

MIKROSATELITNÝ POLYMORFIZMUS GENOTYPOV JAČMEŇA MICROSATELLITE POLYMORPHISM OF BARLEY GENOTYPES

Želmíra BALÁŽOVÁ – Zdenka GÁLOVÁ – Martin VIVODÍK

The aim of our study was to detect genetic diversity of thirty barley genotypes based on ten microsatellite markers. Ten primer pairs amplified altogether 55 different polymorphic alleles with an average number of 5,5 alleles per locus. The number of allele ranged from two (locus HVCMA) to eleven (locus HVRCABG). All ten microsatellite markers were polymorphic and produced reproducible data. The diversity index (DI), the polymorphic information content (PIC) and probability of identity (PI) of the tested SSR markers were calculated. The diversity index of the tested SSR markers ranged from 0,291 to 0,866 with an average of 0,622. Six (60%) of 10 microsatellite loci obtain values of index diversity higher than 0,6, what is generally considered sufficient for this purpose. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0,248 to 0,866 with average value 0,587. The most important feature of marker for differentiation of genotypes is probability index. The lowest probability of identity of chosen barleys was at the locus HVRCABG (0,008). High values of DI and also of PIC present high level of genetic polymorphism in tested microsatellite loci. Results showed the utility of microsatellite markers for estimation of genetic diversity of barley genotypes leading to genotype identification.

Key words: Hordeum vulgare L., microsatellite markers, index diversity, differentiation

Úvod

Jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.) je diploidný druh s počtom chromozómov $2x = 2n = 14$ a patrí medzi najdôležitejšie rastliny pestované na Slovensku (HOLKOVÁ et al., 2003).

Mikrosatelity sú jednoduché repetitívne sekvencie dlhé iba niekoľko bázových párov (1–6). Sú to markery genómovo špecifické s kodominantnou dedičnosťou. Kvôli ich jednoduchému použitiu, založenému na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR), sa stávajú veľmi užitočným nástrojom na štúdium genetických vzťahov medzi druhmi, populáciami a odrodami. Na jačmeni boli mikrosatelitné analýzy študované len v posledných rokoch (BECKER a HEUN, 1995, RUSSELL et al., 1997, MACAULAY et al., 2001, BAEK et al., 2003, KRAIC, 2005). Na Slovensku mikrosatelitné analýzy boli použité na diferenciaciu odrôd pšenice (GREGÁŇOVÁ et al., 2005), jačmeňa (KRAIC, 2005), cícera (JOMOVÁ et al., 2005), v Čechách boli použité pri štúdiu triticales (VYHNÁNEK a BEDNÁŘ, 2006). Mikrosatelitné analýzy preukázali vysoký stupeň polymorfizmu, sú reprodukovateľné, majú schopnosť detekcie heterozygotov i heterogenitu (BAEK et al., 2003).

Cieľom práce bolo detekovať genetický polymorfizmus 30 genotypov jačmeňa siateho pomocou desiatich mikrosatelitných markerov, ktoré publikoval a opísal BECKER a HEUN (1995) resp. MACAULAY et al. (2001).

Materiál a metódy

Na analýzy bol použitý súbor 30 genotypov jačmeňa siateho jarnej aj ozimnej formy poskytnutý ÚKSUP Bratislava. Celková rastlinná DNA bola izolovaná z mladých 7–10 dňových listov jačmeňa kombináciou dvoch izolačných postupov – podľa DELLAPORTU et al. (1983) a GRANERA et al. (1990). Mikrosatelitné analýzy boli uskutočnené podľa BECKER a HEUN (1995) resp. podľa MACAULAY et al. (2001). Polymerázové reťazové reakcie (PCR) boli uskutočnené v objeme 20 μ l v MJ PTC 200 termocykleri. Na detekciu PCR produktov, mikrosatelitných alel boli použité 6 % denaturované PAGE gély a vizualizované boli striebrom (BASSAM et al., 1991). Výsledné PCR produkty v polyakrylamidových géloch boli naskenované a vyhodnotené. Z počtu alel detegovaných pre každý mikrosatelit boli vypočítané frekvencie jednotlivých alel a následne indexy diverzity (DI), pravdepodobnosti identity (PI) a polymorfické informačné obsahy (PIC) podľa RUSSELL et al. (1997).

Výsledky a diskusia

Na diferenciaciu 30 genotypov jačmeňa bolo použitých 10 párov primerov. Všetkých 10 párov primerov amplifikovalo jeden lokus. V 10 mikrosatelitných lokusoch bolo detekovaných 55 alel s rôznou veľkosťou, pričom priemerný počet alel bol 5,5. Počet alel na lokus sa pohyboval v rozmedzí od 2 do 11. Najvyšší počet rôznych alel (11) bol detekovaný v lokuse HVRCABG. Najmenší počet rôznych alel bol detekovaný v lokuse HVCMA, kde boli detekované len dve alely s rôznou veľkosťou, čo mohlo byť spôsobené nízkym počtom (9) repetícií použitého mikrosatelitu. Kodominantná povaha mikrosatelitných markerov umožňuje detekciu heterozygotného stavu. V dvoch lokusoch (*HVCMA*, *HVGNIRE*) boli zistené u jedného genotypu dve alely s rôznymi veľkosťami. Vysoký stupeň polymorfizmu v sledovaných lokusoch potvrdzujú aj vysoké hodnoty indexu diverzity a polymorfického informačného obsahu. Z 10 mikrosatelitných markerov, v 80 % lokusoch sme dosiahli hodnoty DI vyššie ako 0,5 a v 60 % lokusoch hodnoty DI vyššie ako 0,6. Priemerná hodnota DI v sledovaných lokusoch bola 0,622 a priemerná hodnota PIC bola 0,587. Tieto hodnoty nám poukazujú na vysokú diferenciačnú schopnosť mikrosatelitných markerov, pričom prezentujú vysokú úroveň polymorfizmu odrôd jačmeňa detegovaného pomocou mikrosatelitných markerov. Podobné hodnoty PIC a DI získal KRAIC (2005) i GREGÁŇOVÁ et al. (2005).

Tabuľka 1: Prehľad počtu získaných mikrosatelitných alel, vypočítané hodnoty PIC, DI, PI.

SSR marker	počet alel	lokus na chromozóme	DI	PIC	PI
HVCMA	2	7H	0,291	0,248	0,545
HVGNIRE	6		0,711	0,694	0,074
HVRCABG	11	4H	0,866	0,866	0,008
Bmac40	10	6H	0,849	0,846	0,010
Bmac67	6	3H	0,691	0,652	0,123
Bmag13	4	3H	0,340	0,316	0,458
Bmag135	3	7H	0,527	0,419	0,331
Bmag173	4	6H	0,593	0,546	0,203
Bmag211	4	1H	0,624	0,567	0,188
Bmag225	5	3H	0,727	0,716	0,051
priemer	5,5		0,622	0,587	0,199

Záver

Spomedzi DNA techník v súčasnosti využívaných na jačmeni, najvyšší polymorfizmus bol pozorovaný pri mikrosatelitných analýzach, čo potvrdili aj naše výsledky. Mikrosatelitné analýzy poukázali na možnosť detekcie genetického polymorfizmu medzi vybranými genotypmi jačmeňa, pomocou ktorého je možné identifikovať genotypy a zároveň detegovať heterozygotov.

Literatúra

- BAEK, H., BEHARAV, A., NEVO, E. 2003. Ecological-genomic diversity of microsatellites in wild barley, *Hordeum spontaneum*, populations in Jordan. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 106, 2003, no. 3, p. 1524-1532
- BASSAM, B. J., CAETANO-ANOLLES, G., GRESSHOFF, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. In *Anal. Biochem.*, 196, 1991, 80-83.
- BECKER, J., HEUN, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. In *Plant Mol. Biol.*, vol. 27, 1995, p. 835-845.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B. 1983. Plant DNA miniprep: version II. In *Plant Mol Biol Rep*, 1, 1983, 19-21
- GREGÁNOVÁ, Ž., KRAIC, J., GÁLOVÁ, Z. 2005. Effectiveness of microsatellites in differentiation of elite wheat cultivars. In *Biologia*, vol. 60, 2005, p.665-670.
- HOLKOVÁ, S. et al. 2003. Jačmeň. *Biológia, pestovanie a využívanie*. Nitra: AGROGENOFOND n.o. Nitra. 2003, 193 s. ISBN 80-969068-2-8.
- JOMOVÁ, K., BENKOVÁ, M., ŽÁKOVÁ, M., TREFOVÁ, E., KRAIC, J. 2005. Clustering of chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 52, 2005, p. 1039-1048.
- KRAIC, J. 2005. Relevancy of genomic and gene-based variation in distinguishing of elite barleys. In *Biologia*, vol. 60/6, 2005, p. 675-680.
- MACAULAY, M., RAMSAY, L., POWELL, W. et al. 2001. A representative, highly informative genotyping set of barley SSRs. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 102, 2001, no. 4, p. 801-809.
- RUSSELL, J., FULLER, J., YOUNG, G. et al. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. In *Genome*, vol. 40, 1997, p. 442-450.
- VYHNÁNEK, T., BEDNÁŘ, J. 2006. Molecular markers of genetic variability in triticale varieties registered in the Czech Republic. In *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis*, vol.15, 2006, no. 5, p. 149-153

PodĎakovanie: Práca bola podporená projektom Vedeckej grantovej agentúry SR VEGA č. 1/3474/06 a projektom grantovej agentúry SPU č. 717/05310.

VARIABILITA AGRO-MORFOLOGICKÝCH ZNAKOV A VLASTNOSTÍ STARŠÍCH A NOVŠÍCH GENOTYPOV JARNÉHO JAČMEŇA VARIABILITY OF AGRO-MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF OLD AND NEW VARIETIES OF SPRING BARLEY

Michaela BENKOVÁ – Mária ŽÁKOVÁ

A set of 106 spring barley accessions of Slovak origin and former Czechoslovakia origin, developed from 1900 to 2003, was studied in 2004-2005. The study was conducted to assess the impact of breeding on nine agro-morphological traits of barley cultivars. The obtained data were analysed statistically using basic statistic characteristics, analysis of variance (ANOVA), correlation analysis and principal component analysis (PCA). An analysis of variance revealed strong influence of year on selected traits and especially strong influence of genotype on all the traits of study. Changes of traits at new genotypes were observed for plant height, 1000-grain weight, spike per m², spike density, grain yield, resistance to lodging, resistance to powdery mildew, total starch and protein contents. PCA based on agro-morphological traits divided the whole collection in the two groups corresponding to two different periods (1900-1971 and 1972-2003).

Key words: spring barley, variability, evaluation, ANOVA, PCA analysis, correlation

Úvod

Jačmeň je neodmysliteľnou súčasťou obilnín na Slovensku. Historický vývin jarného jačmeňa na území bývalého Československa poukazuje na skutočnosť, že skoro všetky domáce sladovnícke odrody boli výsledkom rekombinácií vlastností pôvodných krajových odrôd (LEKEŠ, 1997). Hanácky jačmeň ovplyvnil rozhodujúcim spôsobom šľachtenie a vývoj pestovania sladovníckeho jačmeňa v celej strednej Európe a pre väčšinu sladovníckych odrôd bol ich genealogickým predkom. Porovnanie starých a súčasných odrôd jarného jačmeňa vo vybraných znakoch a vlastnostiach môže poskytnúť obraz o jeho vývoji na našom území. Podobné štúdiá boli vykonané v mnohých krajinách (RIGGS et al., 1981; WYCH a RASMUSSEN, 1983). Cieľom tohto príspevku bolo zhodnotenie a porovnanie zmien vo vybraných znakoch a vlastnostiach v genotypoch jarného jačmeňa vyvinutého počas storočia.

Materiál a metódy

Hodnotili sme 106 genotypov jarného jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) vyvinutých v rokoch 1900–2003. Poľný experiment bol založený v lokalite Borovce do maloparcelkových pokusov v 3 opakovaníach v znáhodnených blokoch na parcelky veľkosti 2,5 m², počas rokov 2004–2005. Znaky a vlastnosti sa hodnotili podľa príslušného klasifikátora (LEKEŠ et al., 1996, IPGRI, 1994): výška rastliny (mm), hmotnosť 1000 zrn (g), počet klasov na m², hustota klasu, úroda zrna (t.ha⁻¹), odolnosť voči poliehaniu (body 1–9), odolnosť voči múčnatke trávovej (body 1–9), celkový obsah škrobu (%) a obsah bielkovín (%). Výsledky boli zhodnotené štatistickou analýzou ANOVA a PCA (HOTELLING, 1993), ktoré sú súčasťou štatistických balíkov, SPSS 8.1 a STATGRAPHIC 6.1.

Výsledky a diskusia

Použitá dvojfaktorová analýza ukázala vysoko preukazný ($P < 0.01$) vplyv ročníka na znaky výška rastliny a úroda zrna a vplyv genotypu na všetky znaky (tab. 1), čo je v zhode so zistenými poznatkami CONDONA (2004). Štatisticky vysoko preukazný vplyv na všetky znaky okrem znaku hustota klasu mala interakcia rok x genotyp.

Tabuľka 1: Analýza rozptylu sledovaných agronomických znakov a vlastností

Zdroj premenlivosti	A: Rok	Opakovanie	B: Genotyp	A x B	Chyba	Spolu	Priemer	
							2004	2005
<i>df</i> ^a	1	2	105	105	420	635		
Hustota klasu	1.291	0.052	3.215**	0.516	1.545	1.232	11.94	12.05
Počet klasov / m ²	1839057	9269.0	17100.5**	13801.0**	69132	13841.0	760	870
Výška rastliny	116641**	4434	38822.2**	7470.5**	10832	9026.6	827.9	800.8
HTZ	193.8	4.30	27.2**	11.1**	3.23	8.8	38.4	39.5
Úroda	126.1**	40.62**	9.74**	1.63**	0.11	2.91	7.15	6.26
Poliehanie	369.8	37.19	13.89**	4.25**	0.74	4.42	6.45	7.98
Odolnosť voči PM ^b	3.04	1.719	13.31**	5.0**	0.44	3.19	5.03	5.17
Obsah škrobu	62.156	0.03	22.61**	9.72**	2.33	8.87	59.87	60.63
Obsah bielkovín	35.7	3.23	7.43**	3.19**	0.35	2.73	11.73	12.31

** $P < 0.01$, ^a stupne voľnosti; ^b PM – múčnatka trávová

Korelačnou analýzou sme zistili lineárnu závislosť niektorých sledovaných znakov. Analýza ukázala pozitívnu koreláciu medzi znakmi úroda zrna a znakmi: počet klasov na m² (2004 $r=0.460^{**}$ a 2005 $r=0.301^{**}$), hustota klasu (2004 $r=0.468^{**}$ a 2005 $r=0.405^{**}$) a obsah škrobu (2004 $r=0.455^{**}$ a 2005 $r=0.362^{**}$). Pozitívny vysoko preukazný vzťah úrody k počtu klasov na m² a k počtu zrn na klas potvrdili viacerí autori, ako napr. GRAUSGRUNER a kol.(2002) a ORTIZ a kol. (2002). Medzi obsahom bielkovín a výškou rastliny bola tiež pozitívna korelácia (2004 $r=0.593^{**}$ a 2005 $r=0.474^{**}$). Úroda zrna negatívne korelovala s výškou rastliny (2004 $r=-0.431^{**}$ a 2005 $r=-.581^{**}$) a obsahom bielkovín (2004 $r=-0.668^{**}$ a 2005 $r=-0.457^{**}$). Obsah bielkovín koreloval negatívne aj s celkovým obsahom škrobu 2004 $r=-0.485^{**}$ and 2005 $r=-0.598^{**}$). Podobné výsledky a trendy zaznamenali aj iní autori ako CONDON et al.(2004), GRAUSGRUBER et al. (2002) a ORTIZ (2002).

PCA analýza zobrazuje genetickú diverzitu medzi sledovanými genetickými zdrojmi. Prvé dva komponenty predstavujú 61,27 % celkovej variability medzi sledovanými znakmi a genotypmi. Prvý komponent obsahuje až 48 % diverzity a pozitívne koreloval so znakmi HTZ, úroda, počet klasov na m², hustota klasu, odolnosť voči múčnatke trávovej a poliehanu a negatívne koreloval s výškou rastliny a obsahom bielkovín. Druhý komponent negatívne koreloval s HTZ, obsahom škrobu a pozitívne s počtom klasov na m² a hustotou klasu. Aplikovaním analýzy sa vytvorili dve skupiny. Prvá obsahovala 52 genotypov z rokov 1900–1971, ktoré sú charakterizované vyššou výškou rastliny a nižšou úrodou a druhá skupina zgrupovala 54 genotypov z rokov 1972–2003, ktoré sú nižšie a úrodnejšie. Predel medzi týmito skupinami vytvorili genotypy vzniknuté z „krátkesteblovej“ odrody „Diamant [1965]“. Táto odroda významne ovplyvnila ďalšie šľachtienie jarného jačmeňa.

Literatúra

- CONDON, F. – SMITH, K. P. – SCHIEFEILBEIN, E.: Allelic Diversity and Genetic Gain in Medwestern Six-Rowed Barley Germplasm. In: Genetics and plant breeding, Book of abstracts, 40, 9th International barley genetics symposium, Brno, Czech Republic, 20 – 26 June 2004, s. 28, ISSN 1212.
- GRAUSGRUBER, H. – BOINTNER, H. – TUMPOLD, R. – RUCKENBAUER, P.: Genetic improvement of agronomic and qualitative traits of spring barley. *Plant Breeding*. 121, 2002, s. 411- 416.
- HOTELLING, H.: Analysis of a Complex of Statistical Variables into Principal Components. *Journal of Educational Psychology*. 24, 1993, s. 417 - 441.
- IPGRI: *Descriptors for barley (Hordeum vulgare L.)*. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, 1994, 45 s.
- LEKEŠ, J. et al.: *Klasifikátor, genus Hordeum L.* Praha : VÚRV, 1986, 46 s.
- ORTIZ, R. et al.: Cultivar diversity in Nordic spring barley breeding (1930 - 1931). In: *Euphytica*, vol. 123, 2002, s. 111 - 119.
- RIGGS, T. J. – HANSON, P.R. – START, N.D. – MILES, D. M. – MORGAN,C.L. – FORD, M.A.: Comparison of spring barley varieties grown in England and Wales between 1880 and 1980. *J. Agric. Sci., Camb.* 97, 1981, s. 599-610.
- SPSS, Inc.: *SPSS User's guide*. USA, 1998, ISBN 0-13-688590-X.
- STATGRAPHICS PLUS: *User manual*.1993, USA
- WYCH R.D. - RASMUSSEN, D.C.: Genetic improvement malting barley cultivars since 1920. *Crop Sci.* 23, 1983, s. 1037-1040.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory na základe Zmluvy č. APVT-27-028704 a úlohou odbornej pomoci pre MP SR v roku 2007 ÚO 27/050 0206

ÚROVEŇ ODOLNOSTI NOVOŠĽACHTENÝCH KMEŇOV PŠENICE LETNEJ VOČI MÚČNATKE TRÁVOVEJ

THE LEVEL OF RESISTANCE OF WHEAT BREEDING LINES TO POWDERY MILDEW

Katarína BOJNANSKÁ

Resistance of 117 wheat breeding lines to powdery mildew was observed in 2008. The evaluation was done at the field conditions and in laboratory. The range of the pathogen attack for each wheat breeding line was observed by means of AUDPC values. Breeding lines were found that were significantly resistant to powdery mildew when compared with the controls (selected Slovak registered cultivars were chosen as controls). These were V₂-17, V₂-18, V₂-42, V₂-44, V₂-55, V₂-57, V₂-59, V₂-60, MS 1750, SK142, SK146, SK147 and SK149. The presence of Pm1, Pm2, Pm3, Pm4b, Pm6, Pm7, Pm8, Mld genes was detected. In some cases resistance in field can be brought on by adult plant resistance.

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

Úvod

Ochorenie pšenice letnej múčnatkou trávovou spôsobuje obligátny patogén *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal. Najsilnejší infekčný tlak a epidemický výskyt tohto patogéna je predovšetkým v jarých mesiacoch, ale pri vhodných podmienkach (nižšie teploty a zrážky) sa vyskytuje a naďalej vyvíja počas celej vegetácie pšenice. Straty na výnosoch sa môžu pohybovať v rozmedzí 5–15 %, KEMA et al. (1995) uvádza v určitých prípadoch až 45 %. Pestovanie odrôd pšenice s geneticky zabudovanou odolnosťou eliminujú straty na výnosoch a v konečnom dôsledku znižovaním nákladov na ochranu rastlín zefektívňujú poľnohospodársku výrobu. V roku 2008 boli v poľných a laboratórnych podmienkach hodnotené novošľachtené kmene pšenice letnej v odolnosti voči múčnatke trávovej.

Materiál a metódy

V poľných podmienkach SCPV - VÚRV v Piešťanoch bolo v roku 2008 hodnotených 117 novošľachtených kmeňov (ďalej len kmene) pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) pochádzajúcich z VŠS Vígľaš - Pstruša, z VŠS Malý Šariš a zo spoločnosti HORDEUM s.r.o. zo Sládkovičova. V prirodzených poľných podmienkach bolo napadnutie patogénom hodnotené percentom napadnutej plochy v dvoch opakovaniach v pravidelných časových intervaloch. Tieto hodnoty boli použité na stanovenie hodnoty AUDPC podľa SHANERA a FINNEYA (1977). Na analýzu variancie a následné štatistické spracovanie bol použitý štatistický program SPSS[®] 13.0. V laboratórnych podmienkach boli kmene s najnižšími hodnotami AUDPC testované podľa autorov HSAM & ZELLER (1997). Na genetickú analýzu odolnosti boli použité izoláty patogéna so známym virulencným spektrom pre najfrekvencovanejšie gény rezistencie (*Pm1, Pm2, Pm3, Pm4a, Pm4b, pm5, Pm6, Pm7, Pm8, Pm9, Pm17, Mld*).

Výsledky a diskusia

Analýzou variancie hodnôt AUDPC kmeňov pšenice letnej z VŠS Pstruša boli nájdené preukazné rozdiely medzi jednotlivými kmeňmi. Hodnoty AUDPC sa pohybovali v rozmedzí od 0 (V₂-17, V₂-18, V₂-44, V₂-55, V₂-59 a V₂-60) do 3035 (V₂-19). V porovnaní s kontrolnými odrodami (Astella, Brea, Ilona, Torysa) boli hodnoty AUDPC kmeňov V₂-17, V₂-18, V₂-42, V₂-44, V₂-55, V₂-57, V₂-59 a V₂-60 preukazne nižšie. Preukazne vyššie hodnoty AUDPC v porovnaní s kontrolami mali kmene V₂-3, V₂-19, V₂-54 a V₂-56.

Medzi hodnotami AUDPC kmeňov pšenice pochádzajúcich z VŠS Malý Šariš boli analýzou variancie nájdené preukazné rozdiely. Najnižšia hodnota AUDPC bola 293 (MS 1750) a najvyššia bola 1238 (K 1732-131-88). V porovnaní s kontrolnými odrodami (Ilias, Ilona, Torysa, Venistar) mal preukazne nižšiu hodnotu AUDPC len kmeň MS 1750, aj to len v porovnaní s kontrolnými odrodami Ilona a Torysa. Žiadne iné hodnoty AUDPC neboli preukazne odlišné.

Medzi hodnotami AUDPC kmeňov zo spoločnosti HORDEUM s.r.o. boli analýzou variancie nájdené preukazné rozdiely. V porovnaní s kontrolnými odrodami (Astella, Brea, Ilona) neboli nájdené preukazne odlišné hodnoty AUDPC. Preukazne nižšie hodnoty AUDPC mali kmene SK142, SK146, SK147 a SK149 len v porovnaní so štvrtou kontrolnou odrodou Torysou. Najnižšiu hodnotu AUDPC (258) mal kmeň SK142 a najvyššiu (1246) dosiahol kmeň SK141.

Genetickou analýzou odolnosti boli v laboratórnych podmienkach detegované špecifické gény rezistencie *Pm1, Pm2, Pm3, Pm4b, pm5, Pm6, Pm7, Pm8* a *Mld* samostatne alebo v kombináciách (tab. 1). U niektorých kmeňov neboli nájdené žiadne špecifické gény rezistencie a niektoré kmene nesú špecifické gény rezistencie, ktoré sa použitými izolátmi nedali identifikovať.

Tabuľka 1: Špecifické gény rezistencie identifikované v novošľachtených kmeňoch pšenice letnej

Špecifické gény rezistencie	Novošľachtené kmene pšenice letnej
žiadny	V ₂ - 2, V ₂ - 32, V ₂ - 39, V ₂ - 40, V ₂ - 50, MS 1750, K 1993-45, MS 1854-2, K 1953-9, PS 2-40, K 1953-207, K 1734-336-156, K 1734-336-174
neidentifikovateľný	V ₂ - 6, V ₂ - 17, V ₂ - 18, V ₂ - 51, V ₂ - 55, V ₂ - 57, V ₂ - 66
<i>Pm1</i>	V ₂ - 30
<i>Pm2</i>	V ₂ - 7, V ₂ - 42, V ₂ - 59, MS 1782, K 1953-228, MS 1912
<i>Pm2,6</i>	V ₂ - 10, V ₂ - 16
<i>Pm2,Mld</i>	V ₂ - 28
<i>Pm2,6,7,</i>	V ₂ - 58, MS 1375
<i>Pm3</i>	V ₂ - 44, V ₂ - 60
<i>Pm3,4b</i>	V ₂ - 34
<i>Pm4b,6</i>	V ₂ - 5, V ₂ - 21
<i>Pm4b,8</i>	V ₂ - 22, V ₂ - 23
<i>Pm4b, Mld</i>	MS 1756
<i>Pm6,7</i>	V ₂ - 45, V ₂ - 65, K 1981-411
<i>Pm6,7,8</i>	V ₂ - 33
<i>Pm7</i>	V ₂ - 41, MS 1734
<i>Pm8</i>	V ₂ - 36
<i>Mld</i>	V ₂ - 43

V odolnosti voči múčnatke trávovej na pšenici boli medzi hodnotenými kmeňmi pšenice zistené preukazné rozdiely. Veľmi široká variabilita v odolnosti bola medzi kmeňmi z VŠS Pstruša, boli nájdené kmene rezistentné až vysoko veľmi citlivé. U veľmi vysoko citlivých kmeňoch bol výskyt patogéna zaznamenaný na celej rastline vrátane klasu. Užšia variabilita v odolnosti bola medzi kmeňmi z VŠS Malý Šariš a zo spoločnosti HORDEUM s.r.o., boli nájdené len kmene, ktoré boli preukazne odolnejšie len v porovnaní s kontrolnou odrodou Torysou, ktorá mala v rámci kontrolných odrôd najnižšiu úroveň odolnosti.

Genetickou analýzou v laboratórnych podmienkach sa u niektorých odolných kmeňov nedali identifikovať špecifické gény rezistencie (tab. 1), na listových segmentoch po inokulácii neprejavili symptómy ochorenia, neboli infikované. Tieto gény rezistencie mohli zabezpečovať obranu voči ochoreniu aj v poľných podmienkach. Špecifické gény rezistencie detegované u kmeňov, ktoré boli v poľných podmienkach odolné, sú okrem génov *Pm2* a *Mld* neefektívne. U 13 testovaných kmeňov nebol nájdený žiadny špecifický gén rezistencie voči múčnatke trávovej. Úroveň odolnosti v poľných podmienkach mohla byť zabezpečená nešpecifickou odolnosťou. PAILLARD et al. (2000) zistili, že počas 10 rokov pestovania pšenice za podmienok vyššieho infekčného tlaku patogéna, sa úroveň nešpecifickej rezistencie zvýšila. Preto je v procese tvorby nových odrôd nevyhnutné tvoriť, hodnotiť a testovať nový materiál v našich podmienkach. Podobne JØRGENSEN et al. (2000) považujú skríning a testovanie nových materiálov a komerčných odrôd za dôležitý vstup pre tvorbu európskych rezistentných odrôd.

Záver

Medzi sledovanými novošľachtenými kmeňmi boli vo všetkých súboroch nájdené genotypy veľmi odolné až rezistentné voči múčnatke trávovej na pšenici. Novošľachtené kmene pšenice V₂-17, V₂-18, V₂-42, V₂-44, V₂-55, V₂-57, V₂-59, V₂-60, MS 1750, SK142, SK146, SK147 a SK149 boli štatisticky preukazne najodolnejšie

Práca bola financovaná prostriedkami MP SR projektom Výskumu a vývoja č. 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11 na základe Zmluvy č. APVT-27-028704.

Literatúra

- HSAM, S.L.K. – ZELLER, F.J. 1997: Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pm17* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust genes in the common wheat cultivar Amigo. In: Plant Breed, vol. 116, p. 119-122.
- KEMA, G.H.J. – LANGE, W. – SILFHOUT, C.H. van. 1995. Differential suppression of stripe rust resistance in synthetic wheat hexaploids derived from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* and *Aegilops squarrosa*. In: Phytopathology, 85, p. 425-429.
- SHANER, G. - FINNEY, R.E. : The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. In: Phytopathology, 97, 1977, 1051-1056 s.
- JØRGENSEN, J.H. - BECH, C. - JENSEN J. : Reaction of European spring barley varieties to a population of the net blotch fungus. Plant Breeding, 119, 2000, 43-46 s.
- PAILLARD, S. - GOLDRINGER, I. - ENJALBERT, J. - DOUSSILNAULT, G. - DE VALLAVIEILLE-POPE, C. - BRABANT, P. : Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II. Adult plant resistance. TAG, 101, 2002, 457-462.

ODHAD NAPADNUTIA SLOVENSKÝCH REGISTROVANÝCH ODRÔD PŠENICE MÚČNATKOU TRÁVOVOU A HRDZOU PŠENICOVOU V ROKOCH 2005–2008

ASSESSMENT OF POWDERY MILDEW AND LEAF RUST SEVERITY ON SLOVAK REGISTRATED VARIETIES IN 2005–2008

Katarína BOJNANSKÁ – Štefan MASÁR

Obligate pathogens belong to more important pathogens they can cause high crop losses through their activity. The wheat resistance to powdery mildew and to leaf rust was evaluated from 2005 to 2008. Data of fungal attack were the assessment base for resistance development of wheat varieties. Obtained data showed the effect of evaluative year, period of registration and variety provenance. Powdery mildew resistance has been more highly within new Slovak varieties and leaf rust resistance has been more highly within new foreign varieties. In discussion has showed the influence of weather process to a disease severity and possible influence of contribution of APR carrying varieties.

Key words: wheat, Triticum, powdery mildew, leaf rust, disease severity

Úvod

Obligátne parazity obilnín patria medzi významné patogény, ktoré svojou aktivitou zapríčiňujú 5–40 % straty na úrodách (SATORRE & SLAFER, 2000; KOLMER, 1996). Rýchly vývojový cyklus a jednoduchá forma rozširovania týchto patogénov sú príčinou neustálej nutnej ochrany rastlín počas vegetácie. Preto je geneticky podmienená odolnosť nevyhnutným prvkom v modernej technológii pestovania rastlín. V priebehu rokov 2005–2008 bola hodnotená odolnosť pšenice letnej voči múčnatke trávovej na pšenici a hrdzi pšenicovej. Údaje o napadnutí odrôd tvorili podklady pre vyhodnotenie vývoja odolnosti odrôd voči uvedeným patogénom.

Materiál a metódy

V rokoch 2005–2008 bola hodnotená odolnosť 74 registrovaných odrôd pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) voči obligátnym parazitom múčnatke trávovej na pšenici (*Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal) a hrdzi pšenicovej (*Puccinia triticina* Ericks.) v poľných podmienkach. Prírodný infekčný tlak patogénov bol podporený výsevom náchylných odrôd v pravidelných vzdialenostiach medzi pokusnými parcelkami. Napadnutie rastlín patogénom bolo hodnotené podľa BABAJANCA (1988). Percentuálne hodnoty plochy napadnutia boli použité na výpočet hodnoty AUDPC podľa SHANER & FINNEY (1977), ktoré boli použité pri štatistickom spracovaní. Odolnosť registrovaných odrôd bola hodnotená v pokusných rokoch, podľa obdobia registrácie – odrody registrované do roku 2000 (vrátane tohto roku) a po roku 2000 a podľa pôvodu – pôvodné slovenské odrody a zahraničné odrody.

Výsledky a diskusia

Múčnatka trávová

Na variabilitu hodnôt AUDPC vysoko významne vplýval rok hodnotenia a významne obdobie registrácie odrody (tab. 1). Významné rozdiely v hodnotách AUDPC boli medzi všetkými rokmi hodnotenia (tab. 2). Významne najnižšie hodnoty AUDPC boli v roku 2007 a významne najvyššie v roku 2008. Variabilita hodnôt AUDPC z hľadiska pôvodu odrody nebola významná. Tak isto nebola významná ani jedna interakcia medzi sledovanými zdrojmi variability. Odrody registrované do roku 2000 mali vyššie hodnoty AUDPC ako odrody registrované po roku 2000. Odrody registrované po roku 2000 slovenského pôvodu mali nižšie hodnoty AUDPC ako odrody pôvodom zo zahraničia registrované v tom istom období. V získaných hodnotách AUDPC je možné postrehnúť pozitívny posun v ich znižovaní vplyvom obdobia registrácie a domáceho pôvodu odrôd. Hodnoty AUDPC majú možný súvis s priebehom počasia v mesiacoch apríl až jún. Najnižšie hodnoty AUDPC v roku 2007 boli v podmienkach najnižších zrážok za súčasnej nízkej teploty.

Hrdza pšenicová

Na variabilitu hodnôt AUDPC vysoko významne vplýval rok hodnotenia, obdobie registrácie a významne pôvod odrody (tab. 1). Významne sa líšili hodnoty AUDPC roku 2006 od rokov 2007 a 2008 (tab. 2). Medzi hodnotami AUDPC rokov 2007 a 2008 neboli významné rozdiely. Vysoko významne na hodnoty AUDPC vplývala interakcia rok hodnotenia x obdobie registrácie. Odrody registrované po roku 2000 mali významne nižšie hodnoty AUDPC ako odrody registrované do roku 2000. Zahraničné odrody mali významne nižšie hodnoty AUDPC ako slovenské odrody. Možný vplyv priebehu počasia v mesiacoch apríl až jún na hodnoty AUDPC je evidentný aj pri tomto patogéne. Najvyššie hodnoty AUDPC boli zaznamenané práve v roku 2006 s najvyššou teplotou a najväčšou sumou zrážok.

Optimálna teplota pre vývoj sledovaných obligátnych patogénov sa pohybuje od 15 °C - 20 °C (McINTOSH et al., 1995). Pre vývoj patogéna múčnatky trávovej je nevyhnutná súvzťažnosť teploty a vzdušnej vlhkosti, ktoré sú zložkami deficitu vodných pár, parametru významného v dynamike vody v systéme hostiteľ – patogén (BÉLANGER et al., 2002). Keďže údaje o teplote sa podstatne nelíšili, rozhodujúcim faktorom v závažnosti

ochorenia bola suma zrážok v sledovaných mesiacoch, čo sa prejavilo zvýšenou vlhkosťou vzduchu v poraste. Pri múčnatke trávovej, zdá sa, že limitujúcim faktorom bola najnižšia priemerná teplota pri nízkej sume zrážok. Pri hrdzi pšenicovej bola limitujúcim faktorom najvyššia priemerná teplota v spojitosti s najvyšším úhrnom zrážok.

Tabuľka 1: Priemerné štvorce z analýzy rozptylu hodnôt AUDPC pre múčnatku trávovú a hrdzu pšenicovú

Zdroj premenlivosti	df	AUDPC múčnatky trávovej	AUDPC hrdze pšenicovej
Model	12	11607446,71**	113320,31**
Rok hodnotenia	2	4197939,22**	279448,90**
Pôvod odrody	1	44635,85	11980,28*
Obdobie registrácie	1	290956,07*	57470,27**
Rok hodnotenia x Pôvod odrody	2	8283,10	6730,97
Obdobie registrácie x Pôvod odrody	1	37944,74	3604,96
Rok hodnotenia x Obdobie registrácie	2	49168,93	46292,71**
Rok hodnotenia x Obdobie registrácie x Pôvod odrody	2	264564,75	1279,46
Chyba	352	75454,35	3100,58
Spolu	364		

** Vplyv preukazný na hladine $\alpha = 0,01$; * vplyv preukazný na hladine $\alpha = 0,05$

Tabuľka 2: Rozdiely v hodnotách AUDPC v pokusných rokoch

(I) Rok	(J) Rok	AUDPC múčnatky trávovej		AUDPC hrdze pšenicovej	
		Rozdiely (I-J)	Stredná chyba priemeru	Rozdiely (I-J)	Stredná chyba priemeru
2006	2007	188,95*	37,91	90,64*	7,66
	2008	-184,73*	36,72	98,28*	7,44
2007	2006	-188,95*	37,91	-90,64*	7,66
	2008	-373,68*	33,30	7,64	6,72
2008	2006	184,73*	36,72	-98,30*	7,44
	2007	373,68*	33,30	-7,64	6,72

* Vplyv preukazný na hladine $\alpha = 0,05$

Záver

Odolnosť registrovaných odrôd voči obom obligátnym patogénom stanovená podľa BABAJANCA (1988) varíovala v celej škále od vysoko odolných odrôd po veľmi vysoko náchylné. Nové odrody registrované po roku 2000 mali vyššiu úroveň odolnosti voči obom patogénom. Nové odrody pôvodom zo Slovenska oproti zahraničným odrodám vykazovali vyššiu odolnosť voči múčnatke trávovej. Naproti tomu odolnejšie voči hrdzi pšenicovej boli nové odrody zahraničného pôvodu. Na rozsah napadnutia pšenice letnej múčnatkou trávovou a hrdzou pšenicovou vplýval priebeh počasia. Narastajúca úroveň odolnosti voči sledovaným patogénom naznačuje na vyšší podiel odrôd s génmi odolnosti účinnými v dospelosti rastlín.

Literatúra

- BABAJANCA, I. 1988. Metody selekcie i ocenky ustojčivosti pšenici i jačmenja k boleznjam v stranach - členach, SEV. Praha, s. 321.
- BÉLANGER, R.R. – BUSHELL, W.R. – DIK, A.J. – CARVER, T.L.W. 2002. The powdery mildews. A comprehensive treatise. APS Press, ISBN 0-89054-291-0, p. 292.
- KOLMER, J.A. 1996. Genetics of resistance to wheat leaf rust. In: Annu Rev. Phytopathol, 34, p. 435-455.
- McINTOSH, R.A., WELLINGS, C.R., PARK, R.F. 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Australia, ISBN 0-7923-3430-2, p. 200.
- SATORRE, E. H., SLAFER, G. A. 2000. Wheat. Ecology and physiology of yield determination. Food Products Press. USA, p. 503.
- SHANER, G. – FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. In: Phytopathology, vol. 97, p. 1051-1056.

Táto práca bola podporovaná Ministerstvom pôdohospodárstva Slovenskej republiky projektom Výskumu a vývoja č. 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11 na základe Zmluvy č. APVT-27-028704.

GENOTYPOVÉ ROZDIELY CITLIVOSTI FOTOSYNTETICKÉHO APARÁTU NA PROSTREDIE

GENOTYPE DIFFERENCES OF SENSIBILITY OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS IN RELATION TO THE ENVIRONMENT

Marián BRESTIČ – Jana PIVKOVÁ – Marek ŽIVČÁK

One of important factors of drought tolerance is also the passive resistance against excessive water loss which is provided especially by function of leaf cuticle. Accordingly we assessed the cuticular transpiration by method of mass loss of detached flag leaves in 10 wheat genotypes of different origin grown in RIPP in Piešťany. After the measurements of mass loss in observed genotypes we observed relative big differences among genotypes in measured values of cuticular transpiration. Those genotypes by which we presuppose higher drought tolerance (varieties originated from more arid areas variety, of durum wheat) showed lower values of cuticular transpiration compared to genotypes bred for growing in milder agro-climatic conditions. It confirms importance of higher cuticular resistance in relation to drought tolerance.

Keywords: wheat genotypes, drought stres, cuticular transpiration

Úvod

Problém zvýšenej tolerancie genotypov obilnín na sucho je pomerne zložitý a je nevyhnutné ho hodnotiť na všetkých úrovniach, od rastovo-vývinových vzťahov celistvých rastlinných organizmov a porastov, až po molekulárnu úroveň. Významné sú aj vlastnosti listov, ako je ich povrch, prítomnosť kutikulárnych voskov, stáčanie listov a pod (9). Tieto vlastnosti zabezpečujú pasívny odpor voči nadmernej strate vody, ktorá má za následok poškodenie dôležitých funkcií listov. Jedným z metód hodnotenia je aj rýchla dehydratácia dekapitovaných listov, so sledovaním straty vody v listoch (1), čo sme využili pri hodnotení miery KT u sledovanej skupiny genotypov pšenice, ktoré sa líšia pôvodom (rôzne geoklimatické oblasti), morfológiou a taxonómiou (zaradenie k botanickému druhu- pšenica letná resp. tvrdá). Takto zvolené kritéria porovnania môžu byť námetom úvah o zaradení toho rýchleho a jednoducho merateľného znaku do šľachtiteľského procesu, ktorý by prispel k tvorbe ekostabilného genotypu v podmienkach klimatickej zmeny, s vyššou efektívnosťou využitia vody.

Materiál a metódy

Na realizáciu experimentu sme využili nasledovných 9 odrôd ozimnej pšenice (*Triticum aestivum* L.) a jeden genotyp pšenice tvrdej (*Triticum durum* Desf), z kolekcie genotypov pestovaných na pokusných parcelách VÚRV Piešťany, v sezóne 2007/2008: Biscay (Nemecko), GK Forrás (Maďarsko), Vendur (Slovensko, genotyp pšenice tvrdej), Astella (Slovensko), Verna a Mottin (Taliansko), Steklovidnaja (Kazachstan), Pehlivan (Turecko), Shaan, (Čína), Shark- 4 (Mexiko). Z pokusných políčov bol materiál odoberaný počas celej vegetácie, v týždenných intervaloch, po dobu 7 týždňov. Listy boli nasýtené vodou a minimálne 30 minút zatmené, pre vylúčenie priechodovej transpirácie. Z každého genotypu sme dekapitovali 10 listov, ktoré sme odvážili, presne zmerali listovú plochu a následne hodinu exponovali v klimatizovanom boxe, pri teplote 20 °C. Po uplynutí expozičnej doby sme listy znovu odvážili a na základe zmeny hmotnosti sme vypočítali rýchlosť KT ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Z 10 opakovaní bol vypočítaný aritmetický priemer a smerodajná odchýlka.

Výsledky a diskusia

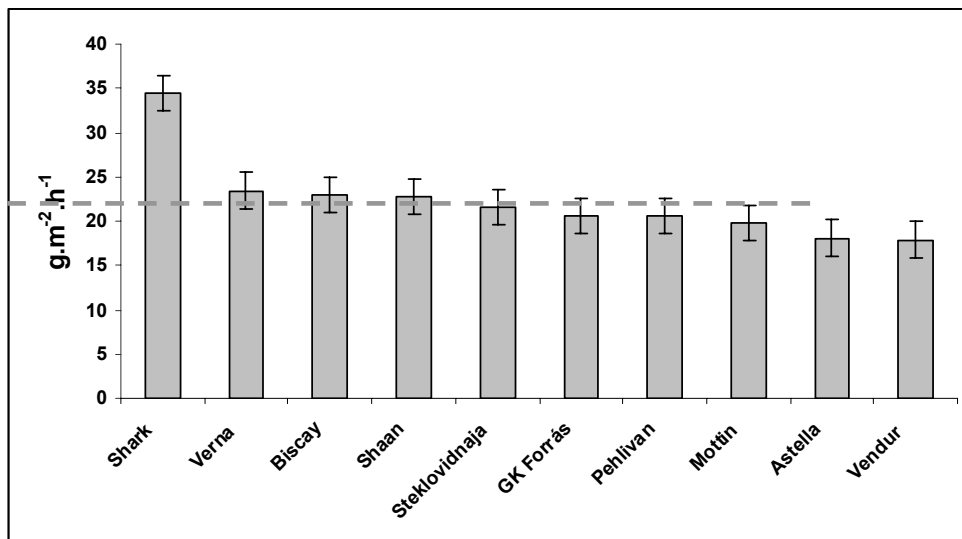
Kutikula predstavuje hlavnú bariéru proti úniku vody z listov. Rýchlosť KT je významným faktorom pasívnej rezistencie voči deficitu vody v prostredí a má svoje miesto aj v nových genetických, šľachtiteľských a molekulárno-biologických štúdiách a pokusoch o genetické modifikácie rastlín (6, 10).

Na základe výsledkov meraní straty vody listami sme medzi testovanými genotypmi pšenice pozorovali pomerne markantné rozdiely v stanovených hodnotách KT (tab. 1). Namerané hodnoty sa nachádzajú približne v intervale hodnôt, ktoré vo svojej práci uvádzajú Rawson a Clarke (8). Na obrázku 1 je znázornený prehľad dosiahnutých priemerných hodnôt KT u sledovaných 10 genotypov pšenice.

Tabuľka 1: Namerané hodnoty rýchlosti kutikulárnej transpirácie vlajkových listov 10 genotypov pšenice. Uvedené sú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky.

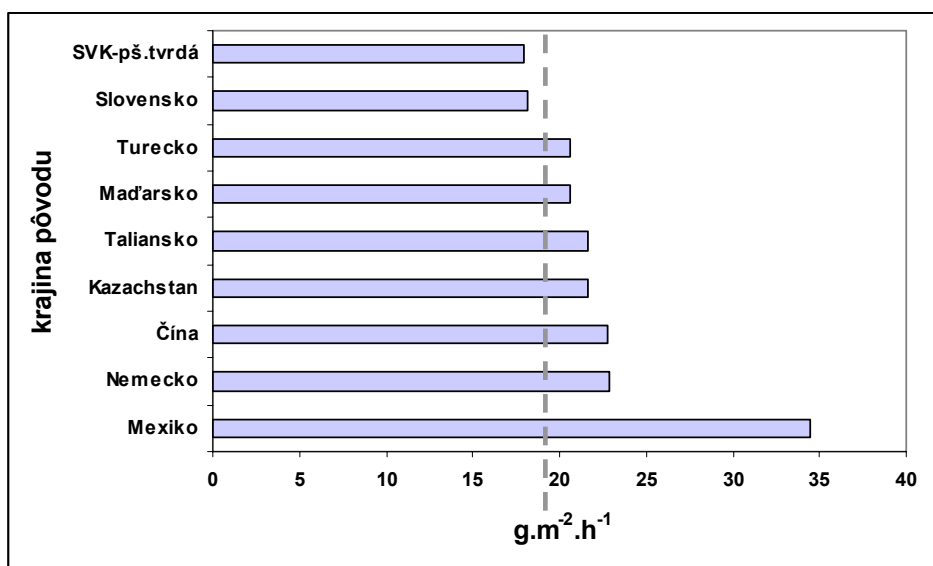
Genotyp	Krajina pôvodu	Kutikulárna transpirácia ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)
Astella	Slovensko	18,11 ± 2,85
Biscay	Nemecko	22,91 ± 2,67
GK Forrás	Maďarsko	20,65 ± 3,40
Mottin	Taliansko	19,77 ± 2,80
Pehlivan	Turecko	20,64 ± 2,61

Genotyp	Krajina pôvodu	Kutikulárna transpirácia ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)
Shaan	Čína	$22,72 \pm 3,43$
Shark	Mexiko	$34,46 \pm 3,47$
Steklovidnaja	Kazachstan	$21,65 \pm 3,40$
Vendur	Slovensko	$17,91 \pm 2,71$
Verna	Taliansko	$23,46 \pm 3,49$



Obrázok 1: Hodnoty kutikulárnej transpirácie vlajkových listov testovaných genotypov pšenice zoradené v zostupnom poradí. Chybové úsečky predstavujú smerodajné odchýlky. Priemerná hodnota KT za celý sledovaný súbor genotypov je zobrazená prerušovanou čiarou.

Podľa nameraných výsledkov môžeme genotypy rozdeliť do troch skupín: Najvyššiu hodnotu KT a teda najväčšiu stratu vody cez kutikulu sme zaznamenali u genotypu Shark, ktorá bola výrazne vyššia v porovnaní s priemernou hodnotou za celý súbor. Podstatne nižšiu, ale stále nadpriemernú úroveň sledovaného parametra, mala aj odroda Verna. Druhú skupinu tvoria genotypy Steklovidnaja, GK Forrás, Pehlivan, Mottin, Astella a Vendur, u ktorých sme namerali hodnoty KT preukazne nižšie ako priemer. Ostatné genotypy boli približne na úrovni priemeru, alebo sa od neho veľmi neodlišovali. Z toho môžeme usúdiť, že v testovanej skupine vysoko produktívnych genotypov pšenice existujú štatisticky významné rozdiely meranej KT, pričom maximálna priemerná hodnota predstavovala takmer dvojnásobok hodnoty minimálnej (Shark $34,4 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ a Vendur $17,9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$).



Obrázok 2: Hodnoty kutikulárnej transpirácie vlajkových listov testovaných genotypov pšenice zobrazené podľa krajiny pôvodu zoradené v zostupnom poradí. Priemerná hodnota KT za celý sledovaný súbor genotypov je zobrazená prerušovanou čiarou.

Z hľadiska analýzy takýchto výsledkov je zaujímavé pozorovať súvislosť miery KT konkrétneho genotypu od krajiny jeho pôvodu, čo je zobrazené na obr. 2. Najnižšia hodnota rýchlosti výparu vody cez kutikulu boli zaznamenaná u genotypu pšenice tvrdej. Pšenica tvrdá je bežnou plodinou predovšetkým teplejších oblastí (oblasť Stredomoria) a pre tento druh je charakteristická vyššia tolerancia voči deficitu vody a vysokej teplote (7). Výrazne nižšie hodnoty KT sme zistili tiež u tureckej odrody, čo poukazuje na jej vyššiu mieru prispôsobenia sa aridným podmienkam s nedostatkom zrážok.

Naopak najvyššiu hodnotu sledovaného parametra sme zistili u genotypu Shark, pôvodom z Mexika, ktorý výrazne prevyšoval genotypy pochádzajúce zo stredu Európy, vrátane slovenského genotypu Astella. Odroda Shark je mimoriadne skorá a ako hlavný nástroj v obrane voči suchu používa unik pred suchom. Vyrastie, naplní zrná a vegetáciu ukončí skôr, ako reálne nastanú nepriaznivé účinky stresu zo sucha. Takisto je možné, že táto odroda vytvára v domovských podmienkach účinnú kutikulu ako reakciu na mimoriadne nepriaznivé podmienky prostredia (pôsobenie nízkej vzdušnej vlhkosti, výsušných vetrov, permanentného vodného deficitu, vysokej úrovne slnečnej radiácie...). V našich miernych podmienkach na začiatku vegetačného obdobia, pri dobrej zásobenosti vodou, relatívne vysokej vlhkosti vzduchu, premenlivej intenzite žiarenia a vysokej zásobe dusíka v pôde (čo im pri permanentnom suchu v pôvodnom prostredí materskej krajiny nehrozí) sa mení anatomicko-morfologická stavba listov, ktorá sa tak stáva ešte menej priaznivou, ako majú domáce genotypy. Je preto možné, že tieto genotypy z extrémnych stanovišť sú v našich podmienkach ešte zraniteľnejšie, než naše domáce. Talianska a kazašská odroda boli približne na úrovni priemeru.

Záver

Na základe zistených výsledkov môžeme zhrnúť, že pri testovaných genotypoch, kde na základe ich pôvodu očakávame vyššiu mieru tolerancie na sucho (Turecko, Kazachstan Maďarsko, genotyp pšenice tvrdej), sme experimentom potvrdili nižšiu mieru kutikulárnej transpirácie, v porovnaní s genotypmi pochádzajúcimi z miernejších agroklimatických pomerov. Poukazuje to na pravdepodobný význam vyššej kutikulárnej rezistencie v súvisi s toleranciou na sucho, čo potvrdzujú aj viaceré štúdie, ktoré uvádzajú vzťah retencie vody v listoch (nižšej miery KT), s vyššou mierou efektívnosti využitia vody (3,5,8), aj keď tento znak sám osebe nie vždy koreluje s celkovou toleranciou genotypov na sucho (2,4) Zaujímavé bolo zistenie niekoľkonásobne vyššej miery kutikulárnej transpirácie u mexického genotypu Shark, čo vysvetľuje mimoriadna skorosť tohto genotypu a vyrovnanie sa so stresom zo sucha metódou úniku (stress escape) a tak isto aj vytvorením anatomicko-morfologickej adaptácie stavby listov tejto odrody ako reakcia na odlišné geoklimatické podmienky našej republiky.

Literatúra

- Brestič, M. – Olšovská, K. 2001. Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy, Nitra: SPU, 2001, 149 s. ISBN 80-7137-902-6.
- Clarke, J. 1982. Excised leaf water retention capacity as an indicator of drought resistance of Triticum genotypes. In: *Canadian Journal of Plant Science*, 1982, 62, 571- 576.
- Clark, J. M. – Richards, R.A. – Codon A. G. 1991. Effect of drought stress on residual transpiration and its relationship with water use of wheat. In *Canadian Journal of Plant Science*, 1991, 71, 695- 702.
- Czeus, L. – Paul, J.- kertes, Z. Et al. 2002. Wheat breeding for tolerance to drought stress at the Cereal Research Non-profit Company. In *Acta Biologica Szegedinesis*, 2002, 46, (3-4), 25-26
- Kerstiens, G. 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance. In *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47, 1813- 1832.
- Kerstiens, G.- Schreiber, L. – Lenzian, K. J. 2006. Quantification of cuticular permeability in genetically modified plants. In *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57 (11), 2547- 2552.
- Marque, V.- Fritz, A. K.- Nartin, T. J. – Paulsen, G. M. 2004. Agronomic and quality attributes of winter durum wheat in the Central Great Plains. In *Crop Science*, 2004, 44, 878- 883.
- Rawson, H. M.- Clarke, J. M. 1988. Nocturnal transpiration in wheat. In *Australian Journal of Plant Physiology*, 1988, 15 (3), 397- 406.
- Reynolds, M. P. Et al. 2001. Application of Physiology in Wheat Breeding. In *Application of Physiology in Wheat Breeding*, Mexico: CIMMYT, 2001, 2 - 16.
- Rieder, M.- Schreiber, L. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. In *Journal of Experimental Botany*, 2001, 2023- 2032.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená projektmi AV /1109/2004 a VEGA 1/0803/08

VARIABILITA MORFOLOGICKÝCH A BIOLOGICKÝCH ZNAKOV ODRÔD A DIVORASTÚCICH POPULÁCIÍ ĎATELINY LÚČNEJ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

VARIATION IN MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL TRAITS OF RED CLOVER VARIETIES AND WILD POPULATIONS (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

Jarmila DROBNÁ

In a field experiment established in 2007 at the experimental station of SARC - Research Institute of Plant Production morphological and biological traits were studied on wild populations and cultivated varieties of red clover. Considerable variation in evaluated traits was found among and within wild populations. Variance between cultivated varieties was caused mainly by their different ploidy. The most variable characteristics between wild populations were growth habit, shape of leaf rosette, leaf area, flowering and the highest variability within populations was recorded in plant weight and stem number. As showed correlation and cluster analyses, morphological variation was associated with altitude of collecting location. Populations from areas with lower elevation were characterised by loosely spreading spaced plants, small leaf rosette, by the highest and thickest stems, the largest leaves and by the high plant weight. The results of correlation analysis showed highly significant positive relationships between growth habits and stem length, stem thickness, leaf area and plant weight. The high variability between and within populations indicated that they present useful material in breeding of varieties for specific environments.

*Key words: red clover (*Trifolium pratense* L.), wild populations, variation, morphological and biological traits*

Pre šľachtenie krmovín je významný predovšetkým rozsah genetickej variability vnútri druhov a populácií a distribúcia genetickej diverzity medzi populáciami. Nakoľko genetická diverzita medzi šľachtenými odrodami je limitovaná v porovnaní s variabilitou divorastúcich druhov, ich gény môžu prispieť k tolerancii voči novým biotickým a abiotickým stresom a môžu reprezentovať jedinečné alely, ktoré absentujú v genofonde šľachtených odrôd (HOLLAND, 2004). Na vysoký rozsah genetickej variability odrôd a populácií ďateliny lúčnej a jej využitie poukazujú viacerí autori (GREENE et al, 2004, MOSJIDIS et al., 2004, PELIKÁN et al., 2006). Aj keď divorastúce populácie vykazujú horšiu agronomickú výkonnosť, ich vysokú trvácnosť a morfológiu odlišnú od pestovaných odrôd je možné využiť pri šľachtení odrôd adaptovanejších k nepriaznivým podmienkam prostredia (PROSPERI et al. 2006). STEINER, GARCIA (2001) uvádzajú, že niektoré morfológické znaky sú významné pre prirodzenú adaptáciu genotypov k špecifickému prostrediu.

Materiál a metóda

V pokuse založenom v roku 2007 na experimentálnej báze SCPV-VÚRV Piešťany bolo hodnotených 27 divorastúcich populácií ďateliny lúčnej, získaných na zberových expedíciách v rokoch 1995-2001 na Slovensku, v Čechách, Poľsku a Slovinsku. Pokus bol založený metódou znáhodnených blokov v štyroch opakovaniach, 10 rastlín v jednom opakovaní. Ako kontroly boli použité slovenské odrody Manuela, Viglana (2n), Margot a Sigord (4n). V roku 2008 bolo hodnotených 19 morfológických a biologických znakov. Pri hodnotení výsledkov boli použité výpočet koeficientu variability, korelačná analýza a zhluková analýza. Z celkového počtu hodnotených znakov bolo pre analýzy vybraných 12 kvantitatívnych a kvalitatívnych znakov.

Výsledky a diskusia

Získané výsledky (hodnoty variačných koeficientov pre jednotlivé populácie a odrody, výsledky korelačnej a zhlukovej analýzy) sú veľmi rozsiahle, a preto sú uvedené v skrátenej forme v tabuľkách a v texte.

Hodnotenie variability ukázalo, že ďatelina lúčna vykazuje vysoký stupeň variability, ktorá sa pri väčšine znakov najviac prejavila medzi, resp. vnútri populácií (tab.1).

Odrody sa vyznačovali polovzpriameným tvarom trsu s prevažne kvitnúcimi byľami, vyšším počtom hrubších a dlhších bylí, väčšou plochou listu a vyššou hmotnosťou rastliny. Medzi odrodami bol zistený nízky až stredný stupeň variability, avšak variabilita vnútri odrôd bola vysoká zvlášť pri znakov hmotnosť rastliny, počet bylí, počet bočných vetví a percento kvitnutia, čo poukazuje na ich nižšiu vyrovnanosť ako sa očakávalo. Menšie diferencie medzi odrodami boli výsledkom rozdielnej ploidity kontrolných odrôd. Nevýznamné rozdiely medzi odrodami prezentujú aj výsledky zhlukovej analýzy (tab. 2), kde odrody tvorili jeden zhluk.

Ako sa predpokladalo, vnútri i medzi populáciami bola pri väčšine znakov zistená vysoká variabilita, ktorá by mohla byť výsledkom rozdielnych environmentálnych a geografických podmienok lokalít zberu. Potvrdzujú to i výsledky korelačnej analýzy (tab. 3), kde bol zistený významný negatívny vzťah medzi nadmorskou výškou lokality zberu a znakmi tvar trsu, tvar listovej ružice, hmotnosť rastliny, počet bylí, dĺžka a hrúbka byle a plocha listu. Populácie pochádzajúce z nižšie položených lokalít (zhluk 3) mali rozložitý tvar trsu, malú alebo veľmi malú listovú ružicu, byle s najvyššou dĺžkou a hrúbkou, najväčšie listy a najvyššiu hmotnosť rastliny. Opačná tendencia bola zistená pri populáciách z lokalít zberu s vyššou nadmorskou výškou (zhluky 2,6).

