaluated Glu-score and health condition..*

*Key words: winter wheat, bread-making quality, HMW glutenin subunits*

### Úvod

Pšenica patrí na Slovensku a v celom svete k najvýznamnejším zdrojom ľudskej výživy. Pri šľachtení pšenice je potrebné brať do úvahy viaceré aspekty, prispôbiť sa požiadavkám trhu, klimatickým a pôdnym podmienkam. V súčasnosti je neustály dopyt po odrodách s vysokou chlebopekárskou kvalitou, dobrým zdravotným stavom a vysokou úrodou. Jednou z dôležitých informácií pri šľachtení pšenice na kvalitu je obsah a kvalita zásobných bielkovín pšeničného zrna, medzi ktoré patria gliadíny a gluteníny.

Zásobné bielkoviny pšenice (gliadíny, gluteníny) sú hlavnou zložkou lepku, ktorý významne ovplyvňuje chlebopekárske vlastnosti pšeničnej múky. Glutenové proteíny zodpovedajú za vizkoelastické vlastnosti cesta (BRANLARD et al., 2001). Predikciu chlebopekárskej kvality je možné uskutočniť na základe hodnotenia biochemickej skladby lepkového komplexu, analýzou gliadínov a podjednotiek glutenínov s vysokou molekulovou hmotnosťou, s čím sa stotožňujú viacerí autori (GREGOVÁ et al., 2001; ŠAŠEK, ČERNÝ, 1996).

### Materiál a metódy

V práci boli použité línie pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum L.*), ktoré sme získali krížením odrôd s netradičnými génmi pre HMW glutenínové podjednotky. Laboratórne analýzy boli uskutočnené v laboratóriu BaMB VÚRV Piešťany, poľné pokusy boli realizované na VŠS Vígľaš-Pstruša.

Do kríženia boli rodičovské odrody vybrané tak, aby aspoň jeden z rodičov mal netradičné vysokomolekulárne glutenínové podjednotky (17+18, 13+16), ktoré sú ukazovateľmi chlebopekárskej kvality. Získané zrno F<sub>1</sub> generácie bolo vysiate ručne v poli, tak isto aj selektované zrná F<sub>2</sub> generácie. Selektácia zrn F<sub>2</sub> generácie bola realizovaná na základe výsledkov analýz HMW-Glu podjednotiek. F<sub>3</sub> generácia bola vysiatá formou kmeňových matiek. Pri populáciách získaných krížením robíme vegetačné pozorovania, pri hodnotení sa používa 9-bodová stupnica.

### Výsledky a diskusia

V práci bolo použitých 18 odrôd, ktoré boli vybrané na základe kvality, zdravotného stavu a úrodnosti. Do kríženia boli rodičovské odrody vybrané tak, aby aspoň jeden z rodičov mal netradičné vysokomolekulárne glutenínové podjednotky (17+18, 13+16), ktoré sú ukazovateľmi chlebopekárskej kvality. Nakřížených bolo 22 kombinácií.

Zrno F<sub>2</sub> generácie bolo podrobené analýze na HMW Glu-podjednotky. Z každej populácie bolo analyzovaných 5 zrn, na analýzu bola použitá len jedna polovica zrna, druhá polovica zrna s embryom bola na základe výsledkov analýzy vysiatá v poli. Vysiate boli homozygotné jedince, pri ktorých boli analyzované netradičné HMW Glu-podjednotky. Glutenínové gény sa dedia kodominantne. Kodominantnosť glutenínových génov a ich dávkový efekt v triploidnom endosperme zrna pšenice umožňuje rozlíšiť genotypy heterozygotné od genotypov homozygotných v skladbe glutenínov (ČERNÝ, ŠAŠEK, 1996).

Z analyzovaných zrn bolo 45 % homozygotov a 55 % heterozygotov. Pri homozygotných jedincoch bolo na základe výsledkov analýz vyhodnotených Glu-skóre. Najvyššie Glu-skóre 10 bolo zistené v 18 prípadoch, čo predstavuje 16 % z celkového počtu analyzovaných zrn, 2 zrná mali Glu-skóre 9, takmer 23 % analyzovaných zrn malo Glu-skóre 8, v dvoch prípadoch bolo zistené Glu-skóre 7, najnižšie Glu-skóre zistené v 3 prípadoch malo hodnotu 6.

Na základe viacerých výskumov bolo zistené, že čím je vyššie Glu-skóre, tým je väčšia pravdepodobnosť, že odroda bude mať chlebopekársku kvalitu. Pravdepodobnosť výskytu odrôd s lepšou chlebopekárskou kvalitou pri nízkom Glu-skóre je minimálna. Naopak, pri odrodách s vysokým Glu-skóre môžeme s veľkou pravdepodobnosťou predpokladať vyššiu chlebopekársku kvalitu, môžu sa však vyskytnúť aj prípady, kde pekárská akosť nebude zodpovedať vysokej predikčnej hodnote. Za zdroje vysokej chlebopekárskej kvality sú označované odrody s HMW – Glu komplexnými alelami 1 alebo 2\*



(lokus Glu-1A), 7+8, 17+18, 13+16 (lokus Glu-1B), 5+10 (lokus Glu-1D) (Gregová et al., 2001). Preto sa ako najperspektívnejšie javia novošľachtence, ktoré majú Glu-skóre 8-10, čo však nemusí byť pravidlo. Vo vyšších generáciách pri dostatku osiva budú robené analýzy na pekárenskú kvalitu.

Pri F<sub>2</sub> generácii rastlín bola tiež hodnotená rezistencia proti chorobám (múčnatka trávová, hrdza pšenícová, Septoria nodorum, fuzárium v klase) zimuvzdornosť a výška.

V nasledujúcich generáciách budú realizované pozitívne výbery klasových potomstiev, ktoré budú analyzované na pekárenskú kvalitu.

**Tabuľka 1: HMW-Glu podjednotky rodičovských odrôd použitých pri krížení**

Odroda	Glu-1A	Glu-1B	Glu-1D	Odroda	Glu-1A	Glu-1B	Glu-1D
1	1	17+18	5+10	10	0	7+8	5+10
2	2*	7+8	5+10	11	0	6+8	2+12
3	1	20	5+10	12	0	7+8	2+12
4	1	7+9	5+10	13	0	7+9	2+12
5	0	7+8	5+10	14	0	7+8	5+10
6	1	7+9	5+10	15	0	13+16	5+10
7	1	17+18	5+10	16	0	17+18	2+12
8	0	7+9	5+10	17	0	17+18	5+10
9	2*	7+9	5+10	18	1	17+18	5+10

### Záver

Poznaním glutenínového spektra jednotlivých odrôd pšenice môžeme efektívne vyberať rodičovské odrody. Aj keď hodnota Glu – skóre nemusí vždy presne zodpovedať pekárskej akosti, je veľká pravdepodobnosť, že pri vysokom Glu – skóre bude mať odroda (lína) vyššiu chlebopekársku kvalitu. Účelom tejto práce je získať kvalitné línie, ktoré budú zaradené do ďalšieho šľachtiteľského procesu za účelom vyšľachtienia odrôd, ktoré budú svojim zdravotným stavom, úrodou a kvalitou zodpovedať požiadavkám poľnohospodárskej praxe, spracovateľov a tiež spotrebiteľov.

### Literatúra

1. BRANLARD, G. - DARDEVET, M. - SACCOMANO, R. - LAGOUTTE, F. - GOURDON, J.: (2001). Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119, 2001, s. 59-67
2. ČERNÝ, J. - ŠAŠEK, A.: *Bílkovinné signální geny pšenice obecné*, ÚZPI Praha, 1996
3. GREGOVÁ, E. – MUCHOVÁ, D. – KRAIC, J. – ONDREJČÁK, F.: Využitie štúdia bielkovinových markerov v tvorbe genotypov pšenice na VŠS Malý Šariš. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín*. Piešťany, 2001, s. 110 – 111

✉

✉

<sup>1</sup>Ing. Andrea Hanková, [hankova@vurv.sk](mailto:hankova@vurv.sk), Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav rastlinnej výroby, VŠS Víglaš-Pstruša, 962 12 Detva  
<sup>2</sup>Ing. Edita Gregová, [gregova@vurv.sk](mailto:gregova@vurv.sk), Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

## NUTRIČNÝ A ZDRAVOTNE PREVENTÍVNY VÝZNAM OVSA NAHÉHO NUTRITIOUS AND HEALTHILY PREVENTIVE VALUE OF NAKED OAT

Peter HOZLÁR - Daniela DVONČOVÁ

*The collection of 43 naked oat genotypes was tested in 2004 and 2005 under conditions of potato growing area in the Research and Breeding Station Viglas-Pstrusa (VSS Viglas-Pstrusa) on chosen qualitative indicators and nutritious and healthily preventive substance content in a naked oat grain. Quite high variability of a grain content of individual naked oat genotypes has been found out and it has also been proved when compared with a grain content of three husked oat control genotypes. Unlike husked oats, naked oats have shown higher content of starch, proteins, fats,  $\beta$ -glucans and higher volume/capacity weight. Husked oats have demonstrated higher content of dietary fibre and 1000 grain weight. The naked oat genotype collection itself has shown variability of starch content 56.2-65.7 %, of protein content 13.1-21.49%, of fat content 3.42-7.45%, of dietary fibre content 2.3-5.3 % and of  $\beta$ -glucan content 2.68-4.64 %. Based on the comparison of two pilot years we can claim that the highest year influence has been proved on the protein content, less on fat content. Significantly lower year influence has been shown in starch and dietary fibre contents.*

*Key words: naked oat, dietary fibre, proteins, fats, starch,  $\beta$ -glucans*

### Úvod

Význam ovsa v ľudskej výžive v posledných rokoch stúpa. Hlavným dôvodom rastúcej spotreby sú odporúčania zdravotníkov k zmene štruktúry výživy, lebo nesprávna výživa je jednou z príčin civilizačných ochorení. Ovos preto patrí medzi tzv. funkčné potraviny, ktoré poskytujú konzumentom nielen živiny, ale zlepšujú aj ich zdravotný stav. V porovnaní s ostatnými obilninami sa vyznačuje najvyššou *energetickou hodnotou* (nahý ovos). Obsah *bielkovín* sa pohybuje medzi 14-21% pri nahom ovsi, čo sú v porovnaní s ďalšími základnými obilninami vyššie hodnoty. V porovnaní so pšenicou alebo jačmeňom obsahujú nahé ovsy viac lyzínu, metionínu a cysteínu. Proteíny ovsa sa vyznačujú nižším zastúpením prolaminov. *Sacharidy* tvoria hlavnú časť zrna a nachádzajú sa hlavne v bunkách endospermu. Tieto sú členené podľa stupňa polymerizácie na jednoduché cukry, oligosacharidy a polysacharidy. Najvýznamnejším sacharidom v zrne je škrob. *Vláknina* je tá časť rastlinných potravín, ktorá sa nestrávi endogénnymi enzýmami v tráviacom trakte človeka. Vlákniu tvoria neškrobové polysacharidy (celulóza, hemicelulóza, galaktománan, pektínové látky,  $\beta$ -glukány, rastlinné gummy a iné látky) (HAVRLENTOVÁ et al., 2005).  *$\beta$ -glukány* sú v ovsi prítomné predovšetkým v bunkových stenách subaleurónovej vrstvy. Najviac preskúmaným účinkom ovsa na ľudské zdravie je práve vplyv  $\beta$ -glukánov na zníženie celkového krvného cholesterolu a tiež LDL cholesterolu. Je známe, že konzumáciou 28 až 56 g ovsa denne klesá obsah sérum cholesterolu od 3 do 19 % u tých ľudí, ktorí už majú zvýšenú jeho hladinu a do 7 % pri normálnej hladine (LONGAUER, 1999). *Tuky* ovsa sa vyznačujú vysokým obsahom nenasýtených mastných kyselín.

### Materiál a metódy

Materiál tvorilo 43 genotypov ovsa nahého a 3 kontrolné genotypy ovsa plevnatého vysiate na pracovisku VŠS Vígľaš-Pstruša formou maloparcelkových pokusov v štyroch opakovaniach v dvoch ročníkoch 2004 a 2005. Ide o lokalitu v zemiakovkej výrobnjej oblasti s priemernou ročnou teplotou 7,76 °C, priemernými ročnými zrážkami 600 mm, nachádzajúcej sa v nadmorskej výške 370 m.n.m. Sejba prebehla v obidvoch ročníkoch začiatkom apríla (8.4.2004 a 5.4.2005). Predplodinou v obidvoch ročníkoch bola kapusta repková forma ozimná. Pokus bol pozberaný maloparcelkovým kombajnom. V súbore genotypov sa stanovovali hlavné kvalitatívne ukazovatele ako obsah škrobu, bielkovín, tuku, vlákniny,  $\beta$ -glukánov, HTZ, objemová hmotnosť, ale aj priemerná úroda. Zmeranie obsahu škrobu, vlákniny, bielkovín, tukov a  $\beta$ -glukánov bolo realizované na prístroji Inframatic (Perten) na VÚZ v Kroměříži v ČR, kým hodnotenia HTZ, úrody a objemovej hmotnosti sa realizovali na VŠS Vígľaš Pstruša.

### Výsledky

Vegetačné obdobie ročníka 2004 sa teplotne veľmi približovalo k 50 ročnému normálu ale zrážkovo bolo mierne nadnormálne. Ročník 2005 bol teplotne nadnormálny s nadnormálnymi zrážkami v mesiacoch apríl, júl a august. Najvýznamnejšie sa prejavil vplyv ročníka na úrodu zrna a obsah bielkovín menej na HTZ a objemovú hmotnosť. Najmenšie rozdiely medzi ročníkmi boli zaznamenané v znakových obsah škrobu, vlákniny a tuku. V roku 2005 boli dosiahnuté vyššie priemerné úrody pri väčšine materiálov ale väčšinou pri nižších HTZ. Spomedzi nahých ovsov vynikal veľmi vysokou HTZ materiál AC Percy a táto vysoká hodnota HTZ sa potvrdila v obidvoch pestovateľských ročníkoch. Veľmi vysoká objemová hmotnosť bola zistená pri materiáloch ako Bullion, Platek, VIR K 1932 Local. Z obsahových látok najvyššie obsahy škrobu vykazovali genotypy OT 258, Salomon, Rhianon, Urcar, Akt, Avenida, Ábel, Izak, či Detvan. Najvyššie obsahy boli stanovené pri materiáloch ako Nue Rennes, Nuprime, Nagi Pulawski. Najvyššie obsahy tuku zo sledovaných genotypov vykázali jednoznačne nahé

ovsy ako Bandicoot, VIR K 2472 Local, či Neon. Obsahy vlákniny boli podstatne vyššie pri plevnatých ovsoch, z nahých ovsov vynikali Nagi Pulawski a AC Hill. Odrody Salvius a AC Hill vynikali v obsahu  $\beta$ -glukánov.

## Diskusia

Z výsledkov vyplýva, že úrody plevnatých ovsov sú vyššie ako úrody nahých ovsov, čo sa potvrdilo aj v pestovateľskej praxi. Vyššie úrodové parametre boli zaznamenané hlavne pri registrovaných odrodách nahého ovsa Izák, Detvan, Avenida, či Ábel. Rovnako HTZ pri nahých ovsoch vykazuje nižšie hodnoty oproti plevnatým materiálom. V znaku objemová hmotnosť nahé ovsy vykazujú podstatne vyššie hodnoty oproti ovsom plevnatým. Plevnaté ovsy vykazovali nižšie obsahy škrobu ako ovsy nahé. Obsahy bielkovín boli rovnako významne vyššie pri ovsoch nahých oproti ovsom plevnatým. Naproti tomu plevnaté ovsy vykazujú podstatne vyššie percentuálne obsahy vlákniny oproti nahým ovsom čo súvisí aj s prítomnosťou plevy prirastenej k zrnú.

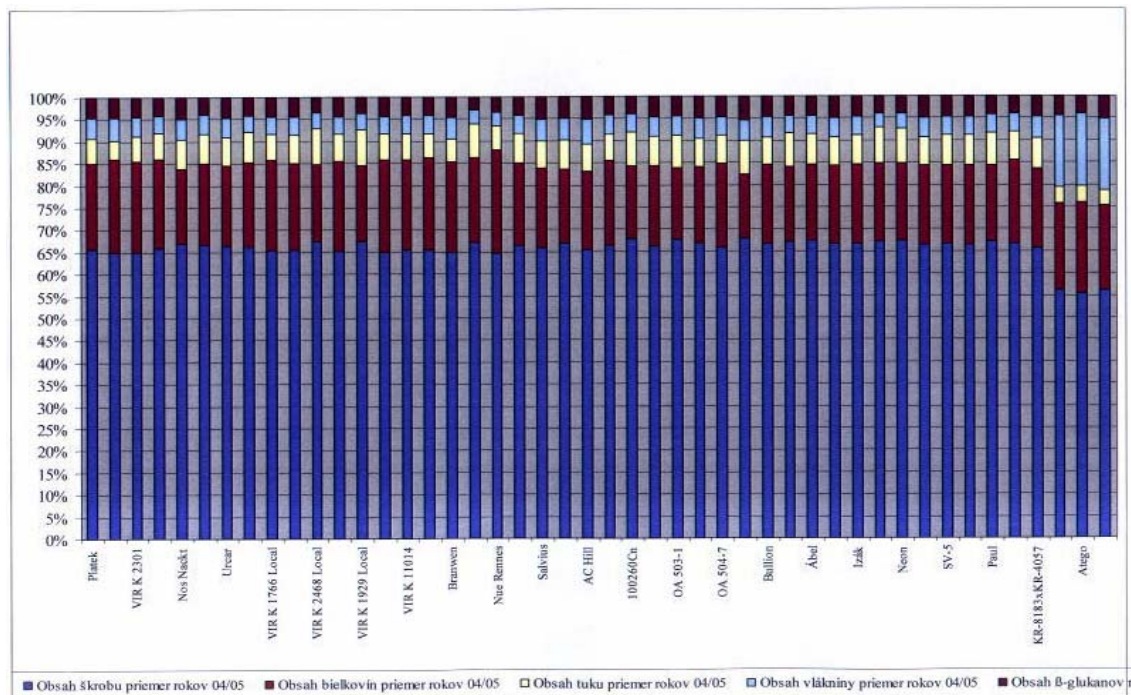
## Záver

1. Znaky obsah tukov, obsah škrobu a obsah vlákniny sú minimálne fixované na vonkajšie prostredie a je možné vyberať prípadne tvoriť genotypy s vyššími úrovňami hodnôt týchto znakov.
2. Znak obsah bielkovín vykazuje vyššiu ročníkovú závislosť, ako závislosť na genotype. Silne ovplyvnené ročníkovo sú aj znaky výška úrody a HTZ.
3. Obsah zdraviu prospešných  $\beta$ -glukánov bol mierne vyšší pri nahých ovsoch oproti ovsom plevnatým, toto nebolo potvrdené medzi ročníkmi.
4. Výšky úrod ovsov plevnatých registrovaných na Slovensku boli priemerne v obidvoch ročníkoch o 25 až 35% vyššie ako pri registrovaných odrodách ovsa nahého. Zodpovedá to približne aktuálnemu percentálnemu obsahu plevy pri plevnatých ovsoch 22 až 29 %.

