



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

PIEŠŤANY, 2007

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 zo 14. vedeckej konferencie
13.–14. november 2007

Názov: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.

Editor: Ing. Valéria Šudyová, CSc., Ing. Edita Gregová, PhD.

Recenzent: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., SPU Nitra
prof. Ing. Jozef Augustín, DrSc., UCM Trnava

Autorský kolektív:

Abraha Eyasu	Ješko Dalibor	Psota Vratislav
Bechyně Miroslav	Ježíšková Ivana	Pšenáková Ivana
Benková Michaela	Kiliánová Veronika	Řehořová Karla
Bežo Milan	Klemš Marek	Salaj Ján
Bieliková Magdaléna	Klenotičová Helena	Sedláček Tibor
Bojnanská Katarína	Klíma Miroslav	Sekaninová Jana
Brestič Marián	Kocourková Zuzana	Sekera Daniel
Bušo Rastislav	Kováč Ladislav	Skálová Dagmar
Candráková Agáta	Kováčová Zuzana	Slámová Zdeňka
Candráková Eva	Kovár Marek	Slezáková Kateřina
Čermáková Blanka	Kraic Ján	Solnická Pavla
Černý Ivan	Krivosudská Eleonóra	Spitzer Tomáš
Čertík Milan	Krofta Karel	Stehno Zdeněk
Červená Viera	Kučera Vratislav	Straková Dana
Degma Petr	Kummerová Marie	Svitáčková Běla
Dobrodenka Miroslav	Lakatos László	Svoboda Petr
Draguň Marián	Lebeda Aleš	Šajgalík Michal
Dunca Juraj	Libantová Jana	Šimora Rastislav
Duncová Alena	Lichvárová Mária	Štefanka Jozef
Dvončová Daniela	Macháčková Ivana	Štefúnová Veronika
Dvořáček Václav	Maliníková Erika	Švec Miroslav
Faltus Miloš	Martinek Petr	Švec Ondřej
Faměra Oldřich	Masár Štefan	Takáč Tomáš
Faragó Juraj	Mátelová Lenka	Trávníčková Alena
Faragová Natália	Matušíková Ildikó	Tvarůžek Ludvík
Feketová Miroslava	Matušínský Pavel	Uher Jiří
Fišerová Helena	Mihálik Daniel	Užík Martin
Gajdová Jana	Miko Marian	Vaculová Kateřina
Galliková Andrea	Mikolášová Renata	Váňová Lucie
Gálová Zdenka	Mikulíková Daniela	Vejražka Karel
Gašpárková Lubomíra	Mikušová Zuzana	Veškrna Ondřej
Gažo Ján	Moravčíková Jana	Vidová Barbora
Golebiowska Gabriela	Múdry Pavol	Vivodík Martin
Golemiac Elzbieta	Muchová Darina	Vyhnánek Tomáš
Gregáňová Želmíra	Musilová Markéta	Vymyslický Tomáš
Gregová Edita	Navrátilová Božena	Vyvadilová Miroslava
Griga Miroslav	Nesvadba Vladimír	Zezulka Štěpán
Gubiš Jozef	Nesvadba Zdeněk	Zur Iwona
Hartmann Jiří	Neugebauerová Jarmila	Žáčková Zuzana
Havrlentová Michaela	Nevrtalová Eva	Žáková Mária
Heldák Ján	Obert Bohuš	Žiarovská Jana
Henychová Alena	Ondřejčák František	Žofajová Alžbeta
Hochmuthová Miroslava	Oslovičová Veronika	
Horáček Jiří	Palenčárová Eva	
Horáčková Simona	Pastirčák Martin	
Horčíčka Pavel	Patzak Josef	
Horváth Lubomír	Peng Zheng-Song	
Horváthová Viera	Polišenská Ivana	
Hozlár Peter	Pospíšilová Dorota	
Hrubíková Katarína	Preťová Anna	
Janovská Dagmar	Procházka Stanislav	

© SCPV - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 978-80-88872-65-8

Obsah

Prednášky

LAKATOS, L.: Flowering characteristic of apples and their relationship with meteorological parameters.....	8
ABRAHA, E.; KLÍMA M.; VYVADILOVÁ, M.; BECHYNĚ, M.: Effectiveness of selected antimutagenic agents for embryogenesis in <i>Brassica carinata</i> microspore culture.....	18
HORVÁTH, E.: Validácia molekulárnych metód pre skúšanie geneticky modifikovaných rastlín.....	22
KLÍMA, M.; VYVADILOVÁ, M.; KUČERA, V.: Zlepšená metoda produkce dihaploidních linií řepky ozimé.....	26
HELDÁK, J.; BEŽO, M.; GALLIKOVÁ, A.: Využitie molekulových markerov pri introgresii znakov z divorastúcich druhov <i>Solanum</i> do kultúrnych foriem ľuľka zemiakového (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	30
SKÁLOVÁ, D.; NAVRÁTILOVÁ, B.; LEBEDA, A.: Metody izolace pylových zrn <i>Cucumis</i> spp. (<i>C. sativus</i> , <i>C. melo</i>) využitelné při <i>in vitro</i> opylování.....	34
SVOBODA, P., FALTUS, M.: Vliv předkultivace na kryokonzervaci chmele.....	38
NESVADBA, V.; KROFTA, K.: Šlechtění chmele (<i>Humulus lupulus</i> L.) pro biomedicíální a farmaceutické účely.....	41
NEUGEBAUEROVÁ, J.; STRAKOVÁ, D.: Hodnocení genofondu reveně (<i>Rheum</i> L., <i>Polygonaceae</i>) z hlediska obsahu vitamínu C.....	45
ČERTÍK, M.; HAVRENTOVÁ, M.; JEŠKO, D.; HOZLÁR, P.; BIELIKOVÁ, M.; KRAIC, J.: Štúdium vybraných biochemických parametrov vo vzťahu k agronomicko-morfologickým znakom v súbore ovsu.....	49
FARAGÓ, J.: Druhá generácia transgénnych plodín na trhu: Transgénne rastliny so zvýšenou nutričnou hodnotou.....	52
SEDLÁČEK, T.; FAMĚRA, O.; DVOŘÁČEK, V.; HORČIČKA, P.: Možnosti šlechtění pšenice pro produkci bioethanolu..	56
MIKULÍKOVÁ, D.; HORVÁTHOVÁ, V.; KRAIC, J., ŽOFAJOVÁ, A.: Hodnotenie obilného škrobu pre produkciu bioetanolu.....	58
GAŽO, J.; MIKO, M.: Prvé poznatky z hodnotenia diaspór hospodársky významných druhov čiernych hľuzoviek.....	62
MIKO, M.; GAŽO, J.: Hodnotenie kvality výsadbového materiálu inokulovaného hľuzovkou letnou (<i>Tuber aestivum</i> Vitt.) pre agrolesnícku výrobu.....	66
POSPÍŠILOVÁ, D.; SEKERA, D.; ŠIMORA, R.: Výskyt <i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i> Gmel. na Slovensku a možnosti jeho uplatnenia v šľachtení.....	70
PSOTA, V.; VEJRAŽKA, K.; HARTMANN, J.; MUSILOVÁ, M.: Tvrdost obilek ječmene (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	74
KOVÁČ, L.: Adaptabilita perspektívnych odrôd krmovín na podmienky ťažkých pôd Východoslovenskej nížiny.....	79
ŽOFAJOVÁ, A.; MIHÁLIK, D.; ŠAJGALÍK, M.; MUCHOVÁ, D.; LICHVÁROVÁ, M.; ONDREJČÁK, F.; UŽÍK, M.: Hodnotenie vybraných rodičovských odrôd pšenice letnej f. ozimnej.....	83
MÚDRY, P.; DRAGÚŇ, M.: Testovanie citlivosti klíčencov kukurice (<i>Zea mays</i> L.) na ióny kadmia polymorfizmom vybraných enzýmov.....	86
HRUBÍKOVÁ, K.; CANDRÁKOVÁ, A.; BEŽO, M.; ŽIAROVSKÁ, J.: Retrotranspozónové markéry v analýze populácií jačmeňa siateho.....	90
MASÁR, Š.: Patogenita hrdze pšenicovej pri optimálnej a zvýšenej teplote.....	94
MIHÁLIK, D.; GREGOVÁ, E.: Nové prístupy v analýze vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek (HMW-GS) pšenice.....	98

Postery

BENKOVÁ, M.; ŽÁKOVÁ, M.: Kvalita súčasného a historického sladovníckeho jčmeňa.....	100
BOJNANSKÁ, K.; MASÁR, Š., GUBIŠ, J.: Odolnosť novošľachtených kmeňov pšenice letnej voči vybraným obligátnym patogénom.....	103
CANDRÁKOVÁ, E.: Využitie genetického potenciálu vybraných odrôd jačmeňa jarného.....	105

ČERNÝ, I.; KOVÁR, M.: Úroda a kvalita čakanky (<i>Cichorium intybus</i> L.) v závislosti od odrody a foliárnej aplikácie Atoniku a Polyboru 150.....	109
DROBNÁ, J.: Variabilita morfológických a hospodárskych znakov divorastúcich populácií <i>Medicago</i> sp.....	111
DUNCA, J.; DUNCOVÁ, A.; ŠVEC, O.: Fyzikálno-mechanické vlastnosti jabĺk.....	114
DUNCA, J.; DUNCOVÁ, A.; ŠVEC, O.: Fyzikálno-mechanické vlastnosti stebiel obilnín.....	117
FARAGOVÁ, N.; FARAGÓ, J.; BUŠO, R.: Počet aeróbných baktérií a respiračný profil mikroorganizmov v rizosfére transgénnej kukurice.....	119
FARAGOVÁ, N.; FARAGÓ, J.: Interakcie hrčkotvorných baktérií s koreňmi geneticky modifikovaných rastlín lucerny.....	121
FARAGÓ, J.; GAŠPÁRKOVÁ, Ľ.; FARAGOVÁ, N.: Adventívna regenerácia výhonkov z internodálnych explantátov chmeľu obyčajného (<i>Humulus lupulus</i> L.) v <i>in vitro</i> kultúre.....	124
FEKETOVÁ, M.; HUDECOVÁ, M.; HORVÁTH, Ľ.: Technológie a oblasti kontroly kvality a bezpečnosti rastlinných komodít, krmív a bioproduktov.....	126
GREGÁŇOVÁ, Ž.; VIVODÍK, M.; GÁLOVÁ, Z.: Mikrosatelitné analýzy genetickej diverzity genotypov jačmeňa.....	128
GUBIŠ, J.; BOJNANSKÁ, K.; MASÁR, Š.; HOZLÁR, P.; DVONČOVÁ, D.: Odolnosť genotypov ovsu siateho voči hubovým chorobám.....	130
GUBIŠ, J.; BOJNANSKÁ, K.; MASÁR, Š.; ČERVENÁ, V.: Reakcia tritordea, jačmeňa siateho a pšenice tvrdej na abiotické stresy.....	132
HELDÁK, J.; BEŽO, M.; ŠTEFÚNOVÁ, V.; GALLIKOVÁ, A.; ŽÁKOVÁ, M.: Hodnotenie genetickej príbuznosti medzi kultivarmi ľuľka zemiakového použitím metódy amplifikácie jedného retrotranspozónového prajmera.....	134
HORÁČKOVÁ, S.; VACULOVÁ, K.; JANOVSÁ, D.; STEHNO, Z.; VYMYSLICKÝ, T.: Minoritní plodiny pro specifické využití v potravinářství.....	137
KILIÁNOVÁ, V.; SVITÁČKOVÁ, B.; FIŠEROVÁ, H.; KLEMŠ, M.: Vliv kinetika a benzyladeninu na regeneraci explantátů <i>Canna indica</i> L.....	139
KLEMŠ, M.; SOLNICKÁ, P.; MIKUŠOVÁ, Z.; SLÁMOVÁ, Z.; FIŠEROVÁ, H.; PROCHÁZKA, S.; HORÁČEK, J.; KLENOTIČOVÁ, H.; GRIGA, M.: Vliv kyseliny abscisové na expresi zásobních proteinů při desikaci zygotických embryí hrachu <i>in vitro</i>	141
KOCOURKOVÁ, Z.; SEDLÁČEK, T.; ŘEHOŘOVÁ, K.: Vliv napadení fusariem na reologii těsta pšenice.....	143
KOVÁČOVÁ, Z.; ČERMÁKOVÁ, B.; TRÁVNÍČKOVÁ, A.; OBERT, B.; MACHÁČKOVÁ, I.; PREŤOVÁ, A.: Vplyv vnútornej hladiny auxínu na regeneráciu z rôznych oblastí hypokotylu ľanu kultivovaného v podmienkach <i>in vitro</i>	145
KOVÁR, M.; ČERNÝ, I.: Zlepšuje foliárna aplikácia Atoniku antioxidačnú kapacitu rastlín čakanky?.....	147
KRIVOSUDSKÁ, E.; BRESTIČ, M.; DOBRODENKA, M.; ŠTEFANKA, J.: Účinok postupnej dehydratácie na vybrané fyziologické parametre hrachu siateho (<i>Pisum sativum</i> L.).....	150
LIBANTOVÁ, J.; MORAVČÍKOVÁ, J.; MATUŠÍKOVÁ, I.: Izolácia génu chitinázy z rosičky okruholistej (<i>Drosera rotundifolia</i> L.) pomocou genome walkingu.....	152
MARTINEK, P.; PENG, Z.S.: Pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) se třemi pestíky v kvítku.....	154
MATUŠINSKÝ, P.; MIKOLASOVÁ, R.; SPITZER, T.: Dynamika vývoje chorob pat stébel na ozimé pšenici.....	158
MENDEL, E.; ČÍČOVÁ, I.; DROBNÁ, J.; BIELIKOVÁ, M.; ZIRKELBACHOVÁ, K.; JEŠKO, D.; HAVRLETOVÁ, M.: Vplyv prídavkov múky z pohánky a prosa na kvalitu chleba.....	160
GOLEBIOWSKA, G.; MORAVČÍKOVÁ, J.; GOLEMIEC, E.; ZUR, I.; SALAJ, J.: Detekcia chitinázových aktivít v kultivaroch zimných odrôd tritikale (x <i>Triticosecale</i> Wittm.) po pôsobení chladu ako stresového faktora.....	162
MUCHOVÁ, D.; GREGOVÁ, E.; ONDREJČÁK, F.; LICHVÁROVÁ, M.; HOCHMUTHOVÁ, M.: Využitie genetických zdrojov pšenice letnej f. ozimnej s <i>GLU-1B</i> 17+18 v šľachtení na potravinársku kvalitu.....	165
NAVRÁTILOVÁ, B.; SKÁLOVÁ, D.; GAJDOVÁ, J.: Regenerace kalusů z mezofylových protoplastů <i>Cucumis sativus</i>	168
NESVADBA, V.; KROFTA, K.: Variabilita obsahu xanthohumolu a desmethylxanthohumolu u samčích genotypů chmele (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	170

NESVADBA, Z.; VYHNÁNEK, T.; JEŽÍŠKOVÁ, I.; TVARŮŽEK, L.; POLIŠENSKÁ, I.: Využití DNA markerů pro predikci rezistence k fuzáriovému vadnutí klasů u vybraných genotypů ozimého ječmene.....	172
NEVRTALOVÁ, E.; SLEZÁKOVÁ, K.; VYHNÁNEK, T.: Aplikace SSR markeru u triticales.....	174
OSLOVIČOVÁ, V.; PALENČÁROVÁ, E.: Genetická diverzita genotypov <i>Triticum aestivum</i> L., <i>Triticum spelta</i> L. a <i>Triticum durum</i> DESF. na základe HMW-GS.....	176
PALENČÁROVÁ, E.; OSLOVIČOVÁ, V.; GÁLOVÁ, Z.: Bielkovinová charakteristika láskavca (<i>Amaranthus</i> L.) a cícera (<i>Cicer arietinum</i> L.) z hľadiska ich alergenicity.....	178
PASTIRČÁK, M.: Diverzita mikroskopických húb obilnín a tráv na Slovensku.....	180
PASTIRČÁK, M.: Vlákňité huby kolonizujúce mak siaty (<i>Papaver somniferum</i> L.) počas ontogenézy.....	182
PATZAK, J.; NESVADBA, V.; HENYCHOVÁ, A.: Genetická variabilita planých chmelů (<i>Humulus lupulus</i> L.) na Kavkaze.....	184
PŠENÁKOVÁ, I.; VIDOVÁ, B.; FARAGÓ, J.: Vplyv genotypu na kalogenézu stonkových a listových explantátov chmelu obyčajného (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	186
ŘEHOŘOVÁ, K.; VEŠKRNA, O.; HORČIČKA, P.; SEDLÁČEK, T.: Vliv napadení fusarióou klasu (FHB) na výnosové a kvalitativní parametry pšenice ozimé.....	189
SEKANINOVÁ, J.: Hodnocení sortimentu severoamerických aster (rod <i>Synphyotrichum</i>).....	191
SVOBODA, P., FALTUS, M.: Kryokonzervace vrcholů chmele.....	193
ŠVEC, M.; MÁTELOVÁ, L.; DEGMA, P.: Nešpecifická rezistencia voči múčnatke trávovej (<i>Blumeria graminis</i> f.sp. tritici) u slovenských odrôd pšenice letnej.....	194
TAKÁČ, T.; PREŤOVÁ, A.: Štúdium vplyvu hlavných redoxných činiteľov na morfogénne procesy ľanu siateho.....	196
UHER, J.: Mezidruhové hybridy 2n=20 a 2n=24 svetlice (<i>Carthamus</i> L.).....	198
VÁŇOVÁ, L.; KUMMEROVÁ, M.; KLEMŠ, M.; FIŠEROVÁ, H.; ZEŽULKA, Š.: Mohou organické polutanty ovlivnit kvantitu i kvalitu výnosu kulturních plodin?.....	200
ŽÁČKOVÁ, Z.; MALINÍKOVÁ, E.: Životný cyklus ľanu siateho.....	202
ŽOFAJOVÁ, A.: Tvorba výberových populácií pšenice letnej f. ozimnej.....	204

FLOWERING CHARACTERISTIC OF APPLES AND THEIR RELATIONSHIP WITH METEOROLOGICAL PARAMETERS

László LAKATOS

The trees observed are grown at Újfehértó, Eastern Hungary in the plantation of an assortment (gene bank) with 586 apple varieties. Each of the varieties were observed as for their dates of subsequent phenophases, the beginning of bloom, main bloom and the end of bloom over a period between 1984 and 2001. during this period the meteorological data-base keeps the following variables: daily means of temperature (°C), daily maximum temperature (°C), daily minimum temperature (°C), daily precipitation sums (mm), daily sums of sunny hours, daily means of the differences between the day-time and night-time temperatures (°C), average differences between temperatures of successive daily means (°C). Between the 90th and 147th day of the year over the 18 years of observation. The early blooming varieties start blooming at 10–21 April. The varieties of intermediate bloom start at the interval 20 April to 3 May, whereas the late blooming group start at 2–10 May. Among the meteorological variables of the former autumnal and hibernal periods, the hibernal maxima were the most active factor influencing the start of bloom in the subsequent spring.

Key words: apple, phenology, blooming, flowering

Introduction

Survey of the purpose and importance of monitoring plant phenological processes and its literature

Growth and development of plants is fundamentally coded in their inherited genetic constitution, but manifestation of the expression of the particular genes depends on the complex effects of a defined environment. The environment is subject within wide limits to periodically repeated changes, especially through returning seasons of the successive years, moreover, the geographic conditions of a given site are though decisive as far as the main characters of the seasons, the variable combination of the environmental components, temperature, humidity, light intensity and atmospheric movements may cause various stresses and adversities with hardly predictable frequencies. In addition to happening determined mainly by the local climate, other components of the site are changing the fate of living organisms, as the soil and other biotic and abiotic factors, especially the agro- or phytotechnical interventions of man, which may modify substantially even the original climatic conditions e.g. by watering and nutrition.

It is almost a common-sense that the rate of growth development is largely under the influence of the climate and the weather conditions. The seasonal life cycle of plants are divided into distinct phases recognized easily by their appearance (phenophases), which are closely related mainly with temperature, consequently, the regular monitoring of phenophases associated with the changes of temperature reveal the regularities called phenology, a characteristic of plant species (BACSÓ, 1966) moreover, variability of individual genotypes within the same species. The beginning of a new phenophase is recognized by the appearance of a new organ (e.g. flower) or loss of petals of leaves. The life of a plant during the whole year is divided into distinct phenophases, which are not obligatory coincident with developmental phases not always recognized by naked eye.

The life cycle of plants belonging to different species or within one species to varieties manifest their genetically coded character also by their different specific phenological performance recognized and described under the same conditions. Whereas the weather of another year with different environmental conditions (e.g. temperatures) may change the phenology of the compared varieties by a different way. The rhythm, speed and intensity of phenophases characteristic to the varieties of a species may be changed by manipulating the genotype, i.e. by the methods of plant breeding. The subsequent phenophases of related varieties may coincide, overlap each other or move away (BRÓZIK & NYÉKI, 1974).

BUBÁN (1998) defined growth as the realization of genetic program on the charge of an input of energy by the modifying contribution of correlated factors of environment, which activate the manifestation of a series of genes according to a genetically fixed order, therefore the organization of biological functions are changing continuously.

Phenological observations are strictly bound to the calendar, but for the purpose of comparing years, sites and meteorological data, the rigid scale of the calendar is suppressed and weather cycles or arbitrary units are used (five-day period, week, decade or month). Terms of phenological periods are given the preference as thoughtful orientations, which hall-mark the actual weather data. The characterization of e.g. thermal demand of the respective phenological phenomena is derived from those observations. Similarly, the water supply of apple trees could not be approached with terms fixed in the calendar, because the incidents of precipitation as the rhythm of warming up during the spring time used to be extremely variable, but the information of three weeks before apple bloom is significant.

The length of phenophases is determined first of all by the meteorological elements: temperature, precipitation, and radiation. Temperature and rainfall used to have optimal values, which may vary according to varieties, however, those values are not stable because of the interactions with other meteorological factors and e.g. with the respective soil conditions, etc. (LAKATOS, 1997). With increasing temperatures the length of phenophases tends to shorten, whereas precipitation being coupled with a drop of temperature, may

prolong the periods. An excessive shortening of phenophases – especially of the fruit growing process – may diminish yield and impairs fruit quality.

In exploring relations between phenophases and meteorological phenomena, the basic concept climatology should keep in mind, the climate is always a complex of many interacting factors. E.g. low temperature may reduce water demand of plants, high temperature on the contrary increases it.

High importance ought to be given to phenology in timing of phytosanitary operations. This refers to the cultivated plant as well as to the predator or to the pathogen. Most elaborate technologies are strictly bound to special phenophases of the host plant, many diseases of fruit trees, e.g. monilia of stone fruits or apple scab (HOLB, 2002) have to be sprayed to exactly defined phenophases as a condition of full efficiency.

Information derived from phonological observations is needed to optimize the effects of man power and of a disposable machine pool. The exact phonological monitoring is also useful in predicting future expectations.

The effect of meteorological elements on the life rhythm of fruit trees

The effect of individual elements may not be observed immediately on the trees of the plantation, because the microclimate of the site may change the dynamics and length of the phenophases and productivity (Berényi, 1958). Among the meteorological factors, the radiation is most susceptible to become dominant under the canopy of the trees, because a modified penetration of sunshine is decisive to the timely and spatial distribution of other elements as temperature, air-humidity, etc.

The microclimate of plantations depends beyond the meteorological regime also on a couple of factors, which are bound to the growing site as well as to biological and phytotechnical moments. (SZÁSZ & TÓKEI, 1997). The spatial order of the trees, the distance and orientation between and within the rows, the form and dimension of the crown. Those are the components of the ecological environment, which determine the adaptability of a given genotype (KÁRPÁTI, 1960).

The life processes of fruit trees are undisturbed within set limits of temperature only. All deviations from the optimum are both directions are deleterious to productivity as well as to fruit quality. Temperature is satisfactory to growth and development within relatively narrow limits only. According to the law of van't Hoff, increasing temperature accelerates the speed of chemical reactions by a rate of two fold per an increase of 10 °C. However, the validity of this law is restricted to a narrow interval only regarding the phenological processes. (SZÁSZ & TÓKEI, 1997).

Most of weather adversities in Hungarian fruit growing are due to the temperature minima during the winter and spring, whereas heath may become deleterious as well (SZABÓ, 1997). The efficiency of photosynthesis is diminished above (30-35°C) because dissimilative processes become dominant.

The initiation of a new phenophase occurs certainly on the biochemical level, and becomes visible after some delay first on the microscopic level only. Therefore, the phenophases are sometimes difficult to be distinguished by morphological criteria (RACSKÓ, 2001); as a matter of fact the phenophases remain latent. At the time of bud development all buds seems to be leaf buds. The initiation of flower primordial ensues in different fruit species and varieties at a set time during the summer. Its first visible sign is the change of form in the growing meristem tip of the bud. The development of primordial of flowers and/or inflorescences is a slow process during the end of summer, autumn (paradormancy) and the first part of winter but keeps to be continuous (BRÓZIK & NYÉKI, 1975). This phenophase is called ectodormancy, which changes to the next phase and the spring. The latter one is very susceptible to temperature changes, as the warming up accelerates the formation of flowers up to bud burst and blooming (BUBÁN, 2003).

The effect of temperature on the development of buds has been studied by SZABÓ (1997), and he stated that during the period of endodormancy, buds and aerial, lignified parts of fruit trees are practically hot damaged by low temperatures or – 20 °C (below zero) in Hungary. As endodormancy finished, any temperature above zero °C stimulates the life processes of the trees (HOLDEFLEISS, 1930) and abolishes gradually that frost resistance experienced during endodormancy. The regression of frost resistance in the flower buds and flowers continues until the end of bloom and fruit set, which is the most frost susceptible period of the fruit trees (SOLTÉSZ, 1997). Even -0,5 °C may prove to be deleterious to the developing ovules (seed primordial). Low temperatures along blooming especially coupled with precipitation cause stress in plants and renders the flowers susceptible to infection of *Monilia* on stone fruits. The relation of phenophases and meteorological phenomena – especially temperature – was most explored around the bloom of fruit trees. The blooming process has been analyzed meticulously by Nyéki (1980, 1981, 1990, 2002) and divided into the following sub-periods 1. Start of bloom (1-5% of flowers opened on the tree), 2. Main bloom (the ratio of open flowers is 50% or more), 3. The day of main bloom the ratio of open florets achieved a maximum), 4. End of bloom (when 95-100% of flowers shed their petals).

It is the easiest to determine the start of bloom, therefore it is considered to be the most characteristic for the respective genotype of the tree and for distinguish varieties. In the literature, there are difficulties with the comparison of data because the authors applied different criteria as for the definition of phenophases.

The length of endodormancy (a phenophase) of apple varieties is determined by the demand of a set number of chilling hours, i.e. until that demand is not fulfilled, the rising temperature does not trigger the process of flower development. Mild winters may cause reversion of the customary blooming order of

varieties in the following spring because endodormancy of some varieties still did not finish (NYÉKI et al., 2004). In case if in all varieties the endodormancy expired regularly (normal or rather long winters), the blooming order will not be disturbed (SOLTÉSZ, 1992)

An important moment of the blooming process is the dynamic of blooming (OROSZ-KOVÁCS, 2002). The number of open flowers on the first day, on the first three days and on the main blooming day may comprehensively characterize the “dynamic” of bloom (Nyéki, 1980). Knowing the data of the first three days, the whole blooming process could be estimated. Out of the three dates, the effect of the variety dominates in the first and gradually diminishes conceding to the effect of the season. Temperatures above 10 °C registered one or two days before the start of bloom is very closely correlated with the rate of flowers opened at the first day ($r=0.78$).

Excessively high temperatures during bloom shorten the length of blooming period, pollen is quickly released but the drying out of the stigmatic fluid lowers the probability of pollen grains being caught and fertilization ensued. The chance of the flowers being visited by pollinating bees declines at the same time (BRÓZIK & NYÉKI, 1975). Summing up, the chance of flowers being pollinated and ovules being fertilized is low with high temperatures during bloom (SZABÓ, 1997).

The relief of the growing site also influences the manifestation of meteorological factors, i.e. the development of plants indirectly (BACSÓ, 1946). Trees grown on a slope of NE exposition are slower in displaying the sequence of phenophases than those of southern exposition (MOHÁCSY, 1946).

Unfavorable climatic conditions and their deleterious effect could be counteracted more or less by a series of phytotechnological measures. E.g. the chances of frost damage threatening the flower buds and later flowers during the phase of ectodormancy are diminished by slowing down the development of the buds. During March and April, the delay of bloom may become as long as 10 days caused by watering the soil or the aerial parts of the trees (SZABÓ, 1997).

After bloom, the fertilized flowers set fruit and the growth of fruit lets starts immediately. The growth of the fruits is also divided to sub-periods, which are varietals properties also subject to meteorological influence (SZALAY, 2003).

Ripening, as the last phase of fruit development is associated with changes of quality meaning complicated biomechanical process (OKÁLYI, 1954). Harvest of the fruits ought to be performed earlier than the complete biological maturity of the fruit and its exact date is referred to as technological maturity (SZÁSZ, 1988). The exact distinction of the phenophase as for the technological maturity of individual varieties is hardly approached all over by plain phenological means. The phenological signs of maturity are specific for most varieties (e.g. changes of the ground colour and/or covering colour of the fruit skin, the force needed to pick the fruit, the firmness of the fruit flesh, accumulating of sugar, regression of acidity, etc)(BRÓZIK & NYÉKI, 1974).

Unusually hot weather accelerates ripening, the fruits may stay smaller and of lower quality, less attractive by aspect.

Materials and methods

The beginning of bloom is, as explained above, a genetically coded character although subject to environmental influence, i.e. the weather of the season.

The trees observed are grown at Újfehértó in the plantation of an assortment (gene bank) of apple varieties of the Society of Public Utility for Fruit Growing and Extension Service.

Each of the 586 varieties is represented by two trees, which have observed as for their dates of subsequent phenophases, the start of bloom, the main bloom and the end of bloom over a period between 1984 and 2001.

For the analysis of data the varieties have been grouped according to dates of maturity, blooming period as well as types of the seasons.

Groups of maturity dates:

- summer ripe,
- autumnal ripening,
- winter ripe varieties.

According to the dates of blooming:

- early blooming,
- intermediate blooming,
- late blooming varieties.

The different seasons according to the weather of the spring:

- rainy
- dry
- sunny
- cloudy, overcast

- cool
- warm

According to the length of fruiting period (Date of maturity)

- short
- medium
- long

The classification of the seasons has been performed by statistical means. Precipitation, number of sunny hours and mean temperature are considered during the whole blooming period. The variation has been calculated around the respective sums (precipitation, sunny hours) or means (temperature). That was the way to establish the six categories.

The methods of research

- We analyzed the time series' fluctuation by the dispersion D
- Determined the different weather characteristics with the mentioned equation

For example:

- Rainy $f(x) \geq \bar{x} + D$

- Dry $f(x) \leq \bar{x} - D$

$$f(x) = \bar{x} \pm D$$

Where 'D' is the dispersion of time series and ' \bar{x} ' is the pattern's average

With this similar method we can classify

- Sunny
- Cloudy, overcast
- Cool
- Warm years
 - For the researching plant-weather relationship we use a simple, well known statistical methods
- Correlation and regression analysis

Applied procedure

- We used the SPSS 11.0 software for the linear regression fitting and for calculation of dispersions as well.
- The tables made by Excel programme.

Meteorological variables examined

The developmental cycles, as the physiological processes of the trees, are influenced not only by the actual weather but also by the meteorological happening of the past years. The former year, is also considered in the exploration of causes manifested in varying blooming dates, especially the start of bloom.

Between 1983 and 2001 the meteorological data-base keeps the following variables:

- daily means of temperature (°C)
- daily maximum temperature (°C)
- daily minimum temperature (°C)
- daily precipitation sums (mm)
- daily sums of sunny hours
- daily means of the differences between the day-time and night-time temperatures (°C)
- average differences between temperatures of successive daily means (°C)

Those variables served to calculate means of the respective growing seasons, which in turn are the base of computing correlation and regression coefficients characterizing the start of blooming of apple varieties.

Results

Approximately the half of the varieties examined (46%) start blooming between the 114th and 121st day, i.e. between April 24 and May 17 and before March 31, blooming occurs very rarely.

Within the interval of 1984-2001 over 18 years, the earliest bloom started in 1990 April 3, and the latest in 1997 May 1.

The highest frequency of starting bloom is expected between April 26 and May 3.

The frequency of starting bloom in varieties of different blooming time

As the data of examined varieties of different blooming dates over 18 years have been evaluated we may draw the following consequences:

The early blooming varieties start blooming at April 10-12. The varieties of intermediate bloom start at the interval April 20-May 3, whereas the late blooming group start at May 2-10. The curve of distribution in the case of early blooming varieties is skewed to the right. It means that the probability of starting bloom increases with the time elapsed. The group of intermediate blooming time shows the distribution most approaching normality, but there are regressions along this course. That anomaly is attributed to the inconstancy of spring weather. The distribution curve of start of bloom in late blooming varieties is a zigzag line. The steep peaks are characteristic. The amplitude of the distribution is the narrowest in this group.

The distribution of starting bloom according to different types of years

The distribution of starting bloom in rainy and dry type of years. In *Figure 1* the function curves prove that bloom started earlier by 4-5 days in dry years than in rainy ones. However, the dynamic of flowering was slower in dry years by 1-2 days.

The number sunny hours influenced decisively the dynamic of bloom. The results show clearly the favourable effect of sunshine in stimulating the start of bloom by 7-8 days compared with the cloudy years (*Figure 2*). The amplitude of variation in the start was much less remarkable, as it was 1-2 days shorter in sunny days than in cloudy ones.

The most remarkable differences in the distribution of starting bloom are experienced between the years characterized as warm and cool. In warm years the start of bloom ensued 8-9 days than in cool years, moreover the amplitude of variation was also narrower in warm years by 7-8 days (*Figure 3*). The cool years produce a quasi-normal function slightly skewed to the left with numerous steep regressions. The cause of it is the unfavourable, chilly weather. In warmer years, on the contrary, the curve is almost regularly normal (*Figure 3*).

The relations of the start of bloom and the different components of the meteorological environment

On the basis of time series of the beginning of bloom we can state that starting points of flowering are shifted 10 days earlier during the last 18 years period (*Figure 4*).

Out of the meteorological variables or components the spring temperature maxima, the mean temperature of the spring as well as the difference between the mean day-time and night-time temperatures produced a significant correlation with the start of bloom on the level of $P=1\%$. We have also found significant correlation between minimum temperature and beginning of bloom (*Figure 5*).

If the specific length of the fruiting season of the varieties and the start of bloom are plotted against the meteorological parameters of the past year, the following consequences have been drawn:

If the varieties, which started bloom lately were considered, there was a significant effect attributed to the autumnal precipitation, the mean winter temperature and winter minima, the autumnal and hibernal maxima on the start of bloom, valid at $P=1\%$ level. In the variety groups of early and intermediate blooming dates, there was no significant effect detected of the meteorological parameters of the former year on blooming data. All the three groups of varieties reflected to the hibernal sunshine with blooming dates, significantly. The varieties of a longer fruiting period manifested the effects of the mean differences between day-time and night-time hibernal temperatures, significantly.

Among the meteorological variables of the former autumnal and hibernal periods, the hibernal maxima were the most active factor influencing the start of bloom in the subsequent spring.

In the group of early blooming varieties, there was a significant correlation (at $P=1\%$ level) between the mean temperature, the minima and maxima of the former spring and the mean temperatures of the summer on the one hand and the start of bloom in the respective spring on the other hand. The start of bloom of varieties of intermediate blooming time reflected significantly the effects of the summer precipitation, the mean differences of daytime and night time temperatures and the spring minima. The late blooming varieties did not reflect by their start of bloom the effects of any meteorological parameter measured in the former year. The groups distinguished by different lengths of fruiting period started blooming as being as being susceptible, significantly, to the summer precipitation and to the mean differences between daytime and night time summer temperatures of the previous year.

Among the meteorological parameters the mean differences of daytime and night time summer temperatures of the last year seemed to be effective on the start of bloom.

There is a significant correlation between average night and day temperature differences and length of blooming period (*Figure 6*).

The general statements concerning the relation between the spring weather of the current year and the date of bloom in different groups of varieties, regarding start of bloom and length of fruiting period are the following:

The date of starting bloom is less influenced by the spring weather of the current year in the early blooming group of varieties. For all the 7 meteorological variables, the influence could not be proved in the date of starting bloom. In the early blooming group of varieties, rather the thermal conditions of spring and summer of the previous year were decisive. In the intermediate blooming time group of varieties, the spring temperature and the mean differences between daytime and night time temperatures proved to be significant

in influencing the start of bloom. Similarly, in the late blooming group of varieties, the mean differences between daytime and night time was decisive as influencing the start of blooming.

In a mild spring, blooming starts earlier. The larger differences between daytime and night time temperatures stimulate the start of blooming. The large amplitude of temperature changes is associated with high daytime maxima during the spring. In the other variety groups too, the two mentioned meteorological variables are decisive in influencing the start of bloom. In addition to that, varieties of intermediate blooming date are significantly influenced by minimum temperatures of the spring. The surprising fact is that in early blooming varieties any of the meteorological variables did not alter significantly the start of bloom. However, weather conditions of the previous year proved to be decisive in determining the blooming dates.

Not only between the blooming date and meteorological parameters we have found significant correlation but between length of vegetation period and minimum temperature of vegetation period (*Figure 7*). The maturity time important phenological stages for the apple growers, there is also significant relationship between maturity time and minimum temperature from 1st of January to maturity date (*Figure 8*).

Conclusions

- Blooming time shifted to an earlier period by 2 weeks at most of Hungarian fruit cultivation areas
- Positive effects:
- Thanks to the lengthening of vegetation season in the future we can cultivate in the Carpathian basin those plants also which require warmer climate circumstances.

Negative effects of temperature and precipitation changes on plant production

- Increasing risk of frost occurrence
later spring, early autumn frost damage (fruits, vegetables)
- Drought-dryness damage (duration, and occurrence growing)
- Extremely high temperature-heat stress (more frequently)
- Huge amount of precipitation during a short period

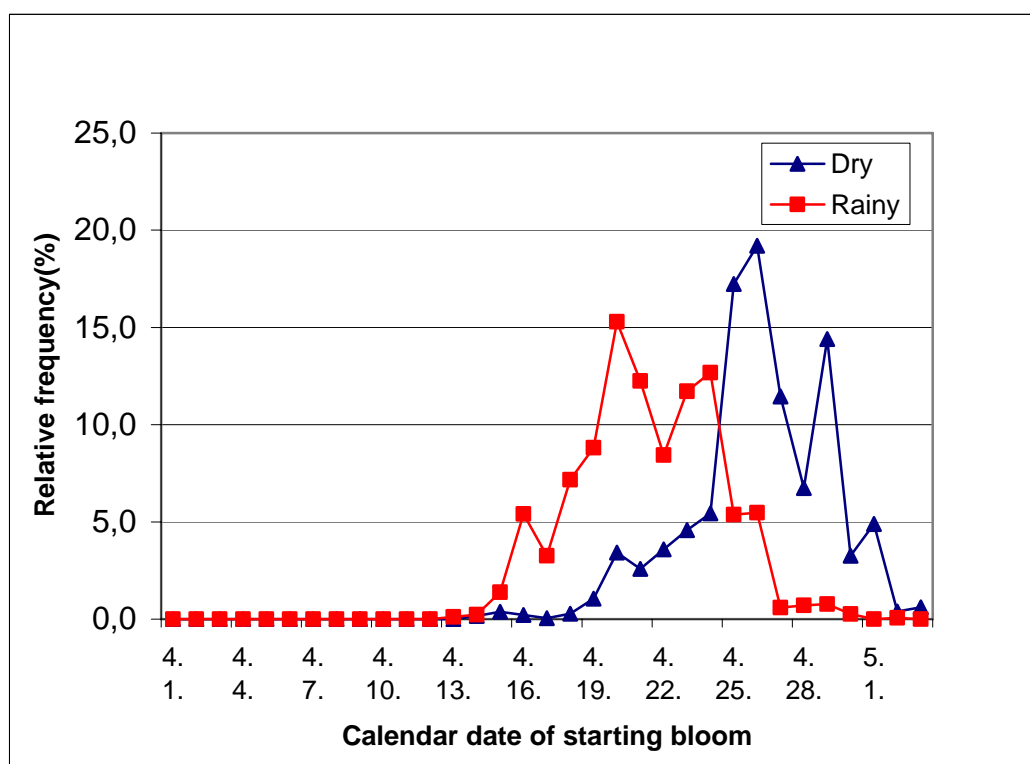


Figure 1: Distribution of the beginning of blooming time in dry and humid years (Újfehértó 1984-2001)

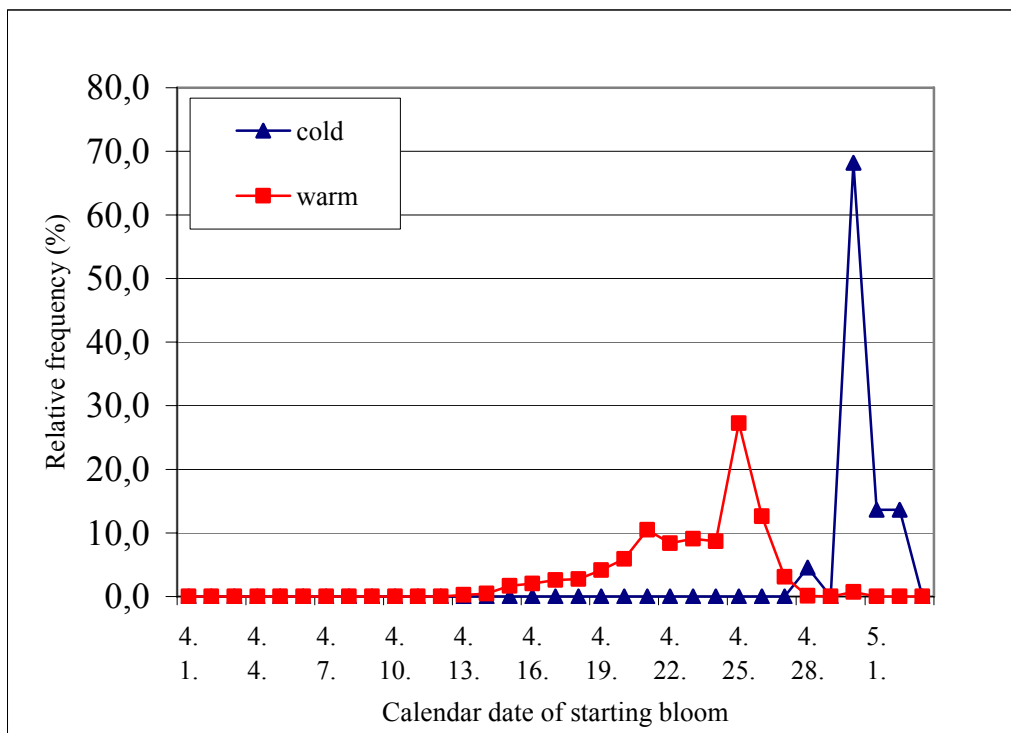


Figure 2: Distribution of the beginning of blooming time in cold and warm years (Újfehértó 1984-2001)

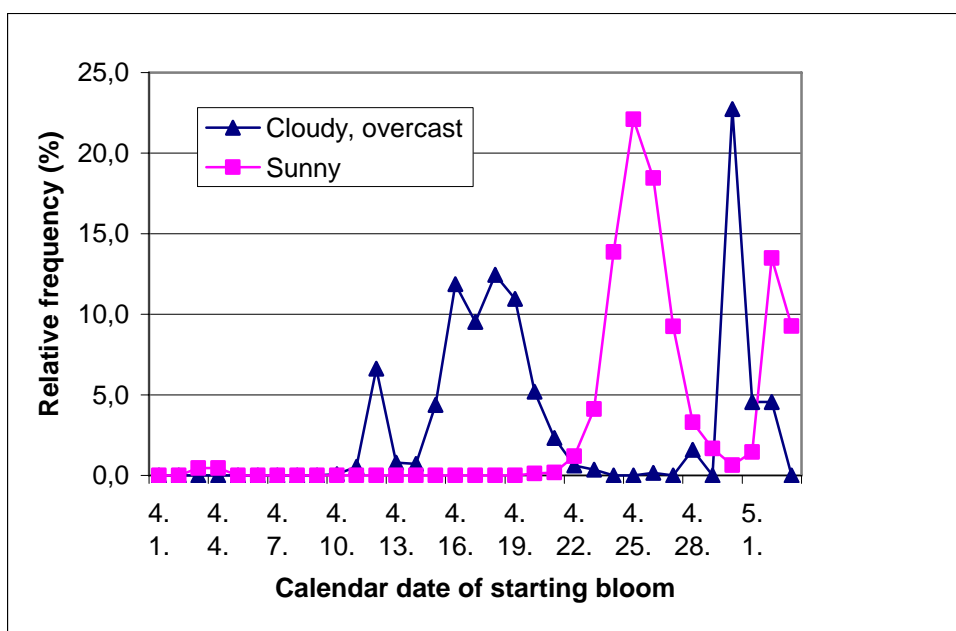


Figure 3: Distribution of the beginning of blooming time in cloudy and sunny years (Újfehértó 1984-2001)

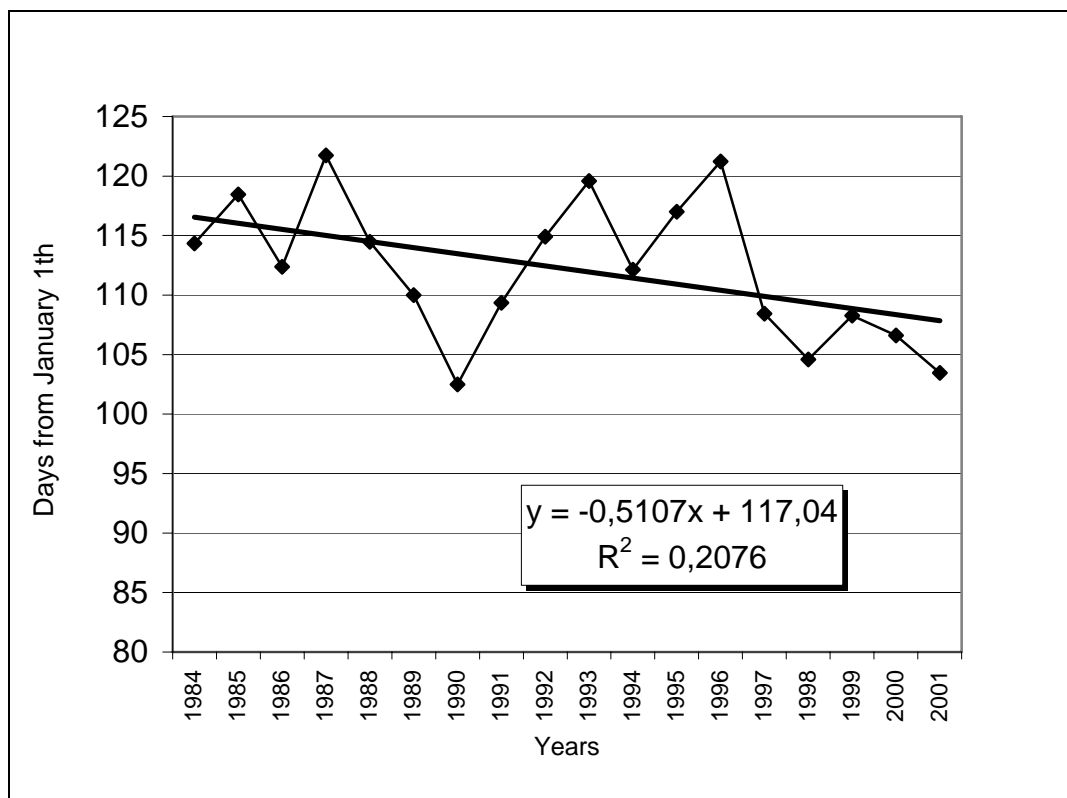


Figure 4: Time series of the beginning of bloom at apple gene bank plantation (Újfehértó, 1984-2001)

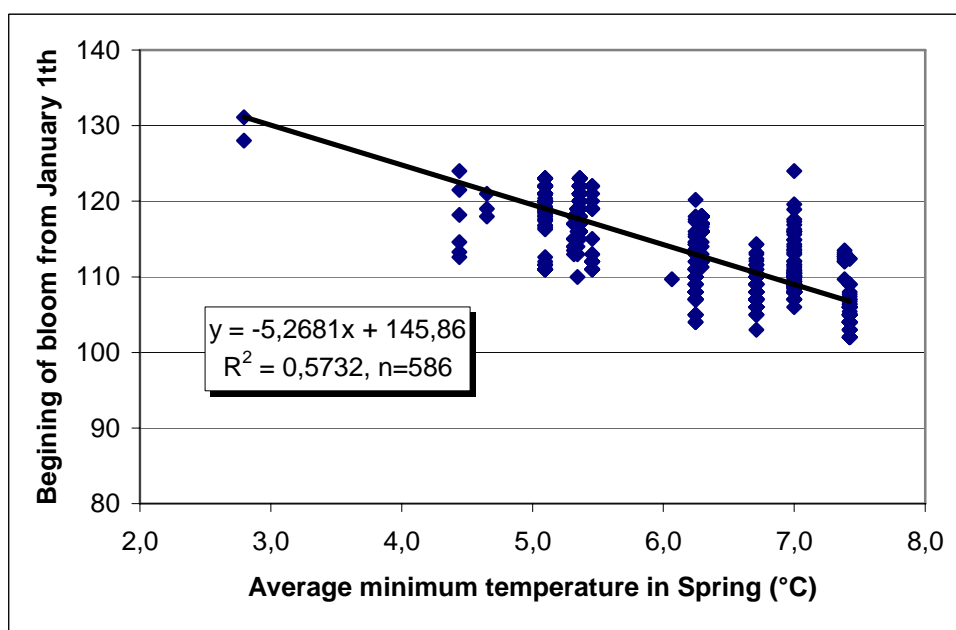


Figure 5: Relationship between the beginning of bloom and minimum temperature in spring time in apple gene bank (Újfehértó, 1984-2001)

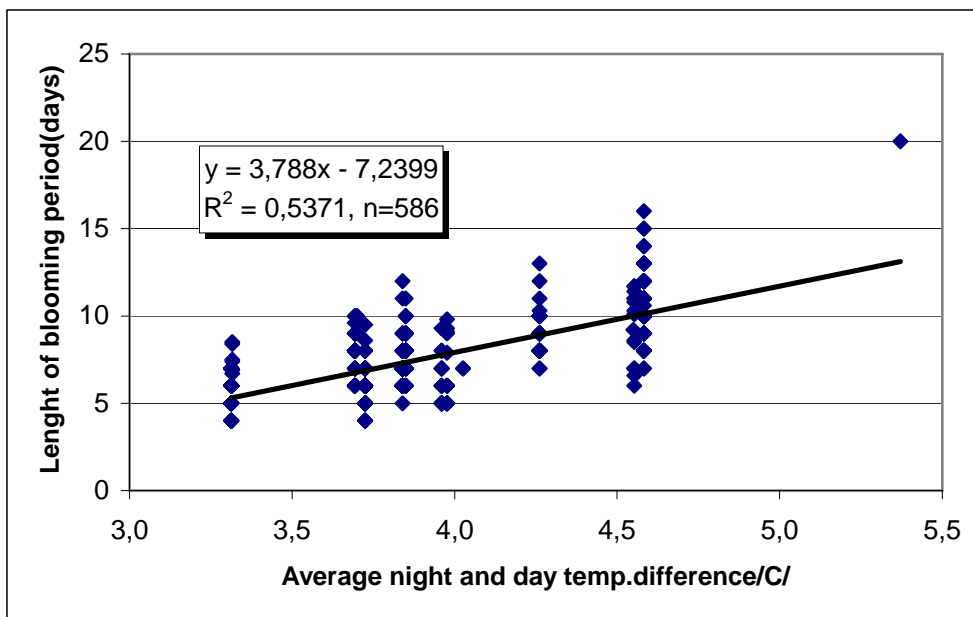


Figure 6: Relationship between the length of blooming and the average night and day temperature difference in Spring (Újfehértó, 1984-2001)

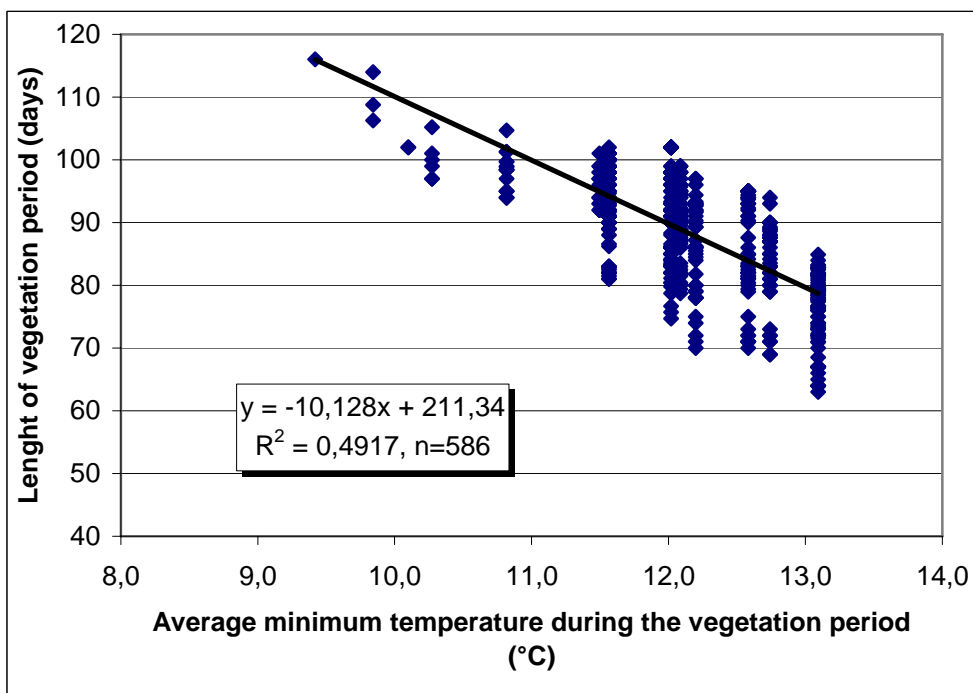


Figure 7: Relationship between length of vegetation period and minimum temperature of vegetation period (Újfehértó, 1984-2001)

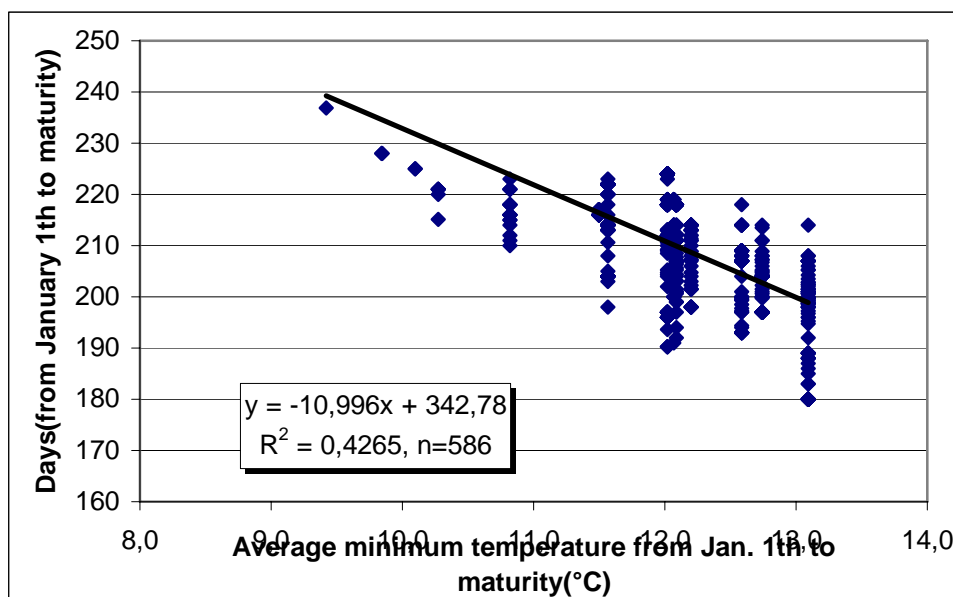


Figure 8: Relationship between maturity time and minimum temperature from 1st of January to maturity date (Újfehértó, 1984-2001)

References

1. Bacsó, N (1996): Basic course of Agricultural meteorology (in Hungarian). Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 300. p.
2. Brózik, S & Nyéki, J. (1974): Phenology (in Hungarian). In: Gyuró, F (szerk.): A gyümölcsstermesztés alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 299-318. p.
3. Brózik, S. & Nyéki, J. (1975): Fruit set and pollination (in Hungarian). Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 234. p.
4. Bubán, T. (1998): Growing parameters of fruits. In: Soltész, M. (1998): Gyümölcsfajta-ismeret és – használat. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 75-97. p.
5. Bubán, T. (2003): Developing stages and characteristics of fruits In: Papp, J. (2003): 1. Gyümölcsstermesztési alapismeretek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 127-157. p.
6. Hann, J & Knoch, K. (1932): Handbuch der Klimatologie Stuttgart. 383. p.
7. Holb, I. (2002): Apple scab biological prediction and protection (In Hungarian). Szaktudás Kiadóház, Budapest. 144. p.
8. Holdefleiss, P. (1930): Agrometeorologie. Berlin. 234. p.
9. Kárpáti, Z. (1960): Relationships between geographical circumstances and horticultural production (In Hungarian). MTA Biológiai Osztályának Közleményei. Budapest. 3-4: 219-232.
10. Lakatos, L. (1997): Climatic model for dry matter production of winter – wheat in Hungary. Agricultural and Forest Meteorology 83, (3/4) 231-246.
11. Nyéki, J. (1980): Floral biology and fruit set at different fruit varieties (In Hungarian). Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 334.p
12. Nyéki, J. (1989): Stone fruits flowering and pollination. MTA, Budapest. Doktori értekezés (manuscript) 288+110. p.
13. Nyéki, J. (1990): Fruit set, pollination, and blooming of fruits Integrated fruit production (In Hungarian). In: Gyuró, F. Fruit production. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 61-90. p.
14. Okályi, I. (1954): Fruit production (In Hungarian). Egyetemi tankönyv. Budapest 338. p.
15. Orosz – Kovács, Zs. (ed.) (2000): Floral biology of apple. Integrated fruit production (In Hungarian). Pécsi Tudományegyetem TTK Növénytani Tanszék és Botanikus Kert – Almatermesztők Szövetsége kiadásában. Újfehértó. 179. p.
16. Racskó, J. (2001): Biological basis of frost resistance and possibilities of decreasing harmful effects Integrated fruit production (In Hungarian). Nyír-Gazda. 10:18-19.
17. Soltész, M. (ed.) (1997): Integrated fruit production (In Hungarian). Mezőgazda Kiadó, Budapest. 843.p.
18. Szabó, Z. (1997): Decreasing of harmful meteorological effects In: Soltész, M. (1997): Integrated fruit production (In Hungarian).. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 353-359.p.
19. Szász, G. & Tőkei, L. (eds.) (1997): Meteorology for agricultural, horticultural experts. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 722. p.
20. Tőkei, L. (1997): Effects of temperature on plants. In: Szász, G. & Tőkei, L. (eds.): Meteorológia mezőgazdáknek, kertészeknek, erdészeknek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 390-399.