Pri hodnotení prejavu jednotlivých znakov a ich vzájomných vzťahov nás najviac zaujímal vzťah medzi tvarom trsu a ostatnými znakmi. Z výsledkov vyplýva, že genotypy s polovzpriameným, resp. rozložitým tvarom trsu mali dlhšie a hrubšie byle, vyšší počet bočných vetví, väčšiu plochu listu a vyššiu hmotnosť rastliny. Aj

v tomto pokuse sa dokázal významný pozitívny vzťah medzi hmotnosťou rastliny a počtom bylí a ich morfológiou, ako aj medzi hmotnosťou rastliny a plochou listu.

Záver

Hodnotením divorastúcich populácií a odrôd ďateliny lúčnej sa potvrdila vysoká variabilita vybraných morfológických a biologických znakov medzi populáciami. Fenotyp hodnotených populácií bol v značnej miere ovplyvnený geografickými podmienkami lokalít zberu. Zistené diferencie medzi populáciami, ako aj vysoká variabilita individuálnych rastlín naznačujú možnosť využitia divorastúcich populácií pri šľachtení odrôd adaptovaných k rôznym podmienkam prostredia.

Literatúra

- GREENE S.L., GRITSENKO M.,VANDEMARK G.: Relation morphologic and RAPD marker variation to collecting site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Gen. Res. and Crop Evol.*, 51, 2004:643-653.
- HOLLAND, J.B.: Breeding: Incorporation of exotic germplasm. In: *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, Marcel Dekker, New York 2004, s.222-224.
- MOSJIDIS, J. A. et al.: Isoenzym Diversity in Wild Red Clover Populations from the Caucasus. *Crop Sci.*, 44, 2004:665-670.
- PELIKÁN, J. et al.: Studium vnútroodrodovej variability v sortimente jetele lučného (*Trifolium pratense* L.). Zborník referátov z konferencie s medzinár. účasťou, 23.-24. november 2006, Brno/ Ed. B. Badalíková, s.235-241. ISBN 80-86908-03-8.
- PROSPERI, J.M. et al.: Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Gen. Res. and Crop Evol.*, 2006, 53: 843-856.
- STEINER, J.J., GARCIA de los SANTOS, G.: Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: I. Plant morphology and RAPD markers characterizations. *Crop Sci.*, 2001, 41: 552-563.

Tabuľka 1: Variabilita vnútri a medzi populáciami a odrodami ďateliny lúčnej

	Odrody				Populácie			
	Min	Max	CV%*	CV%**	Min	Max	CV%*	CV%**
Trs - tvar	7	7	0	17,6	1	5	51,9	36,4
Trs - morfobiotype (MB)	3	4	16,5	0	1	6	56,0	5,5
Listová ružica (LR) - tvar	5	7	15,4	19,4	1	5	66,1	47,7
Rastlina - hmotnosť (HR)	162,5	185,0	9,9	58,4	60,5	90,7	22,1	64,9
Rastlina - počet bylí (PB)	22,7	27,7	3,9	48,9	18,9	23,9	3,0	58,3
Byľ - dĺžka	483,0	582,5	7,8	12,8	272,5	517,0	18,3	16,1
Byľ - hrúbka	4,5	5,5	9,7	12,8	2,5	4,4	14,6	16,4
Byľ - počet internódií	5,5	5,8	2,7	11,1	4,3	6,0	7,2	16,4
Byľ - počet bočných vetví (BV)	1,8	2,5	17,2	49,1	1,8	3,6	16,1	39,0
List - plocha	15,0	22,1	17,2	31,4	4,4	14,8	29,6	31,3
Percento kvitnutia	32,5	40,0	10,5	16,3	0	100,0	48,1	16,3
Percento prežitých rastlín (PR)	77,5	92,5	8,8	52,5	52,5	97,5	16,1	30,0

CV%* - priemerné hodnoty variačných koeficientov medzi populáciami a odrodami, CV%** - priemerné hodnoty variačných koeficientov vnútri populácií a odrôd

Tabuľka 2: Zhuková analýza - priemerné hodnoty znakov v jednotlivých zhukoch s uvedením počtu odrôd/populácií

Znak	Zhuky					
	1 (4)	2 (4)	3 (6)	4 (10)	5 (4)	6 (3)
Trs - tvar	7	3	5	1-3 (5)	1-3	1
Trs - morfobiotype (MB)	3-4	1-2	2-3	1-2	3-5	6
Listová ružica (LR) - tvar	5-7	1-3	3-5	1-3	1	1
Rastlina - hmotnosť (HR)	171,5	72,8	123,1	84,3	89,3	73,3
Rastlina - počet bylí (PB)	27,7	20,1	25,3	22,9	26,1	26,4
Byľ - dĺžka	535,1	378,4	494,3	367,4	381,6	292,2
Byľ - hrúbka	5,0	3,1	4,0	3,2	3,1	2,6
Byľ - počet internódií	5,7	5,0	5,4	4,9	5,2	5,6
Byľ - počet bočných vetví (BV)	2,0	2,4	2,6	2,3	2,8	3,1
List - plocha	19,4	10,5	13,6	9,2	8,4	4,7
Percento kvitnutia	35,6	91,9	62,9	93,8	50,0	0,8
Percento prežitých rastlín (PR)	81,9	59,4	69,6	83,8	85,6	88,3
N.m.v.	326,3	709,5	383,0	566,7	562,0	694,0

Tabuľka 3: Korelačná matica medzi hodnotenými znakmi

Znak	Trs tvar	Trs MB	LR tvar	HR	PB	Byľ dĺžka	Byľ hrúbka	Byľ poč.int.	Byľ poč.BV	List plocha	% PR	% kvit.
Trs MB	-0,178											
LR tvar	0,877	-0,022										
HR	0,855	0,116	0,877									
PB	0,241	0,407	0,382	0,588								
Byľ-dĺžka	0,799	-0,160	0,789	0,851	0,386							
Byľ-hrúbka	0,882	0,001	0,805	0,906	0,258	0,840						
Byľ-počint	0,337	0,535	0,501	0,613	0,548	0,442	0,506					
Byľ-počBV	-0,475	0,364	-0,444	-0,375	0,108	-0,310	-0,404	0,173				
List-plocha	0,907	-0,133	0,851	0,882	0,218	0,827	0,943	0,378	-0,558			
% PR	-0,206	0,288	-0,190	-0,040	0,346	-0,231	-0,174	-0,067	0,199	-0,268		
% kvit	0,002	-0,866	-0,152	-0,304	-0,539	-0,037	-0,195	-0,619	-0,289	-0,032	-0,172	
N.m.v.	-0,494	0,105	-0,585	-0,545	-0,317	-0,614	-0,500	-0,192	0,214	-0,527	0,106	0,116

Hrubo vyznačené hodnoty - štatisticky významný korelačný koeficient pri $P < 0,05$, resp. $P < 0,01$

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVT-27-028704

MECHANICKÉ VLASTNOSTI JABLÍK MECHANICAL PROPERTIES OF APPLES

Juraj DUNCA

In this work are introduced measured mechanical properties of apples: mass, volumen, especially force necessary at destruktion of apples and density of apples

Key words: Apple, mass, force necessary at destruktion of apples

Úvod

Medzi významné mechanické vlastnosti jablák patria: sila potrebná na deštrukciu (poškodenie) jablák, hmotnosť, objem a hustota jablák. Meraním pevnostných vlastností jablák sa zaoberali práce (ABBOT et al., 1995; DUNCA, ŠVEC, 2005; DUNCA 2006; MOHSENIN 1970). Štúdium mechanických vlastností jablák má význam najmä pri zbere, doprave a pri uskladnení z hľadiska možného poškodenia (HRIČOVSKÝ et al., 1990). Štúdium mechanických vlastností ovocia (u nás najmä jablák) má dôležitý význam aj z hľadiska racionálnej výživy obyvateľstva (HRIČOVSKÝ et al., 1990; HRIČOVSKÝ et al., 2003).

Materiál a metódy

Meranie mechanických vlastností jablák sa uskutočnilo v laboratórnych podmienkach. Pevnostné vlastnosti sú charakterizované silou potrebnou na deštrukciu (poškodenie) šupky jablka. Zisťovali sme ju jednoduchým prístrojom, ktorý sme zhotovili na tento účel (DUNCA, ŠVEC, 2005). Biologický materiál, t. j. vzorky jablák sme získali z Katedry ovocinárstva FZKI v Nitre. Objem jablák sme určili pomocou odmerného valca. Hustotu jablák sme vypočítali ako podiel hmotnosti jablka a jeho objemu. Namerané údaje sme vyhodnotili aj metódami matematickej štatistiky.

Výsledky a diskusia

Na ilustráciu uvádzame výsledky meraní jablák odrody Ontario (tab. 1). V tabuľke sú uvedené namerané hmotnosti a sila potrebná na deštrukciu (poškodenie) jablka odrody Ontario, objemy a vypočítané hustoty jablák. Znakom $F_1 - F_4$ sú označené sily potrebné na deštrukciu jablka. Znakom $F(N)$ je označená priemerná sila na deštrukciu jablka. Vypočítaná smerodajná odchýlka sily $s_F = 6,71$ N a vypočítaný variačný koeficient $v_F = 7,03$ %. Vypočítaná smerodajná odchýlka hmotnosti $s_m = 36,0$ g a vypočítaný variačný koeficient $v_m = 31,12$ %. Vypočítaná smerodajná odchýlka objemu $s_v = 45,09$ cm³ a vypočítaný variačný koeficient $v_v = 33,75$ %. Vypočítaná smerodajná odchýlka hustoty jablka $s_p = 37,22$ g.cm⁻³ a vypočítaný variačný koeficient hustoty jablka $v_p = 4,27$ %. Tesnosť väzby medzi hmotnosťami jablák a silami potrebnými na deštrukciu (poškodenie) sme vyjadrili korelačným koeficientom. Vypočítaný korelačný koeficient medzi hmotnosťami jablák a silami potrebnými na poškodenie jablák je $r = 0,04$. Vypočítaný korelačný koeficient medzi objemami a silami jablák je $r = 0,004$. Malé číselné hodnoty korelačných koeficientov svedčia o zložitejšej závislosti medzi mechanickými vlastnosťami.

Záver

V práci sú uvedené namerané hmotnosti jablák a vypočítané sily potrebné na deštrukciu jablák odrody Ontario. Ďalej sú vypočítané smerodajné odchýlky, variačné koeficienty a korelačné koeficienty. Dosiagnuté výsledky sa využijú vo vyučovaní a v ďalšom výskume mechanických vlastností jablák.

Literatúra

- ABBOTT, J. A. – MASSIE, D. R. – UPCHURCH, B. L. – HRUSCHKA, W. R.: Nondestruktive sonic firmness measurement of apples. In: Transaction of the ASAE, vol. 38, 1995, N. 5. s. 146 – 163.
- DUNCA, J. – ŠVEC, O.: Pevnostné vlastnosti jablák. In: Poľnohospodárstvo, roč. 51, 2005, č. 7. s. 382 – 387, ISBN 0551-3677.
- DUNCA, J.: Mechanické vlastnosti jablák. In: Naše pole, sady a vinice 3/2006, Nitra.
- HRIČOVSKÝ, I. a kol.: 1990. Praktické ovocinárstvo. Bratislava, Príroda, 1990, 736 s.
- HRIČOVSKÝ, I. a kol. 2003. Pomológia. Jablone, hrušky, čerešne, višne, škrupinové ovocie, Bratislava, Nezávislosť, 2003, 264 s.
- MOHSENIN, N. N.: Physical properties of plant and animal materials. Gordon and Breach science Publisher, New York, 1970, 734 p.

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

Tabuľka 1: Hmotnosť a sila potrebná na poškodenie (deštrukciu) jablka odrody (ONTARIO)

n	m (g)	V₁ (cm³)	V₂ (cm³)	V ρ(g.cm⁻³)	F₁ (N)	F₂ (N)	F₃ (N)	F₄ (N)	F (N)
1.	116,5	1800	1936	0,8566	100	100	70	90	90,0
2.	157,7	1800	1980	0,8761	90	105	105	90	97,5
3.	207,8	1500	1750	0,8312	90	90	100	90	92,5
4.	176,8	1500	1720	0,8036	100	90	90	90	92,5
5.	179,8	1500	1710	0,8562	90	100	100	100	97,5
6.	83,0	1840	1940	0,830	95	90	100	100	96,2
7.	124,9	1840	1985	0,8614	100	98	90	88	94,0
8.	110,0	1840	1970	0,8461	110	90	110	88	99,5
9.	84,8	1840	1938	0,8653	98	88	86	70	85,5
10.	103,3	1840	1958	0,8754	100	115	110	120	111,2
11.	96,7	1840	1950	0,8791	90	90	90	110	95,0
12.	107,5	1840	1960	0,8958	90	95	105	110	100,0
13.	77,1	1860	1940	0,9637	90	100	88	80	89,5
14.	98,6	1860	1970	0,8964	95	88	100	90	93,2
15.	94,9	1860	1975	0,8252	80	80	80	80	80,0
16.	130,6	1860	2005	0,9007	100	100	90	100	97,5
17.	85,6	1860	1960	0,856	90	88	100	86	91,0
18.	99,0	1860	1966	0,9340	102	120	120	100	110,5
19.	97,3	1860	1970	0,8845	110	90	110	90	100,0
20.	81,8	1860	1950	0,9089	105	90	100	90	96,2
Σ	2313,7			17,4456					1909,3
\bar{x}	115,68			0,8723					95,46

ŠLECHTĚNÍ LÉČIVÝCH A AROMATICKÝCH ROSTLIN V ČESKÉ REPUBLICĚ BREEDING OF MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS IN THE CZECH REPUBLIC

Karel DUŠEK – Elena DUŠKOVÁ – Kateřina KARLOVÁ

The using of medicinal and aromatic plants is very popular in the Czech Republic and, though the collecting of plant drugs in nature is very often there, some species are cultivated in the field and also the special cultivars instead of wild species are produced. First cultivars of the most often used plants were registered in 1941 and a lot of them stay in the National list of varieties listed in the State Variety Book up to the present day. There is 33 varieties presented in the Czech National list of plant varieties and it represent 29 botanical species – it means the most of species has only one recommended cultivar. The majority of listed cultivars (23) were registered before more than 20 years and it have a character of landraces or just a primitive selected material from natural populations. Thought this situation it is surprising that a lot of varieties were restricted in last few years without any compensation by new cultivars and for some species, which were named in the list, there is no cultivar registered anymore. The origin of listed varieties is quite uniform – only one variety comes from abroad and all the rest is Czech bred. The other point influencing the situation in registration of new varieties is the new legislative frame, which currently does not provide any registration of medicinal and aromatic plants.

Key words: State Variety Book, registration, medicinal plants, aromatic plants, culinary plants

Úvod

Cílem této práce je podat stručný přehled o stavu současného šlechtění léčivých, aromatických a kořeninových rostlin (LAKR) v České republice a nastínit prognózu jeho vývoje. Jedná se o příspěvek shrnující informace od jediné české firmy, která se v současné době šlechtěním této komodity zabývá, Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ), který má na starosti zkoušení nových odrůd pro registraci i právní ochranu a kvalifikovaného odhadu autorů.

Materiál a metody

S ohledem na informativní charakter příspěvku byla použita pouze metoda kompilace informací z níže uvedených pramenů.

Výsledky a diskuze

Podat stručný, ale přesto ucelený přehled o stavu současného šlechtění hospodářských plodin v České republice lze nejlépe na základě informací o registraci odrůd, kterou provádí ÚKZÚZ. V případě LAKR je však situace komplikovanější, protože v posledních několika letech zaznamenala legislativa této komodity v ČR výrazné změny.

Prvním významným počinem v této oblasti byl zákon č. 92/1996 Sb. ze dne 15. března 1996 (Zákon o odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin), který do seznamu druhů, které podléhají povinné registraci při uvádění do oběhu, zařadil ze skupiny LAKR pouze několik položek. Z tradičních léčivých rostlin se jednalo pouze o heřmánek pravý a mátu pepřnou; plodiny jako konopí, kmín, hořčice a mák jsou trvale zařazeny v kategorii olejnin a přadných rostlin. Zákon ale současně umožňoval v případě vyšlechtění odrůdy u ostatních druhů léčivých a kořeninových rostlin podat žádost o její registraci. Odrůda pak byla zkoušena stejným způsobem jako u druhů v druhovém seznamu uvedených, a pokud požadavkům vyhověla, byla registrována na základě tzv. "dobrovolné registrace".

Tento zákon byl nahrazen zákonem č. 219/2003 Sb. ze dne 25. června 2003 (Zákon o oběhu osiva a sadby), který se již přiblížil legislativě ES (Evropské společenství) a v druhovém seznamu již žádné typické léčivé a kořeninové rostliny neuváděl – druhy jako pískavice řecké seno, hořčice bílá i černá, konopí seté, kmín, mák a fenykl však byly uvedeny jako jeteloviny a luskoviny, olejnin a přadné rostliny a zeleninové druhy. I tento zákon však zachoval možnost "dobrovolné registrace" dalších druhů, ačkoli kvůli nestanovení žádné kategorie osiva se jednalo o registraci pouze formální.

Dne 5. května 2006 se však situace zásadně změnila, protože vstoupil v platnost zákon č. 178/2006 Sb. (Zákon o oběhu osiva a sadby) a touto novelizací možnost registrovat v České republice odrůdy léčivých a aromatických rostlin zanikla. V případě vyšlechtění nové odrůdy je možné požádat pouze o udělení ochranných práv k odrůdě, a to dle podmínek ES ve dvou úrovních: A) národní odrůdová práva – v ČR dle zákona č. 408/2000 Sb. (Zákon o ochraně práv k odrůdám, ve znění pozdějších předpisů), který uplatňuje práva na území jednoho nebo více členských států ES; a B) odrůdová práva Společenství – dle nařízení Rady (ES) 2100/94, o odrůdových právech Společenství, v platném znění, která jsou uplatňována na území všech členských států.

Tento významný legislativní posun se na změnách v odrůdové skladbě LAKR v ČR výrazně projevil. Zatímco v Seznamu odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize z 1. července 2006 bylo uvedeno 58 odrůd těchto rostlin ze 42 druhů, tak v téměř Seznamu z 1. října 2007 uváděla kapitola č. 6 Léčivé a aromatické rostliny pouze 33 odrůd ze 30 druhů. Tento výrazný pokles byl způsoben tím, že v roce 2007 platnost registrace 52 odrůd LAKR skončila a o prodloužení této registrace, o které bylo dle tehdejší legislativy možné žádat do 31. prosince

2005, požádali největší udržovatelé odrůd (SEVA-FLORA, s.r.o. a AGROGEN, s.r.o.) pouze u 28 odrůd z 27 druhů LAKR. Od roku 2005 tedy postupně probíhají pokusy pro ověření uniformity a stálosti těchto odrůd a jejich hodnocení je v tomto roce dokončováno. Odrůdám, které splňují nutné požadavky, je registrace prodloužena na dalších 10 let (Holubář, 2008a). Již teď je ale známo, že např. jediná dosud registrovaná odrůda šalvěje lékařské 'Krajová' již nadále neodpovídá původním deklarovaným vlastnostem a bude tedy ze Seznamu odrůd vyřazena (HOLUBÁŘ, 2008b).

Souběžně se zkoušením na prodloužení registrace byly v r. 2006 založeny poslední dva pokusy na registraci jednoletých druhů LAKR (bazalka pravá a kopr vonný) (HOLUBÁŘ, 2008a). Odrůda kopru všem požadavkům vyhověla a v letošním roce byla registrována pod jménem 'Oliver' (Seznam odrůd ..., 2008). U přihlášené odrůdy bazalky nebyly splněny požadavky na uniformitu odrůdy a zkoušky byly proto přerušeny (HOLUBÁŘ, 2008b).

Po poslední změně legislativy, která způsobila, že registrace odrůd LAKR v ČR prostě již není možná a nelze ani dále prodloužovat již uznané registrace, volí někteří šlechtitelé a udržovatelé cestu právní ochrany odrůd. Souhrnný seznam odrůd s právní ochranou vyšel formou Věstníku ÚKZÚZ a je volně přístupný na jejich webových stránkách. Ze skupiny léčivých a aromatických rostlin je v seznamu uveden ostropestřec mariánský 'Silyb' a třezalka tečkovaná 'Uperikon' a 'Gold' (Seznam chráněných odrůd ..., 2008). Další odrůda ostropestřce, kterou pro firmu Moravol, spol. s r.o. na zakázku vyšlechtila SEVA-FLORA, s.r.o., má za sebou 1. rok zkoušek a pokud i ve 2. roce splní požadavky na udělení právní ochrany, stane se majetkem firmy Moravol, spol. s r.o. V situaci, kdy šlechtění LAKR není podporováno státem ani legislativou je tento způsob práce – šlechtění formou placené služby – jediným možným řešením (GRBAVČIC, 2008).

Na českém trhu se vyskytuje celá řada komerčně úspěšných, převážně zahraničních, forem LAKR, které však nemají charakter odrůdy. Příkladem mohou být například formy bazalky pravé, např. z nabídky firmy Semo, s.r.o.

Současný systém způsobuje, že šlechtění LAKR je v ČR problematické. Šlechtěním LAKR se dnes v ČR zabývá pouze firma SEVA-FLORA, s.r.o., ale i ta musí u této komodity díky dotační politice šlechtitelských programů hledat jiné, komplikovanější cesty – formu zakázek nebo žádání o grantové projekty (Grbavčic, 2008). Šlechtění tradičních léčivých a kořeninových rostlin na vyšší obsah účinných látek není efektivní, protože trh tyto vlastnosti bohužel nevyžaduje. Údaje o obsahu těchto látek tedy ani nikdo nezjišťuje. Šlechtění nových populárních druhů (třapatka, parcha saflorová atd.), kterému se SEVA-FLORA, s.r.o. věnuje (GRBAVČIC, 2006), probíhá hlavně metodou výběrů ze sběrů, což sebou často přináší nedostatečnou uniformitu vybraného materiálu (HOLUBÁŘ, 2008b).

Závěr

Závěrem lze pouze smutně konstatovat, že ačkoli šlechtění léčivých, aromatických a kořeninových rostlin, v dřívějším Československu tradiční a vysoce kvalitní, přináší obrovské možnosti na jejich využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, stává se dnes v ČR toto odvětví paradoxně vlivem nezájmu trhu, legislativních změn a nepříznivé dotační politiky šlechtění drahým přepychem nebo naopak přísloušnou „popelkou“ svého oboru.

Literatura

- HOLUBÁŘ, J. 2008a. Změny v odrůdové skladbě léčivých a aromatických rostlin. Zahradnictví, 4/2008, s. 40-41. ISBN 1213-7596.
- HOLUBÁŘ, J. 2008b. Současný vývoj registrace odrůd léčivých a aromatických rostlin. [cit. 13.10.2008] Ústní sdělení.
- GRBAVČIC, M. 2006. Breeding results of Medicinal, Aromatic and Spicy Plants, pp. 24-25. In: Composite authors, Aktuální otázky pěstování, zpracování a využití léčivých, aromatických a kořeninových rostlin. ČZU, Praha, Czech Republic.
- GRBAVČIC, M. 2008. Stav šlechtění LAKR v SEVA-FLORA, s.r.o. po vstupu do EU. [cit. 10.10.2008] Ústní sdělení.
- Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize k 15.6.2008. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2008. [online] Dostupné na: <http://www.ukzuz.cz/Articles/4178-2-Seznam+odrud+zapsanych+ve+Statni+odrudove+knize+.aspx> [cit. 13.10.2008]
- Seznam chráněných odrůd ke dni 1. října 2008. Věstník ÚKZÚZ, Ročník VII, řada Národní odrůdový úřad, číslo R, 2008, ÚKZÚZ, Brno. 22 s.
- Zákon č. 92/1996 Sb. o odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin. Sbírka zákonů ČR. Účinný od: 01.07.1996, Zrušen dnem: 30.08.2003
- Zákon č. 219/2003 Sb. o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby). Sbírka zákonů ČR. Účinný od: 30.08.2003, Zrušen dnem: 5.5.2006
- Zákon č. 178/2006 Sb., kterým se mění zákon č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby), ve znění zákona č. 444/2005 Sb., a některé další zákony. Sbírka zákonů ČR. Účinnost předpisu od 5.5.2006, Zrušen dnem: dosud platí

Poděkování: Příspěvek vznikl za podpory Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity (E – 79/01 – 3160 – 0200).

TVORBA VYSOKO REGENERABILNÝCH GENOTYPOV JAČMEŇA SIATEHO REKURENTNOU SELEKCIOU LÍNIÍ ODVODENÝCH Z JEDNÉHO SEMENA DEVELOPMENT OF HIGHLY EMBRYOGENIC GENOTYPES OF BARLEY THROUGH RECURRENT SELECTION OF SINGLE SEED DERIVED LINES

Juraj FARAGÓ – Natália FARAGOVÁ

*In the present work, we analyzed the embryogenic capacity of 15 single seed derived (SSD) lines obtained through recurrent selection from 4 cultivars and 1 breeding line of barley (*Hordeum vulgare* L.). In general, the callus induction rate was not improved by the use of SSD lines, however, frequency of embryogenic lines and average number of regenerants per embryogenic callus proved to be significantly higher in most of the SSD lines, comparing to standard populations.*

Key words: barley, embryogenic callus, regeneration ability, genotype

Úvod

Hoci sú vypracované relatívne účinné protokoly pre genetickú transformáciu jačmeňa či už mikrobalistickou technikou (WAN a LEMAUX, 1994; OBERT et al., 2008) alebo prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* (TINGAY et al., 1997; HENSEL et al., 2008), v rámci druhu stále iba niekoľko málo odrôd je možné transformovať s akceptovateľnou frekvenciou. Najpoužívanejším genotypom na genetickú transformáciu jačmeňa stále ostáva modelová odroda 'Golden Promise' (WAN a LEMAUX, 1994; HOLME et al., 2006 a iní) s vysokou regeneračnou schopnosťou v *in vitro* kultúre. Menej často boli použité iné, z hľadiska praktickej aplikovateľnosti biotechnologickej metódy vhodnejšie lokálne adaptované odrody a to práve z dôvodu nízkej a variabilnej *in vitro* regeneračnej schopnosti. Zvýšenie aplikovateľnosti metódy genetickej transformácie pri jačmeni a rozšírenie na viac šľachtiteľsky významnejších odrôd sa dá dosiahnuť dvoma prístupmi. Prvý je vyhľadávanie a testovanie rôznych odrôd jačmeňa na *in vitro* regeneračnú schopnosť (RIKIISHI et al., 2003; ŠERHANTOVÁ et al., 2004 a iní) a druhý, genetický prístup, je zvýšenie *in vitro* regeneračnej schopnosti genotypov v rámci odrôd zámernou akumuláciou alieli, zúčastňujúcich sa na *in vitro* regeneračnej schopnosti, v jednom alebo málo elitných genotypoch (KOMATSUDA et al., 1995; MANO et al., 1996). Práce autorov KOMATSUDA et al. (1995) a MANO et al. (1996, 2002) odhalili najmenej 3 gény ako aj QTL determinujúce *in vitro* regeneračnú schopnosť kalusov jačmeňa z nezrelých embryí.

Cieľom našej práce bolo využiť poznatky o dedičnej determinácii *in vitro* regeneračnej schopnosti pri jačmeni a v rámci vybraných odrôd, u ktorých bola predtým testovaná embryogénna kapacita, použitím metódy selekcie embryogénnych genotypov odvodených z individuálnych semien zvýšiť *in vitro* regeneračnú schopnosť.

Materiál a metódy

Pri vybraných líniiach jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) s vysokou *in vitro* regeneračnou schopnosťou bola otestovaná embryogénna kapacita potomstiev individuálnych rastlín získaných z jedného semena (SSD línii). SSD línie boli pripravené pri štyroch odrodách ('Golden Promise', 'Orbit', 'Akcent', 'Sladko') a jednej šľachtiteľskej línii ('SK5066') jačmeňa. Regeneračná schopnosť potomstiev SSD línii v *in vitro* kultúre bola otestovaná postupom adaptovaným na podmienky VÚRV Piešťany z protokolu W. Harwood (John Innes Centre, Norwich, Anglicko) (HARWOOD et al., 1995). Donorové rastliny boli pestované v poľných podmienkach. Zdroje explantátov, nezrelé embryá boli izolované z donorových rastlín \approx 12-14 dní po antéze a po povrchovej sterilizácii v 0,1 % roztoku $HgCl_2$ boli z nich izolované nezrelé štítky. Tieto boli v aseptických podmienkach ukladané na modifikované živné médium BCI1 (s prídavkom $CuSO_4$) na indukciu tvorby kalusu. Dvadsaťosem-dňové kalusy boli následne subkultivované na modifikované živné médium FWG s prídavkom $0,1\text{ mg.l}^{-1}$ BAP. Regeneračná schopnosť kultúr bola vyhodnotená po 21-28 dňoch na regeneračnom živnom médiu (postup BCI1-FWG).

Výsledky a diskusia

SSD línie vybraných odrôd a šľachtiteľských línii jačmeňa siateho boli pripravené v r. 2004 a 2005 skríningom embryogénnej schopnosti individuálnych zrn jačmeňa a dopestovaním embryových osí patriacich k regenerujúcim štítkom do štádia dospeljej rastliny. Výsledky experimentov sú uvedené v tab. 1. Zo získaných výsledkov vyplýva, že väčšina SSD línii získaných z testovaných odrôd, okrem odrody Akcent, mala vylepšené parametre regeneračnej schopnosti v *in vitro* kultúre nezrelých embryí. Významné rozdiely medzi SSD líniami a kontrolnými populáciami jačmeňa neboli zaznamenané len v schopnosti tvoriť kalus z nezrelých štítkov. Naopak, 12 SSD línii z 15 testovaných v r. 2006 a 12 z 13 testovaných v r. 2007 vykazovalo oproti kontrolným populáciám vyšší výskyt embryogénnych kalusových línii. K zvýšeniu priemerného počtu regenerantov na embryogénny kalus došlo v r. 2006 pri 9 SSD líniiach a v r. 2007 pri 12 líniiach. K najvýraznejšiemu zvýšeniu *in vitro* regeneračnej schopnosti došlo pri SSD líniiach GP/9, O/2, O/3, S/5 a SK/2. Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že selekcia embryogénnych genotypov pri jačmeni siatom môže prispieť k zvýšeniu embryogénnej

schopnosti línií odvodených z individuálnych semien, hoci toto zvýšenie je rádovo nižšie než napr. pri rekurentnej selekcii embryogénnych genotypov pri lucerne siatej (FARAGÓ et al. 1997). Dosiagnuté výsledky potvrdzujú tiež, že schopnosť kalogenézy a schopnosť regenerácie z kalusov sú pri jačmeni na jednej strane determinované inými genetickými mechanizmami, na strane druhej kalogenéza je kódovaná pravdepodobne väčším počtom génov s nižším účinkom, kým samotná *in vitro* regenerácia somatických embryí menším počtom génov vyššieho účinku (KOMATSUDA et al., 1995; MANO et al., 1996).

Záver

V práci sme počas dvoch rokov (2006, 2007) testovali *in vitro* regeneračnú kapacitu 15 línií jačmeňa odvodených z jednotlivých semien selekciou embryogénnych genotypov. Výsledky poukazujú na možnosť získania vysokoregenerabilných genotypov pri jačmeni použitím tejto techniky.

Literatúra

- FARAGÓ, J., HAUPTVOGEL, P., KRAIC, J.: Development of a breeding material of alfalfa with high regeneration ability by recurrent somatic embryogenesis. In: Chloupek, O., Simon, U. (Eds.): Seed Production of Lucerne, Academia Prague, 1997, s. 38-39.
- HARWOOD, W.A., BEAN, S.J., CHEN, D.F., MULLINEAUX, P.M., SNAPE, J.W.: Transformation studies in *Hordeum vulgare* using a highly regenerable microspore system. In: Euphytica, 85, 1995, s. 113-118.
- HENSEL, G., VALKOV, V., MIDDLEFELL-WILLIAMS, J., KUMLEHN, J.: Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interactions. In: Journal of Plant Physiology, 165, 2008, s. 71-82.
- HOLME, I.B., BRINCH-PEDERSEN, H., LANGE, M., HOLM, P.B.: Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of *in vitro* cultured ovules. In: Plant Cell Reports, 25, 2006, s. 1325-1335.
- KOMATSUDA, T., TAGUCHI-SHIOBARA, F., OKA, S., TAKAIWA, F., ANNAKA, T., JACOBSEN, H.J.: Transfer and mapping of the shoot differentiation locus *Shd1* in barley chromosome 2. In: Genome, 38, 1995, s. 1009-1014.
- MANO, Y., KOMATSUDA, T.: Identification of QTLs controlling tissue-culture traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Theoretical and Applied Genetics, 105, 2002, s. 708-715.
- MANO, Y., TAKAHASHI, H., SATO, K., TAKEDA, K.: Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Breeding Science, 46, 1996, s. 137-142.
- OBERT, B., MIDDLEFELL-WILLIAMS, J., MILLAM, S.: Genetic transformation of barley microspores using anther bombardment. In: Biotechnology Letters, 30, 2008, s. 967-977.
- RIKIISHI, K., MATSUURA, T., MAEKAWA, M., NODA, K., TAKEDA, K.: Barley lines showing prominent high green shoot regeneration in cultures derived from immature embryos. In: Plant Breeding, 122, 2003, s. 105-111.
- ŠERHANTOVÁ, V., EHRENBERGEROVÁ, J., OHNOUTKOVÁ, L.: Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. In: Plant Soil and Environment, 50, 2004, s. 456-462.
- TINGAY, S., McELROY, D., KALLA, R., FEIG, S., WANG, M., THORNTON, S., BRETTELL, R.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. In: The Plant Journal, 11, 1997, s. 1369-1376.
- WAN, Y., LEMAUX, P.G.: Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. In: Plant Physiology, 104, 1994, s. 37-48.

Tabuľka 1: Embryogénna schopnosť SSD línií 4 odrôd a 1 šľachtiteľskej línie jačmeňa siateho v porovnaní s kontrolnými odrodami v 2 rokoch testovania.

Genotyp	2006			2007				
	Počet explt.	% kalog.	% EKL ³	Počet reg./EK ⁴	Počet explt.	% kalog.	% EKL	Počet reg./EK
Golden Promise ¹	64	91,7	38,0	1,91	90	89,7	41,4	1,65
GP/9	64	89,7	47,8	2,05	90	80,2	46,2	2,15
GP/37	64	84,5	42,2	1,76	90	71,6	43,4	2,20
GP/40	64	89,8	47,4	1,94	90	92,8	48,4	1,98
Orbit ¹	64	89,5	22,9	2,94	90	96,6	28,6	2,45
O/1	na ²	-	-	-	90	100	28,2	2,97
O/2	64	96,6	29,6	3,27	90	86,9	38,4	3,35
O/3	64	94,5	30,8	3,09	90	73,8	31,1	3,73
O/4	64	95,1	30,9	3,48	90	96,2	36,0	3,03
O/5	na	-	-	-	90	100	31,3	2,68
Akcent ¹	64	96,3	25,0	2,60	na	-	-	-
A/3	64	94,5	32,7	2,43	na	-	-	-
A/4	64	96,3	19,2	2,13	na	-	-	-
A/7	64	98,3	34,5	2,40	na	-	-	-
Sladko ¹	64	100	29,4	2,62	na	-	-	-
S/1	64	96,7	28,1	2,40	na	-	-	-
S/2	64	94,5	32,7	2,63	na	-	-	-
S/5	64	96,1	40,8	2,85	na	-	-	-
SK/5066 ¹	64	91,4	25,5	2,30	90	93,4	22,5	2,36
SK/1	64	94,8	36,5	2,38	90	98,9	34,8	2,63
SK/2	64	95,3	27,3	2,44	90	83,8	38,7	2,74
SK/3	na	-	-	-	90	88,2	23,3	3,03
SK/4	64	98,3	24,5	2,29	90	98,7	33,3	2,34
SK/5	na	-	-	-	90	87,8	27,9	3,21

¹Kontrola – štandardná populácia; ²na = netestované; ³EKL = embryogénne kalusové línie; ⁴EK = embryogénne kalus

POROVNANIE POČETNOSTI AERÓBNÝCH BAKTÉRIÍ V RIZOSFÉRE DVOCH TYPOV GENETICKY MODIFIKOVANÝCH RASTLÍN LUCERNY SIATEJ

COMPARISON OF THE ABUNDANCE OF AEROBIC BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF TWO TYPES OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS OF ALFALFA

Natália FARAGOVÁ – Juraj FARAGÓ

In a laboratory experiment we compared abundance of culture groups of aerobic bacteria in the rhizosphere of 5 genotypes containing the AMVcp gene for the capsid protein of AMV and 5 genotypes containing the marker gene gus. Plants were grown in sterile and non-sterile substrate. Abundance of aerobic bacteria from the rhizosphere of transgenic plants was compared with that of donor isogenic non-transgenic line and randomly chosen genotypes of the cultivar Lucia. Comparing the abundance of bacterial colonies isolated from soil samples from the rhizosphere of transgenic and non-transgenic lines of alfalfa, we only observed statistically significant differences between transgenic lines containing the marker gene gus, namely in nitrification bacteria.

Key words: aerobic bacteria, alfalfa, genetically modified organisms, rhizosphere

Úvod

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

Materiál a metódy

V experimente boli použité:

1.) geneticky modifikované klony lucerny siatej (*Medicago sativa* L.), pochádzajúce z vysokoregenerujúceho genotypu Rg 9/I-14-22, izolovaného z odrody Lucia (FARAGÓ et al., 1997) s vneseným génom *AMVcp-s* pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny (KÚDELA et al., 1995) a vnesenými markerovými génmi (*npt II* a *gus*)

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

Rastliny sa pestovali v dvoch substrátoch, a to v sterilnej a v nesterilnej zemine, z ktorej sa pred výsadbou klonov vykonal mikrobiologický rozbor. Počas kultivácie sa odoberali pôdne vzorky z okolia koreňov (od hĺbky 0,02 m od vrchnej časti) v dvoch termínoch (na začiatku a na konci kvitnutia). Mikrobiologické analýzy: a.) prítomnosť *Azotobacteria* na Ashbyho agare agregatívnou metódou stanovením fertílých zrníčok z celkového počtu v %, b.) celkový počet aeróbných mikroorganizmov tvoriacich kolónie na Thortonovom agare vyjadrením počtu kolónietvoriacich jednotiek (KTJ) v prepočte na 1 g sušiny pôdy, c.) početnosť celulolytických baktérií využitím filtračného papiera ako zdroja uhlíka v živnom médiu vyjadrenú v KTJ/ 1 g sušiny pôdy, d.) početnosť amonizačných baktérií kultivovaných na mäsovepeptónovom agare (MPA, Imuna, Šarišské Michaľany) v KTJ/ 1 g sušiny pôdy, e.) početnosť nitrifikačných baktérií na živnom médiu pre nitrifikačné baktérie (PAUL a CLARK, 1989) a denitrifikačných baktérií na živnom médiu pre denitrifikačné baktérie (PAUL a CLARK, 1989) v KTJ/ 1 g pôdy, f.) množstvo bakteriálnych spór na Thortonovom agare po pasterizácii vzorky v KTJ/ 1 g suchej pôdy (DONEGAN et al., 1999).

Výsledky a diskusia

Pri geneticky modifikovaných rastlinách s vnesenými génmi pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny *AMVcp-s* a markerovými génmi *nptII* a *gus* boli sledované štatisticky významné rozdiely v početnosti kultivačných skupín (s výnimkou amonizačných baktérií v 1. odbere a celulolytických baktérií v 2. odbere) medzi pestovateľskými substrátmi a klonmi (ANOVA, $p < 0,05$). Pri vzájomnom porovnaní týchto dvoch typov transgénnych klonov boli štatisticky významné rozdiely detekované v početnosti medzi celulolytickými, sporulujúcimi a nitrifikačnými baktériami v 1. odbere a amonizačnými, celulolytickými baktériami a celkovým počtom mikroorganizmov v 2. odbere (ANOVA, $p < 0,05$).

V porovnaní s predkultivačným rozborom sa pri prvom termíne odberu znížila početnosť všetkých sledovaných kultivačných skupín v rizosfére transgénnych rastlín obsahujúcich *AMVcp-s* a *nptII* a *gus* gény, s výnimkou amonizačných baktérií. Pri druhom termíne odberu sa pri geneticky modifikovaných rastlinách s vnesenými *AMVcp-s* gény zvýšila početnosť amonizačných a celulolytických baktérií a pri modifikovaných rastlinách s vnesenými markerovými génmi zvýšila početnosť amonizačných baktérií oproti ich počtom v predkultivačnom rozbere. V rizosfére transgénnych rastlín s vneseným *AMVcp-s* génom pri 1. termíne odberu bola sledovaná vyššia početnosť amonizačných, celulolytických baktérií a celkového počtu kolónietvoriacich

mikroorganizmov v porovnaní s izogénnou líniou SE/22-GT2 v nesterilnom substráte a celulytických baktérií a celkového počtu mikroorganizmov tvoriacich kolónie v sterilnom substráte. Pri druhom termíne odberu sa rizosféra rastlín luceny nesúcich *AMVcp-s* gény vyznačovala vyššou početnosťou nitrifikačných baktérií o 41 % v nesterilnom substráte a amonizačných a celulytických baktérií v sterilnom substráte o 38 až 77 % v porovnaní s rizosférou nemodifikovanej parentálnej línie. Ak porovnáme rizosfére vzorky rastlín s vnesenými markerovými génmi s nemodifikovanými klonmi SE/22-GT2 bolo zaznamenané zvýšenie početnosti denitrifikačných, celulytických baktérií a celkového počtu kolónietvoriacich mikroorganizmov o 15 až 146 % v nesterilnom substráte a amonizačných baktérií, celkového množstva mikroorganizmov a celulytických baktérií o 9 až 55 % v prospech transgénnych klonov pri prvom termíne odberu. V 2. termíne odberu vzoriek bol v porovnaní s kontrolnou nemodifikovanou líniou zaznamenaný pokles početnosti takmer všetkých sledovaných skupín baktérií v rizosfére lucerny s vnesenými génmi *nptII* a *gus*, s výnimkou amonizačných baktérií v sterilnom substráte a nitrifikačných baktérií v nesterilnom substráte. Vysoký pomer medzi nitrifikačnými a denitrifikačnými baktériami bol pri 1. odbere detekovaný v rizosférach klonov A4-4-1 (6,4), A4-5-2 (6,0), A5-3-3 (5,4), A5-9-3 (5,2) netransgénej línie SE/22-GT2 (4,8), odrody Lucia (3,9) a pri 2. odbere v rizosférach klonov B4-1-1 (5,1), A4-5-2 (4,9), A4-4-1 (4,7). Prítomnosť *Azotobacter* spp. bola zistená len v rizosfére rastlín, bez ohľadu na typ genetickej modifikácie, pestovaných v nesterilnej pôde, čo zrejme súvisí s ich vysokou citlivosťou voči fyzikálno-chemickým zmenám v pôde. V rizosférach transgénnych klonov lucerny s vnesenými markerovými a *AMVcp-s* génmi bolo pozorované zvýšenie percentuálneho zastúpenia *Azotobacter* spp. v 2. termíne odberu o 7 %.

Počas genetickej manipulácie rastlinných buniek môžu techniky *in vitro* kultivácie rastlín (použitie vysokých koncentrácií rastových regulátorov, proces selekcie transformovaných buniek, zvlášť ak sa použije antibiotikum kanamycín) vyprovokovať nežiadúce zmeny vlastností regenerovanej rastliny. Napr. tzv. polohový efekt z miesta integrácie transgénu(-ov) môže zmeniť expresiu niektorých génov parentálnej rastliny a viesť k neočakávaným zmenám v charakteristikách rastliny (CURTIS et al., 2002). Neočakávané charakteristiky sa môžu vyskytnúť tiež v pletivách koreňov transgénnych rastlín a v koreňových exudátoch (TESFAYE et al., 2003). V dôsledku komplexného zloženia a diverzity mikrobiálnych spoločenstiev pôdy, ktoré sú asociované s koreňmi rastlín a sú selektívne ovplyvňované exudáciou koreňov, zmeny v zložení koreňových exudátov medzi transgénnymi rastlinami a netransgénymi rastlinami môžu vyvolať odlišné efekty na mikrobiálne spoločenstvá. Takéto odlišné efekty môžu čiastočne vysvetliť zistené rozdiely v sledovaných parametroch medzi transgénnymi a netransgénymi rastlinami v našich experimentoch.

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

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

Záver

Hoci boli detekované rozdiely v početnostiach kultivačných skupín, štatisticky významné rozdiely neboli preukázané pri porovnávaní rizosférných vzoriek transgénnych rastlín s vnesenými *AMVcp-s*, *nptII* a *gus* génmi a ich geneticky nemodifikovaných izogénnych línií, až na skupinu nitrifikačných baktérií v rizosfére rastlín lucerny obsahujúcich markerové gény (ANOVA, $p < 0,05$).

Literatúra

- BUCKLEY, D.H. – SCHMIDT, T.M. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soil from agroecosystems. In: *Environ. Microbiol.*, 5, 2003, s. 441-452.
- CURTIS, I.S. – NAM, H.G. – JUN, J.Y. – SEO, K.H. 2002. Expression of an antisense GIGANTEA (GI) gene fragment in transgenic radish causes delayed bolting and flowering. In: *Transgenic Res.*, 11, 2002, s. 249-256.
- DONEGAN, K. K. – SEIDLER, R. J. – DOYLE, J. D. – PORTEOUS, L. A. – DI GIOVANNI, G. D. – WATRUD, L. S. 1999. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. In: *J. Appl. Ecol.*, 36, 1999, s. 920-936.

- DUNFIELD, K.E. – GERMIDA, J.J. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2003, s. 7310-7318.
- DUNFIELD, K.E. – GERMIDA, J.J. 2004. Impact of genetically modified crops on soil and plant-associated microbial communities. In: *J. Environ. Qual.*, 33, 2004, s. 806-815.
- FANG, M. – KREMER, R.J. – MOTAVALLI, P.P. – DAVIS, G. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2005, s. 4132-4136.
- FARAGÓ, J. – HAUPTVOGEL, P. – KRAIC, J. 1997. Development of a breeding material of alfalfa with high regeneration ability by recurrent somatic embryogenesis. In: *Chloupek, O. – Simon, U. (Eds.): Seed Production of Lucerne. Academia Prague*, 1997, s. 38-39.
- KÚDELA, O. – GALLO, J. 1995. Characterization of the alfalfa mosaic virus strain T6. In: *Acta Virologica*, 39, 1995, s. 131-135.
- PAUL, E. A. – CLARK, F. E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. *Academic Press, New York*, 1989, 275 s.
- TESFAYE, M. – DUFAULT, N.S. – DOMBUSCH, M.R. – ALLAN, D.L. – VANCE, C.P. – SAMAC, D.A. 2003. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. In: *Soil Biol. Biochem.*, 35, 2003, s. 1103-1113.

NUTRIČNÁ KVALITA KOLEKČIE GENOTYPOV LÁSKAVCA NUTRITION QUALITY OF AMARANTH ASSORTMENT GENOTYPES

Zdenka GÁLOVÁ – Eva PALEŇČÁROVÁ – Želmíra BALÁŽOVÁ

*Amaranth is used such as cereals but it is ranged to pseudocereals. The aim of our work was to compare individual genotypes of amaranth on the base of biochemical characteristics and by means of calculated coefficient of nutrition quality. The content of proteins, fractionation of proteins and electrophoretic separation of storage proteins by the method ISTA SDS-PAGE in the seeds of 26 genotypes *Amaranthus L.* were determined. Based on results we can say that amaranth is characterised by significant food value and low content of prolamin proteins therefore we can suggest it for production of foodstuff suitable for patients with different diets.*

Key words: amaranth, nutrition quality, protein fractions, SDS – PAGE

Úvod

Láskavec sa zaraďuje k pseudoobilninám a vyznačuje sa vysokou nutričnou hodnotou (MIKULÍKOVÁ et al, 2005). Semená amaranta majú pomerne vysoký obsah bielkovín (13–18%) s takmer optimálnym zastúpením esenciálnych aminokyselín a vysokým obsahom lyzínu (TOSI et al., 2003). Za nepriaznivú vlastnosť amarantu možno považovať vysoký obsah tukov, ktorý sa pohybuje v rozmedzí 7-8 % v sušine semena (MUCHOVÁ, et al., 2000). Láskavec obsahuje 5–krát viac železa ako pšenica, je bohatý na vápnik, horčík, fosfor a draslík. Je vhodným zdrojom vlákniny a antioxidantov, najmä vitamínu C a β -karoténu (MIKULÍKOVÁ et al., 2005). V dôsledku nízkeho obsahu prolaminov a gliadínov, môžu výrobky z láskavca nahradiť pšeničnú múku vo výžive ľudí s celiakiou, ale aj fenylketonúriou (BRESSANI et al., 1992).

Materiál a metódy

Analyzované boli vzorky 26 genotypov láskavca získané z Génovej banky semenných druhov SR SCPV VÚRV v Piešťanoch. V celozrnnom šrote vzoriek bol stanovený celkový dusík podľa Kjeldahla, percentuálne zastúpenie bielkovín (% N x 5,7) a frakčná skladba bielkovín (ICC metóda). Elektroforetická separácia zásobných bielkovín bola realizovaná štandardnou referenčnou metódou podľa metodiky ISTA SDS-PAGE (WRIGLEY, 1992). Bielkovinové profily jednotlivých genotypov boli vyhodnotené pomocou systému GelWorks 1D pre Windows.

Výsledky a diskusia

V súčasnom období sa venuje veľká pozornosť využitiu pseudocereálií v racionálnej výžive ako čiastočná náhrada chlebového obilia. Do tejto skupiny sa zaraďuje aj láskavec (*Amaranthus L.*). Pre jeho nutričnú hodnotu, zloženie a biologické zvláštnosti je v popredí záujmu vedcov z hľadiska možnosti jeho využitia v diétnom stravovaní. V obchodnej sieti je možné dnes dostať kúpiť výrobky na báze láskavca ako sú cestoviny, pop-corn, zeleninové polievky, keksy, rôzne ochutené a upravené mäsli.

Chemické zloženie semien láskavca je podmienené predovšetkým klimatickými a výživovými podmienkami, ale taktiež poľnohospodárskymi technikami aplikovanými počas pestovania a ošetrovania porastu (TOSI et al, 2003).

Pri hodnotení nutričnej kvality semena je dôležitý obsah bielkovín, zastúpenie jednotlivých frakcií bielkovín a s tým súvisiaci obsah esenciálnych aminokyselín. Z uvedeného pohľadu nami analyzovaný súbor 26 genotypov láskavca možno zaradiť k nízko bielkovinovým plodinám, pričom priemerný obsah bielkovín v semenách bol 11,3 % (rozsah od 9,6% – 12,8 %). Obsah bielkovín vyšší ako 12 % sme zaznamenali v genotypoch láskavca Fabel, 17 GUA, Koniz a K 436. Najnižší obsah bielkovín bol zaznamenaný v novošľachtencoch AMAR - 2D (9,8%) a RRC 1113 (9,6%).

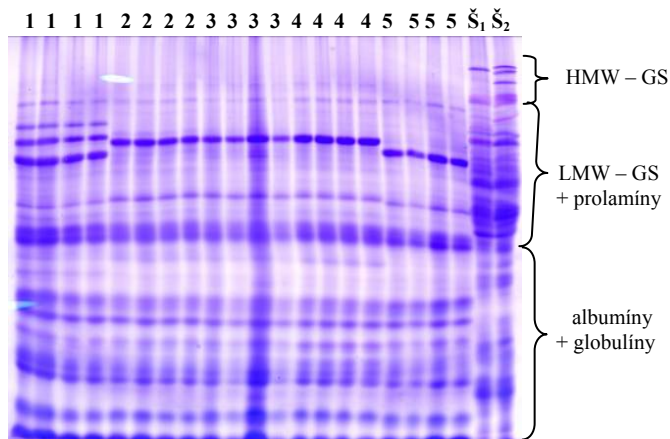
Obsah cytoplazmatických bielkovín (albumínov a globulínov), ktoré sa vyznačujú najvyššou nutričnou kvalitou súvisiacou s vysokým zastúpením esenciálnych aminokyselín, v semenách láskavca varíroval od 46,2 % (DF 118) do 60,0% (RRC 1113). Na druhej strane, zastúpenie neplnohodnotných frakcií bielkovín - zásobných bielkovín, bolo v rozsahu 22% – 37,19 %, čo je v porovnaní so pšenicou približne o 50% menej (MUCHOVÁ et al., 2000, MICHALÍK et al., 2006).

Podiel prolaminových bielkovín v semenách láskavca sa pohyboval od 2,0 % do 3,99 %, glutelínov od 20,0 % do 33,2 % a nerozpustného zvyšku od 13,9 % do 19,4 %. Medzi genotypy s najnižším percentuálnym zastúpením prolaminov patrili z kolekcie láskavca Lider, A-70, RRC 1386. Obsah glutelínov vyšší ako 29% dosiahli genotypy PLAISMAN, BERGUNDY, PI 604 672, 5 DF 111. Osobitnú pozornosť si zaslúži novošľachtene DF 118 s 33,2% zastúpením glutelínov.

Obsah jednotlivých frakcií bielkovín sa využil pre výpočet koeficienta nutričnej kvality (KNK), ktorý do určitej miery charakterizuje výživnú hodnotu semena. V prípade pseudoobilnín dosahuje koeficient nutričnej kvality oveľa vyššie hodnoty v porovnaní s konvenčnými obilninami, čo je spôsobené vysokým podielom

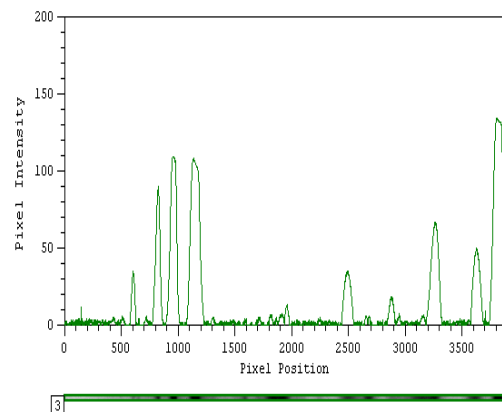
protoplazmatických bielkovín a súčasne nízkym podielom zásobných bielkovín. Priemerná hodnota koeficienta nutričnej kvality v analyzovaných genotypoch bola 2543,1 %, pričom varírovala v rozmedzí od 1821,3% do 3534%, čo poukazuje na dobrú výživnú kvalitu láskavca v porovnaní s inými obilninami ako je pšenica, jačmeň či raž (MICHALÍK et al., 2006).

Denzitometrickým vyhodnotením elektroforeogramov zásobných bielkovín v prostredí SDS-PAGE bolo zistené zastúpenie jednotlivých frakcií v sledovaných genotypoch láskavca. Z výsledkov vyplýva, že podiel vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek (HMW-GS) predstavoval v priemere 2,39 %, pričom v jednotlivých genotypoch varíroval od 0,39 % do 6,9 %. Zastúpenie nízkomolekulárnych glutenínových podjednotiek (LMW-GS) a prolaminov bolo v priemere 45,41 %. Podiel zvyškových albumínov a globulínov dosiahol 52,17 %, čo je v súlade s výsledkami MUCHOVEJ et al. (2000), MICHALÍKA et al. (2006) a ďalšími.



Obr. 1 Elektroforetické spektrum zásobných bielkovín amarantu

Vysvetlivky: 1 – 5 DF 111, 2 - FAKEL, 3 – 17 GUA, 4 - OLPIR, 5 - LIDER, Š₁ – CHINESE SPRING, Š₂ – MARQUIS



Obr. 2 Denzitometrický záznam genotypu 5 DF 111

Záver

Na základe získaných výsledkov frakčnej skladby bielkovín, ako aj elektroforetického spektra zásobných bielkovín a vypočítaného koeficienta nutričnej kvality možno povedať, že analyzované genotypy láskavca sa vyznačujú významnou nutričnou hodnotou, nízkym zastúpením prolaminových bielkovín, čo umožňuje ich využitie v racionálnej výžive.

Literatúra

- BRESSANI, R. et al. 1992. Chemical composition of grain amaranth cultivars and effects of processing on their nutritional quality. In *Food Rev. Int.*, Vol. 8, 1992, p. 23 – 49.
- MICHALÍK, I. et al. 2006. Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie. Nitra: SPU, 2006. 198 s. ISBN 80-8069-780-9.
- MIKULÍKOVÁ, D. et al. 2005. Láskavec ako zdroj zdraviu prospešného škrobu. In *Genofond*, č. 9.
- MUCHOVÁ, Z. et al., 2000. Bielkovinové frakcie semena láskavca (*Amaranthus SP.*). In *Rostlinná výroba*, roč. 46, 2000, č.7, s. 331-336.
- TOSI, E. A. et al. 2001. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. In *Food Chem.*, No. 73, 2003, p. 441 – 443.
- WRIGLEY, C.W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In Linskens, H. F. –Jackson, J. F.: seed analysis, Verlin, Heidelberg, Springer - Verlag, 1992, p. 17-41.

Poznámka

Táto práca bola riešená v rámci grantovej výskumnej úlohy VEGA projektu č. 1/3474/06 „Využitie bielkovinových a DNA markerov pri charakteristike genotypov pšenice a jačmeňa“.

RAMULÁRIOVÁ ŠKVRNITOSŤ LISTOV JAČMEŇA: NOVÁ CHOROBA NA SLOVENSKU

RAMULARIA LEAF SPOT OF BARLEY: NEW DISEASE IN SLOVAKIA

Jozef GUBIŠ – Martina HUDCOVICOVÁ – Lenka KLČOVÁ – Michaela BENKOVÁ – Klára KRIŽANOVÁ

The objectives of our work were to collect plant materials with symptoms Ramularia collo-cygni (R. collo-cygni), isolate and identify this pathogen in samples and evaluate the resistance of selected genotypes of barley to R. collo-cygni in field trials. During summer 2006, 2007 and 2008 an unknown necrotic leaf spot disease was observed in spring barley leaves growing in middle of Slovakia. Leaf samples from diseased barley plants were tested by PCR for the presence of R. collo-cygni. PCR analyses of diseased barley leaves confirmed the presence of the Rcc in barley. The resistance was evaluated under field conditions at locality Viglaš – Pstruša in 2008. Genotypes exhibited a continuous range of response from very susceptible to moderately resistant but none was immune against the disease. To our knowledge, this is the first report of R. collo-cygni in Slovakia.

Key words: Ramularia collo-cygni, PCR, resistance

Úvod

V roku 1987 HUSS *et al.* identifikovali patogéna *Ophiocladium hordei* Cav. zapríčiňujúceho nové ochorenie jačmeňa v Rakúsku. Neskôr SUTTON a WALLER (1988) izolovali tohto patogéna z ďalších trávnatých rastlín a zmenili jeho taxonomickú pozíciu a pomenovanie na *Ramularia collo-cygni*. Od tohto obdobia bol potvrdený výskyt tohto patogéna vo viacerých krajinách Európy, ale aj na Novom Zélande a Južnej Afrike (FREI *et al.*, 2007). Aj napriek tomu, že *R. collo-cygni* bol rozpoznávaný ako významný patogén jačmeňa jeho izolácia a identifikovanie je často obtiažne (FREI a GINDRAT, 2000). Avšak, v súčasnosti boli vyvinuté molekulárne sondy pre detekciu *R. collo-cygni* (HAVIS *et al.*, 2006; FREI *et al.*, 2007), ktoré môžu mať významný dopad na štúdium epidemiológie a populačnej biológie tohto patogéna.