Projekt bol realizovaný na základe dvojstrannej česko-slovenskej spolupráce a touto cestou chceme poďakovať partnerom z ZVÚ Kroměříž, ktorí majú v tejto problematike bohaté skúsenosti a umožnili nám realizovať kvalitatívne analýzy vzoriek. Dosiagnuté výsledky by mali slúžiť obidvom pracoviskám zaoberajúcim sa touto problematikou. Získané údaje boli zaradené do popisných databáz genofondov.

## Literatúra

1. HAVRLETOVÁ, M. - ANTALÍKOVÁ, G. - HOZLÁR, P. - ČIČOVÁ, I. - DVONČOVÁ, D. - KRAIC, J.: Vlákna: definícia, význam, metódy stanovenia a vybrané primárne zdroje. In: Biologické listy, roč. 74, 2005, č. 4, s. 271-284.
2. LONGAUER, I.: Ovso – dôležitá plodina aj vo výžive človeka. In: Naše pole č.9/1999, s. 27.



Graf 1: Kvalitatívne parametre ovsa

☒

☒

## IZOLÁCIA GÉNU GLUKANÁZY Z ROSIČKY OKRÚHLOLISTEJ (*DROSERA ROTUNDIFOLIA* L.) POMOCOU GENOME WALKINGU THE ISOLATION OF GLUCANASE GENE FROM SUNDEW (*DROSERA ROTUNDIFOLIA* L.) USING GENOME WALKING

Jana LIBANTOVÁ - Jana MORAVČÍKOVÁ - Ildikó MATUŠÍKOVÁ

*Glucanases are enzymes belonging to pathogenesis-related (PR) proteins that are attractive for biotechnology due to their inhibitory activities against different phytopathogens. Here the isolation of a glucanase gene from the insectivorous sundew (Drosera rotundifolia L.) using Genome Walking kit is presented. An 1393 bp long sequence encoding glucanase revealed low nucleotide but quite high protein sequence similarity to other plant glucanases. The sundew glucanase gene is one of the first nucleic sequences from this particular plant that in addition encodes for a putative plant defense gene.*

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

### Úvod

Obmedzenia vplyvu rôznych škodcov na kultúrne rastliny pomocou biologicky aktívnych látok sa javí ako sľubná alternatíva ku chemickým pesticídom (MELCHERS et al., 2000). Revolúcia v biotechnológiách priniesla značný záujem o identifikáciu a izoláciu génov, ktoré kódujú biologicky aktívne látky. Atraktívnymi pre biotechnológie sa ukazujú byť gény zohrávajúce úlohu v obrane rastlín voči patogénom. Medzi takéto gény sa zaraďuje aj skupina génov kódujúcich hydrolytické enzýmy, glukanázy a chitinázy, ktorých jedna z funkcií spočíva v degradácii bunkovej steny patogénnych húb, čím dochádza k redukcii ich rastu. Expresia rôznych typov glukanáz a chitináz v transgénnych rastlinách ukázala, že výsledný efekt zvýšenia rezistencie závisí od antifungálnych vlastností jednotlivých glukanáz a chitináz (ktorý môže variovať) a od dostupnosti kontaktu patogén – hydrolytický transgénny enzým. Navyše sa ukázalo, že PR proteíny izolované z geneticky nepříbuzných druhov vykazujú v transgénnych rastlinách lepšie antifungálne vlastnosti v porovnaní s PR proteínmi pochádzajúcimi z geneticky príbuzných druhov (JOOSTEN et al., 1995). Z tohoto dôvodu, našu pozornosť sme zamerali na izoláciu sekvencie glukanázy z mäsožravéj rastliny rosičky okrúhlohlístej, ktorá je bohatým zdrojom látok s antifungálnou aktivitou.

### Materiály a metódy

Génovú sekvenciu pre glukanázu sme izolovali z rosičky okrúhlohlístej pomocou Genome Walking™ Kitu (Clontech). Špecifické reverzné primery pre glukanázu sme navrhli na základe parciálnej sekvencie glukanázy izolovanej z rosičky okrúhlohlístej (LIBANTOVÁ et al., 2005). 0,5 µg genómovej DNA sme štíepili restriktóznou endonukleázou *Pvu* II. Po ligácii adaptoru k restriktóznym fragmentom sme 0,075 µg DNA použili na amplifikáciu fragmentu v PCR reakcii, kde sme ako forwardový primer použili primer navrhnutý v sekvencii adaptoru výrobcom kitu a reverzný špecifický primer so zložením:

Gluc REV 5':GCAGCTGCAATCGCTAATGATGA.

PCR program zahŕňoval 1 cyklus 94°C 2 min; 7 cyklov [94°C 25 s, 70°C 2 min;] 20 cyklov [94°C 25s, 66°C 2 min;], 15 cyklov [94°C 25s, 60°C 1 min, 66°C 1 min;] 70°C 10 min. Následne sme 1 µl produktu použili ako templát pre „nested“ PCR reakciu, kde sme použili výrobcom kitu dodaný forwardový nested primer a reverzný špecifický nested primer so zložením Gluc nestREV5': AGCATACGAAACTCTCTGCTGCTT.

Program nested PCR reakcie zahŕňoval: 1 cyklus 94°C 2 min; 7 cyklov [94°C 25 s, 65°C 2 min;] 20 cyklov [94°C 25s, 60°C 2 min;], 15 cyklov [94°C 25s, 55°C 2 min] 55°C 10 min.

Následne sme produkt PCR reakcie izolovali z gélu pomocou Gél extrakčného kitu firmy QIAGEN, klonovali do pGem-T vektorového Systému II (Promega), a komerčne sekvenovali pomocou M13 primerov. Získanú sekvenciu sme analyzovali pomocou programu

GENSCANW <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>

a BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

### Výsledky a diskusia

Prítomnosť glukanáz v sekréte tráviacich žliaz mäsožravéj rastliny *Drosera rotundifolia* predpokladá prítomnosť a aktivitu týchto enzýmov tak pri procesoch trávenia hmyzu, ako aj pri obrane rastliny voči fytopatogénnym hubám či baktériám (JUNIPER et al., 1989). Experimenty sme preto zamerali na izoláciu a identifikáciu génu pre glukanázu v rosičke okrúhlohlístej s cieľom v budúcnosti ju podrobnejšie ocharakterizovať, prípadne využiť na ciele transgenózu.

Vychádzali sme z 1,5 kb fragmentu kódujúceho časť sekvencie glukanázy získaného PCR amplifikáciou na genómovej DNA s využitím degenerovaných primerov pre glukanázu a pomocou metódy „Genome Walking“. Sekvenčná analýza odhalila, že na 1,5 kb fragmente sa vyskytuje kompletná 3' sekvencia génu A na 5' konci izolovaného fragmentu, približne po 203 bp od začiatku, sa vyskytuje

sekvencia intrónu (LIBANTOVÁ et al., 2005). V ďalšej práci sme sa sústredili na izoláciu kompletnej sekvencie glukánázového génu pomocou Genome Walking metódy, pričom sme navrhli nové reverzné primery a amplifikáciu fragmentu sme uskutočnili na genómovej DNA štiepanej restriktívou endonukleázou *Pvu* II. Po kompletizácii glukánázovej sekvencie program GENSCANW odhalil, že v 2056 bp analyzovanej sekvencii sa vyskytuje 1393 bp sekvencia zodpovedajúca glukánáze, pričom medzi ATG a STOP kodónom sú 3 exónové sekvencie a dva intróny, a za STOP kodónom bola identifikovaná polyA sekvencia.

Porovnaním sekvenčnej homológie s inými glukánázami z Génovej banky <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> sme zistili, že najväčšiu homológiu vykazuje získaná drozerová glukánáza so sekvenciou glukánázy z *Nepenthes khasiana*, avšak homologická je iba oblasť 62 nukleotidov, pričom identických z toho je 85 %.

Napriek nízkej podobnosti získanej glukánázy s glukánázami na nukleotidovej úrovni, na úrovni proteínov z 315 aminokyselín drozerového glukánázového proteínu 266 vykazovalo homológiu ku proteínu glukánázy *Nepenthes khasiana*, pričom identických aminokyselín bolo 49 % a pozitívnych 66 %. Takýto kontrast medzi výsledkami BLAST analýz na nukleotidovej a proteínovej úrovni môže byť dôsledkom často sa vyskytujúcich synonymických kodónov. Podobný jav bol pozorovaný aj pri iných génoch mäsožravých rastlín.

## Záver

Izolovaný gén kódujúci glukánázu z *Drosera rotundifolia* predstavuje jeden z prvých génov izolovaných z genómovej DNA tohto rastlinného druhu. V blízkej budúcnosti sa sústredíme na izoláciu cDNA klonu toho génu, jeho klonovanie do expresného vektora a charakterizáciu jeho enzýmových a antifungálnych vlastností.

## Literatúra

1. MELCHERS, L.S. – STUIVER, M.H.: Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 2000, 147-152.
2. JOOSTEN, M.H.A.J. – VERBAKEL, H.M. – NETTEKOVEN, M.E. – Van LEUWEN, J. - Van Den VOSSSEN, R.T.M. – De WIT, P.J.G.M.: The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase defence proteins of its host, tomato. *Physiol.Mol. Plant Pathol.* 46, 1995, 45-49.
3. JUNIPER, B.E. – ROBINS, R.J. – JOEL, D.M.: The carnivorous plants. Academic Press, London, 1989, 1-392
4. SELA-BUURLAGE, M.B. – PONSTEIN, A.S. – BRES-VLOEMANS, S.A. – MELCHERS, L.S. – Van Den ELZEN, P.J.M. – CORNELISSEN, B.J.C.: Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 101,1993, 857-63.
5. LIBANTOVÁ, J. – MORAVČÍKOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I.: Izolácia fragmentu génu glukánázy z rosičky okrúhlostovej (*Drosera rotundifolia* L.) Zborník z 9. odborného seminára Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, 2002, 21-24.

Práca bola vypracovaná v rámci projektu VEGA 2/5034/25.

✉

✉

Ing. Jana Libantová, Ing. Jana Moravčíková, PhD; CSc; Ildikó Matušiková, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: nrgmora@savba.sk



## NETRADIČNÍ BARVA OBILEK PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.), JEJÍ GENETICKÁ PODMÍNĚNOST A MOŽNOST VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ UNUSUAL COLOUR OF WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) KERNELS, ITS GENETIC DETERMINATION AND POSSIBILITY OF UTILISATION IN FOOD-PROCESSING INDUSTRY

Petr MARTINEK - Olga COUFALOVÁ - Radim KUREČKA - Eva NOVÁKOVÁ - Jarmila MIKULCOVÁ

*A collection of wheat with different genetically determined kernel coloration is being built. The collection includes the genotypes (i) with purple colour of kernel pericarp. Based on literature, this colour is controlled by complementary effects of the genes Pp1, Pp2, Pp3 (now designated Pp1, Pp3b, Pp3a). The genes Pp2 (Pp3b) and Pp3 (Pp3a) are located on chromosome 2A and Pp1 on 7BL, (ii) with blue colour of kernel endosperm controlled by the gene Ba that is on 4BL to which the arm of chromosome from *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub [syn. *Agropyron elongatum* (Host) P.B., *Lophophyrum ponticum* (Podp.) Á Löve] was transferred. The purple and blue colours are conditioned by different kinds and composition of anthocyanins, (iii) with white kernel colour that is determined by a set of recessive alleles r1, r2, r3. In contrast to commonly grown cultivars with red kernel colour, which is conditioned by dominant effect of the R locus alleles, a low content of bitter substances (tannins) are present in surface layers of white kernel cultivars. Whereas the presence of tannins in red cultivars is related to higher sprouting resistance, white cultivars are more widely used in dry areas. Due to efforts aiming to enlarge the assortment of cereal raw materials and food products, production of a gristle flour containing wheat with purple kernel colour was tested in the IREKS – Enzyma, Ltd., Brno. This is used for making wholemeal products. Possible involvement of wheats with different kernel colour in breeding programmes is discussed.*

*Key words: bread wheat, purple kernel, blue kernel, white kernel, food-processing industry*

Požadavky na diverzifikaci výživy populace se promítají do inovací v potravinářském průmyslu a vedou k rozvoji nejrůznějších druhů technologií a uplatnění nových surovin. Je zvažována možnost zpracovatelského využití pšenice, která se vyznačuje netradičním zbarvením obilky a zastoupením přírodních barviv. Příspěvek upozorňuje na existenci zajímavých genotypů pšenice s purpurovou, modrou a bílou barvou zrna. Ty mohou být surovinou pro rozšíření sortimentu cereálních výrobků nejen pro svůj nezvyklý vzhled, ale i ze zdravotního hlediska.

Purpurová barva zrna byla do pšenice obecně přenesena z purpurových tetraploidních a hexaploidních pšeníc, pocházejících z Etiopie (COPP, 1965). Purpurové zrna obsahuje antokyany v povrchových vrstvách zrna (perikarpu), nejvíce je zastoupen kyanidin-3-glycosid (ABDEL-AAL a HUCL, 2003). U purpurových pšeníc je uváděn průměrný obsah antokyanů ve šrotu 157 mg.kg<sup>-1</sup> a v otrubách 458 mg.kg<sup>-1</sup> (ABDEL-AAL a HUCL, 1999). Antokyany jsou významné ze zdravotního hlediska, jsou využívány v lidové medicíně a přispívají ke zdraví populace (LILA, 2004). Byly vytvořeny dvě téměř izogenní linie pro purpurovou barvu zrna, pocházející z australské odrůdy Purple Feed a kanadské Purple na genetickém základě odrůdy Saratovskaya 29. Purpurová barva zrna je podmíněna geny *Pp* (purple pericarp). Pomocí monosomické analýzy byly geny z Purple Feed lokalizovány na 7B (*Pp1*) a na 6A (*Pp2*), a geny z Purple na 7B (*Pp1*) a 2A (*Pp3*) (ARBUZOVA et al., 1998; ARBUZOVA a MAYSTRENKO, 2000). Kromě těchto genů jsou u pšenice známy i jiné, podmiňující purpurové prašníky, červená ouška, červené a purpurové koleoptile, purpurové stéblo a další. Některé z nich byly mapovány pomocí molekulárních markerů. Komplementárně působící geny pro purpurovou barvu zrna *Pp1*, *Pp2*, *Pp3* (nově označované *Pp1*, *Pp3b*, *Pp3a*) byly mapovány na základě hodnocení kříženců hexaploidních pšeníc, lišících se purpurovou barvou zrna. Byly kříženy Purple - *Pp1Pp1Pp2Pp2* (*Pp1Pp1Pp3bPp3b*), a Purple Feed - *Pp1Pp1Pp2Pp2* (*Pp1Pp1Pp3aPp3a*) s pšenicí bez purpurového zrna Novosibirskaya 67 (N67) a Saratovskaya 29 (S29). Geny *Pp2* (*Pp3b*) a *Pp3* (*Pp3a*) mají monohybridní dominantní typ dědičnosti, pokud purpurové formy jsou kříženy s N67. Oba geny se nacházejí v centromerické oblasti na chromosomu 2A, proto byly nově označeny jako odlišné alely stejného lokusu *Pp3a* a *Pp3b*. U kříženců mezi purpurovými pšenicemi a S29 byl štěpný poměr 9 (purpurových) : 7 (nepurpurových), což svědčí o komplementárním působení dvou dominantních genů *Pp1* a *Pp3*. Gen *Pp1* byl lokalizován na 7BL, ve vzdálenosti 24 cM od centromery. Gen *Pp1* nebyl alelický ke genu *Rc-1* (červené koleoptile) a *Pc* (purpurové stéblo), působení *Pp* genů nemělo vliv na odolnost k porůstání. (DOBROVOLSKAYA et al., 2006)

Modrá barva zrna. QUALSET et al. (1983) informuje o existenci jarní pšenice UC66049B s modrým zrnem. Uvádí, že modrý aleuron je řízen kodominantně působícím genem *Ba* (blue aleurone). Do pšenice se gen *Ba* dostal přenesením celého ramena chromosomu z *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub [syn. *Agropyron elongatum* (Host) P.B., *Lophophyrum ponticum* (Podp.) Á Löve,]. Pozdější literatura uvádí u vzorku TRI 2401 (*Triticum aestivum* var. *tschermakianum* Mansf.) pocházejícího z genové banky (GB) v IPK Gatersleben v Německu jiný způsob genetického založení modrého zrna, který je u tohoto vzorku

disomickou substitúcií chromosomu 4A jiným chromosomem neznámého pôvodu. Podľa odchýlek v spôsobe dedičnosti modrého zbarvení sa uvažuje, že môže íť o odlišný gen od již zmiňovaného genu *Ba* z *Elytrigia pontica* (METTIN et al., 1991). Na túto skutočnosť reaguje rovněž katalog genů pšenice „MacGene2003“ (na CR-romu), kde je uváděna existence dvou genů *Ba1* (synonymum *Ba*) na 4B a *Ba2* na 4A. Pozdější údaje uvádějí, že gen *Ba* se nachází na dlouhém ramenu chromosomu 4B (QUALSET et al., 2005). U pšenice s modrým zrnem obsahoval šrot 251 mg.kg<sup>-1</sup> antokyanů a otruby 104 mg.kg<sup>-1</sup> antokyanů (ABDEL-AAL a HUCL, 1999). Pšenice s purpurovým a modrým zrnem se vzájemně lišily nejen rozdíly ve složení jednotlivých antokyanů a v jejich zastoupení v povrchové vrstvě a v endospermu zrna (ABDEL-AAL a HUCL, 2003). To pochopitelně odpovídá i rozdílu v lokalizaci barviv, které jsou vizuálně zřetelné na příčných lomech zrna. V České republice (ČR) se modrou barvou zrna pšenice zabýval Dr. Miroslav Škorpík, CSc. z VÚRV Praha (ŠKORPÍK et al., 1983). Uvádí, že používaný výchozí materiál pocházel pravděpodobně z mezirodového křížení mezi *T. aestivum* a *Aegilops ovata* L. z odkazu Ericha von Tschermaka. Popsal nové modrozrné variety: *T. spelta* L. var. *mostovoioy* Škorpík, *T. spelta* L. var. *cyanospermum* Škorpík *T. aestivum* L. var. *rodianum* Škorpík a *T. aestivum* L. var. *kovacikianum* Škorpík. Jsou uváděny rodokmeny a způsob segregace odstínů barev zrn uvnitř klasů v jednotlivých přesevech rostlin (ŠKORPÍK a ŠAŠEK, 1980).