Address:

László Lakatos, University of Debrecen, Centre of Agricultural Sciences, HUNGARY

EFFECTIVENESS OF SELECTED ANTIMITOTIC AGENTS FOR EMBRYOGENESIS IN *BRASSICA CARINATA* MICROSPORE CULTURE ÚČINNOST VYBRANÝCH ANTIMITOTICKÝCH LÁTEK NA EMBRYOGENEZI V MIKROSPOROVÝCH KULTURÁCH *BRASSICA CARINATA*

Eyasu ABRAHA – Miroslav KLÍMA – Miroslava VYVADILOVÁ – Miroslav BECHYNĚ

The effect of antimitotic agents colchicine, trifluralin and oryzalin on isolated microspore culture Brassica carinata was evaluated in order to combine a positive effect of antimitotic agents on the induction of embryogenesis with the possibility to induce chromosome doubling at early developmental stage. The highest frequency of cell division and embryo yield was obtained when microspores were cultivated in the liquid NLN medium with 0.05 mg/l colchicine for 18 hours. Similarly, all tested concentrations of trifluralin and oryzalin significantly increased embryo yield in comparison with control variants.

Key words: antimitotic agents; Brassica carinata; embryogenesis; microspores

Introduction

Ethiopian mustard (EMus) originated in Ethiopia, where is used both as a leaf vegetable and as an oilseed crop. *Brassica carinata* B. (EMus) is an amphidiploid species with the BB genome derived from female *B. nigra* and CC genome from male *B. oleracea* (SNOWDON et al., 1997). EMus plays a significant role in the farming system of Ethiopian agriculture (NUGUSSIE & BECKER 2001). It has several desirable agronomic characteristics compared to other *Brassica* crops - significant fungal and water stress resistance (CHOUDARARI et al., 2000).

The microspore doubled haploid methodology is now employed in many *Brassica napus* and *Brassica carinata* breeding programs around the world as alternative/supplement to conventional methods of homozygous line production (KUCERA et al., 2002; FRIEDT & ZARHLOUL, 2005). This timesaving method makes possible to develop completely homozygous genotypes from heterozygous parent in one single generation, besides that it allows fixing recombinant gametes directly as fertile homozygous lines. It enables rapid development of homozygous plants and efficient selection for recessive traits and could be used as a versatile genetic manipulation tool for *in vitro* selection and evaluation of desirable genotypes (BARRO et al., 2001).

Microspore or anther culture has been used to produce desirable meiotic recombinants in numerous species. However, the utilization of these recombinants relies on inefficient genome doubling procedures to obtain fertile doubled haploid plants.

The objective of presented experiments was to determine the effect of selected antimicrotubule agents (i.e. colchicine, oryzalin and trifluralin) on induction of embryogenesis in microspore culture of Ethiopian mustard with the possibility of chromosome doubling at an early developmental stage.

Materials and methods

Plant material

Three *Brassica carinata* genotypes provided from Czech University of Life Sciences, Institute of Tropics and Subtropics were utilized and one high productive but high erucic *Brassica carinata* genotype Dodolla received from Ethiopia's Gene Bank have been used as donor plants to establish microspore cultures.

Microspore culture

Microspore isolation was carried out according to COVENTY et al. (1988) with some modifications. Young flower buds with microspores in proper developmental stages were collected from main and lateral branches of the plant. Bud size was optimized for different genotypes of *Brassica carinata*. Buds were surface sterilized with 70% ethanol for one minute and with a 10% solution of sodium hypochlorite for ten minutes, and rinsed three times (with the interval of 5 minutes) with sterile distilled water. Buds were gently macerated with a glass rod in about 2 ml NLN liquid medium (LICHTER, 1982) supplemented with 13% (w/v) sucrose. Microspore suspension was filtered through two pieces of sterile nylon mesh (100µm and 40µm), gently transferred to a centrifugation tube and the volume adjusted with fresh NLN medium to 10 ml. It was then centrifuged at 100 g for 10 minutes, followed by supernatant removal, addition of fresh NLN media and centrifugation for 5 minutes. After the second centrifugation the supernatant was removed and microspores were resuspended in fresh NLN medium (microspores without antimitotic agent were directly cultivated on the Petri dishes, then incubated in the dark). The suspension was then equally divided into 5 centrifuge tubes. The amount of suspension in each tube was adjusted with fresh NLN medium to 10 ml and all tubes were centrifuged for 5 minutes at 100 g. The supernatant was removed and three tubes with microspores were filled up with working solutions of particular doubling agents colchicine, trifluralin and oryzalin. One tube with fresh NLN medium was used as a control. The concentration of doubling agents in working solutions was as follows: 10 and 20 µmol of oryzalin, 10 µmol of trifluralin and 0.05% solution of

colchicine. Two densities 70,000 and 124,000 microspores per 1 ml of colchicine solution were used. Each microspore suspension was then dripped to 9cm plastic Petri dish and cultivated for 18 hrs at 30°C in the dark. After 18 hrs treatment the suspensions were centrifuged for 10 minutes at 100 g. After supernatant removal, the microspores were resuspended in fresh NLN medium and cultivated at the same conditions as described above. After three weeks of cultivation, embryos were counted at torpedo and heart stage (at least 2 mm in length) and the Petri dishes were placed on the shaker (70 rpm) under light at 22°C until the embryos turned green. Further cultivation was maintained according to basic protocol (KLIMA et al., 2004).

Well developed cotyledonary embryos were transferred to solid differentiation medium (DM) with growth regulators and maintained at 22°C, for 16/8 photoperiod with light intensity of 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. After three weeks of cultivation, the one third of embryo cotyledons were cut and embryos were transferred to solid regeneration medium. Well established plantlets were transferred to a rooting MS medium without growth regulators. Plantlets with roots were then transferred to the soil.

Results and discussion

According to number of embryos per 1 ml of cultivation media, genotypes Dodolla, BC 4 and BC 2 were high embryogenic in our experiments, while genotype BC 1 produced significantly less amount of embryos in comparison with other genotypes tested (Fig. 1). Detailed results from individual treatments shows Figure 2.

In general, the frequency of embryogenesis and embryo yield in cultures treated with 0.05% colchicine was significantly higher than in control cultures (Fig. 3). Lower embryo frequency of untreated control in comparison with colchicine-treated variants was also detected by ZHOU (2002) in spring rape. In agreement with statistical analysis, other antimitotic chemicals (trifluralin and oryzalin) had neither positive nor negative impact on embryo production. Susceptibility of individual genotypes to applied treatments is presented in Figure 4. However, we observed that cultivation of microspores in presence of trifluralin and oryzalin for 18hrs slowed down the embryogenesis and embryo formation at least by one week and sometimes had a negative effect on embryo morphology, whereas NLN with colchicine accelerated embryogenesis in comparison with control variants and never suppressed formation of embryos. These results are in accordance with previously presented issues on the positive impact of colchicine on embryo formation (ZAKI & DICKINSON, 1991; ZHOU, 2002), whereas positive effect of trifluralin, presented by ZHAO & SIMMONDS (1995), was not observed.

Conclusion

Frequency of embryogenesis and embryo yield in cultures treated with individual antimitotic chemicals (colchicine, trifluralin or oryzalin) was higher than in control cultures.

The most positive influence was shown especially with 0.05% colchicine in all tested genotypes.

It was obvious that lower concentration of oryzalin and high microspore culture density resulted in higher frequency of embryo production. Similar observations were made by ZHAO & SIMMONDS (1995).

However, we observed that cultivation of microspores in presence of trifluralin and oryzalin for 18hrs slowed down the embryogenesis and embryo formation at least by one week and sometimes has a negative effect on embryo morphology, whereas NLN with colchicine enhances embryogenesis in comparison with control variants and never suppress formation of embryos.

In general, cultivation of microspores with antimitotic agents resulted in higher yield of microspore embryos in comparison with control variants.

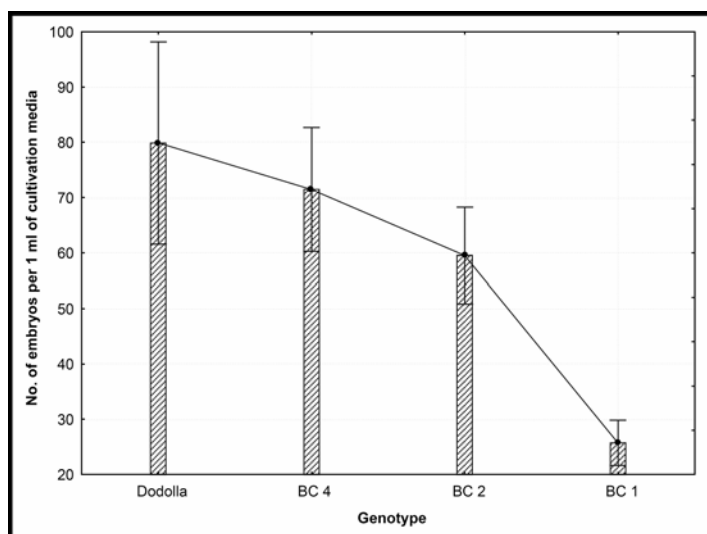
References

1. BARRO, F. – FERNÁNDEZ-ESCOBAR, J. – VEGA, M. – DE LA, MARTÍN, A. (2001): Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breeding*, **120**: 262–26.
2. CHAUDHARY, B.R. – JOSHI, P. – RAMARAO, S. (2000): Interspecific hybridization between *B. carinata* and *B. rapa*. *Plant breeding*, **119**: 417–420.
3. COVENTRY, J. – KOTT, L. – BEVERSDORF, W.D. (1988): Manual for Microspore Culture Technique for *Brassica napus*. OAC Publication 0489, University of Guelph, Guelph.
4. FRIEDT, W. – ZARHLOUL, M.K. (2005): Haploids in the improvement of crucifers. In: PALMER, C.E., KELLER, W.A. – KASHA, K.J. (eds.), *Haploids in Crop Improvement II, Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 56, 191–213, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
5. KLIMA, M. – VYVADILOVA, M. – KUCERA, V. (2004): Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. *Horticulture Science (Prague)*, **31**: 119 – 123.
6. KUCERA, V. – VYVADILOVA, M. – KLIMA, M. (2002): Utilization of doubled haploids in winter oilseed Rape (*B. napus* L.) breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, **38**: 50–54.
7. LICHTER, R. (1982): Induction of haploids plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. pflanzenphysiol.*, **105**: 427–434.

8. NIGUSSIE, A. – BECKER, H.C (2001): Variation and inheritance of erucic acid content in *Brassica carinata* germ plasm collection from Ethiopia. *Plant breeding*, **120**: 331- 335.
9. SNOWDON, R.J. – KOHLER, W. – FRIEND, W. – KOHLER, A. (1997): Genomic in situ hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, **95**: 1320-1324.
10. ZAKI, M.A. – DICKINSON, H.G. (1991): Microspore-derived embryos in *Brassica*. The significant symmetry in pollen mitosis 1 to embryogenic development. *Sex. Plant Reprod.*, **4**: 48-55.
11. ZHAO, J. – SIMMONDS, D.H. (1995): Application of trifluraline to embryogenic microspores cultures to generate doubled haploid plants in *B. napus*. *Physiol. Plant.*, **95**: 304-309.
12. ZHOU, W.J. – TANG, G.X. – HAGBERG, P. (2002): Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. *Plant Growth Regulation*, **37**: 185-192.

The study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech republic, project no. 0002700602

Figure 1: Microspore-derived embryo production in examined genotypes



Thin bars represent confidence intervals

Figure 2: Microspore-derived embryo production in examined genotypes within individual treatments

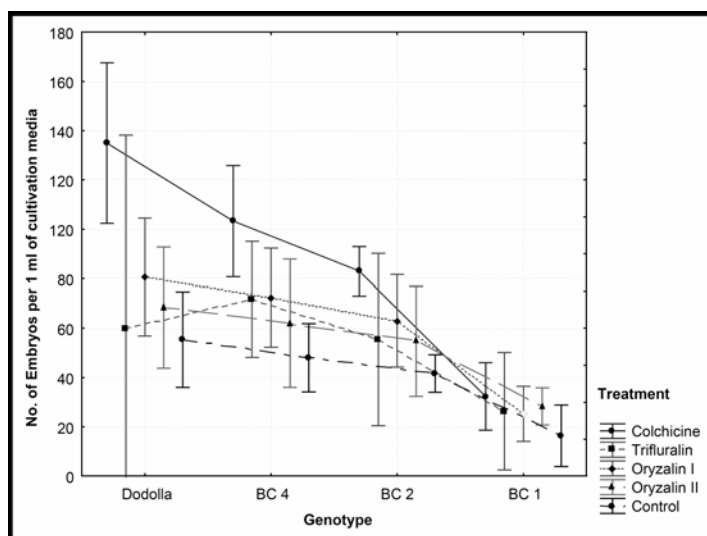


Figure 3: Impact of individual treatments on microspore-derived embryo

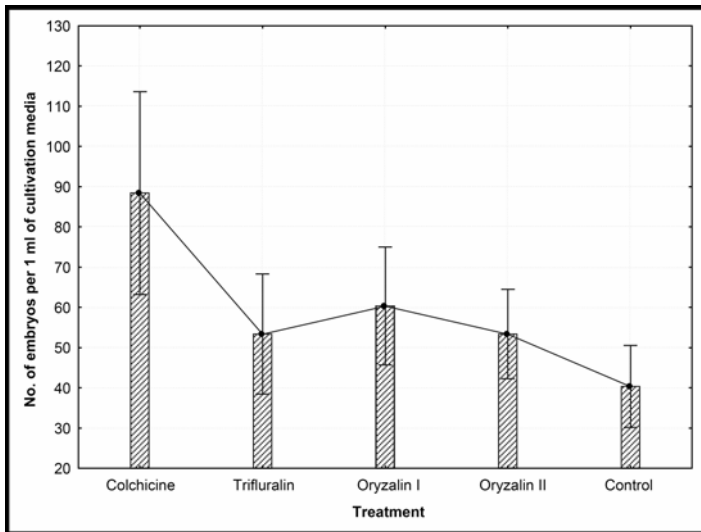
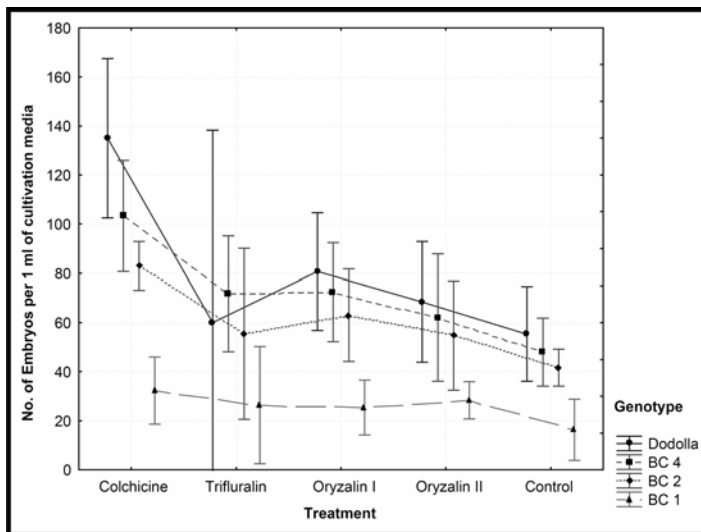


Figure 4: Impact of individual treatments on microspore-derived embryo production within examined genotypes



Adresa autorov:

Eyasu ABRAHA, Miroslav BECHYNĚ, Institute of Tropics and Subtropics, Czech University of Life Sciences
 Kamýcká 129, 165 21, Prague 6 - Suchdol, Czech Republic, eyasu_abraha@yahoo.com

Miroslav KLÍMA, Miroslava VYVADILOVÁ, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně,
 klima@vurv.cz

VALIDÁCIA MOLEKULÁRNYCH METÓD PRE SKÚŠANIE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANIZMOV VALIDATION OF MOLECULAR METHODS FOR TESTING OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

Ľubomír HORVÁTH – Miroslava FEKETOVÁ – Michaela HUDECOVÁ

*The Department of Molecular Biology of the CCTIA is the NRL for GMOs testing of plant commodities, feedstuffs and food components as referred Regulation (EC) No 1981/2006, national Act No. 184/2006 on co-existence of GM plants and letter of appointment of the Minister of Agriculture SK of 2007. Department is accredited according to ISO/IEC 17025 as the testing laboratory for qualitative and quantitative testing of GMOs, for molecular testing and identification of plant varieties and for molecular detection of plant pathogens. The Department uses validated methods for GMOs testing by the CRL JRC EC and standardized procedures according to CEN and ISO standards. Within the scope of accreditation the Department performs validation of methods (home validation by IUPAC, alternative methods validation by ISO 16140 and full validation by ISO 5725 and IUPAC as cooperating laboratory with Community Reference Laboratory of the JRC Ispra in CRL validation process. Within the years 2004-2007 the laboratory took part in various proficiency tests and validation ring-trials. In 2007 the Department participated in Comparative Validation Study on GMOs Detection on the DualChip GMO, organized by Eppendorf AG and CCTIA, in Ring-trial on validation of event specific method for identification and quantification of event 356043 in soybean, organized by CRL JRC Ispra and in Validation test on PCR detection of *Monilinia fructicola* and *Phytophthora ramorum*, organized by LNPV-UMAF, France. Activities of the Community Reference Laboratory (CRL) in the area of validation of methods for GMOs detection and quantification are defined in the Regulation (EC) 1829/2003. The scientific assessment methods for testing of GMOs are based on information and materials submitted by the applicant, and conducted by the CRL. The CRL tests and validate the detection method proposed by the applicant, by using the control samples and the samples provided by the applicant. The validation process requires the participation of a number of external EU laboratories (members of ENGL) and fulfils qualitative criteria. The validation process consists of the following steps: Reception of documents and material provided by the applicant; Scientific evaluation of the documentation and data; Experimental testing of the samples and methods by the CRL; Collaborative study with a network of participating laboratories; and Reporting to the Authority. A part of this article is a short information about the validation study on GMOs detection using Eppendorf DualChip® GMO System as the alternative method for GMOs detection.*

Key words: GMO, PCR, quantitative test, real-time PCR, DNA chip, validation.

Úvod

Oddelenie molekulárnej biológie ÚKSÚP pôsobí v pozícii NRL na základe poverenia ministra pôdohospodárstva, v súlade s Nariadeniami (ES) č.1981/2006 a č. 884/2004 a zákonom č. 184/2006 Z.z. o postovaní GMR v poľnohospodárskej výrobe a vykonáva superkontrolu v oblasti kvality a bezpečnosti rastlinných komodít, krmív, rastlinných porastov a závlahových vôd v oblasti skúšania GMO v rastlinných komoditách a krmivách (odrody kultúrnych rastlín a buriny, osivá, sadivá, biosivá, krmivá, rastlinné produkty, ekologické produkty a merkantil), kontrolu koexistencie GM a non-GM poľnohospodárstva, vysledovateľnosti a cezhraničného pohybu GMO, ďalej v oblasti skúšania odrôd, odrodovej pravosti a čistoty osív a v oblasti molekulárnej detekcie a identifikácie rastlinných patogénov (baktérie, fytoplazmy, huby, vírusy). OMB je akreditované SNAS ako Skúšobné molekulárno-biologické laboratórium (SMBL) podľa ISO/IEC 17025:2005 pre oblasti skúšania odrodovej pravosti a homogenity RK, skúšania GMO a skúšania rastlinných patogénov. OMB je členom ENGL (European Network of GMO Laboratories) od roku 2004 na základe zmluvy EC a ÚKSÚP a je validovaným laboratóriom DG JRC IRMM EC pre spoluprácu s IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) na certifikačných štúdiách CRM v oblasti kvantifikácie DNA. OMB je EPPO direktorátom poverené účasťou v programe zabezpečenia systému kvality diagnostických laboratórií, so zameraním na štandardizáciu postupov validácie diagnostických protokolov (na základe EPPO Database on Diagnostic Expertise). Pôsobí tiež v oblasti plodinového bioterorizmu, nových diagnostických technológií a opatrení biologickej bezpečnosti, ako kontaktný bod EC v SR.

OMB plní koordinačné, metodické, školiace a poradenské úlohy vyplývajúce z pozície NRL vo vzťahu k tuzemským laboratóriám, umožňuje odborné stáže za účelom harmonizácie diagnostických metód a v prípade potreby organizuje porovnávacie testy. Poskytuje odbornú a vedeckú pomoc najmä v prípadoch sporu o výsledok laboratórneho vyšetrenia iných laboratórií.

OMB ako NRL spolupracuje s referenčným laboratóriom spoločenstva (CRL) v oblasti svojej kompetencie, je garantom nových laboratórnych metód a metodických postupov a podieľa sa na validácii skúšobných metód. Národným orgánom poskytuje informácie a vedeckú a technickú pomoc pri zavádzaní koordinovaných plánov kontrol a zúčastňuje sa na odborných rokovaníach k danej problematike na národnej a medzinárodnej úrovni.

V rámci rozsahu akreditácie OMB vykonáva validáciu skúšobných metód (home-validation) podľa IUPAC, validáciu alternatívnych metód podľa ISO 16140 a úplnú validáciu podľa ISO 5725 a IUPAC ako spolupracujúce laboratórium Community Reference Laboratory JRC Ispra v CRL validačnom procese pre oblasť GMO. V období 2004-2007 sa OMB zúčastnilo viacerých proficienčných testov a validačných kruhových testoch. V roku 2007 sa OMB zúčastnilo porovnávacjej a validačnej štúdie GMO detekcie s

použitím DualChip GMO, organizovaného Eppendorf AG a ÚKSÚP, v kruhovom validačnom teste event špecifickej metódy pre identifikáciu a kvantifikáciu eventu 356043 v sóji, organizovanom CRL JRC Ispra a vo validačnom teste PCR detekcie húb *Monilinia fructicola* a *Phytophthora ramorum*, organizovanom LNPV-UMAF, Francúzsko.

Súčasťou tohoto článku je stručná informácia o výsledkoch porovnávacej a validačnej štúdie GMO detekcie s použitím Eppendorf DualChip® GMO metódy, ako alternatívnej metódy na detekciu GMO.

Materiál a metódy

OMB používa na výkon akreditovaných skúšok štandardné skúšobné metódy, ktoré sú validované, alebo sú považované za validované. Metódy pre detekciu a kvantifikáciu GMO sú validované a štandardizované v rámci CRL, ISO a CEN v súlade s medzinárodnými protokolmi ISO, CEN a IUPAC, prípadne CODEX. SMBL ako skúšobné laboratórium typu 2 môže používať aj modifikácie uvedených metód. Modifikácie sa týkajú použitých typov extrakčných metód, primerov, amplifikačných a separačných podmienok, ako aj použitých chemikálií a prístrojovej techniky, ktoré sa však v súčasnosti už dostali na štandardnú úroveň a reprezentujú analytické systémy odporúčané CRL JRC EC a štandardmi ISO a CEN. Modifikácie štandardných metód a alternatívne metódy je potrebné validovať.

Čiastočná validácia metód PCR a real-time PCR pre detekciu GMO (in-house validation) sa uskutočňuje v súlade s IUPAC Technical Report (2), minimálnymi požiadavkami ENGL na analytické metódy pre GMO testy (1), ISO/IEC 17025:2005 a súvisiacimi predpismi. Validácia alternatívnych metód sa uskutočňuje podľa EN ISO 16140:2003 a súvisiacich predpisov.

Pri modifikácii DNA extrakčných metód musia byť dosiahnuté porovnateľné, alebo lepšie parametre extrahovanej DNA, ako pri štandardných a validovaných extrakčných metódach. Pri validácii sa posudzuje najmä koncentrácia izolovanej DNA, fragmentácia izolovanej DNA, čistota DNA a absencia inhibitorov, amplifikovateľnosť cieľovej sekvencie DNA - detekčný limit a dynamický rozsah.

Koncentrácia a fragmentácia extrahovanej gDNA sa v súlade s EN ISO 21571 meria separáciou DNA v gélovej elektroforéze so súbežnou analýzou DNA štandardu so známou koncentráciou a/alebo známym počtom kópií gDNA a spektrofotometricky.

Kvalita extrakcie a purifikácie DNA sa meria pomerom UV absorbancie vzorky napr. pri 260 a 280 nm a použitím spikových kontrol pozitívneho DNA štandardu pri PCR reakcii.

Pri modifikácii PCR metód sa pri validácii posudzuje najmä selektivita metódy, detekčný limit LOD, limit kvantifikácie LOQ pri kvantitatívnych metódach, dynamický rozsah a linearita (v aktuálnych prípadoch), opakovateľnosť metódy a neistota výsledkov (RSDr).

PCR amplifikovateľnosť cieľovej sekvencie DNA, detekčný limit a dynamický rozsah metódy sa stanovujú s použitím lineárneho riedenia DNA extrahovanej z príslušného štandardu CRM v aktuálnom rozsahu, napr. 0, 10, 20, 50, 100 a 200 ng DNA v PCR reakcii, resp. PCR amplifikáciou ekvivalentného počtu kópií gDNA. Špecificita amplifikovaného fragmentu sa kontroluje veľkosťou fragmentu a jeho štiepením špecifickými endonukleázami.

Keďže sa selektivita PCR metód posudzuje v rámci validácie štandardných metód, u modifikovaných metód má význam posudzovať ju iba v prípade modifikácie použitých primerov a/alebo prób. V takomto prípade sa selektivita hodnotí pre aktuálny sortiment GMO eventov pri dostatočnom rozsahu koncentrácií analytu (napr. 0,1-5% rozsah GMO). Špecificita výsledku kvalitatívnej PCR metódy sa kontroluje veľkosťou amplifikovaného fragmentu a jeho štiepením špecifickými endonukleázami, prípadne aj sekvenovaním fragmentu.

Požadovaný detekčný limit GMO na úrovni $\leq 0,1\%$ sa kontroluje použitím príslušného 0,1% GMO CRM a jeho detekciou v 50 ng DNA v PCR reakcii, prípadne PCR amplifikáciou 20, resp. menej kópií gDNA.

Požadovaný detekčný limit kvantifikácie GMO na úrovni $\leq 0,1\%$ sa kontroluje použitím príslušného 0,1% GMO CRM a jeho detekciou v 50 ng DNA/PCR reakciu, prípadne aj súbežnou PCR amplifikáciou 20, resp. menej kópií gDNA v reakcii.

Dynamický rozsah a linearitu modifikovanej kvantitatívnej PCR metódy možno v aktuálnych prípadoch (napr. pri modifikácii primerov a/alebo prób) posúdiť počas real-time PCR analytického behu s použitím kalibračných štandardov CRM pre kvantitatívny obsah GMO. Požiadavkou a kritériom je, aby korelačný koeficient R^2 štandardnej krivky, získaný regresnou analýzou, bol v požadovanom rozsahu rovný alebo väčší ako 0,98 ($R^2 \geq 0,98$).

Stanovenie relatívnej štandardnej odchýlky opakovateľnosti výsledkov testov je významným parametrom charakterizujúcim neistotu meraní. RSDr sa vyráta z výsledkov testov získaných v tom istom laboratóriu, tou istou metódou na tom istom analyzovanom materiáli a tým istým operátorom v krátkom časovom intervale. Požiadavkou je, aby bola RSDr $\leq 25\%$ v celom dynamickom rozsahu metódy.

Validačný proces CRL. Povinnosti a úlohy referenčného laboratória spoločenstva CRL (Community Reference Laboratory) v oblasti validácie metód pre detekciu a kvantifikáciu GMO sú definované v Nariadení (ES) č. 1829/2003. Vedecké posúdenie metód pre testy GMO je založené na informáciách a materiáloch predložených prihlasovateľom GMO a uskutočnené v CRL. CRL testuje a validuje detekčné metódy navrhnuté prihlasovateľom s použitím kontrolných vzoriek dodaných prihlasovateľom. Validačný

proces si vyžaduje účasť externých laboratórií v rámci siete ENGL. Validačný proces pozostáva z nasledovných krokov:

1. Prijatie a registrácia vzoriek a súvisiacej dokumentácie. Po prijatí kompletnej dokumentácie súvisiacej s notifikáciou je prihláška považovaná za platnú a začína plynúť 6-mesačná doba na uskutočnenie validačného procesu.
2. Vedecké zhodnotenie zahŕňa analýzu dokumentácie súvisiacej s metódou a dátami dodanými so vzorkami. Analýza verifikuje či metóda a vzorky spĺňajú požiadavky implementovaných smerníc a umožňujú uskutočniť experimentálne testovanie. Ak prihlasovateľova metóda už bola niekedy validovaná, dokumentácia je posúdená či validačná štúdia bola uskutočnená podľa príslušných medzinárodných štandardov. To prispeje k rozhodnutiu, či je multilaboratórny test potrebný.
3. Experimentálny test metódy uskutočňuje CRL na pretestovanie metódy a dodaných vzoriek, preskúša sa experimentálny dizajn pre kolaboratívnu štúdiu a overí sa adekvátnosť materiálov. Verifikuje sa či metóda spĺňa akceptačné kritériá definované ENGL a či sú dodané vzorky vhodné a v dostatočnom množstve pre testy a kolaboratívnu štúdiu. Experimentálny test (in-house validation) je uskutočnený v CRL iba ak bola metóda predtým už validovaná.
4. Kolaboratívna štúdia zahŕňa detailný postup na organizáciu, uskutočnenie a analýzu metódy v multilaboratórnej štúdiu. Experimentálna práca je kontrahovaná s Európskymi laboratóriami, ktoré majú dostatočné skúsenosti v oblasti a spĺňajú kvalitatívne kritériá.
5. CRL vydáva viacero typov správ: Oficiálnu správu – výsledky sú vyhodnotené a sumarizované pre oficiálne použitie v autorizačnej procedúre; Sumárnu správu – krátky sumár výsledkov hodnotenia; Vedeckú správu – metóda a výsledky testov a validácie metódy sú spracované do vedeckej správy. Táto je predložená oficiálnym členom ENGL po úspešnom validačnom procese; Internú správu – s detailným popisom aktivít CRL, týkajúcich sa konkrétnej notifikácie.

Materiál:

Testované vzorky: pozitívna kontrola CaMV v lineárnom riedení, CRM pre RR Soya, Bt176, MON863, NK603 a GT73 v koncentráciách 0,1 až 5% a negatívne kontroly.

Prístroje a chemikálie: Silverquant scanner Eppendorf, Silverquant SW and data analysis, real-time termocykler ABI7900HT, termocykler Eppendorf Gradient, termomixer, biohazard kabinet, elektroforetické aparatúry s PS Consort, stolné centrifúgy, temperované trepačky, transilluminátor UV, spektrofotometer UV-VIS Unicam, digitálny fotoaparát Olympus, mrazničky, sterilizátory, homogenizátory a bežné laboratórne vybavenie.

Použitá chemikálie: DualChip GMO kit Eppendorf, CRM IRMM, Fluka, extrakčné a analytické systémy od Gibco, Life Technologies a GeneScan.

Metódy:

Porovnávacie štúdia DNA-microarray metódy, ako alternatívnej metódy, a štandardnej PCR metódy na detekciu RR sóje, GM eventov kukurice Bt176, MON863, NK603, repky GT73 a CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), bola realizovaná podľa EN ISO 16140 protokolu.

PCR detekcia GM eventov a CaMV bola uskutočnená podľa akreditovaných štandardných operačných protokolov skúšobného laboratória OMB, ktoré korešpondujú s EN ISO 21571 a EN ISO 21569. Konvenčná PCR metóda pre CaMV detekciu vychádza z GeneScan protokolu pre CaMV. Súbežné testy LOD a linearity konvenčnej PCR metódy dali detekčný limit lepší ako 10 DNA genómových kópií CaMV/PCR reakciu, pri testovaní v rozsahu 3 až 500 DNA kópií v lineárnom riedení. DualChip® GMO Eppendorf DNA-microarray systém, tj. multiplexná PCR, DNA hybridizácia na čipoch, silverquant farbenie DNA hybridizovanej na čipoch, skenovanie čipov a SW analýza výsledkov, bol použitý podľa DualChip® GMO protokolu.

Výsledky a diskusia

Cieľom porovnávej štúdie bolo porovnať DNA-microarray metódu ako alternatívnu metódu so štandardnou kvalitatívnou PCR metódou na detekciu RR sóje, GM eventov kukurice Bt176, RR Soya, MON863 a NK603 a CaMV a vyhodnotiť Eppendorf DualChip® GMO protokol ako alternatívnu metódu v štatistickej štúdiu ako kvalitatívnych metód. Pri štúdiu bolo použitých 16 DNA čipov v troch opakovaniach v spikovom režime s CaMV a 16 vzoriek DNA extraktov GM eventov RR Soya, Bt176, MON863, NK603 a GT73.

Pri štatistickej analýze boli hodnotené pozitívna a negatívna odchýlka, relatívna detekčná úroveň, relatívna citlivosť, relatívna špecificita a konfidenčný interval.

Výsledky získané v porovnávej štúdiu oboch vyššie uvedených metód pre PCR a DNA-microarray detekciu GM eventov s prirodzenou a umelou CaMV kontamináciou DNA extraktov demonštroval, že obe metódy sú porovnateľne presné, citlivé a špecifické. Neboli zistené falošne pozitívne/negatívne výsledky. Avšak vzhľadom limitovanému počtu vzoriek a testov (vzhľadom k vysokej cene microarray čipov) bol dosiahnutý konfidenčný interval relatívne nízky (80-90%). Relatívna presnosť Eppendorf DualChip® GMO metódy, udávaná výrobcom, je 95%.

Záver

Porovnávacia štúdia demonštrovala, že alternatívna DNA microarray Eppendorf DualChip® GMO metóda na detekciu GMO dáva podobné, resp. (v rámci konfidencie) zhodné výsledky ako referenčná štandardná kvalitatívna PCR metóda, preto môže byť po doplňujúcich validačných štúdiách použitá na rutinnú detekciu a identifikáciu GMO.

Literatúra

1. Definition of minimum performance requirements for analytical methods for GMOs testing, (2004), ENGL JRC EC
2. Harmonised guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, (2002), IUPAC Technical Report
3. Validácia metódy – teória a prax, (2006), Slovenská spoločnosť pre priemyselnú chémiu, EURACHEM Slovakia

Adresa autorov:

RNDr. Eubomír Horváth, Mgr. Miroslava Feketová, Mgr. Michaela Hudcová, Oddelenie molekulárnej biológie NRL, ÚKSÚP Bratislava, Hanulova 9/A, 841 01 Bratislava

ZLEPŠENÁ METODA PRODUKCE DIHAPLOIDNÍCH LINIÍ ŘEPKY OZIMÉ AN IMPROVED METHOD FOR PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID LINES OF WINTER OILSEED RAPE

Miroslav KLÍMA – Miroslava VYVADILOVÁ – Vratislav KUČERA

Microspores of three winter rape F1 hybrids were cultivated in the presence of antimetabolic chemicals colchicine, trifluralin and oryzalin to evaluate their effect on frequency of embryo formation, embryo development, plant regeneration and diploidization rate. Ploidy level evaluation of 1709 flowering microspore derived regenerants demonstrated that in vitro treatment with all antimetabolic chemicals increased significantly the rate of doubled haploid (DH) plants. Mean rate of DH plants after application of trifluralin was 85.7 %, colchicine 74.1 % and 66.5 % after application of oryzalin, while the rate of spontaneous diploidization was only 42.3 %. The application of colchicine to in vivo regenerants did not increase the mean rate of DH plants (55.6 %). Although there were no significant differences in diploidization efficiency between in vitro applications of particular antimetabolic agents, trifluralin showed to be the most suitable because of its positive effect on embryo development and conversion. In addition, the diploidization rate was sufficient and stable in all genotypes tested. According to our results, application of trifluralin to microspore culture could be an effective chromosome doubling tool for efficient production of doubled haploid lines from breeding materials of winter oilseed rape.

Key words: antimetabolic agents; Brassica napus; diploidization; microspore culture

Úvod

Metoda mikrosporových kultur je v současné době důležitým prvkem v procesech zaměřených na efektivní produkci výkonných odrůd a tvorbu komponent pro hybridní šlechtění ozimé řepky. Pomocí tohoto postupu lze získat regeneraci z mikrosporových embryí v *in vitro* podmínkách zcela homozygotní genotypy prakticky během jednoho roku a docílit takové kombinace znaků, které jsou tradičními šlechtitelskými postupy obtížně dosažitelné, jako je např. autoinkompatibilita (AI) a 00 kvalita semen (KUČERA et al. 2002; KOPRNA et al., 2005). Uplatnění mikrosporových kultur je ale mnohem širší. Využívají se pro selekce a mutace *in vitro*, genetické analýzy a transformace, časné selekce specifických znaků, stabilizace mezidruhových hybridů apod. Dihaploidní rostliny se po převedení do *in vivo* přemnoží v technické izolaci, testují v polních podmínkách a perspektivní výkonné materiály se následně zařazují do Státních odrůdových zkoušek, případně slouží jako výchozí materiál pro další šlechtění.

I když je dihaploidní systém v současnosti již použitelný k rutinní produkci DH linií u většiny genotypů ozimé řepky, stále existují výrazné rozdíly v embryogenní schopnosti a regeneraci celistvých rostlin mezi jednotlivými testovanými genotypy (SMÝKALOVÁ et al., 2006). Jedním z aspektů, bránících efektivnímu využití mikrosporových regenerantů, je relativně malý podíl spontánních dihaploidů. Aplikace látek zdvojujících chromozomovou sádku je proto nezbytná. Klasickou metodou je ošetření haploidních regenerantů roztokem kolchicinu. Tímto postupem se zvýší podíl dihaploidů až na hodnoty kolem 60 % ve srovnání se spontánní dihaploidizací, která dosahuje pouze 30-40 % (VYVADILOVÁ et al., 1993). Novějším postupem je přidávek kolchicinu přímo do mikrosporových kultur, kterým se zvýší podíl dihaploidů až na 80 – 95 % (WEBER et al., 2005). Přínosem této metody ve srovnání s klasickým postupem je navíc výrazně nižší spotřeba finančně nákladného kolchicinu a eliminace výskytu chimerických rostlin.

Jako perspektivní pro diploidizaci *in vitro* se ukazují další chemické látky na bázi herbicidů s antimetotickým účinkem – trifluralin a oryzalin (ZHAO & SIMMONDS, 1995; HANSEN & ANDERSEN, 1996), které ve srovnání s kolchicinem jsou méně toxické, levnější a efektivně působí i ve výrazně nižších koncentracích.

Cílem experimentů bylo porovnat vliv *in vivo* aplikace kolchicinu a *in vitro* aplikace kolchicinu, trifluralinu a oryzalinu na frekvenci embryogeneze, vývoj embryí a diploidizaci u vybraných genotypů ozimé řepky.

Materiál a metody

Donorové rostliny

Pro odběry mikrospor byl použit jeden F1 kříženec šlechtitelských materiálů - OP-41/1 (OP-BN-07 × SG-C 23), původem z Výzkumného ústavu olejin Opava a dvě F1 hybridní kombinace odrůd - SL-2/04 (Lisek × Stela), SL-3/04 (Stela × Mohican), původem ze šlechtitelské stanice Slapy u Tábora. Donorové rostliny byly po celou dobu odběrů pěstovány v klimatizovaných komorách s fotoperiodou 16/8 h (den/noc), intenzitou osvětlení 84 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, teplotou 22/20°C a pravidelně přihnojovány vícesložkovým hnojivem VEGAFLOR v týdenních intervalech.

Založení mikrosporových kultur

Poupata odpovídající délky, v počtu 40-50 poupat od jednoho genotypu a opakování, s mikrosporami ve středně až pozdně jednojaderném stádiu byla odebírána z terminálních a axilárních větví. Po vyřazení poškozených poupat pod binokulární lupou byla neporušená poupata přenesena do laminárního flowboxu a

povrchovú sterilizovaná 70% ethanolom po dobu 1 minúty a potom 10 minút v 10% roztoku komerčného bieleho SAVO. Nasledovalo dôkladné opláchnutie pupkat v sterilní destilované vode v tŕech pätiminútových cykloch. Extrakce mikroskopov bola provedena opatrným rozdrčením pupkat sklenenou tyčinkou o stěnu kádinky v 3 ml tekutého NLN média (LICHTER, 1982), pŕefiltrováním pŕes dvojité nylonový filtr (pŕůměr ok filtru 100 μ m a 40 μ m) a následně purifikována tŕífázovou centrifugací (10-5-5 minút) pŕi 100 g, spojenou s odsátím supernatantu a doplněním čerstvého NLN média. Nasledovala kultivace mikroskopov v plastových Petriho miskách v NLN médiu s jednotlivými diploidizačními agens – kolchicinem (0,05 %), trifluralinem (10 μ mol) a oryzalinem (1 μ mol). Část mikroskopov (kontrola) byla kultivována v čistém NLN médiu. Hustota byla ve všech variantách upravena na 100 000 mikroskopov/ml. Po 18-ti hodinové inkubaci v termostatu ve tmě pŕi teplotě 30 °C byla provedena jednofázová purifikace mikroskopov centrifugací (5 minút), odstraněním supernatantu a doplněním čerstvého NLN média. Další kultivace v termostatu probíhala z výše uvedených podmínek. Po objevení proembryí, viditelných pouhým okem (cca za 9-12 dní od založení kultury), byly kultury pŕemístěny na tŕepačku (60 RPM) do kultivační místnosti s osvětlením 300 μ mol/m²/s, fotoperiodou den/noc 16/8h a teplotou 25/22 °C. Po 30 dnech od založení kultury byla všechna zelená kotyledonární embrya o minimální délce 2 mm spočítána a pŕepasážována na tuhé diferenciační (DM) médium. Další kultivace probíhala podle standardní metodiky (KLÍMA, 2004) pŕi teplotě 20/18 °C. Po 8-14 dnech byla embrya sejmuta z DM média, 2/3 z obou kotyledonů odříznuta a embrya pŕenesena na tuhé regenerační (RM) médium. Regenerované celistvé rostliny byly pŕepasážovány na MS médium bez růstových regulátorů. Rostliny s vyvinutým kořenovým systémem byly vyjmuty z kultivačních nádob a pod tekoucí vodou opatrně odstraněny zbytky agaru z kořenového systému. Část kontrolních (neovlivněných) rostlin byla kolchicinována postupem publikovaným VYVADILOVOU et al. (1993). Regeneranty byly potom pŕesazeny do provlhčeného půdňního substrátu a dále udržovány v podmínkách shodných s pěstováním donorových rostlin. Po dosažení stádia 4-6 pravých listů byly zakořeněné rostliny jarovizovány po dobu 8 týdnů v jarovizační komoře (fotoperioda den/noc 8/16 hod., světelná intenzita 84 μ mol/m²/s a teplota 4-6 °C).

Jarovizované regeneranty byly pŕesazeny do kontejnerů 19 x 19 cm a pŕemístěny do skleníku s pŕisvětlováním a teplotou den/noc 22 \pm 3/15 \pm 3 °C. Na počátku kvetení byly vyřazovány haploidní regeneranty (se zakrnělými prašňíky) a rostliny s nefunkčními prašňíky. Pŕedpokládané dihaploidní regeneranty byly zaizolovány a samospŕášeny v květu. Jako dihaploidní byly potom započítány pouze rostliny s dostatečnou násadou semen v šešulích.

Výsledky a diskuse

Pŕítomnost sledovaných antimitotických látek v mikroskopových kulturách neměla ani inhibiční ani stimulační vliv na embryogenezi a další vývoj embryí u testovaných genotypů; počty kotyledonárních embryí se u jednotlivých variant statisticky významně nelišily od neovlivněné kontroly (graf 1). Taktě rozdíly v morfologii embryí nebyly významné; embrya ze všech variant i kontrol měla pŕedpoklady pro pŕímou regeneraci v celistvé rostliny.

Hodnocení celkem 1709 kvetoucích regenerantů ukázalo, že *in vitro* aplikace všech testovaných látek zvýšila statisticky významně podíl dihaploidních rostlin ve srovnání s neošetřenou kontrolou (graf 2). Pŕůměrný podíl DH rostlin ze všech tŕi genotypů po *in vitro* ošetření trifluralinem byl 85,7 %, kolchicinem 74,1 % a oryzalinem 66,5 %, zatímco u neošetřené kontroly byl podíl dihaploidů (spontánních) pouze 42,3 % (tab. 1). Dodatečnou aplikací kolchicinu na celistvé rostliny v *in vivo* podmínkách nebylo dosaženo významného zvýšení podílu DH rostlin oproti kontrole, v pŕůměru dosáhl jen 55,6 %. Podíl abnormálních regenerantů (s nefunkčními prašňíky, neschopných samoopylení) byl v pŕůměru vyšší u variant ovlivněných oryzalinem. Nízký byl naopak u variant s kolchicinem a u kontrol.

Pŕestože nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v účinnosti jednotlivých agens na podíl dihaploidních regenerantů, jako nejvhodnější se ukázal trifluralin, vzhledem k tomu, že ošetření mikroskopových kultur touto látkou vyžaduje nižší koncentrace, je méně toxický než kolchicin a ve srovnání s oryzalinem vede k nižšímu procentu abnormálních rostlin. Procento diploidizace pŕi použití trifluralinu bylo vysoké a stabilní u všech testovaných genotypů. Výsledky odpovídají poznatkům, které získali ZHAO & SIMMONDS (1995) aplikací trifluralinu do mikroskopových kultur u odrůdy jarní řepky Topas a u *Brassica oleracea* RUDOLF et al. (1999).

Závěr

Dosavadní výsledky nasvědčují tomu, že účinné látky některých herbicidů, blokující formování mikrotubulárního vřetěnka během mitotického dělení se mohou stát plnohodnotnou, méně toxickou a levnou náhradou doposud běžně používaného kolchicinu a zajistit tak účinnější diploidizaci potenciálně u širokého spektra šlechtitelského materiálu ozimé řepky a výhledově i u dalších zástupců rodu *Brassica*. Tím se upevní role dihaploidního systému jako efektivního postupu, pomocí něhož lze dosáhnout srovnatelných výsledků s tradičními šlechtitelskými postupy, navíc s výhodou urychlení a zkrácení celého procesu šlechtění nových odrůd s požadovanými parametry výnosu a kvality.

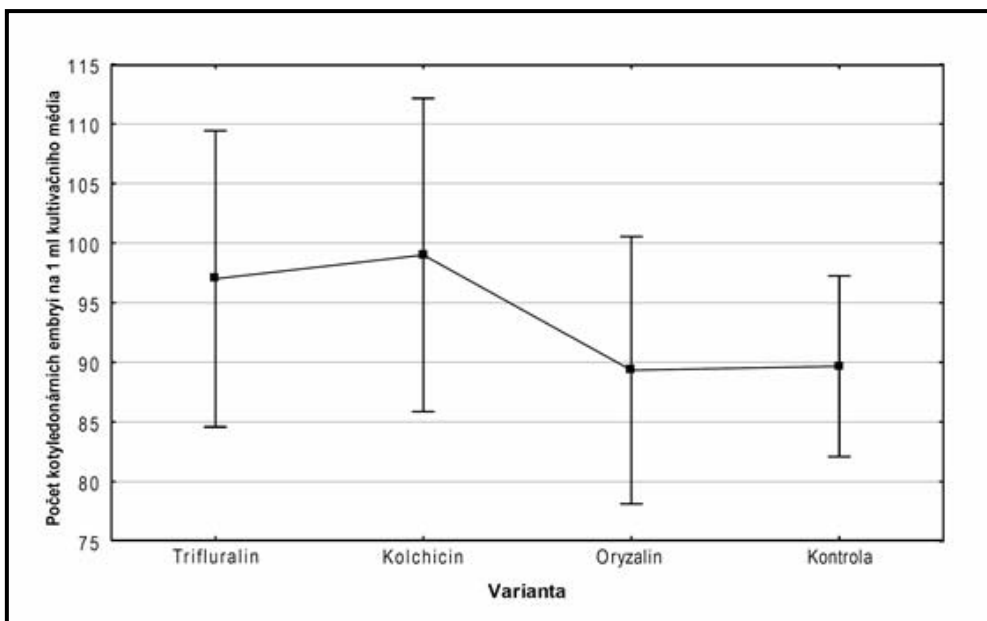
Literatura

- HANSEN, N.J.P. – ANDERSEN, S.B. (1996): *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*, **88**: 156-164.
- KLÍMA, M. – VYVADILOVÁ, M. – KUČERA, V. (2004): Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. *Horticulture Science (Prague)*, **31**: 119 – 123.
- KOPRNA, R. – KUČERA, V. – KOLOVRAT, O. – VYVADILOVÁ, M. – KLÍMA, M. (2005): Development of self-incompatible lines with improved seed quality in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) for hybrid breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **41**: 105–111.
- KUČERA, V. – VYVADILOVÁ, M. – KLÍMA, M. (2002): Utilization of doubled haploids in winter oilseed Rape (*B. napus* L.) breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **38**: 50-54.
- LICHTER, R. (1982): Induction of haploids plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **105**: 427-434.
- RUDOLF, K. – BOHANEK, B. – HANSEN, M. (1999): Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, **118**: 237-241.
- SMÝKALOVÁ, I. – VĚTROVCOVÁ, M. – KLÍMA, M. – MACHÁČKOVÁ, I. – GRIGA, M. (2006): Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the breeding project “Czech Winter Rape”. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **42**: 58-71.
- VYVADILOVÁ, M. – ZELENKOVÁ, S. – TOMÁŠKOVÁ, D. – KOŠNER, J. (1993): Diploidization and cytological control of *Brassica napus* L. haploids. *Rostlinná výroba*, **39**: 129-137.
- WEBER, S. – ÜNKER, F. – FRIEDT, W. (2005): Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment *in vitro* and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding*, **124**: 511-513.
- ZHAO, J. – SIMMONDS, D.H. (1995): Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, **95**: 304-309.