Cieľom našej práce bolo získanie rastlinného materiálu so symptómami *R. collo-cygni*, izolácia a následná identifikácia tohto patogéna vo vzorkách a zhodnotenie rezistencie vybraných genotypov jačmeňa siateho f. jarnej voči *R. collo-cygni* v poľných podmienkach.

Materiál a metódy

Kultúry *R. collo-cygni* boli uchovávané na PDA agare v biologickom termostate pri 20 °C v Petriho miskách. Celková genomická DNA patogéna bola extrahovaná z monosporických kultúr kultivovaných na agarových pôdach. Mycélium patogéna bolo zoškriabané z agarových platiní a DNA bola extrahovaná použitím Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH - Germany). Rovnakou metódou boli extrahované vzorky infikovaných listov. PCR analýzy na diagnostiku *Rcc* sa uskutočnili využitím PCR primerov a PCR amplifikácia prebiehala podľa FREI *et al.* (2007). Elektroforetická separácia PCR produktov sa uskutočnila v 1,4 % agarózovom géle farbenom etídiom bromidom a produkty boli vizualizované UV lampou. Mikroskopické hodnotenia boli uskutočnené stereomikroskopom SZM-168, pričom hodnotené listy boli kultivované vo vlhkých komôrkach na filtračnom papieri nasiaknutým destilovanou vodou.

Hodnotených bolo 29 genotypov (Danuta, Aidas, Akusinal, Alsa, Astor, Aura, Baltazar, Baronesse, Ebson, Malz, Favorit, Logan, Louké, Meltan, Nevada, Otira, Pegy, Pivrac, Punto, Ula, Messina, Brise, Bolina, Jelen, Rabel, Annabell, Madonna, Progres, Nitran) jačmeňa siateho f. jarnej pochádzajúci z Génovej banky SR na SCPV – VÚRV Piešťany a 33 genotypov jačmeňa siateho jarného (Xanadu, Nitran, Ezer, SK 6016-15-05, SK 6081-11-05, SK 6141-2-05, SK 6225-9-05, SK 6225-12-05, SK 6409-20-05, SK 6496-1-05, SK 6500-3-05, SK 6514-25-05, SK 6520-3-05, SK 6533-4-05, SK 6571-18-05, SK 6584-7-05, SK 6584-21-05, SK 6597-7-05, SK 6601-11-05, SK 6605-2-05, SZD 3628 A, 3567 G, 9/02-6D, Prodeum, Levan, SK 5944, SK 6226, 2144, HADM 13920, SK 6339, SK 6378, SK 6411, SK 6389) z *Hordeum s.r.o.* Sládkovičovo. Poľná odolnosť sa hodnotila na lokalite Viglaš-Pstruša. Napadnutie *R. collo-cygni* sa v poľných podmienkach hodnotilo ako percento napadnutej plochy (0, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75 a 100 %) v dvoch termínoch. Percentuálne hodnoty boli transformované použitím arcsin \sqrt{x} . Analýza variácie získaných hodnôt (ANOVA pre $P \leq 0,05$) s následným testom LSD bola spracovaná štatistickým programom SPSS (13.0).

Výsledky a diskusia

V rokoch 2006–2008 počas hodnotenia poľných pokusov sme na jačmeni siatom jarnom zaznamenali drobné, bodkovité nekrotické škvrny podobné hnedej škvrnitosti jačmeňa (*Pyrenophora teres*). Avšak na rozdiel od *P. teres*, ramuláriová škvrnitosť vytvára ostro vyfarbené škvrny len na lícnej strane listu o veľkosti 1–2 mm, zatiaľ čo na rube listu sú tieto škvrny matné, nevýrazné. Postupne dochádza k ďalšiemu tmavnutiu týchto škvŕn do čiernej a následne ich spájaniu až k úplnej nekrotizácii listu (HUSS, 2004). Na základe týchto symptómov sme

z poľných podmienok uskutočnili odbery listových vzoriek z jačmeňa siateho jarného pre mikroskopické štúdie v laboratórnych podmienkach. V rámci týchto analýz bolo na základe morfológických znakov (rast mycélia, tvorba konídiofórov s konídiami) identifikovaná prítomnosť *R. collo-cygni* na infikovaných listoch. Na detekovanie *R. collo-cygni* okrem mikroskopických pozorovaní a morfológickej charakterizácie boli použité RC3 a RC5 primery podľa FREI et al. (2007) s veľkosťou amplifikovaného produktu 348 bp. Amplifikácia špecifických úsekov DNA patogéna prebehla vo všetkých testovaných vzorkách odobratých z poľných podmienok (Víglaš-Pstruša, Kalná nad Hronom a Veľký Krtíš).

V poľných podmienkach bolo celkovo vysiatych 62 genotypov jačmeňa siateho, pri ktorých sme hodnotili poľnú odolnosť voči *R. collo-cygni*. V rámci prvého hodnotenia, ktoré sa uskutočnilo v polovici júna, sa percentuálne napadnutie genotypov pohybovalo od 10 % do 75 %. Počas druhého hodnotenia, ktoré bolo uskutočnené na začiatku júla, bolo napadnutie genotypov od 50 % do 100 %. V poľných podmienkach sme nezaznamenali žiadny genotyp s úplnou odolnosťou voči *R. collo-cygni*. Medzi reakciou genotypov na infekciu *R. collo-cygni* boli zaznamenané významné rozdiely. Najmenej napadnutý bol genotyp Aura (34 %) a naopak najviac napadnuté boli genotypy Nitran a Ezer (81 %). Najväčší rozvoj patogéna bol zaznamenaný v mesiaci jún. Aj napriek tomu, že bola detekovaná stredná odolnosť medzi niektorými genotypmi jačmeňa siateho formy jarnej a ozimnej (PINNSCHMIDT et al., 2006), doposiaľ sa v literatúre neobjavil žiadny genotyp, ktorý by sa v poľných podmienkach vyznačoval úplnou odolnosťou voči *R. collo-cygni*. Najväčší rozvoj *R. collo-cygni* v druhej polovici júna vo svojich poľných experimentoch zaznamenali aj FREI et al. (2007), pričom najväčším zdrojom infekcie jačmeňa jarného bol jačmeň ozimný, z ktorého sa patogén rozširoval.

Záver

Za posledných 15 rokov je *R. collo-cygni* označovaná nielen v Európe ako významný patogén jačmeňa. Význam tohto patogéna je aj v tom, že sa zaraďuje medzi patogény, ktoré sú prenosné semenom. Priebeh ochorenia počas priaznivých podmienok na jačmeni je veľmi rýchly, pričom patogén napáda celú rastlinu od listov, cez steblo, ostniny až po semeno. V práci sme detekovali prítomnosť *R. collo-cygni* využitím molekulárnej (PCR) techniky. PCR patogén-špecifické primery spoľahlivo detekovali patogéna vo vzorkách infikovaných listov jačmeňa siateho na viacerých lokalitách. V poľných podmienkach sa ani jeden genotyp nevyznačoval úplnou alebo čiastočnou odolnosťou. Nami získané výsledky sú prvou potvrdenou informáciou o výskyte o *R. collo-cygni* na území Slovenska. Výsledky dosiahnuté realizáciou metodického postupu prinášajú nové poznatky aj po teoretickej stránke. Rozširujú obzor poznania vednej disciplíny poľnohospodárska fytopatológia a šľachtienie rastlín. Informácie o epidemiológii a populáciách patogéna ako aj o možných zdrojoch rezistencie budú v budúcnosti veľmi dôležité pre úspešnú šľachtiteľskú stratégiu.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporovaná finančnými prostriedkami štátnej úlohy výskumu a vývoja Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky číslo 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11.

Literatúra

- FREI, P., GINDRAT, D. (2000): Le champignon *Ramularia collo-cygni* provoque une forme de grillures sur les feuilles d'orge d'automne et de graminées adventices. *Rev Suisse Agric*, 32, 229–233.
- FREI, P., GINDRO, K., RICHTER, H., SCHÜRCH, S. (2007): Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barley necrotic leaf spots. *Journal of Phytopathology*, 155, 281–288.
- HAVIS, N.D., OXLEY, S.J.P., PIPER, S.R., LANGRELL, S.R.H. (2006): Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiol Lett*, 256, 217–223.
- HUSS, H., MAYERHOFER, H., WETCHING, W. (1987): *Ophiocladium hordei* CAV (Fungi imperfecti), ein für Österreich neuer parasitärer Pilz der Gerste. *Pflanzenarzt*, 40, 167–169.
- HUSS, H. (2004): The biology of *Ramularia collo-cygni*. Meeting the Challenges of Barley Blights (Yahyaoui A.H., Brader L., Tekauz A., Wallwork H. & Steffenson B., eds), pp. 321–328. Proceedings of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights, (ICARDA), Aleppo, Syria, April 2002.
- PINNSCHMIDT, H.O., SINDBERG, S.A., WILLAS, J. (2006): Expression of *Ramularia* leaf spot resistance in barley cultivars and its relation to resistance against other diseases. Proceedings of the Third International Workshop on Barley Leaf Blights, Edmonton, Canada, July 2006 (Turkington T.K., Orr D. & Xi K., eds), pp. 141–145.
- SUTTON, B.C., WALLER, J.M. (1988): Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on Triticale and other Gramineae. *Transactions of the British Mycological Society*, 90, 55–61.

OVOS SIATY – PLODINA 3. TISÍCROČIA SO ŠIROKÝMI MOŽNOSŤAMI VYUŽITIA

OATS – THIRD MILLENNIUM CROP AND ITS UTILIZATION POSSIBILITIES

ANDREA HLINKOVÁ – MICHAELA HAVRLENTOVÁ

Oats (Avena sativa L.) among the basic cereals are highly appreciated from the nutritive and the dietetic point of view. Cereal (1→3)(1→4)-β-D-glucan (referred to as β-D-glucan) plays an important role in human diet due to its beneficial health effects. Its content in oat grain can be influenced by both genotype and environment, although genotypes with black colour of the glume show markedly stable biosynthetic mechanism of studied metabolite. Naked genotypes dispose of higher content of monitored parameter and some of them with the highest content (Slovak variety SV-5, PS 106, and Adam) can be used in breeding programme and seed processing in food industry as a convenient raw material for production of functional foods. Genotypes with the year origin 2001 - 2005 present the highest β-D-glucan content in mature grain. The content of β-D-glucan in oat flakes ranged between 2.64% and 4.6% and oat flakes Vince (Kráľová nad Váhom, Slovakia) disposed its highest content.

Key words: β-D-glucan, oat, genotype, variability, glume colour, oat flakes

Úvod

Ovos siaty (*Avena sativa L.*) je obilnina z nutričného a dietetického hľadiska vysoko cenená. S jeho výživovými hodnotami, ktoré poukazujú na priaznivý pomer bielkovín a sacharidov, vhodný obsah nenasýtených mastných kyselín a vysoký obsah vlákniny, hlavne β-D-glukánu, je spojené jeho využitie v produkcii funkčných potravín. Záujem o produkciu ovsu sa zvýšil po tom, čo Americký vládny úrad pre výživu a liečivá uznal ovsené plevy ako potravinu, ktorá môže znižovať riziko srdcových chorôb v dôsledku fyziologických účinkov β-D-glukánu znižovaním hladiny cholesterolu v ľudskom sére (FDA, 1997). V humidnejších a chladnejších klimatických podmienkach poskytuje vysoké a stabilné úrody a je dôležitým potravinovým zdrojom v oblastiach, kde klimatické podmienky nedovoľujú produkciu kukurice a sóje (PETERSON, 2004).

β-D-glukán je lineárny, viskózný homopolysacharid tvorený β-(1→3) a β-(1→4)-D-glukopyranózovými jednotkami. Obilninami je využívaný ako štruktúrna zložka bunkových stien a zásobný materiál endospermu. V skupine *Gramineae* môže byť do značnej miery práve jeho metabolizmus zodpovedný za odpoveď rastliny na environmentálne signály mierneho, fyziologického rozsahu. Zloženie bunkových stien rastlín má taktiež dôležitý význam v kvalite a príprave potravín založených na rastlinnej báze. β-D-glukán je známy množstvom zdraviu prospešných účinkov na ľudský organizmus. Je považovaný predovšetkým za veľmi účinný aktivátor imunity. Pomáha znižovať hladinu celkového i LDL cholesterolu v krvi a tak redukovat' riziko vzniku srdcovo-cievnych chorôb, má schopnosť spomaliť absorpciu glukózy v krvi a preto môže u ľudskej populácie redukovat' výskyt cukrovky. V potravinárskej technológii sa uplatňuje ako zahusťovadlo, či pri výrobe nízkotučných produktov. Iné výskumy poukazujú na jeho schopnosť zlepšiť senzorické vlastnosti potravín. V praxi sú známe jeho aplikácie i v kozmetickom priemysle.

Genotyp, prostredie a ich vzájomná interakcia sú významným zdrojom variácií v obsahu tohto metabolitu. Jeho hladina môže byť ovplyvnená zložením pôdy, zrážkami i množstvom aplikovaného dusíka, ktorý ako významná zložka hnojiva vplýva na úrodu a iné kvalitatívne parametre zrna.

Cieľom práce bolo zistiť variabilitu v súbore odrôd ovsu a faktory pôsobiace na obsah významnej zdraviu prospešnej zložky zrelého zrna ovsu - β-D-glukánu - s možnosťou využitia v potravinovom priemysle.

Materiál a metódy

V práci sa použil 86-členný súbor odrôd ovsu európskeho pôvodu, rôznorodý na základe krajiny pôvodu, roku vyšľachtienia, plevnatosti a farby plevy. Obsah β-D-glukánu sa stanovil enzymatickou súpravou Mixed-linkage beta-glucan assay procedure K-BGLU 04/06 (Megazyme International Ireland, Ltd.) (McCLEARY, 2006). Každá vzorka sa podrobila analýze v dvoch opakovaniach a výsledné hodnoty sa prepočítali na sušinu.

Výsledky a diskusia

V práci sme sledovali obsah daného metabolitu v súbore odrôd ovsu európskeho pôvodu. Zistili sme veľkú variabilitu v obsahu β-D-glukánu. Priemerné hodnoty sa pohybovali v hraniciach 1,7 % až 8,37 %. Priemernú hodnotu sme stanovili na 5,04 %. Priemerný obsah β-D-glukánu v ovse siatom európskeho pôvodu bol v literatúre popísaný na hodnotu 3,89 % (REDAELLI et al., 2003). Podmienky pestovania však majú výrazný vplyv na jeho hladinu. Naše výsledky, ako aj výsledky iných autorov (GIVENS et al., 2000, EHRENBERGEROVÁ et al., 2003) poukazujú, že nahé odrody disponujú jeho vyšším obsahom v porovnaní s plevnatými. Najvyšší obsah β-D-glukánu sme zaznamenali v odrode slovenského pôvodu SV-5 (8,37 %). Naše výsledky ďalej ukázali zaujímavý vzťah medzi obsahom β-D-glukánu a rokom vyšľachtienia danej odrody.

Odrody vyšľachtené v rokoch 2001–2005 sa vyznačovali najvyšším obsahom danej látky. Vysvetlením môže byť skutočnosť, že od roku 1997, kedy bol ovos uznaný vzhľadom k významnému obsahu β -D-glukánu za tzv. funkčnú potravinu, záujem oň má stúpajúci charakter, s čím môže súvisieť aj šľachtenie práve na jeho vyšší obsah. Plevnaté odrody žltej farby plevy obsahovali v priemere najvyšší obsah β -D-glukánu (3,31 %) na rozdiel od odrôd bielej farby plevy, kde sme pozorovali jeho najnižšiu hladinu (2,94 %). Ovsy s čiernou farbou plevy (s priemernou hodnotou 3,21 %) vykazovali najnižšie štandardné odchýlky v obsahu sledovaného biochemického znaku, čo môže naznačovať jeho výrazne stabilnejšiu biosyntézu. Obsah β -D-glukánu sme porovnávali aj medzi jednotlivými krajinami pôvodu odrôd. Priemerné hodnoty sa pohybovali v rozmedzí od 2,33 % do 3,77 %, pre jednotlivé krajiny. Ovos a jeho potravinové produkty sú čoraz viacej vyhľadávané konzumentmi, najmä kvôli vysokému obsahu vlákniny – dôležitej zložky racionálnej stravy. Denný príjem vlákniny u dospelého človeka by sa mal pohybovať v rozmedzí 20 až 40 g. Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo odporúča 30 g na osobu a pomer obilnín a strukovín by mal dosiahnuť 4:1, t.j. denný prísun surovej zeleniny a ovocia 400 g. Znižovanie hladiny cholesterolu, ako jedna z najvýznamnejších zdraviu prospešných vlastností β -D-glukánu, je vysoko závislé od príjmu. Minimálna účinná denná dávka na redukciiu zvýšenej hladiny cholesterolu je 3 g, čo možno rozdeliť na tri dávky počas dňa. Podľa FDA, konzumácia 3 g β -D-glukánu denne vo forme ovsených vločiek alebo otrúb môže prispieť k 5–8 %-nému zníženiu hladiny celkového cholesterolu (FDA, 1997). Uplatnenie β -D-glukánu pri liečbe cukrovky je spojené s jeho schopnosťou redukovať hladinu krvnej glukózy, pričom významné glykemické a inzulínemické odpovede sa pozorovali už pri dávkach 1,4 g (KIM a kol., 2006). Výsledky WURSCHA et al., (1997) potvrdili, že 50 %-né zníženie glykemickej hodnoty potraviny je možné dosiahnuť pri 10 %-nej koncentrácii β -D-glukánu v obilninových produktoch. V práci sme sledovali obsah β -D-glukánu v siedmich druhov ovsených vločiek. Výsledky ukázali, že sa nachádzal v zastúpení od 2,64 % do 4,6 %. Najvyšší obsah daného metabolitu sme pozorovali pri ovsených vločkách značky Vince (Kráľová nad Váhom, SR). Na dosiahnutie poklesu hladiny LDL cholesterolu môžeme odporúčať denne 80–100 g ovsených vločiek, napr. vo forme ovsenej kaše, či mäsli.

Záver

- V 86-členom súbore odrôd ovsu siateho sme zistili veľkú variabilitu v obsahu β -D-glukánu
- Nahé odrody sa vyznačovali vyšším obsahom β -D-glukánu (v priemere 4,48 %) v porovnaní s plevnatými (3,15 %).
- Najmladšie odrody (vyšľachtené v rokoch 2001–2005) sa vyznačovali najvyšším obsahom daného metabolitu.
- Plevnaté odrody žltej farby plevy sa vyznačovali vyššou hladinou polysacharidu než odrody bielej a čiernej farby plevy.
- Ovsy s čiernou farbou plevy vykazovali najnižšie štandardné odchýlky v obsahu sledovaného znaku.
- Najvyšší obsah β -D-glukánu mali ovsené vločky Vince (4,6 %, výrobca Kráľová nad Váhom, SR).
- Nahé odrody SV-5, PS 106, Neon, Adam a Avenuda a plevnaté Šampionka a Arnold s obsahom viac ako 4,3 % β -D-glukánu môžeme odporúčať ako jeho vhodné prirodzené zdroje.

Literatúra

- EHRENBERGEROVÁ, J., VACULOVÁ, K., PSOTA, V., HAVLOVÁ, P., ŠERHANTOVÁ, V.: Effects of cropping system and genotype on variability in important phytonutrients content of the barley grain. In: Plant Soil Environment, roč. 49, 2003, s. 443-450.
- FDA: FDA allows whole oat foods to make health claim on reducing the risk of heart disease. In: FDA Talk Paper, roč. 5, 1997. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoats.html>
- GIVENS, D.I., DAVIES, T.W., LAVERICK, R.M.: Dietary fibre in hulled and naked winter oat grain: effects of cultivar and various agronomic factors. In: Journal of Science Food Agriculture, roč. 80, 2000, s. 491-496.
- KIM, S.Y., SONG, H.J., LEE, Y.Y., CHO, K.-H., ROH, Y.K.: Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. In: Journal of Korean Medicinal Science roč. 21, 2006, s. 781-789.
- MCCLEARY, B.V.: Megazyme: Mixed-linkage beta-glucan assay procedure (McCleary method). <http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/K-BGLU.pdf>
- PETERSON, D.M.: Oat – a multifunctional grain. In: Agrifood Research Reports, roč. 51, 2004, s. 21-26.
- REDAELLI, R., SGRULLETTA, D., DE STEFANIS, E.: Genetic variability for chemical components in sixty European oat (*Avena sativa* L.) cultivars. In: Cereal Research Communication, roč. 31, 2003, s. 185-192.
- WURSCH, P., PI-SUNYER, F.: The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. In: Diabetes Care, roč. 20, 1997, s. 1774-1780.

NIKTORÉ MOLEKULÁRNE A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI PR-4 PROTEÍNU SYNTETIZOVANÉHO PRI INTERAKCIÁCH HOSTITEĽ-PATOGEN S RÔZNYM GENETICKÝM POZADÍM

SOME MOLECULAR AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PR-4 PROTEIN SYNTHESIZED BY HOST-PATHOGEN INTERACTIONS WITH DIFFERENT GENETIC BACKGROUND

Elena HLINKOVÁ – Vladena BAUEROVÁ-HLINKOVÁ – Milan BOBÁK – Danka VALKOVÁ

Present work interesting in some characteristics of PR-4 protein synthesized to the end of asexual phase of development of Blumeria graminis f.sp. hordei (BGH) on host barley plants by compatible interactions. PR-4 protein is synthesized in the infection site by compatible interaction on cultivar Dvoran and by isogenic line P04B with the pathotype of Sk-5/11 powdery mildew. Cultivar Dvoran and isogenic line P04B differ in presence of resistance gene from Mla – locus. P04B contain in its genome resistance gene Mla-7, which answered for the level compatibility/incompatibility with the powdery mildew pathotype SK-5/11(HR-hypersensitive reaction). Protein has a chitinase activity and its quantitative content strongly depends on infection site. Immunological reactions showed on different amount of this protein and its serological related paralogs in dependence of barley genotypes as well as virulence of pathogen. Results indicated on the presence both suppressor genes into host genomes as well as orthological genes by pathogens. DNA analyses indicated that on the intensity of the synthesis of PR-proteins and pathogenity level can participate a virus DNA of BGH. Sequencing of PR-4 protein is continued.

Key words: barley, powdery mildew, PR-4 protein, chitinase, DNA

Úvod

PR-proteíny sú syntetizované v rastlinách ako odpoveď na biotický a abiotický stres. Ich kvalitatívne i kvantitatívne zastúpenie sa odlišuje ako v závislosti od genotypu hostiteľa tak i patogéna. V prípade inkompatibilných reakcií prevažujú v intercelulárnych extraktoch v prvých hodinách infekcie peroxidázy a superoxiddismutázy (PR-9 proteíny), ktoré odpália už primárnu hýfu a kľúčiacu spóru múčnatky odpadáva z napadnutého listu (HLINKOVÁ et al. 1995; 2007; HÜCKELHOVEN et al. 2001). Pri hypersenzitívnych interakciách je situácia v génovej expresii zložitejšia a závisí ako od bazálnych génov rezistencie tak aj od špecifických génov rezistencie, čo sa prejavuje ako na proteínovom zastúpení (u extracelulárnych aj intracelulárnych zložiek) tak i morfológii papily, ktorá sa v závislosti od ontogenetickej fázy vývoja patogéna postupne stáva kompaktnejšou a prestúpenejšou lignínovými zložkami. Súčasný vplyv oxidoreduktáz spolu s hydrolytickými enzýmami a fytoalexíni vedie k apoptóze a nekróze infikovanej bunky a spolusediacich buniek (HÜCKELHOVEN et al. 2001; HARTLEB et al. 1997). Tento process sa ukončuje do 60 hodín od infekcie v závislosti od génov rezistencie hostiteľského genotypu jačmeňa a génov virulencie patogéna (BGH) (HLINKOVÁ et al. 2001). Okrem špecifických β -1,3-glukanáz (Glu, E.C.3.2.1. 39; skupina PR-2 proteínov; MADSEN et al. 2003), ktoré sú syntetizované u jačmeňa predovšetkým v nízkomolekulovej oblasti, syntetizujú aj obiloviny ďalšiu významnú skupinu hydrolytických enzýmov, ktorými sú chitinázy (Chi, E.C.3.2.1.14). Do tejto kategórie boli vyčlenené skupiny proteínov PR-3, PR-4, PR-8 a PR-11. Kategorizácia Chi bola vytvorená na základe experimentálnych údajov získaných predovšetkým u dvojkličnoslistových rastlín. Systematickejšie analýzy PR-proteínov u jačmeňa infikovaného múčnatkou boli urobené až MUTHUKRISHNANOM et al. (2001). Zatiaľ najúplnejší prehľad PR-proteínov jačmeňa infikovaných múčnatkou v závislosti od typu interakcie : gén rezistencie hostiteľa proti génu virulencie patogéna publikovali LYON a NEWTON (2005). Zaujímalo nás, do akej miery sa bude syntetizovať PR-4 proteín aj u iných genotypov jačmeňa nesúcich vo svojom génóme rôzne gény rezistencie z *Mla* – lokusu v porovnaní so senzitívnym kultivarom Dvoran; ako aj závislosť génovej expresie na vzdialenosti od miesta infekcie ovplyvnená rôznymi génmi virulencie patogéna.

Materiál a metódy

Mladé, osem-dňové rastliny asepticky kultivovaného jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) rôznych genotypov s odlišnými génmi rezistencie (P02: *Mla-3*; P04B: *Mla-7*; P10: *Mla-12*) boli inokulované s dvomi patotypmi múčnatky RU-3 (patotyp bol vyselektovaný z divých kmeňov na Technische Universität München-Weihen Stephen Dr. Fischbeckom a Wolfem) a slovenským patotypom múčnatky SK-5/11 odchytenej na západnom Slovensku v oblasti horného Ponitria. Obidva patotypy sa odlišovali génmi virulencie : RU-3 (*avr Ml-a3*; *vir Ml-a7*; *vir Ml-a9*; *vir Ml-a12*; *vir Ml-a13*) a SK-5/11 (*avr Ml-a3*; *avr Ml-a7*; *vir Ml-a12*, *vir mlo*) vo svojom génóme. Na ôsmy deň po ukončení vegetatívnej fázy vývoja patogénov boli z mladých rastlín jačmeňa odstránené infikované primárne listy (300mg). Tieto boli rozdelené na časti s miestami infekcie a neinfikovanú časť. Zo

zdravých aj infikovaných častí primárnych listov všetkých kombinácií pri infekcii s patogénmi bol izolovaný intercelulárny extrakt podľa REPKU (1997). V extraktoch bolo určené kvantitatívne zastúpenie proteínov podľa BRADFORDA (1976). Zvyšná listová hmota bola použitá na izoláciu DNA. Proteínové analýzy boli realizované pomocou 1 a 2-D PAGE. Kyslé anodické proteíny boli separované v prvom rozmere na 12,5% PAGE v diskontinuálnom usporiadaní podľa SMITHA (1988). 2D- SDS PAGE bola robená na 15% géli podľa HAMESA (1981). Gély boli farbené dusičnanom strieborným (BEŇOVÁ 2005). Westernblotové analýzy pre PR-4 proteín boli robené podľa REPKU (1997). Kompletná genomická DNA bola izolovaná podľa DELLAPORTA et al. (1983).

Výsledky a diskusia

Kvantitatívne zastúpenie proteínov v extracelulárnom extrakte ukázalo, že najväčšia koncentrácia rozpustných proteínov bola zistená v infikovaných častiach listov. Rozdiely boli u všetkých testovaných genotypov okrem kultivaru Dvoran vysoko preukazné. Kvalitatívne analýzy potvrdili prítomnosť viacerých PR a DR-proteínov (obr. 1, 3) spojených ako s obrannými reakciami hostiteľských rastlín tak i procesom samotnej patogenézy-rozvojom haustória pri kompatibilných interakciách, ktorú pre obidva patotypy múčnatky vykazovala izogénna línia jačmeňa P10(*Ml-a12*) a kultivar Dvoran bez génu rezistencie z *Ml-a* lokusu. Obidva patotypy prekonávali tento gén rezistencie. Hypersenzitívnu reakciu bola charakteristická izogénna línia P04B(*Ml-a7*) v oboch prípadoch. Gén *Ml-a3* prekonával patotyp múčnatky SK-5/11, ale nie RU-3. Na začiatku sporulácie patogénov tak extracelulárne proteínové spektrá obsahovali niekoľko špecifických chitináz. Ako potvrdili Westernblotové analýzy (obr. 2) ich početnosť závisela nielen od génov rezistencie, ktoré sú v prípade izogénnych línií cv. Pallas v dominantnom postavení, ale aj od génov zodpovedajúcich za bazálnu ochranu jačmeňa voči všeobecným patogénom a boli vyvinuté v priebehu evolúcie a získané v šľachtiteľských programoch. Ďalšou skutočnosťou, ktorá sa odrazila na počte chitináz detekovaných pomocou čiastočne špecifickej protilátky k Chi_a14,4 (Mr bola určená pomocou 1a 2D- SDS-PAGE, obr.4) bol aj samotný patogén (jeho gény virulencie/avirulencie) a vzdialenosť od miesta infekcie. V proteínovom extrakte z infikovanej časti listu kultivaru Dvoran (patotyp múčnatky SK-5/11) sa nachádza ešte ďalšie 4 sérologicky príbuzné chitinázy (Mr ~ 12; 40; 50 a 62kDa; obr.3) zatiaľ čo s patotypom múčnatky RU-3 iba 1 aj to s nízkym kvantitatívnym výťažkom. Immunoblot potvrdil prítomnosť PR-4 proteínu aj u extraktov z izogénnych línií P04B a P10 infikovaných patotypom múčnatky SK-5/11 avšak v nižšej koncentrácii. V ich spektre boli prítomné ďalšie dve sérologicky príbuzné Chi. Elektroforetogramy genomickej DNA (obr.5) potvrdili prítomnosť cudzorodej DNA v infikovaných častiach listov. Hmotnosť je väčšia ako 23,1 kb. Ostatné prúžky (4;2 a 1kb) zodpovedajú najpravdepodobnejšie DNA vírusom podobným partikulám identifikovaným v intracelulárnom priestore. Tieto partikuly boli identifikované pri ultraštrukturných analýzách (Hlinková et al.2007, Kunoh et al. 1985). Je vysoko pravdepodobné, že nízkomolekulové Chi nie sú len produktom rastlinných génomov, ale podiel na ich prítomnosti má aj patogén (Melchers et al. 1994). Či vírusová alebo jadrová zložka to ukážu ďalšie DNA-proteínové analýzy.

Záver

Získané výsledky ukázali, že:

- 1) PR-4 proteín (Chi14.4) sa vyskytuje v listoch jačmeňa infikovaného múčnatkou jačmennou v závislosti od génového pozadia hostiteľa a patogéna;
- 2) Podiel na jeho kvantitatívnom zastúpení s spektre hostiteľa je ovplyvnený pravdepodobne aj vírusovou zložkou patogéna.

Podakovanie

Predložená práca vznikla na základe finančnej podpory grantovej agentúry Vega MŠ SR projekt č. 1/4360/07.

Legenda k obrázkom:

Obrázok 1, 2: Proteínové spektrá kyslých extracelulárnych proteínov izolovaných zo zdravých a infikovaných primárnych listov jačmeňa cv. Dvoran a P04B v období ukončenia vegetatívnej fázy ontogenézy patogénov. Na separáciu A-PAGE bol použitý 1 µg proteínov. Gély boli farbené dusičnanom strieborným; č- čistá časť infikovaného listu; i- infikovaná časť listu

Obrázok 3: Westernblot pre identifikáciu Chi14.4 u extracelulárneho proteínového extraktu izolovaného z infikovanej časti listu cv. Dvoran v období ukončenia vegetatívnej fázy ontogenézy u patogéna SK-5/11. Na A-PAGE bolo nanesených 25µg proteínov. Ako primárna protilátka bol použitá protilátka z kráľika pripravená k tomuto proteínu.

Obrázok 4: 2-D-PAGExSDS-PAGE na prítomnosť Chi 14.4 v extracelulárnom proteínovom spektre primárnych listov jačmeňa cv. Dvoran infikovaných patotypom múčnatky SK 5/11.

Na primárnu elektroforézu bolo použitých 40µg proteínov. Gél bol farbený dusičnanom strieborným.

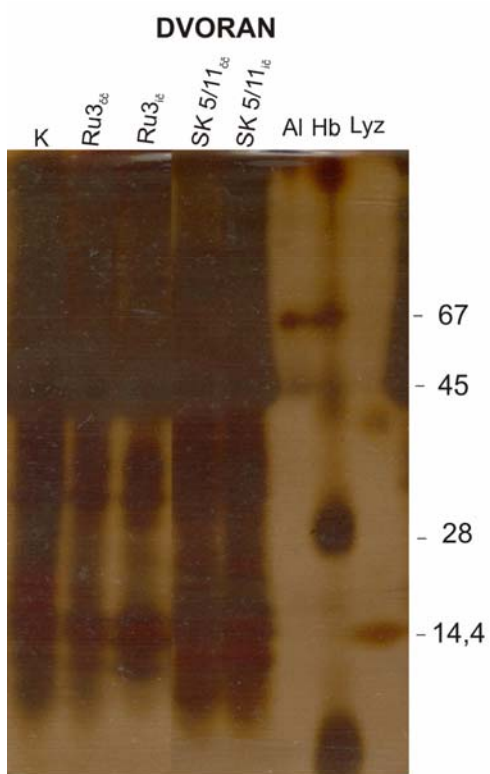
Obrázok 5: Elektroforetogram genomickej DNA izolovanej z primárnych listov jačmeňa zdravých a infikovaných rastlín v období ukončenia vegetatívnej fázy vývinu patogéna.

1-DNA izolovaná z listov zdravej rastliny- cv. Dvoran; 2- DNA- izolovaná z primárnych listov infikovaných patotypom múčnatky RU-3;3- DNA – izolovaná z primárnych listov infikovaných patotypom múčnatky SK-5/11.

Na elektroforézu bolo použitých 8µg DNA po očistení RN-ázou A. Ako štandard bola použitá DNA λ-fága štiepeného restriktázou HindIII.

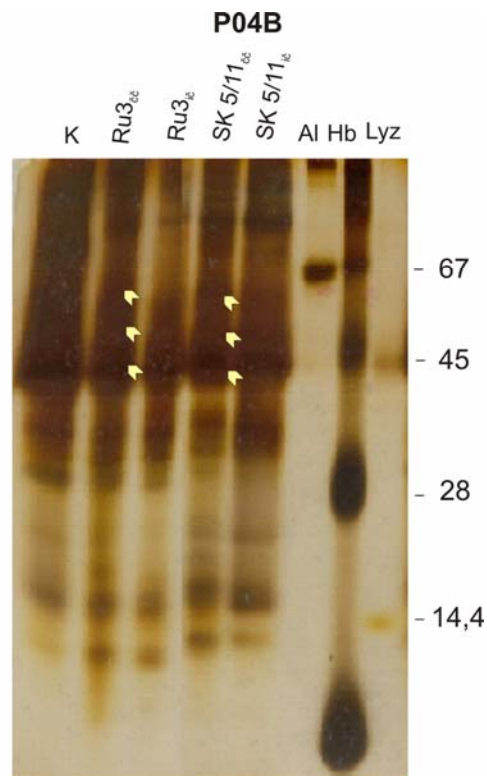
Literatúra

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annal. Biochem.* 72:248-254
- Beňová, A., Hlinková, E., Šimonovičová, A. (2005): Changes in protein patterns of microscopic fungi of *Aspergillus niger* TIEGH & *Aspergillus clavatus* DESM by the stress conditions. *Phytopedon (Bratislava)* 4: 19-27.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983): A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol.* 4:19-23.
- Hartleb, M., Heitefuss, R., Hoppe, H. H. (1997): Host pathogen interactions, AP, N Y, pp. 570
- Hames, D.B., Rickwood, D. (1981): Gel electrophoresis of proteins; A practical approach. IRL Press Oxford, Washinton DC, pp 250.
- Hlinková, E., Šýkora, M., Šubr, Z. (1995): Zastúpenie rozpustných proteínov v listoch jačmeňa po napadnutí múčnatkou trávovou (*Erysiphe graminis* f.sp. hordei Marchal) *Poľnohospodárstvo/ Agriculture* 41.8: 597-613
- Hlinková, E., Bobák, M., Illéš, P. (2001): Morphological characteristics of powdery mildew ontogenesis asexual phase by infection barley primary leaves. In: *Cell III* (Ed. J. Berger), Kopp Publ., České Budějovice, 225-226.
- Hlinková, E., Bobák, M., Hlinková, V., Rafay, J. (2007): Pathogenes as a source of possible new resistance genes. In: Book of abstracts, 18-th EUCARPIA Genetic Resources Section, Meeting, May 23.-26, 2007 Piešťany, SARC Nitra 2007, 153.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Trujilo, M., Kogel, K. H. (2001): Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. hordei are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates in fungal invasion. *Planta* 212:16-24
- Kunoh, H., Kuroda, K., Hayashimoto, A., Ishizaki, H. (1985): induced susceptibility and enhanced resistance at the cellular level in the barley coleoptiles II. Timing and localization of induced susceptibility in a single coleoptile cell and its transfer to the adjacent cell. *Can. J. Bot* 64: 889-895.
- Lyon, G.D., Newton, A.C. (2005): Disease resistance-related proteins in barley. <http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/Web/site/...logy/cereal> pathology
- Madsen, L. H., Collins, N.C., Rakwalska, M., Backs, G., Sandal, N., Krusell, L., Jensen, J., Waterman, E.H., Jahoor, A., et al. (2003): Barley resistance genes analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. *Mol. Gen. and Genomics*. Springer –Verlag, 10.1007/S00438/003-0823.
- Melchers, L. S., Apotheker de Groot, M., van der Knaap, J. A., von Stein, A.S., Sela-burlage, M. B., Bol, J. F., Cornelissen, B.J.C., van den Elzen, P. J. M., Linthorst, H. J. M. (1994): A new class of tobacco chitinase homologous to bacterial exochitinases display antifungal activity. *Plant Jour.* 5: 469-480.
- Muthukrishnan, S., Trick, H. N., Gill, B.S. (2001): Pathogenesis related proteins and their gene in cereals. *Plant Cells, Tissue and Org. Culture* 64:93-114.
- Repka, V. (1997): Intra and extracellular isoforms of PR-3 class chitinase in virus infected cucumber plants. *Acta Virol.* 41:71-75
- Smith, J. A. (1988) Analysis of proteins. In: *Current protocol in mol. Biology.* (Ed.: Ausubel, F.M. et al.) John Wiley & Sons, N.Y., Chichester-toronto-cambridge. 10.0.3-10.3.11.

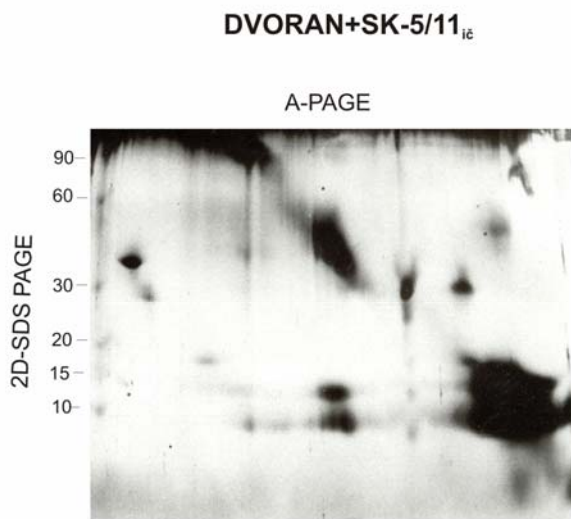


Obr. 1

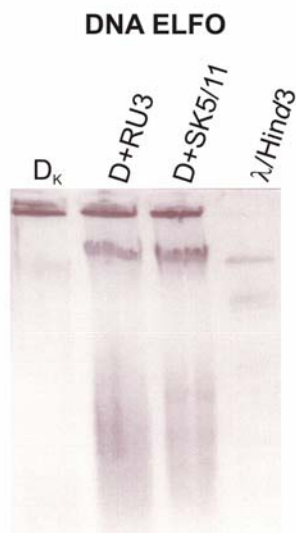
Obr. 3



Obr. 2



Obr. 4



Obr. 5

HODNOCENÍ VÝSKYTU VIROVÝCH ZAKRSLOSTÍ OBILNIN U VYBRANÝCH ODRŮD JEČMENE, PŠENICE A TRITIKALE

EVALUATION OF THE SEVERITY OF BYDV AND WDV IN SELECTED BARLEY, WHEAT AND TRITICALE CULTIVARS

Simona HORÁČKOVÁ – Zdeněk NESVADBA – Ivana POLIŠENSKÁ

*Barley yellow dwarf virus (BYDV) is a widely spread luteovirus including several strains out of which PAV predominates in the territory of the Czech Republic (CR). BYDV symptoms are apparent as uneven leaf colouration - yellow, sometimes red or violet colour spreading from the leaf tip towards its centre and base. The most distinct symptoms are found on older leaves, whereas young leaves are free of them. According to Stromberg (2002), the virus survives in 20 aphid species, particularly bird-cherry aphid (*Rhopalosiphum padi*) and grain aphid (*Sitobion avenae*), that live on a number of cereal and grass hosts. Wheat dwarf virus (WDV) is classified among monogeminiviruses and infects wheat, barley, oat and some grass species. These strains are transmitted by leafhopper (*Psammotettix alienus*).*

Key words : BYDV; WDV; cereal; virus; aphid

Úvod

Virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV) je široce rozšířený luteovirus s několika kmeny, z nichž na území České republiky převládá kmen PAV, který se vyznačuje silnou patogenitou a efektivitou přenosu. Symptomy BYDV se projevují jako nerovnoměrné zbarvení listů, žlutou, někdy červenou nebo fialovou barvou, postupující od špičky ke středu a k bázi listu. Nejvýrazněji se symptomy vyskytují na starších listech, mladé listy nebývají ovlivněny. Virus přežívá dle STROMBERGA (2002) ve 20 druzích mšic, zvláště v mšici střemchové (*Rhopalosiphum padi*), kyjatce osenní (*Sitobion avenae*), které žijí na řadě obilních a travních hostitelů. Virus zasahuje do růstu infikovaných rostlin, zpomaluje vývoj listů a kořenů, někdy zabraňuje metání nebo způsobí i odumření rostlin. Mezi nejtypičtější symptomy napadených rostlin patří zkrácení délky stébla, slabší odnožování, zhoršení přezimování. Ztráty způsobené BYDV závisejí především na druhu obilniny, ale také na době infekce. U ozimého ječmene činí výnosové ztráty náchylnějších odrůd z podzimní infekce 96-100 %, při jarním napadení 10–30 %. U jarního ječmene dochází ke ztrátám 10–30 % (HRUDOVA, POKORNÝ 2008).

Virus zakrslosti pšenice (WDV) řadíme mezi monogeminiviry, který napadá pšenici, ječmen, oves a některé druhy trav. Tyto kmeny se přenášejí cirkulativně prostřednictvím kříška polního (*Psammotettix alienus*). Ztráty výnosů u ozimého ječmene při podzimních infekcích mohou činit 80–100 %, u jarního ječmene pak až 50 % (HRUDOVA A POKORNÝ, 2008).

Významnou strategií ochrany proti virózám představuje kombinace geneticko-šlechtitelských postupů. V případě BYDV je to tvorba perspektivních odrůd se zvýšenou odolností. Pro zvýšení odolnosti k WDV, u které nejsou známy zdroje odolnosti jak u pšenice, tak u ječmene, se jako nadějně jeví metody transgenozie (CHRPOVÁ a VEŠKRNA, 2008).

Materiál a metody

Pokus byl veden na pozemku firmy Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž v letech 2006 až 2008. Bylo vyseto celkem 60 odrůd ozimého ječmene, jarního ječmene, ozimé pšenice a ozimého tritikale, tzn. od každého druhu 15 odrůd. U jednotlivých odrůd bylo provedeno předseťové ošetření zrna mořidlem Raxil Secur (firmy Bayer AG), které obsahuje systémový imidacloprid, který působí insekticidně jako kontaktní a požerový jed. Jako kontrola byly vysety stejné odrůdy, ale nemořené. Výsev ozimých i jarních obilovin byl proveden ve druhé polovině září, secím strojem Oyjord na parcely o ploše 2,5 m². Na jaře bylo provedeno ošetření herbicidy. První vizuální hodnocení bylo provedeno koncem března. Ve vegetačním odstupu 3 týdnů od prvního hodnocení byla přítomnost viru stanovena laboratorním imunoenzymatickým ELISA testem (Enzyme linked immunosorbent assay) (BARTUŠKOVÁ et al., 2007). Sklizeň parcel byla provedena v plné zralosti maloparcelním kombajnem Osevan. Po sklizni byl stanoven výnos zrna přepočtený na t.ha⁻¹ a 14 % vlhkost.

Výsledky a diskuze

Ve vegetačním roce 2006/2007 velmi dobře přezimovaly všechny odrůdy ozimého ječmene jak šestiřadého, tak dvouřadého. Horší přezimování se projevilo u některých odrůd ozimé pšenice a rovněž u tritikale. Obdivuhodně dobře, až na některé výjimky, přezimovaly i odrůdy jarního ječmene. Zatímco v ročníku 2007/2008 byly zjištěny výrazné rozdíly v přezimování nejen u jednotlivých druhů, ale i odrůd. Nejhůře přezimovaly jarní ječmeny a některé odrůdy ozimého ječmene (tab. 2). Při prvním hodnocení po zimě (26. 3. 2007) byl kromě přezimování zjišťován i výskyt symptomů viróz. Přestože podzimní nálet obilních mšic do porostů vzcházejících ozimů nastal již koncem září, nebyl nijak výjimečně silný. To znamená, že na vzcházející ozimy nalétávalo malé množství mšic a tím i riziko přenosu a šíření podzimní (primární) infekce BYDV nebylo velké. Přesto se však v jarním vegetačním období projeví u většiny ječmenů (ozimých i jarních) znatelné symptomy virové zakrslosti, projevující se jako ohniskově intenzivní žloutnutí, mírná zakrslost, bez redukce

počtu rostlin. U některých odrůd se projevilo silné žloutnutí, začínající redukce odnoží, zakrslost, slábnutí celých rostlin (tab. 1). Začátek podzimu 2007 byl poznamenán nadprůměrnou letovou aktivitou obilných mšic, zejména mšice střežchové. V druhé dekádě října se výrazně zpomalil vývoj těchto mšic a to hlavně díky prudkému ochlazení, kdy se denní teploty pohybovaly místy kolem 10 °C. Při hodnocení symptomů viróz (28. 3. 2008), byly vizuálně, téměř bez napadení, hodnoceny odrůdy ozimé pšenice a tritikale. Značný projev napadení virózami byl zaznamenán u ozimého a jarního ječmene. Jak později potvrdil i laboratorní test, došlo k výraznému napadení infekcí BYDV, naopak napadení WDV bylo minimální a bylo prokázáno pouze u šesti z 60 hodnocených vzorků. Příčiny dosažených výsledků uvedeného testu souvisí zřejmě s všeobecně silným výskytem obilných mšic, který se přibližoval hodnotám kalamitního podzimního přemnožení v letech 2001–2002 (KÖHLER, 2007).

Výsledky testu z roku 2007 potvrdily, že reakce většiny odrůd na BYDV byla negativní, jak na ošetřené tak i neošetřené variantě. V roce 2008 byla prokázána negativní reakce některých odrůd na přítomnost viru WDV v nemořené variantě, zatímco pozitivní reakce na WDV byla zjištěna v mořené variantě (Alissa, Vilna a Jersey). V roce 2007 převažoval výskyt WDV, naopak v roce 2008 byl dominující výskyt BYDV. Z jednotlivých druhů obilovin dosáhly v roce 2007 nejvyšší výnos odrůdy šestiřadého ozimého ječmene na nemořené variantě (v průměru odrůd výnos 8,2 t.ha⁻¹). Ošetření mořidlem se pozitivně projevilo na zvýšení výnosu zrna pouze u tritikale a jarního ječmene a to až o 10 %. V roce 2008 byla situace zcela opačná. U všech druhů byl prokázán vliv moření na zvýšení výnosu a to až o 50 % u ozimých ječmenů. Nejvyšší výnos byl zaznamenán u tritikale a to v průměru 13 t.ha⁻¹ v ošetřené variantě.

Literatura

- BARTUŠKOVÁ, I., et al. (2007): Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ, Brno, 20-34
HRUDOVÁ, E., POKORNÝ, R. (2008): Úroda 1/2008: 8-10.
CHRPOVÁ, J., VEŠKRNA, O., (2008): Úroda 2/2008: 25-27
KÖHLER, A., RŮŽIČKA, T., (2007): www.srs.cz
STROMBERG, E.L. (2002): Physiology and Weed Science, Virginia Tech: p.2.

Tab.: 1 Hodnocení symptomů virové zakrslosti na infekčním poli po přezimování 2006/2007

Odrůda	Přezimování	SVZ	Odrůda	Přezimování	SVZ
6-řadý ozimý ječmen			Jarní ječmen		
Luxor	9	1	Forum	9	3
Luxor	9	3	Forum	9	3
Luran	9	3	Tolar	8	3
Luran	9	3	Tolar	8	3
Alissa	9	3	Sebastian	8	3
Alissa	9	3	Sebastian	8	3
Nelly	9	3	Amulet	9	3
Nelly	9	1	Amulet	9	3
Carola	8	3	Akcent	7	5
Carola	8	3	Akcent	9	3
Merlot	8	3	Prestige	7	3
Merlot	9	3	Prestige	9	3
Lomerit	9	1	Olbram	6	3
Lomerit	9	3	Olbram	7	3
Traminer	9	1	Nordus	8	3
Traminer	9	3	Nordus	8	3
Campill	9	3	Sabel	8	3
Campill	9	3	Sabel	8	3
2-řadý ozimý ječmen			Madonna		
Tiffany	9	3	Madonna	8	5
Tiffany	9	5	Saloon	6	3
Duet	9	3	Saloon	8	3
Duet	9	3	Scarlett	8	3
Jolante	9	3	Scarlett	8	3
Jolante	9	3	Kompakt	9	3
Vilna	8	3	Kompakt	8	3
Vilna	9	5	Ozimá pšenice		
Camera	9	3	Ebi	5	1
Camera	9	5	Ebi	6	1
Reni	9	3	Caphorn	8	1
Reni	8	3	Caphorn	5	1
Jarní ječmen			Ilias		
Philadelphia	8	3	Ilias	7	1
Philadelphia	9	3	Triticale		
Jersey	8	3	Tricolor	6	1
Jersey	8	3	Tricolor	8	1

Legenda:

Nemořená varianta - **mořená varianta**
 SVZ = symptomy virových zakrslostí

Tab.: 2 Hodnocení symptomů virové zakrslosti na infekčním poli po přezimování 2007/2008 a výsledky imunoenzymatického ELISA testu

Odrůda	Přezimování	SVZ	ELISA WDV	ELISA BYDV	Odrůda	Přezimování	SVZ	ELISA WDV	ELISA BYDV
6-řadý ozimý ječmen					Jarní ječmen				
Luxor	4	7	N	P	Forum	3	5	N	P
Luxor	7	7	N	P	Forum	6	3	N	P
Luran	6	7	N	P	Tolar	3	3	N	P
Luran	7	7	N	P	Tolar	7	3	N	P
Alissa	6	5	N	P	Sebastian	4	5	N	P
Alissa	7	7	P	P	Sebastian	7	3	N	P
Nelly	3	7	N	P	Amulet	3	5	N	P
Nelly	6	3	N	P	Amulet	6	3	N	P
Carola	5	5	N	P	Akcent	3	7	N	P
Carola	7	1	N	P	Akcent	5	3	N	N
Merlot	5	7	N	P	Prestige	3	5	N	P
Merlot	7	3	N	P	Prestige	5	3	N	P
Lomerit	7	7	N	P	Olbram	2	7	N	P
Lomerit	8	3	N	P	Olbram	6	3	N	P
Traminer	6	5	N	P	Nordus	2	7	N	P
Traminer	8	1	N	N	Nordus	5	3	N	P
Campill	5	7	N	P	Sabel	3	7	N	P
Campill	8	3	N	P	Sabel	6	3	N	P
2-řadý ozimý ječmen					Madonna				
Tiffany	6	7	N	P	Madonna	5	3	N	P
Tiffany	8	3	N	P	Saloon	2	5	N	P
Duet	7	7	P	P	Saloon	6	3	N	P
Duet	8	3	N	P	Scarlett	4	7	N	P
Jolante	6	7	N	P	Scarlett	6	3	N	P
Jolante	7	3	N	P	Kompakt	3	5	N	P
Vilna	7	5	N	P	Kompakt	7	3	N	P
Vilna	8	3	P	P	Ozimá pšenice				
Camera	7	7	N	P	Ebi	6	3	P	P
Camera	8	3	N	P	Ebi	6	1	*	*
Reni	7	5	N	P	Caphorn	6	3	P	P
Reni	7	5	N	P	Caphorn	7	1	*	*
Jarní ječmen					Ilias				
Philadelphia	2	5	N	P	Ilias	7	1	*	*
Philadelphia	6	3	N	P	Triticale				
Jersey	2	7	N	P	Tricolor	5	3	N	P
Jersey	6	3	P	P	Tricolor	7	1	*	*

Stupně projevu:

1 - bez symptomů
 9 - nejsilnější projev BYDV a WDV

ELISA :

P - pozitivní
 N - negativní

* nebylo analyzováno

Práce vznikla za finanční podpory projektu MSM 2532885901.

IDENTIFIKACE KULTIVARŮ MERUNĚK POMOCÍ MIKROSATELITNÍCH PRIMERŮ

IDENTIFICATION OF APRICOT CULTIVARS BY MICROSATELLITE PRIMERS

Eva CHROBOKOVÁ – Jana RADDOVÁ – Miroslav VACHŮN – Boris KRŠKA – Miroslav PIDRA

Microsatellite primers are often used in the studies of identification of cultivars of many species. The total of 16 apricot cultivars maintained in the gene resources collection of Horticultural Faculty in Lednice, Department of Fruit Growing, were analyzed using 10 microsatellite primers. 11 cultivars from Europe, 3 hybrid cultivars (Vesna, Betinka, Vynoslivyj), 1 cultivar from middle-asian eco-geographic group (Priusadėbnyj) and 1 cultivar from iranocaucasian eco-geographic group (Šalah) were analyzed. The dendrogram of genetic similarity was constructed, based on the Jaccard coefficient. In dendrogram four clusters were differentiated. The first cluster contains all european cultivars and one hybrid cultivar Vesna, the crossing of European and middle-Asian cultivar. The second cluster contains middle-Asian cultivar Priusadėbnyj. In the next cluster 2 hybrids Betinka and Vynoslivyj are situated. In the fourth cluster the iranocaucasian cultivar Šalah is localized. All the cultivars analyzed have been successfully distinguished.

Key words: Prunus armeniaca, microsatellite primer, dendrogram, eco-geographic group

Úvod

Meruňky představují významný ovocný druh. Jsou botanicky řazeny do rozsáhlého rodu *Prunus*, který zahrnuje také další agronomicky důležité druhy, jako např. třešně (*P. avium*), višně (*P. cerasus*), švestky (*P. domestica*), slivoně (*P. japonica*), broskvoně (*P. persica*) a mandloně (*P. amygdalus*). Při identifikaci kultivarů mnoha ovocných druhů se dnes úspěšně využívá metoda SSR (*Single Sequence Repeats*; mikrosatelity), využívající amplifikace určitých oblastí DNA. Získané výsledky v podobě SSR profilů odrůd (tzv. mikrosatelitní fingerprinty) umožňují určit podobnost, rozlišení a vztahy mezi jednotlivými genotypy. Jsou proto cenným nástrojem analýz genetické diverzity, jak dokládají výsledky získané jinými autory.

Soubor 212 broskvoní a nektarinek byl testován za použití 16 mikrosatelitních primerů (ARANZANA et al., 2003). Identifikace sledovaných kultivarů byla uskutečněna pomocí 3 vyselektovaných primerů. Celkově bylo rozlišeno 87 % kultivarů.

V práci AHMAD et al. (2004) bylo použito 28 mikrosatelitních markerů pro identifikaci a charakterizaci kultivarů meruněk ke zjištění, zda se meruňka nevyskytuje v rodokmenu kultivarů slivoní. Mikrosatelitní markery dokázaly rozlišit všechny testované položky a díky jejich unikátním fingerprintům je začlenit do skupin (tzv. klastrů). Také RUIZ et al. (2004) testoval 8 mikrosatelitními primery pět meruňkových kultivarů ze Španělska a severní Afriky a dále 15 nových hybridních kultivarů meruněk. U všech mikrosatelitních primerů proběhla úspěšná amplifikace SSR lokusů. Výsledky umožnily molekulární identifikaci všech meruňkových genotypů kromě dvou hybridních kultivarů 'Z109/58' a 'Z108/38'. Zajímavým výsledkem jiné práce bylo, že mikrosatelitní primery poskytly u druhu *Prunus mume* (meruňka japonská) fragmenty, které zároveň obsahují lokus identifikovaný u broskvoní (GAO et al., 2004). Sekvenční podobnost mezi *P. mume* a broskvoní byla v tomto případě 98 %. Kolekce 24 japonských meruněk pocházejících z různých geografických oblastí byla identifikována pomocí 14 mikrosatelitních primerů, které byly vyvinuty pro různé druhy z rodu *Prunus*.

Také vztahy mezi kultivary meruněk z Maďarska a jižní Evropy byly určeny pomocí SSR primerů (ROMERO et al., 2006). Ty byly použity ke studiu 9 kultivarů z Budapešti a 11 kultivarů ze Severní Ameriky a jižní Evropy. Vytvořený dendrogram zobrazil 2 klastry, z nichž jeden zahrnul maďarské kultivary a druhý se dále členil na dvě podskupiny (severoamerické a jihoevropské kultivary). Polymorfismus mikrosatelitních markerů byl dále využit pro sledování genetické diverzity 62 kultivarů meruněk, pocházejících z rozdílných oblastí střední Evropy (MAGHULY et al., 2006). Na základě molekulárně-genetických analýz byl vytvořen dendrogram, ve kterém byly všechny kultivary zařazeny do skupin. Tyto výsledky potvrdily dřívější zařazení genotypů meruněk, získané z RAPD analýz a ze sledování morfologických znaků. Mikrosatelitní a AFLP markery fungovaly také jako nástroj k popisu 6 meruňkových kultivarů a dalších hybridních kultivarů (STRUSS et al. 2006). K analýzám bylo použito 20 primerových párů mikrosatelitních lokusů vyvinutých podle STRUSS a PLIESKE (1998) pro třešeň (*Prunus avium*). Vysoký stupeň polymorfismu mikrosatelitních markerů umožnil rychlou a efektivní identifikaci sledovaných genotypů meruněk.

Metoda SSR byla použita pro rozlišení jednotlivých položek v souboru kultivarů z genofondu meruněk. Cílem bylo nalezení souboru primerů, které by byly schopny rozlišit sledované genotypy a rozdělit je podle ekogeografických skupin. Mikrosatelitní lokusy, vybrané na základě literatury (LOPES et al., 2002; MESSINA et al., 2004; HAGEN et al., 2004), byly použity na vybraném souboru nejrozdílnějších genotypů se záměrem posoudit míru polymorfismu poskytovanou jednotlivými mikrosatelitními primery.