Červená barva zrna se vyskytuje u většiny běžných odrůd. Červený perikarp je podmíněn dominantními alelami lokusu R. Předpokládá se, že R geny mohou být transkripčními faktory pro syntézu flavonoidů (HIMI a NODA, 2004) Pigment je tvořen derivátem katechinu a taninu /chalkon syntáza (CHS), chalkon isomeráza (CHI), flavono 3-hydroxyláza (F3H), dihydroflavonol 4-reduktáza (DFR)/, syntetizovanými v procesu biosyntézy flavonoidů (HIMI et al., 2005, HIMI a NODA, 2005). Výskyt těchto barviv je spojován s vyšším obsahem fenolických látek, nižší aktivitou hydrolytických enzymů a s tím spojenou lepší odolností k porůstání (MARES et al., 2005). Fenolické látky omezují výskyt volných radikálů, inhibují lipoxygenázu a fungují jako nespecifické inhibitory. Mají proto ochranný vliv proti chorobám a stresu a inhibiční vliv na dormanci a klíčení (LACHMAN et al., 2003). Červená barva je spojována s vyšší odolností k porůstání (PARKHOMENKO a KRUPNOV, 1994). Naopak odrůdy s bílým zrnem se rozšířily více do suchých oblastí.

Bílá barva zrna je řízena sestavou recesivních alel *r1*, *r2*, *r3*. Pšenice s bílým zrnem má nižší obsah fenolických složek, které jsou hořké. Neobsahuje polyfenol oxidázu, která je u červeno-zrné pšenice uložena v povrchových vrstvách zrna. To umožní nastavení vyšší výmelnosti mouky a produkt tak může obsahovat více vlákniny, minerálů a proteinů. Nepřítomnost hořkých látek způsobuje, že je produkt přirozeně sladší (význam v cukrářství).

## **Materiál a metody**

ZVÚ Kroměříž vytváří kolekci pšenice s rozdílnou barvou zrna. Disponuje souborem téměř izogenních linií (lišících se navzájem pouze jednotlivým znakem/genem/) odvozených od recipientní odrůdy Novosibirskaja 67 (N67) (WATANABE et al., 2003). V této kolekci jsou následující linie s definovaným zbarvením zrna: (i) purpurové zrna: ANK-28A (*Pp1*, *Pp2*), ANK-28B (*Pp1*, *Pp3*), červené zrna: ANK-1A (*R1*), ANK-1B (*R3*), ANK-1C (*R1*), ANK-1D (*R2*), ANK-1E (*R3*); přítomné geny jsou uvedeny v závorce. Nabízí se možnost detailního studia rozdílů mezi těmito liniemi a recipientní N67, celá kolekce čítající 72 vzorků byla předána na jaře 2004 do Genové banky (GB) v Praze. Od Ing. M. Škorpíka, CSc. byly získány ozimé modrozrné pšenice: Barevná 25, Barevná 9 a RU 440. Z nich nejvýnosnější je RU 440, která je rovněž dostatečně odolná k poléhání a k houbovým chorobám. Rovněž byla získána modrozrná jarní pšenice UC66049B (QUALSET et al., 2005), z GB IPK Gatersleben v Německu byly získány ozimé modrozrné formy: HTRI 2401/96, ATRI 4317/94 (*T. aestivum* L. em. Fiori et Paol. var. *tschermakianum* Mansf.), jarní pšenice Konini (Nový Zéland) s purpurovým zrnem, odrůda Turda (Rumunsko) s červeným endospermem, ozim ATRI 4694/97 (*T. aestivum* L. em. Fiori et Paol. var. *aureum* /Link/ Manet) se žlutým zrnem, z GB v Praze jarní *T. eathopicum* JAKUBZ. var. *arraseita* (Hochst. et Koern.) A. Filat.: „Abissinskaja arrasajta“ (Rusko) s purpurovým zrnem, a z Hodowla Roslin Strzelce (Polsko) zajímavý modrozrný vzorek ozimého hexaploidního tritikale 48M. Bílé zrna pšenice je reprezentováno ozimou pšenicí Heroldo (v ČR byla registrována v roce 2005 a je zastupována šlechtitelskou firmou RAGT Czech, s r.o., Branišovice).

## **Výsledky a diskuse**

Ve firmě IREKS – Enzyma, s.r.o. v Brně byla použita pšenice Abissinskaja arrasajta s purpurovou barvou zrna pro výrobu celozrného pečiva ze šrotu (obr. 1). Na obrázku jsou zřetelně vidět tmavé purpurové tečky na celozrném rohlíku, způsobené pigmentem z povrchových vrstev zrna. Použitá surovina vedla ke změně vzhledu tohoto výrobku, který se liší od obdobných výrobků ze šrotu běžné pšenice. Výrobky z této pšenice byly prezentovány firmou IREKS – Enzyma rovněž na mezinárodní potravinářské výstavě SALIMA v Brně v roce 2006. Je pochopitelné, že pokud by tato pšenice byla semleta na mouku, purpurová barva by se do mouky nedostala a zůstala by v otrubách.

Zcela jiná situace by nastala v případě využití modrozrné pšenice, kde se antokyany nacházejí uvnitř zrna. V tomto případě by mouka měla šedomodrou barvu a tato barva by se pochopitelně projevila i v vezhledu příslušných výrobků.

Důležitou otázkou zůstává, jaký zdravotní, případně nutriční význam by mělo zavedení těchto netradičních pšenic do výroby. Vzhledem k tomu, že úloha antokyanů je ze zdravotního pohledu obecně prospěšná (LILA, 2004), mohou uváděné netradiční pšenice být zdrojem nových vhodných látek. Přírodní barviva se obvykle vyznačují antioxidační aktivitou. Strava bohatá na antioxidanty typu antokyanů, flavonoidů a karatonoidů působí preventivně mimo jiné na výskyt aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, zánětlivých procesů, zlepšuje funkci zraku a pozitivně ovlivňuje ochranné procesy v organismu (LACHMAN, et al., 2003). Dosud není jasné, do jaké míry by byly přírodní barviva ovlivněna následným tepelným zpracováním během pečení. Během pečení (cca nad 120 °C) především v průběhu tzv. Maillardovy reakce dochází k různým chemickým reakcím, kdy mohou vznikat i škodlivé látky, a to pochopitelně i v procesu inovace potravinářských výrob. Je žádoucí, aby byly stravou přijímány pokud možno příznivě působící látky v přirozeném (nativním) stavu. Šetrnější by mohla být technologie expandování (pufování), jejíž princip je založen na rozpínání zrna parou v průběhu krátkodobého zahřátí.

Při studiu dědičnosti barvy zrna obilky je třeba mít na zřeteli, že u pšenice je povrchová vrstva obilky (epidermis) tvořena společně s perikarpem kompletně mateřskou diploidní tkání (shodnou s genetickou výbavou matky), embryo je tvořeno diploidní tkání (polovina genetické informace pochází od matky a polovina od otce) a endosperm s aleuronovou vrstvou buněk na povrchu je tvořen triploidní tkání (kde dvě třetiny jsou tvořeny genetickou výbavou matky a jedna třetina je od otce). Lze očekávat, že tato skutečnost bude ovlivňovat expresi kodominantního působícího genu *Ba*. To se výrazně projeví během segregace v  $F_2$  populacích kříženců, kdy je možné pozorovat výskyt různě zbarvených zrn v rámci



Obrázek 1: Celozrné rohlíky upečené z pšenice s purpurovou barvou zrna

jednoho klasu. Rovněž segregace modré barvy zrna u reciprokých křížení v  $F_2$  nebude shodná. Odlišnost v zastoupení genu *Ba* v rozdílných tkáních by se mohla fenotypově projevit odlišnostmi intenzity zbarvení i mezi jednotlivými typy tkání obilky.

Je vytvářena kolekce genových zdrojů pšenice s rozdílně geneticky determinovaným zbarvením obilek. Shromažďované zdroje v kolekci mohou být využity pro vzájemné kombinování různých genů mezi sebou, ke genetickým studiím a ve šlechtění.

## Literatura

1. ABDEL-AAL, EL-S.M., HUCL, P.: Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *Agric. Food Chem.*, 51, 2003: 2174-2180.
2. ABDEL-AAL, EL-S.M., HUCL, P.: A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76, 3, 1999: 350-354
3. ARBUZOVA, V.S., MAYSTRENKO, O.I.: Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. *Cereal Res. Comm.*, 28, 2000: 235-237.
4. ARBUZOVA, V.S., MAYSTRENKO O.I., POPOVA, O.M.: Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar 'Saratovskaya 29'. *Cereal Res. Comm.*, 26, 1998: 39-46.
5. COPP, L.G.L.: Purple grains in hexaploid wheat. *Wheat Inform. Service*, 19-20, 1965: 18.
6. DOBROVOLSKAYA, O., ARBUZOVA, V.S., LOHWASSER, U., RÖDER, M.S., BÖRNER, A.: Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 2006, Vol. 150, 3, 2006: 355-363.
7. HIMI, E., NODA, K.: Isolation and location of the three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression. *Journal Exp. Botany*, 55, 2004: 365-375.
8. HIMI, E., NISAR, A., NODA, K.: Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat *Genome*, 48, 4, 2005: 747-754.
9. HIMI, E., NODA, K.: Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor. *Euphytica*, 143, 3, 2005: 239-24.
10. LACHMAN, J., DUDJAK, J., ORSÁK, M., PIVEC, V.: Effect of accelerated ageing on the content and composition of polyphenolic complex of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Plant, Soil and Environment*, 49, 1, 2003: 1-7.



11. LILA, A.M.: Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. J. Biomed. Biotechnol. 2004: 306-313.
12. MARES, D., MRVA, K., CHEONG, J., WILLIAMS, K., WATSON, B., STORLIE, E., SUTHERLAND, M., ZOU, Y.: A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in white- and red-grained wheats of diverse origin Theoretical and Applied Genetics, 111, 7, 2005: 1357-1363.
13. METTIN, D., SCHLEGEL, G., LEHMANN, C.: Instability of the blue grain colour in a strain of *Triticum aestivum* L., Genome, 34, 5, 1991: 745-750.
14. PARKHOMENKO, A.I., KRUPNOV, V.A.: Productivity of red- and white-grained spring common wheat isolines on the chestnut soils of Trans-Volga region Rep. of RAAS. No 6. 1994: 5-7.
15. QULASET, C. O., SOLIMAN, K. M., DVORAK, J. J., VOGT, H. E.: Release of wheat germplasm: A blue aleurone translocation stock - UC66049, Agronomy Progress Report (Univ. of California, Davis), July 1983, No. 139.
16. QULASET, C. O., SOLIMAN, K. M., DVORAK, J. J., MCGUIRE, P.E., VOGT, H. E.: Registration of UC66049 *Triticum aestivum* blue aleurone genetic stock. Crop Science, 2005, Vol. 45: 432.
17. ŠKORPÍK M., ROD, J., ŠÍP, V., SEHNALOVÁ, J., KOŠER, J.: Coloured wheat from the effects of E. Tschermak. Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae, 32, 2, 1983: 147-157.
18. ŠKORPÍK M., ŠAŠEK, A.: Charakteristika vybraných linií barevné pšenice elektroforézou bílkovin. Sborník ÚVTIZ - Genetika a Šlechtění, 16, 3, 1980: 193-200.
19. WATANABE, N., KOVAL, S.F., KOVAL, V.S.: Wheat near-isogenic lines, Sankeisha, Nagoya, 2003. 156p.

#### **Poděkování:**

Výzkum byl financován Národním programem výzkumu II (program 2B) Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projektem evidenční číslo 2B06168.



Ing. Petr Martinek, CSc., Ing. Olga Coufalová, Jarmila Mikulcová: Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika, tel.: (+420) 573 317 158, martinek@vukrom.cz  
Ing. Radim Kurečka, Ing. Eva Nováková: IREKS – Enzyma, s.r.o., Kšírova 257, 619 00 Brno, Česká republika, (+420) 543 250 155, radim.kurecka@ireks-enzyma.cz

# KRÍMNA KVALITA ODRÔD PŠENICE LETNEJ F. OZIMNEJ VELDAVA A PAVLINA TESTOVANÁ NA BROJLEROVÝCH KURČATÁCH

## FEED QUALITY OF WINTER WHEAT VELDAVA AND PAVLINA TESTED ON BROILER CHICKEN

Ľubomír RÜCKSCHLOSS

*Two varieties of winter wheat were tested for feed quality on broiler chicken. The most expressive improvement of the benefit indicators of the broiler chicken were achieved with Veldava variety, when were expressively improved live weight and average daily live weight gain of the broiler chicken. Also were reduced feed consumption for 1 kg of live weight gain and expenses for consumed feed mixture.*

*Key words: winter wheat, feed quality, broiler chicken*

### Úvod

Variabilita jednotlivých odrôd vzhľadom na ich zloženie je veľká. Ktoré vlastnosti jednotlivých odrôd vplyvajú na krmnú kvalitu zatiaľ nevieme exaktne definovať. Vstupom zahraničných, najmä západoeurópskych odrôd na náš trh sa čoraz viac proklamuje ich krmná kvalita aj napriek tomu, že nikde nebola testovaná. Preto v roku 2006 boli testované 2 odrody pšenice letnej f. ozimnej z VŠS Vígľaš-Pstruša na krmnú kvalitu.

### Materiál a metódy

V pokuse boli použité odrody Veldava a Pavlina, ktoré boli zapracované do kompletných krmných zmesí, na parametre úžitkovosti brojlerových kurčiat.

Pokus bol realizovaný ako trojskupinový krmný pokus v štyroch opakovaníach na Biologicko – testáčnej stanici ÚKSÚP vo Vígľaši pod gesciou oddelenia krmív a výživy zvierat pobočky ÚKSÚP Zvolen. Do pokusu boli zaradené jednodenné, nesexované kurčatá mäsového hybridu, v počte minimálne 100 ks v každej skupine v každom opakovaní. Zostavený materiál zodpovedal kritériám STN 46 6410, čo sa preverilo individuálnym ohodnotením, vo vážení a posúdení exteriéru u 200 kusov kurčiat. Pokus bol ukončený v 43. dni veku kurčiat. Za uhynuté zvieratá v priebehu pokusu skupiny neboli dopĺňované.

### Výsledky a diskusia

Podstatnejšie rozdiely medzi kontrolnou odrodou a odrodami Veldava a Pavlina boli zistené v obsahu dusíkatých látok, popola a vápnika. Najvyšší obsah dusíkatých látok bol analyticky zistený pri odrode Pavlina (102,7 g/kg), nižší pri odrode Veldava (101,4 g/kg) a najnižší pri kontrolnej odrode (79,9 g/kg). Obsah popola a vápnika bol zistený pri kontrolnej odrode vyšší ako pri odrodách Veldava a Pavlina. Pokusné odrody pšeníc Pavlina a Veldava mali lepšie aminokyselinové zloženie ako kontrolná odroda. Uvedené sa prejavilo aj v rozdielnom obsahu živín kompletných krmných zmesí.

Pokus sa uskutočnil podľa nasledovnej schémy:

Obdobie	1. skupina	2. skupina	3. skupina
Predvýkrm 0-20 dní	ZKZ + odroda kontrola	ZKZ + odroda Veldava	ZKZ + odroda Pavla
Výkrm 21-38 dní	ZKZ + odroda kontrola	ZKZ + odroda Veldava	ZKZ + odroda Pavla
Dokrm 39-43 dní	ZKZ + odroda kontrola	ZKZ + odroda Veldava	ZKZ + odroda Pavla

Pozn.: ZKZ = Základná krmná zmes

Základná krmná zmes (ďalej len „ZKZ“) bola vyrobená z rovnakých surovín pre všetky skupiny zvierat.

Pre prvú skupinu bola do ZKZ primiešaná podľa predchádzajúcej schémy kontrolná odroda pšenice. Pre druhú skupinu bola do ZKZ primiešaná pšenica odrody **Veldava** a pre tretiu skupinu bola do ZKZ primiešaná pšenica odrody **Pavlina**.

Z uvedeného vyplýva, že kompletne krmné zmesi boli rovnakého surovinového zloženia a od seba sa líšili len použitou odrodou pšenice.

#### Výsledky pokusu môžeme zhrnúť do nasledovných bodov:

1. Za celé obdobie pokusu sme najnižšiu spotrebu krmiva na jeden kilogram prírastku živej hmotnosti zistili pri kurčatách druhej skupiny, ktorá bola oproti prvej skupine nižšia o 3,11 %. Pri zvieratách tretej skupiny sme zaznamenali taktiež nižšiu spotrebu krmiva oproti prvej skupine o 0,65 %.
2. Index efektívnosti výkrmu bol najnižší v prvej skupine (226,56). Zvieratá tretej skupiny dosiahli index vyšší o 3,36 % a zvieratá druhej skupiny vyšší o 9,72 %.

3. Najnižšie náklady za spotrebované krmivá na jeden kilogram prírastku živej hmotnosti sme zaznamenali vo všetkých obdobiach ako aj za celé obdobie pokusu v druhej skupine. Úspora nákladov v porovnaní s prvou skupinou bola nasledovná: v období predvýkrmu 2,79 %, v období výkrmu 2,41 %, v období dokrmu 6,39 % a za celé obdobie pokusu 3,18 %. Taktiež zvieratá tretej skupiny oproti zvieratám prvej skupiny dosiahli vo všetkých obdobiach ako aj za celé obdobie pokusu nižšie náklady za krmivá, o 0,25 % v období predvýkrmu, o 0,61 % v období výkrmu, o 2,52 % v období dokrmu a o 0,78 % za celé obdobie pokusu.

Ekonomická bilancia nákladov za spotrebované krmivá na 1 kg prírastku živej hmotnosti

Druh KZ	Cena KKZ v Sk	Spotreba krmív na 1 kg prírastku živej hmotnosti v kg			Cena spotrebovaných KZ na 1 kg prírastku živej hmotnosti v Sk		
		1. skupina	2. skupina	3. skupina	1. skupina	2. skupina	3. skupina
<b>Obdobie predvýkrmu</b>							
Spolu	897,0	1,576	1,532	1,572	14,14	13,74	14,10
Index	-	100,00	97,21	99,75	100,00	97,21	99,75
<b>Obdobie výkrmu</b>							
Spolu	809,0	2,281	2,226	2,267	18,45	18,01	18,34
Index	-	100,00	97,59	99,39	100,00	97,59	99,39
<b>Obdobie dokrmu</b>							
Spolu	672,0	2,66	2,49	2,593	17,88	16,73	17,42
Index	-	100,00	93,61	97,48	100,00	93,61	97,48
<b>Celé obdobie pokusu</b>							
HYD - 01 – K	897,0	0,453	-	-	4,06	-	-
HYD - 01 - P1	897,0	-	0,425	-	-	3,81	-
HYD - 01 - P2	897,0	-	-	0,439	-	-	3,94
HYD - 02 – K	809,0	1,190	-	-	9,63	-	-
HYD - 02 - P1	809,0	-	1,167	-	-	9,44	-
HYD - 02 - P2	809,0	-	-	1,184	-	-	9,58
HYD - 03 – K	672,0	0,509	-	-	3,42	-	-
HYD - 03 - P1	672,0	-	0,493	-	-	3,31	-
HYD - 03 - P2	672,0	-	-	0,515	-	-	3,46
Spolu	-	2,152	2,085	2,138	17,11	16,57	16,98
Index	-	100,00	96,89	99,35	100,00	96,82	99,22

## Záver

Z výsledkov pokusu vyplýva jednoznačne pozitívny vplyv krmných odrôd pšeníc Pavlina a Veldava na parametre úžitkovosti vo výkrme brojlerových kurčiat v porovnaní s kontrolnou odrodou pšenice. Najvýraznejšie zlepšenie úžitkových parametrov brojlerových kurčiat sa v porovnaní s kontrolnou pšenicom dosiahlo so pšenicom odrody Veldava, kde došlo k výraznému zvýšeniu živých hmotností a priemerných denných prírastkov živej hmotnosti vykrmovaných kurčiat a k zníženiu spotreby krmiva na jeden kilogram prírastku živej hmotnosti pri úspore nákladov za spotrebované krmne zmesi.