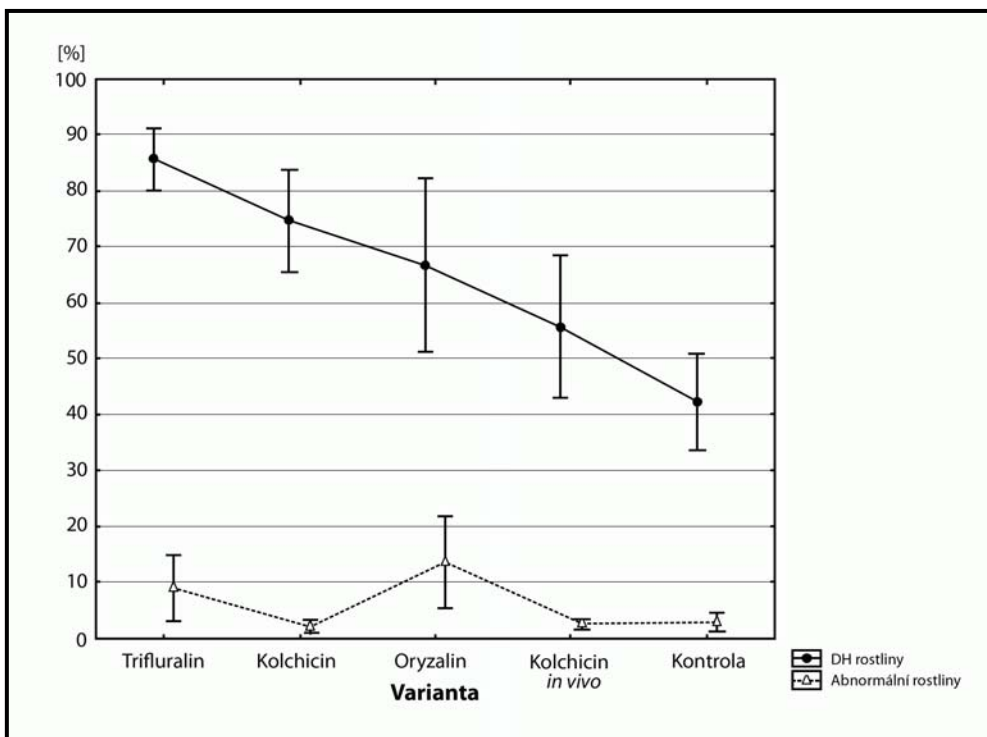
Studie byla podpořena projektem Ministerstva zemědělství České republiky č. 0002700602

Tabulka 1: Procento DH rostlin odvozených po jednotlivých ošetřeních

Genotyp	Opakování Č.	Počet testov. rostlin		Kontrola neošetř. [%]	Kolchicin <i>in vivo</i> [%]	Kolchicin <i>in vitro</i> [%]	Oryzalin <i>in vitro</i> [%]	Trifluralin <i>in vitro</i> [%]
SL-2/04	1	193		19.05	53.33	56.25	32.69	90.70
	2	187		36.59	43.90	88.89	43.75	93.48
	3	154		40.00	22.58	60.00	54.90	81.82
	Celkem	534	Průměr	31.88	39.94	68.38	43.78	88.67
SL-3/04	1	174		61.76	66.67	77.78	72.73	89.29
	2	166		50.00	70.83	70.45	91.67	80.00
	3	220		54.84	75.76	81.63	93.67	71.43
	Celkem	560	Průměr	55.53	71.09	76.62	86.02	80.24
OP-41/1	1	177		36.36	61.11	86.96	75.76	87.50
	2	136		34.48	47.83	68.00	70.00	93.10
	3	302		47.17	58.02	76.92	63.64	83.61
	Celkem	615	Průměr	39.34	55.65	77.29	69.80	88.07
	Celkem	1709	Celkem Průměr	42.25	55.56	74.10	66.53	85.66

Graf 1: Průměrný počet kotyledonárních embryí u jednotlivých variant

Sloupce reprezentují 95% intervaly spolehlivosti

Graf 2: Efektivnost jednotlivých diploidizačních agens a výskyt abnormálních rostlin

Adresa autorů:

Miroslav KLÍMA, Miroslava VYVADILOVÁ, Vratislav KUČERA, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Česká republika, klima@vurv.cz

**VYUŽITIE MOLEKULOVÝCH MARKEROV PRI INTROGRESII ZNAKOV
Z DIVORASTÚCICH DRUHOV SOLANUM DO KULTÚRNYCH FORIEM
ĽUĽKA ZEMIAKOVÉHO (*SOLANUM TUBEROSUM*, L.)
THE USE OF MOLECULAR MARKERS AT INTROGRESSION OF TRAITS
FROM WILD SOLANUM SPECIES INTO CULTIVATED POTATO
(*SOLANUM TUBEROSUM*, L.)**

Ján HELDÁK – Milan BEŽO – Andrea GALLIKOVÁ

Introgression from wild Solanum species is used in potato breeding for the improvement of qualitative and quantitative traits. Molecular markers were employed for early selection of genotypes with desirable introgressed traits. Using the marker GP122₇₁₈ the extreme resistance to PVY was proven to be introgressed from Solanum stoloniferum. None of tested genotypes possessed the extreme resistance to PVY derived from Solanum tuberosum subsp. andigena. Genotypes with extreme resistance to PVX derived from Solanum tuberosum subsp. andigena, Solanum acaule a Solanum vernei were reliably detected by molecular marker M221. The results suggest that the Rx for the extreme resistance to PVX could originate from one source, which was transferred into Solanum tuberosum subsp. andigena, Solanum acaule a Solanum vernei from, or one of primary sources could be any of mentioned wild species. Resistance to wart in tetraploid genotypes was detected by marker NL25. None of markers tested correlated with resistance to nematodes.

Keywords: potato, molecular markers, introgression, resistance

Úvod

Ľuľok zemiakový, ako vegetatívne množená poľnohospodárska plodina podlieha vplyvu patogénov a škodcov s následkami na kvalitu a znižovanie úrody. Rastúce nároky spotrebiteľov, spracovateľského priemyslu a limitované možnosti v súčasnosti uchovávaného genofondu viedli k opätovnému návratu využívania divorastúcich foriem a vyhľadávaniu zdrojov s novými formami rezistencie a kvalitatívne lepším senzorickým vlastnosťami hľúzy ľuľka zemiakového. Klasické šľachtiteľské postupy zahŕňajú introgresiu požadovaných znakov (rezistencia proti patogénom a škodcom, kvalitatívne parametre hľúzy, úrodovtné prvky) z divorastúcich a neadaptovaných genetických zdrojov do nových odrôd opakovaným spätným krížením s rôznymi genotypmi *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* a následnú fenotypovú selekciu na požadovaný znak (ROSS, 1986).

V posledných dvoch dekádach sa začali nové poznatky z molekulárnej biológie intenzívnejšie využívať v procese šľachtienia ľuľka zemiakového. Rezistencia proti viacerým patogénom a škodcom, ktoré boli introdukované z divorastúcich druhov do kultúrnych foriem boli lokalizované na molekulových mapách a charakterizované pomocou molekulových markerov (GEBHARDT, VALKONEN, 2001).

V semenárstve ľuľka zemiakového patrí medzi najškodlivejších patogénov vírus Y zemiaka (PVY). Gény rezistencie boli zistené vo viacerých divorastúcich druhoch, ale najširšie šľachtiteľské využitie našli 3 druhy – *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, *Solanum stoloniferum* a *Solanum chacoense*. Gén *Ry_{adg}* bol lokalizovaný na chromozóme XI a následne bol vyvinutý diagnostický PCR marker (KASAI et al., 2000). Gén *Ry_{sto}* bol na základe analýzy F₁ generácie kríženia rezistentných a náchylných materiálov lokalizovaný na chromozóme XII (FLIS et al., 2005) a testované markery nie vždy korelovali s fenotypovými prejavmi. Gén *Ry_{chc}* bol lokalizovaný na chromozóme IX a širšie uplatnenie našiel v japonských šľachtiteľských programoch (SATO et al., 2006). V šľachtení na rezistenciu proti vírusu X zemiaka (PVX) sa využívali najmä štyri divorastúce druhy: *Solanum acaule*, *Solanum sucrense*, *Solanum vernei* a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Gén extrémnej rezistencie proti PVX pochádzajúci zo *Solanum acaule* – *Rx_{acl}* bol introdukovaný najmä do nemeckých odrôd. Americké, holandské a poľské odrody s extrémnou rezistenciou proti PVX disponujú génom *Rx_{adg}*, pochádzajúcim zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (SWIEŻYNSKI, 1994).

Háďatko zemiakové (*Glodobera rostochiensis*) patrí medzi karanténne činitele v miernom zemepisnom pásme a takmer všetky európske šľachtiteľské programy vyžadujú, aby nové odrody boli rezistentné proti tomuto škodcovi. Rezistencia proti háďatku zemiakovému bola introdukovaná zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, *Solanum vernei* a *Solanum spgazzinii* (ROSS, 1986). Dominantný gén *Gro1* pre rezistenciu proti všetkým známym patotypom *Glodobera rostochiensis* najpravdepodobnejšie pochádza zo *Solanum spgazzinii* a bol lokalizovaný na chromozóme VII. Pomocou markera *Gro1-4* bolo možné detekovať rezistentné genotypy v potomstve z troch rezistentných rodičovských genotypov (GEBHARDT et al., 2006). Zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC11673 pochádza gén *H1*, ktorý je tiež zdrojom rezistencie proti *Glodobera rostochiensis*, patotypu *Ro1* (PINEDA et al., 1993).

Rakovina zemiaka (*Synchytrium endobioticum*) bola popísaná v našich zemepisných šírkach už v 19. storočí. Pre svoj devastujúci účinok na hľuzy ľuľka zemiakového, rezistencia proti rakovine zemiaka sa stala nevyhnutnou podmienkou pre uznanie novej odrody. Gény rezistencie proti rakovine zemiaka boli zistené v *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, *Solanum acaule*, *Solanum sparsipilum* a *Solanum spgazzinii*. V súčasnosti je dostatok genetických zdrojov rezistencie proti rakovine

v kultúrnych formách. Testy rezistencie proti tomuto patogénovi sú komplikované pomerne rozsiahle množstvo patotypov, preto sa hľadajú markery, ktoré by proces hodnotenia zefektívnil a skrátili.

Na rozdiel od tetraploidných foriem kultúrnych odrôd ľuľka zemiakového, väčšina divorastúcich druhov potenciálne využiteľných v šľachtení ľuľka zemiakového, sú diploidy. Na prekonanie bariér vyplývajúcich z rôznych úrovní ploidity sa využívajú dihaploidy indukované divorastúcim druhom *Solanum phureja*. Druhou, veľmi dôležitou a šľachtiteľsky využiteľnou vlastnosťou *Solanum phureja* je vysoko hodnotená chuť a vôňa, ktoré sa stávajú kľúčovými parametrami v šľachtení ľuľka zemiakového. Klony *Solanum phureja* boli z hľadiska senzorických vlastností lepšie hodnotené ako odrody *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*. DNA zo *Solanum phureja* sa stabilne inkorporuje do chromozómu dihaploidov ako koncové alebo medzigénové segmenty. Hľadajú a testujú sa markery pre ich efektívne využitie (CLULOW, RUOSSELLE-BOURGEOIS, 1997).

Cieľom práce bolo zhodnotenie efektívnosti detekcie rezistencie pochádzajúcej z rôznych divorastúcich druhov, potenciálu pre ich ďalšie využitie v šľachtiteľskom procese a možnosti využitia mikrosatelitných markerov pre identifikáciu medzigénových segmentov DNA pochádzajúcich zo *Solanum phureja* v dihaploidných klonoch.

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

Tetraploidné genotypy ľuľka zemiakového s rezistenciou proti PVX, PVY, háďatku zemiakovému, patotypu Ro1, náchylné genotypy k uvedeným patogénom a škodcom a vybrané dihaploidné genotypy získané z génovej banky VŠÚZ - Výskumného a šľachtiteľského ústavu zemiakárskeho, a.s., Veľká Lomnica sa rozmnožili v podmienkach *in vitro*. Listy rastlín, kultivovaných 5 týždňov v podmienkach *in vitro*, sa použili na analýzy.

Detekcia rezistencie proti PVY, PVX, háďatku zemiakovému, patotypu Ro1 a rakovine zemiaka pomocou molekulových markerov.

Z jednotlivých genotypov ľuľka zemiakového sa vyzolovala DNA a použila na detekciu odrôd s extrémnou rezistenciou proti PVY a PVX. V PCR reakciách sa použili markery GP122₇₁₈ (FLIS et al., 2005) pre *Ry_{sto}* a M221 (KANYUKA et al., 1999) pre *Rx*. Rezistentné a náchylné genotypy k háďatku zemiakovému boli analyzované pomocou markerov CP113 (NIEWÖHNER et al., 1995) a Gro1-4 (GEBHARDT et al., 2006) a k rakovine zemiaka pomocou markera NI25 (GEBHARDT et al., 2006).

Detekcia inergénových úsekov DNA pochádzajúcich zo Solanum phureja.

Pre analýzu dihaploidných klonov sa použili markery STINHWI, ST13ST (CLULOW, RUOSSELLE-BOURGEOIS, 1997).

Amplifikácia prebiehala v 25 µl reakčnej zmesi obsahujúcej 30 ng genomickej DNA, 2,5 mM MgCl₂, 0,3 mM z oboch prajmerov, 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 prajmera 60 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 ethidium bromidom. Malé PCR produkty sa delili v nativných PAGE géloch a farbili striebrom.

Výsledky a diskusia

Pre detekciu extrémnej rezistencie proti PVY bolo navrhnutých a overovaných niekoľko markerov. Gén rezistencie pochádzajúci zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* bol spoľahlivo detekovaný pomocou markera RYSC3 (KASAI et al., 2000). V našom súbore 70 genotypov sa nezistil ani jeden, ktorý by mal extrémnu rezistenciu proti PVY pochádzajúcu zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Prítomnosť génu *Ry_{sto}* v odrodách White Lady, San, Fanal, Forelle, Boda, Bobr a Bettina bola už pomocou molekulových markerov potvrdená (HELDÁK et al., 2006). Z 22 odrôd vyšľachtených na Slovensku mala extrémnu rezistenciu proti PVY pochádzajúcu zo *Solanum stoloniferum* len jedna odroda - Alva. Pomocou rovnakých markerov bola extrémna rezistencia proti PVY pochádzajúca zo *Solanum stoloniferum* zistená aj v ďalších 24 genotypoch, ktoré pochádzali z výskumných projektov zameraných na získavanie genetických materiálov s extrémnou rezistenciou proti PVY.

Rovnaké spektrum genotypov sa analyzovalo s použitím markera M221 pre detekciu *Rx*. Výsledky PCR analýz potvrdili prítomnosť markera M221 vo všetkých genotypoch s extrémnou rezistenciou proti PVX. Odrody Atlantic, Jemseg a Saco, ktorých extrémna rezistencia pochádza zo *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, odrody Saphir a Roeslau, ktorých rezistencia pochádza zo *Solanum acaule* a odrody Darwina, Produzent a Santé, ktorých rezistencia pochádza zo *Solanum vernei* (SWIEŻYNSKI, 1994) boli spoľahlivo detekované rovnakým markerom. Tým istým markerom sa zároveň spoľahlivo identifikovali genotypy s extrémnou rezistenciou proti PVX, o ktorých nie sú k dispozícii informácie o pôvode ich extrémnej rezistencie proti PVX. Teda všetky genotypy, bez ohľadu, z ktorého divorastúceho druhu pochádzajú, majú gén extrémnej rezistencie asociovaný s markerom M221. Marker M221 zároveň predstavuje takú časť génu ľuľka zemiakového, ktorá sa prenáša do potomstva spolu s *Rx*. Výsledky naznačujú, že gén *Rx* pre extrémnu rezistenciu proti PVX mohol pochádzať z jedného zdroja, z ktorého sa hybridizáciou preniesol do

Solanum tuberosum subsp. *andigena*, *Solanum acaule* a *Solanum vernei*, prípadne jedným z primárnych zdrojov extrémnej rezistencie proti PVX mohol byť aj niektorý z uvedených divorastúcich druhov.

Zo 70 genotypov analyzovaných obomi markermi pre extrémnu rezistenciu proti PVY aj PVX len 9 genotypov malo extrémnu rezistenciu proti obom vírusom potvrdenú aj pomocou molekulových markerov. Genotypy s extrémnou rezistenciou proti obom významným vírusom – PVY a PVX – sa do potomstva prenášajú nezávisle (HELDÁK et al., 2006) a majú vyšší potenciál pre ďalšie šľachtiteľské využitie.

Gény pre extrémnu rezistenciu proti vírusom zabezpečujú efektívnu ochranu proti všetkým kmeňom vírusov a preto sa v šľachtení ľuľka uprednostňujú pred hypersenzitívnou reakciou N génov, ktorá býva obyčajne kmeňovo špecifická. Gén *Ry_{sto}* zabezpečuje ochranu proti všetkým kmeňom PVY vrátane kmeňa spôsobujúceho nekrotickú krúžkovitosť hlúz ľuľka zemiakového PVY^{NTN} (LeROMANCER, NEDELLEC, 1997). Gén extrémnej rezistencie proti PVX je efektívny proti všetkým izolátom PVX s výnimkou kmeňovej skupiny 4, o ktorej je známe, že prekonáva Rx (QUERCI et al., 2005), ale takéto kmene sa doteraz mimo Južnej Ameriky vyskytli len dvakrát (ROSS, 1986).

Pomocou prajmerov pre marker CP113 bolo analyzovaných 10 rezistentných genotypov (Accent, Bettina, Cicero, Cinja, Impala, Viola, Dali, Solara, Victoria, Santé) proti *Glodobera rostochiensis*, patotypu *Ro1* a 10 náchylných genotypov (Desirée, Fambo, Provento, Lipta, Eta, Lipa, Lomnica, Vivaldi, Monalisa, Provento). Nebol zistený polymorfizmus, ktorý by koreloval s rezistenciou proti *Glodobera rostochiensis*, patotypu *Ro1*. SKUPINOVÁ et al. (2002) zistila pomocou markera CP113 veľmi dobrú koreláciu medzi markerom a genotypmi s *H1* alelou v protiklade k výsledkom NIEWOHNERA et al. (1995), kde marker pre detekciu alely *H1* bol efektívny len v 4 odrodách zo 136 testovaných. Aj keď marker Gro1-4 bol použiteľný pre selekciu rezistentných genotypov v diploidných populáciách, v našich tetraploidných genotypoch sa rezistentné materiály doteraz identifikovať nepodarilo.

Marker NL25, ktoré je asociovaný s génom rezistencie *Sen1*, bol prítomný vo všetkých testovaných genotypoch s rezistenciou proti rakovine zemiakovej, patotypu *D1*. Aj pri hodnotení rezistencie proti rakovine zemiaka budú pomery zrejme zložitejšie, pretože marker NL25 bol prítomný aj v odrode Livera, ktorý je v slovenskom katalógu hodnotený bonitačným stupňom 7. Toto zistenie môže súvisieť aj s možnosťou, že v testoch rezistencie proti rakovine zemiaka bola použitá zmes viacerých patotypov, voči ktorým odroda Livera nebola rezistentná.

Banka genetických zdrojov VŠÚZ - Výskumnom a šľachtiteľskom ústave zemiakárskom bola v priebehu posledných 20 rokov postupne dopĺňovaná cennými materiálmi z novošľachtienia a z riešenia výskumných úloh zameraných na rezistenciu proti patogénom. Väčšina materiálov s rezistenciou proti patogénom a škodcom bola pred vložením do génovej banky testovaná len na jedného patogéna, prípadne škodcu. Molekulové markery umožnili presnejšiu charakterizáciu genetických zdrojov z hľadiska prítomnosti jednotlivých alieli pre rezistenciu proti PVY a PVX. Pre detekciu rezistencie proti hädátke zemiakovému pomocou molekulových markerov bude potrebné overiť aj iné typy markerov, nakoľko doteraz overované markery neboli vhodné pre šľachtiteľské využitie. Marker *Sen1* má diagnostický potenciál pre selekciu genotypov s rezistenciou proti rakovine zemiaka, patotypu *D1* a je využiteľný v šľachtení ľuľka zemiakového.

Indukcia dihaploidov a ich spoľahlivá detekcia sú základným predpokladom pre použitie v šľachtení, pri genetických analýzach, mapovaní genómu a štúdiách expresie génov (CLULOW, RUOSSELLE-BOURGEOIS, 1997). V našej práci boli použité dihaploidy a tetraploidy pre zistenie prítomnosti DNA z diploidného induktora. Výsledkom amplifikácie DNA boli produkty o veľkosti 176 a 158 bp delené v PAGE géloch. Oba PCR produkty, ktoré boli prítomné v *Solanum phureja*, boli prítomné aj v ďalších troch dihaploidoch (DH2, DH8, DH16). Len jeden produkt bol prítomný v ďalších piatich dihaploidoch. Produkt o veľkosti 176 bp bol prítomný aj v tetraploidnej odrode Livera, ktorá bola vyšľachtená z kríženia dihaploida Lü 74417/102, odvodeného zo *Solanum phureja* a kríženca LH 168. V žiadnej z ďalších tetraploidných odrôd, ktoré boli analyzované pomocou markera STINHWI nebol prítomný ani jeden z PCR produktov, charakteristických pre *Solanum phureja*. Druhý marker ST13ST nebol zistený v žiadnom z dihaploidov, ale ani v *Solanum phureja*, čo môže súvisieť s rozdielnym pôvodom *Solanum phureja*. Každopádne, introgresia DNA zo *Solanum phureja* do genómu dihaploidov je viac rozšírená ako sa predpokladalo (CLULOW, RUOSSELLE-BOURGEOIS, 1997) a naše výsledky preukázali, že DNA z induktora je možné markerom STINHWI preukázať aj v tetraploidnom potomstve.

Záver

Introgresia nových génov z divorastúcich foriem do kultúrnych genotypov ľuľka zemiakového bude mať naďalej veľmi významné postavenie v šľachtení nových odrôd, najmä z hľadiska obsahových látok, ktoré majú významné postavenie vo výžive a ochrane zdravia obyvateľstva. Nemenej dôležité budú znaky, ktoré súvisia s pestovaním v zmenených agroekologických podmienkach ako je rezistencia proti patogénom, škodcom a stresovým podmienkam pestovania. V nadväznosti na tieto šľachtiteľské ciele budú mať významnejšie postavenie molekulové markery, ktoré zefektívnia proces selekcie genotypov so žiaducimi vlastnosťami. Markery GP122₇₁₈, M221 a *Sen1* boli overené na 9 populáciách kríženia výsledky potvrdili, že sa môžu v priamej selekcii v novošľachtení ľuľka zemiakového aplikovať. Druhá časť, hlavne polygénne založených znakov, si bude vyžadovať ešte veľa úsilia nielen pre získanie spoľahlivých selekčných

markerov, ktoré budú jednoznačne identifikovať požadovaný znak, ale bude potrebné aj objasniť interakcie polygénne založených znakov so zmenami prostredia.

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

Literatúra

1. CLULOW, S. A. – ROUSSELLE-BOURGEOIS, F. 1997. Widespread introgression of *Solanum phureja* DNA in potato (*S. tuberosum*) dihaploids. In: Plant Breeding, 1997, 116, s. 347 – 351.
2. FLIS, B. – HENNIG, J. - STRELZYK-ZYTA, D. – GEBHARDT, C. – MARCZEWSKI, W. 2005. The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant cultivars. In: Molecular Breeding, 2005, 15, s. 95 – 101.
3. GEBHARDT, C. – VALKONEN, J.P.T. 2001: Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. In: Ann. Rev. Phytopathol., 2001, 39, s.79–102.
4. GEBHARDT, C. – BELLIN, D. – HENSELEWSKI, H. – LEHMAN, W. – SCHWARZFISCHER, J. – VALKONEN, J.P.T. 2006. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. In: Theor. Appl. Genet., 2006, 112, s.1458 – 1464.
5. HELDÁK, J. - BEŽO, M. - ŠTEFÚNOVÁ, V. - DEBROVÁ, K. - FORIŠEKOVÁ, K. - GALLIKOVÁ, A. 2006. Analýza génov rezistencie proti vírusu Y zemiaka (PVY) a vírusu X zemiaka (PVX) v genetických zdrojoch ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum*, L.) pomocou molekulových markerov. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z 13. vedeckej konferencie, 14.-15.11.2006, Piešťany: SCPV – VÚRV, s.39-42.
6. KANYUKA, K. – BENDAHMANE, A. - ROUPPE VAN DEN VOORT, J.N.A.M. – VAN DER VOSSSEN, E.A.G. - BAULCOMBE D.C. 1999. 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., 1999, 98, s. 679 – 689.
7. KASAI, K. - MORIKAWA, Y. - SORRI, V.A. - VALKONEN, J.P.T. - GEBHARDT, C. - WATANABE, K.N. 2000: Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. In: Genome, 2000, 43, s. 1-8.
8. Kang B.-C., Yeam I., Jahn M.M. (2005): Genetics of plant virus resistance. Annu. Rev. Phytopatol., 43:581-621.
9. LEROMANCER M. - NEDELLEC M. 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). In: Plant Pathology, 1997, 46, s.104 - 111.
10. NIEWOHNER, J. - SALAMINI F. – GEBHARDT, C. 1995. Development of PCR assay diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *Gro1* and *H1* conferring resistance to the root cyst nematode *Globobera rostochiensis* in potato. In: Molecular breeding, 1995, 1, s. 57 - 78.
11. PINEDA, O. – BONIERBALE, M.W. – PLAISTED, R.L. – BRODIE, B.B. – TANKSLEY, S.T. 1993. Identification of FRLP markers linked to *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode (*Globobera rostochiensis*). In: Genome, 1993, 36, s.152–156.
12. QUERCI, M. – BAULCOMBE, D. C. – GOLDBACH, R. W. – SALAZAR, L. F. 1995. Analysis of the resistance-breaking determinants of potato virus X (PVX) strain HB on different potato genotypes expressing extreme resistance to PVX. In: Phytopathology, 1995, 85, s. 1003 – 1010.
13. RITTER, E. – DEBENER, T. – BARONE, A. – SALAMINI, F. - GEBHARDT C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). In: Mol. Gen. Genet., 1991, 227, s. 81-85.
14. ROSS H. 1986. Potato breeding. Problems and perspectives. In: Advances in Plant Breeding. (Suppl. 13 J. of Plant Breed.), Eds: HORN V. - RÖBBELEN G. Berlin: Paul Parey.
15. SATO, M. – NISHIKAWA, K. – KOMURA, K. – HOSAKA, K. 2006. Potato virus Y resistance gene, *Ry_{chc}*, mapped to distal end of potato chromosome 9. In: Euphytica, 2006, 149, s. 367-372.
16. ŚWIEŻYŃSKI K.M. 1994: Inheritance of Resistance to Viruses. In: BRADSHAW J.E. - MACKAY G.R. Potato Genetics. Wellington: CAB International University Press, 1994, s. 339 – 364.

Adresa pracoviska autorov:

Ing. Ján Heldák, PhD., VŠÚZ - Výskumný a šľachtiteľský ústav zemiakársky, a.s., Popradská 518, Veľká Lomnica, PSČ 05952, heldak@sinet.sk

Prof. RNDr. Milan Bežo, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, PSČ 94976, Milan.Bežo@uniag.sk

Ing. Andrea Galliková, VŠÚZ - Výskumný a šľachtiteľský ústav zemiakársky, a.s., Popradská 518, Veľká Lomnica, PSČ 05952, gallikova@vsuz.sk

METODY IZOLACE PYLOVÝCH ZRN *CUCUMIS* SPP. (*C. SATIVUS*, *C. MELO*) VYUŽITELNÉ PŘI *IN VITRO* OPYLOVÁNÍ

METHODS OF ISOLATION OF *CUCUMIS* SPP. POLLEN GRAINS (*C. SATIVUS*, *C. MELO*) AND THEIR UTILIZATION IN *IN VITRO* POLLINATION

Dagmar SKÁLOVÁ – Božena NAVRÁTILOVÁ – Aleš LEBEDA

Aim of this study is optimization methods of isolation Cucumis spp. pollen grains. These isolated pollen grains can be utilized for in vitro pollination within the genus Cucumis. This type of pollination is useful for interspecific hybridization to transfer some specific genes for various resistances from wild Cucumis spp. genotype to cucumber genotype. Successful interspecific hybridization will be used in cucumber breeding. The main influence to pollen grains has type of isolation, type of isolation (washing) solution, type of cultivation media and others. For these experiments were used two accessions of Cucumis spp. – C. sativus and C. melo. Three types of isolations, three types of isolation (washing) solutions and two types of cultivation media for pollen grains of these two accessions were tested. There were observed percentages of pollen grains viability, of occurred pollen tubes and arisen embryos (embryo-rescue cultures). Various methods of isolation were compared and their utilization for successful in vitro pollination was evaluated.

Key words: Cucumis spp., isolations of pollen grains, in vitro pollination, interspecific hybridization, cultivation media, embryo-rescue

Úvod

In vitro opylování je součástí souboru metod explantátových kultur. Tato biotechnologická metoda je využitelná při překonání řady prezygotických i postzygotických bariér vznikajících při interspecifické hybridizaci vzájemně se nekřížitelných druhů (např. rozdílný počet chromozómů; ONDŘEJ a kol., 2002). Okurka setá (*Cucumis sativus*) z čeledi Cucurbitaceae je jednou z hospodářsky nejvýznamnějších rostlin, ale jako většina kulturních plodin je i ona napadána mnoha škůdci a chorobami. Geny pro rezistenci vůči nim se velmi často nacházejí v genofondu planých druhů rodu *Cucumis* (LEBEDA a kol., 2007). Interspecifická hybridizace může u tohoto rodu vyřešit problematiku rezistence a obohacení genové diverzity (přenesením vhodných genů z genofondu planých druhů do genofondu okurky seté; SKÁLOVÁ a kol., 2007). Izolovaná zralá vajíčka a pylová zrna jsou kultivována na médiích podporujících růst pylových láček. Po *in vitro* opylování může dojít k oplození a vzniklá embrya jsou poté přenesena na média podporující embryogenezi a samotnou organogenezi (metoda embryo-rescue; embryokultury). Cílem tohoto pokusu bylo porovnat různé metody izolace pylových zrn a jejich následné využití pro *in vitro* opylování (vnitrodruhové i mezidruhové).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Pro *in vitro* opylování byly použity rostliny *Cucumis sativus* (Stela F1, 09H390744) a *C. melo* (09H400596). Byla odebrána poupata samičích květů *C. sativus* a samčích květů *C. sativus* a *C. melo*. Tato poupata byla povrchově desinfikována (1 min v 70% EtOH; 10 min v 2,5% chloraminu; 3x promytí ve sterilní vodě) a kultivována na ½ MS-médiu (MURASHIGE a SKOOG, 1962) po dobu 3 dnů (termostat, 25 °C).

Izolace pylových zrn, *in vitro* opylování

Pro izolaci pylových zrn byly použity tři promývací roztoky (NLN, YST a VB; Tab. 1) a tři metody izolace pomocí centrifugace (metoda a, b, c; Tab. 1). Purifikovaná pylová zrna byla rozmístěna na a okolo zralých vajíček (Obr. 2a). Jejich kultivace a následné *in vitro* opylování probíhalo na dvou kultivačních médiích: YS (ONDŘEJ a kol., 2002) a CP (CASTANO a DE PROFT, 2000) (termostat, 25 °C). Bezprostředně po izolaci pylových zrn byla hodnocena jejich životnost a počet pylových láček (hodnocení probíhalo na médiu YS pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus "BX60" s filtrem BW a fluorescein diacetátu; Tab. 2; Obr. 2b, c).

Embryokultury

Po třech dnech kultivace vajíček a pylových zrn na médiích YS a CP byl hodnocen vývoj vajíček, případně vznik embryí (Tab. 2). Vytvořující se vajíčka a vzniklá embrya byla přenesena na média podporující embryogenezi (SKÁLOVÁ a kol., 2006) a byla umístěna do kultivační místnosti (22 °C / 18 °C ; 16 h den/ 8 h noc - perioda; 32 – 36 μmol · m⁻² · s⁻¹).

Výsledky a diskuse

V experimentech týkajících se *in vitro* opylování u rodu *Cucumis* byly testovány tři metody izolací pylových zrn pomocí centrifugace (metoda a, b, c); tři promývací roztoky (NLN, YST, VB) a dvě kultivační média pro izolovaná vajíčka a pylová zrna (YS a CP). Výsledky jsou sumarizovány v Tab. 2 a Obr. 1. Po *in vitro* opylování docházelo k vývoji vajíček (vajíčka se zvětšovala, zelenala) nebo ke vzniku embrya, jehož vývoj se zastavil v rané fázi (Obr. 2f). Jako nejvyšší stupeň regenerace byl zaznamenán vznik kalusu z embryí (Obr. 2d, e). Naše experimenty pokračují, zatím nebyly získány rostliny.

Z porovnání životnosti pylových zrn po všech variantách jejich izolace (metody a, b, c; promývací roztoky NLN, YST, VB) vyplývá, že pro *C. sativus* byl nevhodnější promývací roztok VB a metoda izolace „c“ (79 %). Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky již publikovanými (CASTANO a DE PROFT, 2000). Promývací roztok NLN a metoda „a“ byla nevhodnější pro *C. melo* (68 %).

U obou druhů se ukázalo, že vhodnou metodou izolace pylových zrn pro následný růst pylových láček je metoda „a“. Nejvyššího průměrného počtu pylových láček bylo dosaženo u promývacího roztoku YST v případě *C. sativus* (2,9%) a u roztoku NLN u *C. melo* (12,4%).

Nejvyšší procento regenerace oplozených vajíček (tj. růst vajíčka; vznik embrya, kalusu) bylo u *C. sativus* pozorováno v případě pylových zrn izolovaných v roztoku NLN, metodou „b“, kultivovaných na médiu YS (65%). Nejlepší regenerace u *C. melo* bylo dosaženo v případě pylových zrn izolovaných v roztoku VB, metodou „b“, kultivovaných na médiu CP (66%).

Pylová zrna *C. sativus* prokazovala obecně vyšší průměrnou životnost (72%) než pylová zrna *C. melo* (61%). Na druhou stranu, pylová zrna *C. melo* vykazovala větší průměrnou aktivitu v růstu pylových láček (7,1%), než pylová zrna *C. sativus* (0,8%). Počet regenerací (růst vajíček; vznik embryí, kalusů) byl vyšší v případě mezidruhového *in vitro* opylování *C. sativus* × *C. melo* (44%). U vnitrodruhového *in vitro* opylování *C. sativus* byl počet regenerací nižší (29%).

Zvolené metody izolace pylových zrn pomocí centrifugace byly úspěšné. Metoda „a“ (drcení prašníků a trojnásobná centrifugace) byla vhodná pro získání nejvyššího počtu životných pylových zrn a následně i vyššího procenta růstu pylových láček. Jednoduché složení promývacího roztoku YST a kultivačního média YS mělo pozitivní vliv na kultivaci pylových zrn (u YST vysoké procento životnosti, u YS poté vyšší procento růstu pylových láček). Pozitivní vliv na životnost pylových zrn měly ale i další promývací roztoky (NLN i VB). Kultivační médium CP, které obsahovalo caseinhydrolyzát, poskytovalo vhodné podmínky pro vznik embryí a následně i tvorbu kalusů. Tvorba kalusu byla nejvyšším získaným stupněm regenerace po *in vitro* opylování (velikost kalusu max. 1mm). Ke stejným výsledkům dospěl i ONDŘEJ a kol., 2002.

Na zdokonalení metodiky se bude nadále pracovat (využití polyploidizace pomocí kolchicinu, jako v případě *in vivo* opylování u rodu *Cucumis*, SKÁLOVÁ a kol., 2006).

Závěr

Vybrané metody izolace pylových zrn pomocí centrifugace se výrazně neliší. Velký vliv na *in vitro* opylování má především kvalita pylových zrn (jejich zralost, množství a stav květů, stav donorových rostlin). Vysoká procenta životnosti pylových zrn se vyskytují u izolací ve všech promývacích roztocích metodami „a“ a „c“. Metoda „b“ byla pro získání životných pylových zrn nejméně vhodná. Kultivační médium YS i promývací roztok YST mají pozitivní vliv na růst pylových láček. Vyšší procento vzniklých embryí se na druhou stranu objevuje na kultivačním médiu CP u pylových zrn izolovaných metodou „b“. Nejvyšším dosaženým stupněm regenerace byl vznik kalusu (průměrná velikost 1mm). Zdokonalení této metodiky může výrazně přispět k pokrokům ve šlechtitelství tykvovitých rostlin.

Literatura

1. CASTANO, C.I. - DE PROFT, M.P.: 2000. *In vitro* pollination of isolated ovules of *Cichorium intybus* L. In: *Plant Cell Rep.*, vol. 19, pp. 616-621.
2. LEBEDA, A. - WIDRLECHNER, M.P. - STAUB, J. - EZURA, H. - ZALAPA, J. - KRÍSTKOVÁ, E.: 2007. Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.), Chapter 8. In: R. Singh (ed) Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series, Volume 3 – Vegetable Crops. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 271-376.
3. LICHTER, R.: 1981. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. In: *Z. Pflanzenphysiol.*, vol. 103, pp. 229 – 237.
4. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: 1962: A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. In: *Plant Physiol.*, vol. 15, pp. 473-497.
5. ONDŘEJ, V. - NAVRÁTILOVÁ, B. - TARKOWSKI, P. - DOLEŽAL, K. - LEBEDA, A.: 2002. *In vitro* pollination as a tool of overcoming crossing barriers between *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. In: *Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comeniana Bot.*, Vol. 41, pp. 81-88.
6. SKÁLOVÁ, D. – DZIECHCIARKOVÁ, M. - LEBEDA, A. - NAVRÁTILOVÁ, B. – KRÍSTKOVÁ, E.: 2007. Interspecific hybridization of *C. anguria* × *C. zeyheri*, *C. sativus* × *C. melo* and *C. sativus* × *C. metuliferus* with the use of embryo cultures. In: *Acta Hort.*, vol. 731, pp. 77-82.
7. SKÁLOVÁ, D. – NAVRÁTILOVÁ, B. – LEBEDA, A. – GASMANOVÁ, N.: 2006. Embryo culture as a tool of interspecific hybridization of *Cucumis sativus* and wild *Cucumis* spp. In: Holmes, G. (Ed.): Cucurbitaceae 2006. North Carolina State University, Raleigh (NC, USA), 2006, pp.51-59.
8. VIŽINTIN, L – BOHANEK, B.: 2004. In vitro Manipulation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Pollen and Microspores: Isolation Procedures, Viability Tests, Germination, Maturation. In: *Acta Biol. Cracov. Series Bot.*, vol. 46, pp. 177-183.

Tabulka 1: Promývacie roztoky a metódy izolácie pylových zrn pro *in vitro* opylování

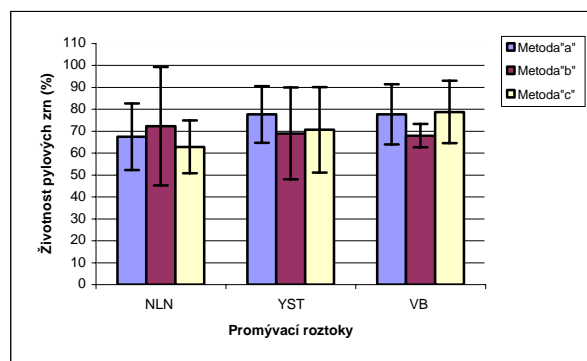
Izolační roztoky	NLN modifikovaný NLN roztok (LICHTER, 1981)	YST modifikovaný YST roztok (ONDŘEJ a kol., 2002)	VB modifikovaný VB roztok (VIŽINTIN a BOHANEČ, 2004)
Izolační metody	„a“ rozdrcení prašníků skleněnou tyčinkou v prom. roztocích; 3x filtrace a centrifugace při 900 rpm (10-5-5 min)	„b“ rozdrcení prašníků skleněnou tyčinkou v prom. roztocích; centrifugace při 500 rpm (5 min), filtrace a centrifugace při 1000 rpm (3 min)	„c“ rozdrcení prašníků v prom. roztocích sterilní žiletkou; centrifugace shodná s metodou „b“

Tabulka 2: Porovnání životnosti, průměrného počtu pylových láček a počtu regenerací u *in vitro* opylování *Cucumis* spp.

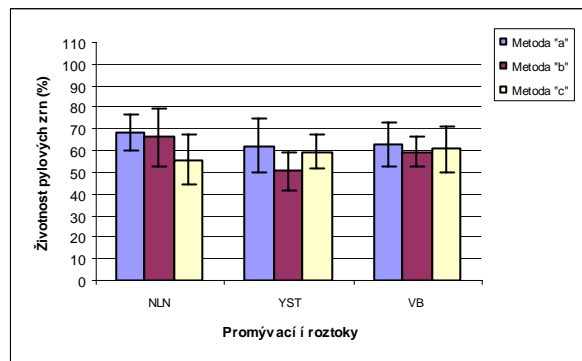
Izolovaná pylová zrna <i>Cucumis</i> spp. ♂	Počet izolovaných vajíček <i>C. sativus</i> ♀	Průměrná životnost pylových zrn <i>Cucumis</i> spp. (%)*	Průměrný počet pylových láček u pylových zrn <i>Cucumis</i> spp. (%)*	Počet regenerací po <i>in vitro</i> opylení u <i>Cucumis</i> spp. **	
				YS-médium	CP-médium
<i>C. sativus</i>	1080	72 (±16)	0,8	45 E 118 V	56 E 92 V
				Σ 311 (29%)	
<i>C. melo</i>	900	61 (±11)	7,1	50 E 124 ZV	55 E 164 ZV
				Σ 393 (44%)	

*hodnoceno na YS-médium; bezprostředně po izolaci pylových zrn

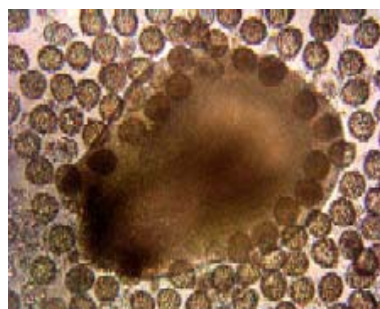
**hodnoceno po 3 dnech kultivace ♀ s ♂ na médiích YS a CP, poté přesazeno na média podporující embryogenezi; E – vznik embrya (1mm; v některých příp. výskyt kalusu), V – vývoj vajíčka (do 1mm; růst, zelenání)



Obr. 1a



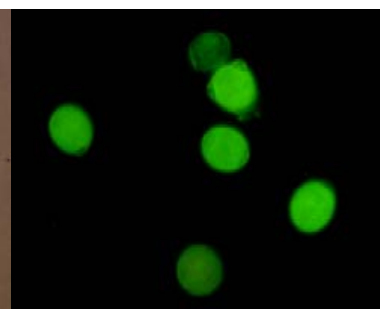
Obr. 1b

Obr: 1a-b Průměrná životnost pylových zrn po izolaci u *C. sativus* (1a) a *C. melo* (1b)

Obr. 2a



Obr. 2b



Obr. 2c



Obr. 2d

Obr. 2e

Obr. 2f

Obr. 2a-f Rozmístění izolovaných pylových zrn na a okolo vajíček (2a); rostoucí pylová láčka (2b); životná pylová zrna (2c); vznik kalusu po *in vitro* opylování (2d,e); vznik embrya po *in vitro* opylování (2f)

Poděkování:

Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR, MSM 6198959215 a Ministerstva zemědělství ČR, NAZV 4108.

Adresa autorov:

RNDr. Dagmar Skálová, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice; dagmar.skalova@upol.cz

RNDr. Božena Navrátilová, PhD., Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice; bozena.navratilova@upol.cz

Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc., Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice; ales.lebeda@upol.cz

VLIV PŘEDKULTIVACE NA KRYOKONZERVACI CHMELE INFLUENCE OF PRETREATMENT ON HOP CRYOPRESERVATION

Petr SVOBODA¹ – Miloš FALTUS²

*In our experiments we compared different pretreatment on hop (*Humulus lupulus*, L.) cryopreservation. We evaluated impact of 0.75 M sucrose and 60 % polyethylene glycol together with low temperature treatment on survival and regeneration of hop plant after cryopreservation. We found out that pretreatment by both osmotic components had significant effect on an improvement of survival and plant regeneration. The highest plant regeneration was obtained for the method using nodal cuttings pretreatment with 0.75 M sucrose and low temperature treatment (2 °C) and following shoot tip loading with 0.7 M sucrose for overnight and air desiccation of shoot tips above silicagel (3 hours). This method is used routinely for cryopreservation of hop germplasm at the Research Institute of Crop Production in Prague in collaboration with the Hop Research Institute, Co., Ltd. in Žatec.*

*Key words: hop, *Humulus lupulus* L., pretreatment, cryopreservation, in vitro cultivation*

Úvod

Kryokonzervace je technologie uchování rostlin a jejich částí v ultra – nízkých teplotách v kapalném dusíku při teplotě – 196 °C. Využívá se pro uchování genofondu vegetativně množených rostlin. Tato metoda přispívá k uchování genetické stability a zamezuje stárnutí skladovaného materiálu. Kryokonzervace je využívána pro uchování genetických zdrojů kulturních a planých forem, ozdraveného materiálu, u kterého hrozí při množení v *ex vitro* podmínkách znehodnocení vlivem působení biotických a abiotických stresů. Výchozím materiálem jsou rostliny převedené do *in vitro* kultur. Pro šlechtitele se pomocí kryokonzervace uchovává pyl pro křížení.

V roce 2003 byla založena první Kryobanka vegetativně množených rostlin v České republice ve VÚRV Praha. V první fázi je její činnost zaměřena na nejdůležitější vegetativně množené plodiny (brambor, chmel, *Allium*, jabloň, hrušeň, jahodník, višň, třešň a vinnou révu). Od roku 2003 je v rámci projektu Kryobanky řešen společný projekt Národní agentury pro zemědělský výzkum QF 3039: Založení kryobanky pro konzervaci vegetativních vrcholů bramboru a chmele.

Základním předpokladem úspěšné kryoprezervace je splnění podmínky, že nesmí dojít k intracelulární tvorbě krystalů ledu. Nejvýhodnější je uchování vzorků v tzv. skelném stavu, kdy kapalná voda přešla do pevné fáze – amorfní hmoty s vyloučením tvorby ledových krystalů. V případě, že nedochází ke krystalizaci, nacházejí se vzorky obsahující vodu (veškeré rostlinné vzorky) při teplotě pod – 130 °C ve skelném stavu. Skelný stav je charakterizován prakticky úplným zastavením veškerých metabolických procesů, včetně procesů stárnutí nebo jiných procesů, které by způsobily poškození takto uchovávaného materiálu.

Cestou k dosažení skelného stavu je snížení obsahu vody ve vzorcích a dostatečně rychlý způsob zamrazení vzorků do tekutého dusíku. Při vývoji kryoprezervační metody chmele jsme se zaměřili na přirozené způsoby otužování rostlin pomocí osmotického přizpůsobení a nízké teploty pro dehydrataci vzorků před kryoprezervací. Porovnávali jsme vliv různých způsobů předkultivace rostlin s cílem zvýšit úspěšnost jejich kryoprezervace.

Materiál a metodika

Byl zkoumán vliv 0,75 M sacharosy a 60 % polyethylen glykolu s molekulovou hmotností 3350 při předkultivaci rostlin chmele *in vitro* při současném otužování rostlin nízkou teplotou.

Kultivace výchozích rostlin in vitro

Osvaldův klon číslo 72, meriklon 4631 získaný v rámci ozdravovacího procesu českého chmele Svoboda (2) byl použit jako experimentální materiál pro porovnání kryoprezervačních metod chmele. Výchozí rostliny byly kultivovány v Erlenmeyerových bankách (100ml, 20 ml media) na modifikovaném kultivačním mediu podle Murashige a Skoog (1) bez kaseinu a myoinositolu a se sníženým obsahem dusíku (25 % původního obsahu NH₄NO₃ a 50 % původního obsahu KNO₃ ve srovnání s mediem podle MURASHIGE a SKOOG, 1962), 20 g l⁻¹ glukosy a 7 g l⁻¹ agaru (MS^H medium) při 22 ± 1 °C, 80 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperiodou 16/8 h, subkultivační interval byl 8 týdnů. Z těchto rostlin byly odebrány nodální části, které byly pasážovány na MS^H medium a kultivovány ve stejných podmínkách jako výchozí rostliny a během kultivace došlo k prorůstání axilárních pupenů na nodálních segmentech.

Předkultivace rostlin

Po 12 dnech kultivace byla jedna část rostlin, označená jako varianta A ponechána v kontrolních kultivačních podmínkách při 22 ± 1 °C. Druhá část rostlin byla přenesena do kultivace s nízkou teplotou (2 ± 1 °C) k otužování. U části těchto rostlin byla po 7 dnech kultivace provedena aplikace 10 ml 60 % roztoku polyethylen glykolu 3350 (varianta B) nebo 10 ml 0,75 M roztoku sacharosy (varianta C).

Sycení a desikace apikálních vrcholů

Po dalších 7 dnech kultivace byly rostliny izolovány vegetační vrcholy a syceny na filtračním papíře nasyceném roztokem 0,7 M sacharosy. Po jednom dni sycení sacharosou byly apikální vrcholy přeneseny na hliníkové plíšky a dehydratovány 3 hodiny nad vysušeným silikagelem v uzavřených nádobách.

Kryoprezervace a regenerace

Apikální vrcholy na hliníkových plíškách byly zmrazeny přímým ponořením plíšku do tekutého dusíku. Odtávání apikálních vrcholů na hliníkových plíškách bylo provedeno přímým ponořením plíšků s vrcholy do vodní lázně o teplotě 40 °C. Následná regenerace rostlin probíhala na MS^H mediu s 40 g l⁻¹ glukosy a 0,2 mg l⁻¹ kyseliny gibberelové (GA), 0,1 mg l⁻¹ kyseliny indolyl máselné (IBA) a 0,2 mg l⁻¹ 6 – benzylaminopurinu (BAP).

Výsledky a diskuse

Předkultivace s aplikací osmotik a nízké teploty významně zvýšilo životnost i regeneraci rostlin po kryoprezervaci (tab. 1. U varianty bez předkultivace rostlin, kdy byly izolované vrcholy přímo syceny pomocí 0,7 M sacharosy s jejich následnou desikací nad silikagelem, dosahovala životnost rostlin po kryoprezervaci pouze 10 % a nepodařilo se zregenerovat žádnou rostlinu po kryoprezervaci.

Vlivem osmotického přizpůsobení a nízké teploty došlo ke zvýšení životnosti o přibližně 40 – 55 %. Regenerace rostlin se vlivem osmotického stresu zvýšila přibližně o 30 – 40 %.

Nejvyšší přežití rostlin (67%) po kryoprezervaci bylo dosaženo u varianty B s použitím polyethylen glykolu 3350 pro osmotické přizpůsobení rostlin. Při použití sacharosy byla dosažena průměrná životnost rostlin 53%. Životnost rostlin těchto dvou variant předkultivace nebyla vzájemně statisticky významně odlišná na hladině významnosti 0,05. Obě varianty byly statisticky významně odlišné od kontrolní varianty, což znamená, že použité způsoby předkultivace měly významný vliv na zvýšení životnosti rostlin po kryoprezervaci.

Nejvyšší regenerace rostlin (37%) po kryoprezervaci byla zjištěna u varianty s použitím sacharosy pro osmotické přizpůsobení rostlin. Mírně nižší úroveň regenerace měla varianta s použitím polyethylen glykolu 3350 pro předkultivaci rostlin (28%). Obě varianty předkultivace nebyly vzájemně statisticky významně odlišné, ale byl prokázán statisticky významný vliv obou způsobů předkultivace na zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci.

Působení nízké teploty společně s aplikací osmotika mělo vliv na omezení dlouhivého růstu axilárních výhonků, které byly více kompaktní a jejich pletivo bylo pevnější než u kontrolních rostlin. Došlo tak k výraznému zvýšení efektivity vlastní kryoprezervace vrcholů chmele. Nebyl zjištěn významný rozdíl v životnosti ani regeneraci rostlin mezi testovanými variantami použitých osmotik. Varianta C s předkultivací nodálních segmentů při nízké teplotě (2 °C) s aplikací 0,75 M sacharosy pro osmotické přizpůsobení rostlin s následným sycením izolovaných vrcholů na 0,7 M sacharose a s jejich následnou desikací nad silikagelem se jevila jako nejvhodnější postup pro kryoprezervaci. V tomto případě byla dosažena nejvyšší maximální regenerace rostlin po kryoprezervaci (až 44%) a současně byla jednodušší a přesnější aplikace roztoku 0,75 M sacharosy než 60 % roztoku polyethylen glykolu, přičemž sacharóza je na rozdíl od polyethylen glykolu, součástí metabolismu rostlin a je považována za přirozený kryoprotektant.

Tabulka 1: Vliv různých způsobů předkultivace na procento přežití a regenerace rostlin chmele po kryoprezervaci

Varianta	Podmínky předkultivace rostlin			Úspěšnost kryoprezervace	
	Teplota kultivace	Osmotické přizpůsobení rostlin	Sycení izolovaných vrcholů	% přežití*	% regenerace*
A	22 ± 1°C	ne	0,7 M sacharosa	10 ^b	0 ^b
B	2 ± 1°C	60% PEG 3350	0,7 M sacharosa	67 ^a	28 ^a
C	2 ± 1°C	0,75 M sacharosa	0,7 M sacharosa	53 ^a	37 ^a

* a, b označují statisticky významný rozdíl mezi variantami na hladině významnosti 0,05)

Závěr

Byly ověřeny dva způsoby předkultivace rostlin chmele s využitím 0,75 M sacharosu a 60 % polyethylen glykolu. Oba způsoby předkultivace rostlin měly statisticky významný vliv na zvýšení životnosti a regenerace rostlin chmele po kryoprezervaci. Nejvyšší regenerace rostlin po kryoprezervaci byla dosažena při použití 0,75 M sacharosu spolu s nízkou teplotou pro předkultivaci nodálních segmentů a následným sycením izolovaných vzrostných vrcholů na 0,7 M sacharose a jejich desikaci nad silikagelem. Tento postup je rutinně používán při kryoprezervaci genových zdrojů chmele ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni ve spolupráci s Chmelařským institutem s.r.o. v Žatci.

Poděkování: Presentování výsledky byly dosaženy při řešení projektu NAZV QF 3039 za finanční podpory Mze ČR.

Literatura

1. MURASHIGE, T. – SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiol. Plant.* 15, 1962, s. 473 – 497
2. SVOBODA P.: Klonové množení chmele *in vitro*. *Rostlinná výroba*, 37, 1991 (8): 643 – 648

Adresa autorov:

¹ Hop Research Institute, Co., Ltd. in Žatec. p.svoboda@telecom.cz

² Research Institute of Crop Production, Prague, Czech Republic, faltus@vurv.cz

ŠLECHTĚNÍ CHMELE (*HUMULUS LUPULUS L.*) PRO BIOMEDICIÓNÍ A FARMACEUTICKÉ ÚČELY

BREEDING OF HOP (*HUMULUS LUPULUS L.*) FOR BIOMEDICAL AND PHARMACEUTICAL PURPOSES

Vladimír NESVADBA – Karel KROFTA

We harvested and analyzed with the help of liquid chromatography totally 543 samples taken from our breeding material and collection of hop genetic resources. The range of xanthohumol contents varied from to 0,14 % (Ukraine variety Sumer) to 0,88 % (Czech variety Agnus). Desmethylxanthohumol (DMX) contents move since 0,02 % (four hop varieties: regional variety "Roudnický", German variety Hersbruck and English varieties Kent and College Cluster) to 0,23 % (new breeding material no. 4902). Linear regressions of xanthohumol as well as DMX contents with alpha acids contents were determined. Correlation coefficients move since 0,61 to 0,86 and so they show important tightness of dependence. That means genotypes with high contents of hop resins show higher contents of xanthohumol and DMX. Key words: hop, Humulus lupulus L., xanthohumol, desmethylxanthohumol, genetic resources, new breeding material, hop resins.