Materiál a metóda

Rostlinný materiál

Pro molekulárně-genetické analýzy bylo vybráno 16 genotypů meruněk, které jsou součástí genofondové kolekce udržované Ústavem ovocnictví na Zahradnické fakultě v Lednici na Moravě, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Jednalo se o následující odrůdy: Strepět, Krasnošćokij Nikitskij, Šalah, VP-LE-118 (Velkopavlovická), Neptun, Priusaděbnj, Marlen, Maďarská C 235, Vesna, Pesci Orias, Luizet, Čačansko zlato, Reumberto, Vynoslivj, Betinka a Pavioť. Tyto položky byly vybrány na základě dřívějších RAPD analýz, ve kterých vykazovaly vysokou genetickou odlišnost.

Izolace DNA

Izolace genomové DNA byla provedena ze zmrazených listů izolačním kitem DNeasy Plant Mini Kit Qiagen. Kvalita a kvantita genomové DNA byla provedena prostřednictvím elektroforézy na 1% agaróze a srovnáním intenzity signálu se standardem λ -DNA.

SSR analýzy

SSR analýzy byly provedeny podle postupů LOPES et al. (2002), MESSINA et al. (2004) a HAGEN et al. (2004). Na základě těchto literárních zdrojů bylo vybráno 10 mikrosatelitních lokusů, které na testovaných souborech kultivarů meruněk poskytovaly nejvyšší míru polymorfizmu. Amplifikační reakce proběhla v objemu 25 μ l a obsahovala: H₂O, 10x Buffer pro Dynazyme DNA Polymerázu (Finnzymes), DNA Polymerázu 5U/ μ l (1 U) (Finnzymes), 25 mM dNTPs (0,1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – Promega, 20 ng templátové DNA. Reakce byly provedeny v termocykleru Biometra® UNO II a Biometra® Tgradient.

Teplotní a časový profil reakce podle LOPES et al. (2002): 1 cyklus 95°C – 300 s, 1 cyklus odpovídající teplota annealingu – 60 s, 1 cyklus 72°C – 60s; 34 cyklů (94 °C – 30 s, odpovídající teplota annealingu – 40 s, 72°C – 40 s), 1 cyklus 96°C – 30 s, odpovídající teplota annealingu – 40 s, 1 cyklus 72 °C – 30 min.

Teplotní a časový profil reakce podle MESSINA et al. (2004): 1 cyklus 94°C – 300 s; 27 cyklů (94°C – 30 s, 56°C – 30 s, 72 °C – 50 s), 1 cyklus 72°C – 480 s.

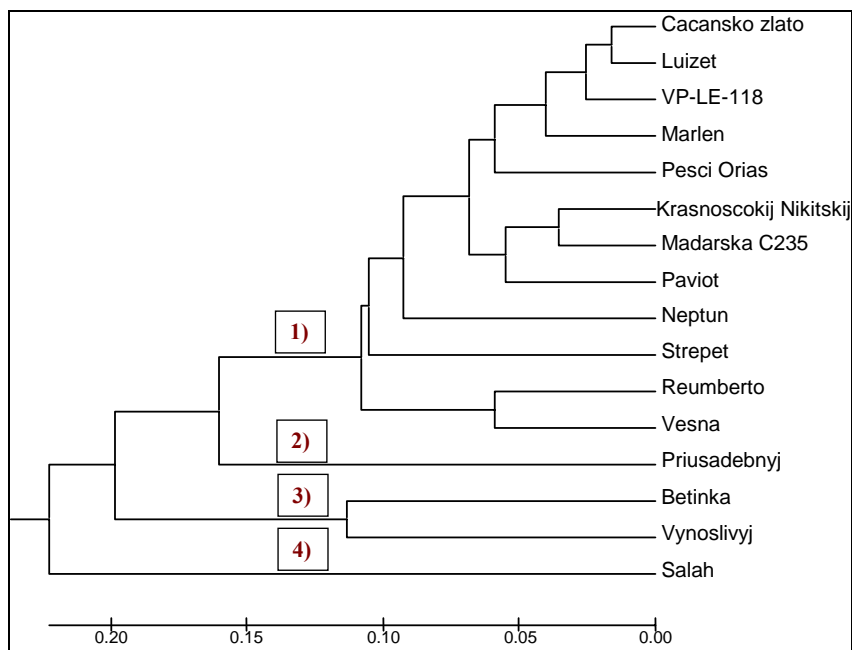
Teplotní a časový profil reakce podle HAGEN et al. (2004): 1 cyklus 94°C – 180 s; 35 cyklů (94°C – 60 s, 55 °C – 60 s, 72°C – 60 s), 1 cyklus 72°C – 300 s.

Pro předběžnou kontrolu úspěšnosti/neúspěšnosti amplifikace byla část objemu reakce nadávkována na 1,5% agarózový gel, vizualizovaný ethidiumbromidem. Produkty amplifikace byly separovány na polyakrylamidovém nedenačurním gelu v TBE pufru na vertikální elektroforéze (90 min, 20 W). Vizualizace produktů byla provedena barvením v TBE pufru s přidáním ethidiumbromidu. Produkty amplifikační reakce byly vyhodnoceny pomocí binární matice, ve které je přítomnost produktu označena jako „1“ a jeho nepřítomnost jako „0“. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu NTSYSpc, kdy z binární tabulky byly vypočítány koeficienty podobnosti (koeficient podle Jaccarda) a výsledný dendrogram genetické odlišnosti odrůd byl sestaven metodou UPGMA.

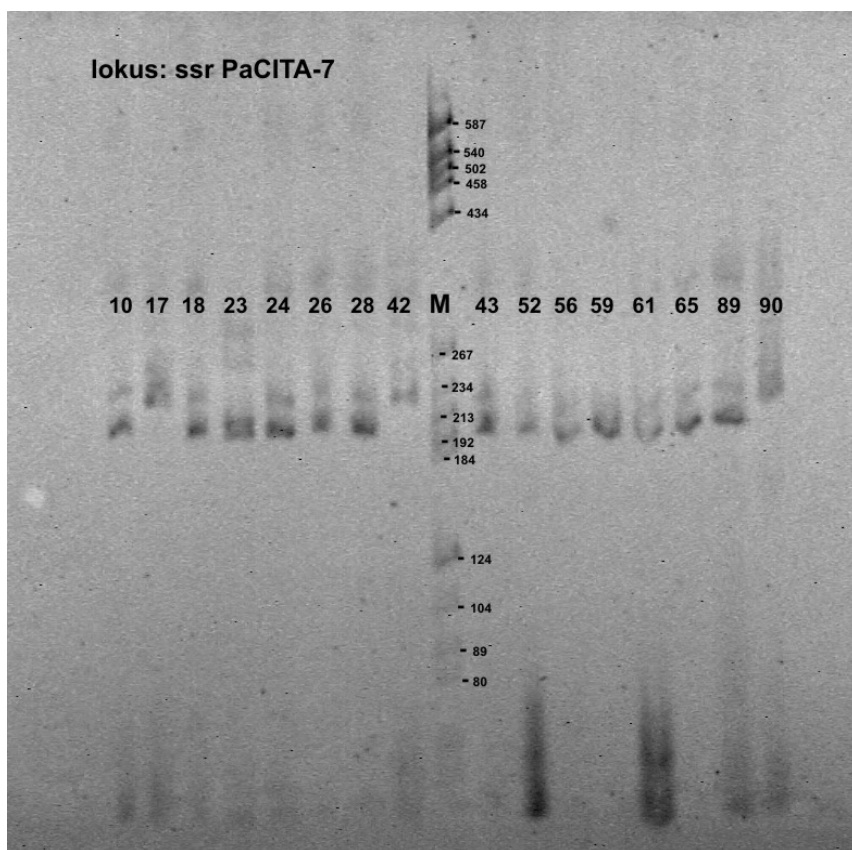
Výsledky a diskuze

Celkem bylo testováno 16 genotypů meruněk pomocí 10 mikrosatelitních lokusů. Jeden mikrosatelitní lokus (ssrPaCITA 15) poskytl uniformní spektrum u všech analyzovaných genotypů (1 alela). Zmíněný mikrosatelitní lokus nevykazoval polymorfizmus ani v souboru nejrozdílnějších genotypů, a z toho důvodu se nebude využívat v následujících analýzách. Ostatní mikrosatelity produkovaly v rámci sledovaných genotypů od 2 do 5 alel. Nejširší spektrum alel bylo detekováno u mikrosatelitního lokusu ssrPaCITA 27 (5 alel). Dále byly nalezeny alely, které se nevyskytovaly u jiných odrůd tohoto souboru: odrůda Vynoslivj (primer UDAp-410, alela 172 bp), Priusaděbnj (primer UDAp-420, alela 172 bp), Betinka (primer UDAp-407, alela 184 bp) a Šalah (primer ssrPaCITA 27, alela 267 bp).

Na základě statistických analýz byl sestaven dendrogram genetické vzdálenosti odrůd (Jaccardův koeficient), ve kterém jsou rozlišeny všechny testované genotypy meruněk (obr. 1). Dendrogram je možno rozdělit na čtyři klastry: v klastru č. 4 je samostatně zařazena odrůda Šalah, která je geneticky významně odlišena od všech ostatních položek. Jedná se o arménskou odrůdu, která se řadí do skupiny iranokavkazských odrůd. KRICHEN et al. (2006) sestavili pomocí 5 mikrosatelitních markerů klíč k identifikaci 54 odrůd meruněk a odrůda Šalah byla rozlišena na základě použití 3 mikrosatelitních primerů EPPCU9566, CPSCT039 a CPSCT024. V klastru č. 3 se nachází hybridní odrůdy Betinka a Vynoslivj. Betinka vznikla křížením odrůd evropského a čínského původu. Vynoslivj je křížením odrůdy evropské a středoasijské. V klastru č. 2 je vyčleněna odrůda Priusaděbnj. Jedná se o středoasijskou odrůdu. Nejrozsáhlejší je klaster č. 1, ve kterém jsou zařazeny odrůdy evropského původu. Pouze hybridní odrůda Vesna představuje křížení odrůdy středoasijské a evropské. Odrůdy Pavioť a Luizet pocházejí z Francie (HAGEN et al., 2002).



Obrázek 1: Dendrogram genetiké odlišnosti 16 odrůd meruněk, založený na UPGMA analýze při použití Jaccardova koeficientu po amplifikaci 10 mikrosatelitními lokusy. Měřítko uvádí stupeň odlišnosti jednotlivých odrůd, interval 5 %.



Obrázek 2: Ukázka elektroforetické separace mikrosatelitních produktů na polyakrylamidovém gelu po amplifikaci mikrosatelitu sssrPaCITA-7.

Vysvětlivky: **M** – hmotnostní standard (velikost produktů v bp); analyzované genotypy: **10** – Strepet, **17** – Krasnošckoj Nikitskij, **18** – Šalah, **23** – VP-LE-118 (Velkopavlovická), **24** – Neptun, **26** – Priusaděbnij, **28** –

Marlen, 42 – Maďarská C 235, 43 – Vesna, 52 – Pesci Orias, 56 – Luizet, 59 – Čačansko zlato, 61 – Reumberto, 65 – Vynoslivij, 89 – Betinka, 90 – Pavlot.

Závěr

V práci jsou prezentovány výsledky SSR analýzy souboru 16 kultivarů meruněk, uchovávaných v genofondové kolekci Zahradnické fakulty v Lednici. Analýza 10 mikrosatelitních lokusů umožnila úspěšné rozlišení a rozdělení jednotlivých genotypů do klastřů v dendrogramu. Na základě vyhodnocení binární tabulky byly vypočítány koeficienty odlišnosti (koeficient podle Jaccarda) a výsledný dendrogram genetické odlišnosti odrůd byl sestaven metodou UPGMA. Významně se podařilo odlišit irano-kavkazskou odrůdu Šalah a středoasijskou odrůdu Priusadėbnj. Obě odrůdy jsou samostatně zařazeny v jednotlivých klastrech. Všechny evropské odrůdy jsou společně umístěny v dalším klastru. Na základě získaných výsledků je možné potvrdit, že většina námi použitých mikrosatelitních primerů vykazuje vysokou rozlišovací schopnost, a proto mohou využity v procesu identifikace kultivarů, popř. v mapování.

Literatura

- ARANZANA, M. - CARBÓ, J. - ARÚS, P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. In: *Theoretical and Applied Genetics* 106 (8) / 2003, s. 1341-1352
- GAO, Z.H. - SHEN, Z.J. - HAN, Z.H. - FANG, J.G. - ZHANG, Y.M. - ZHANG, Z. Microsatellite markers and genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume*). In: *Hortiscience*, 39 (7)/ 2004, s. 1571-1574
- HAGEN, L.S. - CHAIB, J. - FADY, B. - DECROOQ, V. - BOUCHET, J.P. - LAMBERT, P. - AUDERGON, J.M. Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). In: *Molecular Ecology Notes*, 4/2004, s. 742-745
- KRICHEN, L. - BEN MIMOUN, M. - HELLALI, R. Identification and Characterization of Tunisian Apricot Cultivars. In: *Acta Hort.* 701/2006, s. 241-246
- LOPES, M.S. - SEFC, K.M. - LAIMER, M. - DA CÂMARA MACHALO, A. Identification of microsatellite loci in apricot. In: *Molecular Ecology Notes*, 2/2002, s. 24-26
- MAGHULY, F. - BORROTO FERNANDEZ, E. - RUTHNER, S. - BISZTRAY, G.D. - PEDRYC, A. Microsatellite Characterisation of Apricot (*Prunus armeniaca*) Cultivars Grown in Central Europe. In: *ISHS Acta Hort.*, 717/2006, s. 207-212
- MESSINA, R. - LAIN, O. - MARRAZZO, T. - CIPRIANI, G. - TESTOLIN, R. New set of microsatellite loci in apricot. In: *Molecular Ecology Notes*, 2004, primer note
- ROMERO, C. - LLÁCER, G. - BADENES, M.L. Relationship among Apricot Cultivars from Hungary and a South European Pool Determined by SSR Markers. In: *Acta Hort.*, 701/2006, s. 233-240
- RUIZ, D. - SÁNCHEZ-PÉREZ, R. - DICENTA, F. - EGEEA, J. - MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Molecular Characterization of Apricot Cultivars and New Breeding Lines Using SSRs. In: *Acta Hort.*, 663 (2)/ 2004, s. 647-649
- STRUSS, D. - AMAN, M. - AHMAD, R. - SOUTHWICK, S.M. Identifying Cultivars and Genetic Diversity of Apricot by Molecular Markers. In: *Acta Hort.*, 701/2006, s. 253-255
- STRUSS, D. AND PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. In: *Theor Appl Genet*, 97 (1-2)/1998, s. 308-315

VLIV GENOTYPU NA OBSAH AKRYLAMIDU V PRAŽENÝCH CEREÁLIÍCH THE EFFECT OF GENOTYPE ON ACRYLAMIDE CONTENT IN ROASTED CEREALS

Ondřej JIRSA – Veronika BARTÁČKOVÁ – Jana HAJŠLOVÁ – Petr BUCHER – Petr MARTINEK

Roasted cereals rank among foods that are treated with high temperatures, which results in acrylamide (AA) formation. The present study was focused on the content of AA precursors in initial raw material and the effect of roasting parameters on AA content in cereals. Two cultivars of barley, two cultivars of wheat and one cultivar of rye were examined. The wheat and barley cultivars were managed under three growing treatments and barley also after three preceding crops. Grain samples were roasted using a laboratory roaster. During roasting, the AA content was gradually increasing and then decreasing along with rising temperature as well as time of roasting. Remarkable effects of the crop and genotype on the formation and formation course of AA during roasting, and specific responses of individual crops and cultivars to the roasting temperature and time were determined. In general, the lowest amount of AA was produced in barley, followed by rye, and the highest content of AA was formed in wheat. In rye, the highest increase in AA was recorded after short roasting time, 15 minutes at the temperature of 150°C. It indicates that the roasting course is similar to that in coffee. In wheat, the decrease in AA content with the roasting time and temperature was not as pronounced as in rye. Preceding crops and crop management practices did not significantly affect the AA content.

Key words: acrylamide, cereals, roasting

Úvod

Zjištění výskytu poměrně vysokých koncentrací akrylamidu (AA) v běžně konzumovaných potravinách vyvolalo velkou pozornost odborníků na bezpečnost potravin, protože se jedná o látku považovanou za pravděpodobný karcinogen pro člověka (IARC, 1994) a navíc i o účinný neurotoxin. Jeho přítomnost byla potvrzena v mnoha druzích tepelně zpracovaných potravin, zejména v kávě, cereálních produktech (pražených sladech, kávovinách, chlebové kůrce) a smažených bramborových výrobcích.

Ke vzniku AA v potravinách dochází v průběhu tepelného zpracování. Za hlavní mechanismus je všeobecně považována reakce mezi volným asparaginem a karbonylovými sloučeninami (hlavně redukujícími sacharidy) jako součást Maillardovy reakce. Během této reakce vzniká řada velmi reaktivních karbonylových sloučenin, které reagují vzájemně a také s přítomnými aminosloučeninami. Kromě reakcí vedoucích ke vzniku AA probíhají v potravinách také eliminační reakce, kdy AA reaguje s velkým počtem potravinových složek. Hladina AA klesá po překročení určité teploty, neboť rychlost jeho eliminace převyšuje rychlost jeho tvorby (CIESAROVÁ, 2005).

Množství vzniklého AA je závislé na množství asparaginu a dostupnosti a typu redukujících sacharidů. Tvorba AA začíná při teplotě nad 100 °C, s rostoucí teplotou v rozmezí 120 až 210 °C se zvyšuje, ale zároveň stoupá i rychlost jeho degradace (FRIEDMAN, 2003). Většina AA se nahromadí v konečných fázích pečení, grilování nebo smažení kdy se snižuje vlhkost potraviny a zvyšuje se povrchová teplota. Výjimkou je káva, u které se obsah AA významně snižuje v pozdějších fázích pražení, kdy převládají eliminační reakce.

Článek se zabývá sledováním vlivu genotypu a podmínek pěstování na obsah prekurzorů AA a vlivu podmínek pražení obilovin na obsah AA.

Materiál a metody

Pro pokus byly vybrány dvě odrůdy jarního ječmene Bojos (krmný), Prestige (sladovnický), dvě odrůdy ozimé pšenice Ebi (kvalita A), Rapsodia (kvalita C) a odrůda ozimého žita Dankowskie Nowe, které byly sklizeny v roce 2007. Odrůdy ječmene byly pěstovány po třech předplodinách: cukrovce, obilovině a řepce, odrůdy ozimé pšenice a žita byly pěstovány po předplodině obilovině. Všechny varianty (odrůdy, předplodina) byly pěstovány při třech intenzitách: nízké (L), střední (M) a vysoké (H), které se lišily aplikací hnojiv, fungicidů a morforegulatorů růstu.

U vybraných vzorků zrna z výše uvedených pokusů byly stanoveny: hmotnost 1000 zrn (HTZ), objemová hmotnost (OH) a obsah dusíkatých látek (N-látky) v zrně Dumasovou metodou ($N \times \text{koefficient } 5,7$). Ve vzorcích šrotu byl stanoven obsah asparaginu metodou HPLC-FLD. Mezi zjišťovanými znaky byly zjištěny korelační závislosti. Analýza obsahu cukrů (glukosa, fruktosa a sacharosa) byla provedena ve VÚB Havlíčkův Brod. Obsah AA v pražených obilovinách byl stanoven ve VŠCHT Praha.

Pro stanovení vlivu teploty a doby pražení na obsah AA byly vybrány varianty kontrastní v obsahu N-látek a asparaginu (obr. 1).

S vybranými vzorky bylo provedeno zkoušení vlivu doby pražení (15, 30, 45 a 60 minut při teplotě 150 °C) a vlivu teploty pražení (150, 160, 170, 180 a 190 °C po dobu 15 minut). Jednalo se o následující varianty: Bojos po cukrovce při vysoké intenzitě pěstování, Prestige po řepce při nízké intenzitě pěstování, Dankowskie Nowe

po obilovině při střední a vysoké intenzitě pěstování, Rapsodia po obilovině při nízké intenzitě pěstování, Ebi po obilovině při vysoké intenzitě pěstování (obr. 2).

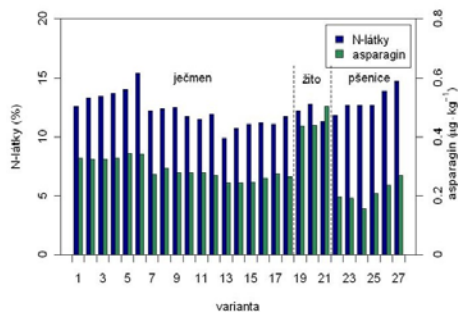
Pražení vzorků bylo provedeno na pražiči PRE 1 Z (Probat). Všechny vzorky byly praženy z výchozí teploty 150 °C na maximální teplotu 190 °C. Doba pražení činila 15 až 20 min, až byla dosažena standardní barva. Pro stanovení vlivu teploty a doby pražení na obsah AA byly vybrány pro každou předplodinu dva vzorky, s nižším a vyšším obsahem N-látek. Časová závislost byla sledována při teplotě pražení 150 °C a dobách 15, 30, 45 a 60 min. Teplotní závislost byla stanovena při době pražení 15 min a teplotách 150, 160, 170 a 180 °C.

Výsledky a diskuse

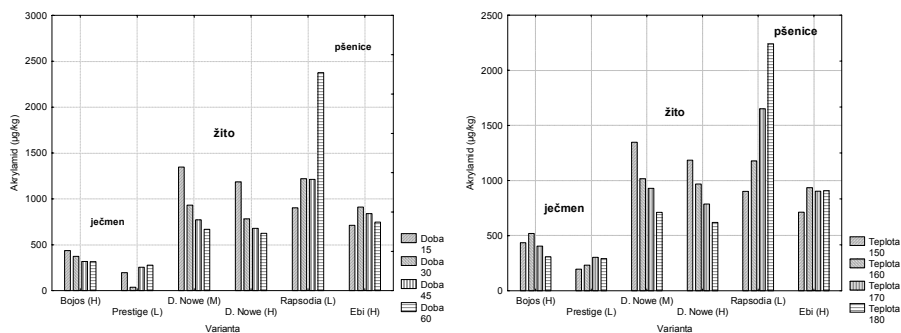
Obsah asparaginu významně koreloval s HTZ ($r = -0,89$) a OH ($r = 0,83$). Obsah AA ve vzorcích pražených na 190 °C významně koreloval s obsahem asparaginu ($r = 0,68$), HTZ ($r = -0,70$) a OH zrna ($r = 0,81$).

Jednotlivé plodiny a odrůdy reagovaly specificky na teplotu a dobu pražení (obr. 2). U ječmene se pražením vytvářelo nejméně AA. U žita byl obsah AA nejvyšší po krátké době pražení 15 minut při teplotě 150 °C a pak klesal s teplotou i časem. Byly zjištěny rozdíly mezi odrůdami Ebi a Rapsodia. U nepotravinářské odrůdy Rapsodia byl nárůst obsahu AA velký, u potravinářské odrůdy Ebi malý.

Po počátečním vzestupu obsahu AA docházelo se zvyšující se teplotou a rovněž i s dobou pražení u hodnocených genotypů (s výjimkou odrůdy Rapsodia) ke zpomalení, zastavení nebo poklesu obsahu AA. Pokles obsahu AA u žita ukazuje na určitou podobnost s průběhem pražení kávy. Změny koncentrací obsahu AA během pražení zrna ukazují na výrazný vliv analyzovaných genotypů (plodiny a odrůdy), který byl potvrzen intervaly spolehlivosti provedených měření.



Obrázek 1: Pro stanovení vlivu teploty a doby pražení na obsah AA byly vybrány varianty podle obsahu N-látek a asparaginu



Obrázek 2: Vlevo: vliv doby pražení na obsah AA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) v zrna při konstantní teplotě 150 °C; vpravo: vliv teploty pražení na obsah AA v zrna při stejné době pražení 15 min.

Závěr

Pražané obiloviny nacházejí uplatnění např. jako náhražky kávy, přísady do pečiva (barvení) nebo součást dalších cereálních výrobků. Proto je nutné sledovat vliv technologie zpracování z hlediska vlivu na zdraví spotřebitele. Byl zjištěn výrazný vliv plodiny a odrůdy na tvorbu AA, vliv předplodiny a pěstitelské technologie nebyl průkazný. Složitost vztahu mezi obsahem AA a teplotními zásahy ukazují specifické reakce analyzovaných genotypů na teplotu a dobu pražení.

Práce byla podpořena projektem MŠMT České republiky č. 2B06168.

Literatura

- CIESAROVÁ, Z. (2005): Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách. Chem. Listy 99, 483-491.
 FRIEDMAN, M. (2003): Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. J. Agric. Food Chem. 51(16), 4504-4526.
 IARC (1999): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 60 Some industrial chemicals.

ŠLECHTĚNÍ SALÁTU V ČESKÉ REPUBLICE BREEDING OF LETTUCE IN THE CZECH REPUBLIC

Kateřina KARLOVÁ – Karel DUŠEK

*The breeding of lettuce (*Lactuca sativa* L.) has a long history in the Czech Republic because lettuce is one of the traditional vegetable species there. After the collapse of Communist governments and opening of free market with seeds a lot of foreign varieties (especially from the Netherlands) of all vegetable species glutted the markets. Czech breeders lived a hard period at that time and couple of traditional breeding companies came apart, so only four national breeding and seed producing companies interested in lettuce stayed alive up today.*

In current National list of varieties listed in the State Variety Book there are 94 lettuce varieties presently which consist of 68 butterhead lettuces, 23 crisphead lettuces and 3 roman lettuces. The oldest variety still recommended for production is winter crop variety 'Altenburský' which was registered in 1941 (!) and there are 5 another varieties older than 30 years but after all the majority of listed varieties (69) come from last ten years. Some Czech origin lettuce varieties, for example 'Král Máje', 'Lednický', 'Dětenická atrakce' and 'Smaragd "S"' became very famous in all the Europe and it were used for breeding of many modern cultivars.

Key words: lettuce, breeding, variety

Úvod

První zmínky o odrůdách salátu v českých zemích pocházejí z počátku 19. st. (Moravec, Kvasnička 1969) a cílem tohoto příspěvku je podat stručný přehled o vývoji českých odrůd od této doby do současnosti a připomenout i pracoviště, kde tyto odrůdy vznikaly a vznikají.

Materiál a metody

S ohledem na informativní charakter příspěvku byla použita pouze metoda kompilace informací z níže uvedených pramenů.

Výsledky a diskuze

První zmínka o odrůdách salátu v českých zemích byla nalezena v pražském semenářském katalogu (J. F. Convalina) z r. 1811, kde byly nabízeny odrůdy jako francouzský s mačinkami rozpjatými, tentýž kadeřavý, hlávkový (raný, žlutý, vraný, velký listu červeně obroubeného aneb berlínský), hlaváč největší aneb Mogolova palice, hlavatý švejdský, hlávkový z červena poskvrněný atd. V první pol. 19. st. byl u nás salát již všeobecně rozšířen, protože Magdalena Dobromila Rettigová v 6. vydání domácí kuchařky (1953) uvádí, že „netřeba psátí, jak se má hlávkový salát dělat“.

J. DUMEK (1874) uvádí třídění salátů na kamenáč, letní hlávkový salát, zimní hlávkový salát a salát polní. Pod pojmem kamenáč rozumí nejranější, jehož semeno se vysévá v únoru do pařeniště a sazenice se pak vysazují ven. Kamenáče rozděluje na dvě formy – se žlutavými nebo s jemně zelenými listy. Kamenáč byl oblíben a rozšířen, protože netrpěl nepříznivým počasím a měl pevné hlávky. U letního salátu je uvedena poznámka o mnoha odrůdách, ale bohužel nejsou vyjmenovány. Zimní hlávkový salát autor rozděluje na malý a velký, zelený, hnědý i žlutavý (MORAVEC, KVASNIČKA 1969). V tomto období však nelze hovořit o „odrůdách“ v pravém smyslu slova – jednalo se spíše pouze o různé formy a morfotypy salátu.

SITENSKÝ (1924) uvádí odrůdy k rychlení ('Císařský', 'Ideal', 'Universal', 'Kamenohlávek'), rané polní ('Král máje', 'Kamenohlávek', 'Prváček', 'Rudolfův', 'Tvrdohlávek', 'Struhovitý'), letní ('Turnovský tvrdohlávek', 'Perpighanský', 'Svéhlavec', 'Triumf', 'Lublaňský'), zimní ('Nansen', 'Máselník', 'Zimní žlutý') a dále salát k trhání, římský, chřestový a listový neboli k řezání ke sklizni, když rostlina vytvoří 4-5 listů (MORAVEC, KVASNIČKA 1969). Z použitých názvů jasně vyplývá, že u většiny ze jmenovaných odrůd se jedná o krajové odrůdy, které dostávaly názvy podle svých charakteristických vlastností, nebo místa svého pěstování.

Počátky cíleného šlechtění salátu v českých zemích lze datovat přibližně na přelom 19. a 20. st. Šlechtění se v této době věnovaly zemědělské školy i podniky, soukromé šlechtitelské stanice a od r. 1919 vznikaly i státní a zemské výzkumné ústavy a stanice (BAREŠ a kol. 2001). Z krajového salátu Dačického z pardubicka byl Zemským ústavem pro zušlechťování rostlin v Přerově r. 1915 selekcí vyšlechtěn 'Hanácký letní' a z odrůdy 'Bzenecký' byl Sekcí pro zušlechťování rostlin Zemských ústavů zemědělských v Brně vyšlechtěn 'Gourmand'. Odrůdy k rychlení se většinou řadily do skupiny buď rychlíků, nebo kamenáčů. Landovský uvádí v Zahradnickém slovníku (1942) řadu krajových odrůd pro rychlení ('Císařský', 'Kamenáček zelený', 'Kamenáček zlatožlutý', 'Dvorského jubilejní') a odrůdy letní ('Kutnohorský', 'Kamenáč velký', 'Bzenecký', 'Vavřínecký', 'Hradecký miláček', 'Pstruhovitý', 'Kudrnův letní'. Ze zimních salátů byl známý 'Div poděbradský', zvaný i 'Poděbrad' (Moravec, Kvasnička 1969) a řada dalších krajových odrůd a ekotypů, jejichž přesný původ nebyl znám. Jako příklady lze uvést 'Novosidelský', 'Kunovický', 'Slovenský krajový', 'Herkules', 'Lešenský', 'Lešenský poděbradský', 'Hansen', 'Z Hradiště', 'Rychlík z Hradiště', 'Lešenský rychlík' a další (BETLACH 1964).

Staré krajové a nově vyšlechtěné odrůdy všech plodin byly ministerstvem zemědělství postupně oficiálně registrovány. Zpočátku byly registrace odrůd ručně zapisovány do Knihy původních odrůd osiv a sádí (kniha je uložena v ÚKZÚZ v Brně a první zápis je datován 1921), později, zřejmě v období založení ÚKZÚZ (1951), do Státní odrůdové knihy, která svou funkci plní dodnes (KRMELOVÁ 2008). Státní odrůdová kniha je úředním seznamem odrůd rostlin, které jsou v České republice zaregistrovány pro uznávání a uvádění do oběhu, a obsahuje i údaje o adresách udržovatelů odrůd a držitelů šlechtitelských práv (Seznam odrůd ... 2008). V Úřední listině Protektorátu Čech a Moravy ze dne 2.7.1941 byla zveřejněna dvojjazyčná vyhláška ministerstva zemědělství, kterou byla na našem území vydána první listina povolených odrůd zemědělských plodin (LPO) a v tomto seznamu byly uvedeny i zušlechtěné původně krajové odrůdy salátu hlávkového 'Dašický', 'Kutnohorský letní' a 'Průhonický červený' (LUŽNÝ, PETŘÍKOVÁ, 2005a). LPO (v průběhu let pod různými názvy), která každoročně uváděla seznam odrůd všech zemědělských plodin, které byly vyzkoušené a v daném roce povolené pro množení (LPO 1948), vychází dodnes a všechny zápisy, změny a doplňky zápisů jsou průběžně zveřejňovány ve Věstníku ÚKZÚZ (Seznam odrůd ... 2008).

V r. 1948 např. uváděla LPO celkem 19 odrůd salátu. Jednalo se o salát k rychlení 'Selecty Stupický Kamenáč' (1), 'Boettnerův', 'Jánský Kamenáč' (Kr), 'Král Máje', 'Victoria', raný 'Hanácký' (2), 'Višňovský Gourmand' (3), 'Kráj Máje polní', letní 'Atrakce', 'Bohemia', 'Kutnohorský' (Kr), 'Průhonický červený' (Kr), zimní 'Altenburský', 'Nansenův', 'Hnědý', 'Máslový', k olamování 'Americký hnědý' a 'Australský žlutý' a k trhání 'Máslový s vydutými listy'. Číslo v závorkách udává příslušného šlechtitele odrůdy (1 – Selecta, společnost pro pěstování osiv a sádí, Praha; 2 – Zemský ústav pro zušlechťování rostlin, Přerov; 3 – Zemské výzkumné ústavy zemědělské, Brno), zkratka Kr znamená odrůdu krajovou a neoznačené odrůdy byly přihlášeny jako kmenové. Odrůdy krajové a kmenové nepříslušely žádnému určitému šlechtitelskému podniku (LPO 1948).

V poválečném období let 1945-1947 byla řada zemědělských a samozřejmě i zahradnických podniků zkonfiskována a po několika reorganizacích nastalo období centrálního řízení výroby, hospodářských podniků, ŠS, množení i výzkumných ústavů (LUŽNÝ 2005).

Listina povolených odrůd byla každoročně aktualizována – byly vyřazovány odrůdy již překonané, které už nespĺňovaly stanovené požadavky a doplňovány byly odrůdy nové. Např. v r. 1962 bylo v LPO uvedeno již pouze 10 odrůd (k rychlení 'Böttnerův', 'Kamýk', 'Prostějovský Rychlík', 'Rudnický' a 'Stupický Kamenáč', raný 'Veltruský Král máje' a 'Mělnický Král máje', letní 'Dětenická Atrakce', 'Bohemia' a 'Průhonický červený' a salát k přezimování 'Altenburský') a tento stav setrval jen s drobnými odchylkami až do r. 1983, kdy se počet povolených odrůd rozrostl až na 21 včetně osmi zahraničních odrůd povolených pro dovoz osiva. Další větší nárůst byl zaznamenán v r. 1987 – LPO uváděla 31 odrůd salátu včetně deseti zahraničních.

Politické změny po roce 1990 přinesly konec centrálního řízení, cenové regulace a zajišťování odbytu produktů zahradnické výroby. Přestalo fungovat monopolní postavení organizací, mnohé centrální zahradnické podniky zanikly, nebo se rozčlenily na menší závody, některé objekty byly restituovány, jiné privatizovány. Uvolněním mezinárodního obchodu se podstatně zvýšil konkurenční tlak zahraničních firem, na což naše domácí zelinářská výroba nebyla vůbec připravena. Atraktivní nabídka a dobrá obchodní strategie pestrého sortimentu vizuálně i cenově lákavých produktů předčily domácí české výrobky. Zahraniční import zastihl české zahradnictví nepřipravené a neschopné adekvátně na nově vzniklou situaci reagovat (LUŽNÝ, PETŘÍKOVÁ 2005b).

Tato problematičká situace se promítla i do stavu českého šlechtění salátu a zastoupení domácích odrůd v LPO. V r. 1994, kdy se oproti 36 povoleným odrůdám z r. 1993 počet odrůd uvedených v LPO rozšířil na 62, byla u nadpoloviční většiny těchto odrůd (35) přihlašovatelem zahraniční firma. 30 odrůd pocházelo z Holandska, 5 z Německa – z českých firem měla největší podíl Sempra Praha a.s. (13 odrůd) a Semo, ŠS zelenin s.r.o., Smržice (12 odrůd). U zbylých odrůd patřila vlastnická práva firmám VÚRV Praha-Ruzyně, ŠUP Troubsko – ŠS Libochovice, SEVA FLORA, s.r.o. Valtice a Výzkumný a šlechtitelský ústav zelinářský Olomouc. Ačkoli byl v této době počet šlechtitelských pracovišť v ČR silně zredukován, jejich odborná úroveň a dosahované výsledky byly velmi dobré. Dokladem jsou desítky nových českých odrůd zelenin z této doby, s kvalitou srovnatelnou, ne-li vyšší, než dovážené odrůdy zahraniční – u nás často neověřené a pro naše pěstitelské podmínky mnohdy nevhodné. Za období 1991 – 2002 bylo v ČR vyšlechtěno až 170 původních odrůd zelenin včetně F1 hybridů (Lužný, Petříková 2005b). Na tomto množství se samozřejmě podílel i salát – v uvedeném období bylo v ČR registrováno 30 nových českých odrůd. Největší podíl na těchto odrůdách měla firma Semo Smržice, s.r.o., která v tomto období k registraci přihlásila 19 odrůd. Dalšími přihlašovatelemi byly firmy Moravoseed, s.r.o. (7 odrůd) a Selgen, a.s., Sempra Praha, a.s., Sempra Olomouc, a.s. a Seva-Flora, s.r.o. (každá po 1 odrůdě). Současně bylo ale v tomto období v ČR registrováno 95 odrůd salátu ze zahraničí (86 z Nizozemí, 5 z Itálie a po jedné z Německa a Slovenska) a tento poměr mezi českými a zahraničními odrůdami nelze označit jinak než smutný.

Po vstupu ČR do Evropské unie (2004) byla distribuce zahraničního osiva ještě usnadněna - odrůdy registrované v jiném státě EU již nemusely být ČR registrovány znovu (KRPEŠOVÁ 2008). Počáteční dramatická expanze zahraničních odrůd však již našťestí pominula a čeští zákazníci se začali opět vracet k českým odrůdám.

Ke dni 15.6.2008 je v Seznamu odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize uvedeno 94 odrůd salátu, z nichž 68 odrůd představuje salát hlávkový, 23 odrůd salát listový a 3 odrůdy salát římský. Vzájemný poměr českých a

zahranických odrůd se výrazně změnil. 60 odrůd, které vyšlechtili a udržují české firmy (25 – Semo, s.r.o., 19 – Moravoseed, s.r.o., 9 – Seva-Flora, s.r.o. a 7 – Sempra Praha, a.s.; několik odrůd je současně udržováno 2-3 firmami současně) ku 42 odrůdám zahraničním (30 – Nizozemí, 8 – Itálie, 2 – Francie a po jedné odrůdě Německo a Slovensko) znamená jistě příjemný posun. Nejstarší dosud platnou odrůdou je zimní salát 'Altenburský', který byl registrován již v roce 1941 (!) a dosud nebyl překonán. Také dalších 5 odrůd je starších třiceti let, ale hlavní podíl tvoří samozřejmě odrůdy vyšlechtěné v posledních 10 letech (Seznam odrůd ... 2008).

Vzhledem k nepřehledné škále tvarů, barev a velikostí se šlechtění salátu dnes zaměřuje především na rezistenci k chorobám nebo na speciální použití. To zahrnuje například některé velmi rané odrůdy salátu určené pro sklizeň ve stadiu baby-leaf do salátových směsí (Krpešová 2008). Ačkoliv i dnes trvá vyšlechtění nové odrůdy salátu 5 až 10 let, životnost odrůd na trhu se, až na vzácné výjimky, stále zkracuje (Vondrášková 2003). Hlavní příčinou je ale u salátu vysoký infekční tlak patogenů, kteří stále rozšiřují území svého výskytu a stále vznikají jejich nové rasy. Jedním z nejproblematictějších je plíseň salátová (*Bremia lactucae*), která se jen v Evropě vyskytuje v minimálně 24 agresivních rasách. Infekční tlak patogenů je tak silný, že i moderní odrůdy, patogenům rezistentní, si svoji rezistenci uchovávají pouze jeden až tři roky od svého uvedení na trh (Vondrášková 2003). Po této době rezistence upadá, nebo se objevuje nová agresivní rasa patogena, proti které už odrůda odolná není.

Závěr

Závěrem lze říci, že šlechtění salátu má v ČR bohatou historii a některé původní české odrůdy, např. 'Král Máje', 'Lednický', 'Dětenická atrakce' a 'Smaragd "S"', byly velmi úspěšné i v Evropském měřítku a podílely se na vzniku mnoha dalších odrůd.

Literatura

- BAREŠ, I.; VLASÁK, M.; STEHNO, Z.; DOTLAČIL, Z.; FABEROVÁ, I.; BARTOŠ, P. 2002. 50 let studia genofondu pšenice (rodu *Triticum* L.) ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni. In: Faberová, I. (ed.) Historie a současný stav práce s genofondem v ČR. Sborník referátů ze semináře Historie a současný stav práce s genofondy v ČR, 11. listopadu 2001, Olomouc. Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, „Genetické zdroje č. 86“, VÚRV Praha 2002, s. 43-58, ISBN: 80-86555-14-3
- BETLACH, J. 1964. Vyšlechtění zimního salátu. Olomouc, 11 s. + 9 příl. Informační zpráva. Výzkumný ústav zelinářský.
- KRPEŠOVÁ, N. 2008. Rozšíření sortimentu odrůd salátu v roce 2008. Zahradnictví 7/2008, Profi Press, s.r.o. s. 16-17. ISSN 14143781.
- LISTINA POVOLENÝCH ODRŮD 1948, 1962, 1983, 1987, 1991 - 2002
- LUŽNÝ, J. 2005. Pohled do historie a tradic pěstování a šlechtění zeleniny III. Zahradnictví 10/2005, Profi Press, s.r.o. s. 42-43. ISSN 14143781.
- LUŽNÝ, J.; PETŘÍKOVÁ, K. 2005a. Pohled do historie a tradic pěstování a šlechtění zeleniny II. Zahradnictví 9/2005, Profi Press, s.r.o. s. 39-41. ISSN 14143781.
- LUŽNÝ, J.; PETŘÍKOVÁ, K. 2005b. Pohled do historie a tradic pěstování a šlechtění zeleniny V. Zahradnictví 12/2005, Profi Press, s.r.o. s. 48. ISSN 14143781.
- MORAVEC, J.; KVASNIČKA, S. 1969. Zhodnocení světového sortimentu salátu. Olomouc, 49 s. + 54 příl. Závěrečná zpráva. Výzkumný ústav zelinářský.
- Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize k 15.6.2008. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2008. [on-line] Dostupné na: <http://www.ukzuz.cz/Articles/4178-2-Seznam+odrud+zapsanych+ve+Statni+odrudove+knize+.aspx> [cit. 13.10.2008]
- VONDRÁŠKOVÁ, Š. 2003. Strategie šlechtění salátu. Zahradnictví 11/2003, Profi Press, s.r.o., s. 10. ISSN 14143781.

Poděkování: Příspěvek vznikl za podpory Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity (E – 79/01 – 3160 – 0200).

MOLEKULÁRNA DETEKCIA PUROINDOLÍNOVÝCH GÉNOV PŠENICE MOLECULAR DETECTION OF THE PUROINDOLINE GENES IN WHEAT

Lenka KLČOVÁ

Puroindolines are lipid-binding proteins associated with grain hardness. In wheat, Pina and Pinb genes are located on the short arm of 5D chromosome. The soft grain texture in wheat is a result of both puroindoline genes being in the active form and bound to starch. In the case of one of the puroindolines is either absent or altered by mutation, the result is a hard texture. Deletion in Pina (Pina-D1b) and glycine to serine sequence change at position 46 (Pinb-D1b) are the most frequent mutations. We optimised the method for the most common Pin alleles detection. This way of hardness characterisation is going to be used in Slovak and Czech wheat cultivars screening.

Key words: hardness, Pina and Pinb alleles, puroindoline, wheat

Úvod

Jednou z hlavných vlastností pri určení koncového využitia pšenice je tvrdosť zrna. Súvisí s poškodením škrobu počas mletia a so schopnosťou absorbovať vodu. Škrob tvrdých zŕn sa láme intenzívnejšie. Mäkké pšenice majú nižší obsah proteínov (MARTIN et al., 2001). Všeobecne sa múka z tvrdých pšeníc používa na výrobu chleba, z mäkkých na výrobu koláčov a jemného pečiva. Hlavný gén pre tvrdosť zrna (*Ha-Hardness*) bol lokalizovaný na krátkom ramene 5D chromozómu (LAW et al., 1978). Mäkká forma je dominantný, jednoducho dedený znak. Alely *Ha* génu sa tiež nachádzajú na 5A a 5B chromozóme, ale neexprimujú sa. Proteín friabilín je viazaný na povrchu škrobových zŕn a spája sa s *Ha* lokusom. V nadbytočnom množstve sa nachádza pri mäkkých pšenicach, v malom množstve pri tvrdých a vôbec sa nenachádza v *Triticum durum* (GREENWELL a SCHOFIELD, 1986). BLOCHET et al. (1993) izolovali proteíny, ktoré viažu lipidy a nazvali ich puroindolíny. Sú bázické, bohaté na cysteín a majú antimikrobiálne účinky. GAUTIER et al. (1994) izolovali cDNA korešpondujúcu s génmi purindolín A (*Pina*) a puroindolín B (*Pinb*). Mäkká štruktúra zrna je podmienená aktívnou formou oboch *Pin* génov. Ak je jeden z puroindolínov zmenený alebo chýba, zrno má tvrdú štruktúru (MORRIS, 2002). Tretou časťou friabilínového komplexu je *GSP* proteín (grain softness protein). Patrí k rovnakej skupine bielkovín, ale nemá významný podiel na tvrdosti zŕn (GIROUX a MORRIS, 1997). Doteraz sa popísalo 8 *Pina* alel (mäkká *Pina-D1a*, mutované *Pina-D1b, c, g, l, m, n, p*) a 12 *Pinb* alel (mäkká *Pinb-D1a*, mutované *Pinb-D1b, c, d, e, f, g, p, t, u, v, w*) (MIKULÍKOVÁ, 2007). Najbežnejšie mutácie v *Pin* géne sú *Pina-D1b* – delécia (nulová) a *Pinb-D1b* – zmena glycínu na serín v polohe 46 (BHAVE a MORRIS, 2008). Naším cieľom bolo optimalizovať podmienky molekulárnej detekcie týchto mutácií, čo sa využije pri charakterizácii puroindolínových génov slovenských a českých odrôd pšenice.

Materiál a metódy

Použili sme primery *Pina-D1-F* (5'-CCCTGTAGAGACAAAGCTAA-3'), *Pina-D1-R* (5'-TCACCAGTAATAGCCAATAGTG-3'), *Pinb-D1-F* (5'-ATGAAGACCTTATTCCTCCTA-3'), *Pinb-D1-R* (5'-TCACCAGTAATAGCCACTAGGGAA-3'), *Pinb-glyR* (5'-CTCATGCTCACAGCCGCC-3'), *Pinb-serR* (5'-CTCATGCTCACAGCCGCT-3') (GAUTIER a kol., 1994; TRANQUILLI a kol., 1999; GIROUX a MORRIS, 1997). Testovali sme rôzne podmienky a priebeh PCR reakcie. Optimalizácia prebiehala na kontrolných odrodách pšenice so známym alelickým zložením (tab. 1). DNA bola izolovaná zo 100 mg mladých listov DNeasy Plant Mini Kitom (Qiagen). Amplifikáciu sme uskutočnili za prítomnosti *Taq*-DNA polymerázy (Invitrogen) v termocykleri PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham). Elektroforetická separácia PCR produktov prebiehala v 1,4 % agarózovom géli po farbení etídium bromidom.

Výsledky a diskusia

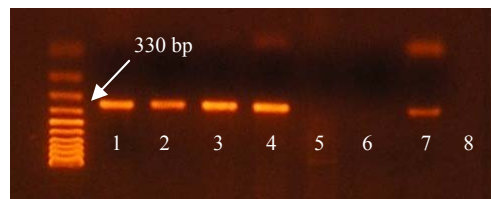
Pri všetkých použitých primeroch sme upravovali zloženie reakčnej zmesi (množstvo primeru, dNTP, polymerázy) a objem reakcie. Optimalizovaná PCR reakcia prebiehala v objeme 15 µl so zložením: 25 ng DNA, 1x PCR reakčný tlmivý roztok, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 200 nM primery, 0,8 U *Taq*-DNA polymerázy. V rámci anelácie sme testovali teploty 55-58 °C. Amplifikačné podmienky pre *Pina*: úvodná denaturácia 3 min pri 94 °C; 37 cyklov: 90 s pri 94 °C, 90 s pri 55 °C, 2 min pri 72 °C; záverečná polymerizácia 10 min pri 72 °C. Pre *Pinb* je vhodná anelačná teplota 58 °C, inak platia rovnaké podmienky amplifikácie. PCR produkt alely *Pina-D1a* má dĺžku 330 bp, pri alele *Pina-D1b* sa neamplifikuje žiadny produkt (obr. 1). Potvrdili sa *Pina-D1a* alely v odrode Bolero, Brasilia, Pascal a Saliente, mutovaná *Pina-D1b* alela v odrode Amidon. V rozpore s udávanou *Pina-D1b* alelou odrody Eridano (GAZZA et al., 2005) sme v nej potvrdili *Pina-D1a*. Dĺžka PCR produktu amplifikácie celého *Pinb* génu je 447 bp. Na rozlíšenie *Pinb-D1a* a *Pinb-D1b* alely sme použili primery *Pinb-glyR/Pinb-serR* (GIROUX a MORRIS, 1997) v páre s *Pinb-D1-F*, kde bol produkt dlhý 250 bp (obr. 2). Druhou možnosťou rozlíšenia týchto *Pinb* alel je použitie restriktívnej endonukleázy Bsr BI po amplifikácii celého génu (TRANQUILLI et al., 1999). V odrodách Bolero, Eridano, Amidon sa potvrdila prítomnosť *Pinb-D1a*, v odrodách Brasilia, Pascal, Saliente *Pinb-D1b* alely. Odroda Astrodur (*T. durum*) neamplifikovala žiadnu *Pin* alelu (nepřítomnosť D-genómu).

Záver

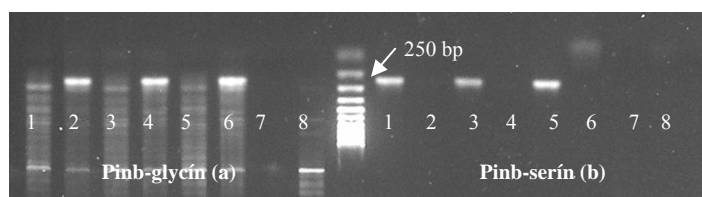
Optimalizovali sme podmienky a priebeh PCR reakcie pre určenie normálnych a najbežnejších mutovaných *Pin* alel na 7 odrodách pšenice so známym alelickým zložením. Tento spôsob detekcie využijeme pri charakterizácii puroindolínových génov slovenských a českých odrôd pšenice.

Tabuľka 1: Prítomnosť *Pin* alel v odrodách pšenice

Odroda	pôvod	<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>
Amidon	USA	b	a
Astrodur	AUT	-	-
Bolero	ITA	a	a
Brasilia	ITA	a	b
Eridano	ITA	b	a
Pascal	FRA	a	b
Saliente	ITA	a	b



Obrázok 1: Produkty PCR reakcie pre detekciu *Pina* alel v 7 odrodách pšenice (1-Brasilia, 2-Bolero, 3-Eridano, 4-Saliente, 5-Amidon, 6-Astrodur, 7-Pascal, 8-H₂O)



Obrázok 2: Produkty PCR reakcie pre detekciu *Pinb* alel v 7 odrodách pšenice (1-Brasilia, 2-Bolero, 3-Saliente, 4-Eridano, 5-Pascal, 6-Amidon, 7-H₂O, 8-Astrodur)

Literatúra

- BHAVE, M. – MORRIS, C.F. 2008. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. In: *Plant Mol Biol*, 66/3, s. 205-219.
- BLOCHET, J.E. – CHEVALIER, C. – FOREST, E. – PEBAY-PEYROULA, E. – GAUTIER, M.F. – JOUDRIER, P. – PEZOLET, M. – MARION, D. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine rich protein with a unique tryptophane-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. In: *FEBS Lett*, 329, s.336-340.
- GAUTIER, M.F. - ALEMAN, M.E. – GUIRAO, A. – MARION, D. – JOUDRIER, P. 1994. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. In: *Plant Mol Biol*, 25, s. 43-57.
- GAZZA, L. – NOCENTE, F. – NG, P.K.W. – POGNA, N.E. 2005. Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a. In: *Theor Appl Genet*, 110, s. 470-478.
- GIROUX, M.J. – MORRIS, C.F. 1997. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. In: *Theor Appl Genet*, 95, s. 857-864.
- GREENWELL, P. – SCHOFIELD, J.D. 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. In: *Cereal Chem*, 63, s. 379-380.
- LAW, C.N. - YOUNG, C.F. – BROWN, J.W.S. – SNAPE, J.W. – WORLAND, J.W. 1978. The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitution lines. In: *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*. International Atomic Energy Agency, Vienna, s. 483-502.
- MARTIN, J.M. – FROHBERG, R.C. – MORRIS, C.F. – TALBERT, L.E. – GIROUX, M.J. 2001. Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. In: *Crop Sci*, 41, s. 228-234.
- MIKULÍKOVÁ, D. 2007. The effect of friabilin on wheat grain hardness. In: *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 43, s. 35-43.
- MORRIS, C.F. 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. In: *Plant Mol Biol*, 48, s. 633-647.
- TRANQUILLI, G. – LIJAVETZKY, D. – MUZZI, G. – DUBCOVSKY, J. 1999. Genetic and physical characterization of grain texture-related loci in diploid wheat. In: *Mol Gen Genet*, 262, s. 846-850.

Táto práca vznikla za podpory MP SR (č. 2006 UO27/091 05 01/091 05 11).

INTERAKCE KYSELINY ABSCISOVÉ A ETYLÉNU V PROCESU TVORBY HLÍZ LILKU BRAMBORU (*Solanum tuberosum* L.) *IN VITRO* THE INTERACTION OF ABSCISIC ACID AND ETHYLENE DURING TUBER FORMATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) *IN VITRO*

Marek KLEMŠ – Zdeněk ŠTĚPÁN – Anna BRADÁČOVÁ – Pavla SOLNICKÁ – Helena VÍTKOVÁ – Helena FIŠEROVÁ

The objective of this study was to determine the level of abscisic acid, ethylene and CO₂ production during potato microtuber formation in vitro. Stem nodal segments of potato plants were cultivated in vitro 8 weeks on Murashige-Skoog medium containing modified level of inorganic nitrogen (10-12 μM or 65-70 μM), 80 g/l sucrose and 10 mg/l benzylaminopurine. Cultures with low nitrogen level in induction medium showed higher frequency of tuber formation. During induction of tuber formation (first two weeks of cultivation) nodal segments produced ethylene. Later ethylene production inhibited the growth of stolons and tuber formation. Higher level of abscisic acid was determined in leaves, later in stolons and tubers on nodal segments cultivated on induction medium with low level of nitrogen.

Key words: tuberization, abscisic acid, ethylene, potatoe

Úvod

Tvorba hlíz u lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.) je regulovaná fotoperiodou a fytohormony, především zvýšeným poměrem ABA/GA za krátkodenních podmínek (WHEELER and TIBBITTS 1997, MACHÁČKOVÁ et al. 1998). Endogenní ABA stimuluje proces tuberizace (ABDULLAH and AHMAD 1980). Velmi významná je role etylénu, který se podílí na celé řadě procesů v průběhu růstu a vývoje rostlin. Etylén vstupuje do interakcí s ostatními hormony, kdy může nepřímo stimulovat tvorbu hlíz v nízkých koncentracích, zvláště na začátku tuberizace. Později etylén tvorbu hlíz inhibuje (MINGO-CASTEL et al. 1976). Tuberizaci negativně ovlivňuje zvýšený příjem nitrátů. V rostlinách se zvyšuje obsah endogenních cytokininů a snižuje se obsah ABA, zrychluje se vegetativní růst a obecně se prodlužuje vegetační doba rostlin (LIPS et al. 1970). Naopak snížené množství nitrátů a zvýšení obsahu ABA za současného snížení obsahu cytokininů vede obecně v rostlinách k přechodu ke kvetení, indukci tvorby hlíz a zásobních orgánů, eventuálně k dormanci (CRAMER et al. 1995). Cílem práce bylo studovat vztah mezi obsahem kyseliny abscisové, produkcí etylénu a CO₂ při *in vitro* kultivaci jednonodálních segmentů stonku bramboru ve vztahu ke tvorbě (mikro)hlíz. Experiment byl proveden při dvou úrovních ošetření dusíkem (snížený a zvýšený obsah anorganického dusíku v indukčním médiu). Byla sledována frekvence tvorby hlíz, počet hlízek a jejich hmotnost, dále obsah endogenní ABA v jednonodálních segmentech stonku a v listech a také produkce etylénu a CO₂.

Materiál a metody

K indukci tvorby hlízek byly použity jednonodální segmenty stonku ze sterilně vypěstovaných rostlin (odrůda Karin). Rostliny byly kultivovány na modifikovaném médiu MS (MURASHIGE and SKOOG 1962) s obsahem 30 g/l sacharózy, 8 g/l agaru a pH 5,8 při trvalém osvětlení. Pro indukci tvorby hlíz byly kultivovány tři varianty: varianta se sníženým obsahem anorganického dusíku v médiu (10-12 μM), varianta se zvýšeným obsahem dusíku v médiu (65-70 μM) a kontrola (přibližně 40 μM anorganického dusíku). Média všech tří variant obsahovala 80 g/l sacharózy 10mg/l BA pro indukci hlízek. Kultivace jednonodálních segmentů stonku probíhala na fotoperiodě 8/16 (8 hodin světla a 16 hodin tmy). Byla hodnocena frekvence tvorby hlízek (%) od čtvrtého týdne po založení kultury jednonodálních segmentů, obsah ABA v jednotlivých částech rostlin pomocí RIA metody, za použití monoklonální protilátky MAC 252 (QUERRIE et al. 1988). Stanovení etylénu bylo provedeno pomocí plynové chromatografie (FIŠEROVÁ 1994). Pro stanovení obsahu ABA byla provedena 4 opakování vzorků, pro stanovení produkce etylénu a CO₂ 5 opakování a morfologické hodnocení bylo provedeno v 6-ti opakováních. Výsledky byly statisticky hodnoceny analýzou variance.

Výsledky a diskuze

Viditelná tvorba hlíz v *in vitro* kultuře byla zaznamenána tři týdny od založení experimentu. Snížení obsahu anorganického dusíku v médiu vedlo k intenzivnější tvorbě hlíz. Tato varianta měla nejvyšší frekvenci tvorby hlíz z celkového počtu založených explantátů a tvorba a růst hlíz byly u této varianty nejrychlejší. Naopak zvýšení obsahu dusíku (40 μM) v médiu vedlo ke snížení frekvence tvorby hlíz. Tyto rozdíly byly na konci kultivace statisticky průkazné oproti kontrole a v případě sníženého obsahu dusíku v médiu dosáhla frekvence tvorby hlíz téměř 80 %. Etylén obsažený v plynném prostředí kultury *in vitro* ovlivňoval tvorbu hlíz obdobně, protože největší počet baněk v nichž došlo alespoň na jednom explantátu ke tvorbě hlízky byl charakteristický pro kultivační variantu se sníženým obsahem dusíku. Tyto výsledky odpovídají výsledkům MINGO-CASTELA et al. (1976), v jehož experimentech se produkce etylénu snižovala od období iniciace hlízy až do období jejího růstu. Analýzy produkce etylénu prokázaly, že snížený obsah dusíku v médiu vytváří pro tvorbu hlíz dobré kultivační prostředí, neboť z počátku jednonodální segmenty produkovaly více etylénu a později se produkce

etylénu snížila. Naopak u varianty se zvýšeným obsahem dusíku v médiu z počátku poklesla produkce etylénu. Nejvyšší obsah kyseliny abscisové byl zaznamenán nejprve v listech jednodálných segmentů stonku. Později došlo ke zvýšení obsahu ABA v pupenech a v rostoucích stolonech. Zvýšení obsahu ABA v průběhu tuberizace uvádějí KRAUSS et al. (1981). Snížení obsahu dusíku v médiu opět vedlo ke zvýšení obsahu ABA. Výsledky poukazují na možnost ovlivnění produkce sadbových brambor pomocí optimalizace hnojení, tento poznatek uvádí i ATKINSON et al. (2003). Detailně budou tyto výsledky prezentovány v posteru.