Na základe týchto výsledkov odporúčame využívať ozimnú odrodu pšenice Veldava nakoľko sa táto javí ako špičková krmna odroda ozimnej pšenice.

✉

✉

Eubomir Rückschloss, Ing. [ruckschloss@vurv.sk](mailto:ruckschloss@vurv.sk) Výskumno-šľachtiteľská stanica, Vigľaš-Pstruša, 962 12 Detva

# PRODUKTIVITA A KVALITA DIHAPLOIDNÝCH LÍNIÍ PŠENICE LETNEJ F. OZIMNEJ

## PRODUCTIVITY AND QUALITY OF WINTER WHEAT DIHAPLOID LINES

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Martin UŽÍK

*57 dihaploid (DH) lines (originated from 5 crossings) and lines from classical selection were evaluated in field experiment in 2004/05. DH lines originated from 3 crossings had lower grain yield than lines, in 1 crossing grain yield was comparable and DH lines from crossing 11 (Ilona x SK 656-2) had higher grain yield. Higher grain yield was connected with higher plant height. In 1000 grain weigh, in protein content and in grain hardness no differences were among evaluated line groups. DH lines had higher average values in wet gluten.*

*Key words: winter wheat, dihaploid, productivity, quality*

### Úvod

Technika peľnicových kultúr ako prostriedok pre produkciu haploidných rastlín je stále aplikovaná v šľachtení rastlín (MILKOVA et al., 2003). Umožňuje urýchlenie procesu šľachtenia v porovnaní s tradičnými metódami, nakoľko haploidizácia je dosiahnutá v priebehu jednej generácie. Vo svete je registrovaných mnoho odrôd pšenice, ktoré boli vyšľachtené prostredníctvom indukovanej androgenézy. Prehľad, aj pri iných plodinách uvádza napr. THOMAS et al. (2003).

Predmetom mnohých výskumov už v minulosti bolo porovnať dihaploidné línie (DH) s líniami vytvorenými klasickými selekčnými postupmi (pedigree, SSD). SNAPE (1976) na základe teoretickej analýzy zistil, že medzi DH a SSD líniami nie sú rozdiely v prípade, že medzi znakmi nie je väzba. TORJEK et al. (2002) porovnali produktivitu a adaptabilitu nových DH odrôd vytvorených v Maďarsku. Zistili, že v poľných pokusoch boli podobné v porovnaní s konvenčnými odrodami. Pri hodnotení 10 DH línií pšenice v poľných pokusoch počas dvoch rokov sme zistili ich agronomickú rovnocennosť v porovnaní s klasickými odrodami (ŽOFAJOVÁ, UŽÍK, 2004). Prednosťou DH línií je ich homozygotný stav a v prípade registrácie odrody jej jednoduché udržiavanie.

Cieľom práce bolo v produktivite a v kvalite porovnať dihaploidné línie pšenice letnej f. ozimnej s líniami z klasickej selekcie.

### Materiál a metódy

DH línie pšenice letnej f. ozimnej boli vytvorené technikou peľnicových kultúr (ŽOFAJOVÁ, UŽÍK, 2004). Vo vegetácii 2004/05 v poľnom pokuse bez opakovania (plocha parcely 0,75 m<sup>2</sup>) bol hodnotený súbor 57 DH línií pšenice letnej f. ozimnej. Do pokusu boli zaradené okrem kontrolných odrôd tiež línie rovnakého pôvodu, ale pochádzajúce z klasického výberu. Pôvod línií je uvedený v tab. 1. V priebehu vegetácie boli sledované obligátne znaky, v zrelosti stanovená úroda zrna a pomocou prístroja NIRS znaky kvality, z ktorých uvádzame obsah bielkovín, obsah mokrého lepku a tvrdosť zrna.

### Výsledky a diskusia

V pokuse bez opakovania bolo vo vegetácii 2004/05 z hľadiska úrody, vybraných úrodotvorných znakov a kvality hodnotených 57 DH línií pšenice letnej f. ozimnej, ktoré pochádzali z 5 krížení (tab. 1). Do pokusu boli tiež zaradené línie (generácia F<sub>6</sub>), ktoré z príslušných krížení boli vybrané na základe klasického šľachtiteľského postupu (ďalej línie). Počet DH línií bol podľa krížení rozdielny a pohyboval sa od 6 do 22. DH línie mali v priemere nižšiu úrodu zrna (787 g.m<sup>-2</sup>) v porovnaní s líniami (998 g.m<sup>-2</sup>), avšak vyššia úroda zrna bola spojená s vyššou výškou porastu. Podobne CAMARGO et al. (2003) pri hodnotení DH línií pšenice na dvoch lokalitách a v priebehu troch rokov zistili, že najproduktívnejšie genotypy mali vysoké rastliny. Výška rastlín DH línií bola porovnateľná s vyššími kontrolami - Ilona a Torysa. Iba DH línie z kríženia Ilona x SK 656-2 mali priemernú úrodu zrna o 16,8 % vyššiu ako línie a DH línie z kríženia SK 656-2 x SO 1441 mali porovnateľnú úrodu zrna s líniami. Variabilita medzi pôvodmi kríženia a vnútri krížení bola v úrode zrna veľká a determinoval ju tiež zvolený spôsob založenia pokusu, ktorý pre nedostatok osiva bolo možné ako jediný použiť. Zo súboru 57 DH línií 15 dosiahlo úrodu zrna vyššiu ako 1000 g.m<sup>-2</sup> a najviac takýchto línií pochádzalo z krížení 11 a 20. V hmotnosti 1000 zrn v priemere medzi DH líniami a líniami z klasického šľachtenia neboli rozdiely, avšak DH línie pochádzajúce z 3 krížení (3, 9, 11) mali nižšiu hmotnosť zrna. Najvyššiu hmotnosť zrna mali línie z kríženia 11 ( $\bar{x}$  = 50,21 g), čo bola zároveň aj najvyššia hodnota v porovnaní s kontrolami (K<sub>3</sub> – Torysa = 49,54 g).

V obsahu bielkovín a v tvrdosti zrna medzi porovnávanými skupinami línií neboli rozdiely. Podľa očakávania najvyšší obsah bielkovín mala kontrolná odroda Ilona ( $\bar{x}$  = 15,50), štandard pre kvalitu. Podobný obsah bielkovín ( $\bar{x}$  = 15,54) mali DH línie pochádzajúce z kríženia 9. Pri tomto pôvode bola tiež najvyššia diferenciacia v obsahu bielkovín v prospech DH línií. V obsahu mokrého lepku DH línie mali v priemere vyššie hodnoty, čo sa potvrdilo tiež pri 3 (9, 13, 20) z 5 hodnotených krížení. Podobne ako pri obsahu bielkovín najvyšší obsah mokrého lepku mali DH línie z kríženia 9.

## Záver

Z porovnania 57 DH línií pšenice letnej f. ozimnej s líniami vybranými klasickým šľachtiteľským postupom vyplynuli tieto závery: DH línie pochádzajúce z 3 krížení mali v priemere nižšiu úrodu zrna než línie, pri 1 krížení bola úroda zrna porovnateľná a DH línie z kríženia 11 (Ilona x SK 656-2) mali vyššiu úrodu zrna. Vyššia úroda zrna bola spojená s vyššou výškou porastu. V hmotnosti 1000 zrn, v obsahu bielkovín a v tvrdosti zrna neboli medzi porovnávanými skupinami línií rozdiely. V obsahu mokrého lepku mali DH línie v priemere vyššie hodnoty ako línie.

## Literatúra

- CAMARGO, O. et al.: Performance of wheat dihaploid lines at two locations of the state of Sao Paulo, Brazil. *Bragantia*, 62, 2003, 2, 217-226.
- MILKOVA, V. R. – IVANOV, P.I. – TODOROV, I.: Intensification of the breeding process in wheat (*T. aestivum* L.) by using *in vitro* methods and characterization of the new developed genotypes. In: *Cer. Res. Com.*, 31, 2003, 3-4. 355-361
- SNAPE, J.W.: A theoretical comparison of diploidised haploid and single seed descent populations. In: *Heredity*, 36, 1976, 275-277.
- THOMAS, W.T.B. et al.: Doubled haploids in breeding. In: MALUSZYNSKI et al.: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dundee : Scottish Crop Research Institute, 2003, s. 337-349.
- TORJEK, O. – KISS, E. et al.: Molecular homogeneity of conventional and doubled haploid wheat cultivars and their DH lines. In: *Novenytermeles*, 2002, vol. 51, Iss 1, p. 7-20.
- ŽOFAJOVÁ, A. - UŽÍK, M.: Anther culture in wheat. In: *Plant biotechnology : Progress and developments : 5th International symposium in the series Recent advances in plant biotechnology : Book of abstracts : Stará Lesná, September 7-13, 2003*. Nitra : ÚGRB SAV, 2003, s.67.
- ŽOFAJOVÁ, A. - UŽÍK, M.: Hodnotenie dihaploidných línií pšenice letnej f. ozimnej. 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. 53 - 56.*

Podakovanie: Ing. Gavurníkovej Soni za analýzu na NIRS prístroji.

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

### Tabuľka 1: Produktivita a kvalita línií (získaných klasickým výberom - L a dihaploidných - DH) pšenice letnej f. ozimnej, skúšaných v poľnom pokuse 2004/05

Pôvod		n	Úroda zrna (g.m <sup>-2</sup> )	Výška rastlín (cm)	HTS (g)	NIRS		
						Bielkoviny	Mokrý lepok	Tvrdosť zrna
3-PS 19/94 x SK 679-18	L	2	1030	95	46,92	13,52	42,26	65,83
	DH	6	763	90	45,51	13,21	39,59	66,58
9-SO 1441 x PS 19/94	L	2	1083	100	47,65	14,45	43,44	69,62
	DH	6	519	96	45,26	15,54	51,77	74,36
11-Ilona x SK 656-2	L	2	857	107	50,21	15,26	42,40	81,52
	DH	22	1001	91	49,77	14,50	39,14	75,71
13-Ilona x PS 28-96	L	2	1047	103	41,20	13,12	31,55	73,74
	DH	14	687	86	43,44	14,15	37,94	76,72
20-SK 656-2 x SO 1441	L	2	973	96	45,76	14,68	36,64	80,10
	DH	9	964	85	46,49	14,74	37,57	79,43
$\bar{x}_L$		10	998	100	46,35	14,21	39,26	74,16
$\bar{x}_{DH}$		57	787	90	46,09	14,43	41,20	74,16
K <sub>1</sub> - Astella		5	1113	85	43,30	12,94	35,75	58,59
K <sub>2</sub> - Ilona		5	943	88	46,45	15,50	43,68	79,11
K <sub>3</sub> - Torysa		5	1395	94	49,54	12,85	33,54	64,67

✉

## HODNOTENIE GENETICKEJ VZDIALENOSTI MEDZI POPULÁCIAMI / ODRODAMI ĽUĽKA ZEMIAKOVÉHO, ĽANU SIATEHO A JAČMEŇA SIATEHO PCR–ISSR MARKÉRMÍ GENETIC DISSIMILARITY EVALUATION OF POTATO, FLAX AND BARLEY POPULATIONS/ VARIETES USING PCR–ISSR MARKERS

Milan BEŽO - Katarína HRUBÍKOVÁ - Jana ŽIAROVSKÁ - Martin BEŽO -  
Agáta CANDRÁKOVÁ

*The aim of the study was to distinguish a set of varieties (for flax and barley) and a population (for potato) according to the genetic dissimilarity based on microsatellite primers. Three primers anchored on the 3'OH end were used [(GAG)<sub>3</sub>GC, (CTG)<sub>3</sub>GC a (CTC)<sub>3</sub>GC] to provide PCR–ISSR profiles. Clustering related to the origin of common ancestors was presented in the dendrogram of flax varieties and groups of hybrids related to the genetic background of their parents were found in the potato population. Clusters linked to the other varieties' ancestor relationships were found among barley varieties.*

*Key words: flax (Linum usitatissimum L.), potato (Solanum tuberosum, L.), barley (Hordeum vulgare, L.), PCR–ISSR, genetic dissimilarity*

### Úvod

Mapovanie rastlinných genómov ako aj šľachtenie nových odrôd a línií sa v súčasnosti vo svojich metodických postupoch spolieha na polymorfne genetické markéry. PCR–ISSR (Inter Simple Sequence Repeats – zmnôženie úsekov medzi jednoduchými opakovaniami nukleotidov, mikrosatelitmi) je efektívny systém hodnotenia genotypov rastlín. Zmnôženie úsekov DNA technikou PCR–ISSR umožňuje rozlíšenie aj príbuzensky blízkych genómov, kde iné techniky neposkytujú dostatočný stupeň polymorfizmu (McGREGOR et al., 2000; YONG-CUI et al., 2005).

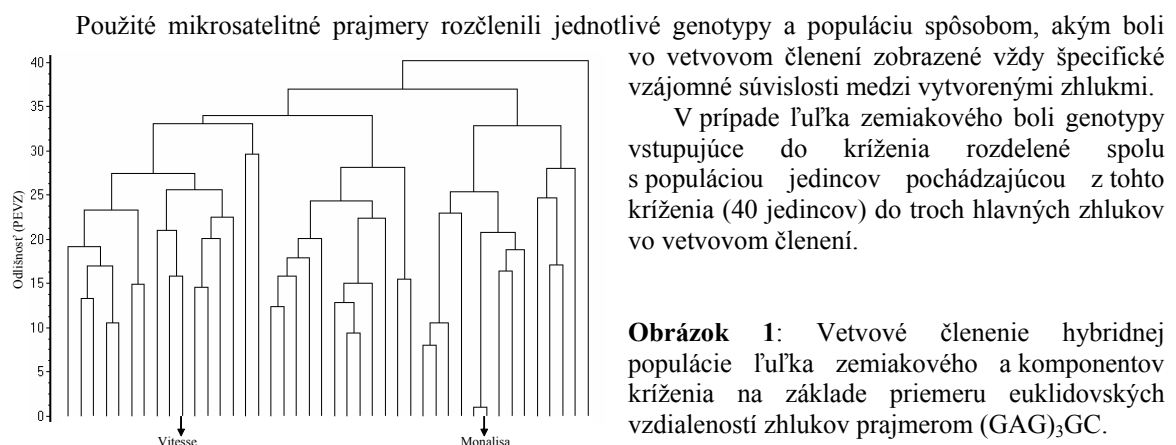
Cieľom práce bolo zhodnotiť pomocou PCR–ISSR genetickú vzdialenosť medzi populáciami alebo odrodami v rámci zbierok genofondu troch druhov rastlín, ľuľka zemiakového, ľanu siateho a jačmeňa siateho.

### Materiál a metodika

Pre PCR–ISSR analýzy boli použité triméry odvodené z mikrosatelitných opakovaní nukleotidov a ukotvené pomocou dvojice nukleotidov GC na 3'OH konci prajmera [(GAG)<sub>3</sub>GC, (CTG)<sub>3</sub>GC a (CTC)<sub>3</sub>GC]. K hodnoteniu genetických vzdialeností bola použitá DNA troch druhov rastlín, ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum*, L.). Ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) a jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*, L.).

Polymerázové reťazové reakcie (PCR) sa uskutočnili v tlmivom roztoku 20 mmol × dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 8,0) a zložkami 50 mmol × dm<sup>-3</sup> KCl, 30 ng DNA pre ľan a ľuľok a 10 ng pre jačmeň, 4 nmol × dm<sup>-3</sup> prajmera, 1 U Taq polymerázy, 3 mmol × dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub> a 0,2 mmol × dm<sup>-3</sup> dNTPs. Časový a teplotný profil PCR bol nasledovný: úvodná denaturácia 2 min pri 94 °C, nasledovalo 45 cyklov s krokmi, denaturácia 1 min pri 94°C; naviazanie prajmera 1 min pri 55 °C a syntéza polynukleotida 3 min pri 72 °C. Záverečná syntéza polynukleotida 7 min pri 72 °C. Vetvové členenie bolo zostavené UPGMA analýzou na základe priemeru euklidovských vzdialeností zhlukov (PEVZ) v programe SYNTAX.

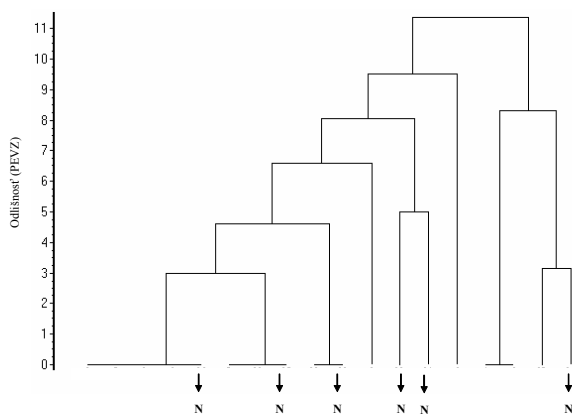
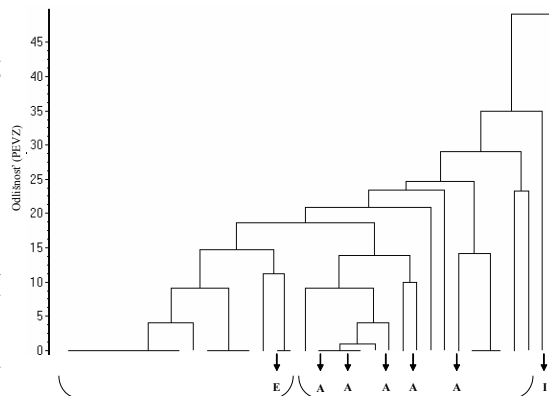
### Výsledky a diskusia



Hybridná kombinácia pochádzajúca z kríženia odolného a náchylného genotypu Vitesse (RRrr) × Monalisa (rrrr) k háďatku zemiakovému bola rozdelená na genotypy zoskupené okolo jedného komponentu kríženia (Vitesse), na skupinu zoskupenú okolo druhého komponentu kríženia (Monalisa) a na skupinu medzi týmito dvoma, avšak pripojenú na úrovni 0,34 PEVZ ku skupine okolo Vitesse (obr. 1). Vzhľadom k založeniu komponentov kríženia k háďatku zemiakovému môže zoskupenie uvedených hybridných genotypov poskytnúť vhodný genetický základ pre ich ďalšie využitie v šľachtiteľských programoch smerom k rozlišovaniu biologickej variability pri medziodrodovom krížení. Genotypy zoskupené spolu s určitým genetickým založením komponentov kríženia môžu byť prínosom pri prekonávaní nevýhod príbuzenského kríženia.