Úvod

Šlechtění chmele bylo vždy výhradně zaměřeno pro pivovarské účely. Chmelové odrůdy musí vykazovat příznivý vliv na kvalitu piva a především na charakter hořkosti piva (NESVADBA, KROFTA, 2007). V posledních letech bylo šlechtění chmele zaměřeno na odolnost k houbovým chorobám a to především k peronospře chmelové a k padlí chmelovému (NESVADBA et al., 2006). Tyto choroby způsobují ve světě značné ztráty na produkci chmele a výrazně zvyšují náklady na chemickou ochranu proti těmto chorobám.

V současné době je výrazný zájem farmaceutického průmyslu o látky obsažené v chmelových hlávkách. Jedná se především o prenylované flavonoidy, protože u nich byly objeveny významné antioxidační, protizánětlivé, protivirové a antikarcinogenní účinky. Například u xanthohumolu a dehydrocykloxanthohumolu bylo prokázáno aktivační působení na chinonreduktázu. Zmíněný enzym chrání buňky proti toxickým xenobiotikům tím, že redukuje chinony na hydrochinony, které se v těle savců snadněji odbourávají (MIRANDA et al., 2000). U isoxanthohumolu a 8-prenylaringenininu byly zjištěny inhibiční účinky na cytochrom P450 enzymy, které aktivují působení různých karcinogenů. TOBE et. al. (1997) zjistili, že kostní resorpce je významně inhibována některými látkami ze chmele, především xanthohumolem a humulonem. Uvedené sloučeniny jsou v současné době považovány za perspektivní terapeutické látky proti osteoporóze. Antioxidační vlastnosti prenylovaných flavonoidů byly objeveny při inhibici oxidace „low density“ lipoproteinů, která snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob. Cytotoxický vliv xanthohumolu, dehydroxanthohumolu a isoxanthohumolu na lidské rakovinné buňky několika orgánů byl prokázán v koncentracích 0,1 až 100 μ M. Testování pozitivních vlastností xanthohumolu a dalších příbuzných látek stále pokračuje v „in vitro“ i „in vivo“ podmínkách. S ohledem na uvedené skutečnosti lze očekávat, že množství chmele, které se využívá mimo pivovarský průmysl, bude mít do budoucna rostoucí trend.

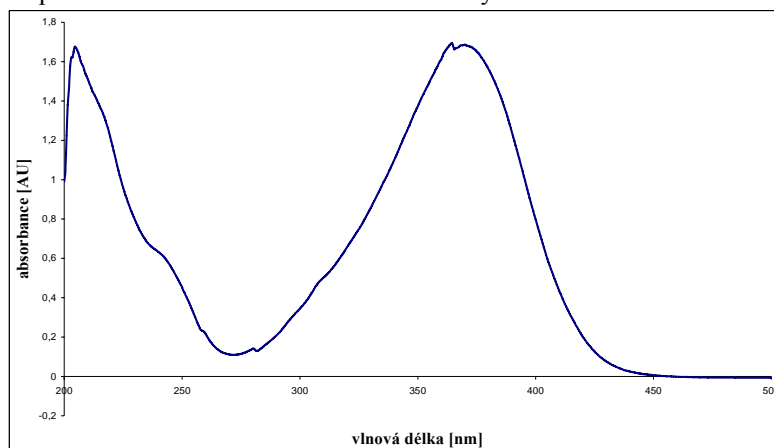
Od roku 2006 se Chmelařský institut s.r.o. Žatec zaměřil na šlechtění chmele pro biomedicIÓNÍ a farmaceutické účely. Cílem projektu je získat nové genotypy chmele s vysokým obsahem xanthohumolu a desmethylxanthohumolu (dále DMX)

Materiál a metody

Výsledky obsahu sledovaných látek byly získány z šlechtitelského materiálu a polní kolekce genetických zdrojů chmele. Xanthohumol byl ze chmele a upravených chmelových výrobků extrahován směsí diethyléter-methanol. Získaný extrakt se dělil na chromatografické koloně NUCLEOSIL RP C₁₈, 5 μ m, 250 x 4,6 mm. Xanthohumol eluovaný z kolony byl spektrometricky detekován při vlnové délce 370 nm. Vlastní pracovní postup byl stejný jako při přípravě vzorku pro analýzu hořkých kyselin metodou HPLC, EBC 7.7 (1997). Chroma-tografické stanovení xantho-humolu a α - a β -hořkých kyselin bylo prováděno simultánně tak, že analytický signál byl snímán při dvou vlnových délkách 314 a 370 nm. Při první vlnové délce se detekovaly α -hořké a β -hořké kyseliny, při druhé xanthohumol, jehož absorpční spektrum s typickým maximem při 370 nm, je na obr. 1. Kvantifikace xanthohumolu byla provedena externí kalibrací na analyticky čistý standard o čistotě 99,5 %, který byl získán darem z Oregon State University USA (KROFTA, 2002). Kalibrační roztok xanthohumolu byl připraven rozpuštěním 4 mg látky ve 100 ml methanolu o HPLC čistotě. Ze záznamu simultánní analýzy hořkých kyselin a xanthohumolu je patrné, že flavonoid se eluuje přibližně v šesté minutě analýzy, hořké kyseliny se vydělují postupně od desáté do dvacáté minuty. Absorbance xanthohumolu při vlnové délce 370 nm je v porovnání s absorbcí při 314 nm přibližně trojnásobná. Obsah xanthohumolu ve vzorku se zpravidla stanovuje s přesností na dvě desetinná místa. Rozšířená nejistota měření, tj. 95 % interval spolehlivosti střední hodnoty, byla pro xanthohumol stanovena \pm 3,5 % relativních. Statistické zpracování experimentálních dat bylo provedeno pomocí programu QC.Expert 2.5 (TriloByte s.r.o., Pardubice).

Výsledky a diskuze

V roce 2006 byly odebrány vzorky z celé polní kolekce genetických zdrojů, kde je 308 položek a z části rozpracovaného šlechtitelského materiálu bylo sklizeno a následně odebráno 235 vzorků chmele. Celkem

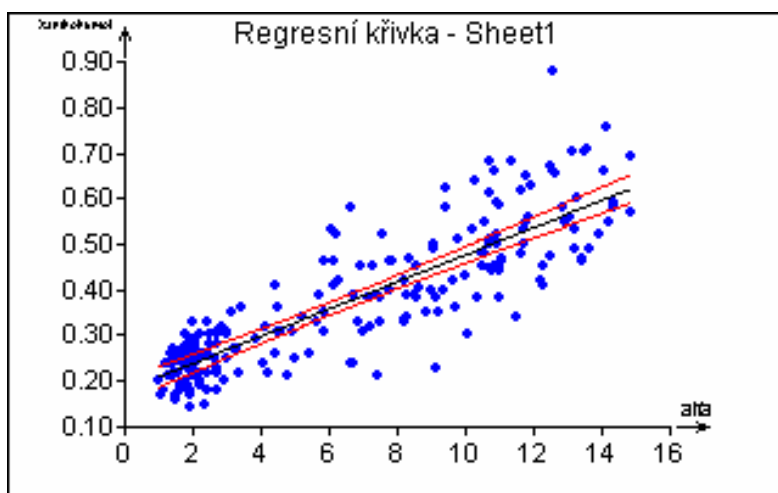


Obrázek 1: Absorpční spektrum methanolového roztoku xanthohumolu

bylo sklizeno 543 vzorků chmele. Po sklizni byly zahájeny chemické analýzy těchto vzorků. Rozpětí obsahu xanthohumolu bylo stanoveno od 0,140 % (ukrajinská odrůda Sumer 0,880 %) do (česká odrůda Agnus). Obsah DMX je nižší než obsah xanthohumolu a to od 0,02 (4 odrůdy – krajová Roudnický, německá Hersbruck a anglické Kent a College Cluster) do 0,23 (nšl. 4902). Cílem projektu je získat genotypy s obsahem xanthohumolu 1,2 až 1,5 %, bohužel v analyzovaném souboru dat nebyl nalezen žádný genotyp dosahující tento parametr. Druhý cíl projektu je získat genotypy s obsahem DMX 0,25 až 0,30 %, bohužel ani tuto hranici nepřekonal žádný genotyp, pouze 4 novošlechtění (4902, 4729, 5008 a 4909) vykazují obsah nad 0,20 %. První výsledky poukazují, že analyzovaný šlechtitelský materiál nedosahuje požadované minimální hranice 1,2 % obsahu xanthohumolu. Pro šlechtění chmele je důležité, že nejvyšší obsahy xanthohumolu vykazují především novošlechtění z české republiky než testované zahraniční odrůdy. Lze konstatovat, že tyto materiály budou dobrým základem pro křížení v rámci tohoto výzkumného projektu. Naopak výsledky obsahu DMX šlechtitelského materiálu poukazují, že několik novošlechtění se k hranici 0,25 % přibližuje. Lze konstatovat, že dosažení požadované hranice obsahu xanthohumolu bude nutně realizovat vyšší počet křížení, abychom otestovali rodičovské komponenty, které budou vykazovat obecnou kombinační schopnost a následně je využít pro výběr sestavení kombinací pro získání jedinců se specifickou kombinační schopností. Dle výsledků obsahu DMX je zřejmé, že se možná naleznou požadované genotypy (tj.s obsahem DMX nad 0,25 %), přesto postup šlechtění bude shodný se šlechtěním na obsah xanthohumolu.

Šlechtění chmele na obsah xanthohumolu a DMX dosud v České republice a dle informací ani v zahraničí nebylo dosud cíleně řešeno. Jedná se o úplně nový šlechtitelský znak. Samozřejmě, že základem šlechtění bude výběr rodičovských komponentů s vysokým obsahem xanthohumolu a DMX. Z uvedeného souboru získaných dat byly zjištěny na základě statistického hodnocení další nové poznatky. Pomocí lineární regrese se stanovil trend závislosti obsahu jak xanthohumolu, tak DMX na obsah složek chmelových pryskyřic. Dále korelací byla stanovena těsnost závislosti.

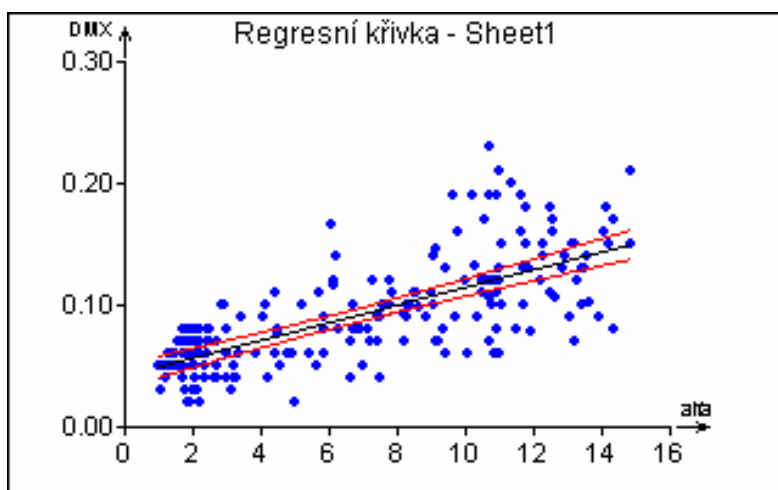
Z grafu 1 je patrné, že se zvyšujícím obsahem alfa hořkých kyselin se zvyšuje obsah xanthohumolu.



Graf 1: Lineární regrese obsah xanthohumolu/obsah alfa hořkých kyselin

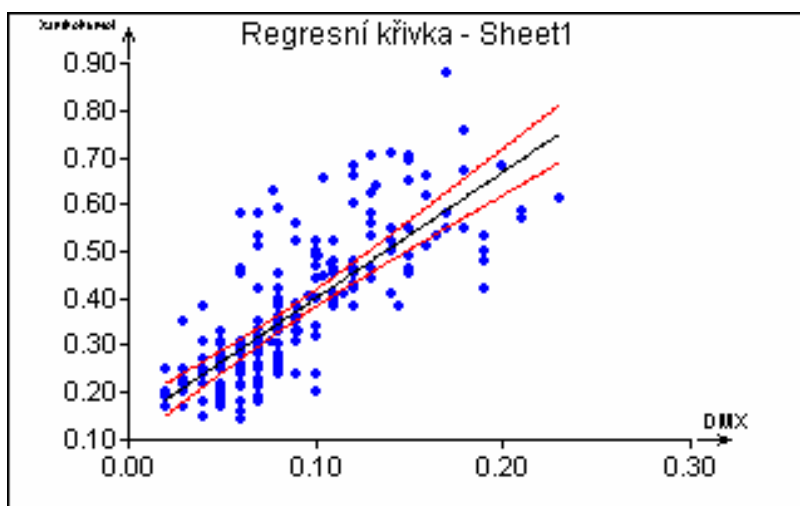
Tento trend potvrzuje i vysoký korelační koeficient ($r = 0,86$). Stonásobek koeficientu determinace (r^2) uvádí, že z 74,44 % je výše obsahu xanthohumolu závislá na vysokém obsahu alfa hořkých kyselin. Tento poznatek má velký význam pro šlechtění na obsah xanthohumolu, protože šlechtitelské pracoviště ve Chmelařském institutu Žatec má zkušenosti se šlechtěním na vysoký obsah alfa hořkých kyselin (nová odrůda Agnus byla registrována v roce 2001). Obsah beta hořkých kyselin má též vliv na obsah xanthohumolu. Opět genotypy chmele s vyšším obsahem beta hořkých kyselin vykazují vyšší obsah xanthohumolu. Tato závislost není tak silná ($r = 0,61$) jako u obsahu alfa hořkých kyselin. Dalším důležitým odrůdovým znakem je podíl kohumulonu a kolupulonu. Bohužel korelace k podílu kohumulonu není významná ($r = 0,32$), pouze podíl kolupulonu vykazuje vyšší korelaci ($r = 0,55$).

Z grafu 2 je patrné, že se zvyšujícím obsahem alfa hořkých kyselin se zvyšuje obsah DMX. Tento trend



Graf 2: Lineární regrese obsah DMX/obsah alfa hořkých kyselin

(vykazují téměř shodný korelační koeficient), tzn., že novošlechtění s vysokým obsahem alfa hořkých kyselin musí též vykazovat vysoký obsah beta hořkých kyselin. Tato teorie se bude ověřovat při vyšším počtu získaných dat a v rámci několika ročníků. Pokud se tato teorie potvrdí, tak by šlechtění chmele na vysoký obsah DMX bylo náročnější, protože by bylo nutné zaměřit šlechtění na další dva hlavní znaky. Výše obsahu DMX nevykazuje závislost na výši podílu kohumulonu ($r = 0,13$) nebo kolupulonu ($r = 0,25$).



Graf 3: Lineární regrese obsah xanthohumolu/obsah DMX

humolu budou tyto trendy (obsah alfa hořkých kyselin a obsah DMX) poukazovat na možný směr v šlechtitelském cyklu.

Závěr

Dosažené výsledky analýz, trendů a korelace u samčích genotypů mají informativní význam, protože se jedná o malý soubor dat, který byl hodnocen pouze v jednom roce. Přesto mají získané výsledky pro řešení projektu velký význam, protože je možné používat vhodné rodičovské komponenty, které vykazují (pouze informativně) vysoký obsah xanthohumolu nebo DMX. V roce 2006 bylo provedeno 19 křížení a v roce 2007 bylo provedeno 36 křížení. Rodičovské komponenty byly vybrány pouze s vysokým obsahem xanthohumolu a DMX.

Literatura

1. Analytica EBC, Metod 7.7 European Brewery Convention, Getränke Fachverlang, 1997
2. KROFTA, K.: Obsah a složení chmelových pryskyřic žateckých chmelů z pohledu pivovarské hodnoty. Disertační práce, VŠCHT Praha, 2002
3. MIRANDA, C. I. et al.: Prenyladet chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. Cancer Letters 149. 2000

4. NESVADBA, V. – KROFTA, K. – PATZAK, J.: Problematika šlechtění chmele (*Humulus lupulus L.*) na odolnost k houbovým chorobám. Sborník přednášek Nové poznatky z genetiky a šlechtění poľnohospodárskych rastlín, 23. – 24.11.2005 VÚRV Piešťany, Slovensko
5. NESVADBA, V. – KROFTA, K.: Aspects of breeding aroma hops. Proceedings of the Scientific Commission IHGC Tettnang, Germany, 2007
6. TOBE, H. et al.: Bone resorption inhibitors from hop extract. Biosci. Biotech. Biochem. 61, 1997.

Poděkování

Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného projektu 2B06011 Vývoj genotypů chmele pro biomedicinnální a farmaceutické účely, který podporuje MŠMT ČR. Vzorky byly získány z polní kolekce GZ chmele, která je součástí Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a biodiversity (MZe 33083/03-300 6.2.1. – MZe ČR).

Adresa autora:

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

HODNOCENÍ GENOFONDU REVENĚ (*RHEUM L.*, *POLYGONACEAE*) Z HLEDISKA OBSAHU VITAMINU C. ASSESSMENT OF ASCORBIC ACID IN DIFFERENT GENETIC RESOURCES OF RHUBARB (*RHEUM L.*, *POLYGONACEAE*)

Jarmila NEUGEBAUEROVÁ – Dana STRAKOVÁ

Rhubarb is a perennial plant with a specific taste. To evaluate the genetic resources of rhubarb, 21 specimens of petiole have been tested for ascorbic acid content. In average, ascorbic acid recorded 258 mg.kg⁻¹. Higher ascorbic acid content was obtained with the first harvested petiole 343 mg.kg⁻¹ (May), while the second harvest showed lower content 172 mg.kg⁻¹ (June).

Key words: Rheum L., genetic resources, edible petiole, ascorbic acid

Úvod

Reveň (rebarbora) je zdatnou vytrvalou rostlinou čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*). Rod *Rheum L.* zahrnuje asi 40 druhů. Z historického hlediska se reveň nejvíce používala v léčitelství a to především druhy *Rheum officinale* Baill. a *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. (syn. *Rheum palmatum L.*) (1). Jako vytrvalé zeleniny se pro jedlé řapíky pěstují reveň kadeřavá (*Rheum rhabarbarum L.*), reveň bulharská (*Rheum rhaponticum L.*) a jejich kříženci (*Rheum x hybridum* Murray) (2). V roce 1995 byl na pracovišti Zahradnické fakulty MZLU v Lednici na Moravě založen genofond rodu *Rheum L.* (3). Položky genofondu byly hodnoceny i v roce 2007 podle platného klasifikátoru (4). Stanovení vitamínu C bylo provedeno metodou kapalinové chromatografie. Obsah vitamínu C byl porovnán v závislosti na termínu sklizně.

Materiál a metody

V roce 2007 bylo hodnoceno na pracovišti Zahradnické fakulty MZLU v Lednici na Moravě deset položek aktivní kolekce genofondu reveně. Další hodnocení popisných znaků bylo provedeno u rostlin zahrnutých v pracovních kolekcích nebo rostlin regenerovaných. Přehled 21 hodnoceného vzorku je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1:

vzorek č.	druh/odrůda
1*	<i>R. rhabarbarum</i> 'JARA'
2*	<i>R. rhabarbarum</i> 'VICTORIA'
3*	<i>R. rhabarbarum</i> 'DAWES CHALLENGE'
4*	<i>R. rhabarbarum</i> 'THE SUTTON'
5*	<i>R. rhabarbarum</i> 'HOLSTEINER BLUT'
6*	<i>R. rhabarbarum</i> (Německo)
7	<i>R. rhaponticum</i> (ČR)
8*	<i>R. rhabarbarum</i> (Velká Británie)
9	<i>R. palmatum</i> x <i>R. witrockii</i>
10	<i>R. compactum</i>
11	<i>R. rhaponticum</i> (ČR)
12	<i>R. rhabarbarum</i> 'TIMPERLEY EARLY'
13	<i>R. palmatum</i>
14*	<i>R. australe</i>
15*	<i>R. rhaponticum</i> (Polsko)
16	<i>R. rhaponticum</i> (Maďarsko)
17	<i>R. rhaponticum</i> (ČR)
18*	<i>R. rhabarbarum</i> (Německo)
19	<i>R. spiciforme</i>
20	<i>R. rhabarbarum</i> 'GLASKINS PERPETUAL'
21	<i>R. australe</i> 'ANGERSIS'

* vzorky odebrané z aktivní kolekce genofondu

Po sklizni v termínech 22. 5. a 18. 6. 2007 byly odebrány průměrné vzorky z řapíků listů. Kyselina askorbová byla po předcházející úpravě vzorku stanovena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), s detekcí v ultrafialové oblasti (UV) spektra na přístroji ECOM (CZ). Pro analýzu byla použita analytická kolona CGC 3x150 Separon SGX C 18,7 μm, mobilní fázi byl roztok tetrabutylamonium hydroxidu (TBAH), kyseliny šťavelové a vody v poměru 10:20:70 (v/v/v). Rychlost průtoku byla 0,5 ml/min., objem nástřiku 20

μl, měření při vlnové délce 254 nm a teplotě stanovení 30 °C. Kvalitativní určení bylo provedeno z retenčních dat, kvantitativní stanovení z ploch (výšek) piků vzorku a standardu.

Výsledky a diskuze

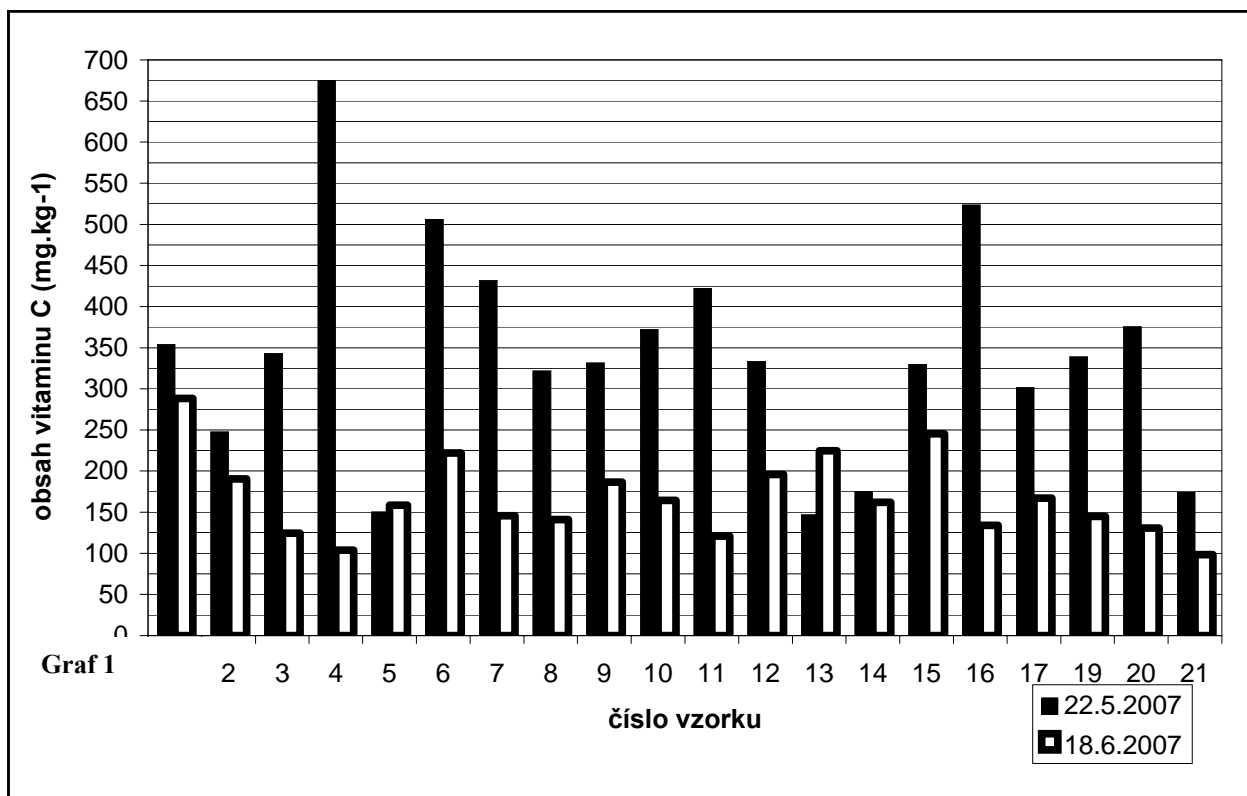
Obsah vitamínu C byl v prvním termínu sklizně (květen 2007) hodnocen jako **nízký** (50-150 mg.kg⁻¹) ve dvou vzorcích: vzorek č. 13 *Rheum palmatum* s hodnotou 146,81 mg.kg⁻¹ a ve vzorku č. 5 *Rheum rhabarbarum* 'HOLSTEINER BLUT' s hodnotou 150,43 mg.kg⁻¹. **Střední** obsah (151-250 mg.kg⁻¹) byl zjištěn u vzorků č. 14 *Rheum australe* (175,68 mg.kg⁻¹) a č. 21 *Rheum australe* 'ANGERSIS' (174,35 mg.kg⁻¹). **Vysoký** obsah (251-350 mg.kg⁻¹) u osmi vzorků: vzorek č. 15 *Rheum rhaponticum* (Polsko), hodnota 329,61 mg.kg⁻¹; vzorek č. 8 *Rheum rhabarbarum* (Velká Británie), hodnota 321,68 mg.kg⁻¹; vzorek č. 9. *Rheum palmatum* x *Rheum witrockii*, hodnota 331,36 mg.kg⁻¹; vzorek č. 12. *Rheum rhabarbarum* 'TIMPERLEY EARLY', hodnota 333,62 mg.kg⁻¹; vzorek č. 3. *Rheum rhabarbarum* 'DAWES CHALANGE', hodnota 343,13 mg.kg⁻¹; vzorek č. 17. *Rheum rhaponticum* (ČR), hodnota 301,91 mg.kg⁻¹; vzorek č. 19. *Rheum spiciforme*, hodnota 338,76 mg.kg⁻¹ a vzorek č. 18 *Rheum rhabarbarum* (Německo) s hodnotou 307,25 mg.kg⁻¹. **Velmi vysoký** obsah (nad 350 mg.kg⁻¹) byl zjištěn u zbývajících osmi vzorků. Nejvyšší hodnota (674,65 mg.kg⁻¹) byla zjištěna u vzorku č. 4 *Rheum rhabarbarum* 'THE SUTTON', dále hodnota 523,52 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 16 *Rheum rhaponticum* (Maďarsko), hodnota 506,38 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 6 *Rheum rhabarbarum* (Německo), hodnota 432,37 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 7 *Rheum rhaponticum* (ČR), hodnota 422,13 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 11 *Rheum rhaponticum* (ČR), hodnota 375,64 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 20 *Rheum rhabarbarum* 'GLASKINS PERPETUAL', hodnota 371,85 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 10 *Rheum compactum* a hodnota 354,11 mg.kg⁻¹ u vzorku č. 1 *Rheum rhabarbarum* 'JARA'. Průměrné hodnoty obsahu vitamínu C ve vzorcích listových řapíků z červenové sklizně roku 2007 byly o 49,75 % nižší než ze sklizně květnové.

V červeném termínu byl obsah vitamínu C hodnocen jako **nízký** u devíti vzorků: vzorek č. 21 *Rheum australe* 'ANGERSIS', hodnota 98,17 mg.kg⁻¹; vzorek č. 4 *Rheum rhabarbarum* 'THE SUTTON', hodnota 103,59 mg.kg⁻¹; vzorek č. 11 *Rheum rhaponticum* (ČR), hodnota 120,83, vzorek č. 3. *Rheum rhabarbarum* 'DAWES CHALANGE', hodnota 124,34 mg.kg⁻¹; vzorek č. 20 *Rheum rhabarbarum* 'GLASKINS PERPETUAL', hodnota 130,79 mg.kg⁻¹; vzorek č. 16 *Rheum rhaponticum* (Maďarsko), hodnota 134,08 mg.kg⁻¹; vzorek č. 8. *Rheum rhabarbarum* (Velká Británie), hodnota 140,95,13 mg.kg⁻¹; vzorek č. 19 *Rheum spiciforme*, hodnota 145,14 mg.kg⁻¹ a vzorek č. 7 *Rheum rhaponticum* (ČR) s hodnotou 145,61 mg.kg⁻¹. **Střední** obsah byl zjištěn u jedenácti vzorků: vzorek č. 18 *Rheum rhabarbarum* (Německo), hodnota 155,57 mg.kg⁻¹; vzorek č. 5 *Rheum rhabarbarum* 'HOLSTEINER BLUT', hodnota 158,47 mg.kg⁻¹; vzorek č. 14 *Rheum australe*, hodnota 162,02; vzorek č. 10 *Rheum compactum*, hodnota 164,36 mg.kg⁻¹; vzorek č. 17 *Rheum rhaponticum* (ČR), hodnota 167,06 mg.kg⁻¹; vzorek č. 9 *Rheum palmatum* x *witrockii*, hodnota 186,65 mg.kg⁻¹; vzorek č. 2. *Rheum rhabarbarum* 'VICTORIA', hodnota 190,56 mg.kg⁻¹; vzorek č. 12 *Rheum rhabarbarum* 'TIMPERLEY EARLY', hodnota 195,87 mg.kg⁻¹; vzorek č. 6 *Rheum rhabarbarum* (Německo), hodnota 221,95 mg.kg⁻¹; vzorek č. 13 *Rheum palmatum*, hodnota 224,77 mg.kg⁻¹ a vzorek č. 15. *Rheum rhaponticum* (Polsko) s hodnotou 245,20 mg.kg⁻¹. **Vysoký** obsah vitamínu C byl zjištěn u jediného vzorku č. 1 *Rheum rhabarbarum* 'JARA' (288,54 mg.kg⁻¹). Naměřené hodnoty jsou uvedeny tabulce 2 a znázorněny v grafu 1.

Zjištěné hodnoty obsahu vitamínu C jsou vyšší než publikované údaje (3) z let 1998-2000, průměrný obsah se pohyboval v rozmezí 95,10-320,00 mg.kg⁻¹.

Tabulka 2:

Číslo vzorku	Datum stanovení	
	22. 5. 2007	18. 6. 2007
1	354,105	288,54
2	247,755	190,555
3	343,125	124,34
4	674,645	103,59
5	150,43	158,47
6	506,38	221,945
7	432,365	145,605
8	321,68	140,95
9	331,355	186,65
10	371,85	164,36
11	422,128	120,83
12	333,62	195,87
13	146,805	224,765
14	175,68	162,02
15	329,605	245,195
16	523,52	134,075
17	301,905	167,06
19	338,775	145,135
20	375,64	130,785
21	174,35	98,165



Závěr

Obsah vitamínu C byl vyšší u vzorků sklizených v květnu 2007, pohyboval se v rozmezí 146,81-674,65 mg.kg⁻¹. U vzorků sklizených v červnu 2007 se hodnoty obsahu vitamínu C pohybovaly v rozmezí 98,17-288,54 mg.kg⁻¹. Pro další činnost s genovými zdroji léčivých rostlin a vytrvalých zelenin je v případě rodu *Rheum* L. nutné zohlednit zjištěná data a vzhledem k ověřeným velmi dobrým vlastnostem domácí odrůdy *Rheum rhabarbarum* 'JARA' rozšířit možnosti uplatnění této odrůdy ve výzkumu i zahradnické praxi.

Poděkování

Příspěvek vznikl za finanční podpory MZe ČR (Národní program konzervace a využití genofondu rostlin a biodiverzity)

Literatura

1. CHRTEK, J. – RHEUM, L., 1990. In Hejný S., Slavík B. (ed) Květena České republiky 2, Academia Praha, s. 339-340
2. BRUNETON, J. 1999. Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants, Lavoisier Publishing, Paris, p. 437-438, ISBN2-7430-0316-2
3. FARRAGOVÁ, J. 2007. Studium rodu *Rheum* L., dizertační práce, depon. in ZF MZLU Lednice, s. 156
4. TUREČKOVÁ, J. – PETŘÍKOVÁ, K. – HLAVÁČOVÁ, S. – FABEROVÁ J. 2001. Klasifikátor Descriptor list Genus *Rheum* L. Česká rada genetických zdrojů rostlin 2001 Genetické zdroje č. 80 VÚRV Praha, MZLU ZF Lednice

Adresa autorov:

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

Dana Straková, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, Zahradnická fakulta Lednice, Valtická 337, 691 44 Lednice

ŠTÚDIUM VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETROV VO VZŤAHU K AGRONOMICKO-MORFOLOGICKÝM ZNAKOM V SÚBORE OVSA STUDY OF SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN THE RELATION TO AGRONOMIC-MORPHOLOGICAL MARKS IN A SET OF OATS

Milan ČERTÍK – Michaela HAVRLENTOVÁ – Dalibor JEŠKO – Peter HOZLÁR –
Magdaléna BIELIKOVÁ – Ján KRAIC

The proteins, β -D-glucan, lipids, and fatty acids (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3) content was analyzed in 79 genotypes of oat from different origin and colour (white, yellow, black). No statistically important correlation was observed between monitored parameters. However, oat genotypes with black colour of the glumes account significantly lower standard deviations and variation coefficients in the content of monitored biochemical parameters. It indicates markedly stable biosynthetic mechanism of studied metabolites in black oat varieties.

Key words: oats, β -D-glucan, protein, lipid, fatty acids, correlation

Úvod

Záujem o ovos má v dnešnej dobe z dôvodu jeho nutričnej kvality i zdraviu prospešných účinkov stúpajúci charakter. Chemické zloženie zrna (napríklad obsahy bielkovín, lipidov, vlákniny) sú preto predmetom mnohých štúdií.

(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glukán (ďalej len β -D-glukán) prezentuje spolu s arabinoxylánom najvýznamnejší neškrobový polysacharid semien obilnín. Je zložkou rozpustnej potravinovej vlákniny a spomedzi všetkých zrnovín jeho najvyššie množstvá obsahujú jačmeň a ovos (HAVRLENTOVÁ, KRAIC, 2006). Koncentrácia tohto polyméru, lokalizovaného predovšetkým v bunkových stenách endospermu (CHARALAM-POPOULOS a kol., 2002) je ovplyvnená genotypom a prostredím. β -D-glukán zohráva dôležitú úlohu počas vegetatívneho rastu obilnín a trávovín, kedy ho rastliny využívajú ako štrukturálny element bunkových stien rastúcich buniek a ako endospermový zdroj zásobného materiálu, ktorý je hydrolyzovaný počas klíčenia ako extra zdroj uhlíka počas ranného ujímania sa klíčkov (MEIER, REID, 1982).

Obsah lipidov sa v ovse pohybuje v hodnotách okolo 5%, vysoké percento kyseliny linolovej (okolo 40%) však robí z ovsa výborný zdroj tejto esenciálnej mastnej kyseliny (CORDAIN, 1999). Navyše významné hladiny ďalších lipidických zložiek, ako napr. fosfolipidov, glykolipidov a fytoosterolov, nachádzajú uplatnenia v rôznych oblastiach farmaceutického a potravinárskeho priemyslu a v medicíne. Lipidy sú nevyhnutné pre stavbu bunkových štruktúr (fosfolipidová vrstva biomembrán), majú metabolickú, termoregulačnú a zásobnú funkciu (endosperm), sú zdrojom energie a plnia ochrannú funkciu (vosky).

Výskumy ukázali, že konzumácia ovsa znižuje hladinu nízkodenzitného cholesterolu, čo priaznivo pôsobí pri chorobách obehového systému a chráni pred vznikom arteriosklerózy. Spomaľovaním vstrebávania cukrov reguluje a stabilizuje hladinu glukózy v krvi, preto je vhodný aj pre diabetikov. Vyšší obsah ľahko rozpustnej vlákniny v semenách ovsa je prevenciou vzniku zápchy a črevných porúch. Významné postavenie mal od nepamäti ovos aj v ľudovom liečiteľstve, napr. pri zvýšenej činnosti štítnej žľazy, ako sedatívum v nervovom systéme a pri vyčerpanosti, nespavosti, príp. nervovej slabosti.

Na svete, ale aj u nás sa pestuje mnoho druhov ovsa, kde aj v rámci jedného druhu je značná genotypická alebo fenotypická variabilita (DOEHLERT a kol., 2001). Cieľom práce bolo poukázať do akej miery táto variabilita vplyva na niektoré morfológické a vybrané biochemické parametre ovsa a či existuje vzťah medzi pozorovanými agronomicko-morfológickými znakmi a biosyntézou biochemických metabolitov z pohľadu β -glukánov, lipidov a celkových proteínov. Výskum v takejto oblasti by zároveň výrazne napomohol pri cielej kategorizácii ovsa na základe jeho morfológicko-biochemických charakteristík.

Materiál a metódy

V práci sa použili semená 66 genotypov ovsa siateho (*Avena sativa* L.), ktoré boli pestované v roku 2003 na jednej lokalite (Výskumno-šľachtiteľská stanica Vígľaš-Pstruša). Boli vysušené a zomleté na ultracentrifugačnom mlyne (ZM 100, Retsch GmbH&Co.KG, Haan/Germany) na veľkosť častíc 0,5 mm. Na stanovenie obsahu β -D-glukánu sa použil enzymatický set K-BGLU 04/06 (Megazyme International, Ireland). Metóda je akceptovaná Association of Official Analytical Chemists (AOAC) a American Association of Cereal Chemists (AACC). Dusík sa stanovil Dumasovou metódou (CNS -2000 Elemental Analyzer, LECO Corp., USA) a obsah hrubých bielkovín následným prepočtom (dusík x 6,25). Celkové lipidy boli izolované zmesou chloroform/metanol (2:1) podľa ČERTÍKA a kol. (1996). Mastné kyseliny boli analyzované vo forme ich metylesterov plynovou chromatografiou (plynový chromatograf GC-6890 N, Agilent Technologies) (ČERTÍK a kol., 2006) a vyhodnotené pomocou ChemStation 10.1 (Agilent Technologies). Index nenasýtenia mastných kyselín IU bol kalkulovaný: (Σ monoény + 2Σ diény + 3Σ triény)/100. Variačný koeficient jednotlivých biochemických parametrov bol vypočítaný: Smerodajná odchýlka / Priemer x 100. Všetky hodnoty stanovovaných ukazovateľov sa prepočítali na sušinu, ktorá sa určila prístrojom Sartorius MA 45 (Sartorius AG, Goettingen/Germany).

Výsledky

V práci bolo testovaných 66 genotypov ovsu, v ktorých obsah bielkovín kolísal v hodnotách od 10,2 do 18,2% a zastúpenie β -D-glukánu bolo v rozmedzí 1,7 – 5,7%. Množstvo lipidov sa v jednotlivých genotypoch pohybovalo v rozpätí od 2,7 do 8,5%. Kyselina olejová (C18:1c n-9) a kyselina linolová (C18:2c n-6) sú dominantné mastné kyseliny a tvoria viac než 78% všetkých mastných kyselín v lipidoch ovsu. V tomto rastlinnom druhu bola popísaná korelácia medzi jednotlivými mastnými kyselinami (ČERTÍK, JEŠKO, 2006), čo môže indikovať geneticky podmienenú mieru expície desaturáz mastných kyselín v sledovanom súbore. Významná korelácia medzi študovanými biochemickými parametrami (bielkoviny, β -D-glukán a lipidy) však nebola detegovaná.

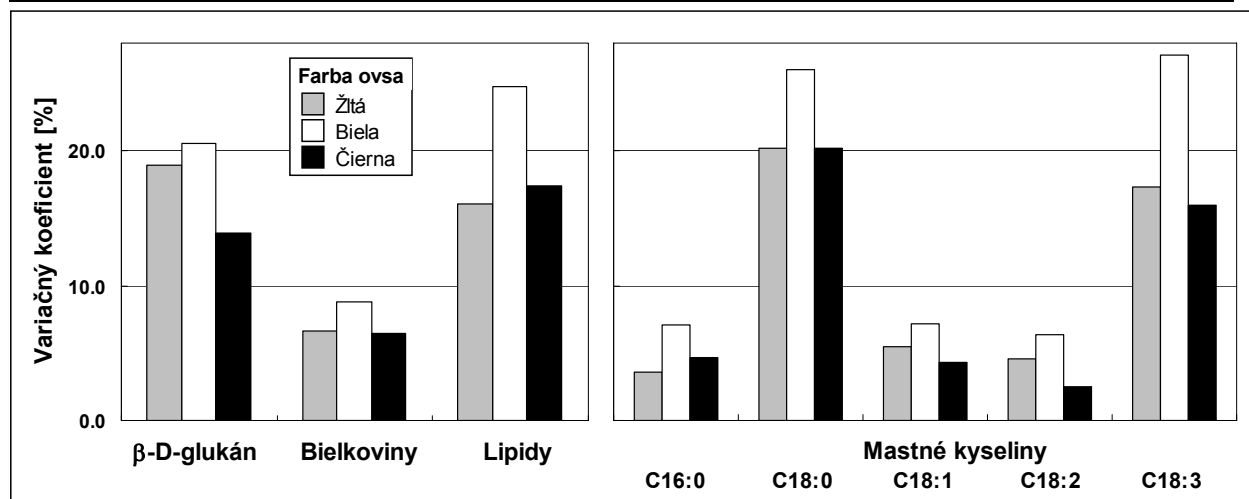
Štúdium bolo ďalej zamerané na zistenie, či existuje vzťah medzi farbou plevy ovsu (žltá, biela, čierna) a obsahom bielkovín, β -D-glukánu, lipidov a hlavnými mastnými kyselinami. Výsledky naznačujú, že priemerné hodnoty jednotlivých biochemických parametrov sa nelíšili významne v závislosti od farby plevy (tab. 1). Naproti tomu genotypy s čiernou farbou plevy vykazovali najnižšie štandardné odchýlky v obsahu sledovaných metabolitov. Navyše je zaujímavé, že miera rozptylu akumulácie bielkovín, β -D-glukánu a lipidov, ako aj miera rozptylu zastúpenia mastných kyselín v lipidoch, vyjadrená ich variačnými koeficientmi, bola najvyššia v bielych genotypoch ovsu, potom v žltých a najmenšie hodnoty vykazovali genotypy s čiernou farbou plevy (obr. 1). Keďže vyšší variačný koeficient vyjadruje nižšiu mieru stability tvorby daného metabolitu, môžeme konštatovať, že genotypy ovsu s čiernou farbou plevy s nízkymi variačnými koeficientmi majú výrazne stabilnejšiu biosyntézu bielkovín, β -D-glukánu a lipidov než žlté a najmä biele typy. Podobne i biosyntéza mastných kyselín bola stabilnejšia v genotypoch ovsu s čiernou farbou plevy.

Záver

V predkladanej práci sme testovali súbor 66 genotypov ovsu siateho rôznej krajiny pôvodu a farby plevy (biela, žltá a čierna) z hľadiska obsahu bielkovín, β -D-glukánu, lipidov a vybraných mastných kyselín (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 a C18:3). Nedetegovali sme štatisticky významnú koreláciu medzi jednotlivými sledovanými parametrami. Genotypy ovsu s čiernou farbou plevy však vykazovali najnižšie štandardné odchýlky v obsahu sledovaných biochemických znakov, čo môže naznačovať výrazne stabilnejšiu biosyntézu daných sledovaných znakov.

Tabuľka 1: Priemerné hodnoty a štandardné odchýlky obsahu bielkovín, β -D-glukánu, lipidov a hlavných mastných kyselín v hodnotenom súbore genotypov ovsu v závislosti na farbe ich plevy.

	Farba	β -D-Glukán [%]	Bielkoviny [%]	Lipidy [%]	Mastné kyseliny [% v lipidoch]				
					C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Priemer	Žltá	3.3	11.9	4.2	16.1	1.6	37.0	39.0	1.7
	Biela	3.5	12.1	4.4	15.8	1.7	37.4	39.0	1.7
	Čierna	3.3	12.1	3.6	16.2	1.5	37.1	39.0	1.7
Št. odchýlka	Žltá	0.62	0.79	0.67	0.57	0.32	2.02	1.77	0.29
	Biela	0.71	1.06	1.08	1.11	0.45	2.69	2.47	0.46
	Čierna	0.46	0.78	0.62	0.75	0.29	1.61	0.99	0.27



Obrázok 1: Variačné koeficienty obsahu bielkovín, β -D-glukánu, lipidov a zastúpenia hlavných mastných kyselín v lipidoch v hodnotenom súbore genotypov ovsu v závislosti na farbe ich plevy

Literatúra

1. CORDAIN, L.: Cereal grains: humanity's double-edged sword. *World Rev. Nutr.*, 84, 1999, 19–73.
2. ČERTÍK, M., ANDRÁŠI, P., ŠAJBIDOR, J.: Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ -linolenic acid extracted from fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1996, 357-365.
3. ČERTÍK, M. – SLÁVIKOVÁ, L. – MASRNOVÁ, S. – ŠAJBIDOR, J.: Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid state fermentations. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 2006, 75-82.
4. ČERTÍK, M. – JEŠKO, D.: Genotype variability of fatty acids in cereals. Proceedings of 4th Euro Fed Lipid Congress "Oils, Fats and Lipids for a Healthier Future". Madrid, Spain, 2006, LAMI-043.
5. DOEHLERT, D.C. – McMULLEN, M.S. – HAMMOND, J.J.: Genotypic and environmental effects on grain yield and quality of oat grown in North Dakota. *Crop Sci.* 41, 2001, 1066–1072.
6. HAVRLETOVÁ, M. – KRAIC, J.: Content of β -D-glucan in cereal grains. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45: 97 – 103, 2006.
7. CHARALAMPOPOULOS, D. – WANG, R. – PANDIELLA, S. S. – WEBB, C.: Application of cereals and cereal components in functional food: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 131 – 141, 2002.
8. MEIER, H. – REID, J. S. G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. Pages, 1982, s. 418 – 471, In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, č. 13. Loewus, A. F. A., Tanner, W., eds. Springer Verlag: Berlin.

Adresa autorov:

Doc. Ing. Milan Čertík, PhD., Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, e-mail: milan.certik@stuba.sk

RNDr. Michaela Havrlentová, Mgr. Dalibor Ješko, Ing. Peter Hozlár, PhD., Ing. Magdaléna Bieliková, Doc. RNDr. Ján Kraic, SCPV - Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany; e-mail: havrlentova@vurv.sk, jeskod@vurv.sk, hozlar@vurv.sk, bielikova@vurv.sk, kraic@vurv.sk

DRUHÁ GENERÁCIA TRANSGÉNNYCH PLODÍN NA TRHU: TRANSGÉNNE RASTLINY SO ZVÝŠENOU NUTRIČNOU HODNOTOU

THE SECOND GENERATION OF TRANSGENIC CROPS ON THE MARKET: TRANSGENIC PLANTS WITH ENHANCED NUTRITIONAL QUALITY

Juraj FARAGÓ

Abstract. The potential of biotechnology to improve the agronomic as well as qualitative traits of agricultural crops has long been recognized. The viability of transgenic approaches in crop improving is exemplified in the every year double-digit increases of total acreages of so called GM or „biotech“ crops. Recently, the second generation of transgenic crops with improved output traits have been commercialized, such as the LY038 high-lysine corn, for example. Because plants are the primary sources of dietary protein, much research effort is concentrated on the improvement of essential acid composition of agricultural crops. Additionally to breeding different biotechnological approaches have been developed. Among them the metabolic engineering of essential amino acid metabolic pathway and the expression of natural essential amino acid-rich proteins in transgenic plants are the most used. Novel approaches, such as protein engineering, de novo protein design and accelerated evolution provide much promise into the future.

Key words: genetically modified crops, input traits, output traits, protein quality, essential amino acids

Geneticky modifikované plodiny druhej generácie

Minulý rok bola firmou Reussen (spoločný podnik medzi Cargill a Monsanto) uvedená na trh transgénna kukurica LY038 pod trhovým označením MaverTM (USDA-APHIS, 2006). LY038 kukurica bola vytvorená biobalistickou genetickou transformáciou a vnesením génu *cordapA* z *Corynebacterium glutamicum* do genómu rastliny. Gén *cordapA* kóduje enzým dihydrodipikolinát syntázu (DHDPs) nesenzitívnu k spätnoväzbovej inhibícii lyzínom. To znamená, že transgénne rastliny obsahujúce tento gén nadprodukovujú esenciálnu aminokyselinu lyzín, ktorá sa nachádza z nutričného hľadiska v nedostatočnom množstve všeobecne pri všetkých obilninách. LY038 kukurica je určená na trh hlavne ako krmivo pre hydinařenský priemysel.

V r. 2005 bola udelená Indii licencia na produkciu GM ryže Golden Rice. Golden Rice („Zlatá Ryža“) je geneticky modifikovaná ryža, ktorá produkuje karotenoidy v endosperme zrn, čo týmto dáva charakteristické žlté sfarbenie. Pôvodná ryža Golden Rice produkovala približne 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ celkových karotenoidov (YE a kol., 2000). Nedávno bola vyvinutá druhá generácia Zlatej Ryže, Golden Rice 2, ktorá dosahovala v endosperme až 31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ β -karoténu (PAINE a kol., 2005).

V databáze GM odrôd Európskej únie sa nachádzajú 3 odrody klinčeka (*Dianthus caryophyllus*), Moonshadow 1, Moonshadow 2 a Moondust od austrálskej firmy Florigene Ltd. so zmenenou farbou kvetov a s predĺženou životnosťou rezaných kvetov vo váze (GMO Compass, 2007). Ďalšie dve, Moonlite a Moonaqua sú v pokročilej fáze schvaľovania.

V apríli a máji 2006 udelilo Ministerstvo životného prostredia Českej republiky povolenie k zavádzaniu do životného prostredia geneticky modifikovaného ľulka zemiakového so zmeneným obsahom cukrov v hľuzách (MŽP ČR, 2006a) a so zvýšeným obsahom amylopektínu v škrobe hľúz (MŽP ČR, 2006b). Prvé povolenie sa týka poľných pokusov s transgénnym ľulkom zemiakovým s vneseným génom *pfkII* z baktérie *Lactobacillus delbrückii* kódujúcim enzým fruktokinázu, v dôsledku aktivity ktorého majú hľuzy znížený obsah rozpustných cukrov. Predmetom druhého povolenia sú tiež poľné pokusy s ľulkom zemiakovým s vloženým fragmentom génu *gbss* v *antisense* orientácii, ktorý kóduje syntetázu škrobu (GBSS) viazanú na škrobové zrno. Transkripcia vneseného génu spôsobuje vyšší obsah amylopektínu v hľuzách zemiaka v dôsledku zníženia obsahu amylozy.

Toto všetko sú príklady nástupu tzv. geneticky modifikovaných (GM) plodín druhej generácie na ťaženie na lokálne či globálne trhy. Ktoré GM plodiny patria do „prvej generácie“, ktoré do „druhej generácie“ a čím sa líšia?

Podľa toho, aké vlastnosti sa do transgénnych rastlín vnášajú, je možné definovať dve triedy transgénnych rastlín: prvú triedu tvoria tie, ktoré majú vylepšené agronomické vlastnosti (z angl. *input traits*) a druhú skupinu transgénne rastliny s vylepšenými kvalitatívnymi vlastnosťami (angl. *output traits*). Medzi transgénne rastliny s vylepšenými agronomickými vlastnosťami patria transformanty s rezistenciou k herbicídum (napr. Roundup Ready[®] sója), toleranciou k hmyzím škodcom (napr. Bt kukurica), zvýšenou suchovzdornosťou a vylepšenými akýmikoľvek vlastnosťami, týkajúcimi sa klíčenia semien a rastu rastliny. GM plodiny s vylepšenými agronomickými vlastnosťami sú určené najmä pre poľnohospodárov a farmárov a tvoria tzv. prvú generáciu GM plodín. Genetická transformácia pre vylepšenie kvalitatívnych vlastností rastlín sa týka najmä úrodových vlastností a chemického zloženia zberaných častí rastlín, napr. aminokyselinového zloženia, zloženia mastných kyselín, odlišného zloženia škrobu, zvýšeného obsahu vitamínov a pod. Sem patria aj transgénne rastliny vyvíjané s cieľom použitia ako alternatívne produkčné systémy na produkciu napr. biologicky aktívnych bielkovín, priemyselných enzýmov a látok s vysokou pridanou hodnotou. Druhá generácia GM plodín s pozmenenými vlastnosťami konečného produktu je zameraná viac na spotrebiteľov. GM plodiny druhej generácie teda majú zmenené zloženie zásobných bielkovín, esenciálnych aminokyselín, lipidov, polysacharidov, ai. Tretia generácia GM plodín orientovaná na produkciu farmakologicky alebo priemyselne významných zlúčenín (vakcín, protilátok, enzýmov) je v súčasnosti vo vývoji, hoci niektoré z nich vyrábajúce pre človeka a jeho zdravie prospešné látky sú už v konečných štádiách klinického skúšania.

V prvom roku druhej dekády komercializácie transgénnych odrôd rastlín prekročila celková osevná plocha GM plodín na svete „magickú“ hranicu 100 miliónov hektárov - 101 mil. ha v r. 2006 (JAMES, 2006). Celkom pestovalo GM plodiny už 22 krajín (tab. 1). Slovensko sa stalo šiestou krajinou Európskej únie a dvadsiatou

druhou krajinou sveta, ktoré začalo pestovať GM plodiny. V r. 2006 pestovali na Slovensku GM kukuricu MON810 (resp. jeho hybridy) traja pestovatelia na ploche 33,1 ha, v tomto roku sa zvýšil počet pestovateľov na 16 a oševná plocha na 948,5 ha. V budúcom roku sa dá očakávať ďalší nárast, podobne ako to bolo v ČR, kde GM kukuricu začali pestovať o rok skôr.

Ešte vyšší je počet krajín, ktoré udelili povolenie pre import GM plodín pre krmovínové alebo potravinové použitie. Spolu 51 krajín sveta udelilo celkom 539 povolení pre 107 transgénnych odrôd 21 plodín (JAMES, 2006).