Literatura

- ABDULAH, Z.N. and AHMAD, R. (1980): Effect of ABA and GA₃ on tuberization and some chemical constituent of potato. *Plant Cell Physiol.* 21:1343-1346.
- ATKINSON, D., GEARY, B., STARK, J., LOVE, S. and WINDERS, J. (2003): Potato varietal responses to nitrogen rate and timing. *Western Nutrient Management Conference, Salt Lake City, Utah, USA, Vol. 5:149-155.*
- CRAMER, M.D., SCHIERHOLT, A., WANG, Z. and LIPS, S. H. (1995): The influence of salinity on the utilization of root anaplerotic carbon and nitrogen metabolism in tomato seedlings. *J. Exp. Bot.* 46:1569-1577.
- FISEROVA, H. and HRADILIK, J. (1994): Ethylene and ethane production during adventitious root-formation on vine stem segments. *Rost. Vyr.* 40 (8): 755-762.
- KRAUSS, A. (1981): Abscisic acid and gibberelic acid in growing potato tubers. *Pot. Research* 24(4):435-439.
- LIPS, S. H., BEN ZIONI, A. and VAADIA, Y. (1970): K⁺ recirculation in plants and its importance for adequate nitrate nutrition. In: R. M. SAMISH (ed) *Recent Advances in Plant Nutrition.* Gordon and Breach Science Publishers. New York - London - Paris. pp. 207-215.
- MACHACKOVA, I., KONSTANTINOVA, T.N., SERGEEVA, L.I., LOZHNIKOVA, V.N., GOLYANOVSKAYA, S.A., DUDKO, N.D., EDER, J. and AKSENOVA, N.P. (1998): Photoperiodic control of growth, development and phytohormone balance in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 102:272-278.
- MINGO-CASTEL, A. M., SMITH, O. E. and KUMAMOTO, J. (1976): *Plant Physiol.* 57: 480-485.
- MURASHIGE T., and SKOOG F. (1962): A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.* 15:473-97.
- QUARRIE, S. A., WHITFORD, P. N., APPLEFORD, N.E.J., WANG, T.L., COOK, S.K., HENSON, I.E. and LOVEYS, B.R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extract of cereal and lupin leaves. *Planta* 173:330-339.
- WHEELER, R. M. and TIBBITTS, Th. W. (1997): Influence of changes in daylength and carbon dioxide on the growth of potatoe. *Ann. Bot.* 79:529-533.

POROVNÁNÍ REOLOGICKÝCH METOD PRO HODNOCENÍ KVALITY TĚSTA PŠENICE

COMPARISON OF RHEOLOGICAL METHOD FOR EVALUATION OF WHEAT DOUGH QUALITY

Zuzana KOCOURKOVÁ – Tibor SEDLÁČEK

The quality of wheat can be evaluated by different methods, including rheological tests. Alveograph and mixograph are methods based on the measurement of rheological characteristics of wheat dough. Multiple regression analysis of mixographic parameters was used for the prediction of alveographic parameters in this work. The regression equation for conversion from mixographic data to the alveographic W was extracted.

Key words: alveograph, mixograph, rheology, wheat, breeding

Úvod

V pekárenské technologii se pro hodnocení mechanických vlastností těsta využívá přístrojů vyhodnocujících reologické vlastnosti těsta. Reologické metody jsou založeny na měření fyzikálních vlastností těsta, na zjišťování vztahů mezi působícími silami a deformací těsta (Dobraszczyk a Morgenstern, 2003). Pro reologické posouzení pšeničného těsta existuje řada přístrojů umožňujících predikci jeho chování během zpracovatelského procesu, mezi které patří také alveograf a mixograf.

Alveografické hodnocení, kdy probíhá deformace těsta napínaného tlakem plynu, bývá použito ke zjišťování pekařské kvality v pekárenské technologii a příbuzných oborech zpracovávajících těsto pšenice. Mixografické hodnocení reologických vlastností je součástí řady šlechtitelských programů. Na rozdíl od alveografu je při mixografickém hodnocení malá spotřeba vzorku a krátký čas pro analýzu, z toho důvodu je možné toto hodnocení použít již v raných generacích šlechtitelského procesu.

Cílem práce bylo porovnat možnost predikce alveografických parametrů a vytvoření regresní rovnice pro přepočítání alveografického W z mixografických hodnot.

Materiál a metody

Alveografické hodnocení těsta bylo provedeno na souboru 54 odrůd pšenice a 3 lokalit z pokusů ÚKZÚZ podle normy ICC 121. Tyto výsledky byly porovnávány s výsledky mixografického hodnocení, které bylo provedeno na ŠS Stupice na přístroji ReoMixer (REOMIX Instruments) podle normy AACC 54-40A (1995). Těsto bylo připraveno z 10 g mouky a normovaného přídavku vody. Mouka použitá pro analýzy byla semleta na laboratorním mlýnu Chopin CD1. Výstupem mixografického hodnocení byla křivka, která je charakterizována 16 parametry. Obsah proteinů v mouce byl stanoven NIR metodou.

Statistické hodnocení bylo provedeno v programu Statgraphics centurion, verze XV.

Výsledky a diskuse

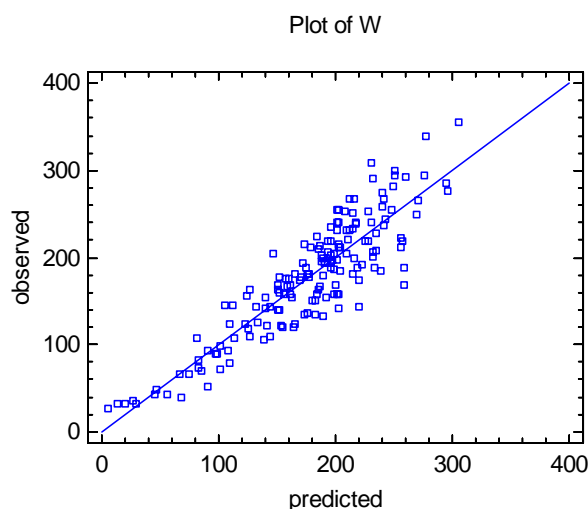
Metodou vícenásobné lineární regrese byl hodnocen vztah alveografických parametrů s 16 mixografickými parametry, ke kterým byl jako další faktor přidán obsah proteinu v mouce.

Tabulka 1: Koeficient determinace a výsledky F testu

Parametr	R ²	F	P
W	80,00	33,89	0,000
P	70,41	20,15	0,000
L	40,79	5,84	0,000
P/L	36,60	4,89	0,000

Vzhledem ke zjištěnému relativně vysokému koeficientu determinace a hodnotám F testu ve vztahu mezi alveografickým parametrem W (vyjadřující deformační energii, která je charakteristikou pekařské síly mouky) a hodnotami mixografických parametrů je možná predikce W na základě následující rovnice:

$$W = -62,5 + 12,0 \cdot \text{Protein} + 12,5 \cdot \text{IHTP} - 376,9 \cdot \text{buildup} + 169,5 \cdot \text{peaktime} + 232,6 \cdot \text{peakwidth} + 420,4 \cdot \text{peakheight} - 3,6 \cdot \text{peakAngle} + 49,6 \cdot \text{breakdown} + 4,6 \cdot \text{areabelow} + 21,0 \cdot \text{areawithin} - 220,9 \cdot \text{initslope} - 158,6 \cdot \text{initwidth} - 470,0 \cdot \text{initbuild} - 485,5 \cdot \text{time1_2} - 31,3 \cdot \text{endwidth} + 78,4 \cdot \text{widthbuild} - 38,9 \cdot \text{widthinitbld}$$



Obrázek 1: Porovnání predikovaných hodnot se skutečně zjištěnými pro alveografické W

Na základě výsledků uvedených v tabulce 1 lze předpokládat dobrou predikční schopnost rovněž pro alveografický parametru P (vyjařující odpor těsta). Horší výsledky byly získány pro alveografické parametry L (charakterizuje tažnost těsta) a poměrovému číslu P/L. Využitelnost mixografického hodnocení pro predikci pekařské kvality potvrdili např. Dobraszczyk a Schofield 2002).

Závěr

Hodnocení reologických vlastností těsta pšenice přístrojem ReoMixer vykazuje vysokou shodu s alveografickým parametrem W. Z mixografického stanovení je možné pomocí regresní rovnice predikovat alveografické W. Výhodou mixografického stanovení v porovnání s alveografem je malé množství vzorku potřebného pro analýzy, časová nenáročnost a nízká míra ovlivnění výsledků lidským faktorem a podmínkami laboratoře.

Poděkování

Autoři děkují ÚKZÚZ Brno za poskytnutí alveografických dat a vzorků pro analýzy. Práce vznikla za podpory grantového projektu GAČR 521/05/H013.

Literatura

- DOBRAZCZYK B. J., SCHOFIELD, J. D. (2002): Rapid assesment and prediction of wheat and gluten baking quality with the 2-g direct drive mixograph using multivariate statistical analysis. *Cereal Chemistry* 79 (5): 607-6112.
- DOBRAZCZYK B. J., MORGENSTERN, M. P. (2003): Rheology and the breadmaking process. *Journal of Cereal Science* 38: 229-245.

VHODNOSŤ ODRÔD ĎATELINOVÍN DO SUCHÝCH PODMIENOK VÝCHODOSLOVENSKEJ NÍŽINY THE SUITABLE OF CLOVER PLANTS VARIETIES INTO DRY CONDITIONS OF THE EAST SLOVAK LOWLAND

Ladislav KOVÁČ

In dry and warm conditions of the East Slovak Lowland production parameters of selected sorts and perspective varieties of clover plants were observed. Results of experiments were significantly influenced by meteorological factors. Significantly the highest yields were ascertained in the 3rd crop year 2008, then followed year 2007 and the 1st crop year 2006. The highest yield (18.44 t ha⁻¹) was determined at variety Amos and this yield was significantly higher than yields of further varieties. Variety Magura with yield 17.57 t ha⁻¹ was second the most production variety. In yields Magura variety was no-significant higher than varieties Nodula, Rezista and Margot. Yields of all other observed varieties of clover plants were statistically significant lower than yield of Magura variety. Significantly the lowest yields were noted at bird's-foot clover variety Polom.

Key words: clover plants, yields, dry conditions

Úvod

Východoslovenská nížina (VSN) sa najmä v letnom období vyznačuje teplým a suchým priebehom počasia. Výber vhodných druhov viacročných krmovín (VRK), ale aj odrôd je nevyhnutnou podmienkou na dosiahnutie vysokých úrod kvalitného krmiva. Tejto problematike sa na VSN venuje pozornosť už dlhšie časové obdobie (GEJGUŠ – KOVÁČ, 1998; KOVÁČ, 2003).

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 opakovaníach a pokračoval v rokoch 2007 a 2008.

V pokuse bolo zaradených 7 tetraploidných odrôd ďateliny lúčnej – Vesna, Radegast, Rezista, Amos, Nodula, Margot a Magura, dve tetraploidné odrody Marieta a Slatina a ľadenec rožkatý Polom. 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 takej istej dávke ako pred založením pokusu. Produkcia sušiny sa hodnotila analýzou rozptylu s testovaním rozdielov. Poveternostné podmienky na stanovišti sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Priemerné mesačné teploty vzduchu a úhrny zrážok v Milhostove

Mesiac	Teplota vzduchu [°C]				Mesiac	Úhrny zrážok [mm]			
	DP	2006	2007	2008		DN	2006	2007	2008
I.	-3,3	-4,7	2,4	-0,5	I.	32	13	40	36
II.	-1,0	-2,6	2,8	2,0	II.	28	41	40	11
III.	3,5	2,3	8,2	5,1	III.	27	48	18	30
IV.	9,7	11,3	11,2	10,7	IV.	39	49	6	48
V.	14,6	14,8	17,5	15,0	V.	53	83	38	40
VI.	18,2	18,8	20,7	19,3	VI.	78	96	72	61
VII.	19,6	22,5	22,5	19,7	VII.	76	18	11	140
VIII.	19,0	18,8	21,7	20,1	VIII.	63	151	29	53
IX.	14,8	16,3	13,6	14,0	IX.	41	5	147	34
X.	9,1	10,3	9,2		X.	39	23	62	
XI.	4,0	5,4	2,5		XI.	43	16	26	
XII.	-0,7	2,2	-0,8		XII.	41	13	29	
priemer	8,9	9,6	11,0		suma	559	556	543	

Výsledky a diskusia

Pokus s odrodami ďatelinovín bol založený 17.05.2006. Ďatelinoviny začali vzhádzať 22.05.2006. V tabuľke 2 sú uvedené produkcie sušiny podľa rokov. Najvyššie produkčné parametre v roku 2006 dosahovali odrody Amos s úrodou 4,17 t.ha⁻¹ sušiny, Radegast s úrodou 4,06 t.ha⁻¹ sušiny a Nodula s úrodou 3,92 t.ha⁻¹ sušiny. Na výšku produkcie sušiny v roku 2007 výrazne vplývali suché a teplé poveternostné podmienky. Podobne ako v prvom aj v druhom úžitkovom roku bola najproduktnejšia tetraploidná odroda ďateliny lúčnej Amos (7,49 t.ha⁻¹). V treťom úžitkovom roku 2008 v poraste tiež dominovali tetraploidné odrody.

Tabuľka 2: Produkcia sušiny d'atelinovín podľa rokov [$t \cdot ha^{-1}$]

Odroda	Produkcia sušiny			
	2006	2007	2008	Spolu
Vesna	3,26	5,92	6,54	15,72
Radegast	4,06	5,04	6,81	15,91
Rezista	3,70	6,17	6,82	16,69
Amos	4,17	7,49	6,78	18,44
Nodula	3,92	6,19	7,01	17,12
Margot	2,97	6,19	7,26	16,42
Magura	3,73	6,87	6,97	17,57
Marieta	3,62	5,63	6,14	15,39
Slatina	3,18	5,48	5,95	14,61
Polom	2,99	3,54	6,43	12,96

Na základe štatistických hodnotení bola významne najvyššia úroda dosahovaná v poveternostne priaznivejšom roku 2008, pred rokom 2007. Preukazne najnižšie úrody boli dosiahnuté v roku založenia pokusu 2006. Za tri úžitkové roky sa najvyššia úroda dosiahla pri odrode Amos – $18,44 t \cdot ha^{-1}$. Táto úroda bola štatisticky preukazne vyššia než pri ostatných odrodách okrem odrody Magura, ktorá bola druhá najproduktívnejšia s úrodou $17,57 t \cdot ha^{-1}$. Odroda Magura nepreukazne úrodovo prevyšovala odrody Nodula, Rezista a Margot. Dosahovala štatisticky preukazne vyššie úrody ako všetky ostatné tetraploidné a diploidné odrody. Preukazne najnižšia úroda sa dosiahla pri ľadenci rožkatom Polom.

Záver

V suchých a teplých podmienkach VSN sa sledovali produkčné parametre vybraných druhov a perspektívnych odrôd d'atelinovín. Na výsledky z pokusných sledovaní výrazne vplývali poveternostné podmienky. Preukazne najvyššie úrody sa dosahovali v treťom úžitkovom roku 2008, pred rokom 2007 a prvým úžitkovým rokom 2006. Najvyššia úroda ($18,44 t \cdot ha^{-1}$) bola dosiahnutá pri odrode Amos. Táto úroda bola štatisticky preukazne vyššia ako pri ostatných odrodách okrem odrody Magura, ktorá bola druhá najproduktívnejšia s úrodou $17,57 t \cdot ha^{-1}$. Odroda Magura nepreukazne úrodovo prevyšovala odrody Nodula, Rezista a Margot. Ostatné odrody štatisticky preukazne prevyšovala. Signifikantne najnižšie úrody sa dosiahli pri ľadenci rožkatom odrody Polom.

Literatúra

- 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.
- KOVÁČ, L. 2003. Úrodové parametre odrôd d'atelinovín na ťažkých fluvizemiach glejových. In: Zborník vedeckých prác OVÚA v Michalovciach. Michalovce : OVÚA, 2003, s. 137-146. ISBN 80-969049-4-9

ZVYŠUJÚ NITROFENOLÁTY TOLERANCIU RASTLÍN ČAKANKY NA SUCHO? DOES APPLICATION OF NITROPHENOLATE ENHANCE THE CHICORY DROUGHT TOLERANCE?

Marek KOVÁR – Ivan ČERNÝ

Tolerance to environmental stresses (includes drought) is very complex feature of plant. Experimental results obtained during 10-days dehydration cycle of chicory shown that foliar applied p-nitrophenol (2 mM concentration) enhance of drought tolerance. Chicory plants treatment by nitrophenol sustained RGR on stabil level up until 68 % RWC. This effect was accompanied by accumulation of osmotically active compounds. The accumulation of free proline under dehydration in chicory is new knowledge.

Key words: plant growth regulator, antioxidant system, carbohydrates, nitrophenol, chicory

Úvod

Výkonnosť biologického materiálu (odrod) poľnohospodárskych plodín je determinovaná schopnosťou efektívne využívať zdroje prostredia (najmä vodu, žiarenie a minerálne látky). Okrem toho, moderné odrody by mali mať vysokú schopnosť plasticity fyziologických procesov, čo by im umožnilo efektívne sa prispôbovať periodicky, ale aj sezónne sa meniacim podmienkam prostredia (VALLADARES et al. 2007). Práve plasticita fyziologických procesov nových odrôd v reakcii na environmentálne stresové situácie je však problémom, čo následne vedie k znižovaniu ich úrody (RICHARDS et al. 1999).

Významným faktorom prostredia, ktorý v našich podmienkach limituje poľnohospodársku produkciu, je nedostatok vody (BRESTIČ a OLŠOVSKÁ 2001). Vodný stres, ktorý vzniká v reakcii rastlín na nedostatok vody v pôde, spôsobuje celú radu biochemických a fyziologických zmien, najmä energetických procesoch. Výsledkom týchto zmien je redukcia rastu a tým aj kvantity a kvality produkcie plodín.

Jednou príčinou poškodenia fyziologických procesov rastliny v stresových podmienkach je nadmerná tvorba a uvoľňovanie aktívnych foriem kyslíka (ASADA 1999). Ukazuje sa, že práve expresia antioxidantných enzýmov zohráva dôležitú úlohu v tolerancii rastlín voči nepriaznivým faktorom prostredia (FOYER a NOCTOR 2000).

V súčasnom období do popredia vstupujú snahy minimalizovať negatívny účinok stresových situácií na realizáciu rastovo-produkčného procesu prostredníctvom aplikácie biologicky aktívnych látok s potenciálnym antistresovým účinkom. Jedná sa o prírodné i syntetické látky, ktoré sa zapájajú do metabolizmu bunky, najmä cez reguláciu proteosyntézy, uhlíkového metabolizmu, metabolizmu hormonálnych látok, dusíkového metabolizmu, syntézy sekundárnych metabolitov a pod. Výsledkom je ovplyvňovanie akumulácie organickej hmoty prostredníctvom zvyšovania efektívnosti využívania vody, žiarenia a minerálnych látok (GUO et al. 1994). Jednou skupinou široko využívaných biologicky aktívnych látok sú nitrofenoláty. Tieto aktívne látky sa prirodzene vyskytujú v rastlinách a stimulujú rastové procesy najmä cez mechanizmus zmeny aktivity špecifických antioxidantných systémov enzymatického charakteru.

Cieľom práce bolo študovať efekty foliárne aplikovaného nitrofenolu na metabolizmus uhlíka a antioxidantné enzýmy počas dehydratačného cyklu a zistiť, či aplikácia nitrofenolu zlepšuje toleranciu rastliny na sucho.

Materiál a metódy

Rastliny čakanky obyčajnej (*Cichorium intybus* L.) odrody Fredonia Nova boli pestované v nádobových experimentoch (2 kg pôdno-rašelinového substrátu na nádobu) v sklenkových podmienkach. Počet rastlín na nádobu bol 4. Substrát bol denne hydratovaný vodou v množstve 300 ml na nádobu. 30 dní po vzídení bol na nadzemnú časť rastlín mikropostrekom aplikovaný 2,0 mM roztok 4-nitrofenolu sodného (*Riedel-de Haën; cat. n. 36612-IG-R*) v dávke 5 ml na rastlinu. Kontrolné rastliny boli ošetrované rovnakým množstvom vody. Dehydratačný cyklus rastlín bol indukovaný prerušením zalievania substrátu 42 dní po vzídení. Fyziologické a biochemické merania boli uskutočnené na 5. liste rastliny (počítané od bázy). Dĺžka dehydratačného cyklu bola 10 dní.

Biochemické parametre antioxidantného systému (aktivita SOD a POX), metabolizmu dusíka (prolín) a uhlíka (celkové rozpustné sacharidy) boli stanovené spektrofotometricky podľa KOVÁR a ČERNÝ (2007). Membránová stabilita bola meraná konduktometricky podľa TRIPATHY et al. (2000). Relatívny obsah vody bol hodnotený gravimetricky podľa (BARR a WEATHERLEY 1962). Rastovú aktivitu nadzemnej časti rastlín sme charakterizovali prostredníctvom zmien relatívnej rýchlosti rastu (RGR).

Experimenty boli uskutočnené v štyroch blokoch, v troch až piatich opakovaniach. Výsledky sme štatisticky spracovali prostredníctvom štandardných grafických a štatistických metód.

Výsledky a diskusia

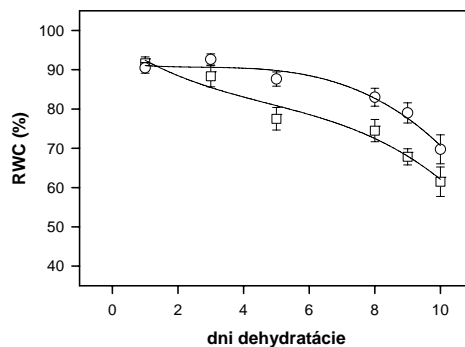
Problematika minimalizácie dopadu stresových situácií na produktivitu plodín je vysoko aktuálna a zaoberajú sa ňou popredné fyziologické laboratória základného aj aplikovaného výskumu. Uvažuje sa o využívaní rôznych agrotechnických opatrení pri pestovaní plodín, ďalej tvorbe nového biologického materiálu aj cestou genetickej manipulácie, alebo využitím biologicky aktívnych látok, ktoré po zapojení do metabolizmu rastlinnej bunky indukujú adaptačné odpovede (OOSTERHUIS a ROBERTSON 2000).

Postupná dehydratácia pôdneho substrátu spôsobila v listoch čakanky pokles relatívneho obsahu vody (RWC) (obr. 1). V terminálnej fáze dehydratačného cyklu (10. deň) úroveň RWC dosiahla v nitrofenolom neošetrených rastlinách hodnotu $61,50 \pm 3,47$ %. Ošetrenie rastlín nitrofenolom zvýšilo v dobre hydratovaných rastlinách RWC na úroveň $94,18 \pm 0,98$ %. Podobný efekt nitrofenolu na obsah vody v pletivách rastlín bavlny pozorovali aj BYNUM et al. (2007). Dehydratácia pôdneho substrátu spôsobila zníženie hodnoty RWC na hodnotu $69,74 \pm 3,68$ %.

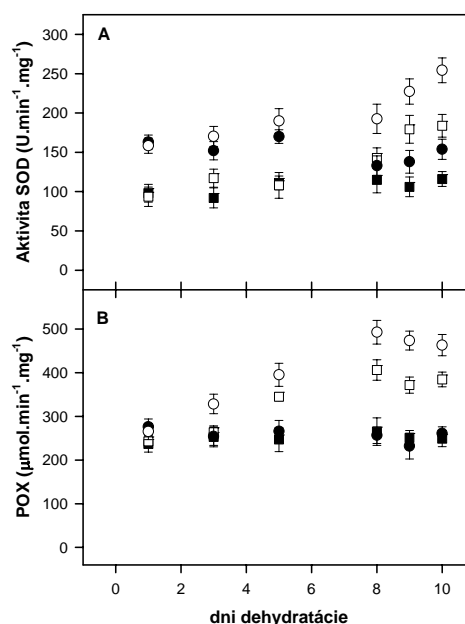
Je známe, že na metabolickej úrovni sucho spôsobuje poruchy v distribúcii energie a zvyšuje produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Bunka na tento stav homeostaticky reaguje zvýšenou aktivitou antioxidantných enzýmov, najmä superoxidodismutázy (SOD) a peroxidázy (POX) (ASADA 1999; FOYER a NOCTOR 2000). Foliárna aplikácia nitrofenolu spôsobila v dobre hydratovaných rastlinách čakanky aktiváciu antioxidantného systému (obr. 2). Tento rozdiel oproti neošetrenému variantu predstavoval pri SOD 34,8 % a POX 4,4 % nárast aktivity. Zvýšenie aktivity antioxidantných enzýmov nitrofenolmi (v priemere o 16 %) pozorovali v bunkách rastlín rajčiaka pestovaného v optimálnej vodnej zásobenosti aj DJANAGUIRAMAN et al. (2004). Počas dehydratačného cyklu, kedy zvýšená produkcia ROS je kompenzovaná nárastom antioxidantnej kapacity, sme v rastlinách čakanky neošetrených nitrofenolom zaznamenali nárast aktivity SOD na úroveň $183,73 \pm 14,52$ U.min⁻¹.mg⁻¹, čo predstavuje zvýšenie aktivity oproti dobre hydratovaným rastlinám o 58,39 % (obr. 2). V rastlinách ošetrených nitrofenolom sme zaznamenali nárast aktivity SOD na úroveň $254,36 \pm 15,82$ % čo zodpovedá 65,37 % nárastu oproti počiatočnej úrovne pred dehydratáciou substrátu (dvojnásobný nárast oproti aktivite v kontrole).

Stupeň oxidačného poškodenia buniek je možné charakterizovať prostredníctvom indexu membránovej stability (MSI) (obr. 3). V dobre hydratovaných listoch čakanky sme zistili MSI na úrovni $95,64 \pm 1,86$ %. Aplikácia nitrofenolu indukovala zvýšenie MSI o viac ako 1 %. S prehlbujúcou sa dehydratáciou sme pozorovali pokles hodnoty MSI v dôsledku oxidačného poškodenia buniek. Zvýšená aktivita antioxidantných enzýmov v homeostatickej detoxikácii ROS počas sucha v rastlinách ošetrených nitrofenolom sa prejavila v udržaní MSI do úrovne 75 % RWC. V terminálnej etape postupnej dehydratácie (10. deň) dosiahla hodnota MSI nitrofenolom neošetrených rastlín $53,79 \pm 7,14$ % a rastlín ošetrených nitrofenolom $76,82 \pm 4,25$ %. Tento rozdiel predstavuje zvýšenie membránovej tolerance prostredníctvom nitrofenolu oproti kontrole o 42,8 %.

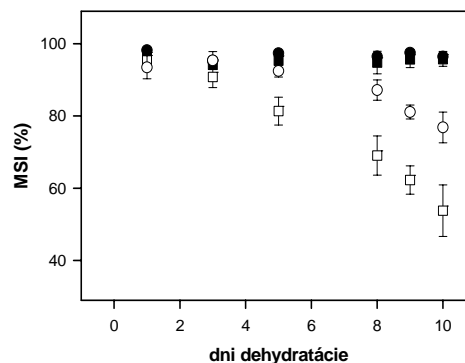
S parametrami antioxidantnej aktivity počas postupnej dehydratácie sme hodnotili schopnosť osmotického úpravy. Foliárne aplikovaný nitrofenol spôsobil v dobre hydratovaných rastlinách nárast koncentrácie voľného prolínu (takmer päťnásobné), ako aj množstva redukujúcich sacharidov (o 22 %) (tab. 1). Tento nárast plne súhlasí s pozorovaniami, uskutočnenými na rastlinách čakanky ošetrených prípravkom Atonik v celovegetačných experimentoch (KOVÁR a ČERNÝ 2007). Počas dehydratácie nastáva akumulácia osmoticky aktívnych látok (prolín, rozpustné cukry), čo sme pozorovali aj v prípade suchom ovplyvnených rastlín čakanky. Osmotická úprava umožňuje udržať intaktné fyziologické procesy, čo sa v konečnom dôsledku prejaví v udržaní rastu. Takýto vzťah sme



Obrázok 1: Pokles relatívneho obsahu vody (RWC; %) v 5. liste rastlín čakanky počas dehydratačného cyklu. □ - neošetrené rastliny; ○ - nitrofenolom ošetrené rastliny. n=5±SE.



Obrázok 2: Zmena aktivity enzýmov SOD (A), a POX (B) v 5. liste rastlín čakanky počas dehydratačného cyklu. ● - dobre hydratované rastliny; □○ - dehydratované rastliny; ■□ - neošetrené rastliny; ●○ - nitrofenolom ošetrené rastliny. n=3±SE.



Obrázok 3 Index membránovej stability (MSI; %) 5. listu rastlín čakanky počas dehydratačného cyklu. ● - dobre hydratované rastliny; □○ - dehydratované rastliny; ■□ - neošetrené rastliny; ●○ - nitrofenolom ošetrené rastliny. n=5±SE.

pozorovali v prípade foliárne ošetrovaných listov nitrofenolom, keď sme zistili v terminálnej fáze dehydratačného cyklu

Tabuľka 1: Relatívny obsah vody (RWC; %), koncentrácia voľného prolínu (Pro; $\mu\text{mol.g}^{-1}$), obsah rozpustných sacharidov (TCs; mmol.g^{-1}) a relatívna rýchlosť rastu (RGR; $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) v terminálnom období dehydratačného cyklu (10. deň) rastlín čakanky. RWC, Pro a TCs merané v 5. liste, RGR nadzemná časť rastliny.

Variant	RWC [%]	Pro [$\mu\text{mol.g}^{-1}$]	TCs [mmol.g^{-1}]	RGR [$\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$]
Hydratované rastliny	91,26 ± 1,34	0,67 ± 0,04	31,76 ± 2,60	4,33 ± 0,60
Dehydratované rastliny	61,50 ± 3,74	43,60 ± 2,35	38,43 ± 3,11	0,81 ± 0,27
Hydratované rastliny ošetrované nitrofenolom	93,43 ± 1,08	4,95 ± 0,65	34,58 ± 3,86	4,90 ± 0,84
Dehydratované rastliny ošetrované nitrofenolom	69,74 ± 3,68	73,27 ± 5,36	49,62 ± 4,63	2,07 ± 0,32

relatívnu rýchlosť rastu (RGR) nadzemnej časti na úrovni $2,07 \pm 0,32 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, pričom v prípade suchom ovplyvnených ale nitrofenolom neošetrovaných rastlín RGR dosiahlo v tomto období dehydratácie úroveň $0,81 \pm 0,27 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Záver

Experimentálne výsledky získané počas 10-dňového dehydratačného cyklu rastlín čakanky ukázali, že foliárne aplikovaný nitrofenol (2 mM), ktorý je aktívnou zložkou prípravku Atonik, zvyšuje toleranciu na suchu. Pozorovali sme, že rastliny ošetrované nitrofenolom udržiavajú počas dehydratácie RGR na stabilnej úrovni až do poklesu RWC 68 %. Tento efekt bol doprevádzaný akumuláciou osmoticky aktívnych látok. Novým poznatkom je, že dehydratácia v rastlinách čakanky indukuje akumuláciu voľného prolínu. Ukázali sme tak, že aplikácia nitrofenolu na list čakanky zvyšuje toleranciu proti suchu. Mechanizmus a to, či sa jedná o všeobecný fenomén, je potrebné ďalej študovať a bližšie charakterizovať.

Literatúra

- ASADA, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. In: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 1999, 601-639.
- BARR, H.D., WEATHERLEY, P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. In: *Aust. J. Biol. Sci.*, 15, 1962, 413-428.
- BRESTIČ, M.; OLŠOVSKÁ, K. 2001. Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. SPU Nitra, 2001, 149 s.
- BYNUM, J.B.; COTHREN, J.T.; LEMON, R.G.; FROMME, D.D.; BOMAN, R.K. 2007. Field evaluation of nitrophenolate plant growth regulator (Chaperone) for the effect on the cotton lint yield. In: *J. Cott. Sci.*, 11, 2007, 20-25.
- DJANAGUIRAMAN, M.; DEVI, D.; SHEEBA, J.; BANGARUSAMY, U.; BABU, R. 2004. Effect of oxidative stress on abscission of tomato fruits and its regulation by nitrophenols. In: *Trop. Agric. Res.*, 16, 2004, 25-36.
- FOYER, CH.; NOCTOR, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. In: *New Phytol.*, 146, 2000, 359-388.
- GUO, C.; OOSTERHUIS, D.M. 1995. Atonik: a new plant growth regulator to enhance yield in cotton. In: *Proc. Beltwide Cotton Conf.*, 1995, 1086-1088.
- KOVÁR, M.; ČERNÝ, I. 2007. Zvyšuje foliárna aplikácia Atoniku antioxidačnú kapacitu rastlín čakanky? In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín, Piešťany, 2007*, 147-149.
- OOSTERHUIS, D.; ROBERTSON, W. 2000. The use of plant growth regulators and other additives in cotton production. In: *Proceedings of the 2000 Cotton Research Meeting*, 2000, 22-32.
- RICHARDS, R.A. 1999. Breeding crops with improved stress resistance. In: *Close, T.J. – Bray, E.A. – (eds.) Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. In: *Am. Soc. Plant Physiol.*, Rockville, MD, 1999, 211-223.
- TRIPATHY, M. 2000. *TAG*, 100, 2000, 1197-1202
- VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J.M. 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. In: *New Phytol.*, 176, 2007, 749-763.

Pod'akovanie

Práca bola finančne podporená projektom VEGA číslo 1/3461/06.

MOŽNOSTI PŘEKONÁNÍ DORMANCE NAŽEK RŮŽÍ POSSIBILITIES OF THE RELEASE FROM DORMANCY IN ROSE ACHENES

Anna KUČEROVÁ – Běla SVITÁČKOVÁ – Helena FIŠEROVÁ – Marek KLEMŠ

The dormancy of rose achenes is induced by a complex of several factors, viz. by impermeability of the pericarp, insufficient development of the embryo and presence of inhibitive substances not only in the pericarp but also in the seed itself. Although the viability of untreated achenes ranges between 40 and 90% (depending on the botanical species), they usually show a minimum or zero germinative power. This paper describes effects of three variants of pre-sowing treatment of rose achenes (i.e. effects of either low or high temperatures for different time intervals) in 8 botanical species of roses. There were marked differences in the depth of dormancy as well as in the release from dormancy between individual species under study. So, for example, the germinative power of achenes of *Rosa setigera* Michx. (which showed viability of 90%) was only 40% after a period of low temperatures (i.e. after the degradation of inhibitive substances) while after the effect of higher temperatures (which increased the permeability of pericarp) their germinative power increased to 60% and after a combination of both treatments even to 70%. On the other hand, achenes of the species *Rosa glauca* Pourr. (40% of viability) did not respond on the pre-sowing treatment with different temperatures and their germinative power remained to be nearly zero.

Keywords: Botanical species of roses, cold stratification, effect of higher temperatures, pericarp impermeability, achene viability, germinative power

Úvod

Zdřevnatělý perikarp nažek růží zabraňuje výměně vody a plynů vlastního semene s okolím. Uložení nažek do vlhkého substrátu při teplotách 10-30°C lze dosáhnout narušení perikarpu mikroorganizmy (BEKENDAM 1973). Vysoký obsah abscisové kyseliny v nažkách je příčinou nízké klíčivosti (HRADILÍK a kol. 1987) a lze jej snížit chladovou stratifikací (teploty 0-10°C). Cílem práce bylo zjistit, jaký typ dormance se podílí u sledovaných nažek botanických růží, a stanovit účinnou formu jejího přerušení.

Materiál a metody

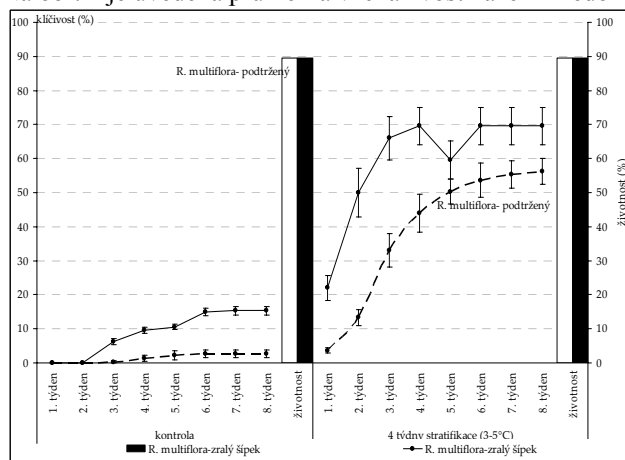
K pokusům byly použity nažky botanických růží *R. begeriana* Schrenk, *R. glauca* Pourr., *R. palustris* Marsh., *R. rubiginosa* L., *R. rugosa* Thunb., *R. setigera* Michx. a *R. virginiana* Mill.

Životnost nažek byla stanovena pomocí trifenylnetrazoliové metody u 2 x 100 ks nažek. Předseťové ošetření nažek bylo provedeno u 3 x 100 ks nažek u varianty a botanického druhu. Jako kontrolní byla vyseta do substrátu varianta bez předseťové úpravy, další variantou bylo působení 12 týdnů chladové stratifikace (3-5°C), nebo 12 týdnů působení vyššími teplotami (15-20°C) a kombinace obou ošetření – napřed 12 týdnů vyšší teploty, pak 12 týdnů chladové stratifikace.

Vliv zralosti šípků a chladové stratifikace na klíčivost nažek byl sledován u druhu *R. multiflora* Thunb. Tepelné ošetření nažek probíhalo v polyetylenových sáčcích s říčním pískem v poměru 1:5 s ošetřením 0,25% Previcurem 607 SL a dovlhčením vodou. Výsev nažek byl po aplikaci teplot proveden do výsevních misek s výsevním substrátem Klassman ve skleníku při teplotě 20°C. Statistické vyhodnocení vzcházivosti bylo provedeno v počítačovém programu Statistica CZ verze 8.

Výsledky a diskuse

Na obr. 1 je uvedena průměrná vzcházivost nažek z nedozrálých a dozrálých šípků druhu *R. multiflora* Thunb.



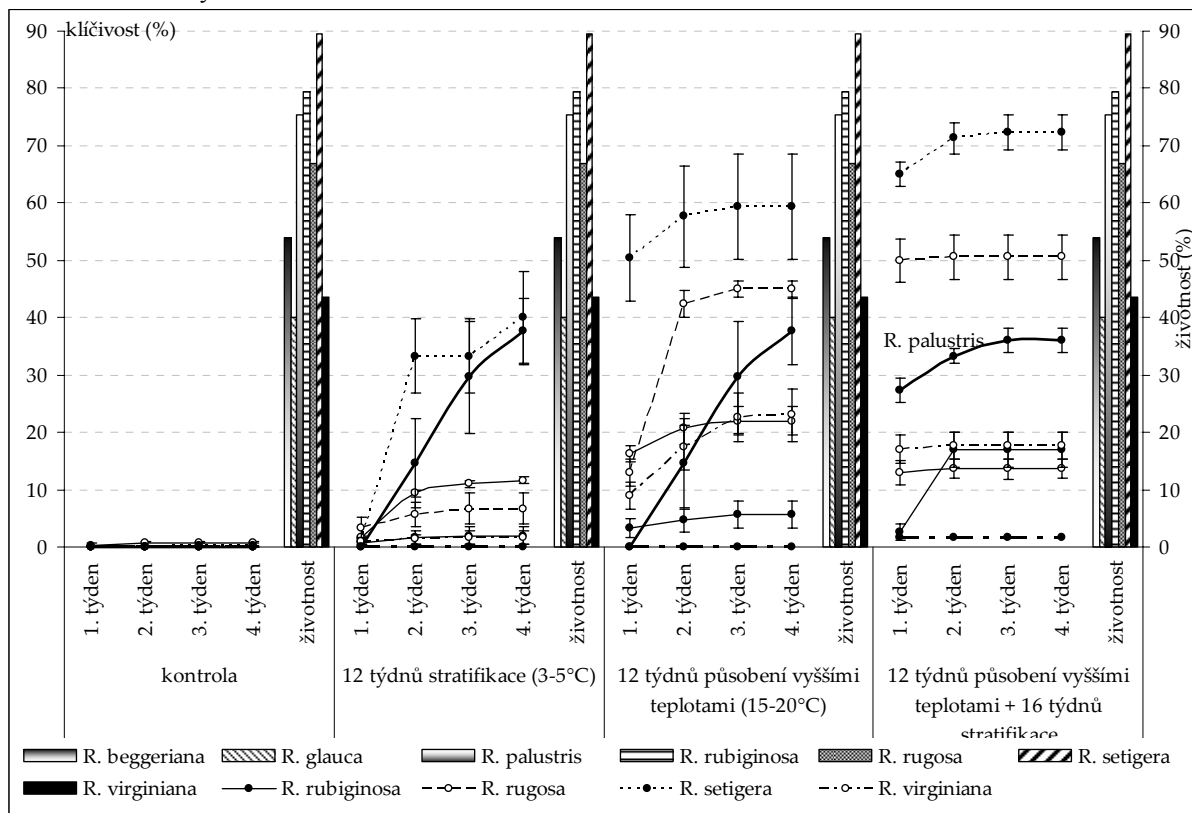
Životnost nezralých a zralých nažek byla stejná – 90%. V neošetřené variantě klíčily z 18% nažky z vyžralých šípků. Působením chladové stratifikace se klíčivost zvýšila na 70%. Neošetřené nažky z nevyžralých šípků klíčily jen do 3% a po chladové stratifikaci se zvýšila klíčivost na 55%. Přesto někteří autoři uvádí, že je u tohoto druhu možný výsev bez předseťové úpravy (VEČEŘA et al. 1967, HAVLŮ et al. 1977).

Na obr. 2 je uvedena vzcházivost nažek sedmi botanických druhů šípků po aplikaci chladové stratifikace, kdy bylo dosaženo až 40 % vzcházivosti u *R. setigera* Michx. (90% životnost) a u *R. palustris* Marsh. (75% životnost).

Obr. 1: Vliv zralosti šípků a chladové stratifikace na klíčivost a životnost nažek u druhu *R. multiflora* Thunb.

Podle UEDA (2003) in ROBERTS (2003) patří nažky těchto druhů k nažkám se slabou dormancí. Po aplikaci vyšších teplot se zvýšila klíčivost u *R. setigera* Michx. na 60% a po kombinaci obou teplot na 75%. Naopak u *R. rugosa* Thunb. došlo ke zvýšení vzcházivosti po chladové stratifikaci na 8 % (životnost 68 %), ale po aplikaci vyšších teplot se zvýšila vzcházivost na 45% a po kombinaci obou na 50%. SPETHMANN, FEUERHAHN

(2003) in ROBERTS (2003) dosáhli u téhož druhu po aplikaci 12 týdnů vyššími teplotami (20-25°C) a 12 týdnů stratifikace (4°C) klíčivosti 60%. U *R. glauca* Pourr. se vzházivost uvedenými zásahy zvýšit nepodařilo, přesto že VĚTVIČKA (1969) zaznamenává 53% vzházivost a doporučuje nažky jako testovací materiál pro zkoušky klíčivosti botanických růží.



Obr. 2: Vliv druhu nažek růží na životnost nažek a interakce předseťové úpravy nažek na jejich vzházivost

Závěr

Nažky sledovaných botanických druhů bez předseťové úpravy nevzházely. Nažky *R. setigera* Michx., *R. rubiginosa* L. a *R. rugosa* Thunb. nejlépe vzházely po kombinované teplotní úpravě nažek, nažky *R. bergiana* Schrenk. a *R. virginiana* Mill. lépe vzházely po působení vyššími teplotami, pro nažky *R. palustris* Marsh. byla dostačující aplikace chladové stratifikace a nažky *Rosa glauca* Pourr. se 40% životností nereagovaly na předseťovou úpravu nažek působením teplot vůbec a jejich klíčivost zůstala téměř nulová.

Literatura

- BEKENDAM, J. Keimkracht van *Rosa canina* en *Rosa inermis*. Bedrijfsontwikkeling. Ročník 4, č. 12, s. 1143-1151 ISSN 0303-4127. 1973
- HAVLŮ, J., JAŠA, B., KLIMEŠ, J. Růže - královna květin. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 347 s. ISBN 07-029-77. 1977
- HRADILÍK, J., FIŠEROVÁ, H., CVRČEK, A. Studium dormance nažek podnožového šípku *Rosa canina*. Acta Universitatis Agriculturae, ročník 35, č. 1-2, s. 3-12, ISSN 1211-8516, 1987
- KUČEROVÁ, A. Možnosti využití vybraných botanických růží ve šlechtění. Diplomová práce, MZLU v Brně, ZF, 1 – 175, 2008
- ROBERTS, A. Encyklopedia of Rose Science. 1. vyd. Oxford: Elsevier, 1449 s. ISBN 0-12-227620-5, 2003
- VEČEŘA, L. et al. Růže. 1. vyd. Praha: SZN, 183 s., ISBN 07-031-67-04/45, 1967
- VĚTVIČKA, V. Růže. 1. vyd. Praha: Aventinum, 224 s., ISBN 80-7151-183-8, 2001.

Poděkování

Výsledky byly získány za podpory grantu MŠMT – FRVŠ 2324/2006/F4a.

ÚLOHA OXIDU DUSNATÉHO V OBRANNÉ REAKCI OKURKY SETÉ VYVOLANÉ PŘÍTOMNOSTÍ KADMIA

ROLE OF NITRIC OXIDE IN CUCUMBER DEFENCE RESPONSES ELICITED BY CADMIUM

Lenka LUHOVÁ – Markéta RYZÍ – Marek PETŘIVALSKÝ – Božena NAVRÁTILOVÁ

The aim of this work was to study the role of nitric oxide (NO) in defence reactions of Cucumis sativus cells elicited by toxic metal cadmium. NO is a highly reactive molecule that has numerous molecular targets in plant cells as an antioxidant and signalling molecule. Synergistic action of NO and hydrogen peroxide is also involved in the process of programmed cell death. Application of cadmium to growth medium enhanced NO production as an early response to stress and subsequently induced cell death.

Key words: cadmium, Cucumis sativus, nitric oxide, programmed cell death.

Úvod

Podstata toxicity těžkých kovů spočívá v jejich afinitě k esenciálním skupinám biomolekul. Těžké kovy vykazují vazbu s funkčními skupinami obsahujícími redukované formy síry, atomy kyslíku a dusíku. Schopnost těžkých kovů nahrazovat v biomolekulách esenciální ionty kovů může vést až k plné ztrátě enzymové aktivity. Těžké kovy jsou také schopny produkovat toxické aktivní formy kyslíku (ROS) autooxidací a Fentonovou reakcí a tak způsobovat oxidační stres (SCHÜTZENDÜBEL a POLLE, 2002).

Oxid dusnatý (NO) je malá biologicky účinná molekula plynu. Jako důležitá signální molekula ovlivňuje řadu fyziologických dějů, mezi které patří např. odezva na napadení patogenem, programovaná buněčná smrt, klíčení, růst, produkce fytoalexinů a zavírání stomat (DESIKAN a kol., 2004). Známa je také jeho úloha při odezvě na abiotický stres (DESIKAN et al., 2004). Jsou-li rostliny stresovány přítomností toxických kovů, byla často zaznamenána zvýšená produkce NO (BARTHA et al., 2005; KOPYRA et al., 2006; TEWARI et al., 2008). Aplikace NO donoru, např. nitroprusidu sodného (SNP) snižuje negativních vliv kovů na vývoj rostliny. Tento jev může být způsoben antioxidantní schopností NO snižující oxidační stres způsobený kovem (TEWARI et al., 2008).

Materiál a metody

Rostlinný materiál, izolace a kultivace protoplastů

Zdrojem mesofylových protoplastů byly *in vitro* rostliny *C. sativus* cv. Marketer (CZ09H3900121). Kultivace probíhala 4 týdny v kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C a světelným režimem 16 h den a 8 h noc, s osvětlením $32\text{--}36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pro izolaci protoplastů byl použit enzymový roztok obsahující 1% celulasu Onozuka R-10 a 0,25% macerozym R-10 v promývacím roztoku PGly, pH 5,8 (tma, 25 °C, 18 h) (NAVRÁTILOVÁ et al., 2008). Pro izolaci protoplastů byla použita centrifugace v hustotním gradientu. Protoplasty byly naředěny kultivačním médiem LCM1 na výslednou hustotu 10^5 protoplastů na 1 ml média. Kadmium bylo přidáno k buněčné suspenzi 7 dnů po izolaci protoplastů ve formě CdCl_2 o výsledné koncentraci 1 mM.

Stanovení životnosti MTT-testem a FDA

K 0,5 ml buněčné suspenze bylo přidáno 50 μl MTT (0,5 mg/ml). Po opatrném promíchání následovala 2 h inkubace (tma, 37 °C). Po centrifugaci (9000 g, 10 min) bylo k sedimentu přidáno 200 μl roztoku 1% NH_3 v DMSO. Po 5 min byla stanovena absorbance při 540 nm.

Fluorimetrické stanovení životnosti s využitím FDA bylo realizováno v mikrodestičkovém uspořádání s využitím spektrofotometru/fluorimetru Reader Synergy HT. Ke 100 μl buněčné suspenze bylo přidáno 10 μl FDA (25 $\mu\text{g/ml}$). Po 10 minutové inkubaci byla změřena fluorescence (excitace 485 nm, emise 515 nm).

Stanovení NO fluorescenční sondou DAF-FM-DA a DAF-2 a RNS a ROS fluorescenční sondou H_2DCF

Intracelulární produkce NO byla stanovena s využitím detekční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA), extracelulární NO s využitím detekční sondy 4,5-diaminofluorescein (DAF-2). Jako marker oxidativního stavu buněk byla použita fluorescenční sonda 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát ($\text{H}_2\text{DCF DA}$). Ke 100 μl buněčné suspenze *C. sativus* bylo přidáno 5 μl 0,2 mM fluorescenční sondy. Fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) byl změřen okamžitě po přidávku fluorescenční sondy a po 1 h inkubaci.

Výsledky a diskuse

V buněčné suspenzi *C. sativus* bylo po aplikaci CdCl_2 detekováno zvýšení fluorescence DCF odpovídající vyšší produkci ROS a RNS buňkami v porovnání s kontrolou první 4 h po aplikaci kadmia. Poté byl zaznamenán výrazný pokles fluorescence DCF. Právě zvýšená tvorba ROS a navození oxidativního stresu je často zmiňována

jako jeden z hlavních principů toxicity těžkých kovů (SCHÜTZENDÜBEL a POLLE, 2002). Zvýšení tvorby H_2O_2 a superoxidového radikálu vlivem Cd^{2+} iontů bylo již dříve pozorováno, např. u buněk sóji (KOPYRA et al., 2006), kořene a listu hrachu setého (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2006) či listu rýže (HSU a KAO, 2004).

Stres těžkými kovy indukuje u rostlin tvorbu NO. Bylo zjištěno, že Cd^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} ionty způsobují zvýšení endogenního NO v kořenech *P. sativum* a *B. juncea* (BARTHA et al., 2005). Také u buněk sóji vystavených působení Cd^{2+} iontům bylo zaznamenáno zvýšení endogenního NO, a to již po jednohodinovém působení kovu (KOPYRA et al., 2006). V případě buněčné suspenze *C. sativus* byl rovněž detekován o 20 až 60 % vyšší signál DAF-FMT odpovídající zvýšené produkci NO, a to první 4 h po přidavku $CdCl_2$. Lze předpokládat možný podíl NO jako antioxidační sloučeniny na snížení indukovaného oxidativního stavu. Po 24 h byl zaznamenán pokles produkce NO a v průběhu dalších 6 dnů byl detekován její pozvolný nárůst, který ale nedosáhl hodnot stanovených pro kontrolní vzorky (obr.1A).

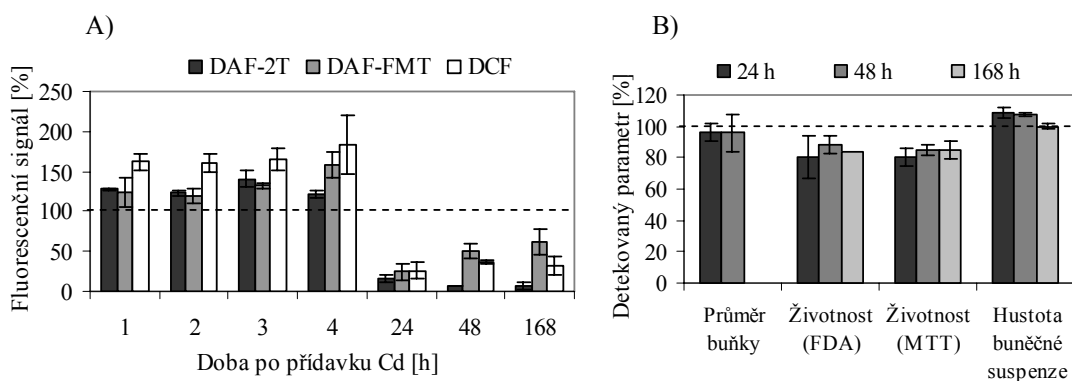
Hustota buněčné suspenze *C. sativus* a rozměry buněk nebyly výrazně ovlivněny po přidavku $CdCl_2$ k mediu (obr. 1B). Naše studie dále potvrdila již dříve pozorovaný negativní vliv Cd^{2+} iontů na životnost buněk. V případě buněčné suspenze *C. sativus* po aplikaci 1 mM $CdCl_2$ byl zaznamenán cca 20% pokles životnosti. Pokles životnosti může být vedle toxického vlivu ROS způsoben schopností Cd^{2+} iontů vytěsnit esenciální kationty z proteinů, což může vést k inhibici řady enzymových aktivit (NOCENTINI, 1987). Dalším faktorem vysvětlujícím působení Cd^{2+} iontů může být z důvodů podobné velikosti a náboje Cd^{2+} iontů a Ca^{2+} iontů ovlivnění Ca^{2+} homeostasy (RIVETTA et al., 1997).

Závěr

U buněčné suspenze *C. sativus* byl potvrzen toxický vliv Cd^{2+} iontů, projevující se poklesem životnosti buněk. V okamžité reakci na přidavek Cd^{2+} iontů k buněčné suspenzi byla prokázána intenzivní produkce aktivních forem kyslíku a dusíku a navození oxidativního stresu. Potvrzení možného podílu NO, jako antioxidační sloučeniny na snížení indukovaného oxidativního stavu bude součástí navazující studie.

Literatura

- BARTHA B. – KOLBERT Z. – ERDEI L. 2005. Acta Biologica Szegediensis 49 (1-2): 9-12
 DESIKAN R. – CHEUNG M.K. – BRIGHT J. – HENSON D. – HANCOCK J.T. – NEIL S.J. 2004. Journal of Experimental Botany 55(395): 205-212
 HSU Y.T. - KAO C.H. 2004. Plant Growth Regulation 42, 227-238
 KOPYRA M. – STACHON-WILK M. – GWÓZDZ E. A. 2006. Acta Physiologiae Plantarum 28(6): 525-536
 NAVRATILOVÁ B. – LUHOVÁ L. – PETŘIVALSKÝ M. 2008. Plant Cell Tiss and Organ Cult 94: 313 - 318
 NOCENTINI S. 1987. Nucleic Acid Research 15: 4211-4225
 RIVETTA A. – NEGRINI N. – COCUCI M. 1997. Plant, Cell and Environment 20: 600-608
 RODRÍGUEZ-SERRANO M. – ROMERO-PUERTAS M.C. – ZABALZA A. – CORPAS F.J., GÓMEZ M. – DEL RÍO L.A. – SANDALIO L.M. 2006. Plant, Cell and Environment 29: 1532-1544
 SCHÜTZENDÜBEL A. – POLLE A. 2002. Journal of Experimental Botany 53 (372): 1351-1365
 TEWARI R.K. – HAHN E.J. – PAK K.Y. 2008. Plant Cell Reports 27: 171-181



Obrázek 1: Vliv 1mM $CdCl_2$ na (A) produkci RNS a ROS (detekce fluorescenční probou H_2DCF DA) a tvorbu NO uvnitř buněk, resp. vně buněk *C. sativus* (detekce fluorescenční probou DAF-FM DA, resp. DAF-2) a na (B) vývoj buněk *C. sativus*, průměr buněk, hustotu buněčné suspenze a životnost (metoda FDA a MTT).

Poděkování:

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

HODNOTENIE SUCHOVZDORNÝCH EKOTYPOV TRÁV A ĎATELINOVÍN Z HĽADISKA ÚRODY SUŠINY A MORFOLOGICKÝCH A KVALITATÍVNYCH PARAMETROV

ASSESSMENT OF DROUGHT-TOLLERANT GRASS AND LEGUME ECOTYPES FROM THE ASPECTS OF DRY MATER YIELD, MORPHOLOGICAL AND QUALITATIVE PARAMETERS

Jana MARTINCOVÁ

*Morphological, biological and agronomic parameters, e.g. plant height, ear length, spring growth intensity, regrowth rate and dry matter (DM) yield were assessed in wild ecotypes and cultivars of grasses and forage legumes. The research trial was carried out at Banská Bystrica site over 2005 - 2007 (1st - 3rd harvest years). The trial involved 18 accessions (among them 13 ecotypes) of eight grasses and 14 accessions (of which 8 ecotypes) of six forage legumes. The variability of all the investigated traits was high. The highest variability was recorded at DM yield. The differences between the ecotypes were not significant. There were significant differences between the ecotypes and the cultivars. The spring growth intensity, the regrowth rate, the plant height and DM yield were higher at the cultivars than at the ecotypes. The total DM yields ranged between 2.34 and 10.29 t ha⁻¹ at grass cultivars (the highest DM yield was recorded with *Bromus inermis* cv. Tabrom) and from 0.59 to 12.72 t ha⁻¹ at the legume cultivars (the highest DM yield was found at *Onobrychis viciifolia* cv. Taja). Mean crude protein (CP) content was higher at the ecotypes than at the cultivars. There were significant differences between the botanical groups, and the content was higher at legumes in comparison to grasses (192,8 - 150,8 g kg⁻¹ DM).*

Key words: ecotypes, genetic diversity, morphological traits, qualitative parameters, grasses, legumes

Úvod

Nastupujúce klimatické zmeny prinášajú zo sebou rôzne negatívne dopady a sú sprevádzané viacerými negatívnymi vplyvmi. Problematika klimatických zmien a jej možných dôsledkov je vo svete ale aj na Slovensku čoraz aktuálnejšia a dostáva sa do popredia spoločenského záujmu. V súvislosti s nastupujúcim globálnym otepľovaním sa zvýšená pozornosť venuje vyhľadávaniu, zhromažďovaniu a hodnoteniu suchovzdorných ekotypov tráv a ďatelinovín. Problematika detekcie rastlín na suchovzdornosť je nanajvýš aktuálna, či už z praktického uplatnenia v lúčnych a pasienkových miešankách, ako aj pre ďalšie šľachtenie pri tvorbe nových suchovzdorných odrôd. Z tohto dôvodu sa do popredia dostáva pestovanie a hľadanie takých druhov plodín, ktoré sú odolné voči negatívnym vplyvom prostredia, najmä voči suchu, chorobám, škodcom a dosahujú vyšší výnos.

Cieľom príspevku bolo zhodnotiť morfológické a kvalitatívne znaky divorastúcich ekotypov a kontrolných odrôd tráv a ďatelinovín, poukázať na variabilitu ich znakov a na základe dosiahnutých výsledkov odporučiť vhodné druhy pre praktické uplatnenie do suchovzdorných miešaniek a pre šľachtiteľské účely.