Vetvové členenie 36 genotypov ľanu zostrojené na základe PCR–ISSR zoskupilo analyzované genotypy do zhlukov (obr. 2), v ktorých sa odráža genetické pozadie vzájomného kríženia ľanu siateho. Zoskupenie európskych genotypov v každom zhluku s určitými mimoeurópskymi genotypmi môže odrážať nielen širšie pozadie celého postupu šľachtenia ľanu siateho, ale aj previazanosť šľachtiteľských programov jednotlivých krajín a dostupnosti určitých genotypov pre tieto programy.

**Obrázok 2:** Vetvové členenie genotypov ľanu siateho na základe priemeru euklidovských vzdialeností zhlukov prajmerom (CTG)<sub>3</sub>GC. E – egyptský genotyp v spojení s európskymi; A – genotypy amerického kontinentu v spojení s európskymi; I – indický genotyp



v spojení s registrovanými odrodami.

Využitím PCR–ISSR v kolekcii genotypov jačmeňa siateho, boli genotypy rozdelené do zhlukov podľa vzťahov predpokladaného systému kríženia v šľachtení ich predkov. Takéto rozčlenenie je možné použiť pri analýzach genotypov, pri ktorých nie je známy predchádzajúci postup kríženia, ich priradením PCR–ISSR analýzami ku skupinám genotypov, o ktorých takéto údaje poznáme.

**Obrázok 3:** Vetvové členenie genotypov jačmeňa siateho na základe priemeru euklidovských vzdialeností zhlukov prajmerom (CTC)<sub>3</sub>GC. N – novošľachtence

## Záver

Vzhľadom k nízkym možnostiam rozdeľovania genotypov hospodárskych rastlín do skupín odrážajúcich ich pôvod alebo typ hospodárskeho využitia a pripisovaniu tejto skutočnosti vzájomnému kríženiu sa genotypov počas šľachtenia nielen u blízkych, ale aj vzdialenejších predkov, ako aj neexistujúce údaje o genotypoch vstupujúcich do šľachtenia, poskytujú mikrosatelity ako markéry odrážajúce priame možnosti prenosu určitých úsekov DNA efektívny nástroj k odhadovaniu vzájomných vzťahov v genómoch rastlín.

Práca vznikla s podporou projektu „Vývoj retrotranspozónových a mikrosatelitových markérov identifikácie odrôd a F1 jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) vo vzťahu k odolnosti voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. *hordei*). Číslo projektu VEGA 1/3452/06 a projektu APVT 20-026002 DNA markéry v selekcii ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.).

## Literatúra

1. MCGREGOR, C.E. – LAMBERT, C.A. – GREYLING, M.M. – LOUW, J.H. – WARNICH, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. In: Euphytica, 2000, vol. 113, p. 135-144.
2. YONG-CUI, H. – ZE-HONG, Y. – YUI-MING, W. – YOU-LIANG, Z. 2005. Genetic diversity in barley from west China. In: Barley Genetics Newsletter, 2005, vol. 35. p. 9-22.

✉

✉

## GENETICKÁ ANALÝZA POPULÁCIÍ LIPNICE LÚČNEJ (*POA PRATENSIS* L.) PCR–ISSR MARKÉRMÍ

### GENETIC ANALYSIS OF KENTUCKY BLUEGRASS (*POA PRATENSIS* L.) USING PCR–ISSR MARKERS

Martin BEŽO - Ján BRINDZA - Milan BEŽO - Katarína HRUBÍKOVÁ - Jana ŽIAROVSKÁ - Agáta CANDRÁKOVÁ

*Molecular markers (PCR–ISSR) were employed to characterize a genetic resource collection of Kentucky bluegrass (Poa pratensis L.). Inter simple fragments (microsatellites) were amplified by four PCR–ISSR primers PP–ISSR–1 (CT)<sub>8</sub>AC, PP–ISSR–2 (gA)<sub>6</sub>CC, PP–ISSR–3 (gAg)<sub>3</sub>gC and PP–ISSR–4 (gTg)<sub>3</sub>gC. The PCR–ISSR markers detected two original bands among all 569 bands of analysed thirty four populations. The population Alpine had one original fragment with length 250 bp amplified by PP–ISSR–3 (gAg)<sub>3</sub>gC and the population 63/722 had other original fragment 1020bp amplified by PP–ISSR–4 (gTg)<sub>3</sub>gC.*

*Key words:*, Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.), PCR–ISSR, genetic dissimilarity

#### Úvod

Lipnica lúčna patrí medzi rastlinné druhy, ktorým sa venuje pozornosť genetických analýz na úrovni DNA markérov. Na analýzu polymorfizmu DNA genómu organizmov sa uplatňujú mikrosatelity, krátke opakujúce sa poradia nukleotidov (1–5 párov báz). Variabilita produktov PCR–ISSR vzniká rozdielnou vzdialenosťou medzi mikrosatelitmi do rozsahu, ktorý postačuje na PCR zmnoženie úseku. Genetická charakteristika je veľmi dôležitá pre určenie pôvodnosti populácií podľa jedinečných prúžkov PCR–ISSR, zisťovania jedinečnosti populácií alebo vylúčenia duplikátov v zbierkach genofondu a potvrdenia pravosti odrôd lipnice lúčnej.

PASAKINSKIENE et al. (2000) použili ukotvené prajmery na množenie mikrosatelitnej DNA tráv rodu mätonoh (*Lolium*) a kostrava (*Festuca*).

Cieľom práce bolo zhodnotiť pomocou PCR–ISSR genetickú vzdialenosť v zbierke populácií lipnice lúčnej.

#### Materiál a metodika

Populácie lipnice lúčnej (*Poa pratensis*, L.) boli získané zo šľachtiteľskej stanice Levočské Lúky a.s. Levoča. Zoznam genotypov použitých pri analýzach: 1) Lea, 2) Slezanka, 3) 9, 4) 43, 5) LL20, 6) Moravanka, 7) Bohémia, 8) 63/724, 9) 212, 10) Ochotnica, 11) Južná Ukrajina, 12) Radhošť, 13) 63/718, 14) 63/720, 15) 63/721, 16) 63/722, 17) Zlatá okrajka, 18) 116, 19) Lea 103, 20) Malý Slizovník, 21) Alsa, 22) Holiday, 23) Park, 24) Nublu, 25) Alpine, 26) Bartitia, 27) Grebalowska, 28) 15/3, 29) 28/5, 30) 16/9, 31) 29/4, 32) 27/6, 33) 10/285, 34) 2/12.

Pre PCR–ISSR boli ako prajmery použité syntetizované fragmenty jednoreťazcovej DNA komplementárne k štyrom mikrosatelitom, originálne zostavené diméry a triméry ukotvené na 3'OH konci dvojicou nukleotidov, PP–ISSR–1 (CT)<sub>8</sub>AC, PP–ISSR–2 (gA)<sub>6</sub>CC, PP–ISSR–3 (gAg)<sub>3</sub>gC a PP–ISSR–4 (gTg)<sub>3</sub>gC. Po optimalizácii podmienok pre 25 µl reakčnú zmes (DNA 20 ng, prajmer 0,3 nmol × dm<sup>-3</sup>, Taq polymeráza 0,45 U, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mmol × dm<sup>-3</sup>, dNTP 0,2 mmol × dm<sup>-3</sup>) sa zvolil profil pre PCR–ISSR, úvodná denaturácia dve minúty pri 94 °C, 45 cyklov, pričom každý cyklus mal kroky, denaturácia DNA jednu minútu pri 94 °C, naviazanie prajmera 1 minútu pri 50 °C a syntézu nového reťazca 2 minúty pri 72 °C. Po 45 cykloch nasledovala záverečná syntéza reťazcov sedem minút pri 72 °C.

Na rozdelenie produktov PCR–ISSR bol použitý 2 % agarózový gél v 1 × TBE tlmivom roztoku. Elektroforézou rozdelené fragmenty DNA boli farbené etídiumbromidom (0,5 µg × ml<sup>-1</sup>) a fotografované pod UV žiarením (Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator, UPV).

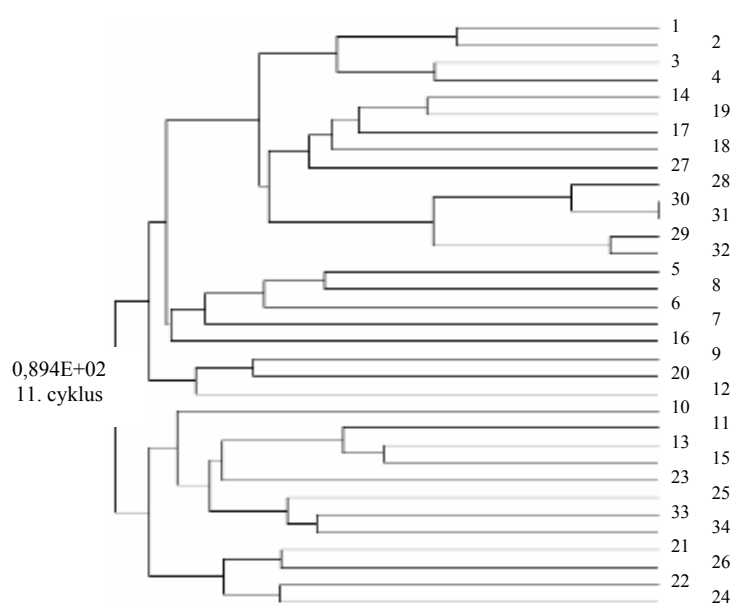
Vetvové členenie bolo zostavené UPGMA analýzou na základe priemeru euklidovských vzdialeností zhlukov (PEVZ) v programe SYNTAX.

#### Výsledky a diskusia

Celkom 109 prúžkov v ôsmich pozíciách bolo zistených na elektroforegramoch produktov PCR–ISSR s prajmerom PP–ISSR–1 (CT)<sub>8</sub>AC. Priemerne na jednu populáciu bolo zistených 3,2 prúžka v rozsahu 1–5 prúžkov na jednu populáciu. Ani jedna zo sledovaných populácií nemala jedinečný prúžok. Zistený bol 100% polymorfizmus. Prajmerom PP–ISSR–2 (gA)<sub>6</sub>CC bolo v PCR–ISSR reakciou namnožených fragmentov DNA a elektroforézou v agarózovom géle rozdelených celkom 212 prúžkov z pätnástich možných pozícií. Priemerne na jednu populáciu bolo 6,2 prúžka v rozsahu 2–9 prúžkov na jednu populáciu. Zistený bol 100% polymorfizmus. Ani jedna populácia nemala jedinečný prúžok. Prajmerom PP–ISSR–3 (gAg)<sub>3</sub>gC bolo v PCR–ISSR reakciou namnožených fragmentov DNA a elektroforézou v agarózovom géle rozdelených celkom 139 prúžkov z deviatich možných pozícií. Priemerne na jednu populáciu bolo 4,1 prúžka v rozsahu 1–6 prúžkov na jednu populáciu. Zistený bol 89 % polymorfizmus, populácia Alpine mala jedinečný prúžok vo



veľkosti 250 bp. Prajmerom PP-ISSR-4 (gTg)<sub>3</sub>gC bolo v PCR-ISSR reakciou namnožených fragmentov DNA a elektroforézou v agarózovom géle rozdelených celkom 109 prúžkov zo siedmich možných pozícií. Priemerne na jednu populáciu bolo 3,2 prúžka v rozsahu 1–7 prúžkov na jednu populáciu. Zistený bol 86% polymorfizmus. Populácia 63/722 mala jedinečný prúžok vo veľkosti 1020 bp.



Spracovaním číselných podkladov získaných pomocou prajmerov PP-ISSR-1 (CT)<sub>8</sub>AC, PP-ISSR-2 (gA)<sub>6</sub>CC, PP-ISSR-3 (gAg)<sub>3</sub>gC a PP-ISSR-4 (gTg)<sub>3</sub>gC bolo v agarózovom géle rozdelených celkom 569 prúžkov z tridsaťdeväť možných pozícií. Priemerne na jednu populáciu bolo 14,6 prúžkov v rozsahu 12–20 prúžkov na jednu populáciu. Zistený bol 95% polymorfizmus, s prajmerom PP-ISSR-3 (gAg)<sub>3</sub>gC mala populácia Alpine jedinečný prúžok vo veľkosti 250 bp a s prajmerom PP-ISSR-4 (gTg)<sub>3</sub>gC mala populácia 63/722 jedinečný prúžok vo veľkosti 1020 bp.

Vetvovým členením podľa UPGMA boli vytvorené dva zhluky populácií. Hodnota PEVZ na úrovni 11 cyklu bola 0,894E+02.

**Obrázok:** Vetvové členenie vzájomnej závislosti 34 populácií lipnice lúčnej na základe PCR-ISSR produktov zmožených pomocou prajmerov PP-ISSR-1 (CT)<sub>8</sub>AC, PP-ISSR-2 (gA)<sub>6</sub>CC, PP-ISSR-3 (gAg)<sub>3</sub>gC a PP-ISSR-4 (gTg)<sub>3</sub>gC.

Podobný počet prúžkov zistili XIE et al.(2005) analýzou populácie bršlenca (*Monimopetalum chinense* L., čeľad *Celastraceae*). PCR-ISSR metódou vo vzorke 190 jedincov bolo desiatimi prajmermi identifikovaných 110 PCR-ISSR prúžkov. Nízke hodnoty genetickej variability boli zistené na úrovni druhovej a populácií.

## Záver

Hodnotenie variability rastlín na základe polymorfizmu DNA je jedna z možností uplatnenia moderných postupov a metód v genetickom výskume, šľachtení rastlín a záchrane genetickej rozmanitosti rastlín. Technika PCR-ISSR využíva jedinečnú možnosť zmoženia úsekov izolovanej DNA v skúmavke, presnom určení veľkosti a primárnej štruktúry namnoženého úseku DNA. Získané výsledky molekulárnou analýzou variability zbierky populácií lipnice lúčnej rozširujú poznatky o variabilite molekuly DNA medzi jedincami a medzi populáciami. Navrhnuté a úspešne odskúšané prajmery pre PCR-ISSR sú využiteľné pre ďalšie analýzy populácií lipnice lúčnej rozdielneho pôvodu, hospodárskeho využitia, zaradenia do programu šľachtenia a určovania pravosti odrôd.

Práca bola súčasťou riešenia výskumného projektu C519/3 D118/VTPC/1998 Záchrana a ochrana ohrozeného genofondu rastlín na Slovensku a VEGA 1/3452/06 projektu „Vývoj retrotranspozónových a mikrosatelitových markérov identifikácie odrôd a F1 jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) vo vzťahu k odolnosti voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. *hordei*).

## Literatúra

1. PASAKIENIENE, I. – GRIFFITHS, C. M. – BETTANY, A. J. E. – PAPLAUSKIENE, V. – HUMPHREYS, M. W. 2000. Anchored simple-sequence repeats as primers to generate specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. In: *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 100, 2000, p. 384–390
2. XIE, G. W. – WANG, D. L. – YUAN, Y. M. – GE, X. J. 2005. Population genetic structure of *Monimopetalum chinense* (*Celastraceae*), an endangered endemic species of Eastern China. In *Annals of Botany*, vol. 95, 2005, no. 5, p. 773–777.

✉

# TRANSFORMÁCIA ĽANU SIATEHO S CIEĽOM ZVÝŠENIA KVALITY LIGNÍNOVÝCH VLÁKEN

## GENETIC TRANSFORMATION OF *LINUM USITATISSIMUM* WITH AN AIM TO IMPROVE A QUALITY OF THE LIGNIN FIBERS

Juraj BLEHO – Andrea HRICOVÁ – Anna PREŤOVÁ

*Lignin is a major cell wall polymer of plant vascular tissues, thus important for mechanical support and water transport in plants. The ability of lignin to impede the degradation of cell wall polysaccharides has also impact on the plant defence against pathogens, insect or other herbivores. Its composition and quantity affects industrial use of flax plant material, because after cellulose it is second most abundant organic compound (25% of plant biomass). It is a very heterogenous polymer and there are lots of mechanisms how to modify lignin composition and quantity. The way how we try to change a quality of flax fibers is to modify the activity of cinnamyl alcohol dehydrogenase. Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD; EC 1.1.1.195) is monolignol biosynthetic enzyme that catalyzes the final step of lignin subunit biosynthesis in higher plants.*

*Keywords: lignin, CAD, flax*

### Úvod

Ľan (*Linum usitatissimum* L.) bol jednou z prvých poľnohospodárskych plodín, ktoré boli domestikované ľuďmi. Z hľadiska využitia v hospodárstve možno kultúrny ľan rozdeliť do dvoch skupín: priadny a olejný. Na kvalitu priadneho ľanu má vplyv aj zloženie a množstvo lignínu vo vláknach. Lignín je biopolymér, ktorý v rastline plní mechanickú (opornú) funkciu, podieľa sa na transporte vody v pletive a bráni degradácii polysacharidov bunkovej steny, čím vplýva aj na obranu rastlín voči patogénom, hmyzu a bylinožravým druhom. Jednou z možností ovplyvnenia kvality a zloženia lignínu je využiť aktivitu enzýmu cinnamyl alkohol dehydrogenázy (CAD), ktorý katalyzuje redukciu cinnamyl aldehydov (koniferyl, sinapyl, p-kumaryl) na prekursor lignínu.

### Material a metódy

Ako východiskový materiál sme pri našich pokusoch použili dva kultivary ľanu siateho Jitka a Super, ktoré patria medzi priadne typy.

Hypokotylové segmenty ľanu sme transformovali pomocou odzbrojeného kmeňa *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, ktorý niesol derivát binárneho vektora pBINPLUS. Binárny plazmid pAV04 obsahoval CAD gén, ktorý bol riadený konštitutívnym CaMV 35S promótorom. Okrem toho obsahoval selekčný nptII gén pre neomycín fosfotransferázu. Segmenty hypokotylov zo 6-7 dňových *in vitro* kľúčnych rastlín ľanu sme transformovali podľa modifikovanej metódy MLYNÁROVEJ *et al.* (1994). Jadrovú DNA sme z regenerovaných rastlín izolovali metódou podľa BEKESIOVEJ *et al.* (1999) a následne analyzovali na prítomnosť CAD a nptII génov metódou PCR. Pre PCR analýzy sme použili priméry CAD REV 155 a CaMV FOR 300.