Tabuľka 1: Celkové pestovateľské plochy GM plodín v r. 2006 podľa krajín; v miliónoch ha

Por.	Štát	Oševná plocha (mil. ha)	Pestované GM plodiny
1.	USA	54,6	sója, kukurica, bavlník, repka, tekvica, papaja, lucerna
2.	Argentína	18,0	sója, kukurica, bavlník
3.	Brazília	11,5	sója, bavlník
4.	Kanada	6,1	repka, kukurica, sója
5.	India	3,8	bavlník
6.	Čína	3,5	bavlník
7.	Paraguay	2,0	sója
8.	Južná Afrika	1,4	kukurica, sója, bavlník
9.	Uruguay	0,4	sója, kukurica
10.	Filipíny	0,2	kukurica
11.	Austrália	0,2	bavlník
12.	Rumunsko	0,1	sója
13.	Mexiko	0,1	bavlník, sója
14.	Španielsko	0,1	kukurica
15.	Kolumbia	<0,1	bavlník
16.	Francúzsko	<0,1	kukurica
17.	Irán	<0,1	ryža
18.	Honduras	<0,1	kukurica
19.	Česká Republika	<0,1	kukurica
20.	Portugalsko	<0,1	kukurica
21.	Nemecko	<0,1	kukurica
22.	Slovenská Republika	<0,1	kukurica

Zdroj: Clive James, ISAAA, 2006

Zvýšenie nutričnej hodnoty rastlinných bielkovín metódami genetického inžinierstva

Primárnym zdrojom bielkovín v krmive pre hospodárske zvieratá a v potrave pre človeka sú rastliny. Pritom napr. viac ako 70% bielkovín konzumovaných človekom pochádza z obilnín a strukovín. V porovnaní so živočíšnymi bielkovinami je produkcia rastlinných bielkovín lacnejšia. Problémom je však to, že bielkoviny – či už z obilnín alebo strukovín – sú nutrične nevyvážené, najmä z hľadiska obsahu esenciálnych aminokyselín, t.j. aminokyselín, ktoré ani človek, ani monogastrické zvieratá nie sú schopné syntetizovať. Pri obilninách sa jedná o deficienciu najmä lyzínu (Lys, obsah 1,5-4,5%, odporúčanie WHO 5,5%), treonínu (Thr, obsah 2,7-3,9%, odporúčanie WHO 4,0%) a tryptofánu (Trp, obsah 0,8-2,0%, odporúčanie WHO 1,0%), zatiaľ čo pri strukovinách je veľmi nízky obsah metionínu + cysteínu (Met + Cys, obsah 0,8-2,0%, odporúčanie WHO 3,5%).

Za posledných 50 rokov sa šľachtitelia pokúšali zvýšiť obsah lyzínu v obilninách a metionínu v strukovinách, väčšinou s negatívnym výsledkom (SUN a LIU, 2004) a to z dôvodu, že zvýšenie obsahu esenciálnych aminokyselín bolo vo väčšine prípadov sprevádzané nepriaznivými vlastnosťami, ako napr. zníženie úrody či zvýšenie citlivosti k chorobám (BRIGHT a SHEWRY, 1983).

Intenzívny rozvoj metód genetického inžinierstva umožňuje v súčasnej dobe zvýšiť obsah esenciálnych aminokyselín v poľnohospodárskych plodinách vnášaním cudzorodých génov do génomov rastlín. Od prvej práce (ALTENBACH a kol., 1989), týkajúcej sa snahy zvýšiť obsah Met v semenách modelového organizmu, tabaku, vnesením do jeho génomu génu kódujúceho bielkovinu 2S albumín z brazílskeho paraorecha (*Bertholetia excelsa*) bol vyvinutý celý rad rôznych prístupov pre zvýšenie nutričnej hodnoty rastlinných bielkovín metódami genetického inžinierstva (GALILI a HÖFGEN, 2002; SUN a LIU, 2004; BEAUREGARD a HEFFORD, 2006). Z rôznych dodnes používaných stratégií, tri prístupy sa ukázali ako najefektívnejšie pre dosiahnutie zvýšenej nutričnej hodnoty rastlinných bielkovín, a to i) metabolické inžinierstvo esenciálnych aminokyselín, ii) expresia heterologických alebo zvýšená expresia homologických bielkovín bohatých na esenciálne aminokyseliny v transgénnych rastlinách a iii) proteínové inžinierstvo. Veľké nádeje sa vkladajú do ďalších dvoch novších prístupov a to *de novo* dizajnovania nutrične obohatených bielkovín a metódam riadenej evolúcie.

Metabolické inžinierstvo esenciálnych aminokyselín

V semenách rastlín sa okrem aminokyselín, ktoré sú viazané v bielkovinách, nachádzajú aj "voľné" aminokyseliny v cytozole, dostupné pre syntézu bielkovín a ako zdroj dusíka a energie napr. pre klíčenie semien. Metabolické inžinierstvo voľných esenciálnych aminokyselín vnášaním génov pre kľúčové enzýmy metabolických dráh je závislé na dôkladnej znalosti konkrétnej metabolickej dráhy, regulačných mechanizmov a limitujúcich krokov tejto dráhy.

Zvýšiť obsah určitej aminokyseliny je možné zvýšením jej biosyntézy a akumulácie, alebo spomalením jej degradácie v katabolickej časti metabolickej dráhy. Pri genetickej transformácii rastlín sa na tieto účely používajú

bud' rastlinné mutované gény, alebo gény bakteriálneho pôvodu nesenzitívne k spätnoväzbovej (feed-back) inhibícii konečným produktom biosyntetickej dráhy. V prípade ak ide o "posilnenie" biosyntézy esenciálnej aminokyseliny, je dôležité použitím vhodných regulačných elementov (promótor, leader sekvencie ai.) správne "načasovať" maximálnu biosyntézu, napr. počas maximálnej akumulácie semenných zásobných bielkovín. Metabolickým inžinierstvom biosyntetickej dráhy lyzínu použitím aspartát-kinázy a dihydrodipikolinát syntázy (DHDPS) nesenzitívnych k feed-back inhibícii FALCO a kol. (1998) dosiahli pri repke olejnej a sóji až niekoľko 100-násobné zvýšenie voľného lyzínu, čo viedlo k 2-5 násobnému zvýšeniu celkového lyzínu pri týchto rastlinách. Okrem zvýšenia obsahu esenciálnych aminokyselín má genetické inžinierstvo metabolických dráh syntézy aminokyselín význam aj pre zlepšenie rastu rastlín a zvýšenia odolnosti voči stresovým faktorom.

Vzhľadom na ohromnú komplexnosť a vzájomnú previazanosť rôznych metabolických dráh v živých organizmoch, vrátane rastlín, môže pri metabolickom inžinierstve modifikácia jedného génu v metabolickej dráhe ovplyvniť nielen obsah želanej esenciálnej aminokyseliny, ale aj iných, najmä tých, ktoré vznikajú zo spoločného prekurzoru, napr. treonín, metionín, lyzín a glutamín z aspartátu.

Nevýhodou metabolického inžinierstva sú často pozorované neočakávané a nežiaduce fenotypové zmeny transgénnych rastlín so zvýšenou akumuláciou určitej esenciálnej aminokyseliny (FRANKARD a kol., 1992). Tieto sa dajú - zatiaľ čiastočne - odstrániť použitím orgán-špecifických, alebo vývojovo regulovaných promótorov, resp. zvýšením zabudovania nadprodukovanej voľnej aminokyseliny do homologických alebo heterologických sink proteínov (BEAUREGARD a HEFFORD, 2006).

Expresia heterologických alebo homologických bielkovín s prirodzene vysokým obsahom esenciálnych aminokyselín.

Zrno obilnín - a všeobecne semená druhov rastlín patriacich do čeľade *Gramineae* - obsahuje hlavne dva druhy zásobných bielkovín: prolamíny (rozpustné v alkohole) a glutelíny (rozpustné v alkalických roztokoch). Prevažujú prolamíny, ktoré majú nízky obsah lyzínu (u kukurice napr. 0,1 g Lys/100 g bielkoviny), kým glutelíny, ktoré majú vyšší obsah lyzínu (v priemere 3,2 g Lys/100 g bielkoviny) sú prítomné v zásobných bielkovinách v nižšej koncentrácii. Preto je pri obilninách limitujúcou esenciálnou aminokyselinou lyzín. Naopak, pri strukovinách je nedostatočne zastúpená - či už v semenách alebo vegetatívnych častiach rastliny - najmä esenciálna síru obsahujúca aminokyselina metionín.

Prvé snahy zvýšiť obsah uvedených aminokyselín metódami genetického inžinierstva boli spojené s vnašaním génov kódujúcich bielkoviny s prirodzene vysokým obsahom lyzínu (napr. semenného vicilínu z *Pisum sativum*, β -fazeolínu z *Phaseolus vulgaris*, LRP [lysine rich protein] z *Psophocarpus tetragonolobus*, semenného albumínu A1 z *Amaranthus hypochondriacus* ai.) alebo metionínu (β -zeínu a δ -zeínu z kukurice, semenného albumínu SSA zo slnečnice, 2S albumínu z *Bertholetia excelsa* ai.) do genómov poľnohospodárskych plodín (SUN a LIU, 2004; BEAUREGARD a HEFFORD, 2006). Okrem génov pre rastlinné bielkoviny boli, najmä pri krmovinových druhoch, pokusy zvýšiť obsah metionínu a cysteínu vnašaním živočíšnych génov kódujúcich aminokyselinovo vyvážené bielkoviny, napr. vtáčieho ovalbumínu do lucerney (SCHROEDER a kol., 1991; FARAGÓ a kol., 2007).

Pri tomto type genetickej transformácie sú rozhodujúcimi faktormi použitie vhodných promótorov pre expresiu v semenách alebo vegetatívnych častiach rastliny a použitie rôznych iných regulačných sekvencií pre vhodnú kompartmentalizáciu syntetizovanej heterologickej či homologickej bielkoviny do vhodných bunkových organel, napr. plastidov alebo endoplazmatického retikula. Limitom sa môže stať aj dostupnosť voľných aminokyselín pre syntézu cudzorodej bielkoviny, čo sa rieši súčasnou expresiou génu kódujúceho bielkovinu bohatú na esenciálnu (-e) aminokyselinu (-y) a metabolickým inžinierstvom biosyntézy príslušnej (-ých) aminokyseliny (-ín) (BEACH a TARCZYNSKI, 2000).

Proteínové inžinierstvo.

Proteínové inžinierstvo ponúka možnosť modifikovať existujúce bielkoviny rastliny zabudovaním nadpočetných zvyškov esenciálnych aminokyselín do aminokyselinovej sekvencie polypeptidu. Táto metóda je závislá na sekvenovaní bielkovín a resyntéze novonavrhnutého polypeptidového reťazca. Výhodou použitia proteínového inžinierstva (v spojení s geneticou transformáciou rastlín) je to, že sa v rastline exprimuje gén pre bielkovinu, ktorá je rastline vlastná, t.j. jej biochemické mašinérie ju dokážu správne spracovať, kompartmentalizovať a alokovať. Nevýhodou je to, že je závislé na takých výmenách aminokyselín, ktoré nenarušujú ani folding, ani stabilitu či post-translačnú úpravu bielkoviny. Cieľmi pre proteínové inžinierstvo sa stali najmä zásobné bielkoviny rastlín, ktoré sa vyskytujú vo vysokej koncentrácii (v semenách alebo vegetatívnych častiach rastlín) ale majú nízky obsah esenciálnej aminokyseliny (napr. RAO a kol., 1994; HOFFMAN, 1996) a metodickým postupom miestošpecifická mutagenéza na substitúciu aminokyselín v polypeptidovom reťazci (RAO a kol., 1994).

De novo dizajnovanie bielkovín.

V niekoľkých laboratóriách vo svete prebieha výskum *de novo* dizajnovania nových nutritívnych bielkovín na základe princípov dizajnovania *ab initio*. Hoci prvé "umelé" polypeptidy boli vytvorené už koncom 90-tych rokov 20. storočia (napr. DeGRADO, 1988), až v súčasnosti bola vytvorená nutritívna *de novo* bielkovina MB-1 (Milk Bundle-1), ktorá bola úspešne exprimovaná v transgénnej sóji (SIMMONDS a DONALDSON, 2000) a lucerne (KHOUDI a BEAUREGARD, 2005). Stratégia *de novo* dizajnovania umožňuje oproti proteínovému inžinierstvu väčšiu flexibilitu pre aminokyselinové zloženie novej bielkoviny a pomocou tejto metódy je možné vytvárať úplne nové gény, ktoré sa nevyskytujú v prírode.

Metódy riadenej evolúcie.

Na rozdiel od horeuvedenej metódy, ktorej konečný úspech závisí z väčšej miery od rozvoja základného výskumu, veľké nádeje sa v posledných rokoch vkladajú do veľmi mladej metódy tzv. metódy riadenej evolúcie (CLAVEAU a kol., 2004). Metóda riadenej evolúcie využíva porovnanie sekvencií homologických bielkovín z rôznych rastlinných druhov, inkorporovanie zmien do sekvencií génov kódujúcich tieto bielkoviny pomocou chyby generujúcej PCR, tvorbu "knižnic" zmenených bielkovín a nakoniec skríning správne štruktúrne usporiadaných bielkovín pomocou špecifických protilátok (SLEISTER a RAO, 2002).

Záver

Potenciál biotechnológií pre vylepšovanie agronomických a aj kvalitatívnych vlastností poľnohospodárskych plodín je nespochybniteľný. Rozvoj v oblasti rastlinných biotechnológií pokračuje "míľovými krokmi" a pred dverami komercializácie (niektoré už za prahom) sú aj geneticky modifikované plodiny druhej (a pomaly aj tretej) generácie. Úplné využitie potenciálu týchto transgénnych rastlín však nezávisí len na nových vedeckých poznatkoch, ale najmä na "interakcii" medzi ekonomickými záujmami rôznych skupín na jednej strane a legislatívnymi bariérami a akceptovaním verejnosťou na strane druhej.

Literatúra

1. ALTENBACH, S.B. – PEARSON, K.W. – MEEDER, G. – STARACI, L.C. – SUN, S.S.M.: In: Plant Mol. Biol., 13, 1989, s. 513-522.
2. BEACH, L. – TARCZYNSKI, M.C.: US Patent 6,127,600, 2000
3. BEAUREGARD, M. – HEFFORD, A.: In: Plant Biotech. J., 4, 2006, s. 561-574.
4. BRIGHT, S.W.J. – SHEWRY, P.R.: In: Crit. Rev. Plant Sci., 1, 1983, s. 49-93.
5. GMO Compass: 2007, <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db>
6. JAMES, C.: 2006, URL: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/executivesummary/default.html>
7. FALCO, S.C. – KEELER, S.J. – RICE, J.A.: US patent 5,773,691, 1998.
8. FARAGÓ, J. – MIHÁLIK, D. – FARAGOVÁ, N. – FÁRI, M. – KRAIC, J.: In: Libiaková, G. – Gajdošová, A. (Eds.) Book Abstr. 7th Int. Symp. „Recent Advances in Plant Biotechnology“, Stará Lesná, June 10-16, 2007, Inst. Plant Genet. Biotech., Nitra, SK, s. 71.
9. FRANKARD, V. – GHISLAIN, M. – JACOBS, M.: In: Plant Physiol., 99, 1992, s. 1285-1293.
10. GALILI, G. – HÖFGEN, R.: In: Metab. Engineering, 4, 2002, s. 3-11.
11. GMO Compass: 2007, <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db>
12. HOFFMAN, L.M.: US Patent 5,576,203, 1996
13. JAMES, C.: 2006, URL: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/executivesummary/default.html>
14. KHOUDI, H. - BEAUREGARD, M.: In: Plant Physiol. Biochem., 43, 2005, s. 1039-1043.
15. MŽP ČR: 2006a, URL: [http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/\\$pid/MZPMVFF2S26Q/\\$file/oe-1674ENV06_UEB_rozhodnuti-20060504.pdf](http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/$pid/MZPMVFF2S26Q/$file/oe-1674ENV06_UEB_rozhodnuti-20060504.pdf)
16. MŽP ČR: 2006b, URL: [http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/\\$pid/MZPMVFFCZPHX/\\$file/oe-5091ENV06_BASF_rozhodnuti-20060526.pdf](http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/$pid/MZPMVFFCZPHX/$file/oe-5091ENV06_BASF_rozhodnuti-20060526.pdf)
17. PAINE, J.A. – SHIPTON, C.A. – CHAGGAR, S. – HOWELLS, R.M. – KENNEDY, M.J. – VERNON, G. – WRIGHT, S.Y. – HINCHLIFFE, E. – ADAMS, J.L. – SILVERSTONE, A.L. – DRAKE, R. : In: Nat. Biotechnol., 23, 2005, s. 482-487.
18. RAO, A.G. - HASSAN, M. - HEMPEL, J.C.: In: Protein Eng., 7, 1994, s. 1485-1493.
19. SIMMONDS, D.M. – DONALDSON, P.A.: In: Plant Cell Reports, 19, 2000, s. 485-490.
20. SCHROEDER, H.E. – KHAN, M.R.I. – KNIBB, W.R. – SPENCER, D. – HIGGINS, T.J.V.: In: Aust. J Plant Physiol., 18, 1991, s. 495-505
21. SLEISTER, H.M. - RAO, A.G.: In: Immunol. Methods, 261, 2002, s. 213-220.
22. SUN, S.S.M. – LIU, Q.: In: In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 40, 2004, s. 155-162.
23. USDA-APHIS: 2006, URL: http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs2/04_22901p_com.pdf
24. YE, X. – AL-BABILI, S. – KLOTI, A. – ZHANG, J. – LUCCA, P. – BEYER, P. – POTRYKUS, I.: In: Science, 287, 2000, s. 303-305.

MOŽNOSTI ŠLECHTĚNÍ PŠENICE PRO PRODUKCI BIOETANOLU POTENTIAL OF WHEAT BREEDING FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Tibor SEDLÁČEK – Oldřich FAMĚRA – Václav DVOŘÁČEK – Pavel HORČIČKA

Energy security and climate change imperatives require large-scale substitution of petroleum-based fuels as well as improved vehicel efficiency. The most powerful potential for this substitution has a production of bioethanol from agriculture. In Czech republic, respective in whole central Europe wheat is aimed for this production. Unfortunately there are no wheat varieties specialized for bioethanol production, because breeding has been long focused on food and animal feed quality. Wheat variety should have high content of starch as a source of glucose for ethanol fermentation. For success of breeding is important presence of gene sources. We had screened 90 landraces and varieties for starch content. Results showed content of starch in range from 60% to 68,2% of dry matter. It is possible to say that there are present gene sources with high starch content suitable for breeding of wheat for bioethanol production. Quality of starch should be important factor too and it is under research.

Key words: bioethanol, starch, gene sources, breeding

Úvod

Dopravní prostředky v současné době využívají pro svůj pohon paliva prakticky výhradně fosilního původu. Spotřeba energie v dopravě se blíží 40% celkové spotřeby energie ve světě. Stále silněji se projevuje vliv trvale rostoucí produkce skleníkových plynů na klimatické podmínky planety a potvrzuje se vyčerpatelnost fosilních zdrojů energie. Největší potenciál jako alternativní zdroj paliva pro dopravní prostředky má produkce bioetanolu ze zemědělských komodit. V podmínkách ČR, respektive v podmínkách střední Evropy, se pro tyto účely počítá s využitím pšenice a tritikale. Bohužel nejsou dostupné cíleně vyšlechtěné odrůdy z důvodu dlouhodobého soustředění šlechtitelských programů na potravinářskou a krmnou kvalitu. Pro úspěšnost šlechtění jsou nezbytné genové zdroje. Naším cílem bylo zjistit, zda jsou v kolekcích genových zdrojů genové banky VÚRV Ruzyně perspektivní materiály pro šlechtění odrůd pšenice vhodných pro lihovarské využití.

Materiál a metody

U souboru odrůd a novošlechtění z pokusů ORO ÚKZÚZ byl stanoven obsah škrobu metodou dle Ewerse (ČSN EN ISO 10520, 1999) a metodou blízké infračervené spektroskopie (NIR). Vzorčky byly dále sešrotovány na mlýnu Perten 3100. Byla zjištěna výtěžnost ethanolu kvasnou zkouškou. Na základě statisticky průkazné korelace obsahu škrobu s výtěžností bioetanolu (litřů etanolu na 100kg šrotu) bylo přistoupeno k vyhledávání genových zdrojů. Byly analyzovány vybrané materiály z genové banky VÚRV Ruzyně (tab.1) a u těchto materiálů byl zjištěn obsah škrobu metodou dle Ewerse.

Výsledky a diskuze

U sledovaného souboru materiálů z pokusů ORO ÚKZÚZ byla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi obsahem škrobu (ČSN) a výtěžností ethanolu $r = 0,51$, respektive $r = 0,63$ mezi obsahem škrobu (NIR) a výtěžností ethanolu. Přestože jsou závislosti statisticky průkazné, korelační koeficienty jsou poměrně nízké. Tento problém může být způsoben nízkou vypovídací hodnotou použité metody pro stanovení škrobu, případně dalšími faktory ovlivňujícími výtěžnost škrobu jako např. granulace škrobu, přítomnost mykotoxinů atd. Nižší přesnost metody dle Ewerse zjistily i další experimenty (KENNEDY et.al, 2006). Pro účely vyhledávání genových zdrojů a šlechtění odrůd pšenice vhodných pro produkci bioetanolu bude nezbytné používat přesnější metodu. Potenciál pro splnění těchto požadavků má enzymatická metoda dle McCLEARYHO (McCLEARY et. al., 1997).

Ze sledovaných materiálů se jako perspektivní jeví odrůda Bet Hashita s 68,2% škrobu v sušině.

Závěr

Na základě získaných poznatků je možno konstatovat, že v kolekcích genových zdrojů jsou přítomny materiály s vysokým obsahem škrobu. Tyto materiály mají potenciál pro využití ve šlechtění odrůd pšenice vhodných pro produkci bioetanolu.

Tato práce je podporována projektem NAZV 1G58076 a projektem MZe ČR 0002700602.

Literatura

1. ČSN EN ISO 10520, Přírodní škrob - Stanovení obsahu škrobu - Ewersova polarimetrická metoda, 1999, ČNI, kat.č. 56211
2. Kennedy J.F., Stevenson D.L.: An Objective Illustration of the Inadequacy of the Official EC Ewers Method for the Determination of Starch, in Starch, 2006, 42, 1, 8 - 12
3. McCleary, B.V., Gibson, T. S. and Mugford, D. C: Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase – α -amylase method: Collaborative study, in J.AOAC Int., 1997, 80, 571-579

Tabuľka 1: Obsah škrobu u sledovaných genových zdrojů (% sušiny)

Odrůda	Škrob %	Odrůda	Škrob %
Ackermanns Bayernkoenig	61,04	LD 164 (Langdon)	62,22
Ackermanns Bayernkoenig	60,83	Leguan	65,40
Admonter Frueh	61,58	Ljutescens 1060/10	62,11
Apu	63,14	Ljutescens 1060/10	63,49
Aranka	64,90	Ljutescens 59	64,33
Atle	61,10	Ljutescens 59	64,59
Banater Winterweizen	63,93	Local	63,36
Banater Winterweizen	63,51	Lorro	64,85
Banater Winterweizen	63,62	Marienhofer Kolben	61,86
Banater Winterweizen	64,61	Marienhofer Kolben	62,09
Banater Winterweizen	63,39	Marienhofer Kolben	62,24
Bergland	59,99	Mario	65,95
Bergland	62,30	Mestnaja turkovskaja	61,65
Bet Hashita	68,19	Niederndorferberg (Tirol)	61,59
Ble du Jura	63,33	Odesskaja 16	63,83
Ble du Jura	63,23	Pitic 62	65,53
Ble du Jura	63,34	Postoloprtska presivka 102	63,46
Ble du Jura	61,72	Relin	64,98
Ble du Jura	62,71	Remo	63,98
Bokal	64,45	Rieti 11	63,36
Breisgauer glatter Landweizen	61,58	Rosamova ceska cervena presivka	62,37
Breisgauer glatter Landweizen	62,75	Sakha 80	65,46
Canthatch	63,18	Samanta	63,08
Capega	63,33	Saratovskaja 29	63,76
Dankowska Graniatka	64,35	Sarka	63,41
Dregerova ceska vouska	62,92	Siete Cerros T 66	65,49
Dundee	63,34	Slazaczka	62,61
Dwarf Eagle	64,36	Slazaczka	63,79
Festival	62,00	Slazaczka	64,56
Flambard	65,27	Sonett	64,81
Florence-Aurore	63,33	Sperlings Sinnslebener NZ	62,48
Gavilan	65,78	Strubes General von Stocken	61,13
Harrachweizen	62,85	Svaloefs Diamant II	62,12
Hatvani	62,09	Tryumf Mikulic	64,09
Hatvani 5612	63,64	Tun-czjao No. 5	62,05
Hatvani 5612	62,54	v. Stieglers Sieges	61,08
Hodoninska bezosinna	61,65	v. Stieglers Sieges	63,07
Hohenwetttersbacher Braun	62,35	Vanek	65,03
Che-czo No. 2	61,15	Vega	62,03
Chiddam	62,49	Venera	66,45
Ilona	64,36	Wieselburger Kolben	62,16
Jara	65,22	Yeoman	62,07
Jubile	62,87	Yeoman	62,06
Jubile	63,00	Zebra	64,96
Ksiazce Andrzej	61,44	Zlatka	62,99

Adresa autorov:

Sedláček Tibor, Horčíčka Pavel - Výzkumné centrum SELTON, s.r.o., Stupice 24, Sibřina 250 84

Faměra Oldřich – ČZU, FAPPZ, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbát 165 21

Dvořáček Václav – VÚRV, Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně 161 06

HODNOTENIE OBILNÉHO ŠKROBU PRE PRODUKCIU BIOETANOLU EVALUATION OF CEREAL STARCH FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Daniela MIKULÍKOVÁ – Viera HORVÁTHOVÁ – Ján KRAIC – Alžbeta ŽOFAJOVÁ

The aim of our study was the evaluation of genetic and environmental factors' influence on main wheat grain parameters which are necessary for bioethanol production: starch content, amylose/amylopectin ratio and α -amylase (α -AMS) activity. 48 wheat cultivars from two years and 16 cultivars from four different regions was appreciated. There were differences between individual cultivars in all three parameters. The highest starch content was observed in wheat cultivars grown in Slovak region Vígľaš-Pstruša. Starch content and α -AMS activity were markedly increased in lower temperature and more rainfall during grain maturation. Locality and year did not effect on amylose/amylopectin ratio. From the point of view evaluated parameters, new Slovak cultivars Pavlína and Veldava are perspective for bioethanol production. Both these cultivars are high in starch and amylopectin content and α -AMS activity.

Key words: α -amylase, amylose/amylopectin, rye, starch, triticale, wheat

Úvod

Snaha o ekologizáciu životného prostredia (najmä zníženie emisií škodlivých látok do ovzdušia) vyústila do vypracovania dokumentu Rady Európy č. 39/97, ktorý určuje zloženie reformulovaných pohonných hmôt obsahujúcich alkoholy, prípadne butylétery z nich vyrobené (MTBE alebo ETBE). Okrem toho smernica EÚ č. 93/500 EEC č. 1972 stanovuje ciele na dosiahnutie náhrad spotreby energií obnoviteľnými zdrojmi a stanovuje odporúčenia v oblasti daňových úľav, potrebných na spracovanie poľnohospodárskych surovín ako náhrady za lacnejšie suroviny fosilného pôvodu.

Na produkciu bioetanolu sú vhodné suroviny s vysokým obsahom škrobu, lignínu, celulózy alebo hemicelulózy, ktoré možno hydrolyzovať na skvasiteľné monosacharidy. Vzhľadom na nadprodukciiu sú obilniny vhodným materiálom na výrobu palivového etanolu. Za limitnú hranicu rentability sa považuje 65% škrobu v sušine zrna. Z hľadiska efektívnej rastlinnej produkcie v SR je perspektívnym zdrojom pre využitie na energetické účely škrob zo zrna pšenice a tritikale. Možno ich úspešne pestovať najmä v marginálnych oblastiach.

Škrob je jedným z najrozšírenejších a najvýznamnejších rastlinných polysacharidov na Zemi. Ako zdroj chemickej energie ho využívajú živočíchy, vyššie rastliny aj mikroorganizmy. Škrob má veľký význam v humánnej výžive i v technickej praxi. Nachádza sa v semenách a hl'uzách rastlín (obilniny, pseudoobilniny, strukoviny, zemiaky a ďalšie plodiny). Syntetizuje sa v endosperme semien vo forme zásobného škrobu alebo v chloroplastoch počas fotosyntézy vo forme prechodného škrobu. Z chemického hľadiska je škrob zmesou dvoch α -D-glukózových homopolymérov: 20-30% amylozy a 70-80% amylopektínu.

Amylóza je dlhý lineárny α -glukán zložený z 200-700 glukózových jednotiek, ktoré sú pospájané α -1,4 glykozidovými väzbami. Amylopektín je tiež zložený z glukózových reťazcov, spojených α -1,4-glykozidovými väzbami. Sú však kratšie než reťazce amylozy a sú vetvené tak, že nad každou 10. až 12. jednotkou je α -1,6-glykozidovou väzbou pripojený ďalší reťazec.

Škrob sa nachádza v rastlinách vo forme škrobových zŕn A-typu alebo B-typu, ktoré sa líšia veľkosťou, tvarom, chemickým zložením a fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Zrná A-typu sú väčšie ($>10 \mu\text{m}$), majú lentikulárny tvar. Škrobové zrná B-typu sú menšie ($<10 \mu\text{m}$), sú sférické a v porovnaní s A-typom obsahujú menej amylozy a viac fosfolipidov.

Od podielu amylozy a amylopektínu závisia fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu. Prejavujú sa najmä v rozdielnej rozpustnosti, napučíavaní, želatinizácii, retrogradácii a stráviteľnosti a majú určujúci význam z hľadiska využitia škrobu. Škrob má široké uplatnenie vo výrobe potravín i v technickej praxi. Škroby s vysokým obsahom amylopektínu sú vhodné na výrobu papiera, adhezív, piva, cestovín a mrazených potravín. Vysoký podiel amylozy ich predurčuje na výrobu funkčných potravín na báze zdraviu prospešného rezistentného škrobu, na použitie v cukrárenstve a na výrobu fotografických filmov.

Cieľom práce bolo analyzovať vplyv plodiny, odrody a poveternostných faktorov na parametre, ktoré majú významný vplyv na produkciu etanolu: obsah škrobu, podiel amyloza/amylopektín v ňom a enzýmová aktivita α -amylázy (α -AMS), ktorá hrá dôležitú úlohu v jeho degradácii.

Materiál a metódy

Na porovnanie sledovaných parametrov v jednotlivých druhoch obilnín sa použilo 26 odrôd pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum* L.), 11 odrôd raže siatej (*Secale cereale* L.) a 13 odrôd ozimného tritikale (*X Triticosecale* Wittmarck). Plodiny boli pestované v jednej lokalite (Borovce pri Piešťanoch) v r. 2005.

Na zistenie vplyvu lokality na hodnotené parametre sa vybralo 16 odrôd pšenice letnej, f. ozimnej, pestovaných v 4 lokalitách (Malý Šariš, Michalovce, Vígľaš-Pstruša a Borovce), ktoré sa významne líšia nadmorskou výškou, priemernou dennou teplotou a množstvom zrážok počas vegetačného obdobia. Lokality Borovce a Michalovce patria medzi teplé suché oblasti s nižšou nadmorskou výškou. Vígľaš-Pstruša a Malý Šariš sú v zemiakovej výrobnnej oblasti s vyššou nadmorskou výškou.

Vplyv vegetačného roku na jednotlivé parametre sa hodnotil v 48 odrodách pšenice letnej f. ozimnej pestovaných v lokalite Borovce v r. 2005 a 2006.

Na stanovenie obsahu škrobu sa použila akceptovaná polarimetrická metóda stanovenia škrobu STN 46 1011-37 podľa Ewersa. Po kyslej hydrolyze vo vriacom vodnom kúpeli, vyčírení pomocou Carrezovho činidla I a II a filtrácii sa oproti destilovanej vode merala optická aktivita filtrátu (digitálny polarimeter GENEQ 3001, fa Kruss). Ako štandardná vzorka sa použila $50\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ glukóza; kontrolnou vzorkou bol šrot pšenice s obsahom škrobu $0,65\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ šrotu.

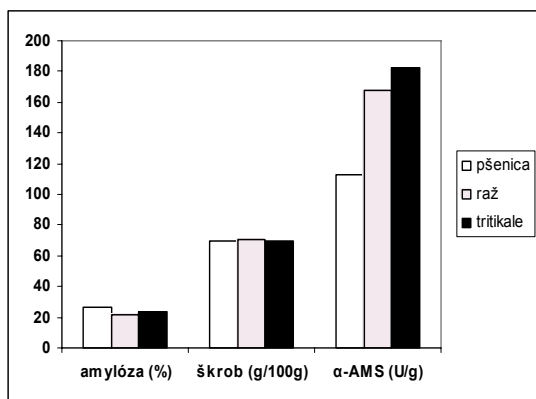
Podiel amylyózy a amylopektínu v škrebe sa určil pomocou kitu Amylose/Amylopectin Assay Kit (Megazyme, Írsko). Škrob sa kompletne dispergoval v dimetylsulfoxide vo vriacom vodnom kúpeli. Lipidy sa odstránili po precipitácii v etanole. Pridaním konkanavalínu A sa vyzrážal amylopektín a odstránil sa centrifugáciou. Amylóza sa nechala zhydrolyzovať enzýmovou zmesou (30 U amyloglykozidázy a 4,5 U α -AMS). Vzniknutá glukóza sa stanovila enzýmovou metódou pomocou enzýmového činidla, obsahujúceho glukózaoxidázu a peroxidázu. Extinkcia červeného komplexu sa merala pri 510 nm oproti 0,1 M octanovému tlmiavému roztoku pH 4,5. Ako štandardná vzorka sa použila glukóza ($1\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$); kontrolná vzorka šrotu mala obsah amylyózy $0,7\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ škrobu.

Aktivita α -AMS sa stanovila kitom Alpha-amylase assay procedure (Megazyme). Enzýmová aktivita je priamo úmerná množstvu p-nitrofenolu, ktorý sa uvoľní po 20 min inkubácii pri 40°C a pH 5,4 zo syntetického substrátu BPNPG7 (p-nitrofenyl-maltoheptaosid). Po zastavení reakcie pomocou tris-hydroxymetylaminometánu sa extinkcia žltého komplexu merala pri 400 nm oproti destilovanej vode. Ako štandard sa použil p-nitrofenol (molárny extinkčný koeficient E_{mM} 18,1). Enzýmová aktivita α -amylázy v šrote kontrolnej pšenice bola $340 \text{ CU} \cdot \text{g}^{-1}$.

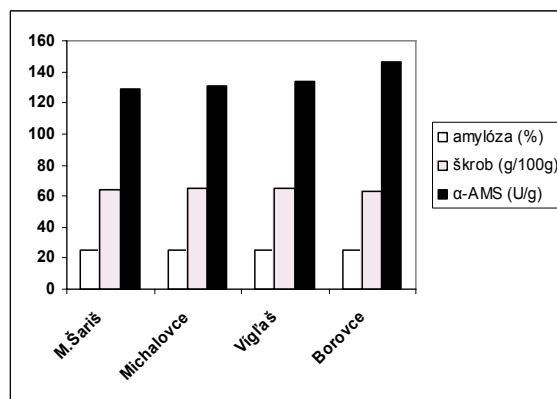
Cereálna jednotka (CU) je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré je v prítomnosti nadbytku termostabilnej α -glukozidázy potrebné na uvoľnenie 1 μmol p-nitrofenolu z BPNPG7 za min pri 40°C a pH 5,4.

Všetky analýzy sa robili v 2 opakovaniach. Výsledky sa prerátali na obsah sušiny.

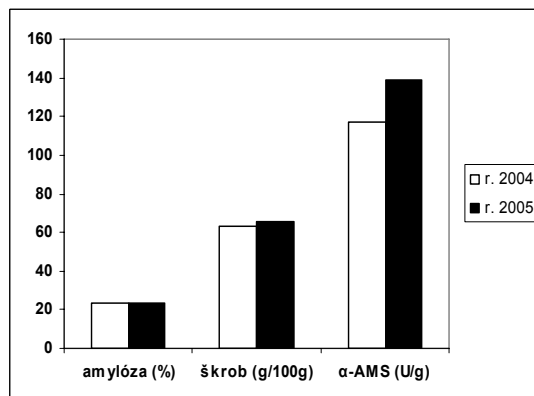
Výsledky a diskusia



Graf 1. Hodnotenie parametrov škrobu v 3 obilninách



Graf 2. Hodnotenie parametrov škrobu v 4 lokalitách



Graf 3. Hodnotenie parametrov škrobu v 2 ročníkoch

Zistili sa rozdiely v aktivite α -AMS aj v podieli amylyózy medzi jednotlivými obilninami (Graf 1) aj medzi odrodami v rámci jedného druhu. Priemerné hodnoty obsahu škrobu ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ sušiny šrotu) klesali v poradí:

raž (70,38), pšenica (69,90) a tritikale (69,61). Enzymová aktivita α -AMS ($\text{CU} \cdot \text{g}^{-1}$) bola: v tritikale 182,34, v raži 167,16 a v pšenici 113,19. Podiel (%) amyλόzy v škrobe týchto obilnín bol: pšenica 26,51, tritikale 23,08 a raž 22,02. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že na etanolovú fermentáciu je tritikale vhodnejšie než pšenica, zvlášť niektoré jeho odrody (Asper, Kendo, Kolor, Largus, Presto a Tricolor). V porovnaní so pšenicou majú vyšší obsah škrobu, vyšší podiel amylopektínu v ňom a vyššiu autoamylolytickú aktivitu.

Vplyv lokality sa hodnotil v 16 odrodách pšenice letnej f. ozimnej pestovaných v 1 roku na 4 miestach (Malý Šariš, Michalovce, Vigľaš-Pstruša a Borovce), ktoré sa významne líšia nadmorskou výškou, priemernou ročnou teplotou a množstvom zrážok (Graf 2). Najvyšší priemerný obsah škrobu ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) mali odrody pšenice pestované v lokalite Vigľaš-Pstruša (65,07), najnižší z Boroviec (62,80). Vysoký obsah škrobu mali odrody Pavlína, Torsya, Venistar, Mladka, Acteur a Cubus z lokality Vigľaš-Pstruša. Odroda Pavlína mala vysoký obsah škrobu vo všetkých hodnotených lokalitách. Odroda Veldava mala vysokú aktivitu α -AMS vo všetkých hodnotených lokalitách. Aktivita α -AMS bola ovplyvnená viac odrodou než lokalitou; bola vyššia pri odrodách s horšou potravinárskou kvalitou. Daždivé počasie počas dozrievania zrna v Borovciach zvýšilo aktivitu α -AMS viac v odrodách s horšou kvalitou než v odrodách s dobrou chlebopekárskou kvalitou. Lokalita pestovania neovplyvnila podiel amyλόzy v škrobe. Podiel amyλόzy v škrobe bol nižší v odrodách s dobrou kvalitou.

Vplyv vegetačných rokov (2004 a 2005) sa hodnotil v 48 odrodách pšenice letnej f. ozimná, pestovanej v lokalite Borovce. Roky sa výrazne líšili počasím, najmä počas vegetačného obdobia. V r. 2005 boli oproti r. 2004 vyššie priemerné teploty v máji a vysoké zrážky v júli, čo výrazne zhoršilo chlebopekársku kvalitu pšenice. Odrody pšenice v r. 2005 mali vyšší obsah škrobu aj vyššiu aktivitu α -AMS, pričom podiel amyλόzy v škrobe sa nezmenil (Graf 3).

Biosyntézu škrobu katalyzuje 14 rôznych enzýmov, pričom tri z nich možno považovať za kľúčové: ADP-glukóza-pyrofosforyláza (AGP), syntetáza škrobu (SS) a enzým vetviaci škrob (BE). Enzým AGP je zodpovedný za tvorbu ADP-glukózy ako monoméru pre syntézu polymérneho škrobu, SS spôsobuje predlžovanie reťazca a BE sa podieľa na vetvení reťazcov do klastrovej štruktúry. Všetky tri enzýmy sa nachádzajú vo viacerých izoformách a majú rôznu enzymovú aktivitu a fyzikálno-chemické a imunologické vlastnosti. Sú kódované rozdielnymi génmi a líšia sa primárnou štruktúrou, molekulovou hmotnosťou, hodnotou Michaelisovej konštanty K_m , citlivosťou k aktivátorom a inhibítorom, teplotným optimom a podobne. Gény, ktoré kódujú ich syntézu, možno klonovať a introdukovať do iných genotypov. Syntézu škrobu možno ovplyvniť aj mutáciou na rôznych lokusoch.

In vivo prebieha syntéza amyλόzy i amylopektínu simultánne. V zastúpení ich podielu v škrobe majú rozhodujúcu úlohu špecifické izoenzýmy: syntetáza škrobu viazaná na granuly (GBSSI) a vetviaci enzým BEIIb. Na granuly viazaná syntetáza škrobu je v obilninách kódovaná *WAXY* lokusom, v zemiaku *AMF* a v hrachu *LAM* lokusmi. Vhodnou mutáciou, ktorá spôsobí stratu tejto izoformy, možno v škrobe znížiť prípadne celkom eliminovať obsah amyλόzy. Škroby týchto *waxy* mutantov obsahujú iba amylopektín. Mutácia na lokuse *AMYLOSE-EXTENDER* (*AE*) v obilninách alebo na *RUGOSUS* (*R*) lokuse hrachu spôsobujú stratu izoenzýmu BEIIb, ktorý prednostne vetví amylopektín. Dôsledkom oboch mutácií je zvýšený podiel amyλόzy v škrobe.

Šľachtením alebo pomocou biotechnológií možno cielene získať škrob s požadovaným zastúpením amyλόzy a amylopektínu podľa účelu, na ktorý je určený.

Vyšší obsah amylopektínu v škrobe spôsobuje jeho vysokú rozpustnosť a veľkú schopnosť napučiavať a viazať vodu (NEBESNY et al., 2002; SŁOMIŃSKA et al., 2003). Teplotný interval mazovatenia posúva do oblasti vyšších teplôt (SASAKI et al., 2002).

V ostatnom čase sa intenzívne študuje kinetika hydrolýzy škrobu vo vzťahu k podielu amyλόza/amylopektín v ňom. Schopnosť hydrolýzy škrobu sa zvyšuje v poradí (RENDLEMAN, 2000): 100% amyλόza < vysoký obsah amyλόzy < normálny obsah amyλόzy < 0% amyλόza (= 100% amylopektín). Skutočnosť, že škrob bez amyλόzy (*waxy*) má väčšiu schopnosť hydrolyzovať, potvrdili aj iní autori (BARREDO et al., 2001; NODA et al., 2002; 2003). Prítomnosť komplexu amyλόzy s lipidmi totiž negatívne ovplyvňuje schopnosť viazať vodu a napučiavať. Línie jačmeňa s *amo1* génom, ktorý spôsobuje zvýšený podiel amyλόzy v škrobe, majú zlú sladovnícku kvalitu. Tieto línie majú významne zníženú aktivitu β -AMS, ktorá je jedným z ukazovateľov sladovníckej kvality.

V škroboch bez amyλόzy sa zistila vyššia rýchlosť aj vyšší stupeň hydrolýzy než v škroboch s normálnym alebo zvýšeným podielom amyλόzy. V zhode s tým sa zistilo, že na hydrolýzu sú vhodnejšie malé škrobové granuly typu B, ktoré majú nižší obsah amyλόzy. Vysoký podiel amyλόzy totiž spôsobuje rezistenciu voči degradácii škrobu α -amyložou.

V súčasnosti sú už známe faktory, ktoré priamo ovplyvňujú produkciu bioetanolu. Patria k nim: vysoký obsah škrobu, schopnosť rýchleho skvapalnenia, nízka viskozita počas skvapalňovania a vysoká rýchlosť a účinnosť fermentácie (ROSENBERGER, 2005; ROSENBERGER et al., 2002; 2005; WU et al., 2006; 2007).

Ojedinele sa objavili informácie o niektorých *waxy* odrodách kukurice a o transgénnom *waxy* zemiaku ako mimoriadne vhodných zdrojoch na produkciu etanolu.

Domnievame sa, že pre výrobu bioetanolu má veľký význam molekulárne šľachtenie (MAS) pšenice za účelom získania línie s vysokým obsahom škrobu bez amyλόzy. Možno to dosiahnuť zablokovaním enzymovej aktivity GBSSI (na granuly viazaná syntetáza škrobu), ktorá je v pšenici regulovaná *WAXY*

génmi: $Wx-A_1$ (7AS chromozóm), $Wx-B_1$ (4AL) a $Wx-D_1$ (7DS). Zabudovaním troch nulových waxy alel sa podiel amylózy v škrobe zníži takmer na nulovú hodnotu. V praxi bežne používané slovenské a české odrody majú približne rovnaký podiel amylózy v škrobe (21-25%) a neovplyvňuje ho lokalita ani ročník. Existujú však odrody s vysokým obsahom škrobu aj s vysokou aktivitou α -AMS. Zabudovaním troch nulových waxy alel do ich genómu možno cielene získať línie bez amylózy, ktoré budú mať všetky predpoklady pre účinnú hydrolyzu a pre produkciu etanolu.

Záver

- 1) Niektoré odrody tritikale (Asper, Kendo, Largus, Presto, Radko, Tricolor, Woltario) majú v porovnaní so pšeniceou a ražou vyššiu enzýmovú aktivitu α -AMS, vyšší obsah škrobu a nižší podiel amylózy. Sú preto veľmi vhodné pre etanolovú fermentáciu. Perspektívna je aj nová línia tritikale TC 16/04 z Výskumného šľachtiteľského stanice Vígľaš-Pstruša.
- 2) Lokalita Vígľaš-Pstruša je mimoriadne vhodnou na produkciu pšenice a tritikale s vysokým obsahom škrobu.
- 3) Daždivé počasie počas dozrievania zrna významne zvyšuje obsah škrobu aj enzýmovú aktivitu α -AMS v zrne pšenice.
- 4) Podľa našich predbežných výsledkov sú na produkciu bioetanolu simultánnou sacharifikáciou a fermentáciou vhodné odrody s vysokým obsahom škrobu, vysokou autoamylolytickou aktivitou a nižším podielom amylózy.
- 5) Pre produkciu palivového etanolu sú perspektívne novo vyšľachtené slovenské odrody pšenice letnej f. ozimnej: Pavlína a Veldava.

Literatúra

1. BARREDO MOGUEL, L.H. - ROJAS de GANTE, C. - SERNA SALDIVAR, S.O.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 59: 24-27, 2001.
2. NEBESNY, E. - ROSICKA, J. - TKACZYK, M.: Starch/Stärke 54: 603-608, 2002.
3. NODA, T. - KIMURA, T. - OTANI, M. - IDETA, O. - SHIMADA, T. - SAITO, A. - SUDA, I.: Carbohydr. Polym. 49: 253-260, 2002.
4. NODA, T. - NISHIBA, Y. - SATO, T. - SUDA, I.: Cereal Chem. 80: 193-197, 2003.
5. RENDLEMAN, J.A.: Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 171-178, 2000.
6. ROSENBERGER, A.: Zuckerindustrie 130: 697-701, 2005.
7. ROSENBERGER, A. - KAUL, H.P. - SENN, T. - AUFHAMMER, W.: Ind. Crop. Prod. 15: 91-102, 2002.
8. ROSENBERGER, A. - KAUL, H.P. - SENN, T. - AUFHAMMER, W.: J. Agronom. Crop Sci. 185: 55-65, 2000.
9. SASAKI, T. - YASUI, T. - MATSUK, J. - SATAKE, T.: Cereal Chem. 79: 861-866, 2002.
10. SŁOMIŃSKA, L. - WIŚNIEWSKA, D. - GRZEŚKOWIAK, A.: Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2: 17-26, 2003.
11. WU, X. - ZHAO, R. - WANG, D. - BEAN, S.R. - SEIB, P.A. - TUINSTRA, M.R. - CAMPBELL, M., - O'BRIEN, A.: Cereal Chem. 83: 569-575, 2006.
12. WU, X. - ZHAO, R. - BEAN, S.R. - SEIB, P.A. - McLAREN, J.S. - MADL, R.L. - TUINSTRA, M. - LENZ, M.C. - WANG, D.: Cereal Chem. 84: 130-136, 2007.

Autori ďakujú Ing. E. Rückschlossovi a Ing. P. Hauptvoglovi, PhD., za poskytnutie rastlinného materiálu a p. S. Hrušíkovej za technickú pomoc pri chemických analýzach.

Adresa autorov:

RNDr. Daniela Mikulíková, CSc., Doc. RNDr. Ján Kraic, PhD. a Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., Výskumný ústav rastlinnej výroby SCPV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany; Ing. Viera Horváthová, PhD., Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava
e-mail: mikulikova@vurv.sk, viera.horvathova@ucm.sk, kraic@vurv.sk, zofajova@vurv.sk

PRVÉ POZNATKY Z HODNOTENIA DIASPÓR HOSPODÁRSKY VÝZNAMNÝCH DRUHOV ČIERNYCH HĽUZOVIEK THE FIRST RESULTS FROM EVALUATION OF DIASPORES ECONOMICALLY IMPORTANT BLACK TRUFFLES

Ján GAŽO – Marian MIKO

*Inventory research focused on economically important black truffles in natural localities of Slovak republic in 2005 and 2006 revealed presence of four species: *Tuber aestivum*, *T. brumale*, *T. macrosporum* and *T. mesentericum* in forests. Ripe carpophores were morphologically described. Analysis of truffle bed pH values indicates, that from mentioned species is *T. aestivum* capable fructificate in most wide range of values from 6,59 – 7,85. Period of truffle ripening in relation to climatic conditions of Central Europe preferred *T. aestivum* for experiments with cultivation. In studied carpophores of *T. aestivum* were observed both forms: *aestivum* and *uncinatum*. For perspectives of truffle cultivation is economically more profitable forma *uncinatum*. Establishment of truffle plantations requires planting of truffle inoculated host tree species on farm land. This kind of semi-culture is known as agroforestry.*

Key words: Truffle, habitat, fruitbody, pH, agroforestry.

Úvod

Hľuzovky *Tuber* spp. sú vreckaté huby, ktoré vytvárajú ektomykoriznú symbiózu s rozličnými druhmi drevín a krov. Výsledkom tohto vzájomného spolužitia je tvorba plodníc známych ako hľuzovky. Niektorí zástupcovia rodu *Tuber* vytvárajú jedlé plodnice, ktoré sú na svetových trhoch vysoko cenené pre svoju arómu. Výskum týchto húb sa zameriava na podporu pestovania hľuzoviek s cieľom pokryť rastúci celosvetový dopyt a poskytnúť náhradu za katastrofálny pokles ich produkcie zo zberov vo voľnej prírode (HALL et al., 2003). Pestovanie hľuzoviek už nie je len Európskou poľnohospodárskou výrobou, hoci väčšina hospodársky významných druhov sa prirodzene vyskytuje v Európe. Hľuzovkové výsadby sa zakladajú v rozličných krajinách celého sveta vrátane Nového Zélandu, Austrálie a USA. Hoci sú naše poznatky detailných aspektov biológie hľuzoviek a ich ekologických požiadaviek v súčasnosti len málo známe, pestovanie hľuzoviek sa neustále rozširuje.

Materiál a metódy

Lokality výskytu hľuzoviek boli identifikované cvičenými psami počas inventarizačného výskumu v rokoch 2005 a 2006. Geografická charakteristika lokality – nadmorská výška, zemepisná dĺžka a šírka, boli určené pomocou GPS prístroja. V zmysle rozhodnutia č. 3800/1184/04-5.1 Ministerstva životného prostredia SR, v príspevku neuvádzame popisné údaje o jednotlivých lokalitách. Taxonomické zaradenie jednotlivých vzoriek plodníc bolo realizované priamo na lokalite výskytu podľa morfológických znakov plodníc (peridia a gléby) a typickej arómy. Pôdne vzorky o hmotnosti cca 1 kg boli odoberané po odstránení opadaného lístia na mieste výskytu plodníc v pôdnej vrstve, kde boli nájdené zrelé plodnice (maximálne do hĺbky 20 cm). Stanovenie pH vo vodnom výluhu pôdnych vzoriek bolo realizované v laboratóriu Katedry fyziológie Univerzity Eötvösa Lóránda v Budapešti a v Stredisku biológie a ekológie rastlín, Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Identifikácia druhov bola potvrdená na pracovisku Katedry fyziológie Univerzity Eötvösa Lóránda v Budapešti s využitím analýzy morfológických znakov. Verifikácia druhovej identity na základe morfológie askospór bola uskutočnená na Katedre genetiky a šľachtenia rastlín SPU v Nitre. Dokladový materiál plodníc je uložený v herbáriu Katedry genetiky a šľachtenia rastlín SPU v Nitre.

Cieľom výskumu bolo potvrdiť aktuálny stav výskytu hospodársky významných druhov čiernych hľuzoviek vo vybraných lokalitách západného Slovenska a analyzovať možnosti ich pestovania v agrolesníckych systémoch.

Výsledky a diskusia

Na území Slovenskej republiky nebol od roku 1911 (HOLLÓS, 1911) realizovaný systematický mykologický výskum zameraný na diverzitu hypogeických húb, napriek tomu že niektorí zástupcovia tejto skupiny (rod *Tuber*) húb sú z komerčného hľadiska mimoriadne cenné. Od 18. storočia sa datujú prvé úspešné pokusy s pestovaním hľuzoviek vo Francúzsku cestou pasívnej inokulácie známej ako Talónova metóda (HOLLÓS, 1911). Neustály pokles produkcie z prírodných zberov a rastúci dopyt po hľuzovkách si na začiatku sedemdesiatych rokov vynútil rozvoj metód aktívnej mykorizácie hostiteľských drevín (HALL et al., 2003). V súčasnosti v rámci jednotného Európskeho trhu nie je problém získať inokulované sadenice pochádzajúce z Francúzska či Talianska. Výsledky štúdia výsadiel mykorizovaných hľuzovkou čiernovýtrusovou v Taliansku (BENCIVENGA, GRANETTI, 1988) však potvrdzujú dôležitosť využitia mykorizovaných sadeníc pochádzajúcich zo semien a spór miestnych ekotypov.

Najvýznamnejšou a v Európe najviac pestovanou hľuzovkou je hľuzovka čiernovýtrusová (*Tuber melanosporum* Vitt.). Oblasť jej prirodzeného rozšírenia sa nachádzajú v južnej časti Európy, v severovýchodnej časti Španielska, v južnom Francúzsku, v severnom Taliansku, a v Portugalsku. V

Maďarsku ani na Slovensku neboli záznamy o jej výskyte a aj napriek tomu je zaradená do Červeného zoznamu ohrozených druhov Slovenskej republiky. Zavedenie pestovania hľuzoviek v podmienkach Slovenska si vyžaduje rozšíriť poznatky o prirodzenej diverzite hospodársky významných druhov čiernych hľuzoviek, o ich biológii a nárokoch na ekologické podmienky. Na základe výskumu vybraných lokalít západného Slovenska sme v rokoch 2005 a 2006 zaznamenali vo voľnej prírode výskyt štyroch druhov hospodársky významných čiernych hľuzoviek: hľuzovka letná (*Tuber aestivum* Vitt.), hľuzovka zimná (*Tuber brumale* Vitt.), hľuzovka veľkovýtrusová (*Tuber macrosporum* Vitt.) a hľuzovka térová (*Tuber mesentericum* Vitt.).

Z tejto skupiny sa hľuzovka letná považuje v Európe za najčastejšie sa vyskytujúci druh vzhľadom na jej genetickú diverzitu a plasticitu k ekologickým podmienkam (MONTECCHI, SARASINI, 2000). Pri morfológickej analýze nájdených plodníc sme zistili, že plodnice hľuzovky letnej boli nepravidelne okrúhleho až hľuzovitého tvaru. Perídium bolo čierneho až čierneho, na povrchu popraskané na 1-3 mm veľké kužeľovité hrbolčeky, na temene vtláčené a nezreteľne ryhované. Gléba na priereze zrelých plodníc bola svetlá až tmavo hnedá s úzkymi a početnými belavými žilkami. Aróma bola príjemná a intenzívna. Plodnice získané počas inventarizačného výskumu mali najväčší rozmer v rozpätí od 15,7 do 64,9 mm. Hmotnosť plodníc sa pohybovala od 2,7 do 61 g.