Materiál a metódy

V roku 2004 bol na pokusnom stanovišti VÚTPHP v Banskej Bystrici založený pokus s divorastúcimi ekotypmi tráv a ďatelinovín. Do pokusu bolo zaradených 18 položiek 8 druhov tráv (*Festuca rubra*, *Festuca valesiaca*, *Poa pratensis*, *Trisetum flavescens*, *Phleum pratense*, *Phleum phleoides*, *Bromus erectus*, *Bromis inermis*) a 14 položiek 6 druhov ďatelinovín (*Anthyllis vulneraria*, *Coronilla varia*, *Onobrychis viciifolia*, *Lotus corniculatus*, *Medicago lupulina*, *Trifolium repens*) a kontrolné odrody (tab. 1,2). Orientovali sme sa predovšetkým na výber suchovzdorných druhov. Získaný východiskový materiál tráv sme zozbierali počas zberových expedícií v Krkonošiach, Nízkyh Tatrách, Slovenskom krase a ďatelinoviny pochádzali z oblasti Poľany, Považia, Beskyd. Pokus sme založili metódou s náhodným usporiadaním pokusných členov v 2 opakovaníach pre semenárske a produkčné využitie. Po predpestovaní boli rastliny vysadené individuálne na parcelky o ploche 0,5 x 2 m vo vzdialenosti 0,25 m, medziriadková vzdialenosť 0,50 m. Pre produkčné využitie boli vysadené 2 riadky po 14 rastlín v každom opakovaní. U ďateliny plazivej sme volili širšiu medziriadkovú vzdialenosť 0,80 m.

Pokus sme založili na pozemku v areáli VÚTPHP v nadmorskej výške 420 m n.m. s priemernou ročnou teplotou 8,1°C a priemerným úhrnom zrážok 693 mm. Pôdny typ je hlinito-piesočnatá pôda s vyšším podielom štrku s veľmi vysokým obsahom prijateľných živín. Počas rokov 2005-2007 boli zhodnotené viaceré morfológické, biologické a hospodárske znaky. V príspevku sa zameriavame na hodnotenie základných hospodárskych znakov: výška rastliny, rýchlosť jarného rastu, rýchlosť obrastania po kosbe, úroda sušiny a obsah N- látok. Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené analýzou variancie, významnosť rozdielov sa posúdila LSD- testom programom Statgraphics.

Výsledky a diskusia

Počas 3 úžitkových rokov (2000-2002) bola zistená vysoká variabilita vo všetkých sledovaných znakoch (výška rastliny, dĺžka klasu, intenzita jarného rastu, rýchlosť obrastania po kosbe, úroda sušiny) ako u tráv tak aj u ďatelinovín (tab. 1-2). Najvyššie hodnoty v sledovaných znakoch u tráv dosiahli druhy rodu *Bromus*, z nich najvyššia bola odroda Tabrom druhu *Bromus inermis*. Z ekotypov vynikal *Bromus erectus* z lokality Soroška

(830,0 mm). U d'atelinovín najvyššiu výšku rastliny mali odrody Taja *Onobrychis viciifolia* a Eroza *Coronilla varia* (731,0 resp. 710,0 mm). V priemere najúrodnejšia odroda bola zároveň aj najvyššia. Rýchlym jarným rastom a vyššou rýchlosťou obrastania po kosbe sa vyznačovali druhy *Bromus erectus*, *Bromus inermis*, *Trisetum flavescens*. Najvyšší jarný rast mala v priemere rokov odroda Tabrom druhu *Bromus inermis* (370,2 mm) a ekotyp z lokality Bôrka druhu *Bromus erectus* (349,7 mm). V rýchlosti obrastania po kosbe taktiež vynikali druhy rodu *Bromus* s najlepšou schopnosťou obrastania u ekotypu z lokality Bôrka druhu *Bromus erectus* (388,2 mm). U tráv variabilitu morfológických a hospodárskych znakov potvrdzujú aj ŠEVČÍKOVÁ A ŠRÁMEK (2002) u genetických zdrojov *Arrhenatherum elatius* a *Trisetum flavescens* a MARTINCOVÁ (2003) u kostravy trsteníkovitej (*Festuca arundinacea* Schreb). U d'atelinovín vysokú genetickú variabilitu druhu *L. corniculatus* uvádza aj DROBNÁ (2006), pričom potvrdzuje vyššiu rýchlosť obrastania u vyšľachtených druhov v porovnaní s divorastúcimi druhmi. Podobne aj KELMAN et al. (1997) a SAREEN a DEV (2003) zistili u divorastúcich populácií *L. corniculatus* vysokú genetickú variabilitu.

V celkovom hodnotení najvyššia variabilita sa zistila v produkcii sušiny. Priemerná úroda sušiny za 3 úžitkové roky sa pohybovala od 2,34 do 10,29 t.ha⁻¹ sušiny u tráv a od 0,59 do 12,72 t.ha⁻¹ sušiny u d'atelinovín. Najvyššie úrody poskytla počas všetkých rokov odroda Tabrom *Bromus inermis* (10,29 t.ha⁻¹) a z d'atelinovín odroda Taja vičenca vikolistého (12,72 t.ha⁻¹). Medzi odrodami a ekotypmi boli preukazné rozdiely, pričom vyššie úrody dosiahli kontrolne odrody. Rozhodujúcou mierou sa na výške úrody podieľal aj rok. Pribeh poveternostných faktorov počas vegetačného obdobia mal vysoko preukazný vplyv na výšku úrody. Najmä rok 2006 bol klimaticky veľmi nepriaznivý, dlhotrvajúce obdobie sucha a nedostatok zrážok spôsobilo, že veľká časť d'atelinovín vypadla a v poraste sa udržali len tie najsuchovzdornejšie druhy. V obsahu N- látok variabilita medzi ekotypmi a odrodami bola nízka, pričom ekotypy mali v priemere vyšší obsah N- látok než odrody. Výrazné rozdiely boli medzi floristickými skupinami, pričom vyšší obsah bol u d'atelinovín v porovnaní s trávami (192,8- 150,8 g.kg⁻¹ sušiny), čím sa potvrdilo, že d'atelinoviny obsahujú viac N- látok než trávy.

Tabuľka 1: Charakteristika morfológických a hospodárskych znakov u tráv

Var.	Druh	Ekotyp/Odroda	Výška rastliny (mm)	Rýchlosť jar. rastu (mm)	Rýchlosť obrastania (mm)	Úroda sušiny (t.ha ⁻¹)	Obsah N- látok (g.kg ⁻¹)
1.	<i>Festuca rubra</i>	SVKNTAT01-454	446,8	155,7	163,3	2,94	147,5
2.	<i>Festuca rubra</i>	SVKNTAT01-371	487,8	180,9	157,3	2,93	166,9
3.	<i>Festuca rubra</i>	SVKNTAT01-198	470,5	185,8	152,8	2,34	155,2
4.	<i>Festuca valesiaca</i>	SVKGEM 02-18	455,5	202,8	160,2	3,73	153,6
5.	<i>Festuca rubra</i>	Levočská	598,4	266,0	238,7	5,85	140,6
6.	<i>Poa pratensis</i>	Hontianske Nemce	618,3	225,3	233,0	3,79	165,2
7.	<i>Poa pratensis</i>	Čierny Balog	407,1	158,6	180,0	2,98	169,3
8.	<i>Poa pratensis</i>	Lea	419,4	144,3	191,2	3,61	167,2
9.	<i>Trisetum flavescens</i>	CZE KRK 01-77	674,2	334,6	374,5	3,43	128,2
10.	<i>Trisetum flavescens</i>	Horál	671,8	321,9	169,5	5,06	148,2
11.	<i>Phleum pratense</i>	SVKNTAT01-433	749,2	249,8	254,0	3,77	154,2
12.	<i>Phleum pratense</i>	SVKNTAT01-193	562,2	213,6	229,1	3,52	144,7
13.	<i>Phleum phleoides</i>	Biele Karpaty	680,9	263,1	228,1	3,86	148,5
14.	<i>Phleum pratense</i>	Levočská	814,7	332,2	248,5	3,70	139,4
15.	<i>Bromus erectus</i>	SVKGEM02-43	798,7	349,6	388,2	7,33	143,9
16.	<i>Bromus erectus</i>	SVKGEM02-74	811,4	313,6	359,2	6,68	142,7
17.	<i>Bromus erectus</i>	SVKGEM02-54	830,0	330,3	359,5	6,71	150,8
18.	<i>Bromus inermis</i>	Tabrom	977,2	370,2	339,0	10,29	148,4
Σ			637,5	255,5	245,9	4,58	150,8
LSD 0,05			130,8	66,0	74,7	1,38	26,51
LSD 0,01			173,3	87,5	99,0	1,82	34,93

Tabuľka 2: Charakteristika morfológických a hospodárskych znakov u d'atelinovín

Var.	Druh	Ekotyp/Odroda	Výška rastliny (mm)	Rýchlosť jar. rastu (mm)	Rýchlosť obrastania (mm)	Úroda sušiny (t.ha ⁻¹)	Obsah N- látok (g.kg ⁻¹)
1.	<i>Anthyllis vulneraria</i>	SVKBES99-515	334,7	98,6	180,9	1,40	168,5
2.	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Třebíčský	389,5	87,1	110,1	2,08	177,5
3.	<i>Coronilla varia</i>	SVKZAH98-112	552,3	129,1	163,5	2,34	219,8
4.	<i>Coronilla varia</i>	Eroza	710,1	153,7	175,3	5,86	218,5
5.	<i>Onobrychis viciifolia</i>	SVNPIR01-86	682,6	189,6	159,6	5,16	189,8
6.	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Taja	731,0	241,4	275,6	12,72	198,0
7.	<i>Lotus corniculatus</i>	SVKPOL96-132	250,0	69,6	124,0	2,85	186,4
8.	<i>Lotus corniculatus</i>	SVKPOL96-112	448,1	80,4	148,0	0,60	208,0
9.	<i>Lotus corniculatus</i>	Polom	360,8	120,0	172,7	5,92	184,5
10.	<i>Medicago lupulina</i>	POLBES99-772	242,7	44,7	82,8	1,37	174,3
11.	<i>Medicago lupulina</i>	Ekola	184,5	56,9	125,8	0,59	174,2
12.	<i>Trifolium repens</i>	SVKPOV96-042	200,1	73,1	121,0	3,64	187,6
13.	<i>Trifolium repens</i>	SVKPOV99-415	240,1	78,0	137,8	3,69	203,9
14.	<i>Trifolium repens</i>	Dúbrava	294,7	108,0	156,3	6,73	208,3
\bar{x}			401,5	109,3	152,4	3,88	192,8
LSD 0,05			166,0	46,9	146,9	6,68	21,10
LSD 0,01			221,0	71,2	188,2	8,41	27,88

Záver

V rámci výskumnej úlohy „Opatrenia zohľadňujúce adaptáciu na klimatické zmeny v oblasti lúkarstva a pasienkárstva“ sme v rokoch 2005-2007 sledovali kolekciu tráv a d'atelinovín. Odrody sa všeobecne vyznačovali rýchlejším jarným rastom, mali rýchlejšiu schopnosť obrastania, vyššiu výšku rastliny a taktiež dosahovali aj vyššiu produkciu sušiny. Najvyššiu úrodu sušiny sme zaznamenali u odrôd s najvyššou výškou rastliny *Bromus inermis* cv. Tabrom (10,29 t.ha⁻¹) a *Onobrychis viciifolia* cv. Taja (12,72 t.ha⁻¹). V obsahu N-látok sa dosiahol vyšší obsah u d'atelinovín v porovnaní s trávami (196,3- 150,8 g.kg⁻¹ sušiny). Z hľadiska suchovzdornosti, trvácnosti a prispôsobeniu sa daným podmienkam prostredia ako vhodný komponent do lúčnych porastov môžeme doporučiť: *Onobrychis viciifolia* a *Coronilla varia* a z tráv *Bromus erectus* pre ich dobré morfológické a hospodárske vlastnosti.

Literatúra

- DROBNÁ, J (2006) Hodnotenie morfológických a agronomických znakov divorastúcich populácií ľadenca rožkatého (*Lotus corniculatus* L.). In Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin. Brno. 23-24.11.2006: 181-185. ISBN 80-86908-03-8
- KELMAN, W.M. *et al* (1997) Genetic variation for seasonal herbage yield, growth habit, and condensed tannis in *Lotus pedunculatus* Cav. and *Lotus corniculatus* L. Australian Journ. of Exp. Agric. 48 (7): 959-968
- MARTINCOVÁ J (2003) Evaluation of genetic resources of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Proc. 25th EUCARPIA Fodder Crop and Amenity Grasses Section Meeting. Czech J. Genet. Plant Breed., 39 (Special Issue): 215-217. ISSN 1212-1975
- SARREN, S., DEV. (2003) A preliminary study to explore potential of *Lotus corniculatus* L. in Palampur. (Himachal Pradesh, India). Lotus Newsletter. 33: 3-5
- ŠEVČÍKOVÁ M, ŠRÁMEK P (2002) Characterisation of wild populations of European collections of tall oatgrass. Grassland Science in Europe. Multi-functional Grassland. 7: 472-473

ÚRODNOSŤ KLASU PŠENICE PO INOKULÁCIÍ *STAGONOSPORA NODORUM* WHEAT SPIKE FERTILITY AFTER *STAGONOSPORA NODORUM* INOCULATION

Štefan MASÁR

Wheat cultivars AM34/99, Audace, Batis, Charger, Corsaire, Folio, Pesma, Shango and Zornica were tested at two years under field conditions for the effect of artificial infection by Stagonospora nodorum. Cultivars with 2NS/2AS translocation in interaction with year and S. nodorum infection manifest a significant influence to number of kernels per spike and weight of kernels per spike. After S. nodorum infection the cultivars with 2NS/2AS translocation have had a higher number of kernels per spike and weight of kernels per spike as cultivars without 2NS/2AS.

Key words: wheat, Stagonospora nodorum, 2NS2AS translocation, Lr37, spike fertility

Úvod

Septorióza plevová (*Stagonospora nodorum* blotch - SNB) patrí k najzávažnejším ochoreniam pšenice. Spôsobuje ju *Leptosphaeria nodorum* E. Müller = *Phaeosphaeria nodorum* (E. Müller) Hedjaroude, anamorfo *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. = *Stagonospora nodorum* (Berk.) Castellani&Germano. Doteraz nebola zistená imúnna reakcia pšenice a jej príbuzných druhov na SNB (Wicki et al., 1999). Niektoré odrody majú vysoký stupeň parciálnej rezistencie voči SNB (Jeger et al., 1983). Cieľom práce bolo posúdiť vplyv rôzneho genetického pozadia vybraných odrôd na úrodnosť klasu pšenice po infekcii *Stagonospora nodorum* Berk.

Materiál a metódy

Poľný pokus sme založili v Piešťanoch v rokoch 2004 a 2005 v dvoch opakovaníach na parcelkách 1 m². Použili sme genotypy AM34/99, Audace, Batis, Charger, Corsaire, Folio, Pesma, Shango a Zornica. Rastliny sme infikovali zmesou izolátov *Stagonospora nodorum*, ktorú poskytol Dr. B. Vančo podľa ním zavedenej metodiky (Vančo, 2004). Pre stanovenie počtu zŕn v klase (PZK) a hmotnosti zrna v klase (HZK) sme odoberali vzorky 20 klasov z infikovaného (+) a neinfikovaného (-) materiálu. Analýzy sme spracovali v programe SPSS for Windows.

Výsledky a diskusia

Výber odrôd sme robili na základe rodokmeňov. Genotypy Audace, Corsaire a Folio majú gén *Lr37*. (Goyeau a Park, 1977, Bartoš et al., 2004) a genotypy Batis, Charger a Shango gén *Lr37* nemajú (Winzeler et al., 2000, Blažková et al., 2002) ale majú gény *Lr10*, *Lr13* a gén *LrH*, alebo ich kombinácie. Pšenica VPM1 má komplex génov *Lr37*, *Sr38* a *Yr17*, ktoré sú vo väzbe vo fáze coupling, jej pôvod je odvodený od chromozómového 2NS/2AS segmentu z *Triticum ventricosum* Ces., (Bariana a McIntosh, 1994). Podľa údajov <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree>, genotypy Audace, Corsaire a Folio majú v niektorom z rodičov genotyp VPM1, resp. VM s translokáciou 2NS/2AS (+), genotypy Batis, Charger a Shango v rodokmeni nemajú rodičov s VPM1 (-). Rodokmene genotypov AM34/99, Pesma a Zornica nie sú dostupné (n). Na variabilitu PZK mali vysoko významný vplyv infekcia *S. nodorum*, interakcia rok x translokácia 2NS/2AS a interakcia rok x infekcia *S. nodorum* x translokácia 2NS/2AS. Interakcia infekcia *S. nodorum* x translokácia 2NS/2AS mala na PZK významný vplyv (tab. 1). Interakcia rok x translokácia 2NS/2AS sa prejavila v tým, že v suchšom roku 2004 (71, 5% zrážok roku 2005) bol najvyšší PZK v genotypoch s 2NS/2AS a v roku 2005 v odrodách bez 2NS/2AS i v genotypoch s neznámym rodokmeňom. Prejavom interakcie infekcia x 2NS/2AS bol najvyšší PZK v infikovaných rastlinách v genotypoch s 2NS/2AS (obr.1). Na variabilitu HZK mali vysoko významný vplyv rok, infekcia *S. nodorum* a interakcia infekcia x translokácia. Interakcia rok x infekcia mala na HZK významný vplyv (tabuľka 1). Vyššia HZK bola vo vlhkejšom roku 2005 a v klasoch neinfikovaných rastlín. Prejavilo sa to významne v interakcii rok x infekcia. Interakcia infekcia x translokácia sa prejavila tým, že na infikovaných rastlinách mali odrody s 2NS/2AS najvyššiu HZK (obr.2). Priamy vplyv génu *Lr37* na chromozómovom segmente z *Triticum ventricosum* na rezistenciu voči *S. nodorum* doteraz zistený nebol. Mnohé druhy rodu *Aegilops* vykazujú čiastočnú rezistenciu voči *S. nodorum*. Bola zistená napr. v syntetickom amfidiploide *Ae. squarrosa* a *Triticum dicoccum* (Ellerbrook, et al., 1999). Pšenice s translokovaným segmentom z *Triticum ventricosum* boli odolné proti steblolamu, ktorý spôsobuje *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton (Winzeler et al., 2000).

Záver

Translokácia 2NS/2AS sa významne prejavila v interakcii s infekciou *Stagonospora nodorum* Berk. Pšenice s 2NS/2AS mali vyšší počet zŕn v klase a vyššiu hmotnosť zrna v klase na rastlinách infikovaných *S. nodorum*. Odrody s 2NS/2AS sa môžu uplatniť najmä v rokoch s deficitom zrážok pri infekčnom tlaku patogéna *S. nodorum*.

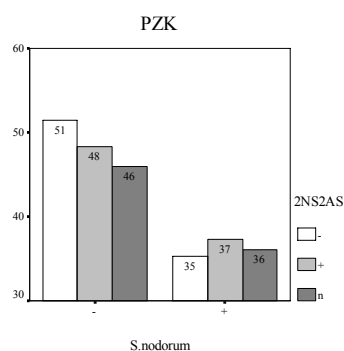
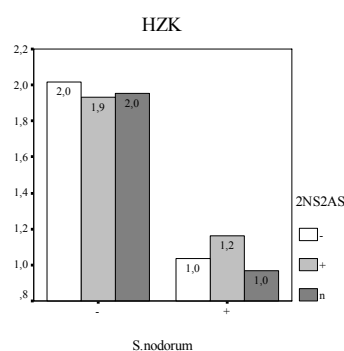
Literatúra

- Bariana, H.S., McIntosh, R.A.: Characterization and origin of rust and powdery mildew resistance genes in VPM1 wheat. *Euphytica*, 1994, 76:53-61
- Bartoš, P., Ovesná, J., Hanzalová, A., Chrpová, J., Dumalášová, V., Škorpík, M., Šíp, V.: Presence of a translocation from *Aegilops ventricosa* in Wheat Cultivars Registered in the Czech Republic. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 2004, 40, (2): 31–35
- Blažková V., Bartoš P., Park R.F., Goyeau H.: Verifying the presence of leaf rust resistance gene Lr10 in sixteen wheat cultivars by use of a PCR-based STS marker. *Cereal Res. Comm.* 2002, 30 (1-2): 9-16.
- Ellerbrook, C.M., Korzun, V., Worland, A.J.: Using Precise Genetic Stocks to Investigate the Control of *Stagonospora nodorum* Resistance in Wheat. In: *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research. Proceedings of the Fifth International Septoria Workshop September 20-24, 1999 CIMMYT, Mexico* p.150-153
- Goyeau H., Park R.F. Postulation of resistance genes to wheat rust at the seedling stage in bread wheat cultivars grown in France. In: *Proc. of Conf. Approaches to improving disease resistance to meet future needs: Airborne pathogens of wheat and barley.* 11-13 Nov. 1997, Praha, Czech Rep. 1997, p. 28-14.
- <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree>
- Jeger, M.J, Jones, D.G., Griffiths, E.: Components of partial resistance of wheat seedlings to *Septoria nodorum*. *Euphytica* 1983, 32:575–584
- Wicki, W., Schmidt, J.E., Stamp, P., Messmer, M.: Inheritance of resistance to leaf and glume blotch caused by *Septoria nodorum* Berk. in winter wheat. *Theor Appl Genet* 1999, 99:1265–1272
- Winzeler, M., Mesterhazy, A. Park, R.F., Bartos, 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.: Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 2000, 20:783–792
- Vančo, B.: Rozšírenie a miesto septorie plevovej v rámci listových škvrnitostí pšenice ozimnej. Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín. Zbor. z 11. odborného seminára 24.-25.nov. 2004, VÚRV Piešťany, 2004, s. 51 – 52.

Tabuľka 1. Priemerné štvorce z analýzy rozptylu

Zdroj premenlivosti	df	PZK	HZK
Model	8	110780,551**	150,164**
Rok (A)	1	79,335	4,768**
Infekcia <i>S. nodorum</i> (B)	1	27441,701**	149,997**
Translokácia 2NS2AS (C)	1	352,343	0,477
A x B	1	214,513	1,031*
A x C	1	1614,335**	0,186
B x C	1	657,268*	0,890**
A x B x C	1	955,587**	0,047
Chyba	472	157,735	0,193

** významné na úrovni P=0,01; * významné na úrovni P=0,05

Obrázok 1: Vplyv *S. nodorum* na PZK v odrodách s rôznym genetickým pozadímObrázok 2: Vplyv *S. nodorum* na HZK v odrodách s rôznym genetickým pozadím

VPLYV IÓNOV KADMIA NA POLYMORFIZMUS ENZÝMOV ŠTYROCH KULTIVAROV RUMANČEKA KAMILKOVÉHO [*CHAMOMILLA RECUTITA* (L.) RAUSCHERT]

EFFECT OF IONS OF CADMIUM ON THE ENZYME POLYMORPHISM OF FOUR CHAMOMILE [*CHAMOMILLA RECUTITA* (L.) RAUSCHERT] CULTIVARS

Pavol MÚDRY – Daša ZIFČÁKOVÁ

The main aim of work was testing of suitable methodology for analyse and interpretation of enzymes polymorphism of chamomile cultivars. In our work we have devoted attention to influence of different concentrations of cadmium – 0, 12, 60, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 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 analytical samples of leaves and roots. From our analyses resulted that cadmium does not influence polymorphism of experimental enzymes.

Key words: Chamomilla recutita (L.) Rauschert, cadmium, enzyme polymorphism, concentrations, electrophoresis, starch gel.

Úvod

Najviac využívaná rastlina na lekárske účely na Slovensku je rumanček kamilkový [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert]. Predovšetkým kvety rumančeka kamilkového sa používajú ako droga. Droga z rumančeka (suché kvetné úbory) je zahrnutá v zozname liečiv 26 krajín a má protizápalové, antiseptické, hojivé, stimulačné, spazmolytické (protikŕčovité), karminatívne (proti nadúvaniu) a sedatívne účinky (ŠALAMON, HONČARIV 1994).

Stresové faktory predstavujú nepriaznivé vplyvy prostredia ohrozujúce rastlinu. Významnými stres faktormi sú ťažké kovy. Kadmium a iné ťažké kovy pozitívne pôsobia na zvýšenie produkcie reaktívnych kyslíkových foriem (ďalej len ROS). ROS poškodzujú terciárnu štruktúru proteínov a môžu viesť k ich denaturácii. Bunka môže na takéto zmeny reagovať aktiváciou obranných génov, ktoré v sebe kódujú antioxidantné enzýmy zachytávajúce ROS. Takýto obranný enzým je napr. kataláza (CAT). Reakciou bunky však môže byť i expresia stresových proteínov zo skupiny heat shock proteins (hsp). Tieto proteíny sa podieľajú na reparácii už denaturovaných proteínov (JOMOVÁ et al., 2005).

Pôsobenie kadmia na rastliny zapríčiňuje vznik rôznych symptómov, medzi ne patrí chloróza listov, červenohnedé sfarbenie listovej žilnatiny, fialovohnedé škvrny na listoch, hnednutie koreňových vláskov alebo špičiek koreňov, v extrémnych prípadoch uschýnanie a opadanie listov (CIBULKA et al., 1991).

Cieľom našej experimentálnej práce bolo uskutočniť analýzu polymorfizmu vybraných druhov enzýmov rumančeka a vyhodnotiť jeho bioindikačný význam vo vzťahu k pôsobeniu iónov kadmia.

Materiál a metódy

V roku 2008 sme uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov štyroch kultivarov rumančeka kamilkového (GORAL, LUTEA, BONA a PREŠOV) metódou horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle. Analyzovali sme listové čepele a centrálnu časť koreňovej sústavy.

Kultivary rumančeka boli vysiate na povrch pôdy 27.03.2007, pričom začali vzhádzať 30.03.2007. Po dobe rastu 3,5 týždňa boli rastliny presadené do „kelímok od jogurtov“ a boli prenesené do skleníka. Tu rástli rastliny ešte 5 týždňov až do začiatku experimentu dňa 29.05.2007, kedy sa rastliny vymyli z pôdy a vložili sa do hydroponie. V pokuse sa teda použili 8,5 týždňa staré rastliny.

1. K-variant (kontrola): Hoaglandov roztok (10 rastlín z každého kultivaru).
2. Cd-variant: $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 2 koncentráciách 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Cd, 60 a $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Cd v Hoaglandovom roztoku (po 10 rastlín z každej koncentrácie a za každý variant).

Rastliny potom rástli v rastovej komore pri teplote vzduchu 25 °C, energii fotosynteticky aktívneho žiarenia (PAR) 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16h deň/8h noc. Po ukončení experimentu (4.6.2007) boli rastliny zmrazené pri -70 °C v hlboko chladiacom boxe a uskladnené až do realizácie analýz.

Výsledky a diskusia

Pri práci sme zistili, že na analýzy významne pôsobí teplota v laboratóriu, a preto je potrebné zabezpečiť homogenizáciu vzoriek v extrakčnom činidle pri nízkych teplotách (do 15 °C). Ideálny rozmer knotov je 2x12 mm. Najintenzívnejšie sa vyfarbili izoformy na škrobovom géle - systém B (enzýmy ACP, MDH), systém C (enzým CAT) a D (enzým IDH prejavuje slabšie škvrny). Ostatné enzýmy analyzované v škrobovom géle - systém D (PGM, PGI/PGD) tvoria po vyfarbení väčšinou slabšie škvrny. Najefektívnejšie je nanášanie vzoriek do škrobového gélu bezprostredne po homogenizácii, lebo časom klesá aktivita enzýmov.

Z analýz polymorfizmu enzýmov – ACP, ADH, CAT, IDH, MDH, PGD a PGM vyplynulo, že metodologický postup pre kukuricu možno úspešne použiť aj pre rumanček kamilkový. Z výsledkov vyplýva, že pôsobením iónov kadmia nedochádza ku zmene polymorfizmu analyzovaných enzýmov.

Záver

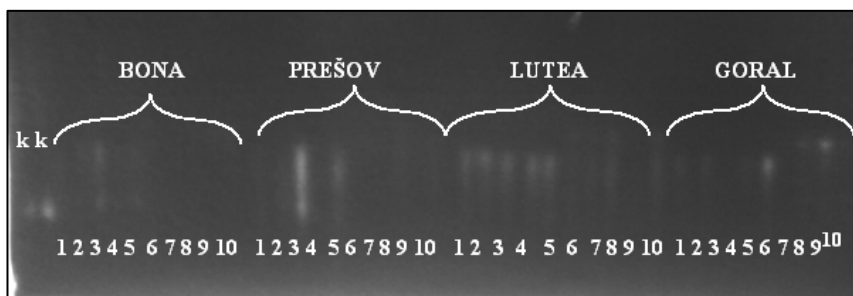
Zamerali sme sa na metodológiu analýzy polymorfizmu enzýmov v listoch a vkoreňoch rumančeka kamilkového. Práca prináša a hodnotí výsledky vplyvu rôznych dávok kadmia v Hoaglandovom živnom roztoku na polymorfizmus siedmich druhov enzýmov. Z nich vyplýva, že zvolený metodologický postup analýzy polymorfizmu enzýmov možno úspešne použiť aj v neskorších fázach ontogenézy rastlín. Výsledky analýz potvrdili, že pôsobenie iónov kadmia nemá vplyv na polymorfizmus analyzovaných enzýmov.

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

Literatúra

CIBULKA, J. et al.: Pohyb olova, kadmia a rtuti v zem'ed'elské výrobc a biosfére. Praha : SZN, 1986. 157 s. ISBN 80-200-0401-7
 JOMOVÁ, K. - ZIMA, M. - HEGEDŮSOVÁ, A. – MOROVIČ, M.: Zmeny v expresii proteínov v koreňových vrcholoch rastlín vplyvom kadmia. In 4. Biologické dni. Nitra : FPV UKF, edícia Prírodovedec č. 178, 2005, s. 130-132. ISBN 80-8050-864-X
 ŠALAMON, I. - HONČARIV, R.: Growing condition and breeding of chamomile regarding the essential oil qualitative-quantitative characteristics in Slovakia. HERBA POLONICA, Vol. 40, No. 1-2, 1994

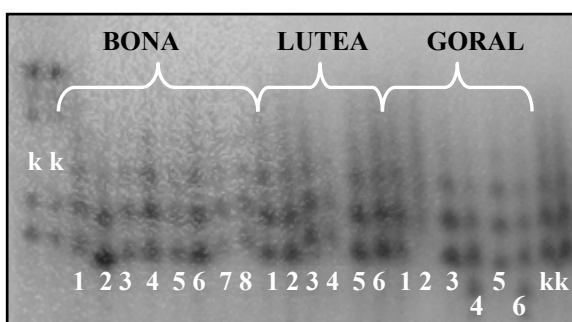
Obrázok 1: Izozymogramy katalázy rumančeka kamilkového



Odroda/č.vzorky	R _f
BONA	
1-10	0,23
PREŠOV	
1-10	0,23
LUTEA	
1-5	0,26
6-10	0,27
GORAL	
1-5	0,26
6-10	0,29

Odroda BONA- vzorky listov č. 1-5, vzorky koreňov č. 6-10. Odrody PREŠOV, LUTEA a GORAL majú ten istý postup číslovania vzoriek. Pri všetkých vzorkách bola koncentrácia kadmia 0 μmol.dm⁻³. Prvé dve vzorky sú kontroly kukurica QUINTAL.

Obrázok 2: Izozymogramy malátdehydrogenázy rumančeka kamilkového



BONA: vzorky listov (č. 1-4) a vzorky koreňov (č. 5-8) homogenizované v extrakčnom činidle sacharóza č. 1,5 (0 μmol.dm⁻³ Cd), č. 2, 6 (12 μmol.dm⁻³ Cd), č.3, 7 (60 μmol.dm⁻³ Cd), č.4, 8 (120 μmol.dm⁻³ Cd).

Odroda/č.vzorky	R _f
BONA	
1-8	0,129
LUTEA	
1-3	0,129
4-6	0,129
GORAL	
1-3	0,129
4,6	0,118
5	0,129

LUTEA: vzorky listov (č.1-3) a vzorky koreňov (č.4-6) homogenizované v extrakčnom činidle sacharóza č. 1, 4 (0 μmol.dm⁻³ Cd), č. 2, 5 (12 μmol.dm⁻³ Cd), č. 3, 6 (60 μmol.dm⁻³ Cd). GORAL: vzorky listov (1-3) a vzorky koreňov (4-6) homogenizované v extrakčnom činidle sacharóza č. 1, 4 (0 μmol.dm⁻³ Cd), č. 2, 5 (12 μmol.dm⁻³ Cd), č. 3, 6 (60 μmol.dm⁻³ Cd). Prvé dve a posledné dve vzorky sú kukurica QUINTAL.

VPLYV ODRODY A ENVIRONMENTÁLNYCH PODMIENOK NA VÝSKYT CHORÔB A PRODUKTIVITU PŠENICE LETNEJ F. OZIMNEJ

THE INFLUENCE OF VARIETY AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON THE DISEASE INCIDENCE AND PRODUCTIVITY OF WINTER WHEAT

Darina MUCHOVÁ – František ONDREJČÁK – Mária LICHVÁROVÁ – Ľubomír RÜCKSCHLOSS

*This paper presents a statistical analysis of disease occurrence and grain yield of wheat varieties grown for three years in locality Malý Šariš. The small-plot trials were conducted to determine the influence of genotypes (16 different varieties), years (2006, 2007, 2008) and treatments (the application of fungicides) on the major biotic constraints affecting productive characteristics of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in intensive production systems. Field experiments showed the significant effect all of the main factors and their interactions on the level of diseases and the crop productivity. The data revealed significant differences among varieties in their resistance or susceptibility to particular diseases. The most serious diseases affecting productivity of wheat were leaf spots in all followed years and yellow rust in 2007. The fungicide treatment significantly reduced incidence of leaf and ear diseases. There was a significant grain yield increase by 16,8 % (1.32 t.ha⁻¹) from fungicide treatments, compared with the unsprayed variant.*

Key words: winter wheat, productivity, diseases, environment

Úvod

Odroda sa právom považuje za jeden z najdôležitejších intenzifikačných faktorov. Má v sebe geneticky zakódovanú úrodovú schopnosť, kvalitu a odolnosť voči biotickým a abiotickým faktorom prostredia. Odolnosť proti biotickým faktorom relatívne ľahko podlieha zmenám. Dôvodom je hlavne veľká adaptabilita a biologická rôznorodosť pôvodcov hubových ochorení, čo má za následok postupné prekonávanie geneticky založených odolností na základe prírodného výberu v populáciách patogéna. Okrem toho zmeny klimatických podmienok, ktoré v posledných rokoch pozorujeme, podmieňujú v značnej miere aj zmeny vo výskyte a v zložení populácií patogénov a škodcov, ktoré poškodzujú kultúrne plodiny (BURDON et al., 2006, GARRET et al., 2006). Pozorujeme šírenie niektorých chorôb do oblastí, v ktorých sa predtým nevyskytovali.

Z vyššie uvedených príčin je potrebné sledovať zmeny v populáciách patogéna na určitom území a reakcie odrôd voči nim, aby sa minimalizoval rozdiel medzi potenciálnou, biologickou a skutočnou, hospodárskou úrodou poľnohospodárskych kultúr a aby sa mohli prijať účinné opatrenia zamedzujúce vzniku škôd a zníženiu produktivity. V poľnohospodárskej praxi sú opatrenia proti patogénom sústredené hlavne na fungicídne ošetrovanie smerujúce k ochrane najvyšších listových poschodí a klasov (LICHVÁROVÁ et al., 2007).

Cieľom práce bolo sledovanie vplyvu ročníka, odrody a ošetrovania na výskyt a intenzitu patogénov a ich dopad na produkčnú schopnosť pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.).

Materiál a metódy

Poľné maloparcelkové pokusy boli realizované na pozemkoch Výskumno-šľachtiteľskej stanice v Malom Šariši, v zemiakarskej výrobnjej oblasti, v priebehu rokov 2006-2008. V pokuse bolo sledovaných 16 odrôd, zoznam ktorých je uvedený v tab. 1 a 2. Pokus bol založený v 2 samostatných blokoch: blok N – bez aplikácie fungicídov, blok O – s aplikáciou fungicídu Duett (0,80 l.ha⁻¹) v štádiu objavenia sa 2. kolenka pšenice a fungicídu Tango Super (1,0 l.ha⁻¹) v štádiu klasenia. V rámci blokov bola použitá metóda náhodného usporiadania pokusných členov v 4 opakovaníach. Veľkosť pokusnej parcelky bola 10 m².

Pri jednotlivých chorobách bolo stanovené percentuálne napadnutie plochy listov, resp. klasov. Hodnotené boli: múčnatka trávová (*Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici*), hrdza pšenícová (*Puccinia tritici* Eriks) a hrdza plevová (*Puccinia striiformis* Westend f.sp. *striiformis*). Septorióza plevová (*Phaeosphaeria nodorum* (E. Müller) Hedjaroude, septorióza pšenícová (*Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröter a helmintosporiáza pšenice (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs boli hodnotené ako komplex listových škvrnitostí. Z klasových chorôb bola hodnotená múčnatka trávová a septorióza plevová.

Vývojové štádium pšenice a spôsob hodnotenia pri jednotlivých chorobách: pri múčnatke trávovej hodnotené priemerné napadnutie troch horných listových poschodí na začiatku mliečnej zrelosti; pri listových škvrnitostiach napadnutie troch horných listových poschodí v skorej mliečnej zrelosti; pri hrdzi pšenícovej a hrdzi plevovej napadnutie dvoch horných listových poschodí v neskorej mliečnej zrelosti; pri klasových chorobách - napadnutie múčnatkou v skorej mliečnej zrelosti a septoriózami v neskorej mliečnej zrelosti. Dosiagnuté výsledky boli štatisticky vyhodnotené analýzou variancie v programe Statgraphics plus.

Výsledky a diskusia

Ako uvádza HUDEC (2005), z hľadiska chorôb rastlín nie je podstatný ani tak zdroj infekcie (prítomný takmer v každom poraste), ako skôr priebeh počasia, agrotechnika a citlivosť odrody. Na základe analýzy variancie sme zistili, že všetky sledované faktory – odroda, ročník, ošetrovanie, ako aj ich interakcie, mali vysoko štatisticky preukazný vplyv na výskyt a intenzitu jednotlivých ochorení. Znalosť diferencií odrodových

charakteristík umožňuje pestovateľovi vybrať si odrody vhodné do jeho konkrétnych podmienok a podľa ich citlivosti či odolnosti voči škodlivým organizmom upravovať postupy chemickej ochrany. Z tabuľky 1 vyplýva, že relatívne nízky stupeň napadnutia všetkými sledovanými chorobami vykazovali odrody Akteur, Cubus, Ilias a Pavlina. Najvyšší stupeň napadnutia bol zistený pri odrode Petrana.

Tabuľka 1: Odrodové rozdiely v napadnutí chorobami (% napadnutia listovej plochy, resp. klasu) pšenice letnej v neošetrenom variante v ročníkoch 2005/2006 – 2007/2008

Odroda	MuL		LiŠ		HPš		HPI		MuK		SeK	
Torysa	3,3	ab	17,9	abc	11,7	e	1,0	a	6,9	ab	3,8	abc
Malvína	3,5	abc	9,6	ab	4,6	abc	20,8	b	4,7	ab	2,8	ab
Malyska	9,6	de	12,1	abc	13,8	e	3,3	a	6,9	ab	4,7	abcde
Markola	5,4	abc	21,7	abcd	1,7	ab	0,8	a	8,1	b	4,7	abcde
Pavlína	2,9	ab	12,9	abc	5,6	abcd	0,2	a	4,4	ab	3,4	abc
Veldava	3,8	abc	25,0	abcd	3,8	abc	1,0	a	6,6	ab	11,6	def
Mladka	4,6	abc	29,0	cd	7,7	bcde	0,6	a	8,1	b	9,1	abcdef
Venistar	7,3	cd	24,4	abcd	1,0	a	0,8	a	5,9	ab	10,6	cdef
Akteur	2,1	ab	8,8	a	3,1	abc	3,8	a	3,8	a	1,9	a
Vanda	5,2	abc	27,9	bcd	9,0	cde	1,0	a	4,4	ab	9,7	bcdef
Sulamit	4,6	abc	23,3	abcd	5,4	abcd	0,8	a	6,3	ab	4,4	abcd
Ilona	5,8	bcd	52,7	e	4,6	abc	2,1	a	4,4	ab	11,9	ef
Ilias	3,5	abc	11,7	abc	4,2	abc	0,2	a	4,4	ab	3,1	ab
Cubus	1,7	a	10,4	abc	5,0	abcd	0,2	a	4,4	ab	4,1	abc
Barroko	2,3	ab	21,3	abcd	1,7	ab	0,8	a	5,6	ab	4,7	abcde
Petrana	11,3	e	38,8	de	10,8	de	1,0	a	8,1	b	13,8	f
Priemer	4,8		21,7		5,8		2,4		5,8		6,5	
min.	1,7		8,8		1,0		0,2		3,8		1,9	
max.	11,3		52,7		13,8		20,8		8,1		13,8	
rozdiel	9,6		44,0		12,7		20,6		4,4		11,9	

MuL – múčnatka trávová na listoch, LiŠ – komplex listových škvrnitostí, HPš – hrdza pšenicová, HPI – hrdza plevová, MuK – múčnatka v klase, SeK – septoriózy v klase. Hodnoty označené rovnakými písmenami nie sú preukazne rozdielne na hranici pravdepodobnosti $P < 0,05$, Tukeyov test.

V predchádzajúcom desaťročí patrila k najškodlivejším chorobám pšenice v sledovanej lokalite hrdza pšenicová, ktorá skorými a včasnými infekciami viedla k výraznej redukcii v úrode zrna. V posledných troch rokoch pozorujeme jej oneskorený výskyt a zníženú mieru napadnutia, čo dokumentuje aj priemerné napadnutie rastlín hrdzou pšenicovou na úrovni len 5,8 % v ročníkoch 2006-2008. Najvyššiu citlivosť k hrdzi pšenicovej vykazovali odrody Malyska, Torysa a Petrana s viac ako 10 %-ným napadnutím listovej plochy. Najodolnejšie boli odrody Venistar, Markola a Barroko. Rovnako nízka intenzita napadnutia v danom období bola sledovaná aj pri múčnatke trávovej.

Čo sa týka hrdze plevovej, pre danú lokalitu je charakteristický jej nepravidelný výskyt. V sledovanom období sa vyskytla len v roku 2007 a intenzita napadnutia silne závisela od odrody.

V posledných rokoch sa stávajú jedným z rozhodujúcich problémov efektívnej ochrany pšenice letnej proti hubovým chorobám pôvodcovia listových škvrnitostí. Spektrum patogénov, ktorí sa podieľajú na tomto komplexnom hubovom ochorení, je široké. V priebehu posledných piatich rokov boli v sledovanej lokalite zaznamenané viaceré zmeny v druhovom spektre patogénov zo skupiny listových škvrnitostí. Kým v minulosti prevládali pôvodcovia septoriózy plevovej, v sledovaných ročníkoch 2006 – 2008 sa podstatne zvýšila početnosť výskytu pôvodcu helmintosporiázovej škvrnitosti. Jedná sa o druh s vysokou patogenitou a úrodovou škodlivosťou. ŠÁROVÁ et al. (2003) ho považujú za jedného z najvýznamnejších pôvodcov listových škvrnitostí v Českej republike. Mimoriadne silný výskyt listových škvrnitostí bol zaznamenaný v ročníku 2008. Poškodenie listovej plochy dosahovalo v štádiu skorej mliečnej zrelosti v priemere 34,3 %, pričom najcitlivejšie odrody Ilona a Petrana mali v tomto období už takmer zničenú celú listovú plochu.

Naplnou využitím biologický potenciál a vyprodukovať vysokú úrodu môžu len rastliny, ktoré sú zdravé počas celej vegetačnej doby. Pre dosiahnutie čo najvyššej úrody a v maximálnej miere eliminovanie vplyvu hubových chorôb na jej výšku, sa odporúča aplikovať dve ošetrenia fungicídov (EGED, 2006). Efektívnosť takejto ochrany rastlín potvrdzujú aj výsledky dosiahnuté v našom pokuse. Rozdiel v úrode zrna medzi ošetreným a neošetreným variantom (tabuľka 2) udáva výšku strát spôsobenú chorobami, ktorá v priemere za všetky ročníky predstavovala 16,8 %. K výraznému zníženiu úrody v dôsledku škodlivosti hubových chorôb došlo hlavne pri odrodách Venistar, Mladka a Ilona, pri ktorých aplikácia fungicídneho ošetrenia viedla k viac ako 20 %-nému nárastu úrody. Najvyššiu úrodu vo vybranom súbore odrôd dosiahla Torysa a najnižšiu Petrana. Odroda

Torysa dosiahla jednu z najvyšších úrod vo všetkých troch pestovateľských sezónach a v oboch testovaných variantoch, čím potvrdila svoju úrodovú adaptabilitu a stabilitu.

Tabuľka 2: Priemerné úrody zrna jednotlivých odrôd pšenice letnej dosiahnuté v ošetrovom (O) a neošetrovom (N) variante v ročníkoch 2005/2006 – 2007/2008

Odroda	Úroda O	Úroda N	Rozdiel O-N		Priemerná úroda		% k priemeru
	t.ha ⁻¹	t.ha ⁻¹	t.ha ⁻¹	%	t.ha ⁻¹		%
Torysa	10,04	8,83	1,21	13,7	9,43	a*	110,4
Veldava	9,68	8,14	1,55	19,0	8,91	b	104,3
Mladka	9,71	8,06	1,65	20,5	8,88	b	103,9
Pavlina	9,53	8,17	1,37	16,7	8,85	b	103,6
Barroko	9,51	8,06	1,46	18,1	8,79	bc	102,8
Ilona	9,52	7,91	1,61	20,4	8,72	bcd	102,0
Ilias	9,29	8,03	1,26	15,6	8,66	bcd	101,3
Cubus	9,12	7,94	1,18	14,9	8,53	cde	99,8
Malyska	9,19	7,83	1,37	17,5	8,51	cde	99,6
Vanda	9,13	7,85	1,28	16,3	8,49	cde	99,4
Markola	8,95	8,02	0,93	11,6	8,48	de	99,3
Malvína	9,06	7,90	1,16	14,7	8,48	de	99,3
Akteur	8,88	7,84	1,04	13,2	8,36	e	97,8
Venistar	8,69	7,14	1,55	21,6	7,92	f	92,6
Sulamit	8,49	7,31	1,19	16,2	7,90	f	92,4
Petrana	8,51	7,13	1,38	19,3	7,82	f	91,6
Priemer	9,21	7,88	1,32	16,8	8,55		100,0

*Hodnoty označené rovnakými písmenami nie sú preukazne rozdielne na hranici pravdepodobnosti $P < 0,05$, Tukeyov test.

Záver

Na produkčnej schopnosti pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum* L.) sa významne podieľali klimatické podmienky, ošetrovanie aj odroda. V sledovanom súbore odrôd bola zistená vysoká variabilita v citlivosti k patogénom napadajúcim rastliny pšenice.

Účinnosť fungicídneho ošetrovania sa prejavila na znížení intenzity napadnutia jednotlivými patogénmi. Hrdza pšenicová a hrdza plevová sa v ošetrovaných variantoch nevyskytovali a ostatné patogény mali nižšiu intenzitu napadnutia ako v neošetrovaných variantoch. Analýza výsledkov potvrdila pozitívny vplyv fungicídneho ošetrovania na udržanie priaznivého zdravotného stavu a s tým súvisiaceho zvýšenia úrody zrna.

Najvýznamnejšími patogénmi ovplyvňujúcimi produkčnú schopnosť pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum* L.) v sledovanom období boli pôvodcovia listových škvrnistostí, v roku 2007 pri odrode Malvína aj hrdza plevová.

Literatúra

- BURDON, J. J. - THRALL, P.H. - ERICSON, L. (2006): The current and future dynamics of disease in plant communities. In *Annual Review of Phytopathology*, 44, p. 19-39
- EGED, Ľ. (2006). Dve ošetrovanie pre zabezpečenie kvality obilnín. In *Agrotip*, č.4, s. 6-7
- GARRET, K. A. - DENDY, S. P. - FRANK, E. E. - ROUSE, M. N. - TRAVERS, S. E. (2006): Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. In *Annual Review of Phytopathology*, 44, p. 489-509
- HUDEČ, K. (2005): Je ekologické poľnohospodárstvo zdrojom infekcie pre okolité porasty? In *Naše pole*, roč. 9, č. 8, s. 22-23.
- LICHVÁROVÁ, M. - MUCHOVÁ, D. - ONDREJČÁK, F. (2007). Vplyv odrody a vegetačných podmienok na efektívnosť ošetrovania pšenice fungicídmi. In *Naše pole*, roč. 11, č. 5, s. 42-44.
- ŠÁROVÁ, J. - HANZALOVÁ, A. - BARTOŠ, P. (2003): Incidence of wheat leaf pathogens in the Czech Republic. In *Cereal Research Communication*, vol. 31, pp. 145-151.

Podakovanie

Práca bola podporená MP SR (projekt č. 2006 UO27/0910501/0910511) a Agentúrou pre vedu a techniku SR (projekt č. SK-MAD-03206).

IZOLACE PROTOPLASTŮ Z MIKROSPOR U RODŮ *BRASSICA* A *CUCUMIS* ISOLATION OF MICROSPORE PROTOPLASTS OF *BRASSICA* AND *CUCUMIS* GENERA

Božena NAVRÁTILOVÁ – Dagmar SKÁLOVÁ – Magdaléna MARKOVÁ

The aim of this work was to optimize a method for isolation of protoplasts from Brassica and Cucumis microspores and to improve the working protocol. Intact buds from plants growing in growth chamber (Brassica spp.) and in glasshouse (Cucumis spp.) were used for isolation of microspore protoplasts. Collected buds obtained late uninucleate- and early binucleate-stage microspores. The best enzymatic mixture for Brassica microspores was 1% Cellulase Onozuka R-10; 0.5% Pectinase; 0.3% Macerozyme; 0.3% Pectolyase; 10% glucose and 13% mannitol in CPW medium. Brassica microspore protoplasts with microspores were cultivated in modified liquid KM medium in the dark at 27 °C. For Cucumis microspores was the most suitable enzymatic mixture 1% Cellulase Onozuka R-10; 0.8% Pectinase; 0.3% Macerozyme; 9% mannitol and 7.2% sorbitol in CPW medium. Cucumis microspore protoplasts with microspores were cultivated in modified LCM1 medium in the dark at 26 °C.

Key words: Brassica sp., Cucumis sp., microspores, protoplasts, enzymatic mixture

Úvod

Zástupci rodů *Brassica* a *Cucumis* patří mezi významné zemědělské plodiny, tyto druhy však postrádají odolnost vůči významným hospodářským chorobám a škůdcům. U některých planých druhů se vyskytují rezistence k těmto patogenům i odolnost vůči abiotickým stresům a je žádoucí přenést tyto vlastnosti do kulturních plodin. Protoplastové kultury a následné fúze protoplastů jsou jednou z biotechnologických metod využívaných pro překonávání bariér klasického křížení, např. pomocí fúze haploidních (mikrosporových) a diploidních protoplastů je možno získat nové hybridní jedince s nižší ploidií než fúzí diploidních protoplastů (LIU a kol., 2007). Mikrosporové protoplasty lze využít i v rámci transformací rostlin (SUN a kol., 1999).

V první řadě je důležité optimalizovat metody izolace protoplastů z mikrospor a podmínky jejich kultivace a následně protoplasty fúzovat. U rodu *Brassica* bylo testováno již několik metod pro izolaci a kultivaci mikrosporových protoplastů (SUN a kol., 1999; LIU a kol., 2007). Rozdíly jsou ve stádiu mikrospor, ve složení enzymatických roztoků a v kultivačních médiích. U rodu *Cucumis* nebyla izolace protoplastů z mikrospor zatím popsána. Cílem této práce byla optimalizace složení enzymatického roztoku a metody izolace protoplastů z mikrospor (hustota protoplastů min. 1×10^5 v 1 ml protoplastové suspenze).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Pro izolaci protoplastů z mikrospor byly použity tři RC genotypy rodu *Brassica* (RC *Brassica oleracea* 8/1; RC *Brassica oleracea* CRGC 5/1; RC *Brassica rapa* subsp. *chinensis*) a dva genotypy rodu *Cucumis* (*Cucumis sativus* Stela F1; *Cucumis melo* linie MR-1). Poupata (15 - 20) všech genotypů byla odebírána ve velikosti odpovídající stádiu pozdně jednojaderných až časně dvojjaderných mikrospor. Poté byla povrchově sterilizována (2 min v 70% EtOH; promytí sterilní destilovanou vodou – 3 x 5 min).

Izolace mikrospor

Postup izolace mikrospor byl převzat a modifikován podle DUIJS a kol. (1992). Poupata (u rodu *Brassica*) či izolované prašníky (u rodu *Cucumis*) byly vloženy do zkumavky s 0,5 ml vychlazeného NLN 13 média (LICHTER, 1981). Poupata (prašníky) byla opatrně rozdrcena skleněnou tyčinkou a po přidavku cca 4 ml NLN 13 média filtrována (*Brassica* přes dvojitý nylonový filtr – 72 μ m, 42 μ m; *Cucumis* přes jednoduchý nylonový filtr – 72 μ m). Podíl na filtru byl proplachován NLN 13 médiem tak, aby konečný objem suspenze byl 10 ml. Izolovaná pylová zrna byla centrifugována 3x při 800 rpm (*Brassica*) a při 900 rpm (*Cucumis*) po dobu 10 – 5 – 5 min (po každé centrifugaci byl odstraněn supernatant a bylo doplněno čerstvé NLN 13 médium).

Izolace protoplastů

Z řady předběžných experimentů byly vybrány dva enzymatické roztoky. Pro oba rody bylo použito jako základ CPW médium (BANKS a EVANS, 1976). Pro rod *Brassica* byla použita směs enzymů: 1% celulasa; 0,5% pektinasa; 0,3% pectolyasa; 0,3% macerozym; 10% glukosa; 13% manitol. Pro rod *Cucumis* byla použita enzymatická směs dle LIU a kol. (2007): 1% celulasa; 0,8% pektinasa; 0,3% macerozym; 9% manitol; 7,2% sorbitol. K sedimentu mikrospor (po poslední centrifugaci v NLN 13 médiu) bylo přidáno 1,5 ml enzymatického roztoku. Směsi byly vloženy do termostatu (*Brassica*: 27 °C, třepačka, 55 – 65 min; *Cucumis*: 30 °C, třepačka, 50 – 70 min). Poté byly protoplasty centrifugovány a purifikovány v médiu KM (KAO a MICHAYLUK, 1975; 600 rpm, 2 x 5 min., *Brassica*) a LCM1 (DEBAUJON a BRANCHARD, 1992; NAVRÁTILOVÁ a kol., 2008; 500 rpm, 2 x 2 min., *Cucumis*) a následně v těchto médiích kultivovány (tma,

termostat, 26 °C). Hustota protoplastů byla počítána v Bürkerově komůrce v 1 ml roztoku a životnost pylových zrn byla stanovována pomocí barviva FDA a fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX60, WB filtr).

Výsledky a diskuse

Optimální pro izolaci protoplastů byla jednojaderná a časně dvojjaderná stádia mikrospor. Základem pro enzymatické roztoky bylo CPW médium, které je při izolacích protoplastů často používáno. Nejvyšší hustota a životnost protoplastů byla získána v enzymatických směsích viz. Materiál a metody.

U RC *Brassica* spp. byly vhodné genotypy *B. oleracea* 8/1 a *B. rapa*, kdy životnost izolovaných mikrospor byla v průměru 50 - 60 % a protoplasty se uvolnily z 15 - 20 % mikrospor (Obr. 1a). Podobné výsledky u *B. napus* cv. Topas získali také SUN a kol. (1999), kdy byly protoplasty uvolněné z 26,3 % mikrospor. Hustota mikrospor po izolaci v našich experimentech byla v průměru $2,2 \times 10^6$ na 1 ml média a hustota uvolněných protoplastů 3,4 - $4,5 \times 10^5$ na 1 ml média. Během kultivace bylo pozorováno zvětšování protoplastů a 1. buněčné dělení. U *B. oleracea* CRGC 5/1 se protoplasty uvolňovaly z 5 - 10 % mikrospor a během kultivace protoplasty praskaly.

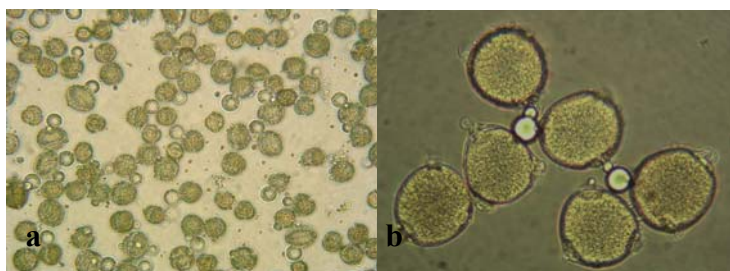
Ze dvou testovaných genotypů rodu *Cucumis* byl úspěšnější genotyp *C. melo*. Životnost mikrospor byla v průměru 75 %; protoplasty se uvolňovaly průměrně ze 14 % izolovaných mikrospor. Průměrná hustota mikrospor v 1 ml média byla $7,3 \times 10^5$; hustota protoplastů byla $1,5 \times 10^5$ (průměrná hustota protoplastů na jedno poupě $8,3 \times 10^3$, Obr. 1b). U *C. sativus* byla pozorována vyšší životnost izolovaných mikrospor (80 - 90 %). Protoplasty se uvolňovaly pouze z 10 % mikrospor. Průměrná hustota mikrospor v 1 ml média byla 4×10^5 ; hustota protoplastů byla $5,8 \times 10^4$ (průměrná hustota protoplastů na jedno poupě $3,1 \times 10^3$). LIU a kol. (2007) uvádí hustotu protoplastů v rozmezí 0,3 - $3,9 \times 10^4$ na jedno poupě. Následná kultivace mikrosporových protoplastů u rodu *Cucumis* byla zatím neúspěšná.

Závěr

Pro izolaci protoplastů z mikrospor byly testovány 3 RC genotypy rodu *Brassica* a 2 genotypy rodu *Cucumis*. Metody izolace mikrospor a protoplastů byly vyhovující. Po izolaci bylo dosaženo požadované hustoty mikrosporových protoplastů. Během purifikace se nepodařilo zcela oddělit protoplasty od mikrospor a proto byly kultivovány společně.

Literatura

- BANKS M.S. – EVANS P.K. 1976. Plant Science Letters 7: 409 - 416
 DEBEAUJON I. - BRANCHARD M. 1992. Plant Cell Reports 12: 37 - 40
 DUIJS J.G. – VOORRIPS R.E. – VISSER D.L. – CUSTERS J.B.M. 1992. Euphytica 60: 45 - 55
 KAO K.N. - MICHAYLUK M.R. 1975. PLANTA 126: 105 - 110
 LICHTER R. 1981. Z. Pflanzenphysiol. 103: 229 - 237
 LIU F. – RYSCHKA U. – MARTHE F. – KLOCKE E. – SCHUMANN G. – ZHAO H. 2007. Protoplasma 231: 89- 7
 NAVRÁTILOVÁ B. - LUHOVÁ L. - PETŘIVALSKÝ M. 2008. Plant Cell Tiss Organ Cult 94: 313 - 318
 SUN M. - KIEF H. - VAN LAMMEREN A.A.M. 1999. Protoplasma 208: 265 - 274



Obrázek: 1 Izolované mikrospory s uvolněnými protoplasty (a) *Brassica rapa*; b) *Cucumis melo*)

Poděkování:

Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR, MSM 6198959215. Semenný materiál byl poskytnut Genovou bankou VÚRV Praha – Ruzyně, pracoviště Olomouc.