### Výsledky

Genetickú transformáciu segmentov hypokotylov ľanu siateho sme uskutočnili pomocou *A. tumefaciens* LBA4404 obsahujúci binárny plazmid pAV04, ktorý sme pred samotnou transformáciou overili restriktívnou analýzou. Na transformáciu sme použili 6-7 dňové kľúčence ľanu, z ktorých sme narezali 2-4 mm dlhé hypokotylové segmenty. Segmenty hypokotylov sme inkubovali v suspenzii agrobaktérií po dobu 5-10 minút a preniesli na kalus indukujúce médium s prídavkom antibiotík a rastových látok. Na rezných plochách explantátov sme po 5-7 dňoch pozorovali indukciu kalusov, ktoré sme zrezali a preniesli na výhonky indukujúce médium. Na kalusoch sme po 2-4 týždňoch pozorovali tvorbu výhonkov, ktoré sme zrezali a preniesli na elongačné a zakoreňovacie médium. Lepší regeneračný potenciál sme pozorovali pri kultivare Super, z ktorého sme po 3-4 týždňoch kultivácie získali kompletne zakorenené rastliny. PCR analýzou sme potvrdili prítomnosť transgénu v 30% zo všetkých testovaných rastlín.

### Záver

Cieľom našej práce bolo technikou transformácie pomocou systému *A. tumefaciens* preniesť do genómu ľanu siateho T-DNA, ktorá obsahovala CAD gén, z transformovaných hypokotylov regenerovať rastliny a analyzovať ich na prítomnosť transgénu. Z doterajších výsledkov vyplýva, že aplikácia genetických transformácií ľanu je sprevádzaná mnohými ťažkosťami a preto predmetom ďalších štúdií bude vyriešiť otázky a problémy týkajúce sa samotnej techniky transformácie. Je žiadúce zamerať sa na zvýšenie transformačnej účinnosti s cieľom získať dostatočné množstvo transgénnych rastlín pre ďalšie analýzy.

Neskôr sa zameriame na detailnú charakterizáciu vplyvu CAD génu na kompozíciu lignínu v bunkách mezofylu a kvalitu vlákna v získaných transgénnych rastlinách.

### Literatúra

1. BEKEŠIOVÁ, I.- NAP, J.P. – MLYNÁROVÁ, L.: Isolation of High Quality DNA and RNA from Leaves of Carnivorous Plant *Drosera Rotundifolia*. In: Plant Molecular Biology Reporter 17, 1999, s. 269-277
2. MLYNÁROVÁ, L.- BAUER, M.- NAP, J.P.- PREŤOVÁ, A.: High efficiency Agrobacterium- mediated gene transfer to flax. In: Plant Cell Report 13, 1994, s. 282- 285.
3. VALACHYOVÁ, A.- LIBANTOVÁ, J.- PREŤOVÁ, A.: The construction of plant binary vector containing cinnamyl alcohol dehydrogenase gene and genetic transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Plant Biotechnology: “Progress and developments“- 5-th Int. Symposium in the series Recent Advantages in Plant Biotechnology. Stará Lesná. Sept. 7-14. 2003. High Tatras. Slovak Republic. pp. 98.

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov APVT-51-028602 a VEGA 2/5079/5.

✉

✉

Juraj Bleho, Andrea Hricová, Anna Preťová.: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O. Box 39A, 95007 Nitra

## TVORBA VYSOKO-EMBRYOGÉNNYCH GENOTYPOV LUCERNY SIATEJ (*MEDICAGO SATIVA L.*) REKURENTNOU SELEKCIOU DEVELOPMENT OF HIGHLY EMBRYOGENIC GENOTYPES OF ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*) USING RECURRENT SELECTION

Juraj FARAGÓ<sup>1</sup> - Natália FARAGOVÁ<sup>1</sup> - Diana GAŠPÁROVÁ<sup>2</sup>

*Alfalfa (Medicago sativa L.) is the most important forage legume throughout the world can provide a valuable tool to improve alfalfa mainly through genetic transformation. Exploitation of this technique in alfalfa is, however, dependent on the availability of highly regenerable genotypes. We evaluated the embryogenic capacity of 32 embryogenic genotypes selected from 14 commercial alfalfa cultivars. The highest embryogenic frequency of embryogenic calli was found in the control genotype SE/22-GT2, while the frequency of embryogenic calli in the other tested embryogenic genotypes ranged from 0 to 50 %. Selected genotypes were subsequently used for hybridization experiments with the aim to accumulate genes for in vitro regeneration ability in the progenies. We tested 33 selected genotypes from 16 varieties of alfalfa. We manually pollinated 1983 flowers and obtained 5181 seeds. Selected progenies from 7 reciprocal cross-breeds within 8 embryogenic genotypes of alfalfa were tested for presence of embryogenic genotypes and their embryogenic capacity. In total, 207 genotypes were tested for embryogenic ability and embryogenic capacity and 27 embryogenic genotypes were detected (13.04 %). The highest frequency of embryogenic genotypes was identified in following progenies: Niva/17 x Gabika/2 (22.6 %), Gabika/2 x Niva/17 (22.2 %), Gabika/2 x Vanda/7 (20 %) a Gabika/2 x Morava/18B(20 %).*

*Key words: somatic embryogenesis, recurrent selection, genotype effect, biotechnology*

### Úvod

Lucerna siata (*Medicago sativa L.*) je dôležitou krmovinou na celom svete. Šľachtenie nových odrôd je ovplyvňované rôznymi faktormi ako sú genetická variabilita, náchylnosť na choroby a škodcov, a autotetraploidný charakter druhu. Metóda pletivových kultúr nám umožňuje vylepšiť lucernu prostredníctvom genetickej transformácie. Využitie tejto techniky je však závislé od dostupnosti vhodných a vysokoúčinných *in vitro* regeneračných postupov. Vysoká regeneračná schopnosť explantátov lucerny v pletivových kultúrach a tvorba somatických embrií je geneticky limitovaná na niekoľko málo genotypov v odrodách a závisí tiež od použitého druhu explantátu. Po identifikácii embryogénnych genotypov v odrodách je potrebné zistiť embryogénnu kapacitu týchto genotypov v *in vitro* kultúre. Genotypy s najvyšším embryogénnym potenciálom je možné použiť priamo na genetickej transformácii lucerny, alebo ešte zvýšiť ich embryogénnu kapacitu rekurentnou selekciou na embryogénnu schopnosť.

### Materiál a metódy

V práci boli použité genotypy lucerny siatej (*Medicago sativa L.*) zo zbierky embryogénnych genotypov lucerny vo VÚRV Piešťany (FARAGÓ et al., 1997; FARAGÓ et al., 2003). Na testovanie embryogénnej kapacity embryogénnych genotypov bolo vybraných 32 genotypov pochádzajúcich zo 14 komerčne pestovaných odrôd lucerny a jedného kultivaru blízko príbuzného druhu (*M. falcata*). Ako kontrolný genotyp bol pužitý vysokoembryogénny genotyp SE-22 získaný z odrody Lucia rekurentnou selekciou na embryogénnu schopnosť v *in vitro* kultúre (FARAGÓ et al., 1997). Do hybridizačných experimentov bolo zaradených 33 embryogénnych genotypov lucerny (25 genotypov použitých na testovanie embryogénnej kapacity embryogénnych genotypov + 8 nových genotypov zo zbierky embryogénnych genotypov lucerny vo VÚRV Piešťany). Na rekurentnú selekciu bolo vybraných 11 populácií genotypov predstavujúcich potomstvá 7 recipročných krížení embryogénnych genotypov lucerny, v ktorých jedným z rodičovských rastlín bol vždy genotyp Gabika/2. Ostatnými vybranými parentálnymi genotypmi boli Lucia/5, Morava/18, Niva/8, Niva/17, Palava/13, Vali/19 a Vanda/7.

### Výsledky a diskusia

V práci sme otestovali embryogénnu kapacitu 32 embryogénnych genotypov vyselektovaných zo 14 komerčných odrôd lucerny siatej. Najvyššia frekvencia embryogénnych kalusov bola zistená pri kontrolnom genotype SE/22-GT2 (93,7 %), zatiaľ čo frekvencia embryogénnych kalusov pri ostatných testovaných embryogénnych genotypoch sa pohybovala od 0 do 50 %. Vybrané embryogénne genotypy boli následne použité na hybridizačné experimenty s cieľom akumulácie génov pre embryogénnu schopnosť v *in vitro* kultúre. V experimentoch bolo použitých 33 genotypov vybraných zo 16 odrôd lucerny. Manuálne bolo opelených 1983 a získaných 5181 semien. Priemerný počet semien na kvietok bol 2,613. Vybrané potomstvá zo 7 recipročných krížení medzi 8 embryogénnymi genotypmi lucerny sa potom otestovali na prítomnosť embryogénnych genotypov a ich embryogénnu schopnosť (tab. 1). Celkom bola embryogénnu schopnosť a embryogénnu kapacita testovaná pri 207 genotypoch a bolo identifikovaných 27 embryogénnych genotypov (13,04 %). Najviac embryogénnych genotypov bolo

identifikovaných v potomstvách krížení Niva/17 x Gabika/2 (22,6 %), Gabika/2 x Niva/17 (22,2 %), Gabika/2 x Vanda/7 (20 %) a Gabika/2 x Morava/18B (20 %).

## Literatúra

1. FARAGÓ, J.; FARAGOVÁ, N.; UVÁČKOVÁ, E. Somatická embryogenéza pri lucerne: Plyv genotypu a druhu explantátu. In: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín BIOS 2003. Zborník referátov z VIII. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, 2003, s. 60-66
2. FARAGÓ, J.; HAUPTVOGEL, P.; KRAIC, J.: Development of breeding material of alfalfa with high regeneration ability by recurrent somatic embryogenesis. In: CHLOUPEK, O.; SIMON, U.; (Eds.): Seed production in lucerne. Academia Publishing House, Prague, 1997, s. 38-39

**Tabuľka 1: Testovanie embryogénnej kapacity hybridov embryogénnych genotypov lucernej sietej**

Por. č.	Kríženie	Expl.	Počet rastlín	Počet expl.	% kalog.	% embr. gent.	SE/C	Embryogénne genotypy
1	Gabika/2 x Niva/17	HY	27	92	100,0	14,8	3,953	1A2/1, 1A4/13, 1A4/17, 1A4/18
		LS	24	241	86,7	8,8	4,417	1A2/4, 1A4/10
		<b>Celkom</b>	<b>27</b>	<b>333</b>	<b>90,4</b>	<b>22,2</b>	<b>4,122</b>	
2	Niva/17 x Gabika/2	HY	31	95	100,0	16,1	6,600	1B3/4, 1B3/5, 1B3/8, 1B3/11, 1B4/3
		LS	21	221	100,0	9,5	6,333	1B3/10, 1B4/9
		<b>Celkom</b>	<b>31</b>	<b>316</b>	<b>100,0</b>	<b>22,6</b>	<b>6,646</b>	
3	Gabika/2 x Niva/8	HY	24	111	96,4	8,33	3,667	2A2/7, 2A2/12,
		LS	24	119	98,3	4,17	3,500	2A2/17
		<b>Celkom</b>	<b>24</b>	<b>230</b>	<b>97,4</b>	<b>12,50</b>	<b>3,571</b>	
4	Niva/8 x Gabika/2	HY	17	83	100,0	5,88	2,500	2B2/11
		LS	17	107	100,0	5,88	3,000	2B2/8
		<b>Celkom</b>	<b>17</b>	<b>190</b>	<b>100,0</b>	<b>11,76</b>	<b>2,750</b>	
5	Gabika/2 x Vali/19	HY	14	67	100,0	0,00	*	*
		LS	13	59	100,0	0,00	*	*
		<b>Celkom</b>	<b>14</b>	<b>126</b>	<b>100,0</b>	<b>0,00</b>	*	
6	Vali/19 x Gabika/2	HY	30	147	100,0	0,00	*	*
		LS	30	167	100,0	0,00	*	*
		<b>Celkom</b>	<b>30</b>	<b>313</b>	<b>100,0</b>	<b>0,00</b>	*	
7	Lucia/5 x Gabika/2	HY	19	51	100,0	10,53	3,750	10A1/5, 10A1/8
		LS	19	84	100,0	10,53	3,600	10A1/5, 10A1/8
		<b>Celkom</b>	<b>19</b>	<b>135</b>	<b>100,0</b>	<b>10,53</b>	<b>3,667</b>	
8	Gabika/2 x Vanda/7	HY	5	17	100,0	0,00	*	
		LS	5	25	100,0	20,00	2,000	11B1/1
		<b>Celkom</b>	<b>5</b>	<b>42</b>	<b>100,0</b>	<b>20,00</b>	<b>2,000</b>	
9	Vanda/7 x Gabika/2	HY	10	22	100,0	10,00	5,000	11A1/1
		LS	10	48	100,0	0,00	*	
		<b>Celkom</b>	<b>10</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>	<b>10,00</b>	<b>5,000</b>	
10	Gabika/2xMorava/18	HY	20	83	90,4	10,00	3,750	12B1/10, 12B1/19
		LS	20	131	91,6	10,00	2,667	12B1/7, 12B1/18
		<b>Celkom</b>	<b>20</b>	<b>214</b>	<b>91,1</b>	<b>20,00</b>	<b>3,100</b>	
11	Morava/18xGabika/2	HY	10	41	100,0	10,00	1,500	12A1/2
		LS	10	60	100,0	10,00	2,750	12A1/2
		<b>Celkom</b>	<b>10</b>	<b>101</b>	<b>100,0</b>	<b>10,00</b>	<b>2,333</b>	

Legenda: Por. č.- poradové číslo; Expl.- explantát, Počet expl.- počet explantátov; % kalog.- % kalogenézy; % embr. gent.- % embryogénnych genotypov; SE/C- počet somatických embryí na kalus; HY- hypokotylové segmenty; LS- segmenty listových stopiek

✉

✉

RNDr. Juraj Faragó, CSc.<sup>1</sup>, Ing. Natália Faragová<sup>1</sup>, Mgr. Diana Gášpárová<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Oddelenie šľachtiteľských metód, Výskumný ústav rastlinnej výroby, SCPV, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovensko  
<sup>2</sup> Katedra biotechnológie, Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko

# HODNOTENIE NODULAČNEJ SCHOPNOSTI GENETICKY MODIFIKOVANÝCH KLONOV LUCERNY SIATEJ S VNESENÝM AIMV CP GÉNOM

## COMPARISON OF THE NODULATION ABILITY OF GENETICALLY MODIFIED LINES OF ALFALFA CONTAINING THE GENE AIMV CP

Natália FARAGOVÁ – Juraj FARAGÓ

*A laboratory experiment was established in order to evaluate the nodulation ability of transgenic alfalfa plants containing the gene *AlMVcp* encoding the coat protein of alfalfa mosaic virus. The variability of all the evaluated traits was significantly affected by both the genotype and the type of inoculation suspension ( $p < 0.01$ ). The highest number of nodules as well as the highest proportion of active nodules was observed in clones A5-3-3 a A5-9-3. The number of nodules was in average 16 % higher in transgenic clones in comparison with the isogenic non-transgenic line SE/22-GT2. In general, the genetically modified lines of alfalfa containing the *AlMVcp* gene, had higher average values of evaluated traits comparing to the non-transgenic isogenic line.*

*Key words: GMO, Medicago sativa, nodulation, Sinorhizobium meliloti*

### Úvod

Rýchly rozvoj techník poľnohospodárskej biotechnológie a uvoľnenie nových transgénnych odrôd poľnohospodárskych plodín prinieslo mnoho ekonomických výhod, ale vyvolal aj obavy z možného vplyvu transgénnych rastlín na životné prostredie, vrátane vplyvov na spolužitie s pôdnymi mikroorganizmami. Tieto obavy sú u nás reflektované aj v Zákone č. 151/2002 o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov, ktorý v § 5 ukladá pre každé použitie geneticky modifikovaných organizmov vykonať posudzovanie environmentálneho rizika.

### Materiál a metódy

V experimente boli využité geneticky modifikované klony lucerny siatej (*Medicago sativa* L.), pochádzajúce z vysokoregenerujúceho genotypu Rg 9/I-14-22, izolovaného z odrody Lucia (FARAGÓ a kol., 1997) s vneseným génom *AMVcp* pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny (KÚDELA a kol., 1995): A5-3-3, A4-2-2, A4-4-1, A4-5-2, A5-9-3. Do pokusu bol zahrnutý aj geneticky nemodifikovaný izogénny klon SE/22-GT2 a vybrané genotypy z odrody Lucia. Rastliny boli pestované v zmesi piesku a perlitu v pomere 3:1. Minerálna výživa bola dodávaná každých 7-10 dní formou zálievky Jensenovým živným roztokom bez dusíka (SOMASEGARAN a HOBEN, 1994). Štartovacia dávka dusíka (0,7 mM N) sa aplikovala jednorazovo do 14 dní od výsadby rastlín (FARAGOVÁ a UŽÍK, 1999). Pri výsadbe boli rastliny lucerny inokulované kmeňmi nitrogénnych baktérií *Sinorhizobium meliloti* D528 (GB *Rhizóbií*, Praha-Ruzyně) a 5M4 (VÚRV Piešťany). Do experimentu bol zahrnutý i variant inokulovaný sterilným fyziologickým roztokom. Hodnotené znaky: absolútna suchá hmotnosť nadzemnej hmoty (ďalej len hmotnosť NH) v mg, hmotnosť koreňa v mg, mohutnosť koreňovej sústavy (body 1-9), počet hrčiek na rastline, percento aktívnych hrčiek z celkového počtu podľa Rice (RICE a kol., 1977), tvar hrčiek a celkový obsah dusíkatých látok v NH v %.

### Výsledky a diskusia

V laboratórnych podmienkach bol založený experiment za účelom hodnotenia nodulačnej schopnosti geneticky modifikovaných rastlín lucerny obsahujúcich *AIMVcp* gén pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny. Variabilita všetkých sledovaných znakov bola štatisticky významne ovplyvnená rastlinným klonom aj inokulačnou suspenziou ( $p < 0,01$ ). Najvyššou hmotnosťou NH sa vyznačovali náhodne vybrané genotypy z odrody Lucia (183 mg). Podľa výsledkov DONEGAN a kol. (1999) transgénne rastliny lucerny obsahujúce peroxidázu lignínu mali štatisticky významne nižšiu hmotnosť NH a vyšší obsah N a P v porovnaní s izogénnymi netransgénymi klonmi. Spomedzi transgénnych klonov lucerny s vneseným *AIMVcp* génom sa najvyššou hmotnosťou NH a súčasne i hmotnosťou a mohutnosťou koreňa vyznačoval klon A5-9-3. Inokulácia kmeňmi *S. meliloti* zvýšila hmotnosť NH o 16 (kmeň 5M4) až 37 (kmeň D528) %. Najvyšším počtom hrčiek s najvyšším podielom aktívnych sa vyznačovali klony A5-3-3 a A5-9-3. Všeobecne môžeme povedať, že geneticky modifikované klony mali nasadených o 16 % viac hrčiek v porovnaní s izogénnou líniou SE/22-GT2. Prevládal guľovitý tvar hrčiek bez ohľadu na genetickú modifikáciu. Podľa štúdie BOISSON-DERNIER a kol. (2001) sa korene transformovaných rastlín *Medicago truncatula* vyznačovali úspešnejšou nodulačnou schopnosťou po inokulácii kmeňmi *S. meliloti* než nemodifikované kontrolné línie. Podľa MASOUD (1996) vnesené gény *Aglu1* a *RCH10* do lucerny nemali negatívny vplyv na *Rhizobium*-alfalfa interakciu. Najvyšším obsahom celkových dusíkatých látok v NH (stonky a listy spolu) sa vyznačoval geneticky modifikovaný klon A4-5-2.