Na svetových trhoch sa pri hodnotení kvality hľuzovky letnej rozlišujú dve formy: *aestivum* a *uncinatum*. Na základe porovnávania ribozomálnej DNA sa potvrdilo, že obidve formy patria tomu istému druhu (WEDÉN, 2004). Preto sa v súčasnosti považuje označenie *Tuber aestivum* forma *uncinatum* Chatin. za obchodné rozlišovanie tržne kvalitnejších plodníc hľuzovky letnej a neslúži na diferenciáciu medzi druhmi. Často sa forma *aestivum* považuje za skorú, nevzretú formu *uncinatum*. Pri našom výskume sa potvrdil výskyt formy *aestivum* na začiatku augusta, kedy mali plodnice slabšiu intenzitu arómy a gléba na priereze bola svetlá. Naopak plodnice získané v októbri mali intenzívnu arómu a tmavohnedé mramorovanie na priereze gléby (obr. 1). Na miestach výskytu plodníc formy *aestivum* sme však v jesenných mesiacoch už nezistili prítomnosť plodníc formy *uncinatum* a naopak.



Obrázok 1: Hľuzovka letná (*Tuber aestivum* Vitt.) vľavo forma *aestivum*, vpravo forma *uncinatum*

Plodnice hľuzovky zimnej (*Tuber brumale*) boli nepravidelne guľovitého tvaru (obr. 2). Perídium tmavo-



Obrázok 2: Hľuzovka zimná (*Tuber brumale* Vitt.)

Plodnice hľuzovky veľkovýtrusovej boli nájdené v roku 2005 na dvoch lokalitách. Plodnice druhu *Tuber macrosporum* Vitt. boli nepravidelného tvaru, laločnaté, s priemerom 2 – 5 cm (obr. 3). Perídium je tvorené hnedočiernymi, veľmi rozmerovo variabilnými nepravidelnými mnohoúhľovníkovými, ale veľmi krátkymi bradavičkami, ktoré sú charakteristicky ploché a niekedy aj chýbajú. Gléba je sivohnedá, hnedo fialová, v

sivej farby s čierno-sivým odtieňom s výrazne menšími kužeľovitými bradavkami v porovnaní s hľuzovkou letnou. Gléba na priereze zrelých plodníc bola mäsitá sivo-fialová až tmavohnedá s výraznejšími belavými žilkami a hrubšou štruktúrou mramorovania. Analyzované plodnice mali veľkosť v rozpätí od 9,7 do 25,0 mm s hmotnosťou plodníc od 1,2 do 4,2 g.

zrelosti purpurovo hnedá, husto pretkaná mnohými kľukatými, bielymi cievami. Nájdené plodnice z lokality 1 mali tvar nepravidelný, až laločnatý s dĺžkou 21 až 28 mm, a hmotnosťou od 3,6 do 7,3 g. Na lokalite 2 boli plodnice rozmerovo vyrovnanejšie, aj keď tiež nepravidelné, mierne sploštené, o hmotnosti 3,8 a 4,8 g. V roku 2006 nebol počas inventarizačného prieskumu potvrdený výskyt plodníc hľuzovky veľkovýtrusovej.



Obrázok 3: Hľuzovka veľkovýtrusová (*Tuber macrosporum* Vitt.)

skoro príjemná pripomínajúca čierne hľuzovky, resp. huby všeobecne. Najväčšie plodnice získané počas výskumu mali v priemere 45 mm s hmotnosťou od 2,7 g do 21,8 g.



Obrázok 4: Hľuzovka térová (*Tuber mesentericum* Vitt.)

a širšie ekologické optimum, čo je z pestovateľského hľadiska zaujímavá informácia. WEDÉN (2004) pri svojich výskumoch na ostrove Gotland zaznamenala rozpätie od 6,8 po 7,9. V analýzach pH na prírodných lokalitách výskytu vo Francúzsku zistili CHEVALIER a FROCHOT (1997) rozpätie od 7,1 do 8,0.

Plodnice druhu *Tuber mesentericum* Vitt. boli guľovité, mierne laločnaté alebo elipsoidné, v priemere 2 až 3 cm veľké, zvyčajne aj s bazálnou depresiou, alebo priehľbinou, zreteľne viditeľnou na vhodnom priereze (obr. 4). Ostatné znaky sú veľmi podobné druhu *T. aestivum*. Perídium je tvorené veľkými, pevnými, hnedočiernymi pyramidálnymi bradavičkami, s bázou nepravidelného mnohoúhľovníkového tvaru ako pri *T. aestivum*, ale sú všeobecne menšie, hustejšie a menej vyčnievajúce. Gléba je tvrdá, variabilnej farby, od béžovej po orieškovohnedú v zrelosti, s niekoľkými bielymi lokálne skrátеныmi a výrazne poprehýbanými cievami. Často s viac menej zbiehavým usporiadaním k bazálnej priehľbine. Vôňa je veľmi silná pri čerstvo zozbieraných plodniciach, pripomínajúca decht, po zvetraní prípadne po skladovaní na vzduchu je slabšia,

Na základe odobratých vzoriek pôdy z lokalít výskytu čiernych hľuzoviek sme analyzovali hodnoty pH. Čierne hľuzovky sú náročné na alkalické prostredie v ktorom sú schopné formovať ektomykorizú a vytvárať plodnice. Všetky lokality sa nachádzali na pôdach ktorých materskou horninou boli druhohorné karbonátové horniny. Plodnice sa nachádzali v humusovom horizonte, v hĺbke do 15 cm. Z tabuľky 1 je zrejmé, že hľuzovka veľkovýtrusová a hľuzovka térová sa nachádzali na lokalitách s vyššími hodnotami pH, pričom ich variačné rozpätie 0,15 a 0,11 je relatívne úzke. Naopak hľuzovka letná vyžadovala v priemere nižšiu hodnotu pH 7,47 s najvyšším rozpätím hodnôt od 6,59 po 7,85. To by naznačovalo vyššiu adaptabilitu na rozsah hodnôt pH

Tabuľka 1: Hodnoty pH zistené na prírodných lokalitách výskytu čiernych hľuzoviek

Druh:	<i>Tuber aestivum</i>	<i>Tuber brumale</i>	<i>Tuber macrosporum</i>	<i>Tuber mesentericum</i>
Priemer	7,47	7,51	7,62	7,66
Str. chyba priemeru	0,049	0,084	0,044	0,020
Variačné rozpätie	1,26	0,6	0,15	0,11
Minimum	6,59	7,13	7,55	7,62
Maximum	7,85	7,73	7,7	7,73

Pri výbere potenciálnych druhov čiernych hľuzoviek vhodných pre pestovateľské technológie v podmienkach Slovenska môžeme konštatovať, že hľuzovka zimná a veľkovýtrusová dozrievajú v podmienkach strednej Európy koncom októbra a začiatkom novembra. V tomto období je rast plodníc obmedzovaný nástupom nízkych teplôt. Pestované hľuzovky by nemuseli dosahovať veľkosť komerčne

využitelných plodníc. Výrazné klimatické zmeny ktoré v súčasnosti zaznamenávame však môžu túto situáciu zmeniť. Hľuzovka térová má z komerčného hľadiska najnižšiu cenu a dopyt z analyzovaných druhov. Pre podmienky Slovenska je preto najperspektívnejšie pestovanie hľuzovky letnej. Dokáže úspešne vytvárať plodnice v širšom rozpätí hodnôt pH. Obdobie tvorby plodníc spadá do obdobia neskorého leta a jesene kedy sú v podmienkach Strednej Európy vhodné klimatické podmienky pre dozrievanie plodníc. Pre inokulačné techniky hostiteľských drevín je preto vhodné využiť plodnice týchto foriem. V roku 2005 boli hľuzovky zaradené medzi genetické zdroje pre výživu a poľnohospodárstvo (GAŽO, MIKO, 2005). Z hľadiska ochrany a ďalšieho využívania genetických zdrojov hľuzoviek je vhodné používať termín genet ktorý je definovaný ako genetický identický komplex ektomykoríz (mycélia na koreňoch a vo vnútri koreňových pletív), mimokoreňového mycélia a plodníc. Pre pestovanie bude dôležité využívať genety dozrievajúce vo forme *uncinatum*. Inokulované sadenice je nutné vysádzať na poľnohospodárskej pôde bez prítomnosti drevín vytvárajúcich ektomykorízy z dôvodu konkurenčného prostredia pre inokulovanú mykorízu. Takéto pestovanie spadá do kategórie agrolesníckych systémov ktoré zlučujú systémy extenzívneho poľnohospodárstva a lesného hospodárstva. Inokulované lesné dreviny ako dub, buk, lieska sa pestujú nielen pre produkciu dreva, či orechov, ale v sponoch a technológiami vytvárajúcimi vhodné prostredie pre rast a fruktifikáciu plodníc hľuzoviek. Cieľom agrolesníctva nie je obnoviť pôvodný prírodný ekosystém, ale obnoviť nevyhnutné procesy potrebné pre zdravý a trvalo udržateľný ekosystém na poľnohospodárskej pôde.

Záver

Výsledky inventarizačného výskumu realizovaného v rokoch 2005 a 2006 potvrdili výskyt štyroch druhov hospodársky významných druhov čiernych hľuzoviek na Slovensku. Výskyt všetkých druhov bol viazaný na zásadité pôdy. Materskou horninou pôd boli druhohorné karbonátové horniny (gutensteinské vápence a svetlosivé laminované metamorfované vápence a dolomity). Analýza pôdneho pH potvrdila, že hľuzovka letná (*Tuber aestivum* Vitt.) vytvárala plodnice v rozpätí hodnôt od 6,59 do 7,85. Z hľadiska perspektívy pestovania hľuzoviek s ohľadom na klimatické faktory Strednej Európy je pre pestovanie najvhodnejšie uprednostniť experimenty s hľuzovkou letnou a to jej jesennou formou *uncinatum*. Do pestovania by bolo vhodné využívať dobre lokálne adaptovaný domáci genofond hľuzoviek a hostiteľských drevín.

Príspevok vznikol s podporou projektu VEGA 1/2412/05 - Štúdium metód množenia a inokulácie sadiva druhov *Quercus* spp. pre zavedenie poľných pestovateľských systémov a hospodárskeho využitia hľuzovky letnej (*Tuber aestivum* Vitt.) na Slovensku.

Literatúra

1. BENCIVENGA, M. – GRANETTI, B. 1988. Risultati produttivi di tartufoe coltivate di *Tuber melanosporum* in Umbria. In: Atti del Secondo Congresso Internazionale sul Tartufo. Spoleto: 313-321.
2. GAŽO, J. – MIKO, M. 2005. Genofond hľuzovky letnej (*Tuber aestivum* Vitt.) na Slovensku. Genofond, VURV Piešťany, No.9, s. 18-19.
3. HALL, I. R. - YUN, W. – AMICUCCI, A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends Biotechnol. 21:433-438.
4. HOLLÓS, L. 1911. Magyarország földalatti gombái, szarvasgombaféléi. (Fungi hypogaei Hungariae), Kiadja a K.M. Természettudományi Társulat, Budapest.1998, 246 pp.
5. CHEVALIER, G. – FROCHOT, H. 1997. La Truffe de Bourgogne. Pétrarque, Levallois-Perret, 1997, 257 pp. ISBN 2-911730-13-5
6. LIZOŇ, P. 2001. Red list of fungi of Slovakia, The third draft (December 2001). Ochr. Prír. suppl., vol. 20, 2001, p. 6-13.
7. MONTECHI, A – SARASINI, M. 2000. Funghi ipogei d'Europa. Associazione Micologica Bresadola, Trento, Italy.
8. WEDÉN, C. 2004. Black truffles of Sweden. Systematics, Population Studies, Ecology and Cultivation of *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 1043. 54 pp. ISBN 91-554-6099-2

Adresa autora:

Ing. Ján Gažo, PhD., Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: Jan.Gazo@uniag.sk

HODNOTENIE KVALITY VÝSADBOVÉHO MATERIÁLU INOKULOVANÉHO HĽUZOVKOU LETNOU (*TUBER AESTIVUM* VITT.) PRE AGROLESNÍCKU VÝROBU

QUALITY ASSESSMENT OF PLANTS INOCULATED BY BURGUNDY TRUFFLE (*TUBER AESTIVUM* VITT.) FOR AGROFORESTRY PRODUCTION

Marián MIKO – Ján GAŽO

*In the paper, requirements on quality of oak seedlings inoculated by mycorrhizal fungi species *Tuber aestivum* Vitt. are evaluated. Negative impacts of container pre-growing of seedlings on their root system shape were proved. Shape construction way of filling and solidification of substrate, while transplantation in containers, causes deformations which are unacceptable according to Slovak Technical Standard (STN). Also requirements for containerized seedling quality used in extreme forestation conditions were not met. Preliminary evaluation of root system by binocular microscope did not prove significantly different influence of factors on quantity and quality of mycorrhiza in specific conditions.*

Key words: hľuzovky, *Tuber aestivum* Vitt., inokulované semenáče, kvalita

Úvod

Čierne hľuzovky sa prirodzene vyskytujú na vápenatých pôdach v spojení s koreňovým systémom drevín, veľmi často dubov (*Quercus* spp.) a liesok (*Corylus avellana* L.) (FISCHER, COLINAS, 1996).

Pokles produkcie jedlých čiernych hľuzoviek v posledných 50-tich rokoch na prírodných stanovištiach vo Francúzsku, Taliansku a Španielsku podporil veľký záujem o ich pestovanie.

Hľuzovkové výsadby sa tradične zakladali výsevom semien dubov spoliehajúc sa na prítomnosť mycélia hľuzoviek v pôde. V takýchto výsadbách boli prvé plodnice hľuzoviek zvyčajne zbierané okolo 6. až 8. roku po výseve. Je však možné špecifickým mycéliom inokulovať korene mladých stromčekov bezprostredne pred ich výsadbou do pôdy (CHEVALIER, GREUTE, 1979; CHEVALIER, DUPRÉ, 1988) a tak dosiahnuť produkciu hľuzoviek o 3 až 4 roky skôr. Takto môžeme hľuzovky pestovať aj v areáloch, kde sa ich mycélium predtým vôbec nevyskytovalo (CALLOT, 1999).

Komerčné inokulačné metódy boli už od 70-tych rokov minulého storočia používané vo Francúzsku a Taliansku. Nezavislé posúdenie kvality výsadbového materiálu (semenáčov a mykorizy), zabezpečoval certifikačný úrad uvedených krajín.

Spojenie dvoch biologických systémov hostiteľskej dreviny a mykoritickej huby v inokulovanom sadive vyžaduje z dôvodu komplexného posúdenia kvality vyrábaného inokulovaného sadiva použiť v certifikačných postupoch špecifický prístup.

Certifikačný postup pozostáva z niekoľkých na seba naväzujúcich krokov a musí rešpektovať všetky špecifiká výroby inokulovaného krytokorenného sadiva. Začína identifikáciou skupiny rastlín, odberom vzoriek z hodnotenej skupiny rastlín, postupov čistenia koreňového systému, zhodnotenia kvality rastlín, predbežného hodnotenia koreňového systému pod binokulárnou lupou, počítania špičiek koreňov, určenia pomerov PT (pomer časti Tuber-mykorizovaných koreňových špičiek) a PK (pomer kontaminovaných koreňových špičiek), štatistického vyhodnotenia intervalov spoľahlivosti pre PT a PK v skupine.

Materiál a metódy

Biologický materiál – semená dubov *Quercus petrae* Mattuschka Liebl, *Q. cerris* L. a *Q. robur* L. boli odobraté z hostiteľských drevín na základe potvrdenia prítomnosti mykorizy hľuzovky letnej *Tuber aestivum* na rastline.

Semenný materiál bol povrchovo dezinfikovaný 70%-ným etanolom a následne premytý pod tečúcou vodou. Semenáče boli predpestované v dvoch variantoch v sterilnom substráte – v zakoreňovači QP E 40 a vo voľnom substráte.

Inokulácia bola realizovaná pri dvoch koncentráciách spór v inokulačnom roztoku so zabezpečením celkového počtu 5, resp. 18 tisíc spór aplikovaných na jednu rastlinu. Inokulum bolo pripravené z plodníc hľuzovky letnej. Plodnice boli nakúpené v Maďarskej republike. Plodnice boli homogenizované a v základnom inokulačnom roztoku bola stanovená koncentrácia spór prepočtom podľa PARLADÉ et al. (1996). Aplikácia inokulačného média bola realizovaná tromi spôsobmi – použitím nosiča, metódou inokulácie „na jamku“ a inokulácia kontaktom s mykorizovanými sadenicami.

Na pestovanie inokulovaných semenáčov boli použité tri rozdielne substráty: 1. s prevahou pôdy (odobranej v lokalite výskytu hľuzovky letnej), 2. s prevahou rašeliny, 3. s prevahou vápencového skeletu. Pokusy boli realizované v kontajneroch 18 cm vysokých – Quick Pot - QP 40 T.

Na rastlinách boli hodnotené znaky v súlade s požiadavkami na kvalitu množiteľského materiálu lesných drevín STN 48 2211.

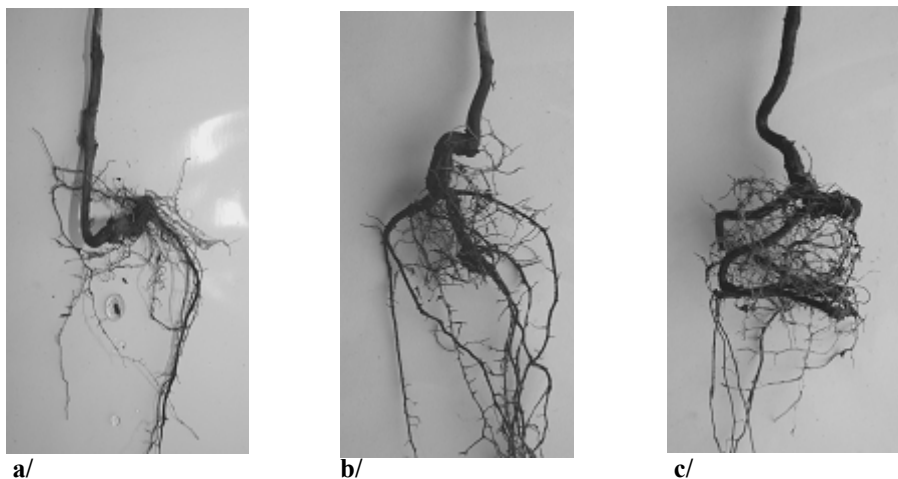
Hodnoteniu kvality rastlín predchádzalo dokumentovanie homogenity a zdravotného stavu. Koreňový systém inokulovaného sadiva bol vyhodnotený pod lupou pri zväčšení 40 x.

Cieľom práce bolo poukázať na vplyv kultivačných podmienok na niektoré ukazovatele kvality inokulovaného sadiva mykoritickej hubou *Tuber aestivum*, ktoré sú hodnotené pri certifikácii.

Výsledky a diskusia

Krytokorenný sadivový materiál sa využíva najmä pri zalesňovaní extrémnych stanovišť (LIPTÁK, 1989), ale aj pri zalesňovaní pôd na dolomitických a vápencových podlažiach (ZACHAR, 1988). Vďaka jeho rýchlemu odrastaniu sa uplatňuje aj v prípadoch, keď je potrebné zapojenie porastov v čo najkratšom čase. Pri výsadbe plôch pre pestovanie hľuzoviek vystupuje do popredia aj ochrana mykORIZOVANÝCH koreňov použitým substrátom v celom procese manipulácie pred výsadbou.

Krytokorenný sadivový materiál má i svoje nevýhody. Z biologického hľadiska ide najmä o nežiaduce deformácie koreňov, ktoré sa môžu veľmi negatívne prejaviť aj po niekoľkých rokoch po výsadbe.



Obrázok 1 až 3: Deformácie koreňového systému spôsobené nevhodným typom kultivačnej nádoby
 a/ koreň tvaru „L“, b/ deformácie s potlačením dominancie hlavného koreňa,
 c/ deformácie v tvare oblúkov

Pestovanie vo vhodných typoch obalov, ktoré majú viac ochranných prvkov zabraňuje deformácii koreňov. Preukazuje kratšiu koreňovú sústavu, ktorá je limitovaná veľkosťou použitého obalu eliminuje celkovú biomasu koreňovej sústavy ktorá je pri väčšine drevín podstatne vyššia ako pri voľnokorennom sadive (ŠMELKOVÁ, 2004).

Komplexný certifikačný proces inokulovaného sadiva pozostáva z dvoch častí.:

I. Predbežného hodnotenia morfológických znakov na rastlinách:

- 1) výšku rastliny (nesmie presiahnuť dvojnásobok dĺžky koreňa)
- 2) priemeru krčka koreňa (musí byť aspoň 2-3 mm, pre rastliny staré 1 – 2 roky)
- 3) koreňový systém má byť pravidelný, bez formovania do tvaru J , a bez oblúkov (deformácie prípustné podľa STN 48 2211 pre voľnokorenný materiál povoľujú maximálny ohyb 45 ° a vzdialenosť špičky hlavného koreňa od osi nadzemnej časti do 10 cm)
- 4) po stenách kontajnera by nemali rásť žiadne sekundárne korene
- 5) sekundárne korene by mali byť rovnomerne rozložené pozdĺž hlavného koreňa s veľkým množstvom zásobovacích koreňov
- 6) rastliny a koreňový systém musia byť zdravé bez príznakov hnilôb a nekróz na koreni a bez príznakov uschnutia
- 7) rastlina musí byť dostatočne pevná s náznakmi lignifikácie na koreňovom krčku

Tabuľka 1: Vybrané ukazovatele kvality semenáčov hostiteľských drevín hľuzovky letnej predpestovaných v zakoreňovačoch (1) a vo voľnom substráte (2) v roku 2006

Druh dreviny typ zakoreňovača	Výška rastliny v mm	V (%)	Hrúbka osi v mm	V (%)	Deformácie	Sekundárne korene (%) rastlín)	Nekrózy
<i>Q. petrae</i> (1)	148,0	30,2	2,29	26,2	68,4 %	1,3 %	nie
<i>Q. petrae</i> (2)	153,8	36,7	3,12	23,5	2,5 %	0,6 %	nie
<i>Q. rubra</i> (1)	128,7	29,8	2,35	20,0	87,2 %	2,3 %	nie
<i>Q. rubra</i> (2)	138,4	29,6	2,79	19,8	3,8 %	1,2 %	nie
<i>Q. robur</i> (1)	147,6	26,6	2,43	9,1	79,9 %	0,9 %	áno
<i>Q. robur</i> (2)	152,5	25,2	2,88	12,6	2,4 %	0,2 %	áno

II. Inokulované sadivo v predbežnom hodnotení musí splniť ešte tri ďalšie kritériá:

- 1) minimálny počet 250 zdravých jemných korieňkov na rastlinu
- 2) minimálne 10% mykoríznych koreňových špičiek druhom *T. aestivum*
- 3) nie viac ako 50% koreňových špičiek kolonizovaných iným kontaminujúcim druhom huby s výnimkou rodu *Tuber*

Mykoríza funguje ako orgán slúžiaci na uchovávanie a výmenu živín s hostiteľskou drevinou, je kľúčovou štruktúrou symbiomy pre kompletný vývoj hľuzoviek. Mykorízne mycélium zabezpečuje rozširovanie huby v rámci koreňového systému hostiteľskej dreviny a susediacich stromov (DELMAS, 1978).

Ektomykorízne huby spôsobujú na koreňoch výrazné makroskopické zmeny. Preto ektomykríza na koreňovom systéme je väčšinou pozorovateľná už voľným okom. Mykorizované korene môžeme odlišovať od nemykorizovaných napríklad farbou, hrúbkou, povrchovou textúrou, alebo spôsobom vetvenia. Typ vetvenia môže byť pre niektoré hostiteľské druhy typický. Morfológické znaky mykoríznych koreňov – vlastnosti hýfového plášťa, vetvenie koreňov, vlastnosti rhizomorf sú kritériami pre zaraďovanie ektomykoríz do morfortypov (HORTON et al., 1998).

Morfológické vlastnosti mykorízy sú ovplyvnené symbiotickou hubou a samotné hýfy nesú niektoré znaky, ktoré sú viac či menej typické pre niektorý druh (AGERER, 1978-1996).

Druhá časť certifikácie náhodne vybranej skupiny rastlín vyžaduje splnenie nasledujúcich kritérií vzorkou rastlín:

- 1) všetky odobrané rastliny musia spĺňať kritériá kvality rastlín
- 2) všetky rastliny musia spĺňať požiadavky pre Predbežné hodnotenie
- 3) ani jedná rastlina vo vzorke nemá menej ako 10%-nú kolonizáciu *T. aestivum*
- 4) ani jedná rastlina vo vzorke nemá viac ako 50%-nú kolonizáciu kontaminantom
- 5) dolný limit pre interval spoľahlivosti PT > 0,25 (25%-na kolonizácia druhom *T. aestivum*)
- 6) horný limit pre interval spoľahlivosti PK < 0,20 (kontaminantmi nie je kolonizovaných viac ako 20% koreňových špičiek rastlín vo vzorke)
- 7) ani jedná rastlina zo vzorky nebola kolonizovaná iným druhom rodu *Tuber*
- 8) podiel kontaminantov nesmie prevyšovať podiel mykorizovaných špičiek druhom *T. aestivum*

Tabuľka 2: Vyhodnotenie pomerov mykorízy *Tuber*-inokulovaných koreňových špičiek (PT) a pomeru kontaminovaných koreňových špičiek (PK)

Druh dreviny	PT	Interval spoľahlivosti PT	PK	Interval spoľahlivosti PK	Počet vzoriek
<i>Q. petrae</i> (1,2)	0,53	0,54 – 0,56	0,14	0,08 – 0,22	5
<i>Q. cerris</i> (1,2)	0,62	0,59 – 0,71	0,08	0,02 – 0,14	5
<i>Q. robur</i> (1,2)	0,59	0,53 – 0,65	0,22	0,18 – 0,26	10

Pri hodnotených vzorkách inokulovaných rastlín boli splnené požiadavky pre druhú časť certifikácie pri použití vyhovujúceho variantu (inokulácia a substrát) s výnimkou hodnotených vzoriek pri druhu *Q. robur*, kde bol prekročený limit pre výskyt kontaminantov.

Záver

Výsledky experimentov poukazujú na nevyhnutnosť optimalizácie materiálno-technických prostriedkov pre prípravnú fázu inokulačného postupu, spôsobu prípravy semenáčov a ich následného pestovania počas inokulácie. V prípravnej fáze je potrebné vylúčiť všetky negatívne vplyvy obmedzujúce voľný rast koreňového systému. Rastliny presadiť do kontajnerov až po vytvorení 2 až 3 pravých listov na rastline. Odporúčame postup bez potreby utlačania pôdy v zakoreňovači, ktoré spôsobuje vznik ďalších nežiaducich deformácií koreňového systému.

Príspevok vznikol za finančnej podpory projektu VEGA 1/2412/05 - Štúdium metód množenia a inokulácie sadiva druhov *Quercus* spp. pre zavedenie poľných pestovateľských systémov a hospodárskeho využitia hľuzovky letnej (*Tuber aestivum* Vitt.) na Slovensku.

Literatúra

1. AGERER, R. 1987 – 1996. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn, Schwäbisch Gmünd, Germany.
2. CALLOT, G. 1999. La TRUFFE, la Terre, la Vie. INRA Editions, Paris.
3. DELMAS, J. 1978. *Tuber* spp. In The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. Edited by Chang, S. T. & Hayes, W. A. 1978. In: Academic Press, New York, USA.

4. CHEVALIER, G. – DUPRÉ, C. 1988. Recherche et expérimentation sur la truffe et la trufficulture en France, p. 157 – 166. In: 2 Congresso Internazionale sul Tartufo, Spoleto, Italy.
5. CHEVALIER, G. – GREUTE, J. 1979. Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production à grande échelle de plants mycorrhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). In: Mushroom Sci, 10: 483 – 505.
6. FISCHER, CH. – COLINAS, C. 1996. Methodology for certification of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum* for commercial application, Poster presentation at the 1st International Conference on Mycorrhizae, Berkeley, California, USA, august 1996.
7. HORTN, T. R. – CASARES, E. - BRUNS, T. D. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 month after wildfire. In: Mycorrhiza. 8. p. 11 – 18.
8. LIPTÁK, J., 1989. Výroba sadencov a zakladanie porastov v meniacich sa ekologických podmienkach. In: Výskum a obhospodarovanie lesov v zmenených ekologických podmienkach . Zborník ref. z Vedeckej konferencie VÚLH vo Zvolene 1988, Príroda, 157 s.
9. PARLADÉ, J. – PERA, J. – ALVAREZ, I. F. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. In: Mycorrhiza, 6. p. 237 – 245.
10. ŠMELKOVÁ, Ľ. 2004. Používanie krytokorenného sadbového materiálu pestovaného intenzívnymi technológiami na Slovensku. In: Možnosti použitia sadbového materiálu z intenzívnych školkařských technológií pro obnovu lesa. Sborník přednášek z mezinárodního semináře. Opočno, 3. a 4. 6. 2004. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce 2004, s. 16 – 21.
11. ZACHAR, D. 1988. Ochranné zalesňovanie: In: Výskum a obhospodarovanie lesov v zmenených ekologických podmienkach. Zborník referátov z Vedeck. konferencie VÚLH vo Zvolene 1988, Príroda, 157s.

Adresa autora:

Ing. Marián Miko, CSc., Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76, e – mail: Marian.Miko@uniag.sk

VÝSKYT *VITIS VINIFERA* SSP. *SYLVESTRIS* GMEL. NA SLOVENSKU A MOŽNOSTI JEHO UPLATNENIA V ŠĽACHTENÍ OCCURRENCE OF *VITIS VINIFERA* SSP. *SYLVESTRIS* GMEL. IN SLOVAKIA AND POSSIBILITIES OF ITS USE IN GRAPE BREEDING

Dorota POSPÍŠILOVÁ – Daniel SEKERA – Rastislav ŠIMORA

Prospecting of the first 12 meadow woods in Slovakia of the river basins Danube, March and Nitra was made in 2006 and 2007 with the aim to discover Vitis vinifera ssp. sylvestris GMEL. plants. From the 12 prospected woods only in five they were discovered. Up to now 298 plants were found, the biggest finding place being the wood "Velky les" in the Nitra river basin. Only on a fifth of the surface of this wood 272 lianas were registered. Ampelographical classification and photo documentation of the organs of about 100 lianas was realised. An ex situ Vitis sylvestris collection is in the course of building for assuring both: the protection of die out of the Slovak Vitis sylvestris populations and its utilisation in breeding programmes.

Key words: Vitis vinifera ssp. sylvestris GMEL., Slovakia, study, grape vine, utilisation, breeding

Úvod

Systematické štúdium *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* GMEL. ako nového genetického zdroja pre šľachtenie viniča na Slovensku sa začalo vstupom nášho pracoviska (VŠSVVM, n. o.) do spolupráce na projekte EÚ GenRes06 „Manažment a zachovanie genetických zdrojov viniča“, ktorý v jednej svojej etape rieši aj „Štúdium, identifikáciu a vyhodnotenie germoplazmy *Vitis sylvestris*“. Dovtedy bol *V. sylvestris* predmetom botanických fytoecologických výskumov v niektorých chránených oblastiach lužných lesov Podunajska a Potisia (ELIÁŠ et al., 2003; SÁDOVSKÝ 2001a, 2001b; SÁDOVSKÝ, ZLATSKÁ, 2005). Predmetné pojednanie predkladá prvé výsledky začatej práce za roky 2006 a 2007.

Materiál a metódy

Predmetom práce bol lesný vinič *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* Gmel. rastúci na Slovensku v lužných lesoch v povodiach viacerých riek, predovšetkým Moravy, Dunaja, Nitry, Tisy.

Naša aktivita bola predovšetkým nasmerovaná na prieskum lesného viniča a spracovanie získaných materiálov. Prácu sme usmernili na:

- expedície s cieľom objaviť *Vitis sylvestris*,
- ampelografický popis nájdených lián,
- vytvorenie fotodokumentácie niektorých orgánov vybraných rastlín,
- odber jednoročného dreva pre založenie *ex situ* zbierky *Vitis sylvestris*.

Výsledky a diskusia

Expedície

Doteraz sme preskúmali na povodí rieky Morava 8 lokalít lužných lesov a to v Skalici, Holíči, Kopčanoch, Kútoch, Sekuliach, Moravskom Jáne, Malých Levároch a Vysokej pri Morave. Lesný vinič sme našli iba v 3 lokalitách: Sekule, Malé Leváre, Vysoká pri Morave. V lužných lesoch Dunaja sme doposiaľ preskúmali lesy obcí Rusovce, Rovinka a Čenkove. Iba v jednej lokalite - Čenkove (pri Štúrove) sme našli lesný vinič. Na povodí rieky Žitava sme z informácií miestnych obyvateľov vedeli o Veľkom lese pri Úľanoch nad Žitavou, v ktorom sme objavili množstvo jedincov *Vitis sylvestris*.

Z 12 lokalít sme teda našli vinič iba v piatich. Prehľad prieskumu uvádzame v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Prehľad miest a počtu lián *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* GMEL. z doterajšieho prieskumu v SR

Povodie rieky	Počet preskúmaných lokalít	Počet nálezísk	Počet nájdených lián	Počet rastlín ampelograficky popísaných
Morava	8	3	16	16
Dunaj	3	1	10	10
Nitra (Žitava)	1	1	272	100
Spolu	12	5	298	126

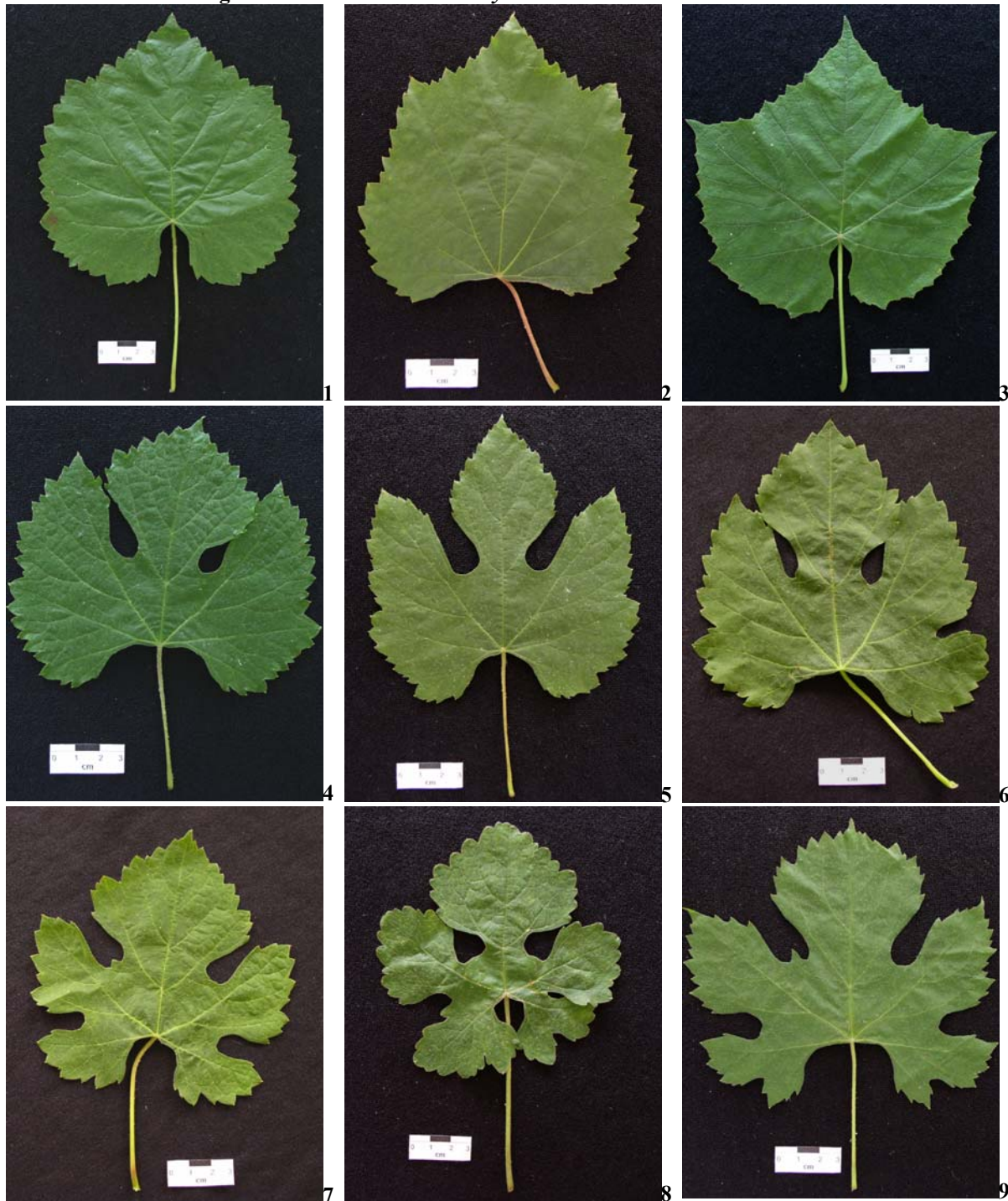
Z tabuľky vyplýva takmer 42 %-ná úspešnosť nálezu *V. sylvestris* v preskúmaných lokalitách lužných lesov. Počet nájdených rastlín je však vo väčšine lokalít malý, z čoho vyplýva značné ohrozenie tohto poddruhu viniča na Slovensku. Výnimkou je iba žitavský Veľký les, kde je početnosť rastlín vysoká a zachovanie lesného viniča zabezpečené.

Liany, z ktorých sme odobrali vzorky orgánov, sme v teréne označili a situačne podchytili polohu zariadením GPS.

Ampelografický opis lián

Z nájdených lián sme opísali 126 ks, a to viac ako šesťdesiatimi hospodárskymi a morfológickými znakmi. Ide najmä o morfológiu vrcholov výhonkov, listov, kvietkov, strapcov, bobúľ, semien a jednoročného dreva. Zistenia svedčia o morfológickej rôznorodosti jednotlivých rastlín, a teda každú lianu možno považovať za osobitný genotyp. Iba v tom prípade, keď liany z jedného „hniezda“ pochádzajú z vegetatívnych orgánov jednej rastliny, sú morfológicky aj geneticky rovnaké. Príklad morfológickej rôznosti demonštrujeme na tvare listov na obrázkoch 1 až 9.

Obr. 1 až 9: Morfológická variabilita listov *Vitis sylvestris* GMEL.



Zaujímavý je aj znak „typ kvietka“, ktorý je však možné zistiť iba po krátku dobu kvitnutia viniča a iba ak sa kvetenstvá nachádzajú aj na letorastoch pri zemi. Normálne je totiž zelená vegetačná hmota krov vysoko v korunách oporných stromov (obr. 10, 11 a 12), lebo liany sa okolo kmeňov stromov vinú až do koruny. Súkvetia sme zistili na 24 rastlinách. Z toho bolo 14 so samčím a 11 so samičím kvetom. Literárne údaje označujú pomer samčích a samičích kvetov pri *V. sylvestris* 3 : 1 (NEGRUL et al., 1965). Pre šľachtiteľskú

prácu prichádzajú do úvahy obidva typy: samčí ako donor peľu a samičí ako schopný po opelení cudzím peľom poskytnúť hybridné semená.

Obr. 10: *V. sylvestris* sa upína v korune suchého stromu



Obr. 11: *V. sylvestris* v korune starého duba



Obr. 12: Liany *V. sylvestris* obopínajú kmeň hrabu



Fotodokumentácia

V teréne sme fotograficky zdokumentovali iba tie liany, ktoré vynikli rastom alebo inou charakteristikou (priemer kmeňa až 0,34 m - obr. 13) a bolo možné ich v lesnom poraste od iných drevín odlíšiť. Zo vzoriek odobratých pre ampelografický opis sme vyhotovili fotodokumentáciu vrcholov letorastov, líca a rubu listov, súkvetí, kvetov, strapcov bobúľ a semien.

Obr. 13: Ukážka hrúbky kmeňa liany *V. sylvestris*



Odber jednoročného dreva a založenie výsadby *ex situ* zbierky genotypov *V. sylvestris*

V zimnom období 2006/2007 sme odobrali jednoráčové drevo zo 41 lián na vypestovanie korenáčov. Bežný spôsob zakoreňovania jednoráčových odrezkov vo vode u tohto poddruhu viniča nie je úspešný. Preto odber v nastávajúcej zime zopakujeme a použijeme škôlkárske metódy na rozmnoženie lián.

Založenie zbierky *ex situ* má predovšetkým tieto ciele:

1. záchrana rastlín, ktoré sú v lesných porastoch ohrozené zánikom,
2. umožnenie podrobnejšieho štúdia lesného viniča,
3. vytvorenie bázy pre šľachtiteľské účely,
4. obohatenie genofondu rodu *Vitis*.

Možnosti využitia *V. sylvestris* pre šľachtenie viniča

Vedci sa zhodujú v názore, že *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* GMEL. je pôvodcom ušľachtilého viniča *Vitis vinifera* ssp. *sativa* L. Skutočnosťou je, že v dôsledku civilizačných zásahov lesnému viniču v mnohých lokalitách hrozí vyhynutie. Ochrannárske aktivity spejú nielen k jeho záchrane, ale aj k využiteľnosti niektorých jeho cenných biologických vlastností: preživa v inundovaných lužných lesoch už stovky rokov, rastie však aj v hornatých polohách (NEGRUĽ et al., 1965), prežil všetky kalamity ničivých chorôb a škodcov viniča bez zásahu človeka a oproti iným rezistentným druhom viniča jeho plody nemajú nepríjemnú pachuť. Ako taký by tento poddruh pri krížení mohol predstavovať zaujímavý zdroj génov, predovšetkým rezistencie proti hubovitým chorobám.

Prvý pokus s krížením lesného viniča sme vykonali v júni tohto roka peľom *V. sylvestris* naneseným na ušľachtilý vinič. Peľ z liany samčieho individua bol plne klíčivý, o čom svedčia normálne vyvinuté strapce po opelení vykastrovaného kvetenstva. Intenzívnejšiu šľachtiteľskú prácu budeme môcť rozvinúť po vstupe *V. sylvestris* v našej zbierke do plodnosti.

V literatúre sa uvádza, že sa *Vitis sylvestris* využíval aj ako podpník pre ušľachtilý vinič, ktorý nenaštepený na rezistentné druhy rodu *Vitis* trpí napadnutím fyloxérou (*Viteus vitifolii* Fitch.).

Záver

Lesný vinič ako poddruh ušľachtilého viniča je možné považovať za genetický zdroj pri šľachtení, najmä na získanie rezistencie voči stresovým faktorom. V súčasnosti však ide aj o výskum výskytu a ochrany náležisk *Vitis sylvestris* na Slovensku. Práca je preto zameraná na tieto študijné okruhy:

- podchytiť lokality výskytu tohto poddruhu na Slovensku,
- stanoviť stupeň nebezpečenstva jeho zániku,
- zabezpečiť ochranu tohto vzácneho poddruhu výskumnými metódami (založenie *ex situ* zbierky) ako aj administratívne,
- využiť tento poddruh pre tvorbu nových rezistentných genotypov.

Literatúra

1. ELIÁŠ, P. – DÍTĚ, D. – SÁDOVSKÝ, M. (2003): Floristické poznámky z juhozápadného Slovenska : Ohrozené a vzácne taxóny cievnatých rastlín. In: Bull. Slov. Bot. Spol., Bratislava, vol. 26, 2003, pp. 105-110.
2. MAGLOCKÝ, Š. (1999): *Vitis sylvestris* C. C. Gmel. In: Červená kniha ohrozených vzácných druhov rastlín a živočíchov SR a ČR Vol. 5. Bratislava : Príroda a. s., 1999, p. 406. ISBN 80-07-01084-X.
3. NEGRUE, A. M. – IVANOV, I. K. – KATEROV, K. I. – DONČEV, A. A. (1965): Dikorastuščij vinograd Bolgarii. Moskva : Kolos, 1965, 79 p.
4. POSPÍŠILOVÁ, D. – ŠIMORA, R. – RUMAN, T. – VALACHOVIČ, M. (2006): Lesný vinič (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* GMEL.) na Slovensku. In: Vinič a víno, vol. 6, 2006, N. 6., pp. 122-124.
5. SÁDOVSKÝ, M. (2001a): Fytocenologické pomery a populačná biológia ohrozených druhov v Prírodnej rezervácii Veľký les. Dipl. práca, Katedra lesníckej fakulty TU Zvolen, 2001.
6. SÁDOVSKÝ, M. (2001b): Fytocenózy Prírodnej rezervácie Veľký les. Rosalia (Nitra), vol. 16, 2001.
7. SÁDOVSKÝ, M., ZLACKÁ, S. (2005): Fytocenologické a lesnícke zápisky z lužných lesov Svätej Márie (Vých. Slovensko). In: Zborník VS-Tábora ochrancov prírody. Hafta, 2005.

Adresa autorov:

Ing. Dorota Pospíšilová, PhD., Ing. Daniel Sekera, PhD., Ing. Rastislav Šimora, Výskumná a šľachtiteľská stanica vinárska a vinohradnícka Modra, n. o., Dolná 120, Post Box 74, SK-90001 Modra, Slovensko, e-mail: vssvwm@pobox.sk

TVRDOST OBILEK JEČMENE (*HORDEUM VULGARE* L.) GRAIN HARDNESS OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)

Vratislav PSOTA – Karel VEJRAŽKA – Jiří HARTMANN – Markéta MUSILOVÁ

*In 20 varieties of two-row spring barley protein content, starch content and selected malting parameters were assessed. Vitreosity was assessed using the Light Transflectance Meter (LTm) a hardness using the Single Kernel Characterization System 4100 (SKCS). Vitreosity and hardness were affected by the locality from 87 % (LTm) or 83 % (SKCS). Significant correlations were found between LTm, SKCS and starch content (0.65***, -0.54***), extract content in malt (0.56***, -0.52***), Kolbach index (0.42***, -0.44***), friability (0.55***, -0.47), β -glucan content in wort (-0.51***, -0.53***). High correlation was found between the used physically different method LTm and SKCS (-0.87***).*

Key words: barley, malting quality, grain vitreosity, grain hardness

Úvod

Výběr odrůdy se řídí nejen podle agronomických vlastností, ale i podle předpokládaného směru využití výsledné suroviny. Zvláště u sladovnických ječmenů, odrůda a kvalitativní parametry odrůdy hrají významnou roli. Proto i při tvorbě nových odrůd se v procesu selekce klade důraz na kvalitativní parametry materiálu.

U obilky ječmene, ale i pšenice rozlišujeme dva odlišné typy endospermu: moučnatý a sklovitý. Rozdíly mezi nimi jsou způsobeny úrovní kompaktnosti endospermu. Moučnatý endosperm má otevřenější strukturu. Škrobová zrna jsou v bílkovinné matici volněji uložena. Sklovitý endosperm je charakteristický těsným spojením škrobových zrn a bílkovinné matrice. Často se vyskytují endospermy, které se nacházejí někde mezi těmito hraničními typy.

Při sladování ječmene dochází ke strukturálním změnám vlivem modifikace buněčných stěn, malých škrobových zrn a proteinové matrice. Úroveň modifikace je tudíž určována úrovní moučnatosti či sklovitosti endospermu sladovaného zrna. Při sladování za stejných podmínek je úroveň modifikace moučnatých a sklovitých zrn různá, což vede k heterogenitě vyrobeného sladu. Tvrdost obilky je založena spíše geneticky, zatímco sklovitost obilky je naopak ovlivněna převážně pěstebními podmínkami. Sklovitý endosperm může mít větší hustotu bílkovinné matrice než endosperm moučný (DOBRASZCZYK et al., 2002). Pro šlechtění ječmene je tedy předpověď sladovnické kvality, která se vztahuje k tvrdosti obilky klíčovým cílem.

Vzhledem k potřebě snižovat především ekonomické náklady na šlechtění, je třeba hledat metody rychlé, finančně nenáročné, pracující s malým množstvím materiálu a zároveň dostatečně přesné pro odhad kvalitativních parametrů.

Výše uvedené předpoklady částečně splňují metody charakterizující fyzikálních vlastností obilky ječmene (např. OSBORNE, ANDERSEN, 2003). Pro stanovení fyzikálních vlastností obilky je možné použít několik principiálně odlišných metod (PSOTA, VEJRAŽKA, 2006). Particle Size index - PSI (AACC 2000) je metoda pro určení stupně tvrdosti obilky pšenice. Pro určení úrovně tvrdosti zrn ječmene se stanovuje mlecí energie zrna - GME (ALLISON, 1986). Pro hodnocení tvrdosti zrna lze též využít i nástavec Do-Corder firmy Brabender (VEJRAŽKA et al., 2007). Perspektivní se jeví i metoda stanovení tvrdosti na přístroji Single Kernel Characterization System - SKCS 4100 (OSBORNE, ANDERSEN, 2003). Vzorek je v přístroji SKCS 4100 postupně rozdělen na jednotlivé obilky, které jsou váženy a drceny. Současně je zaznamenán průměr obilky a jejich vlhkost. Měření průměru, vlhkosti a váhy je nepřímé.

Pro hodnocení sklovitosti a moučnatosti zrn lze použít přístroj Light transflectance meter – LTm. Funkce přístroje LTm je založena na kvantitativním měření průchodu laserového paprsku obilkou ječmene nebo pšenice. Obilky ječmene není nutno zbavovat pluchy, protože laserový paprsek je schopen pluchou proniknout.

Specifikem u posledních dvou metod je hodnocení jednotlivých obilky ječmene. Metoda založená na optických vlastnostech endospermu používaná v přístroji LTm je navíc nedestruktivní.

Cílem práce bylo zjistit vztah mezi výsledky získanými pomocí přístroje LTm a SKCS 4100 navzájem a sladovnickou kvalitou.

Materiál a metody

V pokuse byly analyzovány vzorky 20 odrůd jarního, dvouřadého ječmene se sladovnickou i nesladovnickou kvalitou, který byly testovány na 4 zkušebních stanicích ÚKZÚZ pro Seznam doporučených odrůd ječmene.

Pro mikroskladování a měření na přístrojích LTm a SKCS 4100 byl použit přepad zrna na síť 2,5 mm. Dle metodik, dodávaných s přístroji, byly u zrna stanoveny hodnoty moučnatosti zrna (metodou LTm) a hodnoty tvrdosti (přístrojem SKCS). Souběžně byly vzorky mikroskladovány dle standardního postupu VÚPS, který vychází z postupu doporučeného EBC. U vyrobených sladů byly stanoveny vybrané kvalitativní parametry dle metodik EBC a MEBAK.

Nejprve byly vzorky proměřeny na přístroji LTm. Tento přístroj proměřuje najednou 97 zrn. Tato zrna byla následně proměřena na přístroji SKCS 4100. V rámci tohoto měření jsou zrna v přístroji drcena.

Výsledky byly statisticky hodnoceny analýzou variance s následným mnohonásobným testováním významnosti jednoduchých kontrastů, korelační analýzou. Byly použity statistické programy REML a SPSS.

Výsledky a diskuse

Vliv odrůdy a lokality

Ve šlechtění je nezbytné studovat vztah mezi odrůdou a prostředím, neboť úroveň jednotlivých znaků nemusí být podmíněna jen geneticky, ale i v různé míře i vlivem prostředí a interakcí odrůdy s prostředím. Allison 1986 zdůraznil, že odrůda je jedním z významných faktorů ovlivňující tvrdost obilky ječmene.

Ve sledovaném souboru byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl mezi odrůdami u obou metod použitých pro měření tvrdosti. Vliv odrůdy byl v případě metody LTm na úrovni 5 %. Výsledky získané na přístroji SKCS 4100 byly ovlivněny odrůdou podstatně více a pohybovaly se na úrovni 13 % (tab. 1). U mlecí energie byl zjištěn vliv odrůdy na úrovni 65 % (BERTHOLDSSON, 2004). Ve sledovaném souboru byly především sladovnické odrůdy s podobnou strukturou endospermu, což mohlo být důvodem nízkého vlivu odrůdy na variabilitu tohoto znaku.

Rozdíly mezi lokalitami byly statisticky vysoce průkazné u obou použitých metod, což odpovídá výsledkům SWANSTONA et al. (1993). Vliv lokality na proměnlivost tohoto znaku byl v případě metody LTm na úrovni 87 %, v případě výsledků získaných na přístroji SKCS 4100 byl 83 % (tab. 1).

Testování metodou LSD potvrdilo malé rozdíly mezi strukturami endospermu sledovaných odrůd. Pouze odrůda Orthega má výrazněji odlišnou strukturu endospermu. Metoda LTm ji zařadila do skupiny odrůd se sklovitějším endospermem. Metoda SKCS ji zařadila jako jedinou do samostatné skupiny s nejtvrdějším endospermem (tab. 2a, 2b).

Vliv složení obilky

V nesladované obilce ječmene byl stanoven obsah bílkovin, škrobu a neškrobových polysacharidů β -glukanů. Množství a kvalita dusíkatých látek obsažených v obilce výrazným způsobem ovlivňuje její fyzikální vlastnosti (PALMER, SHIRAKASHI, 1994; LEACH et al., 2002). Výsledky výzkumu naznačují, že i když je sklovitost spojována s vysokým obsahem dusíku a moučnatost naopak s nízkým obsahem dusíku (BROADBENT, PALMER, 2001), sklovitý nebo moučnatý endosperm mohou mít zrna s podobným obsahem dusíku (HOLOPAINEN et al., 2005). Hordeinové bílkoviny moučnatých endospermů se luští rychleji než hordeinové bílkoviny sklovitých endospermů (HOWARD et al., 1996).

Rozpětí, ve kterém se obsah bílkovin v jednotlivých vzorcích sledovaného souboru pohyboval bylo úzké (10 – 12,5 %). Vliv obsahu bílkovin na tvrdost obilky zjištěnou přístrojem SKCS byl statisticky neprůkazný. Optická metoda (LTm) zaznamenala sice malý, ale vysoce průkazný vliv obsahu dusíkatých látek na průchod laserového paprsku. Se vzrůstajícím obsahem dusíkatých látek vzrůstá i tvrdost obilky, což zjistili například ALLISON et al. (1979), HENRY, COWE (1990) a TOHNO-OKA et al. (2004). Podstatnější vliv na tvrdost obilky má pravděpodobně kvalitativní složení bílkovin. SLACK et al. (1979) předpokládají, že hordeiny v proteinové matici představují hlavní překážku odbourávání škrobových zrn. Jednotlivé skupiny hordeinů vykazují různé biochemické vlastnosti a různé složení aminokyselin, což se odráží v tvorbě a stabilitě chemických vazeb. Hordeinové bílkoviny moučnatých endospermů se luští rychleji, než hordeinové bílkoviny sklovitých endospermů (HOWARD et al., 1996). Některé hordeinové bílkoviny jsou díky svým vlastnostem odolnější vůči proteolytickému rozluštění (PALMER, SHIRAKASHI, 1994) a v endospermu mohou vytvářet místa s pevnější vazbou mezi škrobovými zrny a bílkovinnou maticí, která jsou odolnější rozluštění než okolí.