VARIABILITA VÝNOSU CHMELE (*Humulus lupulus* L.) U VYSOKOBSAŽNÝCH GENOTYPŮ

VARIABILITY IN YIELDS OF HOPS (*Humulus lupulus* L.) IN BITTER HOP VARIETIES

Vladimír NESVADBA – Josef JEŽEK – Zdenka POLONČÍKOVÁ – Alena HENYCHOVÁ

The average yield within Saaz aroma hops amounts to 1.97 kg of fresh hops/plant, whereas the average yield in Czech hybrid varieties (Sládek, Harmonie, Premiant, Agnus, etc.) is 3.19 kg/plant. The probability concerning hop yields shows the value of 99% in hybrid varieties favor. The variability in the both assessed collections is nearly the same (Saaz aroma hops 33.4% and hybrid varieties 35.7%, resp.). Czech bitter varieties have the average yield in the range since 1.94 to 3.62 kg of fresh hops/plant. The highest yield was found out in genotype no. 4784. This genotype together with Agnus and Rubín hybrid varieties reaches on average higher yield than the other bitter genotypes. The highest variability was found out in genotype no. 4788 (41.06%). On the contrary, Agnus shows the lowest variability (10.1%).

Key words: hop, Humulus lupulus L., hop varieties, yield, variability

Úvod

Ve šlechtění chmele v České republice byly využívány dvě hlavní metody. Klonová selekce byla využívána od 20. let minulého století, ale dnes se téměř nevyužívá. Touto metodou bylo získáno 9 klonů Žateckého poloraného červeňáku. Jako druhá metoda, která se stále používá je křížení vhodných rodičovských komponentů. Tímto způsobem byla získána nová skupina odrůd, které se označují jako hybridní odrůdy chmele. České chmelové odrůdy se dle pivovarského využití rozdělují na jemně aromatické (klony Žateckého poloraného červeňáku), aromatické (Sládek a Harmonie), hořké (Bor a Premiant) a vysokoobsažné (Agnus a Rubín). Toto rozdělení je stanoveno na základě obsahu a složení chmelových pryskyřic. Hlavním výkonnostním znakem je výnos chmele. Výnos chmele je dán počtem hlávek na rostlině a jejich hmotností. Tyto dva výnosotvorné prvky jsou ovlivněny řadou faktorů, např. výškou nasazení plodonosných pazochů, vzdáleností internodií, hustotou nasazení hlávek na pazochu, velikostí hlávek a její stavbou atd. Vzhledem k současné pěstitelské technologii je počet rostlin na ploše téměř konstantní, proto je pro hodnocení výnosu chmele rozhodující hmotnost hlávek na jedné rostlině. Nelze opomenout, že důležitou prioritou ve šlechtění chmele je odolnost k biotickým i abiotickým činitelům. Z biotických činitelů se jedná především o odolnost k významným houbovým chorobám (peronospora chmelová a padlí chmelové), ke škůdcům (mšice chmelová a sviluška chmelová). Z abiotických činitelů se jedná o odolnost k suchu a k vysokým teplotám. Tyto abiotické faktory mají velký vliv na vysokou variabilitu ve výkonnosti (výnos a obsah chmelových pryskyřic) chmelových odrůd.

Metodika

Pro hodnocení byl vybrán soubor českých odrůd původu Žateckého poloraného červeňáku a hybridních odrůd. U každé odrůdy bylo hodnoceno 10 matečných rostlin od roku 2003. Pro hodnocení variability vysokoobsažných českých chmelů bylo vybráno 10 perspektivních genotypů s vyšším obsahem alfa kyselin. V rámci tohoto souboru jsou zařazeny i dvě české registrované odrůdy vysokoobsažného typu - Agnus a Rubín. Tento vybraný soubor genotypů je zařazen v kontrolní školce a každý je pěstován po osmi rostlinách. Vybraný soubor genotypů byl hodnocen na stejném stanovišti (eliminace vlivu půdních podmínek), tím byly zaručeny i stejné agrotechnické zásahy v pokusném porostu. Každá rostlina byla sklizena na pokusném česacím stroji Wolf. Chmelové hlávky byly váženy v čerstvém stavu. Pro hodnocení byly vybrány základní statistické parametry: průměr, pro variabilitu směrodatná odchylka a stonásobek variačního koeficientu. Pro stanovení průkaznosti rozdílu mezi jednotlivými genotypy byl použit t-test.

Výsledky a diskuse

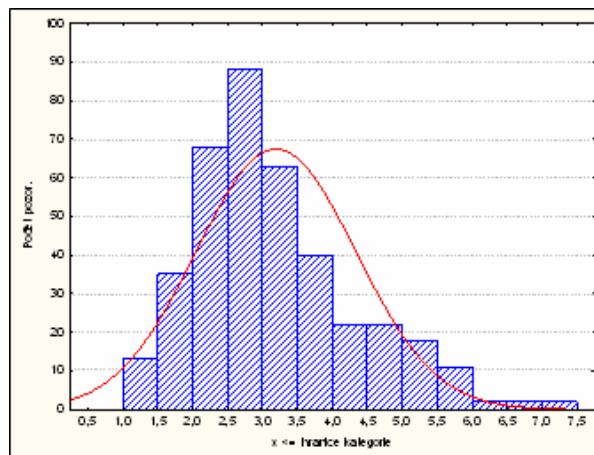
Průměrný výnos u klonů Žateckého poloraného červeňáku je 1,97 kg čerstvého chmele.rostlinu⁻¹. Stonásobek variačního koeficientu vykazuje variabilitu 33,4 %. Průměrný výnos českých hybridních odrůd je 3,19 kg čerstvého chmele.rostlinu⁻¹. Stonásobek variačního koeficientu vykazuje variabilitu 35,7 %. S 99 % pravděpodobností vykazují hybridní odrůdy průkazně vyšší výnos chmele než klony Žateckého poloraného červeňáku. Četnost rozdělení ve výnosu chmele je uvedena v Grafech 1 a 2. Variabilita výnosu chmele u obou skupin chmelů je téměř na stejné úrovni.

Z tabulky 1 je patrné, že nejvyšší výnos chmele vykazuje genotyp 4784 a to 3,62 kg čerstvého chmele.rostlinu⁻¹. Nad hranici 3 kg/rostlinu mají výnos chmele i kontrolní odrůdy Agnus a Rubín. Naopak nejnižší výnos a to pod hranici 2 kg čerstvého chmele.rostlinu⁻¹ mají odrůdy číslo 4709, 4643 a 4814. Pomocí t-testu byla stanovena průkaznost rozdílu ve výnosu chmele mezi hodnocenými odrůdami. Z výsledků je patrné, že

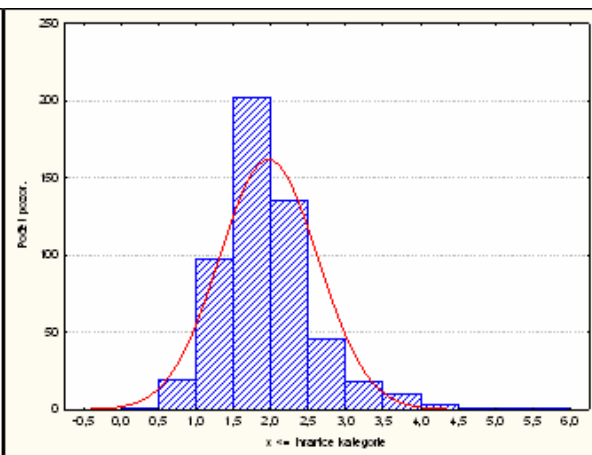
4784 má průkazně vyšší výnos chmele než všechny sledované genotypy mimo srovnávacích odrůd Agnus a Rubín. Průkazně nejnižší výnos mají genotypy 4709 a 4643

Nejvyšší variabilitu vyjádřenou stonásobkem variačního koeficientu ve výnosu chmele má genotyp 4788 a to 41,06%. Je patrné, že výnos chmele u tohoto genotypu je výrazně ovlivněn prostředím. Pro praxi není vhodný, protože lze předpokládat vysokou variabilitu výnosu chmele jak mezi lokalitami pěstování, tak mezi jednotlivými ročníky. Vysokou variabilitu (nad 30 %) vykazují dále odrůdy číslo 4643 a 4784. Naopak nejnižší variabilitu vykazuje odrůda Agnus a to pouze 10,10%. Výsledky potvrzují, že odrůda Agnus vykazuje dobrou stabilitu výnosu. Obdobnou stabilitu výnosu má též odrůda číslo 4814, ale bohužel vykazuje nízkou výnosovou úroveň. Odrůdy číslo 4815, 4717, 4709 mají variabilitu téměř na stejné úrovni jako odrůda Rubín.

Graf 1: Četnost výnosu - klony ŽPČ



Graf 1: Četnost výnosu - hybridní chmele



Tab. 1: Výnos chmele u sledovaných genotypů (kg/rostlinu)

	Agnus	Rubín	4643	4709	4715	4717	4784	4788	4814	4815
Průměr	3,01	3,17	1,69	1,34	2,25	2,05	3,62	2,38	1,94	2,66
s	0,30	0,82	0,52	0,37	0,83	0,50	1,11	0,98	0,26	0,62
Vk %	10,10	25,72	30,68	27,49	36,98	24,51	30,66	41,06	13,33	23,31
Pořadí	3	2	9	10	6	7	1	5	8	4

Závěr

Výnosová úroveň současných českých odrůd je průkazně vyšší než klony původu Žateckého poloraného červeňáku. Z dosažených výsledků lze stanovit, že pouze genotyp 4784 má vyšší výnos než současné registrované odrůdy vysokoobsažného typu. Tento rozdíl výnosu chmele není statisticky významný. Ostatní genotypy vysokoobsažného typu vykazují průkazně nižší výnos než současné registrované odrůdy této skupiny chmelů. Nejvyšší stabilitu má odrůda Agnus a genotyp 4814. Tento znak stability výkonnosti je preferován pěstitelkou praxí.

Poděkování

Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného projektu 3.d Tvorba genotypů chmele s rezistencí k biotickým a abiotickým faktorům s požadovanou kvalitou znaků, který podporuje MZe ČR a výzkumného záměru MSM 1486434701, který podporuje MŠMT ČR

VARIABILITA PLANÝCH CHMELŮ (*Humulus lupulus L.*) VARIABILITY WITHIN WILD HOPS (*Humulus lupulus L.*)

Vladimír NESVADBA – Josef PATZAK – Karel KROFTA – Alena HENYCHOVÁ

*Within the collection of wild hops belonging to Hop Research Institute, Co., Ltd. in Žatec together 155 plants were studied. The objective of this activity was to evaluate chemical and genetic variability in these hops. The highest alpha acid content was determined in a wild hop originating from the USA (6.1%). On the contrary, the lowest one was found out in a wild hop having origin in Switzerland (0.37%). This Swiss genotype shows the highest content of beta acids (9.08%). The lowest content of beta acids was determined in a Caucasus plant no. H33 (0.81%). Totally 33% of wild hops from Caucasus and Czech Republic have the ratio of cohumulone under the level of 20% rel. On the contrary, only the hops having origin in the USA and Canada have the ratio of cohumulone higher than 45% rel. Xanthohumol content amounts to since 0.05% to 0.44% (USA). DMX content moves since 0.01% till 0.14% (wild hops from the USA and Czech Republic). With the help of DNA analyses (SRS and SSR) we determined genetic distance of Czech, European, Caucasus and North American wild hops. It is obvious that Czech hops belong to the group of European germ plasma, distinctively separated from American hop genotypes and *Humulus japonicus*. The work was supported by Czech Ministry of Education within the Research project no. 1486434701: "Research and Regulation of Stress Factors in Hops."*

*Key words: hop, *Humulus lupulus L.*, wild hops, variability, hop resins, DNA analyses.*

Úvod

Plané chmele jsou charakteristické vysokou genetickou variabilitou a tím se stávají nedílnou součástí genetických zdrojů chmele. Ve šlechtitelském procesu jsou využívány jako zdroje odolnosti k houbovým chorobám, k suchu a v poslední době se hledají nové genetické zdroje pro pivovarské i farmaceutické účely. Plané chmele prošly přírodní selekcí, ale tato selekce je ovlivněna podmínkami daného stanoviště a lokality. Pro stanovení znaků geneticky založených je nutné vybrané plané chmele vysadit do stejných podmínek a testovat je jak polních, tak i následně v laboratorních podmínkách.

Metodika

V rámci kolekce planých chmelů ve Chmelařském institutu Žatec bylo hodnoceno 155 planých chmelů z Evropy, Kavkazu a Severní Ameriky. Kolekce planých chmelů je součástí genetických zdrojů chmele (MZe 33083/03-300 6.2.1. – MZe ČR). Z každého genotypu planého chmele byl odebrán průměrný vzorek chmelových hlávek. Chemické analýzy složení a obsahu chmelových pryskyřic, xanthohumolu a desmethylxanthohumolu (DMX) byly provedeny HPLC metodou /EBC 7.7/, (ANALYTICA, 1997). DNA analýzy byly provedeny STS (JAKŠE et al., 2002) a SSR metodou (PATZAK et al., 2007). Pro hodnocení genetické diversity byla použita klastrová analýza NTSYS-pc v. 2.11V for WINDOWS (Exeter Software, USA).

Výsledky a diskuze

V tabulce 1 jsou uvedeny minimální a maximální obsahy a statistické parametry chemických analýz u chmelových hlávek planých chmelů. Z hodnocení variability je patrné, že podíl kolupulonu vykazuje nejnižší variabilitu (36,10 %) a naopak nejvyšší variabilitu má poměr xanthohumol/alfa kyseliny (58,55 %).

Nejnižší obsah alfa kyselin vykazuje planý chmel ze Švýcarska (8) 0,37 % a naopak nejvyšší obsah má planý chmel z USA 6,1 %. Průměrný obsah u planých chmelů je 2,51 %. Podle autorů NESVADBA et al. (2008) vykazují české plané chmele průměrný obsah alfa kyselin 2,93 %. Nejnižší obsah beta kyselin má planý chmel z Kavkazu (0,81 %) a nejvyšší obsah vykazuje planý chmel ze Švýcarska (genotyp s nejnižším obsahem alfa kyselin) a to 9,08 %. Nejnižší podíl kohumulonu má planý chmel z Kavkazu (13 % rel.). Podíl kohumulonu pod 20 % rel. má 27 planých chmelů z Kavkazu a 6 planých chmelů z České republiky. Nejvyšší podíl kohumulonu má planý chmel z Kanady a to 69 % rel. Skupina severoamerických chmelů se evidentně odděluje od skupiny planých chmelů z Evropy a Kavkazu. Podíl kohumulonu u severoamerických planých chmelů je od 45,6 % rel. do 69,0 % rel. Naopak druhá skupina vykazuje rozpětí kohumulonu od 13,0 % rel. do 38,0 % rel. Vysoký podíl kohumulonu z této skupiny vykazují planý chmel Švýcarsko 8 (38,0 %), Kavkaz 37,9 %, ČR Rabštejn (36,7 %) a Belgie 12 (35,8 %). Velmi zajímavý je planý chmel Kanada 81, který vykazuje podíl kohumulonu 23 % rel.. tím se výrazně odlišuje od skupiny svého původu. Severoamerické chmele výrazně ovlivnily průměrný podíl kohumulonu, který je 31,72 % rel. Opět uváděný průměrný podíl kohumulonu u českých planých chmelů je podle NESVADBY et al. (2008) 24,83 % rel. Nejnižší podíl kolupulonu má planý chmel ze severních Čech a to 34,1 % rel. Nízký podíl kolupulonu pod hranicí 40 % rel. vykazují plané chmele z České republiky, Švýcarska, Francie, Kavkazu a pouze jeden z Kanady (genotyp s nízkým podílem kohumulonu). Nejnižší obsah xanthohumolu vykazuje planý chmel Kavkaz H33 a to 0,05 %. Nejnižší obsah xanthohumolu vykazuje planý chmel Kavkaz H33 a to 0,05 %. Nízký obsah xanthohumolu vykazují další plané chmele z Kavkazu, České republiky, Belgie, Francie i Švýcarska. Naopak nejvyšší obsah xanthohumolu vykazuje planý chmel z USA a to 0,44 %. I další plané chmele, především z USA, Kanady, České republiky i Kavkazu, mají obsah xanthohumolu

na úrovni řady komerčních odrůd. Nejnižší obsah DMX vykazují některé plané chmele z Kavkazu a Kanady. Obsah DMX na úrovni Žateckého poloraného červeňáku vykazuje řada planých chmelů z USA, Kanady, České republiky a Francie. Nejvyšší obsah 0,14 % DMX vykazují plané chmele z USA a České republiky.

Tabulka 1: Variabilita obsahu chmelových pryskyřic, xanthohumolu a DMX u planých chmelů

Parametr	Alfa kys. (% hm.)	Beta kys. (% hm.)	Poměr (alfa/beta)	Kohumulon (% rel.)	Kolupulon (% rel.)	Xanthohumol (% hm.)	DMX (% hm.)
Min. obsah	0,37	0,81	0,04	13,0	34,1	0,05	0,01
Max. obsah	6,1	9,08	1,92	69,0	84,4	0,44	0,14
Průměr	2,51	3,49	0,76	31,72	51,97	0,19	0,05
Median	2,57	3,32	0,73	25,35	46,30	0,18	0,04
Směr. odch.	1,094	1,111	0,328	15,832	14,559	0,069	0,024
Var. koef. (%)	43,60	31,79	43,21	49,91	28,02	36,10	49,71

Dále se testovala genetická variabilita (charakterizace) planých chmelů pomocí PCR metod. Pro DNA analýzy byly použity původní vzorky vybraných planých chmelů z oblasti výskytu. Dosažené výsledky poukazují jak na genetickou variabilitu testovaných vzorků, tak i na to, že plané chmele ze severního Kavkazu se svým genetickým původem řadí mezi plané chmele z Evropy a Severní Ameriky.

Závěr

Dosažené výsledky chemických analýz poukazují na vysokou variabilitu chemického složení chmelových hlávek z planých chmelů z Evropy, Kavkazu a Severní Ameriky. Výsledky DNA analýz poukazují na teorii původu chmele z východní Asie. Z této části se pravděpodobně rozšířil přes Kavkaz do Evropy (chmele s evropskými znaky – nízký podíl kohumulonu) a pravděpodobně přes Aljašku do Severní Ameriky (americké znaky – vysoký podíl kohumulonu). Je nutné konstatovat, že se jedná se o dílčí výsledky, které budou předmětem dalšího výzkumu.

Literatura

- ANALYTICA EBC 1997, Metod 7.7 European Brewery Convention, Getränke Fachverlang.
- JAKŠE, J., BANDELJ, D., JAVORNIK, B. 2002. Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). Mol. Ecol. Notes 2: 544-546.
- NESVADBA V., KROFTA K., PATZAK J. 2008: Evaluation of wild hops (*Humulus lupulus* L.) variability in Czech Republic. International Scientific meeting Use Genetic Resource of Cultivated Plant. Žatec: 86-88.
- PATZAK, J., VRBA, L., MATOUŠEK, J. 2007. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). Genome 50: 15-25.

Poděkování

Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného záměru MSM 1486434701 a projektu ME 832, které podporuje MŠMT ČR. Některé 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).

BIOCHEMICKÉ ASPEKTY ÚČINKOV OLOVA A KADMIA NA KORENE SÓJE FAZUĽOVEJ

BIOCHEMICAL ASPECTS OF LEAD AND CADMIUM EFFECTS ON ROOTS OF SOYBEAN

Beáta PIRŠELOVÁ – Roman KUNA – Anna GOGOLÁKOVÁ – Ildikó MATUŠÍKOVÁ

*Activity of β -1,3-glucanase in roots of *Glycine max* cv. Korada, treated with lead ($500 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$) and cadmium ($300 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) was studied in context of heavy metal impact on plant tissue such as cell viability, lipid peroxidation and lignification. Two days after application of heavy metals on roots, strong damage of plasma membrane was observed in all tested plants as a typical symptom of heavy metal toxicity. Further, enhanced lipid peroxidation and lignification in roots indicated formation of a barrier against metal entrance. Changes in activity of glucanases determined through fluorimetric method detected might also reflect to some additional function in the mechanism of metal tolerance in plant.*

Key words: soybean, heavy metals, β -1,3-glucanase, lignification, lipid peroxidation

Úvod

Ťažkými kovmi stresované rastliny v prírode rastú a vyvíjajú sa v podmienkach prítomnosti toxických iónov, ktoré v nich vyvolávajú rôzne poškodenia. Toxické symptómy sa prejavujú počas rôznych vývinových štádií, vykazujúc rôzne úrovne adaptácie k stresovým podmienkam. Významnú úlohu v tolerancii rastlín na ťažké kovy zohrávajú bunková stena a cytoplazmatická membrána buniek koreňov, ktoré sa dostávajú väčšinou ako prvé do kontaktu s iónmi kovov. Sója ľahko prijíma ťažké kovy z ovzdušia a pôdy, preto pre potravinárske a kŕmne využitie nie je vhodné ju pestovať v pôdach kontaminovaných ťažkými kovmi. Mnohé biochemické aspekty vplyvu ťažkých kovov na rastliny sú objasnené. Je známe, že vplyvom ťažkých kovov dochádza ku zmenám v bunkovej stene (lignifikácia, ukladanie kalózy) prostredníctvom rôznych hydrolytických enzýmov (ŠIROKÁ et al., 2004). Tieto zmeny vedú väčšinou k spevneniu bunkovej steny a vytvoreniu bariéry pre vstup ťažkých kovov do buniek.

Glukanázy sú hydrolytické enzýmy, ktoré katalyzujú štiepenie väzieb 1,3- β -glukánu, významnej zložky bunkovej steny rastlín a húb. V rastlinách sa β -1,3-glukanázy indukujú v procese obrany rastliny proti patogénom (LEUBNER-METZGER, 2003). Posledné štúdie ukazujú, že zohrávajú úlohu aj pri mnohých fyziologických a vývinových procesoch neinfikovaných rastlín (LEUBNER-METZGER, 2003). Navyše sa β -1,3-glukanázy zúčastňujú obranných procesov rastlín vyvolaných rôznymi abiotickými stresormi. Ich syntézu indukovala aj prítomnosť hliníka a lítia a pravdepodobne sa zúčastňujú modifikácie komponentov bunkovej steny za daných podmienok (CRUZ-ORTEGA et al., 1993).

Zmeny v aktivite glukanáz vplyvom ťažkých kovov boli sledované najmä v rôznych mikroorganizmoch, oveľa menej v pletivách vyšších rastlín. Ich úloha v odpovedi rastlín na ťažké kovy však doteraz nie je jednoznačne preukázaná. Cieľom našich analýz je doplniť poznatky o toxických účinkoch ťažkých kovov na korene sóje fazuľovej a poukázať na možnú úlohu β -1,3-glukanáz v obranných procesoch sóje voči iónom ťažkých kovov.

Materiál a metódy

Sterilizované semená sóje fazuľovej (*Glycine max* cv. Korada) boli nakličované na Petriho miskách na dvojitej vrstve filtračného papiera navlhčeného destilovanou vodou v tme pri 25 °C. Korene klíčiacych rastlín s približne rovnakou dĺžkou (3-5 mm) boli prenesené do nových Petriho misiek a vystavené účinkom olova ($500 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$) a kadmia ($300 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$). Kontrolnú vzorku tvorili korene nakličované v destilovanej vode. Po 48 hodinách inkubácie bol z koreňov rastlín izolovaný bielkovinový extrakt, v ktorom sme merali aktivitu β -glukanázy fluorimetricky využitím substrátu laminarínu. Toxický účinok kovov na korene sóje sme detekovali spektrofotometrickým meraním viability buniek pomocou Evansovej modrej a histochemických farbením koreňov na určenie miery lipidovej peroxidácie a lignifikácie. Všetky experimenty boli uskutočnené minimálne v troch nezávislých opakovaniach. Získané číselné údaje boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom.

Výsledky a diskusia

Toxický účinok iónov olova a kadmia na korene sóje fazuľovej potvrdilo testovanie viability buniek koreňov. Po 48 hod inkubácie koreňov v roztokoch kovov došlo k výraznému narušeniu cytoplazmatickej membrány buniek, pričom ióny kadmia vo zvolenej dávke prejavili vyššiu toxicitu. Po histochemickom farbení sa na koreňoch prejavili ďalšie symptómy toxicity kovov – zvýšená lignifikácia a lipidová peroxidácia. Syntéza lignínu v bunkových stenách je všeobecným obranným mechanizmom rastlín voči rôznym stresovým faktorom, ktorý vedie k zabráneniu ďalšieho poškodenia buniek. Väzba ťažkých kovov k lignínu pravdepodobne predstavuje ďalší mechanizmus zníženia toxického účinku kovu. Zvýšená peroxidácia lipidov bunkovej membrány indikuje vznikajúci oxidatívny stres, ktorého miera často koreluje s toxicitou kovu (SAVINOV et al.,

2007). V našom experimente histochemické farbenia koreňov naznačili zvýšenú mieru lipidovej peroxidácie najmä vplyvom kadmia.

Na prestavbe bunkovej steny vplyvom ťažkých kovov sa pravdepodobne zúčastňujú aj β -1,3-glukanázy. Ich aktivita sa vplyvom olova zvýšila oproti kontrole o 47% a vplyvom kadmia o 6%. Úloha tohto enzýmu v podmienkach stresu ťažkými kovmi nie je známa. Zvýšená aktivita tohto enzýmu vplyvom kovov je zdanlivo v rozpore so skutočnosťou, že sa tieto enzýmy zúčastňujú rozkladu β -glukánu (kalózy) v bunkovej stene, vplyvom kovov dochádza totiž ku zvýšeniu a nie ku zníženiu množstva kalózy (CRUZ-ORTEGA et al., 1995). Tento predpoklad bude možné overiť meraním množstva kalózy v bunkových stenách sóje v rovnakých experimentálnych podmienkach ako boli zvolené pre meranie aktivity glukanáz.

Záver

Korene klíčiacych rastlín sóje prejavili vysokú citlivosť voči zvoleným dávkam olova a kadmia. Popri narušení cytoplazmatickej membrány buniek došlo ku zvýšenej peroxidácii lipidov bunkovej membrány ako dôsledok oxidatívneho poškodenia. Zvýšená lignifikácia pletív koreňov je prejavom obranných mechanizmov, ktoré nastávajú v bunke vplyvom iónov ťažkých kovov. Výsledky merania aktivity β -1,3-glukanáz v bielkovinových extraktoch koreňov sóje poukazujú na to, že tieto enzýmy sú aktívnou zložkou obranných procesov rastlín voči ťažkým kovom. Ďalšie hĺbkové štúdie týchto molekúl by mohli prispieť k objasneniu možných mechanizmov podieľajúcich sa na zvyšovaní odolnosti rastlín voči toxickým kovom.

Literatúra

- CRUZ-ORTEGA, R.M. - CUSHMAN, J.C. - OWNBY, J.D.: Nucleotide sequence of cDNA for a 1,3-beta-glucanase associated with aluminum toxicity in wheat roots. In: *Plant Physiology*, 109, 1995, p. 722.
- LEUBNER-METZGER, G.: Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. In: *Seed Science Research*, 13, 2003, 17-34.
- ŠIROKÁ, B. - HUTTOVÁ, J. - TAMÁS, L. - ŠIMONOVICHOVÁ, M. - MISTRÍK, I.: Effect of cadmium on hydrolytic enzymes in maize root and coleoptile. In: *Biologia*, Bratislava, 59, 2004, 513-517.
- SAVINOV, A.B. – KURGANOVA, L.N. – SHEKUNOV, Y.I.: Lipid peroxidation rates in *Taraxacum officinale* Wigg. and *Vicia cracca* L. from biotopes with different levels of soil pollution with heavy metals. In: *Russian Journal of Ecology*, 38, 2007, 174-180.

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektu APVV LPP-0125-07.

VLIV POSKLIZŇOVÉHO DOZRÁVÁNÍ NA KVALITU KLÍČENÍ ODRŮD SLADOVNICKÉHO JEČMENE

EFFECT OF POST-HARVEST MATURATION ON GERMINATION QUALITY OF MALTING BARLEY VARIETIES

Vratislav PSOTA – Lenka SACHAMBULA – Ondřej POLÁK

The aim of the study was to follow the course of post-harvest maturation in nine malting barley varieties that have been currently most widespread in the Czech Republic. Five parameters characterizing germination (energy, rate, index, and homogeneity of germination) were monitored 3, 6, 9 and 12 weeks after achieving full ripeness. Considerable intervarietal differences in the length and intensity of post harvest maturation were determined. The variety Calgary was the variety with the longest post harvest maturation. All the studied parameters of germination, with the exception of germination energy, were affected by year from 60 %, location even from 30 % and variety maximally from 17 %. Germination energy was significantly affected by the location even from 83 %. The effect of year on the level of post harvest maturation declined with time and, conversely, the effect of variety and location increased.

Key words: barley, variety, post-harvest maturation, dormancy, germination

Úvod

Několikatýdenní období po sklizni, kdy obilky ječmene klíčí jen pomalu a nejednotně za podmínek jinak pro klíčení vhodných, je obvykle označováno jako posklizňové dozrávání. Pro kvalitu sladu je ale velmi důležité, aby obilky dané partie klíčily rychle a jednotně.

Zárodky jsou obvykle schopné plně vyklíčit již 15 až 20 dní po opylení, pokud jsou izolovány z neporušené obilky a ponořeny do vody (BENECH-ARNOLD et al., 1999). V tomto období neklíčí zrno, ale pouze zárodek. V této části dormance působí endosperm, oplodí, osemení a pluchy jako bariéra bránící předčasnému klíčení (Lenoir et al., 1986). Výstup z dormance začíná zřídka před tím, než porost dosáhne plné zralosti. Po dosažení tohoto období některé odrůdy vystupují z dormance náhle (během několika dnů), některé postupně (během týdnů), a některé zůstávají dormantními po několik měsíců (BENECH-ARNOLD, 2001). Přirozený a rychlý výstup z dormance je přitom z hlediska sladařské technologie mimořádně důležitý.

Rychlost a jednotnost klíčení obilek ječmene se po sklizni postupně zlepšuje. Toto období dormance je označováno termínem posklizňové dozrávání (PSOTA, ŠEBÁNEK, 1999). Mechanismus výstupu z dormance (posklizňového dozrávání) obilek ječmene je významným faktorem ovlivňujícím jeho biologickou a sladovnickou hodnotu. Hluboká a dlouhá dormance znamená pro sladovny finanční ztrátu, protože čerstvě sklizený ječmen klíčí pomalu a nejednotně.

Selekční tlak na dormanci vedl k vytvoření genotypů ječmene, u nichž je dormance ukončena před sklizní. Když je hladina dormance mezi plnou zralostí a sklizní příliš nízká, hrozí, že i krátkodobé (méně než 24 hodin) vystavení porostu dešti vyvolá růst zárodku (BENECH-ARNOLD, 2001). To může činit sladovnickému průmyslu problémy, protože je velmi složité přimět již jednou vyklíčenou obilku k opětovnému lúčení.

Ačkoliv je dormance podmíněna geneticky, je značně ovlivněna podmínkami, kterým je zrno před a po sklizni vystaveno (SVENSSON, LAGERSTRÖM 1966). Mnoho autorů se domnívá, že délka a intenzita dormance je ovlivněna především teplotou při dozrávání (například HILLHORST, 1995). Osamoceně stojí názor BURAASE a SKINNESE (1984), že dormance je recesivní znak s dominancí pro krátkou dormanci, který je řízen několika geny s vysokým koeficientem dědivosti. Podle nich neexistuje žádný těsný vztah mezi dormanci a průběhem počasí.

Materiál a metody

Metodika stanovení délky posklizňového dozrávání

Vzorky obilek devíti odrůd (Bojos, Calgary, Diplom, Jersey, Malz, Prestige, Radegast, Sebastian, Tolar) byly v letech 2005–2007 odebírány každý rok ze čtyř pokusných míst ÚKZÚZ. Posklizňové dozrávání bylo sledováno pomocí energie, rychlosti, indexu a homogenity klíčení (BASAŘOVÁ et al. 1992, PSOTA et al. 1998, EBC 1998, PSOTA, ŠEBÁNEK 1999) ve 4 termínech (3, 6, 9 a 12 týdnů po dosažení plné zralosti). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu.

Výsledky a diskuse

Kvalita klíčení v průběhu posklizňového dozrávání byla hodnocena několika znaky. Přičemž energie klíčení udává množství vyklíčených obilek za 72 h. Potenciál zkoumaného vzorku ječmene pro rychlé a jednotné klíčení byl charakterizován znaky rychlost klíčení a index klíčení. Dále byla sledována homogenita klíčení.

Tři týdny po dosažení plné zralosti byl mezi odrůdou s nejvyšší (Jersey) a nejnižší (Radegast) energií klíčení rozdíl necelých 8 %. V této době ovlivnil ročník energii klíčení z 29 % a lokalita z 34 %. Vliv odrůdy byl zanedbatelný. S postupem času se rozdíly mezi odrůdami zmenšovaly a 12 týdnů po dosažení plné zralosti už

nebyly mezi odrůdami rozdíly statisticky významné. Vliv ročníku a odrůdy byl v této době nulový, ale výrazný vliv měla lokalita (37 %).

Potenciál zkoumaných vzorků ječmene pro rychlé a jednotné klíčení byl charakterizován znaky rychlost klíčení a index klíčení. Tři týdny po dosažení plné zralosti byl rozdíl mezi odrůdou s nejvyšší (Jersey) a nejnižší (Calgary) hodnotou rychlosti klíčení 10 % a indexu klíčení (0,83). Rychlost a index klíčení byly v této době výrazně ovlivněny ročníkem (53 % resp. 49 %) a méně lokalitou (11 % resp. 7 %), vliv odrůdy byl zanedbatelný. Oproti energii klíčení byly u těchto dvou znaků ještě 12 týdnů zjištěny statisticky významné rozdíly mezi odrůdami. Nejrychleji klíčila odrůda Diplom (86 resp. 7,75). Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u odrůdy Calgary (75 % resp. 6,5). Vliv ročníku byl na konci sledování na úrovni 18 % resp. 28 %, vliv lokality na úrovni 33 % resp. 21 %. Odrůda ovlivnila tyto znaky z 13 resp. z 15 %.

Z hlediska sladařského je vedle rychlosti klíčení důležitá také jednotnost klíčení. Homogenita klíčení byla tři týdny po dosažení plné zralosti na úrovni 40–44 %. Nejnižší hodnota byla zaznamenána u odrůdy Bojos a nejvyšší u odrůdy Jersey. Homogenita klíčení byla v této době ovlivněna především ročníkem (24 %), význam vlivu lokality a odrůdy byl minimální. Dvanáct týdnů po dosažení plné zralosti se homogenita klíčení zlepšila a dosahovala hodnot 46 - 55 % a zvýraznily se rozdíly mezi odrůdami. Nejnižší hodnota byla zjištěna u odrůdy Calgary a nejvyšší u odrůdy Diplom, což koresponduje s výsledky dosaženými u rychlosti a indexu klíčení.

Ve sledovaném souboru devíti odrůd byly zjištěny výrazné meziodrůdové rozdíly, ale zároveň bylo zjištěno, že většina odrůd má velmi podobný průběh posklizňového dozrávání. Jestliže srovnáme toto sledování s obdobným sledováním z počátku 90. let, můžeme konstatovat, že v sortimentu sladovnických odrůd registrovaných v České republice došlo k výraznému zúžení meziodrůdových rozdílů ve sledovaných parametrech klíčení. Ze sortimentu zmizely odrůdy s dlouhým posklizňovým dozráváním typu odrůd Rubín nebo Krona (Psota, Procházka, 1998).

Závěr

Studie se zabývá sledování průběhu posklizňového dozrávání u devíti ((Bojos, Calgary, Diplom, Jersey, Malz, Prestige, Radegast, Sebastian, Tolar), v současné době v České republice, nejrozšířenějších odrůd sladovnického ječmene. Pro sledování bylo použito čtyři znaky charakterizující klíčení (energie, rychlost, index a homogenita klíčení). Sledování probíhalo 3, 6, 9 a 12 týdnů po dosažení plné zralosti. Byly zjištěny značné meziodrůdové rozdíly v délce a intenzitě posklizňového dozrávání. Odrůda Calgary se projevila jako odrůda s nejdelším posklizňovým dozráváním. Sledované znaky klíčení, kromě energie klíčení, byly ovlivněny ročníkem z 60 %, lokalitou až z 30 % a odrůdou maximálně ze 17 %. Energie klíčení byla výrazně ovlivněna lokalitou a to až z 83 %. Podíl ročníku na úrovni posklizňového dozrávání s časem klesal a naopak stoupal podíl odrůdy a lokality.

Literatura

- BASAŘOVÁ, G. (ed.): Pivovarsko-Sladařská analytika 1. Merkanta, Praha 1992, 385 stran.
- BENECH-ARNOLD, R.L.: 1998: In RODRÍGUEZ, V.M., MARGINEDA, M., GONZÁLEZ-MARTÍN, J.F., INSAUSTI, P., BENECH-ARNOLD, R.L.: Predicting preharvest sprouting susceptibility in barley: A model based on temperature during grain filling. *Agronomy journal*, 2001, Vol. 93.
- BENECH-ARNOLD, R.L., GIALLORENZI, M.C., FRANK, J. A RODRIGUEZ, M.V., 1999: In RODRÍGUEZ, V.M., MARGINEDA, M., GONZÁLEZ-MARTÍN, J.F., INSAUSTI, P., BENECH-ARNOLD, R.L.: Predicting preharvest sprouting susceptibility in barley: A model based on temperature during grain filling. *Agronomy journal*, 2001, Vol. 93.
- BURAAS, A., SKINNES, H.: Genetic investigations on seed dormancy in barley. *Hereditas*, 1984, Vol 101.
- EBC: Analytica EBC, Getränke-Fachverlag Hans Carl, Grundwerk 1998, 112 stran.
- HILHORST, H.W.M., 1995: In: RODRÍGUEZ, V.M., MARGINEDA, M., GONZÁLEZ-MARTÍN, J.F., INSAUSTI, P., BENECH-ARNOLD, R.L.: Predicting preharvest sprouting susceptibility in barley: A model based on temperature during grain filling. *Agronomy journal*, 2001, Vol. 93.
- LENOIR, C., CORBINEAU, F., CÔME, D., 1986: In RODRÍGUEZ, V.M., MARGINEDA, M., GONZÁLEZ-MARTÍN, J.F., INSAUSTI, P., BENECH-ARNOLD, R.L.: Predicting preharvest sprouting susceptibility in barley: A model based on temperature during grain filling. *Agronomy journal*, 2001, Vol. 93.
- PSOTA, V., ŠUSTA, J., KOSAR, K.: Homogenita a modifikace sladu II. Klíčení zrna, chuť piva. *Kvasný Průmysl* 44, 1998.
- PSOTA, V., PROCHÁZKA, S.: IAA, ABA, and germination of spring barley caryopses during post-harvest maturation. *J. Inst. Brew.*, 104, 1998.
- PSOTA, V., ŠEBÁNEK, J.: Role fytohormonů v klíčení a sladování, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 1999, 53 stran.
- PSOTA, V., ŠEBÁNEK, J.: Za tajemstvím růstu rostlin; návody k experimentům. *Scientia*, Praha, 1999, 187 stran.
- SVENSSON, G., LAGERSTRÖM, G., 1966: In Auranen, M.: Pre-harvest sprouting and dormancy in malting barley in northern climatic conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica, Sect., Soil and Plant Science* 1995, Vol. 45.

DYNAMIKA RASTU KALUSOVEJ KULTÚRY CHMEĽU OBYČAJNÉHO (*HUMULUS LUPULUS L.*) *IN VITRO* GROWTH RATE DYNAMICS OF CALLUS CULTURES OF HOPS (*HUMULUS LUPULUS L.*) *IN VITRO*

Ivana PŠENÁKOVÁ¹ – Juraj FARAGÓ^{1,2} – Ľubomíra GAŠPÁRKOVÁ¹

*Callus culture and cell suspension culture are considered as ideal model system for study of genetic, biochemical and physiological events in plant cell as well as perspective alternative system for production of different biologically active molecules and secondary metabolites. In our work, we compared the ability of callogenesis in hop (*Humulus lupulus L.*) from two types of explants (internode segments, leaf blade sections) isolated from genotype of hop K-72/6/13 on four types of culture media differing in the growth regulator content and glucose concentration and cultured in two culture conditions (continual dark vs. 16h photoperiod). The effect of different factors, such as explant type, culture medium composition and culture conditions on the callus induction frequency and fresh weight of calli was compared. The growth curves of calli proved, that each of the evaluated factors affected significantly the parameters of callogenesis.*

Key words: hop, callus culture, callogenesis, growth curve

Úvod

Problematike kalusových a bunkových suspenzných kultúr rastlín sa venuje v súčasnosti veľká pozornosť, hlavne kvôli štúdiu biosyntézy biologicky aktívnych látok v nich. V posledných rokoch nazierajú na chmeľ mnohé štúdie z nového uhla pohľadu. Chmeľ obsahuje aj látky, ktoré zvyšujú jeho hodnotu nielen z pivovarnického, ale aj z medicínskeho a farmakologického pohľadu. Autori poukazujú na netradičný potenciál tejto plodiny, ktorý spočíva v obsahu zdraviu prospešných látok (STEVENS a PAGE, 2004; FARAGÓ et al., 2004). Takýmito látkami sú najmä polyfenoly chalkónovej rady, z nich najmä prenylovaný flavonoid xantohumul a jeho izomér flavanón izoxantohumul (MILLIGAN et al., 1999; MIZOBUCHI a SATO, 1984; STEVENS et al., 1997; STEVENS et al., 2000; ZUURBIER et al., 1998). Faktory, ktoré určujú lokalizáciu a akumuláciu sekundárnych metabolitov v neporušenej rastline sú dôležité, pretože tie isté faktory ovplyvňujú produkciu sekundárnych metabolitov v rastlinných bunkových kultúrach. V mnohých prípadoch *in vitro* kultúra v dôsledku vhodnej elicitácie alebo pridávania prekurzorov umožňuje oveľa vyššie výťažky, aké sa dosahujú pri pestovaní celistvých rastlín (COLLIN, 2001). Okrem toho *in vitro* kultivované bunky sú ideálnym experimentálnym systémom na štúdium biosyntézy rôznych chemických zlúčenín, identifikáciu génov zúčastňujúcich sa na biosyntéze a regulácii biosyntézy týchto zlúčenín a tiež štúdium faktorov ovplyvňujúcich biosyntézu a akumuláciu chemických zlúčenín, vrátane flavonoidov. Na založenie kalusovej kultúry ako aj na dlhodobú kultiváciu proliferujúcich kalusov vplýva veľký počet biologických (donor a druh explantátu), chemických (zloženie kultivačného média) a fyzikálnych (kultivačné podmienky) faktorov, ktorých optimalizácia je závislá ako na genotype, tak aj konkrétnom rastlinnom druhu (HAN et al., 2005).

Materiál a metódy

Východiskovým zdrojom pre experimenty boli v *in vitro* podmienkach uchovávané výhonky chmeľu obyčajného (*Humulus lupulus L.*) genotypu K-72/6/13, čo je bezvírusový meriklon odvodený použitím meristémovej kultúry z odrody chmeľu Osvaldov klon 72. Na založenie kalusovej kultúry boli použité dva druhy explantátov: listové segmenty (LS) a stonkové segmenty (StS). Explantáty boli kultivované na živných médiách B2D2, B2D2G4, B2N2 a B2N2G4. Média B2D2, B2D2G4 obsahujú minerálne zložky MS médií (MURASHIGE a SKOOG, 1962) a vitamíny WS podľa WETMOREA a SOROKINA (1955). Média B2D2 a B2D2G4 obsahovali rastové regulátory 6-benzylaminopurín (BAP) a kyselinu 2, 4-dichlórfenoxyoctovú (2,4-D) v koncentráciách 2mg/l, lišili sa koncentráciou D-glukózy 20g/l (B2D2) resp. 40 g/l (B2D2G4). Média B2N2 a B2N2G4 boli identické s predchádzajúcimi dvoma živnými médiami s tým rozdielom, miesto 2,4 D obsahovali kyselinu α -naftyloctovú (NAA). V experimente boli vizuálne hodnotené nasledovné parametre: frekvencia kalogenézy (v %) a čerstvá hmotnosť kalusov (v mg). Parametre kalogenézy boli hodnotené každý štvrtý deň po dobu 40 dní.

Výsledky

V našej práci je hodnotený experiment, ktorého cieľom bolo zistiť časovú závislosť kalogenézy chmeľu obyčajného a na základe tejto závislosti zostrojiť rastovú krivku kalogenézy dvoch typov explantátov na štyroch druhoch živných médií lišiacich sa v zložení rastových regulátorov a koncentracii glukózy a pestovaných v dvoch kultivačných režimoch. Pozorovali sme (Obr. 1) že od 0 až po 16 deň narastala frekvencia kalogenézy na oboch médiách s rôznou koncentráciou glukózy pri StS segmentoch, po 16 dni na médiu s obsahom NAA s nižšou koncentráciou glukózy v podmienkach 16h fotoperiody a kontinuálnej tmy zostala frekvencia maximálna a konštantná až do 40 dňa. V porovnaní pri LS segmentoch bola frekvencia kalogenézy nižšia

na médiu s vyššou koncentráciou glukózy a do 40 dňa nedosiahla maximálnu (100%) hodnotu. Pri LS segmentoch na médiu s nižšou koncentráciou glukózy v podmienkach 16h fotoperiody frekvencia kalogenézy od 0 po 20 deň stúpala a až do 40 dňa zostala konštantná. V rovnakých intervaloch ako sme hodnotili kalogenézu, sme aj zaznamenávali čerstvú hmotnosť kalusov (Obr. 2). Najvyššiu priemernú čerstvú hmotnosť sme pozorovali pri StS segmentoch v podmienkach kontinuálnej tmy na médiu s obsahom NAA s nižšou koncentráciou glukózy a najnižšiu priemernú čerstvú hmotnosť sme pozorovali pri LS segmentoch v podmienkach 16h fotoperiody na médiu s obsahom 2,4-D s vyššou koncentráciou glukózy. Mierny nárast čerstvej hmotnosti sme pozorovali pri StS segmentoch po 8 dňoch kultivácie a od 28 dňa rýchlejší nárast na médiu s obsahom NAA v oboch kultivačných podmienkach. Rovnaký priebeh bol aj pri StS segmentoch na médiu s obsahom 2,4-D v oboch kultivačných podmienkach. V podmienkach 16h fotoperiody na médiu s vyššou koncentráciou glukózy sme zaznamenali nižšiu priemernú čerstvú hmotnosť v porovnaní s nižšou koncentráciou glukózy počas 40 dňovej kultivácie. V podmienkach kontinuálnej tmy StS segmenty vykazovali vysoký nárast priemernej čerstvej hmotnosti na médiu s obsahom NAA. Na médiu s obsahom 2,4-D to bolo naopak. Tak ako pri StS segmentoch, tak aj pri LS segmentoch v oboch kultivačných podmienkach na médiu s obsahom NAA a 2,4-D s nižšou koncentráciou glukózy sme pozorovali nárast hmotnosti, ale s tým rozdielom, že kalus začal intenzívnejšie rásť až po 16 dni kultivácie. Na médiu s vyššou koncentráciou glukózy sme pozorovali nižšie prírastky priemernej čerstvej hmotnosti v oboch kultivačných podmienkach na médiu s obsahom NAA aj 2,4-D. Po 40 dni kultivácie je vidieť vysoký nárast na médiu s obsahom 2,4-D v podmienkach kontinuálnej tmy v porovnaní so 16h fotoperiodou. Z týchto výsledkov môžeme usúdiť, že kalusy rastúce na médiu s vyššou koncentráciou glukózy potrebujú dlhší čas kultivácie.

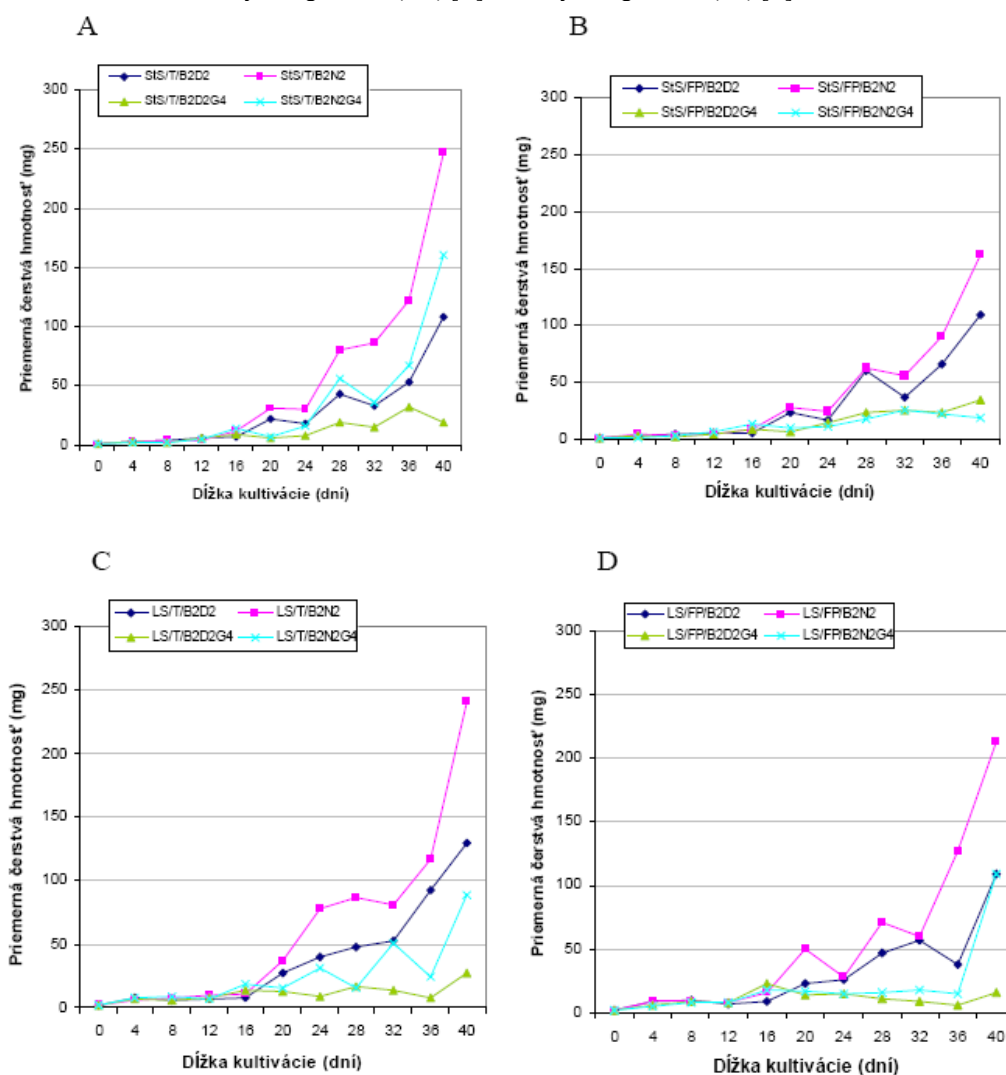
Záver

V našej práci sme hodnotili vplyv rôznych parametrov (typ explantátu, zloženie živného média, kultivačné podmienky) na indukciu a rast kalusov chmeľu obyčajného v *in vitro* kultúre. Zo získaných výsledkov a zostrojených rastových kriviek vyplýva, že každý zo sledovaných faktorov významne vplýval na sledované parametre. Tieto výsledky umožňujú efektívnym spôsobom optimalizovať podmienky pre produkciu kalusov chmeľu vhodných pre iniciáciu bunkových suspenzných kultúr.

Literatúra

- COLLIN, H.: Secondary product formation in plant tissue cultures. In: Plant Growth Regulation, 34, 2001, s. 119-134
- FARAGÓ, J., ŠRAMKOVÁ, Z., PŠENÁKOVÁ, I., FARAGOVÁ, N.: Chmeľ obyčajný: Tradičná plodina s netradičným potenciálom hop. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín, zb.11. odborného seminára, 2004, s. 62- 65. ISBN 80-88790-34-4
- HAN, J.L., WANG, H., YE, H.C., LIU, Y., LI, Z.Q., ZHANG, Y., YAN, F., LI, G.F.: High efficiency of genetic transformation and regulation of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*- mediated procedure. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 168, 2005, s. 73-80.
- MILLIGAN, S.R., KALITA, J.C., HEYERICK, A., RONG, L., DE COOMAN, L., DE KEUKELEIRE, D.: Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus*) and beer. In: The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 1999, s. 2249-2252.
- MIZOBUCHI, S., SATO, Y.: A new Flavanone with Antifungal Activity Isolated from Hops. In: Agricultural and Biological Chemistry, 48, 1984, s. 2771-2775.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.: A reserved medium for rapid growth and biomass of tobacco tissue cultures. In: Physiologia Plantarum, 15, 1962, s. 473-497.
- STEVENS, J.F., IVANCIC, M., HSU, V.L., DEINZER, M.L.: Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. In: Phytochemistry, 44, 1997, s. 1575-1585.
- STEVENS, J.F., TAYLOR, A.W., NICKERSON, G.B., IVANIC, M., HENNING, J., HAUNOLD, A., DEINZER, M.L.: Prenyl-flavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4-O-methylxanthohumol. In: Phytochemistry, 53, 2000, s. 759-775.
- STEVENS, J.F.; PAGE, J.F.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hop and beer: to your good health. In: Phytochemistry, 65, 2004, s. 1317- 1330.
- WETMORE, R.H.; SOROKIN, S.: On the differentiation of xylem. In: Journal of Arnold Arboretum., 36, 1955, s. 305-317
- ZUURBIER, K.W.M., FUNG, S.-Y., SCHEFFER, J.J.C., VERPOORTE, R.: *In vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. In: Phytochemistry, 49, 1998, s. 2315-2322.

Obrázok 1: Dynamika tvorby kalusu chmeľu obyčajného genotypu K-72/6/13 kultivovaného 40 dní na médiách s obsahom 20 g/l glukózy (B2D2, B2N2) a 40 g/l glukózy (B2D2G4 a B2N2G4) v nepretržitej tme (T), resp. 16h fotoperióde (FP). Kalusy boli indukované zo stonkových segmentov (StS) [A] a listových segmentov (LS) [B].



Obrázok 2: Priemerné čerstvé hmotnosti kalusov genotypu K-72/6/13 chmeľu obyčajného počas 40 dňovej kultivácie na médiu s obsahom 20 g/l glukózy (B2D2, B2N2) a 40 g/l glukózy (B2D2G4 a B2N2G4) v nepretržitej tme (T) a 16h fotoperióde (FP). Kalusy boli indukované zo stonkových segmentov (StS) a listových segmentov (LS). A- StS(T), B- StS(FP), C- LS(T), D- LS(FP).

VARIABILITA MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ U GENOVÝCH ZDROJŮ PAPRIKY (*CAPSICUM L.*)*

VARIABILITY OF MICROSATELLITE MARKERS IN GENETIC RESOURCES OF PEPPER (*CAPSICUM L.*)*

Michal ROHRER¹ – Jaroslava CIESLAROVÁ¹ – Pavel HANÁČEK¹ – Tomáš VYHNÁNEK¹
– Helena STAVĚLÍKOVÁ²

*Within a collection of 41 genetic resources of red pepper genotypes (*Capsicum annuum L.*) genetic variability using 8 microsatellite markers was tested. Three of the microsatellite markers (*Hpms 1-1*, *Hpms 1-168*, and *Hpms 1-274*) provided uniform spectra in all analyzed genotypes. From 2 to 7 alleles were detected for the rest of microsatellite loci. Totally 27 alleles were detected, which means an average of 4.0 allele per one microsatellite locus. The size of amplified products was determined within the limits of 172 – 340 base pairs. The highest number of different alleles was detected using *Hpms 1-5* and *Hpms 2-21* primers (7 alleles). The calculated average *DI* value was 0.33 (0.00-0.74), average *PI* value was 0.55 (0.04-1.00) and average *PIC* value was 0.32 (0.00-0.73). The low value of *PIC* indicates higher level of genetic similarity between analyzed genotypes. Based on statistical evaluation a dendrogram of similarity was constructed. Distribution of the analyzed genotypes in the dendrogram implies a high level of similarity within some genotypes and on the contrary there is a presumption of genetically different material within other genotypes of the same or similar name. These results show the possibility of duplicities in the current collection of genetic resources of red pepper.*

Key words: pepper, genetic resources, microsatellites. SSRs, variability

Úvod

Rozsáhlost kolekcí genových zdrojů vede k problémům, jak s charakterizací jednotlivých položek, podmiňujících jejich následné využití, tak i s procesem regenerace, nutným pro další uchování životaschopnosti semen. Z těchto důvodů byl v 80. letech minulého století zaveden koncept „core“ kolekcí, tj. menšího souboru, zachovávajícího na základě podrobného genetického, morfologického a agronomického popisu co největší genetické spektrum výchozí kolekce (BROWN, 1989).

Pro studium genetické diverzity a variability je v současné době k dispozici mnoho metod, např. morfologická charakteristika, analýza rodokmenů, biochemické markery (především proteiny a jejich různé izoenzymové varianty) a dynamicky se vyvíjející molekulární (DNA) markery, především pak vysoce polymorfní a kodominantní mikrosatelitní oblasti DNA. Využití detekce polymorfizmu mikrosatelitů pro studium genetické diverzity a variability popisuje mnoho autorů u řady rostlinných druhů, např. u hrachu (Haghazari et al., 2005), rajčete (WANG et al., 2006), řepky (LI et al., 2007) atd. Z uvedeného krátkého nástinu je zřejmá vhodnost metody SSR i pro studium genetické diverzity a variability u papriky.

Cílem práce byla detekce variability SSR markerů u vybraných genových zdrojů papriky z kolekce genových zdrojů VÚRV, v.v.i. GB Olomouc.

Materiál a metody

Genetická variabilita byla detekována u 41 genotypů paprik (*Capsicum L.*). Materiál byl pěstován v izolačních klecích na pozemcích VÚRV, v.v.i. GB Olomouc. Jako genetických markerů bylo využito polymorfizmu DNA, který byl detekován metodou SSR. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (f. Ivtetek) z listů napěstovaných rostlin na počátku kvetení. Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna fluorimetricky. Pro SSR analýzy bylo použito 8 SSR markerů popsaných v literatuře u papriky (Lee et al., 2004; Minamiyama et al., 2006). Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l obsahovala: 30 ng templátové DNA, 1 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 5 pM každého fluorescenčně značeného primeru a 0,1 mM směsi dNTP. Teplotní a časový profil reakce byl: 1 cyklus 94°C – 180 s; 35x (94°C – 60 s, 50°C – 60 s, 72°C – 120 s); 1x 72°C – 10 min. Pro analýzu vzorků byla použita kapilární elektroforéza ABI Prism 3100. Pomocí software Gene Marker 1.3 byl vyhodnocen počet a velikost produktů. Následně byla sestavena binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Tyto hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí programu FreeTree a graficky zpracovány do podoby dendrogramu pomocí programu TreeView. Pro každý SSR marker byly vypočteny hodnoty: indexu diversity (DI), pravděpodobnosti identity (PI) a polymorfního informačního obsahu (PIC) (RUSSELL et al., 1997).