## Záver

Variabilita všetkých testovaných znakov bola štatisticky významne ovplyvnená rastlinným genotypom aj inokulačnou suspenziou. Štatisticky významné rozdiely v znakoch boli zaznamenané ako medzi geneticky modifikovanými klonmi, tak aj medzi ich izogénnymi líniami a genotypmi selektovanými z odrody Lucia. Vo všeobecnosti sa geneticky modifikované klony lucerney s vneseným AIMVcp génom vyznačovali vyššími priemernými hodnotami znakov v porovnaní s ich izogénnymi nemodifikovanými líniami.

## Literatúra

1. BOISSON-DERNIER, A. – CHABAUD, M. – GARCIA, F. – BÉCARD, G. – ROSENBERG, C. – BARKER, D. G.: *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. In: *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 2001, s. 695-700.
2. DONEGAN, K. K. – SEIDLER, R. J. – DOYLE, J. D. – PORTEOUS, L. A. – DI GIOVANNI, G. – WIDMER, F. – WATRUD, L. S.: A field study with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. In: *J. of Appl. Ecol.* 36, 1999, s. 920-936.
3. FARAGÓ, J. – HAUPTVOGEL, P. – KRAIC, J.: Development of breeding material of alfalfa with high regeneration ability by recurrent somatic embryogenesis. In: *CHLOUPEK, O.- ŠIMON, U. (Eds.): Seed Production of Lucerne, Academia Prague, 1997, s. 38-39.*
4. FARAGOVÁ, N. – UŽÍK, M.: Hodnotenie efektivity a nodulačnej schopnosti vybraných kmeňov hrčkotvorných baktérií *Sinorhizobium meliloti* pri lucerne v závislosti od dusíkatej výživy. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín: Zborník z 5. odborného seminára. Piešťany: VÚRV, 1999, s. 178-180.*
5. KÚDELA, O. – GALLO, J.: Characterization of the alfalfa mosaic virus strain T6. In: *Acta Virologica* 39, 1995, s. 131-135.
6. MASOUD, S. A.: Constitutive expression of an inducible  $\beta$ -1,3-glucanase in alfalfareduces disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp. *Medicaginis*, but does not reduce disease severity of chitin-containing fungi. *Transgenic Res.* 5, 1996, s. 313-353.
7. RICE, W. A. – PENNEY, D. C. – NYBORG, M.: Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. In: *Can. J. Soil Sci.* 57, 1977, s. 197-203.
8. SOMASEGARAN, P. – HOBEN, H. J.: Handbook for *Rhizobia*. Springer-Verlag, New York, Inc., 1994, s. 450.

✉

✉

Natália Faragová, Juraj Faragó, SCPV – VÚRV Piešťany, Oddelenie poľnohospodárskych biotechnológií, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: faragova@vurv.sk, farago@vurv.sk

## POLYPLOIDIZACE A SOMATICKÁ HYBRIDIZACE - ALTERNATIVA ŠLECHTĚNÍ BRAMBORU POLYPLOIDIZATION AND SOMATIC HYBRIDIZATION – AN ALTERNATIVE OF POTATO BREEDING

Marie GREPLOVÁ<sup>1</sup> - Hana POLZEROVÁ<sup>1</sup> - David KOPECKÝ<sup>2</sup> - Božena  
NAVRÁTILOVÁ<sup>3</sup> - Pavla SUCHÁNKOVÁ<sup>2</sup> - Renata ŠVECOVÁ<sup>1</sup> - Jaroslava  
DOMKÁŘOVÁ<sup>1</sup>

*Potato late blight caused by the pathogen *Phytophthora infestans* (Mont de Bary) is the most serious potato disease all over the world. The increase of tolerance to late blight in cultured potatoes belongs to the major breeding aims and is a component of integrated pest management. Minor genes for polygenic-based horizontal resistance and major genes for vertical resistance (hypersensitivity) could be transferred by the utilization of crossing of wild *Solanum* species and *S. tuberosum*. Some kind of wild potato species are sexual incompatible with *S. tuberosum* and so polyploidization and somatic hybridization are alternatives to classical breeding. Obtaining of breeding material using polyploidization was performed with colchicine and oryzaline application to nodal segments of wild potato *S. berthaultii*, *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. verrucosum* and dihaploids of *S. tuberosum*. Regenerants were evaluated by flow-cytometry and derived tetraploids were used in crossing with *Solanum tuberosum*. Somatic hybridization was done by an electrofusion and chemofusion of mesophyll protoplasts. Mesophyll protoplasts of *Solanum tuberosum*, *S. berthaultii*, *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* and *S. verrucosum* were used. Regenerated plants were evaluated by flow-cytometry and a RAPD method. We obtained somatic hybrids, in that morphological evaluation is performed.*

*Key words: polyploidization, somatic hybridization, *Solanum* sp., potato breeding*

### Úvod

Nejzávažnější chorobou bramboru je plíseň bramborová způsobená patogenem *Phytophthora infestans* (Mont de Bary). Zvýšení odolnosti bramboru vůči plísni bramboru je jedním z hlavních šlechtitelských cílů a je nedílnou součástí integrované ochrany rostlin. Využitím některých planých druhů rodu *Solanum* ve šlechtění bramboru *S. tuberosum* lze přenést jak minor geny - polygenně ovládaná horizontální rezistence tak i major geny - vertikální rezistence (hypersensitivita).

### Materiál a metody

#### Rostlinný materiál

Pro polyploidizaci byly použity nodální segmenty z *in vitro* rostoucích rostlin planých druhů rodu *Solanum* (*S. berthaultii* PI 310925, *S. bulbocastanum* 8003 a PI 243512, *S. pinnatisectum* 8166 a PI 320342, *S. verrucosum* PI 161173) a dihaploidů *Solanum tuberosum* (39/2; 41/1; 46/1; 47/1; 53/2; 65/2; 70/2; 80/1; 85/1; 89/1; 96/1; 99/2; 102/1; 109/1). Somatická hybridizace byla prováděna s planými druhy *S. bulbocastanum* 8003 a PI 243512, *S. pinnatisectum* 8166, *S. verrucosum* PI 161173 a kulturním *S. tuberosum* (dihaploid 243, 299, odrůdy Bintje, Ditta, Karin, Kordoba).

#### Polyploidizace

Nodální segmenty byly ošetřovány třetí den po vysazení na agarové médium vodnými roztoky 3,5 a 5 mM kolchicinu nebo 25 a 30  $\mu$ M oryzalinu (5) po dobu 24 a 48 hodin.

#### Somatická hybridizace

Fúze mezofylových protoplastů byla realizována elektrickým polem a pomocí polyetylenglykolu (PEG). Protoplasty byly izolovány z *in vitro* rostlin pomocí enzymatické směsi 1 % celulasy (Cellulase Onozuka R-10, Serva) a 0.2 % macerozymu (Macerozyme R-10, Serva). Protoplasty byly izolovány standardní metodou (filtrace, centrifugace a purifikace v 0.5 M sacharosovém gradientu). Pro elektrofúze byly protoplasty promývány v předfúzním roztoku (0.4 M manitol a 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) a naředěny ve fúzním roztoku (0.4 M manitol) na požadovanou hustotu ( $10^5 - 10^6$  protoplastů na 1 ml). Pro chemické fúze byla požadovaná hustota dosažena v roztoku M+C (0.2 M manitol a 80 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Suspenze protoplastů dvou fúzních partnerů byly smíchány v poměru 1:1.

Elektrofúze protoplastů se uskutečnila pomocí elektroporátoru ECM 2001 (2), velikost střídavého proudu pro řetězení byla 5V/0,5 mm (11 – 18 s) a velikost stejnosměrného proudu pro vlastní fúzi protoplastů byla 10V/0,5 mm (80  $\mu$ s). Chemické fúze probíhaly pomocí 33% roztoku PEG (2). Rostliny získané z polyploidizace a somatické hybridizace byly hodnoceny pomocí průtokové cytometrie (FC), somatické hybridy (SH) byly potvrzeny RAPD, a budou honoceny morfologicky.

### Výsledky a diskuse

#### Somatická hybridizace

Protoplasty po fúzi byly kultivovány v tekutém médiu SW<sub>11</sub> (1) se snižující se koncentrací sacharosy do vzniku mikrokalusů. Mikrokalusy a kalusy pak byly kultivovány v tekutém i agarovém médiu C a D



(4). První rostliny na kalusech regenerovaly po 140 dnech. Regeneranty byly získány na kalusech z několika kombinací elektrofúze protoplastů (Tab.1). Otestováním na průtokovém cytometru a po RAPD analýze bylo potvrzeno získání somatických hybridů, jejichž hodnocení pokračuje v podmínkách *in vivo* (Obr. 1a, b).

#### Polyploidizace

Na základě předchozích experimentů byla zjištěna jako optimální koncentrace u planých druhů 3,5 až 5 mM kolchicinu a 25 až 30  $\mu$ M oryzalinu s dobou působení 24 hod (2a). Pokusy prokázaly, že oryzalin je u bramboru účinnějším polyploidizačním činidlem než kolchicin. Četnost regenerantů s nezměněnou úrovní ploidie a četnost mixoploidů však u planých druhů a zejména u dihaploidů *S. tuberosum* přesahovala četnost indukovaných tetraploidních rostlin. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k zařazení vyšší koncentrace oryzalinu (50  $\mu$ M). Tyto experimenty pokračují. Tetraploidní rostliny byly odvozeny od všech planých druhů rodu *Solanum*, zařazených do našich experimentů (Obr. 2a, b). Ze 14 dihaploidů *S. tuberosum* byly již získány tetraploidy u 8 zástupců (Tab. 2). Odvozené tetraploidy planých druhů a zdvojené dihaploidy *S. tuberosum* byly použity pro klasické křížení ve vybraných kombinacích s tetraploidním *S. tuberosum*.

#### Literatura

1. BRÍZA, J. – MACHOVÁ, I., 1991: *Biologia Plantarum*, **33(3)**, 225-233.
2. GREPLOVÁ M. – NAVRÁTILOVÁ, B. – VYVADILOVÁ, M. – KLÍMA, M., 2004: Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin, sborník z 11. odborného seminára, Piešťany: VÚRV, 70-73
3. GREPLOVÁ, M. – FRČEK, J. – REJLKOVÁ, M. – KOPECKÝ, D. – VAGER, J. – DOLEŽEL, J., 2003: Vědecké práce **14**, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 55-63
4. SHEPARD, F. J. - TOTTEN, R. E., 1977: *Plant physiol.*, **60**, 313 – 316.



Obr. 1a



Obr. 1b



Obr. 2a



Obr. 2b

**Obr. 1a, b** Porovnání morfologie somatických hybridů z kombinace *S. bulbocastanum* 8003 + *S. tuberosum* dihaploid 243; **Obr. 2a** Porovnání morfologie listů diploidního a tetraploidního *S. bulbocastanum* získaného aplikací mitotického jedu (2. list pod vrcholem); **Obr. 2b** Porovnání celkového habitus tetraploidního a dihaploidního *S. bulbocastanum* získaného aplikací mitotického jedu.

**Tabulka 1: Kombinace genotypů použitých v somatické hybridizaci**

	<i>S. tuberosum</i> 243	<i>S. tuberosum</i> 299	<i>S. tuberosum</i> Bintje	<i>S. tuberosum</i> Ditta	<i>S. tuberosum</i> Kordoba
<i>S. bulbocastanum</i> 8003	a	o	c	o	o
<i>S. bulbocastanum</i> PI 243512	o	o	o	c	o
<i>S. pinnatisectum</i> 8166	o	b	a	o	o
<i>S. tuberosum</i> 243	o	o	a	o	o
<i>S. verrucosum</i> PI 161173	o	o	o	o	c

a regenerace SH potvrzených FC a RAPD  
b regenerace SH potvrzených FC  
c regenerace rostlin bez ověření hybridnosti  
o kombinace nebyla realizována

**Tabulka 2: Přehled genotypů použitých v polyploidizaci**

Dihaploid hybrids <i>S. tuberosum</i>	recovery of tetraploids	Wild species of <i>Solanum</i> genus	recovery of tetraploids
39/2	xx	<i>S. berthaultii</i> PI 310925	xx
41/1	xx	<i>S. bulbocastanum</i> 8003	xx
46/1	x	<i>S. bulbocastanum</i> PI 243512	xx
47/1	x	<i>S. pinnatisectum</i> 2166	xx
53/2	x	<i>S. pinnatisectum</i> PI 320342	xx
65/2	xx	<i>S. verrucosum</i> PI 161173	xx
70/2	xx		
80/1	x		
85/1	xx		
89/1	x		
96/1	xx		
99/2	xx		
102/1	x		
109/1	xx		

x - zachována diploidní úroveň  
xx - změna z diploidní na tetraploidní úroveň

**Tento projekt je podporován NAZV QF 4108 a QF 4133.**

✉

✉

<sup>1</sup> Výzkumný ústav bramborářský, s.r.o., Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod, [greplova@vubhb.cz](mailto:greplova@vubhb.cz);

<sup>2</sup> Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, CZ-772 00 Olomouc, [kopeccky@ueb.cas.cz](mailto:kopeccky@ueb.cas.cz);

<sup>3</sup> Universita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, [bozena.navratilova@upol.cz](mailto:bozena.navratilova@upol.cz)

## ÚVOD DO STUDIA ASYMETRICKÉ SOMATICKÉ HYBRIDIZACE AN INTRODUCTION TO STUDY OF ASYMMETRIC SOMATIC HYBRIDIZATION

Marie GREPLOVÁ<sup>1</sup> - Hana POLZEROVÁ<sup>1</sup> - Božena NAVRÁTILOVÁ<sup>2</sup>

*Aim of the study is optimization of protoplast organelles inactivation (nuclei, chloroplasts, mitochondria) with goals using them in cybridization. The effort is focused especially on introduction of resistance genes of wild species to cultivated plants. Inactivation of nuclei and semiautonomic organelles was studied in mesophyll protoplasts selected from the members of the genus *Solanum tuberosum* (cv. Kordoba, cv. Karin, cv. Komtesa) and *Solanum verrucosum*. Immediately after the isolation, an aliquot of protoplasts was UV-irradiated (a germicidal lamp, 7 min and 12 cm), these protoplasts did not regenerate. Inactivation of semiautonomic organelles was performed in aliquots of protoplasts with graded concentrations of IODOACETAMIDE (0.3 mM; 0.4 mM), RHODAMINE 6G (0.05 mM; 0.1 mM) a IODOACETIC ACID (0.125 mM; 0.2 mM). These concentrations of IODOACETAMIDE and IODOACETIC ACID did not damage protoplasts and the regeneration of a cell wall was sporadically recorded. In controls, division was observed and microcolonies, microcalli and calli were derived. Protoplasts were fused in combination: UV irradiated protoplasts + protoplasts treated with Iodoacetamide or Iodoacetic acid. The experiments are continuing and are directed to determine the exact limit of suitable concentration of active substance to produce protoplasts suitable for cybridizations.*

*Key words: protoplast, protoplast fusion, cybridization, Iodoacetamide, Iodoacetic acid, Rhodamine 6G, *Solanum tuberosum*, *S. verrucosum**

### Úvod

Fúze protoplastů vede k získání buněk, které obsahují směs organel obou fúzních partnerů. U mezidruhových somatických hybridů existuje problém nadbytku nežádoucích vlastností planého druhu. Tato překážka může být vyřešena částečným přenosem genů a to pomocí technik asymetrických fúzí protoplastů. Eliminací jádra jednoho z partnerů vzniká nová nukleo-cytoplasmatická kombinace – cytoplasmatický hybrid (cybrid) (4). UV záření je alternativní metoda pro fragmentaci chromosomů v produkci asymetrických hybridů, eliminace části donorového genomu vede ke snížení počtu zpětných křížení a je předpokladem vyšší regenerační schopnosti a fertility (1). Další možností je dvojí ošetření protoplastů, kdy protoplasty jaderného donora (kulturní druh) jsou ošetřeny jodoacetamidem, rhodaminem 6G nebo jodooctovou kyselinou a protoplasty cytoplasmového donora (planý druh) UV zářením. Dvojí ošetření protoplastů je navíc efektivní selekční systém (3).

### Materiál a metody

#### *Rostlinný materiál*

Pro izolaci protoplastů byly použity rostliny *S. tuberosum* (cv. Kordoba, cv. Karin, cv. Komtesa) a *S. verrucosum* PI 161173 kultivované *in vitro*. Izolace protoplastů z listového mezofylu probíhala standardním způsobem (2).

#### *Inaktivace protoplastů*

Promyté protoplasty planého druhu byly ovlivněny UV zářením germicidní lampou ve vzdálenosti 12 cm po dobu 7 minut. Protoplasty kulturního druhu byly ošetřeny odstupňovanými dávkami jodoacetamidu (IAD), rhodaminu 6G (RH6G) nebo jodooctové kyseliny (IOAA) (tab. 1) v promývacím roztoku W5 s dobou působení 30 minut. Po uplynutí této doby byly protoplasty dvakrát promyty roztokem W5. Ošetřené protoplasty byly kultivovány v kultivačním médiu a byla sledována jejich schopnost regenerace (tab. 1) ke zjištění optimální koncentrace inaktivačních činidel. Po výběru vhodné koncentrace byly protoplasty ovlivněny a fúzovány. Elektrofúze byly realizovány pomocí elektroporátoru ECM 2001, chemické fúze pomocí polyetylen glykolu (PEG, 2).

### Výsledky a diskuse

Protoplasty ošetřené UV zářením nebyly schopné další regenerace (obr. 1a), zatímco neošetřená kontrola vykazovala bohatou regeneraci buněčných stěn a buněčné dělení (obr. 1b). UV záření o délce 254 nm proniká do rostlinné tkáně ve velmi malém rozsahu, ale jeho působení na protoplasty je účinné a může způsobit chromosomové zlomy (1). Z našich předchozích experimentů vyplývá, že vysoké dávky chemických činidel (> 1mM IAD; > 0.5 mM RH6G; > 0,25 mM IOAA) protoplasty nevratně poškozují; v nízkých koncentracích (tab. 1) si protoplasty zachovávají kulovitý tvar po dobu až 5 dnů (0,125 mM IOAA, tab. 1; obr. 2) a u testovaných dávek jodoacetamidu byla pozorována i regenerace buněčných stěn a buněčné dělení (obr. 5a, b). Kontroly (chemicky neošetřené protoplasty *S. tuberosum*) regenerovaly buněčné stěny a bylo pozorováno buněčné dělení.

Pro elektrofúze a chemické fúze byla zvolena koncentrace jodoacetamidu 0,4 mM a jodooctové kyseliny 0,2 mM. Záměrně byly vybrány dávky, které byly k protoplastům šetrnější, protože fúze protoplastů je další zátěží a pravděpodobnost jejich přežívání se snižuje.