Obsah škrobu výrazně ovlivňoval úroveň sklovitosti resp. tvrdosti obilky. Statisticky vysoce významná korelace (LTm 0,65***, SKCS -0,55***) ukazuje, že se vzrůstajícím obsahem škrobu klesá sklovitost resp. tvrdost obilky, což koresponduje s výsledky získanými autory HENRY a COWE (1990) a TOHNO-OKA et al. (2004). SWANSTON (1996) se zabýval vlivem kvality škrobu na úroveň mlecí energie. Linie s drolivým endospermem vykazují nižší mlecí energii.

Vliv sklovitosti resp. tvrdosti na sladovnické znaky

Sladovnické parametry nejsou ovlivněny tvrdostí obilky přímo. Tento vztah je výrazně ovlivněn vlastním procesem sladování. V průběhu sladování vstupují do hry nejen fyzikální vlastnosti obilky, ale také aktivita enzymatického aparátu a přístupnost vysokomolekulárních látek k enzymatické degradaci. Z tohoto důvodu je nutno očekávat nižší úroveň vzájemného vztahu mezi tvrdostí obilky a sladovnickými parametry (tab. 3).

Obě metody použité k měření sklovitosti resp. tvrdosti potvrdily, že modifikace škrobu je výrazným způsobem ovlivněna tvrdostí obilky. Se vzrůstající sklovitostí resp. tvrdostí obilky klesá obsah extraktu (LTm 0,56***, SKCS -0,53***) a glycidového extraktu (LTm 0,48***, BRA -0,37***), což odpovídá i korelacím zjištěným autory HOME, ELAMO (1993) a TAYLOR, SWANSTON (1987). Naopak nevýznamné korelace mezi úrovní tvrdosti a obsahem extraktu zjistili ELLIS et al. (1999), SWANSTON et al. (1992).

Vztah mezi sklovitostí resp. tvrdostí obilky ječmene a aktivitou amylolytických enzymů hydrolyzujících škrob (převážně β -amylasy a α -amylasy) vyjádřenou diastatickou mohutností nebyl statisticky průkazný. Stejně tak byl statisticky neprůkazný vztah mezi tvrdostí obilky a účinností amylolytických enzymů

vyjádřenou dobou zcukření. Aktivita amylytických enzymů byla dostatečná a nebyla sklovitostí resp. tvrdostí obilek ovlivněna, ale sklovitost resp. tvrdost obilky negativně ovlivnila přístupnost škrobu k jeho enzymatické degradaci.

Modifikace bílkovin byla významnou měrou ovlivněna sklovitostí resp. tvrdostí obilky. Se vzrůstající sklovitostí / tvrdostí obilky klesala úroveň modifikace bílkovin vyjádřená pomocí Kolbachova čísla (LTm 0,42***, SKCS -0,44***). Obdobný vztah zaznamenal SWANSTON et al. (1992).

Relativní extrakt při 45 °C, tj. extrakt zvýšený o činnost tepelně stabilních enzymů, pravděpodobně proteas a β -glukanas, byl také statisticky vysoce průkazně ovlivněn sklovitostí resp. tvrdostí obilek (LTm 0,38***, SKCS -0,44***).

Významná korelace byla zjištěna také mezi sklovitostí resp. tvrdostí obilky a modifikací buněčných stěn. Obě použité metody zachytily stejný trend, tj. se vzrůstající sklovitostí resp. tvrdostí obilky se zhoršovala modifikace buněčných stěn v průběhu sladování (LTm -0,51***, SKCS 0,53***), což zaznamenali i HOME, ELAMO (1993) a BERTHOLDSSON (2004). Také friabilita (LTm 0,55***, SKCS -0,47***) a s ní spojené parametry (homogenita friabilimetrem, sklovitá zrna, částečně sklovitá zrna) byly významnou měrou ovlivněny sklovitostí resp. tvrdostí obilky.

Snížená úroveň modifikace škrobu, bílkovin a buněčných stěn ovlivnila kromě barvy a čirosti sladiny také její kvalitativní složení. Se vzrůstající sklovitostí resp. tvrdostí obilek došlo ke zhoršování kvalitativního složení sladiny a k poklesu hodnot dosažitelného stupně prokvašení (LTm 0,36***, SKCS -0,33***). Obdobné vztahy mezi sladovnickými znaky a tvrdostí obilek zaznamenali i PSOTA et al. (2007).

Korelace mezi použitou optickou metodou stanovení sklovitosti (LTm) a metodou stanovení tvrdosti obilek ječmene (SKCS) byla vysoká (-0,87***) (tab. 3).

Závěr

U 20 odrůd ječmene byl stanoven obsah bílkovin, škrobu a vybrané sladovnické znaky. Sklovitost byla stanovena pomocí Light Transflectance Meter (LTm) a tvrdost pomocí přístroje Single Kernel Characterization System 4100 (SKCS). Sklovitost a tvrdost byla ovlivněna lokalitou z 87 % (LTm) respektive 83 % (SKCS). Významné korelace byly zjištěny mezi LTm, SKCS a obsahem škrobu (0,65***, -0,54***), obsahem extraktu (0,56***, -0,52***), Kolbachovým indexem (0,42***, -0,44***), friabilitou (0,55***, -0,47), β -glukany ve sladince (-0,51***, -0,53***). Vysoká korelace byla nalezena mezi oběmi použitými metodami (-0,87***).

Literatura

1. AACC: Methods 55-30. In: Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th St. Paul: AACC, 2000. ISBN 1891127128.
2. ALLISON, M.J. - COWE, I.A. - BORZUCKI, R. - BRUCE, F.M. - MCHALE, R.: Milling energy of barley. J. Inst. Brew., 1979, 85, 262-264.
3. ALLISON, M.J.: Relationships between milling energy and hot water extract values of malts from some modern barleys and their parental cultivars. J. Inst. Brew 92, 1986, 604-607.
4. BERTHOLDSSON, N.O., The use of environmentally stable grain characteristics for selection of high extract yield and low beta-glucan in malting barley. Eur. J. Agron., 2004, 20, 237-245.
5. BROADBENT, R.E. - PALMER, G.H.: Relationship between beta-amylase activity, steeliness, mealiness, nitrogen content and nitrogen fractions of the barley grain. J. Inst. Brew., 2001, 107(6), 349-354.
6. DOBRASZCZYK B.J. - WITHWORTH M.B. - VINCENT J.F.V. - KHAN, A.: Single kernel wheat hardness and fracture properties in relation to density and the modelling of fracture in wheat endosperm. J. Cereal Sci., 35:245-263., 2002.
7. ELLIS, R.P. - FERGUSON, E. - SWANSTON, J.S. - FORREST, J.M.S. - FULLER, J.D. - LAWRENCE, P.E. - POWELL, W. - RUSSELL, J. - TESTER, R.F. - THOMAS, W.T.B. - YOUNG, G.R.: Use of DNA marker-based assays to define and select malting characteristics in barley. HGCA Research Report No. 183, 1999.
8. HENRY, R.J. - COWE, I.A.: Factors influencing the hardness (milling energy) and malting quality of barley. J. Inst. Brew., 1990, 96, 135-136.
9. HOLOPAINEN, U.R.M. - WILHELMSON, A. - SALMENKALLIO-MARTTILA, M. - PELTONEN-SAINIO, P. - RAJALA, A., REINIKAINEN, P. - KOTAVIITA, E. - SIMOLIN, H. - HOME, S.: Endosperm structure affects the malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Agric. Food Chem., 2005, 53(18), 7279-7287.
10. HOME, S.- ELAMO, E.: Evaluation of malting potential in barley breeding programmes. Monschr. Brauwiss., 1993, 46(6), 216-220.
11. HOWARD, K.A. - GAYLER, K.R. - EAGLES, H. - HALLORAN, G.M.: The relationship between D hordein and malting quality in barley. J. Cereal Sci., 1996, 24, 47-53.

12. LEACH, R., LI, Y. - EDNEY, M. - IZYDORCZYK, M. - EGI, A. - SAWATZKY, K.: Effects of barley protein content on barley endosperm texture, processing condition requirements, and malt and beer quality. *MBAA TQ*, 2002, 39, 191-202.
13. OSBORNE B.G. - ANDERSSON R.S.: Single-Kernel Characterization Principles and Applications. *Cereal Chem.* 80(5):613-622, 2003.
14. PALMER, G.H. - SHIRAKASHI, T.: Enzyme modification of Kym and Triumph endosperm proteins during malting. *Ferment.*, 1994, 7(5), 289-297.
15. PSOTA, V. - VEJRAŽKA, K.: Fyzikální vlastnosti obilek ječmene a zrn sladu. *Kvasny Prum.* 52, 2006, 5: 148-150.
16. PSOTA, V. - VEJRAŽKA, K. - FAMĚRA, O. - HRČKA, M.: Relationship between Grain hardness and malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Inst. Brew.* 113(1), 80-86, 2007.
17. SLACK, P.T. - BAXTER, E.D. - WAINWRIGHT, T.: Inhibition by hordein of starch degradation. *J. Inst. Brew.* 85, 1979, 112-114.
18. SWANSTON, J.S. - ELLIS, R.P. - ROYO, C. - RAMO, T. - RUBIO, A. - PEREZ-VENDRELL, A. - MOLINA-CANO, J-L.: Grain and malt milling energies relative to malting quality parameters in a mutant of cv. Troubadour. *J. Inst. Brew.*, 1992, 98, 505-508.
19. SWANSTON, J.S.: Deleterious associations with quality, in high amylose inbred lines, are not readily broken. *Barley Genetics Newsletter*, 1996, 25, 50-54.
20. SWANSTON, J.S. - ELLIS, R.P. - RUBIO, A. - RAMO, T. - URIBE, T. - MOLINA-CANO, J-L.: Grain quality of a barley mutant and its parent cultivar in Spain and Scotland. *Asp. appl. biol.*, 1993, 36, Cereal Quality III, 143-151.
21. TAYLOR, K. - SWANSTON, J.S.: Malting quality assessment in a petri-dish. *Asp. appl. biol.*, 1987, 15 (Cereal Quality), Wellesbourne, Warwick, UK, Association of Applied Biologists, 523-528.
22. TOHNO-OKA, T. - KAWADA, N. - YOSHIOKA, T.: Relationship between grain hardness and endosperm cell wall polysaccharides in barley. Poster Section no. 6, 9th International Barley Genetics Symposium, 20-26 June 2004, Brno Trade Fairs, Brno, 2004, Czech Republic.
23. VEJRAŽKA K. - PSOTA V. - EHRENBERGEROVÁ J. - BŘEZINOVÁ-BELCREDI N. - CERKAL R.: Potential of grain hardness of barley (*Hordeum vulgare* L.) as a selection trait in breeding programme. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. LV*, 2:99-104, 2007.

Table 1: Analysis of variance and estimated components of variance for

Source of variation	d.f.	Mean square	Var. cp %	SE
LTm				
Locality	3	19793.946	***	87.63 808.0848
Variety	19	316.618	***	5.26 25.9532
Residual	57	80.042		7.11 14.9933
SKCS (Havg)				
Locality	3	3788.6181	***	83.35 154.6697
Variety	19	128.7784	***	13.38 10.4511
Residual	57	7.4214		3.27 1.3902
Comments:				
*	P=0.05		***	P=0.001
**	P=0.01		NS	non significant

Adresa autorov:

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

(psota@brno.beerresearch.cz)

Karel VEJRAŽKA, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, současná adresa: Roháčova 39, 430 03 Chomutov

(kvejrazka@click.cz)

Jiří HARTMANN, ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, Česká republika (jiri.hartmann@ukzuz.cz)

Markéta MUSILOVÁ, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika (xmusil14@node.mendelu.cz)

Table 2a: Multiple range analysis for LTm

Method: 95 % LSD			
Varieties	n	average	
Orthega	4	26.75	a
Heris	4	33.25	a b
Radegast	4	36.5	a b c
Diplom	4	38.75	a b c d
Kompakt	4	43.25	b c d e
Bojos	4	46.75	c d e f
Tolar	4	48.50	c d e f
Saloon	4	48.75	c d e f
Malz	4	49.50	d e f
Class	4	50.25	d e f
Sebastian	4	51.00	d e f
Bolina	4	51.25	d e f g
Calgary	4	51.50	e f g
Nitran	4	53.00	e f g
Jersey	4	53.50	e f g
Respekt	4	54.00	e f g
Faustina	4	55.75	e f g
Prestige	4	56.25	f g
Xanadu	4	57.50	f g
Braemar	4	63.75	g
Comments:	LSD(t) (P=0.05)	12.6709	
Average values indicated by various letters are statistically different (P = 0.05)			

Table 2b: Multiple range analysis for SKCS (Havg)

Method: 95 % LSD			
Varieties	n	average	
Orthega	4	69.650	a
Calgary	4	59.475	b
Bolina	4	58.150	b
Kompakt	4	57.125	b c
Heris	4	57.000	b c
Malz	4	56.800	b c
Sebastian	4	54.125	c d
Xanadu	4	53.300	c d e
Respekt	4	52.225	d e f
Faustina	4	51.350	d e f
Diplom	4	51.150	d e f
Radegast	4	50.750	d e f
Jersey	4	50.225	e f
Braemar	4	49.900	e f g
Nitran	4	49.675	e f g h
Bojos	4	48.800	f g h
Saloon	4	48.700	f g h
Class	4	46.175	g h
Prestige	4	46.100	g h
Tolar	4	45.950	h
Comments:	LSD(t) (P=0.05)	3.85825	
Average values indicated by various letters are statistically different (P = 0.05)			

Table 3: Detected correlation between LTm and HAVG and technological parameters

	LTm	SKCS (Havg)
LTm		-0,8730 ***
HAVG	-0,8730 ***	
Protein content in caryopsis	-0,3848 ***	0,0928 NS
Extract yield	0,5653 ***	-0,5256 ***
Relative extract (45 °C)	0,3855 ***	-,04459 ***
Kolbach index	0,4245 ***	-0,4443 ***
Diastatic power	0,0077 NS	-0,2261 *
Apparent final attenuation	0,3673 ***	-0,3389 **
Friability	0,5561 ***	-0,4735 ***
β-glucan in wort	-0,5130 ***	0,5394 ***
Protein in malt	-0,4252 ***	0,1381 NS
Total sol. N in wort	0,0913 NS	-0,2831 *
Saccharidic extract	0,4808 ***	-0,3747 ***
Viscosity of wort	-0,3941 ***	0,4908 ***
Colour of wort	-0,1824 NS	0,1001 NS
Saccharification rate	-0,0969 NS	0,2511 *
Glassy corns	-0,2557 *	0,3063 **
Homogeneity (by friabilimeter)	0,4961 ***	-0,5011 ***
Partly unmodified grains	-0,4943 ***	0,4981 ***
Haze of wort at 90 °	0,0884 NS	0,1125 NS
Clarity (Appearance) of wort	0,0628 NS	0,1125 NS
Starch content in caryopsis	0,6506 ***	-0,5499 ***
Degree of steeping 1	-0,1748 NS	0,1016 NS
Degree of steeping 2	-0,1599 NS	0,0270 NS
Comments: LTm - Light transfectance meter SKCS (Havg) - Single Kernel Characterization System (Hardness, average)		

ADAPTABILITA PERSPEKTÍVNYCH ODRÔD KRMOVÍN NA PODMIENKY ŤAŽKÝCH PÔD VÝCHODOSLOVENSKEJ NÍŽINY THE ADAPTABILITY OF PERSPECTIVE VARIETIES OF FODDER PLANTS ON CONDITIONS OF HEAVY SOILS OF THE EAST-SLOVAKIAN LOWLAND

Ladislav KOVÁČ

In Milhostov, on heavy soils, which are localized on experimental working place of SARC – Institute of Agroecology, production and endurance parameters of perspective fodder plants varieties were verified. In field experiment were examined: seven tetraploid varieties of red clover, one diploid variety and one new breeding species of red clover and one variety of bird's-foot clover. Experimental observations of floristic composition and production parameters of fodder crops were made in years 2006 and 2007. On heavy soils of the East-Slovakian Lowland from point of view of floristic and production varieties of red clover Amos and Magura had the best invocation. Diploid varieties Marieta and new breeding species PS 162 in yields and endurance were moderately worse than tetraploid varieties. Stand of bird's-foot clover wasn't adequate compact and its yields were the lowest, too.

Key words: fodder plants, yields, floristic composition

Úvod

Charakteristickou črtou Východoslovenskej nížiny (VSN) je vysoké zastúpenie ťažkých a veľmi ťažkých pôd, ktoré zaberajú takmer 40 % z výmery poľnohospodárskej pôdy. Pri pestovaní viacročných krmovín (VRK) na VSN je preto nevyhnutné sa zamerať na výber vhodných druhov VRK a v rámci druhov aj odrôd, ktoré poskytnú vysoké úrody kvalitného krmiva. Tejtó problematike sa na VSN, aj po prudkom poklese stavov polygastrických zvierat a tým pádom aj plôch VRK, venovala naďalej pozornosť (GEJGUŠ, KOVÁČ, 1998; KOVÁČ, 2003). Podobné pokusy s viacročnými krmovinami sa zakladajú v rôznych ďalších pôdno-klimatických podmienkach Slovenska, čo je známe z prác autorov ILAVSKÁ, RATAJ (1998), ILAVSKÁ, VOROBEL (2006) a VOROBEL, ILAVSKÁ (2006).

Materiál a metóda

Pokus s monokultúrami ďatelinovín bol založený na experimentálnom pracovisku SCPV – Ústavu agroekológie v Milhostove. Pracovisko sa nachádza v nadmorskej výške 101 m. Dlhodobý priemer zrážok je 559 mm a dlhodobý priemer teplôt 8,9 °C. V Milhostove sa nachádzajú pôdy s vysokým obsahom ílovitých častíc (nad 50 %). Sú to ťažké fluvizeme glejové, ktoré sa veľmi ťažko obrábajú. Pokus bol založený roku 2006 v desiatich variantoch a troch opakovaniach a pokračoval v roku 2007.

Tabuľka 1: Zloženia pokusných variantov

Variant	Druh	Odroda	Výsevok [kg.ha ⁻¹]	
1	ďatelina lúčna	Vesna	4 n	22,0
2	ďatelina lúčna	Radegast	4 n	22,0
3	ďatelina lúčna	Rezista	4 n	22,0
4	ďatelina lúčna	Amos	4 n	22,0
5	ďatelina lúčna	Nodula	4 n	22,0
6	ďatelina lúčna	Margot	4 n	22,0
7	ďatelina lúčna	Magura	4 n	22,0
8	ďatelina lúčna	Marieta	2 n	15,2
9	ďatelina lúčna	novošľachtenec PS 162	2 n	15,2
10	ľadenec rožkatý	Polom		9,9

V pokuse boli zaradené perspektívne odrody ďatelinovín a jeden novošľachtenec. Z 9 odrôd ďateliny lúčnej bolo 7 tetraploidných a dve diploidné.

Pred sejbou sa aplikoval dusík v dávke 30 kg.ha⁻¹, fosfor v dávke 30 kg.ha⁻¹ a draslík v dávke 60 kg.ha⁻¹. V druhom úžitkovom roku sa aplikoval len fosfor a draslík v tej istej dávke ako pred založením pokusu. Pred kosbou sa zisťovalo floristické zloženie porastu metódou redukovanej projektívnej dominancie. Produkcia sušiny sa hodnotila analýzou rozptylu s testovaním rozdielov. Poveternostné podmienky na stanovišti v roku 2006 a do septembra 2007 sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Priemerné mesačné teploty vzduchu a úhrny zrážok v Milhostove

Mesiac	Teplota vzduchu [°C]			Mesiac	Úhrny zrážok [mm]		
	DN	2006	2007		DN	2006	2007
I.	-3,3	-4,7	2,4	I.	32	13	40
II.	-1,0	-2,6	2,8	II.	28	41	40
III.	3,5	2,3	8,2	III.	27	48	18
IV.	9,7	11,3	11,2	IV.	39	49	6
V.	14,6	14,8	17,5	V.	53	83	38
VI.	18,2	18,8	20,7	VI.	78	96	72
VII.	19,6	22,5	22,5	VII.	76	18	11
VIII.	19,0	18,8	21,7	VIII.	63	151	29
IX.	14,8	16,3	13,6	IX.	41	5	147
X.	9,1	10,3	-	X.	39	23	-
XI.	4,0	5,4	-	XI.	43	16	-
XII.	-0,7	2,2	-	XII.	41	13	-
priemer	8,9	9,6	-	suma	559	556	-

Výsledky a diskusia

Pokus s odrodami d'atelinovín bol založený 17.05.2006. D'atelinoviny začali vzhádzať 22.05.2006. Z dôvodu vysokého zaburinenia bolo potrebné dňa 18. júla urobiť očišťovacu kosbu. Po očišťovacej kosbe denné teploty vystupovali nad 30 °C a bolo dlhšie obdobie bez zrážok, ktoré trvalo až do 29. júla, kedy spadlo 11 mm zrážok. Z tohto dôvodu bola prvá kosba urobená až 25.09.2006. Floristické zloženie pred prvou kosbou je uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3: Floristické zloženie porastov v roku 2006 [%]

Kosba	Ukazovateľ	Variant									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Ď	90	92	91	90	91	89	91	84	86	33
	B	10	6	8	9	8	9	8	13	12	56
	PM	0	2	1	1	1	2	1	3	2	11

Tetraploidné odrody d'ateliny lúčnej reagovali na podmienky prostredia priaznivejšie ako diploidné odrody. Ich pokryvnosť v poraste bola vyššia (89 – 92 %) ako pri diploidných odrodách (84 – 86 %). V preriedenom poraste ľadencia rožkatého (33 %) prevládali byliny s 56 %-ným zastúpením.

V tabuľke 4 je uvedená produkcia sušiny. Najvyššie produkčné parametre dosahovali odrody Amos (variant 4) s úrodou 4,17 t.ha⁻¹ sušiny, Radegast (variant 2) s úrodou 4,06 t.ha⁻¹ sušiny a Nodula s úrodou 3,92 t.ha⁻¹ sušiny. Nízka úroda (pod 3,0 t.ha⁻¹) sušiny bola dosiahnutá pri odrode Margot a ľadenci rožkatom odrody Polom, pri ktorom prevažnú časť produkcie tvorili byliny.

Tabuľka 4: Produkcia sušiny d'atelinovín v roku 2006 [t.ha⁻¹]

Variant	Produkcia sušiny	
	1. kosba	Spolu
1	3,26	3,26
2	4,06	4,06
3	3,70	3,70
4	4,17	4,17
5	3,92	3,92
6	2,97	2,97
7	3,73	3,73
8	3,62	3,62
9	3,18	3,18
10	2,99	2,99

V roku 2007 pokus pokračoval druhým úžitkovým rokom.

Tabuľka 5: Floristické zloženie porastu v roku 2007

Kosba	Ukazovateľ	Variant									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Ď	99	98	95	97	97	98	98	95	93	65
	B	1	2	5	3	3	2	2	5	6	21
	PM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14
2.	Ď	95	89	95	98	96	96	90	91	77	80
	B	1	3	1	1	1	0	2	3	8	15
	PM	4	8	4	1	3	4	8	6	15	5
3.	Ď	78	75	77	80	82	94	75	70	77	75
	B	4	7	5	3	4	2	8	12	5	15
	PM	18	18	18	17	14	14	17	18	18	10

V prvej kosbe boli pri všetkých odrodách ďateliny lúčnej kompletne porasty s nízkym zastúpením bylín 1 % až 6 %. Porast ľadenca rožkatého, ktorý bol zastúpený na 65 % bol redší (14 % PM) a s vysokým zastúpením bylín 21 %.

V druhej kosbe boli porasty ďateliny lúčnej ešte kompletne 89 – 98 %, okrem novošľachtenca PS 162, ktorý bol preriedený (15 % PM) a podiel bylín tvoril 8 %. Oproti prvej kosbe bol porast ľadenca rožkatého kompletnejší (80 %), aj keď s pomerne vysokým podielom bylín (15 %).

V tretej kosbe sa porasty vplyvom nadnormálnych teplôt a dlhého obdobia bez zrážok, alebo minimálneho množstva zrážok preriedili, zvýšil sa podiel prázdnych miest na všetkých variantoch a zvyšovalo sa aj zaburinenie porastu.

Výsledky hodnotenia úrod sušiny sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6: Produkcia sušiny ďatelinovín v roku 2007 [t.ha⁻¹]

Variant	Produkcia sušiny			
	1. kosba	2. kosba	3. kosba	Spolu
1	1,28	3,94	0,70	5,92
2	1,19	3,33	0,52	5,04
3	1,20	4,31	0,66	6,17
4	1,24	5,64	0,61	7,49
5	1,28	4,26	0,65	6,19
6	1,12	4,66	0,41	6,19
7	1,24	4,92	0,71	6,87
8	1,16	4,07	0,40	5,63
9	1,23	3,74	0,51	5,48
10	0,73	2,17	0,64	3,54

Na výšku produkcie sušiny v roku 2007 výrazne vplývali poveternostné podmienky, keď priemerné teploty od januára do konca augusta každý mesiac prekonávali dlhodobý priemer a suma zrážok každý mesiac od marca do konca augusta výrazne zaostávala za dlhodobým normálom. Septembrové zvýšené zrážky (147 mm) už na výslednú produkciu nemali vplyv, keďže tretia a posledná kosba v roku bola urobená 21.09.2007. Produkčné parametre ďatelinovín boli nižšie ako v predchádzajúcich obdobiach, keď sa v druhom úžitkovom roku dosahovali úrody sušiny od 10,6 t.ha⁻¹ do 12,82 t.ha⁻¹ (Kováč, 2003). Svoje nižšie úrodové parametre na VSN potvrdil ľadec rožkatý (3,54 t.ha⁻¹), čím sa potvrdili výsledky pokusov s týmto druhom ďatelinovín na fluvizemi kultizemnej vo Vysokoj nad Uhom (KOVÁČ, GEJGUŠ, PORVAZ, 2002). Ľadec rožkatý sa preto odporúča skôr ako doplnková ďatelinovina do ďatelinotravných miešanií.

Podobne ako v prvom aj v druhom úžitkovom roku bola najproduktívnejšia tetraploidná odroda ďateliny lúčnej Amos (7,49 t.ha⁻¹), pred ďalšou tetraploidnou odrodou Magura s úrodou 6,87 t.ha⁻¹ sušiny. Úrody nad 6 t.ha⁻¹ sušiny boli dosiahnuté ešte pri tetraploidných odrodách Rezista, Nodula a Margot. Diploidné odrody Marieta a novošľachtenec PS 162 úrodovo boli na nižšej úrovni (5,63 t.ha⁻¹ sušiny a 5,48 t.ha⁻¹ sušiny), čo je v súlade aj s tvrdeniami ILAVSKEJ a RATAJA (1998).

Štatistické hodnotenia potvrdili preukazne vyššie úrody v roku 2007. Štatisticky preukazne najvyššie úrody boli pri odrode Amos. Medzi odrodami Magura, Nodula a Radegast neboli zistené významné rozdiely. Signifikantne najnižšie úrody boli pri ľadenci rožkatom.

Záver

Na ťažkých pôdach VSN sa sledovalo floristické zloženie a produkčné parametre vybraných druhov a perspektívnych odrôd ďatelinovín. Na výsledky z pokusných sledovaní výrazne vplývali poveternostné podmienky, ktoré sa najmä v roku 2007 vyznačovali nadnormálnymi hodnotami pri zrážkových úhrnoch, ktoré boli od marca do konca augusta pod mesačnými normálmi. Floristicky a produkčne sa najlepšie

uplatnili tetraploidné odrody ďateliny lúčnej Amos a Magura, pred odrodami Rezista, Nodula, Margot a Vesna. Diploidné odrody Marieta a novošľachtenec PS 162 vytrvalostne a produkčne mierne zaostávali za uvedenými tetraploidnými odrodami. Najmenej kompaktný bol porast ľadenca rožkatého, ktorý poskytoval najnižšie úrody sušiny a pre monokultúrne využitie na ťažkých pôdach sa ukázal ako menej vhodný.

Literatúra

1. GEJGUŠ, J. – KOVÁČ, L. 1998. Uplatnenie hybridov Festuco - lolium v jednoduchých miešankách. In: Odrúda – základ efektívnej rastlinnej produkcie. Brno : VÚP Troubsko, 1998, s. 96-100.
2. ILAVSKÁ, I. – RATAJ, D. 1998. Testovanie vybraného sortimentu tráv a ďatelinovín v monokultúrach a účelových miešankách : Záverečná správa. Banská Bystrica : VÚTPHP, 1998, 41 s.
3. ILAVSKÁ, I. – VOROBEL, M. 2006. Uplatnenie tráv a ich jednoduchých miešaniek s ďatelinou lúčnou v rozdielnych podmienkach Slovenska. In: Podtatranské pažite. Prybilina – Levoča : SPU Nitra, ŠS Levočské Lúky, 2006, s. 147-154. ISBN 80-8069-721-3
4. KOVÁČ, L. 2003. Úrodové parametre odrôd ďatelinovín na ťažkých fluvizemiach glejových. In: Zborník vedeckých prác OVÚA v Michalovciach. Michalovce : OVÚA, 2003, s. 137-146. ISBN 80-969049-4-9
5. KOVÁČ, L. – GEJGUŠ, J. – PORVAZ, P. 2002. Zabezpečenie potrieb hovädzieho dobytku živinami a energiou z porastov viacročných krmovín v podmienkach VSN : Záverečná správa. Michalovce : OVÚA, 2002, 33 s.
6. VOROBEL, M. – ILAVSKÁ, I. 2006. Uplatnenie ďatelinotravných miešaniek v rozdielnych oblastiach Slovenska. In: Podtatranské pažite. Prybilina – Levoča : SPU Nitra, ŠS Levočské Lúky, 2006, s. 155-162. ISBN 80-8069-721-3

Adresa autora:

Ing. Ladislav Kováč, PhD., SCPV – Ústav agroekológie Michalovce, Špitálska 1273, 071 01 Michalovce, kovac@scpv-ua.sk

HODNOTENIE VYBRANÝCH RODIČOVSKÝCH ODRÔD PŠENICE LETNEJ F. OZIMNEJ

EVALUATION OF SELECTED PARENTAL WINTER WHEAT CULTIVARS

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Daniel MIHÁLIK – Michal ŠAJGALÍK – Darina MUCHOVÁ –
Mária LICHVÁROVÁ – František ONDREJČÁK – Martin UŽÍK

*By molecular markers dwarf genes (*Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht 8*) were detected at 24 wheat cultivars originated from west Europe. Grain yield formation traits and quality traits were analysed. Positive effects of dwarf gene *Rht-D1b* on agronomic characteristics were confirmed.*

Key words: wheat, cultivar, dwarf genes, agronomic characteristics

Šľachtenie rastlín je rekurentný proces selekcie, ktorý zabezpečuje kumuláciu priaznivých alel rodičovských genotypov. Preto pri odrodách, ktoré majú byť rodičmi je potrebné spoľahlivo vyhodnotiť hospodárske znaky, úrodu i kvalitu vo viacerých prostrediach.

Optimálna výška rastlín má veľký význam pre stabilitu a produktivitu odrôd pšenice. Preto jedným z hlavných šľachtiteľských cieľov je tvorba odrôd s optimálnou výškou v daných podmienkach prostredia.

V súčasnosti je známych 21 major génov (*Rht*), ktoré redukovujú výšku (McINTOSH et al., 1998). Mnohé z týchto génov boli odvodené ako mutantné formy a nemajú žiadnu šľachtiteľskú hodnotu. Je iba niekoľko major génov, ktoré redukovujú výšku a neredukujú úrodu a preto sú vhodné pre komerčné šľachtiteľské programy (DALRYMPLE, 1986). Podľa reakcie na kyselinu giberelínovú sú *Rht* gény klasifikované ako necitlivé a citlivé na exogénnu kyselinu giberelínovú (GA). Gény necitlivé na GA, *Rht-B1b* alebo *Rht-D1b* (pôvodné označenie *Rht 1* a *Rht 2*), sú prítomné vo väčšine krátkosteblových odrôd pšenice vo svete. Väčšina odrôd pšenice v južnej a čiastočne aj v strednej Európe má okrem major génov krátkosteblovosti *Rht 1* a *Rht 2* tiež gén *Rht 8*, ktorý má malý účinok na výšku rastlín, ale je vo väzbe s génom pre fotoperiodickú senzitivitu *Ppd*. Genotypy, ktoré majú gén krátkosteblovosti *Rht 8* klasia skôr, majú kratšiu vegetačnú dobu. Genotypy s major gémi *Rht 1* a *Rht 2* majú významne zvýšený zberový index a ich pestovanie je ziskovejšie (BOGNAR et al., 2007).

Na rozdiel od starších GA insenzitívnych odrôd v súčasnosti v ČR je pozorovaná vyššia frekvencia génu krátkosteblovosti *Rht 2*, čo súvisí s pozitívnymi efektmi tohto génu na agronomicky dôležité znaky (CHRPOVÁ et al., 2003). Introdukcia tohto génu krátkosteblovosti v ČR súvisí s dlhodobým využívaním genetických zdrojov zo západnej Európy v šľachtiteľských programoch.

Cieľom výskumu bolo na vybraných zahraničných odrodách pšenice letnej f. ozimnej:

- detekovať pomocou molekulárnych markerov gény krátkosteblovosti *Rht-B1b*, *Rht-D1b* a *Rht 8*,
- analyzovať vybrané úrodovotné znaky a znaky kvality vo vzťahu k detekovaným génom krátkosteblovosti.

Materiál a metódy

V roku 2004/05 bolo na VŠS Malý Šariš v pokuse založenom metódou znáhodnených blokov v 2 opakovaníach skúšaných 24 zahraničných odrôd pšenice letnej formy ozimnej. Odrody pochádzali najmä zo štátov západnej Európy, odroda Mv Suba z Maďarska a odroda Shaan M 8121 má pôvod v Číne (tab. 1). V priebehu vegetácie boli sledované fenologické znaky, v zrelosti bola odobraná vzorka nadzemnej biomasy zo 6 riadkov dĺžky 1 m a rozborovaná na základné úrodovotné znaky. V priemernej vzorke zrna bol pomocou NIRs analýzy stanovený obsah bielkovín a obsah mokrého lepku.

Molekulárna detekcia *Rht* génov krátkosteblovosti: pri analýze dĺžkového polymorfizmu mikrosatelitného markera WMS 261 sme postupovali podľa KORZUN et al. (1998), sekvencie primerov pre *Rht-B1a*, *Rht-B1b*, *Rht-D1a* a *Rht-D1b* boli navrhnuté podľa ELLIS et al. (2002).

Údaje boli spracované pomocou programu Statgrafics for Windows.

Výsledky a diskusia

Zo súboru 24 hodnotených odrôd najpočetnejšiu skupinu predstavovali odrody s génom krátkosteblovosti *Rht-D1b* s alelickými variantmi 174 bp (11 odrôd) a 165 bp (6 odrôd) na lokuse WMS 261 (tab. 1). Podľa očakávania v maďarskej odrode Mv Suba boli detekované gény krátkosteblovosti *Rht-B1b* a *Rht 8* (alela 192 bp), nakoľko je známy prenos génu *Rht 8* z talianskych pšeníc do pšeníc južnej a strednej Európy (WORLAND et al., 2001).

Nakoľko v jednotlivých skupinách členených podľa prítomnosti *Rht* génov krátkosteblovosti bol rôzny počet odrôd (od 1 do 11) vzájomné porovnanie skupín odrôd v úrodovotných znakoch a v kvalite zrna predstavuje určité tendencie, nie však absolútne diferencie.

Najvyšší porast mali odrody Haldor, Manhattan a Altos s divou *rht* alelou (tab. 2, 1). Dlhšia vegetačná doba odrôd bola spojená s vyššou úrodou zrna, pričom z úrodovotných znakov nadpriemernou bola

hmotnosť zrna v klase a pri odrode Altos aj počet zŕn v klase (priemerné hodnoty odrôd neuvádzame). Odrody Haldor a Manhattan mali v priemere najnižší zberový index.

Najnižšiu výšku porastu mala odroda Catalan (69,2 cm), ktorú determinuje *Rht-D1b* gén krátkosteblovosti a alelický variant 165 bp na lokuse WMS 261. Odrody s *Rht-D1b* v porovnaní s odrodami s *Rht-B1b*, a to bez ohľadu na alelický variant na lokuse WMS 261, mali v priemere nižšiu výšku porastu (77,5 cm oproti 82,9 cm). Najnižšiu priemernú výšku porastu (74 cm) mali odrody s *Rht-D1b* s alelickým variantom 165 bp na lokuse WMS 261. Aj odroda Chequer s alelickým variantom 174 bp na lokuse WMS 261 mala výšku 74 cm. Odroda Mv Suba, pri ktorej ako jedinej z hodnoteného súboru odrôd výšku rastlín determinujú 2 gény krátkosteblovosti *Rht-B1b* a *Rht 8* (192 bp) mala vyššiu výšku porastu (87,5 cm), najskôr klasila, mala najvyššiu hmotnosť 1000 zŕn a nadpriemerný zberový index. Vysoká úroda zrna bola pri tejto odrode kombinovaná tiež s nadpriemernou kvalitou hodnotenou obsahom bielkovín a mokrého lepku.

Najneskôr klasili (45 a viac dní od 1.5.) odrody Grisby, Chequer a Smuggler, všetky s génom *Rht-D1b*, 174 bp na lokuse WMS 261 a tiež odroda Hermann s génom *Rht-B1b*, 174 bp na lokuse WMS 261.

Známy kladný vzťah výšky a úrody zrna sa potvrdil aj v tomto súbore odrôd. Avšak v každej skupine odrôd, bez ohľadu na determináciu výšky rastlín *Rht génmi*, bola odroda s najvyššou úrodou zrna (viac ako 1000 g.m⁻²) – Manhattan, Altos, Levis, Hermann. Najvyššia variabilita v úrode zrna bola medzi odrodami s génom *Rht-B1b* a 174 bp na lokuse WMS 261, ktorú podmienila odroda Shaan M 8121 s najnižšou úrodou zrna (486 g.m⁻²).

Hmotnosť zrna na klas vyššiu ako 2 g mali odrody Grisby a Levis s génom *Rht-D1b* a s 174 bp na WMS 261. Táto skupina odrôd mala aj najvyššiu priemernú hodnotu znaku v porovnaní s odrodami s divou *rht* alelou. Podobné porovnanie môžeme uviesť aj pre počet zŕn v klase. Najvyšší priemerný počet zŕn mala odroda Grisby (50,85). V súlade s LI et al. (2007) môžeme konštatovať, že gény krátkosteblovosti *Rht-B1b* a *Rht-D1b* mali negatívny vplyv na hmotnosť 1000 zŕn, s výnimkou odrôd Mv Suba a Levis (47,3 g). Pri zberovom indexe pri odrodách s major génmi *Rht 1* a *Rht 2* bola zrejma tendencia nárastu jeho hodnôt v porovnaní s odrodami s divou *rht* alelou a s 174 bp na WMS 261. Odroda Altos so zriedkavou alelou 198 bp na WMS 261 bola porovnateľná v zberovom indexe s odrodami s *Rht* génmi.

V kvalitatívnych ukazovateľoch, v obsahu bielkovín a v mokrom lepku nebola jednoznačná tendencia nárastu alebo poklesu ich hodnôt v dôsledku rôznej determinácie *Rht* génmi krátkosteblovosti.

Záver

Analýza vybraných úrodotvorných znakov odrôd pšenice letnej f. ozimnej vo vzťahu k detekovaným génom krátkosteblovosti naznačila pozitívne efekty génu *Rht-D1b* na agronomické znaky. Výsledky však podmieňuje zloženie súboru odrôd a ich genetické pozadie.

Literatúra

1. BOGNÁR, Z. – LANG, L. – BEDO, Z.: Effect of environment on the plant height of wheat germplasm. Cer. Res. Com., 35, 2007, 2, 281 – 284.
2. CHRPOVÁ, J. - ŠKORPÍK, M. - PRÁŠILOVÁ, P. - ŠÍP, V.: Detection of Norin 10 dwarfing genes in winter wheat varieties registered in the Czech Republic. Czech J. Genet. Plant Breed., 39, 2003 (3): 89-92
3. DALRYMPLE, D. G.: Development and spread of high yielding wheat varieties in developing countries. Bureau for Science and Technology, Washington, 1986, 99 pages
4. 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
5. KORZUN, V. - RODER, M. - GANAL, M. - WORLAND, A.J.: 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, 1998, 1104-1109
6. LI, X. P. – LAN, S. Q. – LIU, Y. P. – GALE, M. D. – WORLAND, T. J.: Effects of different *Rht-B1b*, *Rht-D1b* a *Rht-B1c* dwarfing genes on agronomic characteristics in wheat. Cer. Res. Com., 34, 2006, 2-3, 919 – 924.
7. McINTOSH, R. A. – HART, G. E. – GALE, M. D.: Catalogue of gene symbols for wheat. In: Z. S. Li & Z. Y. Xin (Eds.), Proceedings of eighth international wheat genet. Symposium, Sciencetech Press, Beijing, 1995, p. 1333-1500.
8. WORLAND, A. J. – SAYERS, E. J. – KORZUN, V.: Allelic variation at dwarfing gene *Rht 8* locus and its significance in international breeding programmes. Euphytica, 119, 2001, 155-159
9. ŽOFAJOVÁ, A. – MIHÁLIK, D. – ŠAJGALÍK, M. – UŽÍK, M.: Vplyv a využitie génov krátkosteblovosti v šľachtení pšenice na Slovensku v rokoch 1960 až 2005 - In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : Zborník z 13. vedeckej konferencie 14. - 15. novembra 2006 / Ed. M. Užík. Piešťany : VÚRV, 2006. - S. 24 - 26.
10. 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: Zoznam hodnotených odrôd pšenice letnej f. ozimnej a ich rozdelenie podľa Rht génov krátkosteblovosti

Rht gény	WMS 261 alely (bp)	Počet odrôd	Odrody a ich pôvod
<i>rht</i>	174	2	Haldor (DEU), Manhattan (DEU)
	198	1	Altos (DEU)
<i>Rht – B1b</i>	174	2	Hermann (DEU), Shaan M 8121 (CHN)
	192	1	Mv Suba (HUN)
	198	1	Occitan (FRA)
<i>Rht – D1b</i>	165	6	Andalou (FRA), Aubusson (FRA), Bastide (FRA), Caphorn (GBR), Catalan (FRA), Verdon (FRA)
	174	11	Baltimor (FRA), Barroko (GBR), Forban (FRA), Grisby (FRA), Hamac (FRA), Chequer (GBR), Korund (DEU), Levis (CHE), Smuggler (GBR), Vercors (FRA), Vergain (FRA)

Tabuľka 2: Priemerné hodnoty znakov odrôd pšenice letnej f. ozimnej

Rht gény	WMS 261 alely (bp)	Výška porastu (cm)	Klasenie (dni od 1.5.)	Úroda zrna (g.m ⁻²)	Počet klasov (ks.m ⁻²)	Hmotnosť 1000 zrn (g)	Hmotnosť zrna na klas (g)
<i>rht</i>	174	94,6 ± 6,5	42,5 ± 0,7	963,5 ± 82,7	531,5 ± 10,6	46,1 ± 3,0	1,815 ± 0,113
	198	95,7	43	1008	469	45,9	2,155
<i>Rht – B1b</i>	174	81,8 ± 7,6	39,5 ± 7,7	798,8 ± 442,3	470,3 ± 210,4	41,6 ± 2,1	1,657 ± 0,201
	192	87,5	31	956	569	49,7	1,680
	198	79,5	35	635	579	32,1	1,100
<i>Rht – D1b</i>	165	74,3 ± 5,2	36 ± 3,2	658 ± 130,5	412,6 ± 76,9	38,7 ± 2,9	1,608 ± 0,273
	174	80,6 ± 6,7	41,1 ± 3,6	793,5 ± 145,8	463,6 ± 80,7	40,8 ± 3,7	1,721 ± 0,201

Rht gény	WMS 261 alely (bp)	Počet zrn v klase (ks)	Dĺžka klasu (cm)	Počet kláskov v klase (ks)	Zberový index	Obsah bielkovín (NIRS)	Mokrý lepok (NIRS)
<i>rht</i>	174	39,4 ± 0,07	9,7 ± 1,31	19,4 ± 1,06	0,431 ± 0,032	13,74 ± 0,51	28,20 ± 0,52
	198	46,9	9,0	18,0	0,461	13,90	25,00
<i>Rht – B1b</i>	174	39,8 ± 2,82	9,0 ± 0,12	17,9 ± 0,56	0,449 ± 0,015	13,11 ± 0,87	24,55 ± 4,16
	192	33,8	8,1	17,6	0,478	14,81	32,53
	198	34,2	9,7	18,5	0,433	13,40	22,55
<i>Rht – D1b</i>	165	41,4 ± 4,43	8,8 ± 0,58	17,8 ± 1,82	0,472 ± 0,027	13,52 ± 0,59	26,25 ± 4,06
	174	42,3 ± 4,66	9,4 ± 0,88	19,9 ± 1,33	0,451 ± 0,023	13,41 ± 0,59	25,92 ± 4,41

Výskum bol finančne podporený projektom MP SR „Parametrizovanie a využitie genetických zdrojov v tvorbe genotypov adaptovaných na zmenu klímy“.

Adresa autorov:

Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., Mgr. Daniel Mihálik, Ing. Martin Užík, DrSc. SCPV Nitra, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 01 Piešťany, zofajova@vurv.sk, RNDr. Darina Muchová, Ing. Mária Lichvárová, RNDr. František Ondrejčák, SCPV Nitra, VŠS Malý Šariš, 080 01 Prešov

TESTOVANIE CITLIVOSTI KLÍČENCOV KUKURICE (*ZEAMAYS* L.) NA IÓNY KADMIA POLYMORFIZMOM VYBRANÝCH ENZÝMOV

TESTING OF MAIZE (*ZEAMAYS* L.) SEEDLINGS SENSITIVITY ON THE IONS OF CADMIUM BY ENZYME POLYMORPHISM OF CHOSEN ENZYMES

Pavol MÚDRY – Marián DRAGÚŇ

*During 2005-2006 we have devoted attention to influence of different concentrations of cadmium ions (0, 15, 60, 240 and 960 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ in full Hoagland solutions) on enzyme polymorphism of seven enzymes – acid phosphatase (ACP), alcohol dehydrogenase (ADH), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD), phosphoglucoisomerase (PGI) and phosphoglucomutase (PGM) – in coleoptiles (5 days cultivation), in leaf blades of developed leaves and in the central parts of primary root systems of seedlings (14 days of cultivation) of two self-pollinated maize (*Zea mays* L.) lines and their single-cross. From analyses and their genetical interpretation resulted: a) the biological material was homogeneous on the basis of enzyme polymorphism, self-pollinated lines had homozygous constitution in each analysed locus and hybrid had three loci (Acp1: 2/4, Idh2: 4/6 and Pgd1: 2/3.8) with heterozygous constitution, b) ions of cadmium negatively influenced seedling growth and development, concentration of 960 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Cd was toxic and stopped further growth and development of maize seedlings after five days cultivation, c) the coincidence of constitutions in all analysed loci responsible for enzyme polymorphism expression supported their genotypic, organ and ontogenetic stability at high doses of cadmium ions (Table 1 and 2).*

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

Úvod

K významným exogénnym faktorom ovplyvňujúcim rast a vývin poľnohospodárskych plodín, a teda aj ich produkčných schopností, patria xenobiotiká (cudzorodé látky) ku ktorým patria aj ťažké kovy (hlavne Cd, Pb, Hg, Ni, Zn, Cu). Symptómy toxicity pozorované na rastlinách spôsobené vysokými koncentraciami toxických kovov možno spájať s množstvom interakcií na bunkovej úrovni. Toxicita môže byť spôsobená väzbou kovov na sulfanylové skupiny v proteínoch (vrátane enzýmov), čo sa prejaví inhibíciou aktivity enzýmov alebo porušením ich štruktúry (VAN ASSCHE, CLIJSTERS, 1990). Enzýmy sú jednými z hlavných terčov toxických kovových iónov. Inhibícia enzýmov toxickými kovmi môže byť spôsobená maskovaním katalyticky aktívnych skupín alebo denaturáciou bielkovín. Okrem toho nadbytok toxických kovov môže stimulovať formovanie radikálov a reaktívnych kyslíkových skupín (DIETZ et al., 1999; GALLEGO et al., 1996).

Kukurica siata (*Zea mays* L.) patrí k našim kľúčovým poľnohospodárskym plodínám a je po pšenici a ryži treťou najvýznamnejšou plodinou z celosvetového hľadiska. Je preto pochopiteľné, že je často študovaná v interakcii s iónmi ťažkých kovov. Kadmium je neesenciálnym prvkom pre rastliny (VERKLEIJ, SCHAT, 1990) a jedným potenciálne z najrizikovejších kovových polutantov, pretože je extrémne toxický pre rastliny, živočíchov a ľudí (CIESLINSKI et al., 1996). Kukurica reaguje na vyššie koncentrácie iónov kadmia, ako je ich prirodzená koncentrácia. Zmeny aktivity enzýmov v skorých etapách rastu a vývinu kukurice vyvolané vyššími koncentraciami kadmia sú rozsiahlo študované a publikované. Na druhej strane však je potrebné poznamenať, že sa venuje málo pozornosti biochemickej a ekofyziologickej úlohe a významu multiplicity enzýmov vo vzťahu k vyšším koncentraciám kadmia (napr. vo vzťahu k rezistencii kultivarov).

Hlavným cieľom našej experimentálnej práce bolo: a) uskutočniť analýzu a genetickú interpretáciu polymorfizmu vybraných druhov enzýmov kukurice, b) overiť vhodnosť použitia štandardizovanej metódy aj na orgánoch kukurice iných, ako je koleoptila, c) vyhodnotiť vplyv kadmia v kultivačnom médiu vo vzťahu ku genotypom a analyzovaným rastlinným orgánom v sledovanom úseku ontogenézy, d) vyhodnotiť bioindikačný význam polymorfizmu vybraných enzýmov vo vzťahu k pôsobeniu iónov kadmia.

Materiál a metódy

V rokoch 2005-2006 sme uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov dvoch rodičovských samoopelivých línií Lč. 3098 (♀) a Lč. 3150 (♂) a ich dvojlíniového hybridu Sc 3098 x 3150 kukurice siatej (*Zea mays* L.), ktorých biologickú identitu garantovala a pre experimentálnu prácu poskytla slovenská firma Sempol Holding a. s., Trnava (Ing. Miloslav Masnica, PhD.). Analýzu a genetickú interpretáciu polymorfizmu enzýmov sme uskutočnili štandardizovanou metódou horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle (STUBER a kol., 1988). Klíčenie zrn trvalo päť dní a následná kultivácia klíčencov štrnásť dní v termostate na filtračnom papieri v Petriho miskách za tmy a pri teplote 25 °C. Experimentálne varianty reprezentovali klíčence kultivované v 12,5 ml plného Hoaglandovho roztoku bez a s prídavkom kadmia vo forme $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a to v koncentráciách: 0, 15, 60, 240 a 960 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Po piatich dňoch kultivácie analyzované vzorky tvorili koleoptily (11 mm dlhé segmenty), po štrnástich dňoch časti listových čepeľí primárnych listov (150 mg) a stredné úseky primárnych koreňových systémov (250 mg).

Analýzy polymorfizmu kyslej fosfatázy (ACP, E.C. 3.1.3.2) a malátdehydrogenázy (MDH, E.C. 1.1.1.37) sme uskutočnili v systéme tlmivého roztoku B (L-histidín a kyselina citrónová, pH=5,7), alkoholdehydrogenázy (ADH, E.C. 1.1.1.1) v systéme C (kyselina boritá a hydroxid lítny, pH=8,3),

izocitrátdehydrogenázy (IDH, E.C. 1.1.1.42), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD, E.C. 1.1.1.44), fosfoglukoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1) v systéme D (L-histidín a kyselina citrónová, pH=6,5).

Výsledky a diskusia

Z vizuálneho hodnotenia experimentálneho biologického líniového a hybridného materiálu vyplynulo, že prítomnosť iónov kadmia v živnom médiu negatívne ovplyvnila klíčenie, rast a vývin klíčencov kukurice, pričom vplyv bol evidentnejší po 14-dňovej kultivácii a menej citlivé boli varianty hybridu. Na vyvíjajúcich sa orgánoch boli evidentné nekrotické zmeny pri koncentráciách 240 a 960 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Cd. Koncentrácia 960 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Cd bola extrémne toxickou na rast a vývin koreňovej sústavy i klíčka klíčiach rastlín a zablokovala ďalší rast a vývin orgánov, preto ich po štrnástich dňoch nebolo možné použiť na analýzu (klíčok mal iba 6 cm, neboli vyvinuté listy a dostatočne vyvinutá koreňová sústava). V našich experimentálnych podmienkach kultivácia klíčencov po piatich dňoch pri koncentrácii 960 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Cd bola neperspektívna. Po štrnástich dňoch kultivácie varianty s koncentraciou 0, 15, 60 a 240 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Cd majú vyvinuté korene i listy, ale orgány klíčencov variantu s koncentraciou 240 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Cd boli približne o polovicu kratšie.

Významná časť vedeckých prác rieši vzťah rastlinného organizmu k toxickým iónom ťažkých kovov na úrovni zmeny aktivity, resp. koncentrácie kľúčových enzýmov látkového a energetického metabolizmu. Stratégia rastlinných druhov v reakcii na prítomnosť iónov ťažkých kovov v prostredí (príjem, transport, detoxikácia, bioakumulácia, remediácia) vo vzťahu k enzýmom nie je jednotná, ba často protichodná. V tomto smere existujú medzidruhové, vnútrodruhové a interorgánové rozdiely, na ktoré sme poukázali v práci MÚDRY et al. (2007). Z hľadiska aplikačného chýbajú vedecké práce, ktoré by riešili zmeny kvalitatívneho zastúpenia enzýmov a zmeny aktivít izoforiem týchto enzýmov vo vzťahu k pôsobiacim iónom toxických kovov a ich dopad na produkčné schopnosti poľnohospodárskych plodín.