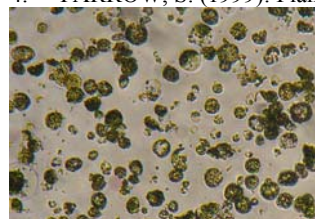
Již po několika hodinách byl pozorován vyšší podíl poškozených protoplastů po chemických fúzích oproti fúzím v elektrickém poli. Tři dny po elektrofúzích byla u protoplastů ojedinele pozorována regenerace buněčné

stěny, zatímco u kontrolních protoplastů ozářených UV a chemicky ošetřených pozorována nebyla. Regenerace buněčných stěn po chemické fúzi byla pozorována až pátý den, zatímco u elektrofúzi byla již zaznamenána častější frekvence regenerace buněčných stěn a buněčné dělení (obr. 3, 4). U ošetřených kontrol (UV záření, IOAA) byla u většiny protoplastů pozorována destrukce; po aplikaci IAD protoplasty regenerovaly buněčné stěny. Po sedmi dnech se u neošetřených kontrol vyskytovaly rozsáhlé buněčné kolonie, u ošetřených kontrol byla zaznamenána regenerace buněčných stěn zcela vyjimečně u varianty 0,2 mM IOAA, častější byl výskyt u varianty 0,4 mM IAD. Po elektrofúzích byl zaznamenán pokročilejší stav regenerace oproti ošetřeným kontrolám (tab. 2).

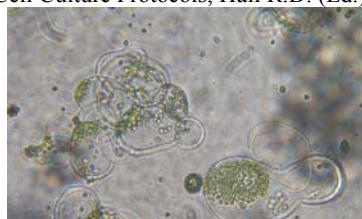
Významnou úlohu při inaktivaci semiautonomních organel hraje vliv genotypu v kombinaci s aplikovaným chemickým činidlem (tab. 1, 2). Podle našich dosavadních experimentů asymetrických fúzí jsou chemické fúze pro protoplasty větší zátěží ve srovnání s fúzemi elektrickým polem.

## Literatura

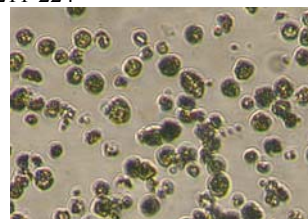
1. FOSBERG, J. - DIXELIUS CH. – LAGERCRANTS, U. - GLIMELIUS K. (1998): Plant Science 131: 65-76
2. GREPLOVÁ, M. – NAVRÁTILOVÁ, B. – VYVADILOVÁ, M. – KLÍMA, M. (2004): Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin, sborník z 11. odborného seminára, Piešťany: VÚRV, 70-73
3. MATIBIR, I.E.A. – MANTELL, S.H. (1994): Theoretical and Applied Genetics, 88 (8): 1017-1022
4. YARROW, S. (1999): Plant Cell Culture Protocols, Hall R.D. (Ed.): 211-224



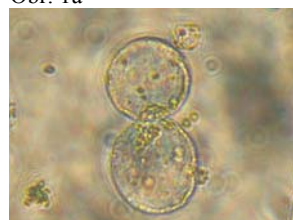
Obr. 1a



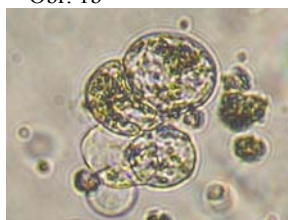
Obr. 1b



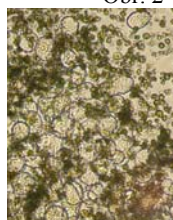
Obr. 2



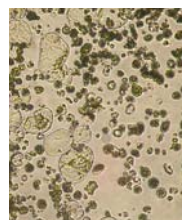
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5a



Obr. 5b

**Porovnání regenerace protoplastů 5. den kultivace:** **Obr. 1a** Ošetření UV zářením (*S. verrucosum*); **Obr. 1b** *S. verrucosum* K<sub>0</sub>; **Obr. 2** Ošetření IOAA 0.2 mM (Kordoba); **Obr. 3** Chemická fúze (Kordoba 0.2 mM IOAA + *S. verrucosum* UV); **Obr. 4** Elektrofúze (Kordoba 0.2 mM IOAA + *S. verrucosum* UV)

**Porovnání regenerace po aplikaci IAD (Karin):** **Obr. 5a** Aplikace 0.3 mM; **Obr. 5b** Aplikace 0.4 mM

**Tabulka 1: Vliv koncentrace účinných látek na regeneraci protoplastů**

účinná látka	koncentrace (mM)	Karin					Kordoba				
		den po ošetření					den po ošetření				
		1.	2.	5.	12.	14.	1.	2.	5.	12.	14.
IOAA	0,125	☺	☹	☹→KO	→KO	KO	☺	☹+	→KO	KO	KO
	0,2	☺	☹	→KO	KO	KO	☺	☹+	→KO	KO	KO
IAD	0,3	☺	☹	☹ BS	☹ BS+	BD+	☺	☹+	→KO	KO	KO
	0,4	☺	☹	☹ BS	☹ BS	☹ BS	☺	☹+	→KO	KO	KO
RH6G	0,05	☺	☹	→KO	KO	KO	☺	☹	→KO	KO	KO
	0,1	☺	☹	→KO	KO	KO	☺	☹	→KO	KO	KO
K <sub>0</sub>		☺	☺ BS	BS+	BD+	BD++	☺	☺ BS	BS+	BD	BD+

**Tabulka 2: Porovnání regenerace protoplastů (neošetřených, ošetřených, po asymetrických fúzích)**

den po izolaci	K <sub>0</sub>			K <sub>IUV</sub>			K <sub>IAD</sub>			K <sub>IOAA</sub>			Fúze elektrické		Fúze chemické	
	S. ver.	Komt.	Kord.	S. ver.	Komt.	Kord.	S. ver.+Komt.	S. ver.+Kord.	S. ver.+Komt.	S. ver.+Kord.	S. ver.+Komt.	S. ver.+Kord.				
1.	☺	☺	☺	50% ☺	50% ☺	50% ☺	50% ☺	50% ☺	50% ☺	20% ☺	30% ☺					
3.	BS	BS	BS	BS -	BS -	BS -	BS	BS -	BS	BS -	(BS)					
5.	BS++ BD	BS++ BD	BS++ BD+	→KO	BS	→KO	☹ BS	BS BD	☹	BS						
7.	BD++	BD++	BD++	KO	BS+	(2 buňky s BS)	→KO	BS+ BD	→KO	BS						

K<sub>0</sub> neošetřená kontrola

K<sub>IUV</sub> kontrola ošetřená UV

K<sub>IAD</sub> kontrola ošetřená IAD

K<sub>IOAA</sub> kontrola ošetřená IOAA

☺ kulovité perspektivní protoplasty

☹ kulovité neperspektivní protoplasty

BS- bez regenerace buněčné stěny

BS počátek regenerace BS

BS+ ojedinělý výskyt BS

BS++ buněčné stěny u všech živých buněk

BD počátek buněčného dělení

BD+ ojedinělé kolonie buněk

BD++ kolonie buněk

→KO bez další regenerace, převážná destrukce

**Tento projekt je podporován NAZV QF 4108.**

✉

✉

## MIKROPROPAGÁCIA VZÁCNÝCH HYBRIDOV RODU *LILIUM* L. V PODMIENKACH *IN VITRO* A ICH AKLIMATIZÁCIA MICROPROPAGATION RARE HYBRIDS OF *LILIUM* L. INTO *IN VITRO* MULTIPLICATION AND THEIR ACCLIMATISATION

Helena LICHTNEROVÁ – Anna JAKÁBOVÁ – Marta DRAGÚŇOVÁ – Tibor DOKUPIL

*First aim was preparing of methodical practices for multiplication of rare Lilium hybrids into in vitro condition, observe efficiency, hormone matters into process bulb growth and their multiplication. Like a final was regenerant acclimatisation from in vitro into in vivo condition.*

*Key words: Lilium hybrids, explantates, multiplication, acclimatisation of the regenerants*

### Úvod

Ľalie sa v dnešnej dobe stávajú obľúbeným artiklom pestovania. Pôvodne sa v záhradách pestovali botanické ľalie, tie sú dnes už z veľkej časti nahradené hybridnými kultivarmi. Ide prevažne o hybridy, ktoré kvalitatívnymi znakmi predstihujú svojich rodičov nielen odolnosťou voči chorobám, ale aj vzrastom, veľkosťou a krásou kvetov, ako aj bohatstvom farieb.

Výsledkom medzidruhového kríženia vzniká ľalia, ktorá preberá niektoré vlastnosti, ktoré potrebujeme dosiahnuť, napr. orientálne ľalie sú mimoriadne krásne, majú príjemnú vôňu, ale neprezimujú v našich podmienkach. Skrížením s čínskymi ľaliami sa z nich stávajú hybridy odolné voči mrazu.

Techniky explantátových kultúr predstavujú v súčasnosti perspektívny doplnok tradičných metód rozmnožovania mnohých druhov rastlín. V posledných desaťročiach sa aj pri pestovaní ľalií čoraz viac začínajú uplatňovať metódy explantátových kultúr.

### Materiál a metódy

#### Rastlinný materiál

V experimentálnej časti sme pracovali so štyrmi kultivarmi ľalií:

- „Northern Carillon“,
- „Northern Sensation“,
- „Erfordia“,
- „Starburst Sensation“.

Rastlinný materiál bol vo forme šupín a cibúľ, ktoré boli ošetrené fungicídom.

#### Príprava a založenie explantátovej kultúry

I. etapa- orgánová kultúra (MURASHIGE, 1974):

Primárnym explantátom boli šupiny a meristémy cibúľ.

Odobraté časti boli sterilizované v 20 % roztoku chlórnanu sodného s detergentom TWEEN 20 (0,03-0,05%), následne 3-krát premyté v sterilnej destilovanej vode a rozdelené na 3 mm segmenty (meristém na 1 mm segmenty). Segmenty boli uložené na základné médium podľa MURASHIGE-SKOOG (1962).

II. etapa- multiplikácia - stimulácia tvorby cibuliek,

III. etapa- rizogenéza a aklimatizácia.

#### Kultivačné médium

Vo všetkých troch etapách mikropropagácie boli použité kultivačné médiá podľa autorov MURASHIGE-SKOOG (1962) s polovičnou dávkou makroelementov.

V prvej etape bolo médium obohatené o auxinoid kyselinu  $\alpha$ -naftyloctovú (NAA) v koncentrácii 0,05 mg.l<sup>-1</sup> a 30 g.l<sup>-1</sup> sacharózy.

V druhej etape boli použité dva varianty. Prvý bol obohatený o cytokinín 6 – bezylaminopurín (BAP) v koncentrácii 1,5 mg.l<sup>-1</sup> a druhý variant o cytokinín kinetín v koncentrácii 1,5 mg.l<sup>-1</sup>. Obe médiá mali vyšší obsah sacharózy 45g.l<sup>-1</sup>.

#### Podmienky kultivácie

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

- teplota 21°C,
- hustota ožiarovania pri tvorbe axilárnych výhonkov 35-40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  so 16 hod. fotoperiódou, biele svetlo
- hustota ožiarovania pri stimulácii rizogenézy 15-30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  so 16 hod. fotoperiódou,
- relatívna vlhkosť vzduchu 65-98 %.

### Aklimatizácia

Regenerované rastliny ľalií s dobre vyvinutým koreňovým systémom boli prenesené z podmienok *in vitro* do podmienok *in vivo*.

Vzhľadom k tomu, že koreňový systém bol dobre vyvinutý, nebolo potrebné rastliny subkultivovať na médiu so zvýšeným obsahom auxínu.

Aklimatizácia prebiehala v laboratórnych podmienkach pri prirodzenom osvetlení. Rastlinky boli vysadené do zakoreňovačov a uložené do miniskleníkov. V miniskleníkoch sme udržiavali 90 % vlhkosť vzduchu rosením.

### Výsledky a diskusia

V experimentálnej práci sme skúmali vplyv rôznych faktorov na diferenciáciu kultúry v podmienkach *in vitro*. Zistili sme, že najlepším materiálom pre tvorbu cibuliek boli šupiny cibúľ.

Zvýšenú tvorbu cibuliek z oboch typov explantátov sme zaznamenali aj pri kultivácii na médiu Murashige – Skoog obohatenom o cytokinín BAP ( $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a kinetín ( $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Účinkom rastových regulačných látok BAP-u a kinetínu sme dosiahli 1,4 násobné zmnoženie cibuliek, pričom BAP bol približne o 1% účinnejší ako kinetín.

Vyššia koncentrácia auxinoidu NAA ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v médiu indukovala tvorbu koreňov.

Ujateľnosť rastlín pri aklimatizácii bola 98 %, čím sme dokázali, že všetky rastliny boli efektívne prenesené z podmienok *in vitro* do *in vivo*.

### Záver

Získané výsledky dokazujú, že rozmnožovanie vzácnych hybridov ľalií pomocou orgánových kultúr možno považovať za veľmi výhodné, nielen z hľadiska genetickej stability, prípravy ozdraveného klonu, ale aj zabezpečenia dostatočne vysokého koeficientu rozmnožovaných cibuliek.

### Literatúra

1. MURASHIGE, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to Agriculture – Practical tissue culture applications. Academic Press, 1979, s. 27-44
2. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rev. Plant Physiol. 25, s. 135-166
3. MURASHIGE, T. - SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: Physiol. Plant 15, 1962, s. 15
4. NOVÁK, F. J.- PETRU, E. 1981. Tissue culture propagation of Lilium hybrids. Scientia Hort., 14, s. 191-199
5. TAKAYAMA, S. – MISAWA, M. 1979. Differentiation in Lilium bulb scales grown *in vitro*. Physiol. Plant. 48, s. 121-125

✉

✉

Ing. Helena Lichtnerová, prof. Ing. Anna Jakábová, CSc., Ing. Marta Dragúňová, Ing. Tibor Dokupil. Katedra biotechniky a parkových a krajinných úprav, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, SPU, Tulipánová 7, 949 01 Nitra. tel. 037/641 54 43

# POROVNANIE MORFOGÉNNEJ REAKCIE HYPOKOTYLOVÝCH SEGMENTOV Z RÔZNYCH OBLASTÍ HYPOKOTYLU ĽANU KULTIVOVANÝCH V IN VITRO PODMIENKACH NA TUHOM A TEKUTOM MÉDIU COMPARISON OF MORPHOGENIC RESPONSE OF DIFFERENT REGIONS OF FLAX HYPOCOTYL CULTIVATED IN VITRO ON SOLID AND LIQUID MEDIA

Zuzana KOVÁČOVÁ - Bohuš OBERT - Anna PREŤOVÁ

*Morphogenic response (shoot regeneration, root regeneration and callus induction) of two flax cultivars PRFGL 62 and Super were tested with 4 combinations of NAA and BAP on solid and liquid MS media. Orientation of hypocotyl segments was maintained to recognise different responses of apical, root or central regions of hypocotyl. Differences have been found in morphogenic response among different media, different parts of the hypocotyl, different concentrations of NAA and BAP and different flax genotypes.*

*Key words: flax, morphogenic response, regions of hypocotyl, growth regulators*

## Úvod

Ľan patrí do čeľade Linacea s viac ako 200 druhmi, pričom praktické využitie má iba jeden z nich - *Linum usitatissimum* L. (PREŤOVÁ et al., 2000). Ľan ako dôležitá ekonomická a perspektívna plodina sa využíva na produkciu vlákna a oleja. Vďaka svojej pomerne dobrej regenerácii v *in vitro* podmienkach je tento rastlinný druh predmetom výskumu mnohých biotechnologických štúdií, a tým nám umožňuje porozumieť základným vývinovým a biochemickým procesom v rastlinách (MILLAM et al., 2005).

## Materiál a metódy

V našich pokusoch sme použili dva kultivary ľanu (*Linum usitatissimum* L.) Super (priadny typ) a PRFGL 62 (novošľachtenec). Semená ľanu boli ponorené na 5 min. do 96 %-ného etanolu, povrchovo sterilizované v 25 %-nom roztoku Sava (2,36 g.l<sup>-1</sup> NaClO) a premyté 3-krát sterilnou vodou. Semená sme pestovali v kultivačnej komore pri teplote 19°C na médiu ½ MS s 2 %-ným prídavkom sacharózy a 0,8 %-ným prídavkom agaru. Pred autoklávovaním bolo upravené pH média na hodnotu 5,8. Hypokotyly 7-dňových klíčnych rastlín ľanu sme narezali na 2-3 mm segmenty a pestovali na tuhých a tekutých MS médiách s rôznou koncentráciou a kombináciou rastových regulátorov.

## Výsledky a diskusia

V našich pokusoch sme sa zamerali na porovnanie morfogénnej reakcie hypokotylových segmentov ľanu z hľadiska ich umiestnenia na hypokotyle od koreňa po vrchol, pričom sme použili tuhé i tekuté MS médium so štyrmi kombináciami rastových regulátorov NAA + BAP (2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP). Z vykonaných experimentov na tekutom MS médiu sme zistili, že obidva genotypy ľanu reagujú podobne, bez väčších rozdielov. Pri použití rastových regulátorov s koncentráciou 2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0,2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP v MS médiu sa vytvoril na hypokotylových segmentoch tvrdý kompaktný kalus. Pri zníženej koncentrácii rastových regulátorov v MS médiu (1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP) sa vytvoril taktiež tvrdý kompaktný kalus, ale v menšej miere. Nepozorovali sme rozdiely medzi koreňovou, strednou a vrcholovou časťou hypokotyly. Pri pokusoch na tuhom MS médiu reagujú genotypy ľanu rozdielne. Pri použití MS média so všetkými štyrmi kombináciami rastových regulátorov NAA + BAP (2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP) pri genotypy PRFGL 62 sme zaznamenali najvyššiu regeneráciu výhonkov na hypokotylových segmentoch z koreňovej časti hypokotyly (graf 1, obr. 1). Pri použití MS média s prídavkom 2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP v prípade genotypu Super regenerovali výhonky najlepšie na hypokotylových segmentoch zo strednej časti hypokotyly, kým pri použití ostatných kombinácií rastových regulátorov v MS médiu regenerovali výhonky najvýraznejšie na hypokotylových segmentoch z koreňovej časti hypokotyly. Indukciu koreňov z hypokotylových segmentov ľanu sme pri obidvoch genotypoch pozorovali v menšej miere. Pri genotypy PRFGL 62 i pri genotypy Super korene z hypokotylových segmentov na MS médiu s 0,2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP, 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP neregenerovali vôbec. Nižšiu regeneráciu koreňov vykázali obidva genotypy pri použití MS média s prídavkom 2 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP na hypokotylových segmentoch z koncových oblastí hypokotyly. Pri všetkých testovaných kombináciách a koncentráciách rastových regulátorov v tuhom MS médiu bol prítomný na hypokotylových segmentoch kalus.