Výsledky analýz a ich genetickej interpretácie sú uvedené v Tab. 1 a 2. Z nich vyplýva, že vzorky rodičovských líniových materiálov a ich dvojlíniového hybridu sú homogénne a identické na základe porovnania fingerprintov z predošlých analýz. Samoopelivé línie vo všetkých analyzovaných lokusoch majú homozygotnú konštitúciu, kým ich dvojlíniový hybrid má tri lokusy s heterozygotnou konštitúciou Acpl: 2/4, Idh2: 4/6 a Pgd1: 2/3.8. Tým spĺňajú kritériá línií a hybridov aj z hľadiska biochemickej diverzity. Ostatné analyzované lokusy (Adh1, Mdh1, 2, 3, 4, 5, Mmm, Idh1, Pgd2, Pgi1, Pgm1 a 2) sú vo všetkých vzorkách monomorfné. Nedochádza ku kvalitatívnym zmenám v zastúpení izoenzýmov v analyzovaných lokusoch a nezaznamenali sme ani expresiu iných lokusov analyzovaných druhov enzýmov, napriek použitým extrémnym dávkam Cd v živnom médiu. To však nevylučuje zmeny na úrovni koncentrácií, resp. aktivít detekovaných izoforiem. Na interorgánovej úrovni sme tiež nezaznamenali žiadne zmeny. Zhodnosť konštitúcie analyzovaných lokusov zodpovedných za expresiu polymorfizmu enzýmov potvrdzuje ich genotypovú, orgánovú a ontogenetickú stabilitu aj za pôsobenia vysokých dávok iónov kadmia.

Záver

Práca prináša a hodnotí výsledky vplyvu rôznych dávok kadmia v Hoaglandovom živnom roztoku na polymorfizmus siedmich druhov enzýmov. Z nich vyplýva, že zvolený štandardizovaný metodologický postup analýzy polymorfizmu enzýmov možno úspešne použiť aj v neskorších fázach ontogenézy rastlín kukurice. Výsledky potvrdili negatívny vplyv iónov kadmia v živnom médiu na rast a vývin klíčencov kukurice, ktorý nie je spôsobený zmenou kvalitatívneho zastúpenia izoforiem. Z toho vyplýva, že polymorfizmus enzýmov študovaných lokusov kukurice nie je bioindikátorom toxického pôsobenia iónov kadmia.

Pod'akovanie: Výskum bol podporený Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a Slovenskou akadémiou vied (VEGA projekt č. 1/3489/06).

Literatúra

1. CIESLINSKI, G. - VAN REES, K.C.J. - HUANG, P.M. - KOZAK, L.M. - ROSTAD, H.P.W. - KNOTT, D.R.: Cadmiu uptake and bioaccumulation in selected cultivars of durum wheat and flax as affected by soil type. *Plant Physiol.*, 182, 115–124.
2. DAS, P. - SAMANTARAY, S. - ROUT, G.R.: Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollut.*, 98, 1997, 29-36.
3. DIETZ, K.J. - BAIER, M. - KRAMER, U.: Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (eds.), *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*, Springer Verlag Berlin, 1999, 73-97.
4. GALLEGO, S.M. - BENAVIDES, M.P. - TOMARO, M.L.: Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121, 1996, 151-159

- MÚDRY, P. - DRAGŮŇ, M. - KRÁLOVÁ, K. - MASAROVICHOVÁ, E.: Effect of cadmium on the activity of some enzymes in vascular plants. Proceedings, 27th International Symposium Industrial Toxicology 2007, Bratislava 30. May – 1. June 2007, ISBN 978-80- 227-2654-2, 342-347.
- 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.
- VAN ASSCHE, F. - CLIJSTERS, H.: Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ., 13, 1990, 195-200.
- VERKLEIJ, J.A.C. - SCHAT, H.: Mechanisms of metal tolerance in higher plants, 1990, 179–194 In: SHAW, A.J. (Ed.) Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. Boca Raton, CRC Press.

Tabuľka 1: Polymorfizmus enzýmov (ACP, ADH a MDH) orgánov klíčencov troch genotypov kukurice siatej (*Zea mays* L.) kultivovaných pri rôznych koncentráciách kadmia

Genotyp Orgán (2)	Koncentrácia Cd ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) (3) Doba klíčenia (4)	Počet analyz. vzoriek (5)	Enzýmy		Enzýmy, lokusy a alely (6)						
			ACP Acp1	ADH Adh1	MDH Mdh1	2	3	4	5	Mmm	
Lč. 3098 (♀)	5 dní klíčenia (10)										
koleoptila (7)	0	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	15	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	60	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	240	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	960	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
Lč. 3150 (♂)	5 dní klíčenia										
koleoptila	0	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	15	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	60	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	240	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	960	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
Sc Lč. 3098 x Lč. 3150	5 dní klíčenia										
koleoptila	0	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	15	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	60	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	240	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koleoptila	960	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
Lč. 3098 (♀)	14 dní klíčenia (11)										
vyvinutý list (8)	0	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	15	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	60	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	240	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
Lč. 3150 (♂)	14 dní klíčenia										
vyvinutý list	0	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	15	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	60	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	240	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
Sc Lč. 3098 x Lč. 3150	14 dní klíčenia										
vyvinutý list	0	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	15	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	60	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
vyvinutý list	240	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
Lč. 3098 (♀)	14 dní klíčenia										
koreňový systém (9)	0	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	15	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	60	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	240	1	2	4	6	3	16	12	12	M	
Lč. 3150 (♂)	14 dní klíčenia										
koreňový systém	0	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	15	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	60	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	240	1	4	4	6	3	16	12	12	M	
Sc Lč. 3098 x Lč. 3150	14 dní klíčenia										
koreňový systém	0	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	15	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	60	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	
koreňový systém	240	1	2/4	4	6	3	16	12	12	M	

Tabuľka 2: Polymorfizmus enzýmov orgánov klíčencov troch genotypov kukurice siatej (*Zea mays* L.) kultivovaných pri rôznych koncentráciách kadmia

Genotyp (1) Orgán (2)	Koncentrácia Cd ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) (3) Doba klíčenia (4) (5)	Počet analyz. vzoriek	Enzýmy, lokusy a alely (6)						
			IDH ldh1	2	PGD Pgd1	2	PGI Pgi1	PGM Pgm1	2
Lč. 3098 (♀)	5 dní klíčenia (10)								
koleoptila (7)	0	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koleoptila	15	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koleoptila	60	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koleoptila	240	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koleoptila	960	1	4	6	3.8	5	4	9	4
Lč. 3150 (♂)	5 dní klíčenia								
koleoptila	0	1	4	4	2	5	4	9	4
koleoptila	15	1	4	4	2	5	4	9	4
koleoptila	60	1	4	4	2	5	4	9	4
koleoptila	240	1	4	4	2	5	4	9	4
koleoptila	960	1	4	4	2	5	4	9	4
Sc Lč. 3098 x Lč. 3150	5 dní klíčenia								
koleoptila	0	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koleoptila	15	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koleoptila	60	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koleoptila	240	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koleoptila	960	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
Lč. 3098 (♀)	14 dní klíčenia (11)								
vyvinutý list (8)	0	1	4	6	3.8	5	4	9	4
vyvinutý list	15	1	4	6	3.8	5	4	9	4
vyvinutý list	60	1	4	6	3.8	5	4	9	4
vyvinutý list	240	1	4	6	3.8	5	4	9	4
Lč. 3150 (♂)	14 dní klíčenia								
vyvinutý list	0	1	4	4	2	5	4	9	4
vyvinutý list	15	1	4	4	2	5	4	9	4
vyvinutý list	60	1	4	4	2	5	4	9	4
vyvinutý list	240	1	4	4	2	5	4	9	4
Sc Lč. 3098 x Lč. 3150	14 dní klíčenia								
vyvinutý list	0	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
vyvinutý list	15	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
vyvinutý list	60	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
vyvinutý list	240	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
Lč. 3098 (♀)	14 dní klíčenia								
koreňový systém (9)	0	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koreňový systém	15	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koreňový systém	60	1	4	6	3.8	5	4	9	4
koreňový systém	240	1	4	6	3.8	5	4	9	4
Lč. 3150 (♂)	14 dní klíčenia								
koreňový systém	0	1	4	4	2	5	4	9	4
koreňový systém	15	1	4	4	2	5	4	9	4
koreňový systém	60	1	4	4	2	5	4	9	4
koreňový systém	240	1	4	4	2	5	4	9	4
Sc Lč. 3098 x Lč. 3150	14 dní klíčenia								
koreňový systém	0	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koreňový systém	15	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koreňový systém	60	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4
koreňový systém	240	1	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4

Adresa autorov:

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

RETROTRANSPOZÓNOVÉ MARKÉRY V ANALÝZE POPULÁCIÍ JAČMEŇA SIATEHO

RETROTRANSPOSONS MARKERS IN BARLEY POPULATION ANALYSIS

Katarína HRUBÍKOVÁ – Agáta CANDRÁKOVÁ – Milan BEŽO – Jana ŽIAROVSKÁ

*The barley genome is comprised by many representatives of transposons classes in its intergene regions what facilitates the effective genome analyses by transposon-based markers. The aim of the study was to design an effective marker system for the analyses of 26 barley (*Hordeum vulgare*, L.) populations. Designing the primer was based on the sequence of LTR region of the BARE-1 retroransposon and the primer 5'-ATTGCCTCTAGGGCATAATCCAACAGTTC-3' was used for PCR-IRAP. Regarding the genetic base of resistance to *Blumeria graminis* f. *hordei*, two main clusters were performed in dendrogram. The first contain genotypes with the resistance gene *mlo 11* (nine genotypes) and the second contain genotypes with different resistance genes (*mlo 6*, *mlo 7*, *mlo 9* and *mlo 11*).*

Key words: retrotransposons, BARE-1, PCR-IRAP

Úvod

Transponovateľné prvky sú jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich štruktúru genómov organizmov. Predstavujú rozptýlené poradia nukleotidov v genóme, ktoré sa prednostne začleňujú do geneticky aktívnych oblastí chromozómov. Ich začlenením priamo do génov alebo do ich okolitých sekvencií môžu ovplyvniť expresiu génov alebo ich úplne inaktivovať. Podieľajú sa na somatickej nestabilite, sterilitě, poruchách klíčenia a dedičných ochoreniach (BENETZEN, 2000).

Transponovateľné prvky sú definované podľa mechanizmu, akým sa množia v genómoch organizmov. Mechanizmus množenia zahrňujúci tvorbu mRNA a následne cDNA pomocou reverznej transkriptázy je charakteristický pre I. triedu transponovateľných prvkov, retrotranspozónov. Druhá trieda transponovateľných prvkov, transpozóny vyžíva mechanizmus „vystrihnutia-a-vloženia“ na úrovni DNA. Do tejto triedy patria napríklad *Ac* prvky rozšírené najmä v ľudskom genóme.

Retrotranspozóny sa na základe ich štruktúry a cyklu transpozície delia na dve podtriedy, LTR retrotranspozóny a retrotranspozóny bez LTR oblastí. LTR retrotranspozóny sú tvorené dlhými koncovými opakovaniami nukleotidov (Long Terminal Repeats, LTR), ktoré sa nachádzajú na 5' a 3' konci (SCHULMAN, KALENDAR, 2005). LTR retrotranspozóny sa ďalej delia do dvoch kategórií podľa podobnosti poradí nukleotidov a organizácie, a to *Ty1-copia* (drozofyla typ alebo *Pseudoviridae*) a *gypsy* kategóriu (*Metaviridae*).

Copia-podobné retrotranspozóny majú vnútornú doménu (časť medzi 5'LTR a 3'LTR) tvorenú génmi pre obalovú bielkovinu (GAG), aspartickú proteinázu (AP), integrázu (IN), reverznú transkriptázu (RT) a RNázu H (RH). Obalová bielkovina retrotranspozónov je jednou zo spoločných čít, ktoré majú retrotranspozóny a retrovírusy. Aspartická proteáza štiepi aktívny polyproteín na funkčné zložky, integráza sprostredkováva začlenenie cDNA na nové miesto v genóme, reverzná transkriptáza (enzým spätného prepisu) je zodpovedný za tvorbu kópií cDNA a RNáza H je dôležitá pre replikáciu retrotranspozónu (TODOROVSKA, 2007). *Gypsy*-podobné retrotranspozóny majú integrázu na konci otvoreného rámca čítacieho (ORF, Open Reading Frame). 5'LTR obsahuje poradie nukleotidov promotora, zatiaľ čo 3'LTR terminátora a polydenylačného konca. Súčasťou 5'LTR sú regulačné tandemové poradie nukleotidov, *cis*, ktoré sú umiestnené v protismere miesta začiatku transkripcie (U3 oblasť) alebo v smere výskytu UTR (Untranslated Region, oblasti, kde nedochádza k prepisu genetickej informácie).

Podtrieda retrotranspozóny bez LTR oblastí je reprezentovaná LINE (Long Interspersed Elements, dlhé rozptýlené prvky) a SINE prvkami (Short Interspersed Elements, krátke rozptýlené prvky). Vnútorná doména je podobná doméne LTR retrotranspozónov.

Retranspozičná aktivita väčšiny retrotranspozónov je vyvolaná stresom (HIROCHIKA, 1997; KALENDAR et al., 2000), či už abiotickým (klimatické podmienky, pletivové kultúry) alebo biotickými (patogénne činitele).

Pre svoju rozsiahle zastúpenie v genóme a polymorfizmus majú retrotranspozóny významné zastúpenie ako genetické markéry pre porovnávacie štúdie genómov, identifikáciu DNA odtlačkov, pozičnom mapovaní génov, analýze príbuznosti a genetickej biodiverzity (KUMAR, BENNETZEN, 1999).

Retrotranspozóny ako genetické markéry sú uplatniteľné aj vďaka nasledovným vlastnostiam, ktoré HIROCHIKA (1997) uvádza nasledovne: a) mutácie spôsobené včlenením retrotranspozónu sú stabilné, pre svoj mechanizmus replikácie, b) oblasť premiestnenia retroranspozónu je odlišná od miesta pôvodnej kópie, čo môže vyvolať vznik náhodných mutácií, c) jedným z mechanizmom transpozičnej aktivity je stres, d) majú schopnosť mutagenézy v dôsledku ich začleňovania do génov, e) nižší počet kópií uľahčuje identifikáciu včleňovania sa retrotranspozónov zodpovedných za špecifickú mutáciu a f) sú značne rozšírené takmer vo všetkých druhoch rastlín.

Medzi najrozšírenejšie retrotranspozóny v genóme jačmeňa siateho patrí *copia*-podobný *BARE-1* a *gypsy*-podobné *BAGY-1* a *BAGY-2*. V genóme pšenice je to retrotranspozón *Wis-2* a v genóme ryže *Tos* skupina

patriace do *copia*-podobných. Pri kukurici je to najmä retrotranspozón *Opie* (*copia*-podobný) a z *gypsy*-podobných retrotranspozónov, sú to najmä *Cinful*, *Grande* a *Huck* (TODOROVSKA, 2007).

Trávy obsahujú skupiny transkripčne, translačne a integračne aktívnych retrotranspozónov, ktoré umožňujú porovnávací a ucelený prístup pre porozumenie životného cyklu retrotranspozónov a ich vplyvu na genóm (VICIENT et al., 2001).

Základné metódy určovania LTR retrotranspozónov zahŕňajú:

1. Syntézu genómovej alebo cDNA retrotranspozónu pomocou PCR za použitia prajmerov komplementárnych k vysoko stabilným sekvenciám LTR alebo RT v rámci vnútornej domény.

2. Výsledné PCR produkty sú buď začlenené do klonovacích vektorov a následne sekvenované alebo sú sekvenované priamo.

3. Predpokladané poradie nukleotidov retrotranspozónov sú porovnávané metódami bioinformatiky so známymi sekvenciami retrotranspozónov.

K metódam analyzujúcim retrotranspozóny pomocou PCR, okrem iných patria IRAP (Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism, metóda polymorfizmu zmnožených úsekov medzi retrotranspozónmi) a REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified polymorphism, metóda polymorfizmu zmnožených úsekov medzi retrotranspozónmi a mikrosatelitmi) (KALENDAR et al., 1999).

Polymorfizmus sledovaný na základe retrotranspozónov je vytváraný práve jedinečným biologickým procesom syntézy RNA podľa predlohy DNA, spätného prepisu DNA podľa RNA a začlenenie DNA na nové pozície v genóme. Nové miesta včlenenia sa sú od seba vzdialené v rozpätí niekoľkých sto až niekoľkých tisíc nukleotidov a majú stabilnú pozíciu (BEŽO et al., 2005).

Tvorbe a využívaniu retrotranspozónových a mikrosatelitných markérov genómov rôznych druhov rastlín (ľan, jačmeň, ľuľok, kukurica, lipnica, láskavec a čučoriedka) pre fylogenetické štúdie, štúdie genetickej biodiverzity a identifikáciu DNA odlačkov genotypov sa venuje kolektív autorov v rámci riešenia projektov APVT, VEGA a GA_SPU.

V príspevku predstavujeme jednu z možností využitia DNA markérov na báze retrotranspozónov pre analýzu fylogenetických vzťahov populácií jačmeňa sateho vo vzťahu k odolnosti voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. *hordei*).

Materiál a metódy

Biologický materiál: V experimentoch sa používa 26 populácií jačmeňa sateho (*Hordeum vulgare*, L.) pochádzajúce zo šľachtiteľskej stanice Hordeum, s.r.o. Jedná sa o náchylné a odolné populácie voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), (odolnosť viazaná na *mlo* gén), registrované odrody a novošľachtence.

Izolácia DNA: Celková DNA bola izolovaná z čerstvých listov desaťdňových rastlín podľa Crowley et al. (2003, upravené). Kvalita a kvantita izolovanej DNA bola elektroforeticky porovnávaním analyzovaných vzoriek so vzorkami ľudskej genómovej DNA (Human Genomic DNA, Promega, 245 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) so známou koncentráciou.

Návrh prajmerov: Pri návrhu prajmerov sa vychádzalo zo známych poradí nukleotidov LTR oblastí retrotranspozónu *BARE-1* (prístupové číslo Z17327) Pre PCR-IRAP bol testovaný prajmer 5'-ATTGCCTCTAGGGCATAATTCCAACAGTTC-3' (BARE-P-01). Prajmer je komplementárny opačne orientovaný vychádzajúci z 5'LTR *BARE-1* retrotranspozónu jačmeňa a zachytáva bázy 305-334 v orientácii smerom von z retrotranspozónu.

Podmienky PCR-IRAP: PCR sa uskutočňovali v tlmivom roztoku zloženom z 20 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH 8,0) a 50 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl; 35 ng DNA; 5 $\text{pmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ prajmera; 1 U *Taq* polymerázy; 3 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl_2 a 0,3 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dNTPs. Celkový objem reakcie bol 15 μl . Časový a teplotný priebeh PCR-IRAP bol nasledovný, úvodná denaturácia DNA 2 minúty pri 94 °C, nasledovalo 35 cyklov s krokmi, 1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C. Záverečná polymerizácia 10 minút pri 72 °C.

Analýza PCR produktov a vyhodnocovanie dát: Produkty PCR boli rozdeľované na 2% agarózovom géle (Amresco 3:1, Invitrogen™). Elektroforeogramy boli spracované dokumentačným systémom Kodak EDAS-290 a vyhodnotené analytickým systémom obrazu Kodak 1D. Na základe získaných fragmentov DNA, elektroforézou rozdelených podľa veľkosti, bola zostavená matica prítomnosti a pozície DNA fragmentov. Z matice boli vypočítané indexy podobnosti (SI-Similarity Index) podľa autorov NEI a LI (1979). Vetvové členenia vzájomných závislostí boli zostrojené hierarchickou zhlukovou analýzou metódou UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) zoskupením zhlukov na základe priemerov euklidovskej vzdialenosti (PEVZ) pozície fragmentov DNA profilu PCR v štatistickom programe SYNTAX.

Výsledky a diskusia

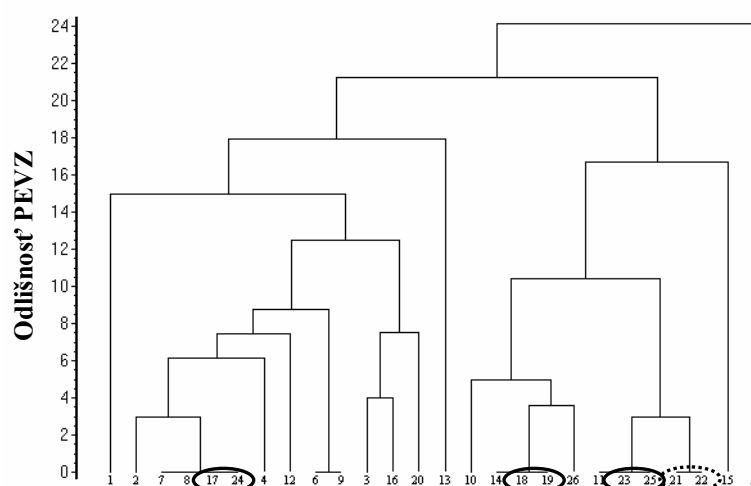
V rámci prebiehajúceho projektu boli experimentálne práce zamerané na analýzu polymorfizmu dsDNA rastlín jačmeňa sateho pomocou *BARE-1* retrotranspozónu a mikrosatelitov. V príspevku prezentujeme čiastkové výsledky aplikácie retrotranspozónov pri mapovaní genómu jačmeňa sateho. PCR-IRAP analýzou 26 populácií jačmeňa, bolo namnožených celkovo 169 DNA fragmentov rozdelených do 16 úrovní. Celkový polymorfizmus v súbore dosiahol 62 %. Priemerná hodnota indexu podobnosti SI_{NL} pre tieto populácie bola 0,814.

Zostrojením vetvového členenia UPGMA analýzou boli genotypy rozčlenené do dvoch hlavných zhlukov spájaných na úrovni 0,212 E + 02 PEVZ (obr. 1). Samostatne vyčlenenou odrodou je Dundy (kód 5), pochádzajúca z Veľkej Británie, nesúca gén odolnosti *mlo* 11.

Prvý zhluk je charakteristický prítomnosťou populácií dánskeho, anglických a holandského šľachtenia, zatiaľ čo v druhom zhluku majú prevahu populácie slovenského a českého pôvodu. Z hľadiska genetickej podmienenosti odolnosti voči múčnatke trávovej sa v jednom zhluku vyskytujú genotypy s génom odolnosti *mlo* 11 (deväť genotypov) a v druhom zhluku bolo zaznamenaná zastúpenie populácií s rôznymi génmi odolnosti (*mlo* 6, *mlo* 7, *mlo* 9 a *mlo* 11)

Na základe pozícií DNA fragmentov PCR–ISSR profilu boli zhlukovou analýzou zoskupené viaceré populácie na úrovni 0,000 E + 00 PEVZ, čiže ako populácie so zhodným PCR–IRAP profilom (obr. 1). Z hľadiska významu pre šľachtiteľský proces na Slovensku je pozoruhodné spojenie odolného novošľachtenca SK 5835-25-00 (kód 17) a náchylnej odrody Poprad (kód 24), spojenie dvoch slovenských novošľachtencov SK 4954-7-01 (kód 18) a SK 5840-34-01 (kód 19) a napokon odolná odroda Nadir (kód 23) s náchylným novošľachtencom SK 5374 (kód 25).

Retrotranpozónové markéry pomocou PCR–ISSR potvrdili prítomnosť jedného spoločného komponentu kríženia (odroda Kompakt) v prípade oboch novošľachtencov 5734-6-00 (kód 21) a SK 5398-10-98 (kód 22) (obr. 1, bodkovaná čiara).



Obrázok 1: Vetvové členenie (dendrogram) jačmeňa siateho hodnoteného prajmerom BARE-P-01 metódou PCR–IRAP podľa PEVZ (priemer euklidovských vzdialeností zhlukov). Plnou čiarou sú zvýraznené populácie slovenského pôvodu s rovnakým PCR–ISSR profilom a prerušovane, majúce spoločného komponenta kríženia

Záver

Retrotranspozóny sa javia byť vhodným základom pre tvorbu molekulových markérov, vďaka ich výraznému zastúpeniu v genóme rastlín a vysokej úrovni polymorfizmu. Umožňujú získať špecifické DNA odtlačky testovaných genotypov, sledovať fylogenetické vzťahy a napomáhať výberu vhodných genotypov pre ich ďalšie uplatnenie v šľachtiteľskom procese.

Riešenie projektu okrem uvedených analýz prispeje k získaniu poznatkov z oblasti rozšírenia retrotranspozónu *BARE-1* a mikrosatelitov v genóme odrôd jačmeňa siateho vo vzťahu genetickej podmienenosti odolnosti voči múčnatke trávovej. V rámci projektu sa ďalej realizuje analýza polymorfizmu medzigénovej DNA jedincov F1 generácie, ako aj štúdia rozmiestnenia *BARE-1* retrotranspozónu vzhľadom na rastovú fenofázu jačmeňa. Predpokladá sa vytvorenie databázy informácií o genetickej vzdialenosti alebo príbuznosti jednotlivých genotypov jačmeňa na základe DNA markérov v šľachtiteľskom programe.

Príspevok bol pripravený s podporou VEGA projektu 1/3452/06 „Vývoj retrotranspozónových a mikrosatelitných markérov identifikácie odrôd a F1 jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*, L.) vo vzťahu k odolnosti voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*).

Literatúra

1. BENNETZEN, J. L. 2000. Transposable element contributions to plant gene a genome evolution. Plant . In: Molecular Biology, vol., 42, 2000, p. 251-269.
2. BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. 2005. Retrotranspozóny v hodnotení genómu rastlín. In: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín BIOS'05.

- Zborník referátov z IX. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005, s. 7-13. ISBN 80-8069-587-3
3. HIROCHIKA, H. 1997. Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. In. *Plant Mol Biol.*, vol. 35, 1997, p. 231-240.
 4. KALENDAR, R. – GROB, T. – REGINA, M. – SUONIEMI, A. – SCHULMAN, A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. In. *Theor Appl Genet*, vol. 98, 1999, p. 704-711.
 5. KALENDAR, R. – TANSKANEN, J. – IMMONEN, S. – NEVO, E. – SCHULMAN, A. H. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. In. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, 2000, no. 12, p. 6603 – 6607.
 6. KUMAR, A. – BENNETZEN, J.L. 1999. Plant Retrotransposons. In. *Anu. Rev. Genet.*, vol. 33, 1999, p.479-532.
 7. MANNINEN, I. – SCHULMAN, A. H. 1993. *BARE-1*, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L). In. *Plant Molecular Biology*, vol. 22, 1993, no. 5, p. 829-846.
 8. TODOROVSKA, E. 2007. Retrotransposons and their role in plant – genome evolution. In: *BIOTECHNOL & BIOTECHNOL. EQ.*, vol. 21, 2007, no 3, p. 294–305.
 9. SCHULMAN, A. H. – KALENDAR, R. 2005. A movable feast: diverse retrotransposon and their contribution to barley genome dynamics. In: *Cytogenet Genome Res.*, vol. 110, 2005, p. 598–605.
 10. VICIENT, C. M. – JAASKELAINEN, M. J. – KALENDAR, R. – SCHULMAN, A. H. 2001. Active Retrotransposons Are a Common Feature of Grass Genomes. In. *Plant Physiology*, vol. 125, 2001, p. 1283-1292

Adresa autorov:

Ing. Katarína Hrubíková, PhD., Ing. Agáta Candráková, prof. RNDr. Milan Bežo, CSc., Ing. PaedDr. Jana Žiarovská. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín. Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra

PATOGENITA HRDZE PŠENICOVEJ PRI OPTIMÁLNEJ A ZVÝŠENEJ TEPLOTE WHEAT LEAF RUST PATHOGENICITY AT OPTIMAL AND INCREASED TEMPERATURE

Štefan MASÁR

Influence of temperature, isolate of wheat leaf rust and wheat leaf rust resistance gene on the number and size of wheat leaf rust uredinia was observed. The plants were grown at temperatures of 30/20 °C day/night and 25/15 °C day/night. Genotypes of bread wheat Audace, Batis, Corsaire, Folio, Charger, Regain, and were used. To infect the seedlings, isolates of Puccinia recondita f. sp. tritici 2132, 2142, 2163 and 2164 were used. The most advantageous gene combinations for the number of uredinia and the area of uredinia of Puccinia recondita f. sp. tritici were Lr13+Lr37, Lr13+LrH and partially also Lr10+Lr13 in the genotypes Folio, Charger and Regain.

Key words: Triticum aestivum - wheat - Puccinia recondita f. sp. tritici - wheat leaf rust - resistance - uredinia

Úvod

Klimatické zmeny majú závažné environmentálne a finančné dôsledky. V tejto súvislosti je potrebné monitorovanie ich priebehu nielen z hľadiska klimatológie, ale aj z hľadiska patogenity hospodársky dôležitých fytopatogénov. V mnohých vzťahoch hostiteľa a patogéna boli popísané hostiteľské gény rezistencie s citlivosťou na teplotu. Interakcia hostiteľ - patogén sa pri pšenici skúma v patosystéme *T. aestivum* – *P. recondita* (KOLMER, 1996). Využívanie rezistentných odrôd je najlepšou cestou k ochrane proti hrdzi pšenicovej. Rezistentné odrody obsahujú jeden a viac génov rezistencie. Doteraz je známych vyše 60 génov rezistencie. Väčšina z nich je účinná počas celého života rastliny, niektoré iba v štádiách dospelosti rastliny, čo je označované ako rezistencia dospelých rastlín - adult plant resistance – APR (WINZELER et al., 2000). Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv optimálnej a zvýšenej teploty na patogenitu frekventovaných izolátov *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* na genotypoch pšenice s rôznymi génmi rezistencie proti nej.

Materiál a metódy

V experimente boli použité genotypy *Triticum aestivum* L. (6x): Audace, Batis, Corsaire, Folio, Charger, Regain a Terza. Na infekciu semenáčov hrdzou pšenicovou sme použili izoláty *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*: 2132, 2142, 2163 a 2164, udržiavané v našej banke izolátov. Predstavujú v prírode často frekventované patotypy uvedeného patogéna. Infekcia bola robená nanášaním vodnej suspenzie obsahujúcej spóry *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* na prvý list mladých rastlín. Rastliny boli izolované igelitovou fóliou 48 hodín, čím sa dosiahla 100% relatívnej vlhkosť vzduchu. Rastliny boli pestované v záhradnom substráte pri 12 hodinovej fotoperióde, na osvetlenie sme použili 400 W výbojky Philips HPL-N, teplota farby 3900 K, teplá biela, čo zodpovedá priemeru slnečného dňa, pri dvoch teplotných režimoch: vyššia $\pm 30^{\circ}\text{C}/\pm 20^{\circ}\text{C}$ deň/noc (ďalej 25), nižšia $\pm 25^{\circ}\text{C}/\pm 15^{\circ}\text{C}$ deň/noc (ďalej 15). Uredinospóry klíčia v kontakte s vodou a prenikajú cez stomata (SAMBORSKI 1985). Podmienky pre vývoj patogéna boli upravené nad rámec optimálnej teploty potrebnej pre vývoj hrdze pšenicovej, ktorá sa po infekcii najlepšie vyvíja pri teplote 15-25°C (McINTOSH et al., 1995). Teplota bola regulovaná zariadením Carrier 407c s kontinuálnym núteným obehom chladeného vzduchu. Rastliny sme hodnotili 14 dní po infekcii. Na infikovaných listoch boli na určenej ploche listu spočítané urediniá (PU). Na vyhradenej ploche bola meraná dĺžka a šírka každého uredinia v pixeloch. Údaje sme získali z obrázkov skenovaním napadnutých listov skenerom HP scanjet 4370 pri 600 dpi vo formáte JPEG. Plocha uredinia sa vypočítala ako plocha kruhu alebo elipsy. Pri rozlíšení 1024x768 veľkosť pixelu predstavuje 0,38mm. Z týchto hodnôt sme vypočítali priemernú plochu jedného uredinia (PPU), celkovú plochu uredínií (PUC) a podiel plochy uredínií z určenej plochy listu (PUPL). Vplyv teploty, izolátu, druhu, genotypu a génu na počet a morfometrické charakteristiky uredínií *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* sme testovali v programe SPPS for Windows. Genotypy pšenice použité v experimente boli vybrané v rámci riešenia rezortnej úlohy VaV 2005 UO 27/050 02 06/050 02 06 - Parametrizovanie a využitie genetických zdrojov v tvorbe genotypov adaptovaných na zmenu klímy.

Výsledky a diskusia

Výber genotypov bol ovplyvnený predbežnými výsledkami ich rozdielnej rezistencie nielen proti *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, ale aj rezistenciou proti *Stagonospora nodorum*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* a *Fusarium culmorum* (MASÁR et al., 2006). Výsledky analýz vplyvu endogénnych a exogénnych faktorov na veľkosť a počet uredínií *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* sú v tabuľke 1. Na analýzu sme použili generálny lineárny model, ktorý umožňuje analýzu rozptylu. Na variabilitu znakov počet uredínií, priemerná plocha uredinia, celková plocha uredínií a podiel plochy uredínií z plochy listu vysoko významne vplývala teplota, izolát *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* a gény rezistencie proti hrdzi pšenicovej. Interakcie teplota x izolát boli vysoko významné v počte uredínií a v priemernej ploche uredinia. Interakcie teplota x gén rezistencie boli významné v znakových priemerná plocha uredinia a plocha uredínií celkom. Interakcie izolát x gén rezistencie a teplota x izolát x gén rezistencie boli tak isto vysoko významné vo všetkých znakovoch.

Počet a plocha uredínií bola ovplyvnená teplotou. Počet uredínií, celková plocha uredínií a podiel plochy uredínií z plochy listu bol pri vyššej teplote nižší. Priemerná plocha uredínií bola pri vyššej teplote väčšia. Poukazuje to na obranný mechanizmus rastliny, ktorá reaguje na vyššiu teplotu uzatváraním prieduchov, ktoré sú vstupnou bránou infekcie (SAMBORSKI, 1985).

Tabuľka 1: Priemerné štvorce vplyvu teploty, izolátu a génu rezistencie proti hrdzi pšenicovej na počet a plochu uredínií *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*

Zdroj premenlivosti	Znak	df	Priemerné štvorce
Model	PU	48	116,875**
	PPU	48	5338,391**
	PUC	48	187040,597**
	PUPL	48	134,945**
Teplota	PU	1	158,227**
	PPU	1	2637,071**
	PUC	1	122797,931**
	PUPL	1	125,982**
Izolát	PU	3	30,780**
	PPU	3	1374,150**
	PUC	3	32126,052**
	PUPL	3	18,588**
Gén	PU	5	31,146**
	PPU	5	1008,687**
	PUC	5	81453,618**
	PUPL	5	66,681**
Teplota x Izolát	PU	3	49,886**
	PPU	3	1996,686**
	PUC	3	5911,838
	PUPL	3	2,816
Teplota x Gén	PU	5	5,346
	PPU	5	358,505*
	PUC	5	10073,182*
	PUPL	5	4,572
Izolát x Gén	PU	15	19,701**
	PPU	15	471,426**
	PUC	15	33157,118**
	PUPL	15	23,901**
Teplota x Izolát x Gén	PU	15	13,096**
	PPU	15	278,891*
	PUC	15	16245,673**
	PUPL	15	10,633**
Error	PU	64	2,875
	PPU	64	146,894
	PUC	64	3583,395
	PUPL	64	2,400
Total	PU	112	
	PPU	112	
	PUC	112	
	PUPL	112	

** P<0,01, * P<0,05

Najnižší počet a plochu uredínií vyjadrené v znakoch PU, PPU, PPC a PUPL (obr. 1) mal genotyp s kombináciou génov Lr13+Lr37 v genotype Folio (GOYEAU, PARK, 1997). Efektívna bola aj kombinácia génov *Lr10+Lr13*, ktorú má genotyp Charger (BLAŽKOVÁ et al., 2002) a kombinácia génov *Lr13+LrH* v genotype Regain (GOYEAU, PARK, 1997). Gén *LrH* je ojedinelý a bol zistený v austrálskej odrode Harrier, od názvu ktorej je odvodené jeho označenie (McINTOSH et al., 1995). Na počet a plochu uredínií významne vplývali gény, kde vždy to bola kombinácia *Lr13* s ďalším génom. Gén *Lr13* je efektívnejší pri vyššej teplote (PRETORIUS et al., 1984). Oproti tomu gén *Lr37* z *Aegilops ventricosa* bol efektívnejší na mladých rastlinách pri nižšej teplote (BARIANA, McINTOSH, 1994). Za nimi nasledovali kombinácia génov *Lr10+Lr37* v genotype Terza (HUANG et al., 2004), *Lr37* v genotypoch Audace (GOYEAU, PARK,

1997) a Corsaire (WINZELER et al., 2000) a *Lr13* v genotypе Batis, ktorý je pokladaný za APR gén (WINZELER et al., 2000). Počet a plocha uredínií bola ovplyvnená izolátom *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* rôznym spôsobom. Najnižšie hodnoty počtu uredínií, celkovej plochy uredínií a podielu plochy uredínií z celkovej plochy listu boli pri izoláte 2163 (tab. 2). Najnižšia priemerná plocha uredínia bola pri izoláte 2132 a najvyššia pri izoláte 2163. Izolát 2163 je známy patotyp *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* 77SaBa. Izolát 2132 je patotyp 12SaBa, izolát 2142 je patotyp 57SaBa a izolát 2164 je patotyp 61SaBa. Patotypy sme určili podľa kľúča (KIRÁLY et al., 1970). Uvedené patotypy sú na Slovensku často frekventované, pričom 77SaBa je považovaný za najagresívnejší z uvedených (BARTOŠ et al., 2001).

Tabuľka 2: Priemerné hodnoty vplyvu patotypu *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* na počet uredínií, priemernú plochu uredínia, celkovú plochu uredínií a podiel plochy uredínií z plochy listu v pixeloch

Znak	Patotyp	Priemer
Počet uredínií	12SaBa	6,833
	57SaBa	7,479
	77SaBa	5,083
	61SaBa	5,688
Priemerná plocha uredínia	12SaBa	33,077
	57SaBa	44,773
	77SaBa	49,160
	61SaBa	47,398
Celková plocha uredínií	12SaBa	228,845
	57SaBa	302,983
	77SaBa	228,600
	61SaBa	255,958
Podiel plochy uredínií z plochy listu	12SaBa	6,170
	57SaBa	7,841
	77SaBa	6,110
	61SaBa	7,222

Záver

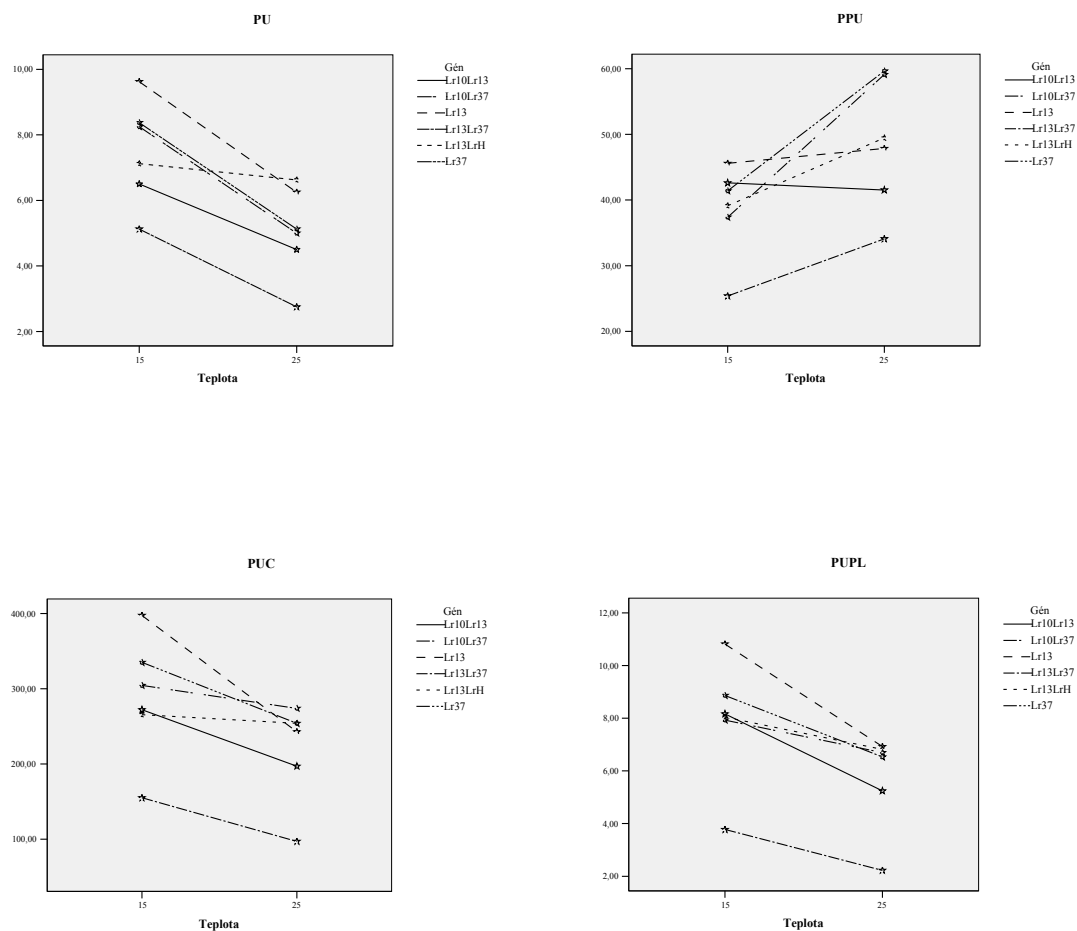
Na variabilitu znakov počet uredínií, priemerná plocha uredínia, celková plocha uredínií a podiel plochy uredínií z plochy listu vysoko významne vplývala teplota, izolát *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* a gény rezistencie proti hrdzi pšenicovej. Počet uredínií, celková plocha uredínií a podiel plochy uredínií z plochy listu bol pri vyššej teplote nižší. Priemerná plocha uredínia bola pri vyššej teplote väčšia. Najnižší počet a plochu uredínií mal genotyp s kombináciou génov *Lr13+Lr37*, pričom sa uplatnil gén *Lr13*, ktorý je efektívnejší pri vyššej teplote.

Literatúra

- BARIANA, H. S. – McINTOSH, R.A. 1994. Characterisation and origin of rust and powdery mildew resistance genes in VPM1 wheat. *Euphytica* 76, p.53-61
- BARTOŠ, P. – HANZALOVÁ, A. – DUMALASOVÁ, V. 2001. Rust research and wheat breeding for rust resistance in the Czech Republic, In: Proceedings of the 50th Anniversary Conference "Crop Science on the Verge of the 21st Century - Opportunities and Challenges", Research Institute of Crop Production, Prague, 11-13 September, 2001, pp. 75
- BLÁŽKOVÁ, V. – BARTOŠ, P. – PARK, R. – GOYEAU, H. 2002. Verifying the presence of leaf rust resistance gene *Lr10* in sixteen wheat cultivars by use of pcr-based sts marker, *Cereal Research Communications*, 30(1-2), 2002, p.9-16
- GOYEAU, H. – PARK, R.F. 1997. Postulation of resistance genes to wheat leaf rust at the seedling stage in bread wheat cultivars grown in France. In: Proc. Conf. Approaches to improving disease resistance to meet future needs. In: Airborne pathogens of wheat and barley. COST 817, 11–13 Nov., Prague 1997, p.28–32.
- HUANG, X. Q. – BASZCZYK, L. – GOYEAU, H. – HUANG XIUQIANG – RÖDER, M.S. – CHEKOWSKI, J. 2004. Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr37* on the microsatellite map of wheat. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2004, Vol. 9, No. 4B, p.869-878
- KIRÁLY, Z. – KLEMENT, Z. – SOLYMOŠY, F. – VÖRÖS, J. 1970. Methods in plant pathology. Budapest, 1970, 509 s.
- KOLMER, J.A. 1996. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 1996, p. 435-455

8. MASÁR, Š. – BOJNANSKÁ, K. – HUDCOVICOVÁ, M. – GUBIŠ, J. – PASTIRČÁK, M. – VANČO, B. 2006. Resistance to powdery mildew, wheat leaf rust, Stagonospora nodorum blotch and Fusarium culmorum in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) [CD-ROM]. In: XVII. česká a slovenská konferencie o ochrane rastlín: sborník príspevků, 12.-14. září Praha 2006. - Praha : ČZU, 2006. - ISBN 80-213-1564-4. - s. 262-266.
9. McINTOSH, R. A. – WELLINGS, C.R. – PARK, R.F. 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Australia 1995, pp. 200
10. PRETORIUS, Z.A. – WILCOXSON, R.D. – LONG, D.L. – SCHAFFER, J.F. 1984. Detecting wheat leaf rust resistance gene Lr13 in seedlings. Plant Disease 68, p. 585-586.
11. SAMBORSKI, D. J., 1985. Wheat leaf rust., in: The Cereal Rusts Vol. II: Diseases, distribution, epidemiology and control, A. P. Roelfs and W. R. Bushnell eds., Academic Press, Orlando, Fl. p. 39-59
12. WINZELER, M. – MESTERHÁZY, A. – PARK, R. - BARTOŠ, P. – CSOSZ, M. – GOYEAU, H. – ITTU, M. - JONES, E.- LOSCHENBERGER, F. - MANNINGER, K. – PASQUINI, M. - RICHTER, K. – RUBIALES, D. – SCHACHERMAYR, G. – STRZEMBICKA, A. – TROTTET, M. - UNGER, O.- VIDA G. – WALTHER, U. 2000. Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust , Agronomie 20, 2000, p. 783-792

Obr. 1: Priemerné hodnoty vplyvu teploty a génov rezistencie na počet uredíí hrdze pšenicovej (PU), priemernú plochu uredínia (PPU), celkovú plochu uredíí hrdze pšenicovej (PUC) a na počet uredíí hrdze pšenicovej z plochy listu (PUPL) v pixeloch



Adresa autora:

Ing. Štefan Masár, CSc., SCPV – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: masar@vurv.sk

NOVÉ PRÍSTUPY V ANALÝZE VYSOKOMOLEKULÁRNYCH GLUTENÍNÓVÝCH PODJEDNOTIEK (HMW-GS) PŠENICE

NEW ADVANCES FOR ANALYSIS HIGH-MOLECULAR-WEIGHT GLUTENINS OF WHEAT

Daniel MIHÁLIK – Edita GREGOVÁ

*The wheat (*Triticum aestivum* L.) contains six genes encoding high molecular weight (HMW) subunits of glutenin. Each of the loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* contains tightly linked the genes *x* and *y*, which are related but have subtle differences in their structures and properties. We analyze old wheat varieties and landraces of the Carpathian Basin in Central Europe and we found one new allele which is encoded by *Glu-D1* loci. We discovered one line with entirely new protein electrophoretic profile at gene products of *Glu-D1* loci. We confirm our finding by size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) and also by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). An unusually small *y*-type high molecular weight (HMW) glutenin subunit gene from *Triticum aestivum* L. was sequenced. This gene, encoded at the locus *Glu-D1* was designated 12.3. The derived amino acid sequence was compared with the amino acid sequences of the HMW glutenin subunits *Dy10* and *Dy12* of *T. aestivum*.*

Key words: HMW-GS, wheat, Dy12.3

Úvod

Pšeničné bielkoviny sú unikátne medzi bielkovinami obilnín i ostatných rastlín pre svoju schopnosť formovať cesto použiteľné pre pečenie chleba, pečiva, koláčov i výrobu cestovín (Autran, 1993). Zrelé zrno obsahuje 10-15% bielkovín, z toho 80-90% všetkých bielkovín tvoria zásobné bielkoviny. Na základe rozpustnosti, ktorá je determinovaná ich primárnou štruktúrou, nekovalentnými väzbami (vodíkové väzby a hydrofóbne interakcie) a kovalentnými (disulfidickými) väzbami, sa už niekoľko desaťročí používa ich klasifikácia na: albumíny – rozpustné vo vode, globulíny – rozpustné v roztokoch solí, prolaminy – rozpustné v alkoholoch, glutelíny – rozpustné v slabých kyselinách a zásadách. Glutenínové podjednotky s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW-GS), ktoré sa podieľajú na celkových zásobných bielkovinách iba malou časťou, ale svojou funkčnosťou a dôležitosťou sú však mimoriadne významné. HMW-GS sú kódované alelami lokusov *Glu-1*, lokalizovaných na dlhých ramenách chromozómov 1 homeologickej skupiny (*Glu-1A*, *Glu-1B*, *Glu-1D*). Štruktúry typickej podjednotky typu *x* a *y* publikoval (SHEWRY a kol., 1992), ktorý podrobne analyzoval podjednotky *x*-typ (*IDx5*) a *y*-typ (*IDy10*). Zásadný vplyv na kvalitu múky má aj kvalitatívne zastúpenie jednotlivých HMW-GS a ich kombinácie. Na stanovenie jednotlivých HMW-GS sa využíva elektroforetická separácia proteínov v akrylamidovom géli tzv. SDS-PAGE, alebo A-PAGE. Asi od polovice 90-tych rokov sa v analýze alel lokusu *Glu-1*, začala využívať polymerázová reťazová reakcia (PCR). Anderson a kol. (1989) identifikovali sekvenciu dvoch génov HMW-GS genómu D a na jej základe D'OVIDIO a ANDERSON (1994) použili sekvenciu alely kódujúcej podjednotku 5 (alela *IDx5*) na rozlišovanie genotypov s rôznymi pekárskymi vlastnosťami, detekovanými v tomto prípade prítomnosťou alely *IDx5*, respektíve *IDx2*. VARGHESE a kol. (1996) použili rovnaký pár primerov pre skrining európskych odrôd pšenice a segregujúcich a zistili, že tento spôsob analýzy dokáže spoľahlivo nahradiť doteraz najčastejšie používaný spôsob analýzy alel *Glu-1* lokusu – elektroforézu glutenínov v SDS-PAGE

Materiál a metódy

V práci bol použitý vybraný genotyp hexaploidnej pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L. spp. *aestivum*) Noe. Detekcia glutenínového spektra bola uskutočnená metódou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). DNA bola izolovaná pomocou kitu (Qiagen). PCR bola vykonaná pomocou termocykléru (MJ Research, PTC-200, Peltier Thermal Cycler) a Taq DNA polymerázy (Invitrogen), dNTP (Invitrogen) a primerov (Invitrogen). DNA fragmenty boli izolované z agarózového gélu a klonované do plazmidu pCRII-TOPO (Invitrogen). Plazmidmi sme transformovali chemicky kompetentné bunky baktérií *E. coli* kmeň TOP 10⁺ (Invitrogen). Plazmidy po transformácii boli analyzované pomocou restrikčných endonukleáz (New England Biolabs) a napokon sekvenované v sekvenačnom servise firmy Ecoli. Sekvenačné dáta boli spracované pomocou voľne prístupného softvéru Bioedit 7.0.

Výsledky a diskusia

Výhodu nových metód molekulárno-biologického výskumu popisuje vo svojej práci JUHÁSZ a kol. (2001), kde analyzovali staré maďarské odrody pšeníc. Pri odrode Bánkúti 1201 zistili, že táto odroda obsahuje alely *IDx2* a *IDy12* a navyše alelu *1Ax2**. Porovnaním pekárskych kvalít so pšenícami s rovnakým profilom elektroforetogramov v SDS-PAGE, zistili, že táto odroda má lepšie pekárske kvality. Následne daná skupina vedcov analyzovala sekvencie DNA génov kódujúcich HMW-GS a to pári primerov špecifických pre N-terminálnu oblasť génov *IDx2*, *IDy12* a definovali primery pre oblasť génu kódujúceho *1Ax2**. Identifikovali sme novú vysokomolekulárnu glutenínovú podjednotku typu *y* *Glu-D1* glutenínového génu *Triticum aestivum* L. kultivar Noe, ktorej mobilita v podmienkach SDS-PAGE sa

odlišuje od doposiaľ identifikovaných podjednotiek *IDy12* a *IDy10*. Danú podjednotku sme označili ako *IDy12.3*. Sekvenčná DNA analýza kódujúcich regiónov nového génu potvrdila, že sa skutočne jedná o novú podjednotku HMW-GS. Veľkosť dedukovaného maturovaného proteínu *IDy12.3* (67866 Da) a podjednotiek *IDy12* (68695 Da) a *IDy10* (67 495 Da) je ďalším dôkazom novej kvality. Vyššiu homológiu kódujúcich úsekov DNA vykazuje podjednotka *IDy12.3* s podjednotkou *IDy12* až 98,58%, resp. 91,35% s podjednotkou *IDy10*. Úplnú zhodu sekvencií DNA a dedukovaných proteínov vykazujú všetky tri podjednotky iba v sekvenciách kódujúcich signálny peptid a C-terminálnu doménu. Najväčšie rozdiely sú medzi centrálnou doménou podjednotiek *IDy12.3* a *IDy10*, kde sa okrem viacerých jednobázových substitúcií (ktoré majú vplyv na aminokyselinové zloženie dedukovaných proteínov) líšia aj deléciami, resp. inzerciami celých repetitívnych motívov, najvýraznejší rozdiel medzi *IDy12.3* a *IDy12* je v oblasti centrálnej domény, kde má podjednotka *IDy12.3* deléciu 18 nukletidov v pozícii (1467-1484), kódujúcich hexapeptid PEQGQQ a deléciu 6 nukleotidov v pozícii (1426-1431) kódujúcich dipeptid GQ. Vyvinuli sme primery, pomocou ktorých sa dajú odlišiť všetky tri spomínané podjednotky.

Záver

Analýza výsledkov potvrdila existenciu nového génu na chromozóme 1D a charakteristika tohto génu kódujúcu vysokomolekulárnu glutenínovú podjednotku prinieslo nové doteraz nepopísané poznatky. Analýza bielkovín pomocou SDS – PAGE sa ukazuje ako dostatočná na určenie genotypu, ale v prípade malých rozdielov medzi podjednotkami je nutné analyzovať až po úroveň sekvencie nukleotidov daných génov.

Literatúra

1. ANDERSON, O. D. – GREENE, F.C. – YIP, R. E. – HALFORD, N. G. – SHEWRY, P. R. – MALPICA-ROMERO, J.-M.: Nucleotides sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from D-genome of hexaploid wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Cheyenne. *Nucleic Acid Research*, 1989, 17, p. 461-462
2. AUTRAN, J.-C.: Recent perspectives on the genetics, biochemistry and functionality of wheat proteins. *Trends in Food Sciences and Technology*, 1993, 4, p. 358-363
3. D'OVIDIO, R. – ANDERSON, O. D. : PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat breadmaking quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88, p. 759-763
4. JUHÁSZ, A. – TAMÁS, L. – KARSAI, I. – VIDA, G. – LÁNG, L. – BEDÖ, Z.: Identification, cloning and characterisation of HMW-glutenin gene from an old Hungarian wheat variety, Bánkúti 1201. *Euphytica*, 2001, 119, p. 75-79
5. SHEWRY, P. R. – HALFORD, N. G. – TAHAM, A. S.: High molecular weight subunit of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 1992, 15, p. 105-120
6. VARGHESE, J. P. – STRUSS, D. – KAZMAN, M. E.: Rapid screening of selected European winter wheat varieties and segregating populations of the Glu-D1d allele using PCR. *Plant Breeding*, 1996, 115, p. 451-454

Adresa autorov:

Mgr. Daniel Mihálik, Ing. Edita Gregová, PhD., SCPV – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Email: mihalik@vurv.sk, gregova@vurv.sk