Výsledky a diskuse

V rámci kolekce genových zdrojů papriky byla testována variabilita mikrosatelitních markerů. Z 8 analyzovaných SSR markerů poskytovaly 3 SSR markery uniformní spektrum (*Hpms 1-1*, *Hpms 1-168*, a *Hpms 1-274*) u všech analyzovaných genotypů papriky. U ostatních mikrosatelitů bylo detekováno od 2 do 7 alel. Celkem bylo detekováno 27 alel, což je v průměru 4,0 alely na lokus. Velikost amplifikovaných produktů se pohybovala v rozmezí 172-340 bp. Největší rozdíl od průměrné velikosti (Lee et al., 2004; Minamiyama et al.,

2006) byl detekován u SSR markeru *Hpms 1-168* (+36 bp) a *Cams 163* (+46 bp). Nejvyšší počet alel byl detekován u mikrosatelitů *Hpms 1-5* a *Hpms 2/21* (7 alel). MINAMIYAMA et al. (2006) zjistili u SSR markerů *Cams 163* (9 alel) a *Cams 647* (10 alel). V našem případě se tyto SSR markery vyznačovaly nižším počtem alel, tj. *Cams 647* (6 alel) a *Cams 163* (2 alely). Průměrný počet alel na lokus je srovnatelný s jinými autory, kteří uvádějí hodnoty 2,9 (MINAMIYAMA et al., 2006) a 3,0 (KWON et al., 2007).

Průměrné hodnota DI byla 0,33 (0,00-0,74), průměr PI 0,55 (0,04-1,00) a v případě PIC byla vypočítána průměrná hodnota 0,32 (0,00-0,73). Průměrná hodnota PIC byla nižší v porovnání s hodnotou 0,76, kterou uvádějí Lee et al. (2004) při studiu různých zástupců rodu *Capsicum*. Pododnou hodnotu 0,46 uvádějí v rámci studia dihaploidních linií papriky (*Capsicum annuum*) Minamiyama et al. (2006). Nízká hodnota PIC ukazuje na vyšší stupeň genetické podobnosti mezi analyzovanými genotypy papriky.

Na základě statistického zpracování byl sestaven dendrogram podobnosti (Nei a Li koeficient) analyzovaných genotypů papriky. U analyzovaného souboru genotypů se podařilo statisticky významně odlišit tři genotypy (Hatvani /č. 13/, Japan a Madarszen /č. 29 a č. 30/) od ostatních 38 analyzovaných genotypů. Rozložení analyzovaných genotypů v dendrogramu naznačuje vysoký stupeň podobnosti v rámci některých položek se stejným resp. podobným názvem, např. Astrachanskij /č. 10 a 11/; Bogyiszloi /č. 26/ a Bogyiszloi Vastaghusu /č. 27/; Konservnyj Belyj 289 /č. 18 a 40/; Tetenyi /č. 1 a 33/ apod. Naopak u dalších položek v rámci studovaného souboru je předpoklad, že se jedná o geneticky odlišné materiály.

Závěr

V práci je prezentována praktická aplikace mikrosatelitních markerů v kolekci genových zdrojů papriky (*Capsicum L.*). Z uvedených výsledků vyplývá možnost využití SSR markerů pro rozlišení a identifikaci genotypů, které je velmi vhodným nástrojem při tvorbě tzv. „core kolekce“. Již první výsledky ukazují možnost duplicit v rámci současně vedené kolekce genových zdrojů papriky (*Capsicum L.*). Pro přesnější závěry by bylo vhodné realizovat studium na více rostlinách v rámci jednoho vedeného genotypu a použití většího počtu SSR markerů, což bude předmětem další práce.

Literatura

- Brown A.H.D. (1989) Core collections: A practical approach to genetic resources management. *Genome*, 31: 818-824.
- Haghnazari A., Samimifard R., Najafi J., Mardi M. (2005) Genetic diversity in pea (*Pisum sativum L.*) accessions detected by sequence repeat markers. *J Genet Breed*, 59: 145-152.
- Kwon Y.S., Moon J.Y., Yi S.I., Bae K.M., Soh E.H., Cho I.H., Kim B.D. (2007) Comparative analysis of Pepper (*Capsicum annuum L.*) Varieties Using Morphological Characters, AFLP and SSR Markers. *Korean J Genetics*, 29: 11-20.
- Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M., Kim D.D. (2004) Characterisation and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor Appl Genet*, 108: 619-627.
- Li M., Zhang C., Qian W., Meng J. (2007) Genetic diversity of Brassica species revealed by amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers. *Hortic Environ Biotech*, 48: 9-15.
- Minamiyama Y., Tsuru M., Hirai M. (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol Breeding*, 18: 157-169.
- Russell J., Fuller J., Young G., Thomas B., Taramino G., Macaulay M., Waugh R., Powell W. (1997) Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, 40: 442-450.
- Wang R., Li Y., Yang L., Li L., Fang F., Li W. (2006) Analysis of genetic diversity based on SSR and morphological markers among tomato cultivars. *J Trop Subtrop Bot*, 14: 120-125.

*Práce vznikla za finanční podpory projektu IGA MZLU v Brně č. DP1/AF/2008 a Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity MZe Č.j.: 20139/2006-13020.

VYHLEDÁVÁNÍ DONORŮ REZISTENCE JARNÍHO JEČMENE KE RZI JEČNÉ A PADLÍ TRAVNÍMU

SCREENING FOR RESISTANCE DONORS TO LEAF RUST AND POWDERY MILDEW IN SPRING BARLEY

Tibor SEDLÁČEK – Lenka STEMBERKOVÁ – Martina HANUSOVÁ

Leaf rust (Puccinia hordei) and powdery mildew (Blumeria graminis) belong among the most important diseases of barley in the Czech Republic. The most effective method how to protect barley from these diseases is to plant resistant varieties. For the breeding of resistant varieties it is important to have sources of resistance available. There are many genes of resistance in the gene stocks. The most expedient for practical use in breeding are genes Rph7 and rph16 for resistance to leaf rust, resp. mlo11 for resistance to powdery mildew. This work is aimed to find sources of these genes.

Key words: barley, resistance, breeding, MAS, puccinia hordei, blumeria graminis

Introduction

Leaf rust (*Puccinia hordei*) and powdery mildew (*Blumeria graminis*) belong among the most important diseases of spring barley in the Czech Republic. The intensity of their occurrence and impact on productivity are different in relevancy to the environmental conditions. The best and the cheapest way to avoid losses caused by these diseases is to plant resistant varieties. For breeding success it is important to have sources of resistance available. Within genetic stocks there are many resources of genes with different level of resistance to leaf rust and powdery mildew. Useful genes possessing full resistance to leaf rust in Europe are Rph7 and rph16. Concerning powdery mildew resistance, there is effective gene mlo11 implicating resistance to all races of mildew. Our aim was to identify suitable donors carrying resistance genes to powdery mildew and leaf rust in collections of genetic resources.

Materials and Methods

Plant material for testing was selected on basis of glasshouse tests for resistance to leaf rust and powdery mildew. Two pieces of leaf long 3cm were collected and dried at 40°C from individual plants. DNA was extracted from these segments by CTAB method (KEB-LLANES et al., 2002). DNA was analyzed by standard PCR with molecular markers MWG2133 (IVANDIC et al., 1998), cMWG691 (GRANER et al., 2000) and Mlo (PIFFANELLI et al., 2004). PCR products were analyzed on 1%, resp. 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide under UV light.

Results and Discussion

We have found 42 individuals with PCR products of marker cMWG691 specific for Rph7 gene. Glasshouse test verified resistance of these individuals to leaf rust. In the tested collection we detected several individuals with fragments unpublished in GRANER et al., 2000. These fragments could indicate new allele and will be an objective of further study. We didn't find any plant with PCR products of marker MWG2133 specific for rph16 gene. It is not surprise, because this gene was described in *Hordeum spontaneum* (IVANDIC et al., 1998), and our genetic resources were selected from *Hordeum vulgare*. We will continue in searching for donors of this gene.

For gene mlo11, we have found 141 individuals with PCR products of marker Mlo specific for this gene. Glasshouse infection tests verified resistance of these individuals to powdery mildew.

Conclusions

We have found 141 donors of mlo11 gene, resp. 42 donors of Rph7 gene. It is possible to say that marker assisted selection is valuable in common breeding. The use of this method for identification of resistance donors is a worthwhile tool.

This work is supported by project NAZV QH71213.

Literature

- GRANER A., STRENG S., DRESCHER A., JIN Y., BOROVKOVA I., STEFFENSON B.J.; Molecular mapping of the leaf rust resistance gene Rph7 in barley; Plant breeding; 2000; 119; 389-392
- IVANDIC V., WALTHER U., GRANER A.; Molecular mapping of a new gene in wild barley conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth); Theor Appl Genet; 1998; 97; 1235-1239
- KEB-LLANES M., GONZÁLEZ G., CHI-MANZARENO B., INFANTE D.; A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants.; Plant Molecular Biology Reporter; 2002; 3; 299a-299e
- PIFFANELLI P., RAMSAY L., WAUGH R., BENABDELMOUNA A., D'HONT A., HOLLRICHER K., JØRGENSEN J.H., SCHULZE-LEFERT P., PANSTRUGA R.; A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew; Nature, 2004, 430, 887-891

VYUŽITÍ POLYPLOIDIZACE U RODU *CUCUMIS* V *IN VITRO* OPYLOVÁNÍ THE UTILIZE OF POLYPLOIDIZATION IN THE GENUS *CUCUMIS* IN *IN VITRO* POLLINATION

Dagmar SKÁLOVÁ

In cucumber breeding programmes, utilisation of wild Cucumis spp. is useful because of possibility to introduce many traits from them into cultivated cucumber such as disease and pest resistances. The main problem in interspecific hybridization in the genus Cucumis are the different chromosome numbers of cucumber and other Cucumis species. The method of in vitro pollination makes this hybridization possible and the method of polyploidization can overcome the problem with different numbers of chromosomes. Mixoploids (2n/4n) cucumber (C. sativus) plants after polyploidization by oryzalin solution were used as maternal and paternal components and cucumber diploids and muskmelon (C. melo) plants were used as paternal components. Isolation ovules and pollen grains were cultivated on several types of media (medium YS, CP, YST, CPT, A, N). Derived microcalli were transferred onto MSN-medium supporting organogenesis. The highest level of regeneration was only callus formation.

Key words: Cucumis spp., cucumber, muskmelon, interspecific hybridization, polyploidization, in vitro pollination.

Úvod

Ve šlechtění u rodu *Cucumis* se často využívají biotechnologické metody pro překonání prezygotických i postzygotických bariér. Jednou z nich může být i polyploidizace, která umožňuje získat bližší chromozómová čísla u jinak rozdílných čísel jednotlivých druhů rodu *Cucumis* (*C. sativus* – $2n = 14$; *C. melo* a plané druhy rodu *Cucumis* $2n = 24$; JEFFREY, 2001) a překonat tak prezygotické bariéry (GREPLOVÁ et al., 2003). Postzygotické bariéry mohou být následně překonány pomocí řady *in vitro* metod, např. pomocí *in vitro* opylování (ONDŘEJ et al., 2002). Izolovaná vajíčka jsou kultivována společně s pylovými zrny na médiích podporujících *in vitro* opylení, embryogenezi i organogenezi. Metoda izolace pylových zrn a podmínky kultivace (složení médií, osvětlení a teplota) jsou důležité faktory pro získání hybridních embryí (SKÁLOVÁ et al., 2007).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Pro *in vitro* opylování byly použity rostliny *Cucumis sativus* (Stela F1, 09H390744 po polyploidizaci; CSO) jako donor samičích i samčích květů a *C. melo* (09H400596; CM) a *C. sativus* (Stela F1, 09H390744 diploidní; CS) jako donor samčích květů. Nezralá poupata (samičí i samčí) byla zaizolována měděným drátkem a po dvou dnech odebírána.

Polyploidizace

Polyploidizace u genotypu *C. sativus* ($2n = 14$) probíhala několika způsoby. Pro polyploidizaci byly použity roztoky oryzalinu (GREPLOVÁ et al., 2003; CHAUVIN et al., 2003): 30, 60, 90, 150 μM pro aplikaci na vzrostný vrchol (vata s kapkou roztoku umístěná na vzrostném vrcholu semenáčků, doba působení 2 h) a 15, 30, 60 μM pro aplikaci na kořínky (ponoření kořínků semenáčků v roztoku, doba působení 24 h). Těmito metodami byly získány mixoploidní rostliny *C. sativus* ($2n/4n$).

Izolace pylových zrn, *in vitro* opylování

Zralá pylová zrna byla izolována z prašníků pomocí centrifugace v promývacím roztoku NLN (modifikované NLN 13 médium, LICHTER, 1981). Prašníky byly vloženy do zkumavky s 0,5 ml vychlazeného promývacího roztoku, poté byly opatrně rozdrčeny skleněnou tyčinkou a po přidavku cca 4ml roztoku byly zfiltrány přes jednoduchý nylonový filtr (72 μm). Podíl na filtru byl proplachován promývacím roztokem tak, aby konečný objem suspenze byl 10 ml. Poté byla izolovaná pylová zrna centrifugována 3x při 900 rpm po dobu 10 – 5 – 5 min (po každé centrifugaci byl odstraněn supernatant a byl doplněn promývací roztok). Izolovaná pylová zrna byla kultivována společně s izolovanými vajíčky (mixoploidní *C. sativus*) na již testovaných médiích YS, CP, YST a CPT (SKÁLOVÁ et al., 2007) a na médiích A (POPIELARSKA, 2005) a N (VERVAEKE et al., 2002) (kultivační místnost; 22 ± 2 °C; 16 h den/8 h noc - perioda; $32 - 36 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Embryokultury

Rostoucí embrya (vajíčka) byla po zvětšení a zezelenání (popř. tvorbě mikrokalusu) přenesena na médium MSN (POPIELARSKA a PRZYWARA, 2003) podporující organogenezi u vzniklých embryogenních mikrokalusů (kultivační místnost; 22 ± 2 °C; 16 h den/8 h noc - perioda; $32 - 36 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Výsledky a diskuse

Polyploidní (mixoploidní $2n/4n$) rostliny *C. sativus* byly využity především k odběru zralých samičích květů. Oryzalin byl použit jako polyploidizační (antimikrotubulinové) činidlo, které je efektivnější (je účinný ve výrazně nižší koncentraci) a bezpečnější (je méně toxický) než kolchicin (GREPLOVÁ et al., 2003; KLÍMA a et al., 2007). Byla vyzkoušena řada metod polyploidizace lišící se koncentrací použitého roztoku oryzalinu a

způsobem aplikace oryzalinu. Optimálnější byla metoda aplikace oryzalinu na vatovém tampónu na vzrostný vrchol semenáčků. Tato metoda byla šetrnější k rostlinám, které lépe rostly. V tomto případě byly získány mixoploidní rostliny po aplikaci roztoků ve všech koncentracích. Metoda ponoření kořínků semenáčků byla neúspěšná v případě nižších koncentrací (15 a 30 μM). Část rostlin zůstala diploidní a část špatně rostla.

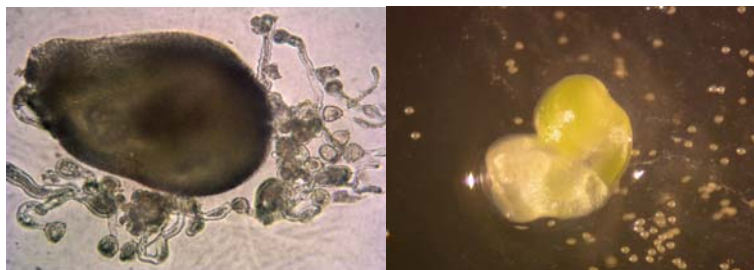
Izolace pylových zrn probíhala podle optimalizované metody a mikrospory byly následně kultivovány s izolovanými vajíčky na již testovaných (SKÁLOVÁ et al., 2007) a na dalších dvou nových médiích. Bylo izolováno 1130 vajíček ze samičích květů mixoploidních *C. sativus*. Z toho 330 bylo kultivováno s pylovými zrny diploidního *C. sativus* (CS); 360 s pylovými zrny mixoploidního *C. sativus* (CSO) a 440 s pylovými zrny *C. melo* (CM). Nejvyšším stupněm regenerace byl mikrokalus. Největší procento získaných mikrokalusů (40 %) bylo v případě hybridizace CSO \times CM na médiu CP. Vysokých procent úspěšnosti v regeneraci bylo dosaženo i v případech hybridizace CSO \times CS na médiích CP a A (36 %). Embryogenní kalusy byly z médií pro *in vitro* opylování pasážovány na médium podporující organogenezi (MSN médium). Proces organogeneze nebyl zatím v našich experimentech pozorován.

Závěr

Využití polyploidizace pro odstranění prezygotických bariér nebylo v případě *in vitro* opylování úspěšné. Jako v předchozích případech využití této metody při interspecifické hybridizaci u rodu *Cucumis* nebyly získány celistvé rostliny (ONDŘEJ et al., 2002; SKÁLOVÁ et al., 2007). Lepších výsledků kultivace izolovaných vajíček a následně embryogenních kalusů bylo dosaženo na médiu A. Mikrokalusy byly zelené a zvětšovaly se, k organogenezi ale nedocházelo ani po přenesení na médium MSN. Metoda *in vitro* opylování nebyla pro rod *Cucumis* stále natolik optimalizovaná, aby byla využita pro získání hybridních rostlin.

Literatura

- CHAUVIN, J. E. – SOUCHET, J. P. – DANTEC, J. P. – ELLISSÈCHE, D. 2003. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73: 65 – 73.
- GREPLOVÁ, M. – FRČEK, J. – REJLKOVÁ, M. – KOPECKÝ, D. – VAGER, J. – DOLEŽEL, J. 2003. Vědecké práce 14, VÚB, 55 – 63.
- KLÍMA, M. – VYVADILOVÁ, M. – KUČERA, V. 2007. Zborník ze 14. vedeckej konferencie Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin, 26 – 29.
- LICHTER, R. 1981. Z. Pflanzenphysiol., 103: 229 – 237.
- ONDŘEJ, V. – NAVRÁTILOVÁ, B. – TARKOWSKI, P. – DOLEŽAL, K. – LEBEDA, A. 2002. Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comeniana Bot., 41, 81-88.
- POPIELARSKA, M. 2005. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47/1: 85 – 92.
- POPIELARSKA M. – PRZYWARA, L. 2003. Sexual Plant Reproduction, 16: 23 – 33.
- SKÁLOVÁ D. – NAVRÁTILOVÁ B. – LEBEDA A. 2007. Zborník ze 14. vedeckej konferencie Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin, 34 – 37.
- VERVAEKE, I. – PARTON, E. – MAENE, L. – DEROOSE, R. – DE PROFT, M. P. 2002. Euphytica, 124: 75 – 83.



Obrázek 1:

- a) Izolovaná klíčící pylová zrna a izolované vajíčko.
b) Zvětšené, zelené vajíčko po kultivaci na A médiu.

Poděkování:

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

KYSELINA ABSCISOVÁ A ZÁSOBNÍ PROTEINY V ZYGOTICKÉ EMBTYOGENEZE HRACHU SETÉHO (*PISUM SATIVUM* L.) ABSCISIC ACID AND STORAGE PROTEINS IN ZYGOTIC EMBRYOGENESIS OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

Pavla SOLNICKÁ – Marek KLEMŠ – Miroslav GRIGA

*The expression of storage proteins in relation to content of abscisic acid with desiccated pea zygotic embryo (*Pisum sativum* L.) has been studied. The flowering plants were threated by 20 µM flurochloridone which decreased the content of ABA in endosperm and in the embryo in teh early stages of development. Volume and effect of abscisic acid (ABA) on expression of storage proteins during seed development of pea. Immature and mature cotyledonary embryos were cultivated in vitro on the medium supplemented by 30 g or 80 g of sucrose in the presence of flurochloridone or absence of ABA, whereas only the mature embryos were able to germinate in these conditions. The accumulation of storage proteins in the relation to desiccation is controlled by increased level of abscisic acid in the embryonic tissues and in the seed.*

Key words: pea zygotic embryo, abscisic acid, flurochloridone, storage proteins, dessication

Úvod

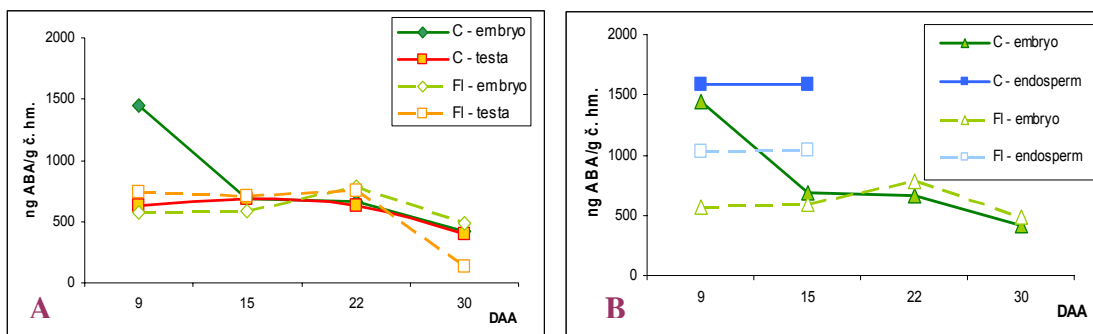
Po oplození se v semeni vyvíjí embryo, jehož růst a vývoj (embryogeneze) je charakterizován řadou změn. Embryogeneze je charakteristická nejen morfologickými, ale i látkovými změnami. Významným podílem na regulaci embryogeneze zaujímají fytohormony. Pro optimální růst a vývoj embrya je důležitá kyselina abscisová. Význam kyseliny abscisové v regulaci embryogeneze studovali PRÉVOST a Le PAGE-DEGIVRY (1985) na embryích *Phaseolus vulgaris*. Zjišťovali změny obsahu ABA v embryonální ose a dělohách. Zjistili, že i při zvýšení obsahu ABA v čase 29 DAA (dny po amthezi) v obou případech byl obsah vyšší v dělohách. Potvrdili také přidavkem ABA do média, že kultivace embryonální osy *in vitro* zkracuje fázi maturace před klíčením. Přítomnost děloh však stimulovala růst klíčnicích rostlin. Akumulaci ABA během embryogeneze *Pisum sativum* L. popsali WANG et al. (1987). Během poslední vývojové fáze embrya, která odpovídá maturaci, jsou akumulovány zásobní proteiny (WANG a HEDLEY 1993). Cílem práce bylo studium růstu a vývoje zygotického embrya hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ve vztahu ke změnám obsahu a distribuce kyseliny abscisové a syntéze zásobních proteinů ve vyvíjejícím se semeni hrachu v *in vivo* a *in vitro* podmínkách.

Materiál a metody

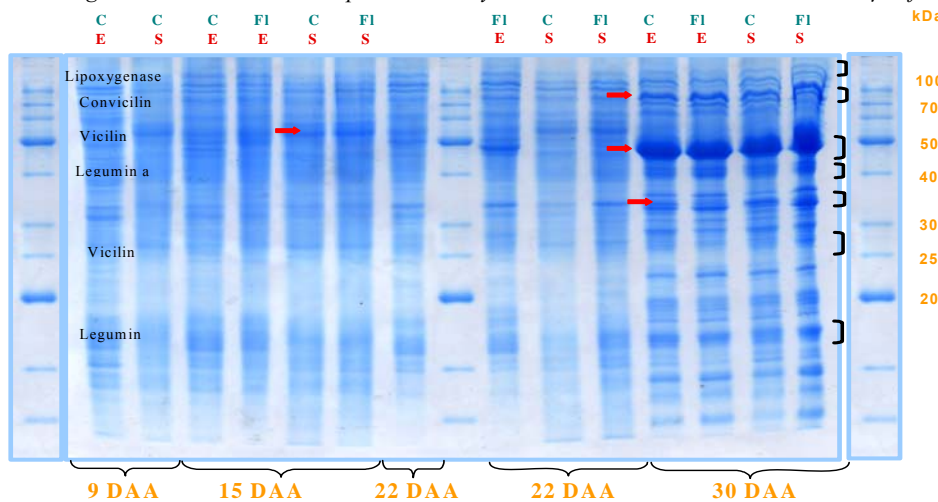
Byla izolována embrya 9, 15, 22 a 30 dní po rozkvětu (DAA) z kontrolních rostlin hrachu setého (odrůda Oskar) a z rostlin, na které byl aplikován 20 µM flurochloridon. Smeno bylo rozděleno na embryo, endosperm a testu. V 9 dnech po rozkvětu bylo embryo v srdčité fázi embryogeneze, po 15 dnech bylo v děložní fázi, po 22 dnech bylo téměř vyvinuté embryo s minimálním obsahem endospermu a po 30 dnech po rozkvětu bylo již embryo plně vyvinuto. Nezralá i zralá kotyledonární embrya byla kultivována *in vitro* na MS médiu (MURASHIGE a SKOOG 1962) s 30 g nebo 80 g sacharózy za přítomnosti flurochloridonu (20 µM) či ABA (10 µM). ABA byla analyzována pomocí RIA metody (QUARRIE et. al. 1988), při které byla použita monoklonální protilátka MAC 262. Pro analýzu zásobních proteinů byla použita SDS polyakrylamidová elektroforéza (LAEMMLI 1970). Při kultivaci izolovaných embryí *in vitro* bylo hodnoceno přežívání embryí a klíčení (%). Ke statistickému hodnocení byl použit t-Studentův test. Statistické hodnocení bylo provedeno v analýzách obsahu ABA ve čtyřech opakováních.

Výsledky a diskuze

V jednotlivých fázích byla hodnocena velikost a hmotnost embryí u kontrolních i u ošetřených rostlin flurochloridonem. Po aplikaci 20 µM flurochloridonu docházelo k malformaci děloh. Distribuce obsahu ABA v semenech *in vivo*, byla charakteristická nejvyšším obsahem ABA v endospermu a embryu, nejnižším v testě (graf 1 – A). Flurochloridon snížil obsah ABA jak v endospermu, tak i v embryích (graf 1- B). Endosperm po 15 DAA byl resorbován embryem.

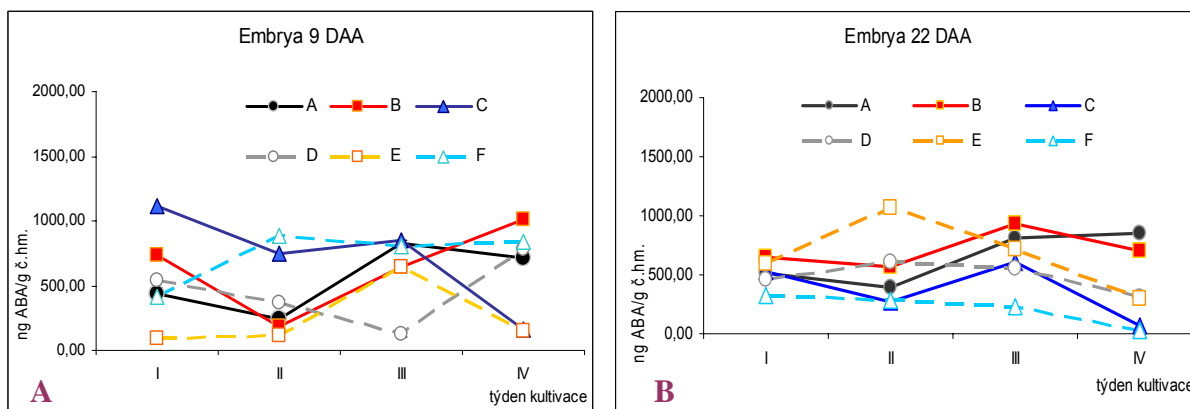


Graf 1: A- Endogenní hladina ABA v embryu a testě semen hrachu setého ošetřeného 20µM flurochloridonem B - Endogenní hladina ABA v endospermu a embryích semen hrachu setého ošetřeného 20µM flurochloridonem



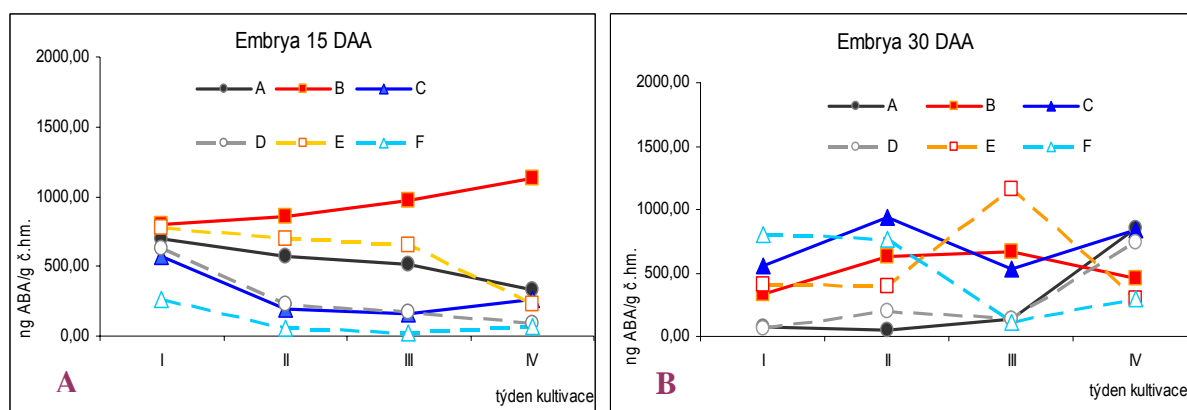
C = kontrola, FI = flurochloridon, E = embryo, S = semeno, MWM = molekulární hmotnostni

Obrázek 1: Dělení zásobních proteinů podle molekulárních markerů (gel získaný metodou SDS – PAGE, červenými šipkami jsou označeny charakteristické proteiny)



Graf 2: A - Obsah endogenní ABA v celých embryích 9 DAA ; B - Obsah endogenní ABA v celých embryích 22 DAA (A – 80 g sacharosy, B – 80 g sacharosy + 10 µM ABA, C – 80 g sacharosy + 20 µM flurochloridon , D – 30 g sacharosy, E – 30 g sacharosy + 10 µM ABA, F - 30 g sacharosy + 20 µM flurochloridon)

Ošetření flurochloridonem oddálilo syntézu zásobních proteinů (obr. 1). Analýza zásobních proteinů poukázala na jejich nepřítomnost v endospermu. V průběhu kultivace izolovaných embryí se velmi dynamicky měnil obsah ABA v embryích. Embrya 9 DAA byla patrně nejcitlivější na izolaci. Obsah ABA byl zvýšen i u 15, 22 a 30 DAA při kultivaci na médiích s flurochloridonem (graf 2, 3)



Graf 3: A - Obsah endogénnej ABA v celých embryách 15 DAA ; B - Obsah endogénnej ABA v celých embryách 30 DAA (A – 80 g sacharózy, B – 80 g sacharózy + 10 μ M ABA, C – 80 g sacharózy + 20 μ M flurochloridon , D – 30 g sacharózy, E – 30 g sacharózy + 10 μ M ABA, F - 30 g sacharózy + 20 μ M flurochloridon)

Výsledky elektroforeogramů 150 vzorků embryí kultivovaných v *in vitro* podmínkách ukázaly závislost zastoupení, syntézy a akumulace jednotlivých zásobních proteinů na zvýšení endogénnej hladiny ABA, ne vždy na kultivaci embryí na médiu s obsahem ABA. Ukládání zásobních proteinů bylo ve vztahu k desikaci řízeno zvýšením koncentrace kyseliny abscisové v pletivech embrya a semene, což odpovídá obdobným zjištěním XU a BEWLEY (1995) na embryích vojtěšky.

Literatura

- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
- PRÉVOST, I. and Le PAGE-DEGIVRY, M.Th. (1985): Changes in abscisic acid content in axis and cotyledon of developing *Phaseolus vulgaris* embryos and their physiological consequences. *J. Exp. Bot.* 36 (173): 1900-1905.
- QUARRIE, S.A., WHITFORD, P.N., APPLEFORD, N.E.J., WANG, T.L., COOK, S. K., HENSON, L.E. and LOVEYS, B.R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupine leaves. *Planta* 183: 330-339.
- WANG, T.L., COOK, S.K., FRANCIS, R.J., AMROSE, M.J. and HEDLEY, C.L. (1987): An analysis of seed development in *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* 38 (196): 1921-1932.
- WANG, T. L. and HEDLEY, C. L. (1993): Genetic and developmental analysis of the seed. In: CASEY, R., DAVIES D.R. (eds.): *Peas. Genetic, molecular biology and biotechnology*. CAB International: 83-120.
- XU, N. and BEWLEY, J.D. (1995): The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. *J. Exp. Bot.* 46(287): 687-694.

ROD *RUBUS* – NOVÝ POHLED NA STUDIUM APOMIXIE GENUS *RUBUS* – NEW MODEL SPECIES IN APOMIXIS STUDIES

Petra ŠARHANOVÁ – Martin DANČÁK – Bohumil TRÁVNÍČEK – Radim J. VAŠUT

This work is a pilot study on reproduction modes in the genus Rubus and its evolutionary consequences. Apomixis is a clonal reproduction through seeds. Due to presence of apomixis, natural populations consist of genetically isolated clones (so-called microspecies). However, apomixis was reported to be facultative and pseudogamous in the genus Rubus. Therefore new lineages are continuously formed in nature. In this long-time project we address the questions, what is the mechanism of formation new successful apomictic clones, what is the genetic background and what are the micro-evolutionary consequences. This pilot work aimed at answering the question, what are the reproduction modes in Rubus. We tested seeds of expected apomictic species Rubus bifrons from several localities in E Moravia. We analyzed seeds from covered flowers using FCSS. Surprisingly, plants exhibit not only apomictic reproduction, but also purely sexual (autogamous) and pseudogamous (pollinated by own pollen by selfing). The molecular analysis of plants and F₁ hybrids is in progress.

Key words: apomixis, brambles, flow-cytometry, reproduction, Rubus

Úvod

Apomixie je definována jako nepohlavní rozmnožování, při kterém dochází ke vzniku semen bez předchozího splynutí gamet. Redukční dělení je zde nahrazeno pozměněnou meiózou (diplosporíe) nebo zcela modifikováno (aposporíe) za vzniku neredukovaných gamet. Takto vzniklé potomstvo je geneticky shodné s mateřskou rostlinou a jedná se tedy o její klony. V naprosté většině je apomixie vázána na polyploidii. U některých rostlin zůstává opylení nutnou podmínkou pro vznik endospermu a tedy funkčního semene a takové rozmnožování se pak nazývá pseudogamie. V určitých podmínkách může apomixie přinášet rostlinám mnohé výhody – fixování vlastností, které by se v průběhu sexuálního rozmnožování nenávratně ztratily, možnost šíření na nová území pomocí jediné asexuálně se rozmnožující rostliny, únik před sterilitou poly- a aneuploidních rostlin, omezení šíření patogenů na potomky (vs. vegetativní rozmnožování), únik před vlivem letálních mutací.

Tvorba klonálního potomstva má význam zejména ve stabilních podmínkách, ve kterých se už daný genotyp osvědčil, extrémním případem stabilního prostředí je polní zemědělství. Porozumění procesu asexuálního rozmnožování, popř. nalezení genů zodpovědných za apomixii by mělo značný význam při produkci geneticky homogenního potomstva s heterózním efektem. Nejvýznamnější dopad by byl pro zemědělskou produkci v oblastech třetího světa, kde by udržení geneticky stabilního a k daným podmínkám přizpůsobeného potomstva, mělo zásadní význam pro zvýšení produkce a snížení cen osiva.

Rod *Rubus* představuje složitý agregát druhů, které jsou variabilní jak ve způsobu rozmnožování – sexuální, fakultativně apomiktické, vegetativní, tak i v ploidní úrovni. V populacích se běžně vyskytují asexuální jedinci společně se sexuálními příbuznými. Jelikož je u tohoto rodu nepohlavním rozmnožování pseudogamie, vytvářejí i asexuální rostliny funkční pyl a zachovávají si tak možnost rozmnožovat se sexuálně. Přestože je u ostružiníků apomixie popsána, genetické pozadí, případně komplexnější znalosti o apomixii ostružiníků, dosud scházejí (ASKER & JERLING, 1992). Pohlavní rozmnožování pak může vést ke křížení příbuzných druhů a k tvorbě nových lokálních typů a hybridních jedinců. Díky snadné kultivaci je vhodným modelovým druhem pro studium fakultativní aposporické apomixie.

Cílem naší studie je analýza reprodukčních mechanismů ostružiníků a pochopení evolučních, populačních a genetických mechanismů spojených s apomiktickým způsobem rozmnožování. Tento výzkum je prozatím v počáteční pilotní fázi a prezentovaný poster představuje první dílčí výsledky.

Materiál a metodika

Jako rodičovské druhy pro studium apomixie u rodu *Rubus* L. byly vybrány dva morfologicky výrazné typy: apomiktický *Rubus bifrons* VEST (ser. *Discolores*), sexuální ostružiníky ze ser. *Glandulosi* a předpokládané hybridogenní taxony náležející do ser. *Radula* a jim podobní primární kříženci. Rostliny pocházejí ze dvou regionů, ve kterých převládají odlišné morfotypy *R.* ser. *Radula* – SV Morava a JZ Čechy. Pomocí cytometrické analýzy semen (Flow-cytometric Seed Screen; FCSS; MATZK et al., 2000) byly studovány způsoby rozmnožování ostružiníků. Většina semen byla získána z květů, které byly zcela zakryté vzdušnou síťovinou, čímž bylo zamezeno opylení cizím pylem. Semena byla nejprve zbavena osemi a dále homogenizována ostrou žiletkou v hořčičkovém pufru. Jako barvivo byl použit propidium jodid (PI). Společně byla analyzována vždy dvě semena, aby bylo možné kvantifikovat jednotlivé způsoby rozmnožování.

Výsledky a diskuze

U studovaných rostlin byl stanoven DNA-ploidní stupeň rodičovských rostlin pomocí průtokové cytometrie. Sexuální rostliny ser. *Glandulosi*, jsou převážně tetraploidní, apomiktické rostliny tetra- a pentaploidní. Analýza semen z apomiktického druhu ostružiníků ukázala čtyři různé typy rozmnožování u ostružiníků. U izolovaných květů jsme pozorovali tvorbu pseudogamických semen (Obr. 1), ve kterém embryo vzniklo aposporicky z neredukované megaspory a endosperm opylením neredukované centrální buňky. Překvapivě, tento typ známý z literatury nebyl pozorován u všech rostlin. U některých rostlin byla nově pozorována tvorba zcela

apomiktických semen, tj. bez nutnosti opylení centrální buňky (Obr. 2). Kromě apomiktického způsobu rozmnožování jsme detekovali sexuální tvorbu semen, a to jak allogamicky, tak nově také autogamicky. Překvapivé bylo objevení autogamických semen v izolovaných květech apomiktického druhu ostružiníku.

Ostružiníky jsou tradičně uváděny jako pseudogamické (Asker & Jerling 1992). Některé druhy ostružiníků navíc vykazují jen velmi omezené sexuální rozmnožování. Druhy *R. bifrons* a *R. nessensis* vykazují vysokou genetickou homogenitu v populacích indikující převládající apomiktický způsob rozmnožování (Nybom & Schaal, 1998; Kollmann et al., 2000). Zvýšená genetická variabilita byla dosud pozorována jen u hybridních taxonů (Kraft et al., 1995). Vznik kříženců u apomiktů je obecně předpokládán jako opylení sexuální rostliny pylem apomiktického jedince. U podobného aposporického systému v rodu *Hieracium* subgen. *Pilosella* je rovněž známá fakultativní exprese apomixie. U jeřábů ale dochází k tomu, že apomixie má různou expresi v F₁ hybridních sex-apo hybridů, případně F₁ potomstvu apomiktů (viz např. Krahulcová et al., 2004). Naše pilotní studie ukázala, že i apomiktické rostliny jsou nejen schopny vytvářet redukované megaspory, ale zároveň jsou schopny tvorby zcela sexuálního potomstva. Ke kombinaci různých způsobů rozmnožování dochází ovšem v různých květech téhož apomiktického klonu. Zde prezentovaný poster představuje pilotní studii a proto další genetické analýzy jsou potřebné pro pochopení mechanismů spouštění apomiktického procesu.

Projekt bude pokračovat studiem genetické analýzy rostlin a jejich F₁ potomstva, které podhalí více informací o frekvenci jednotlivých reprodukčních způsobů. Studium segregace molekulárních markerů v kombinaci se studiem segregace jednotlivých reprodukčních mechanismů a analýzou meiózy objasní příčiny této variability.

Závěr

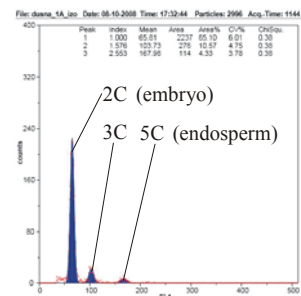
Potomstvo apomiktických ostružiníků má překvapivě relativně vysoké zastoupení sexuálního vzniklých semen. Nově byla pozorována značná variabilita reprodukčních mechanismů v rámci téhož apomiktického druhu: (fakultativní) aposporie, pseudogamie, autogamie a allogamie. Zároveň byla zjištěna variabilita DNA-ploidního stupně autogamicky, pseudogamicky a apomikticky vzniklého potomstva (tetra- a pentaploidi). Příčiny a konsekvence tohoto fenoménu je třeba dále studovat analýzou meiózy a segregací molekulárních markerů.

Literatura

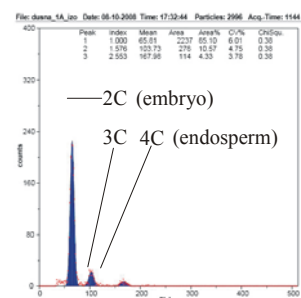
- KOLLMANN J. - STEINGER T. - ROY B.A.: Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. *Am. Jour. of Bot.*, 87(11), 2000: 1592-1598
- WERLEMARK G. - NYBOM H.: Pollen donor impact on progenies of pseudogamous blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*). *Euphytica* 133, 2003: 71-80
- Kraft T.- Nybom H. - Werlemark G.: *Rubus vestervicensis* (Rosaceae) - its hybrid origin revealed by DNA-fingerprinting. *Nord. J. Bot.* 15, 1995: 237-242.
- KRAHULCOVÁ A. - PAPOUŠKOVÁ S. - KRAHULEC F.: Reproduction mode in the allopolyploid facultatively apomictic hawkweed *Hieracium rubrum* (Asteraceae, H. subgen. *Pilosella*). *Hereditas* 141, 2004: 19-30.
- MATZK F. - MEISTER A. - SCHUBERT I.: An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. - *Plant J.* 2, 2000:97-108.
- NYBOM H. - SCHAAL B.A.: DNA „fingerprints“ reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). *Am. Jour. of Bot.*, 77(7), 1990: 883-888

Poděkování:

Tato práce byla podpořena grantem GAČR GA206/08/0890 a grantem Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR, MSM 6198959215.



Obr. 1. FCSS sexuální a pseudogamicky vzniklých semen. Pseudogamická semena obsahují aposporické embryo vzniklé z neredukované vaječné buňky a sexuální endosperm vzniklý z neredukovaného endospermu.



Obr. 2. FCSS sexuální vzniklých apomiktických semen. Apomiktická semena vznikají autonomní proliferací neredukované megaspory, proto má endosperm dvojnásobnou ploidní úroveň, než mateřské pletivo.

VYUŽITIE DNA MARKEROV V ŠĽACHTENÍ TRITIKALE NA ZLEPŠENÚ PEKÁRSKU KVALITU

EXPLOITATION OF DNA MARKERS IN TRITICALE BREEDING FOR ENHANCED BREAD-MAKING QUALITY

Andrej TREBICHALSKÝ – Petr MARTINEK – Želmíra BALÁŽOVÁ

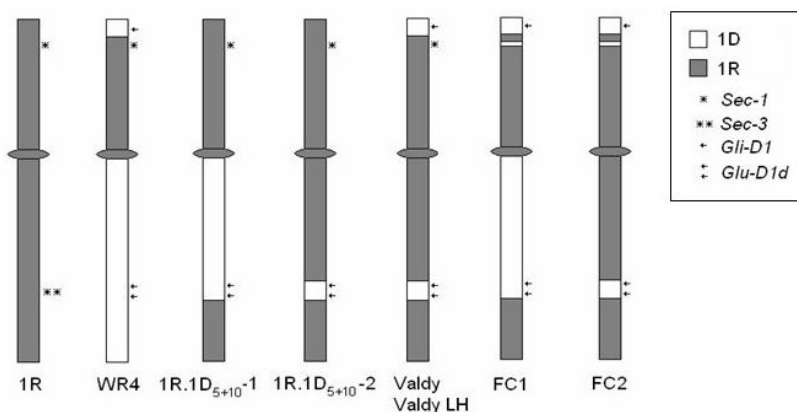
*A triticale breeding programme focused on the improvement of grain bread-making quality is presented. It is aimed at developing triticale lines usable in the production of leavened bakery products. Two breeding strategies are employed that are based on various methods of Marker Assisted Selection (MAS) for detection of HMW glutenin allele *Glu-D1d* (subunits 5+10) in spike progenies. The allele *Glu-D1d*, originating from wheat chromosome 1D is transferred to triticale using some types of translocation of chromosome 1R: 1R.1R₅₊₁₀-1, 1R.1D₅₊₁₀-2, Valdy, Valdy LH, FC1 and FC2. Translocation donors of chromosome 1R for this purpose have been developed and provided by Prof. Adam J. Lukaszewski (Univ. of California, Riverside, USA). The method for selection of *Glu-D1d* using DNA markers is described in detail. In 2008, a total of 307 F₄-F₈ spike progenies derived from various crosses of a triticale cultivar × a translocation donor were tested. *Glu-D1d* allele was confirmed in 162 cases. The development of triticale with bread-making grain quality will enable extending the area planted with food cereals in worse soils where bread cultivars of triticale retain better amino acid composition (particularly higher lysine content).*

Key words: Triticale (*X Triticosecale Wittmack*), bread-making, *Glu-D1d*, subunits 5+10, translocation, 1R.1R₅₊₁₀-1, 1R.1D₅₊₁₀-2, Valdy, Valdy LH, FC1, FC2

Úvod

Význam alely *Glu-D1d* u pšenice je dostatočne známy a je možné v zásade konštatovať, že sa nachádza takmer vo všetkých odrodách pšenice s dobrou (A) alebo vynikajúcou (E) pekárskou kvalitou. Táto alela má tiež vysoké pozitívne tzv. gluteninové (pšeničné) skóre (asi 30 %), teda mieru, ktorou pozitívne prispieva k celkovej pekárskej kvalite. Vzhľadom k tomu, že *Glu-D1d* sa môže nachádzať na chromozóme 1D, ktorý v hexaploidnom tritikale (BBAARR) chýba, je možné do tritikale túto alelu preniesť napríklad pomocou príslušnej translokácie chromozómu 1R.1D. Problémom je, že chromozóm 1R rovnako nesie sekalínové lokusy, z ktorých hlavne *Sec1* výrazne negatívne ovplyvňuje pekársku kvalitu (odrody pšenice nesúce známu translokáciu 1BL.1RS, ktorá nesie na krátkom ramene *Sec1* naopak obvykle nie sú vhodné pre pekárske využitie z dôvodu, že *Sec1* má negatívne /ražné/ skóre). Vzhľadom k tomu, že vytvorenie pekárskych foriem tritikale by mohlo byť hospodársky veľmi významné (o čom nepochybujú v krajinách, kde je tritikale významne rozšírené) sa už niekoľko rokov cielene vyvíjajú translokácie chromozómu 1R.1D v tritikale, kde je cieľom nielen preniesť požadovaný segment nesúci *Glu-D1d* ale súčasne eliminovať účinky sekalínových lokusov *Sec3* a zvlášť *Sec1*. Profesor Adam J. Lukaszewski, 2007 (Univ. of California, Riverside, USA) vytvoril širokú škálu translokácií chromozómu 1R v tritikale (Obr. 1), ktoré sú postupne využívané v šľachtiteľských programoch v Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž (ďalej len KM) a v Hodowla Roslin Strzelce Sp. z o.o. - šľachtiteľská stanica Borowo v Poľsku (ďalej len BOH).

Vzhľadom k tomu, že na oboch pracoviskách sú značne odlišné podmienky v prípade finančného zabezpečenia šľachtiteľských programov tritikale, existujú na nich celkom odlišné stratégie selekcie.



Obrázok 1: Vľavo je znázornený chromozóm 1R bez translokácie (je celý vyfarbený tmavo), vpravo od neho je séria odvodených translokácií s prenesenými segmentmi z chromozómu 1D, ktoré sú označené bielou farbou.

Viacnásobné translokácie, ktoré nesú väčší počet segmentov prenesených z 1D sú nazvané Valdy, Valdy LH, FC1 a FC2. Niektoré pšeničné segmenty nahrádzajú sekalínové lokusy.

Cieľom práce bolo uskutočniť selekciu potomstiev klasov ozimného tritikale obsahujúceho gluteninový alelu *Glu-D1d* pomocou molekulárnych markerov na pracovisku KM.

Materiál a metódy

a) rastlinný materiál

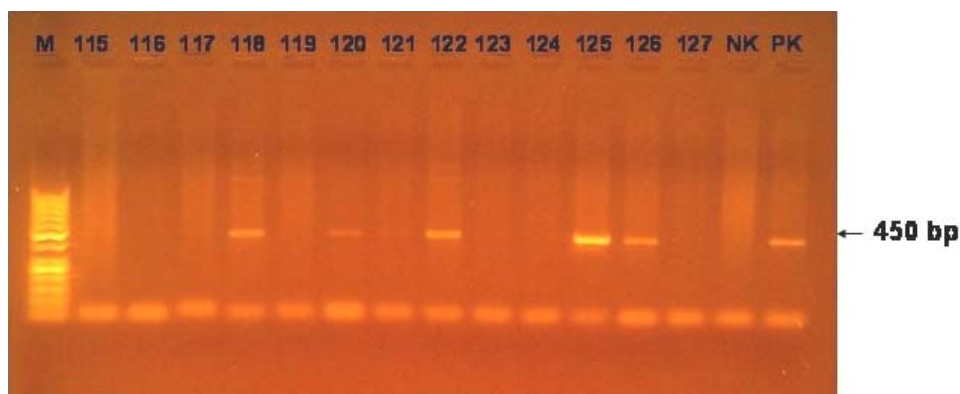
V KM bolo v roku 2007/08 vysiate strojom Seedmatic celkom 2856 potomstiev klasov ozimného tritikale (každý klas do dvoch 80 cm dlhých riadkov) od 158 rozdielnych krížencov typu: odroda tritikale x donor translokácie v generáciách F₄ - F₈. Použité donory translokácie niesli niektorú z translokácií: 1R.1R₅₊₁₀-1, 1R.1D₅₊₁₀-2, Valdy, Valdy LH, FC1. U 10 cennejších krížencov, kde boli do kríženia použité krátkostebľé formy (s génom *Rht21*) a donory translokácie FC1 bol uskutočnený odber listov z jednotlivých dvojriadkov pre DNA analýzy. Listy boli odobrané z 500 potomstiev v dobe odnožovania a tieto boli uložené do hlbokomraziaceho boxu. Odber listov bol uskutočnený náhodne z rôznych rastlín v dvojriadkoch, takže predstavujú zmesnú vzorku rastlín.

Počas vegetácie bola na poli uskutočnená selekcia perspektívnych potomstiev tak, že farebným sprejom boli označené najlepšie vyrovnané potomstvá s dobrou odolnosťou k hubovým chorobám, poliehaniu. Bolo označených a zozbieraných v poli 307 dvojriadkov (teda asi 10 %). Pre molekulárne analýzy bolo použitých 161 vzoriek listov uchovaných v mraziacom boxe (1. série vzoriek) a 146 vzoriek listov mladých rastlín vypestovaných zo zrna zostávajúcich potomstiev v rašelinových sadbovačoch (2. série vzoriek).

b) metodika detekcie *Glu-D1d* pomocou DNA markerov

Metodika DNA markerov pre detekciu *Glu-D1d* bola u tritikale rozpracovaná v Mendelovej zemědělské a lesnické univerzitě v Brně (VINTEROVÁ et al., 2003) a následne bola aplikovaná v laboratóriu molekulárnej genetiky v KM. Genómová DNA bola izolovaná pomocou DNAeasy Plant Mini Kitu firmy Qiagen. Pre detekciu *Glu-D1d* bola použitá metodika PCR-SPLAT (D'Ovidio, Anderson, 1994) podľa modifikovaného PCR protokolu s využitím (5') GCC TAG CAA CCT TCA CAA TC (3'), (5') GAA ACC TGC TGC CGA CAA G (3') primerov. Polymerázové reťazové reakcie (PCR) boli uskutočnené v objeme 20 µl zmesi v termocykleri následovne: denaturácia prebiehala pri 94°C 60 s, naviazanie primerov pri 55 °C pro 45 s a záverečná polymerizácia 30s pri 72 °C. Namnožená DNA po PCR reakcii bola detekovaná horizontálnou elektroforézou (Biometra - agel standard) v 1,5 % agarózovom géli a fixovaná ethidium bromidom. Konečný produkt o veľkosti 450 bp, ktorý verifikuje prítomnosť alely *Glu-D1d* bol porovnaný a vyhodnotený na základe 50 bp dĺžkového markera GeneRuler od firmy Fermentas. Po separácii elektroforetickými metódami a vizualizácii v agarózovom géli boli výsledky molekulárnych analýz vyhodnotené pomocou software BIO 1D++.

Rozdelenie analyzovaných vzoriek do dvoch sérií umožnilo uskutočniť detekciu *Glu-D1d* pomocou DNA markerov v laboratóriu už od polovice júna a celý súbor sa podarilo zanalyzovať ešte do jesenného siatia roku 2008.



Obrázok 2: Elektroforetická separácia v 1,5 % agarózovom géli. M predstavuje 50 bp dĺžkový marker, 115-127 sú analyzované vzorky (u 118, 120, 122, 125 a 126 je pozitívny výsledok), NK je negatívna kontrola a PK je pozitívna kontrola. Fragment o veľkosti 450 bp je vyznačený šípkou.

c) stratégia selekcie tritikale pre pekárské účely

V KM šľachtenie tritikale na pekársku kvalitu bolo zahájené v roku 2000, pokračovalo nadväzujúcim projektom GAČR: 521/03/0113 v rokoch 2003-2005. V KM bol kladený veľký dôraz na použitie homozygotných rodičovských donorových foriem nesúcich príslušné translokácie. Boli uskutočnené takmer výhradne jednoduché kríženia typu: významná odroda tritikale × donor translokácie. Takéto kríženie potom zaručuje, že v následných hybridných potomstvách možno očakávať 50% frekvenciu výskytu požadovanej translokácie. Pokiaľ nie sú finančné prostriedky na detekciu požadovanej alely *Glu-D1d* možno nechať hybridnú populáciu samoopelovať (selfovať) bez veľkého nebezpečenstva, že by sa frekvencia požadovanej alely znížila natoľko, že by nebola detekovateľná. Tento postup taktiež umožňuje presunúť uskutočnenie výberu klasov (alebo rastlín) do neskorších (vyšších) generácií, čo má výhodu, že je v nich vyšší podiel homozygotov, čo sa prejavuje navonok vyšším počtom vyrovnaných dvojiadkov.

V BOH sa uskutočňujú rovnako zložitejšie kríženia typu kedy F_1 (odroda × donor translokácie) je znovu krížená na odrodu. V týchto prípadoch je frekvencia požadovanej translokácie v F_2 populácii nižšia než 50 % a je nevyhnutné túto translokáciu ihneď detekovať. Pokiaľ by populácia bola ponechaná samoopelovaniu, frekvencia translokácie by sa za niekoľko generácií postupne priblížila k nule a bola by veľmi ťažko zistiteľná. Typu kríženia je nevyhnutné prispôsobiť metódu selekcie. K detekcii translokácie používajú v BOH metódu elektroforetickej separácie bielkovín endospermu zrna SDS-PAGE, kde *Glu-D1d* je možné detekovať podľa bielkovín v pozícii 5 a 10 na elektroforetickom géli. SDS-PAGE možno s úspechom využiť v skorých generáciách, jej prednosťou je, že je lacnejšia. Je ju možné použiť taktiež pre rozlíšenie homozygotov a heterozygotov a pre detekciu sekalínových lokusov. Táto metóda umožňuje analyzovať i jednotlivé zrná, pričom z ponechanej časti obilky so zárodkom možno dopestovať rastlinu. Rastliny nesúce *Glu-D1d* v raných generáciách je možné následne ustáliť pomocou metód explantátových kultúr z nezrelých prašníkov a následnej tvorby dihaploidov.

Na rozdiel od SDS-PAGE metóda DNA-markerov pre detekciu *Glu-D1d* využíva spravidla listy ako východzí materiál pre izoláciu DNA, neumožňuje od seba rozlíšiť homozygotov a heterozygotov a je o niečo drahšia. Metóda využívajúca elektroforetickú separáciu bielkovín pracuje teda s translačnými produktmi hodnotených génov - proteínmi, zatiaľ čo metóda DNA markerov detekuje daný gén priamo.

Výsledky a diskusia

Vyššie uvedené selekčné postupy umožňujú vytvoriť línie tritikale so zlepšenými čiastkovými parametrami kvality zrna, ktoré v pekárskych pokusoch preukazujú v niektorých prípadoch uspokojivé chlebopekárske výsledky (Obr. 3).



Obrázok 3: Zľava: KM 42-07 (bez translokácie) má veľmi plochý tvar bochníka, KM 31-07 jednoduchú translokáciu 1R.1D₅₊₁₀₋₂, KM 28-07 a KM 81-07 s dvojitou translokáciou označenou názvom Valdy sa vyznačujú uspokojivým tvarom bochníka (označenie Valdy LH vyjadruje že táto translokácia sa vyznačuje normálnou dĺžkou klasu: LH - long head - dlhý klas). Tieto línie boli porovnané s kontrolnou odrodou tritikale Pawo (ktorá je považovaná za odrodu využiteľnú pre pečenie chleba, i keď neobsahuje žiadnu translokáciu chromozómu 1R) a ozimnou pšenicou Samanta (teraz zaradenou do kategórie B /chlebová kvalita/, skôr bola zaradená do kategórie A)

Z testovaných 161 analyzovaných potomstiev v 1 sérii bola alela *Glu-D1d* zistená u 66 potomstiev, teda v 41 % prípadov. Jednalo sa teda o nižší počet výskytu tejto alely oproti predpokladanému 50 % výskytu. Tento nižší počet možno vysvetliť tým, že v priebehu pestovania hybridných populácií bol periodicky uskutočňovaný hromadný výber klasov, ktorých zrno bolo ako zmes vysievané do ďalších generácií. Počas tohto výberu mohlo dôjsť k čiastočnej eliminácii výskytu *Glu-D1d*, pretože je známe, že u niektorých typov translokácií (predovšetkým Valdy) existuje negatívna väzba na krátky klas (MARTINEK et al., 2008). Mohlo teda dôjsť počas výberu normálne vypadajúcich klasov k výberu čiastočne eliminovaných požadovaných translokácií z populácie.

Naproti tomu v druhej sérii 146 analyzovaných vzoriek mladých rastlín pestovaných v rašelinových sadbovačoch bola alela *Glu-D1d* zistená u 96 potomstiev, teda v 66 % prípadov. Tento počet je oproti očakávanému vyšší a je spôsobený tým, že medzi testovanými potomstvami boli rovnako genotypy, u ktorých selekcia na *Glu-D1d* bola uskutočnená skôr, ale vzhľadom k fenotypovej heterogenite (ku ktorej môže dochádzať niekedy aj vplyvom nekontrolovateľného cudzoopelenia s okolitými rastlinami) bolo nutné opakovať uskutočnenie klasových výberov.

Súhrnne, z 307 zožatých a analyzovaných potomstiev bola alela *Glu-D1d* nájdená v 162 prípadoch. Na jeseň 2008 bolo vysiato 260 potomstiev do malých skúšok výkonu (o veľkosti 5m²) (teda asi len 9 % vysiatych potomstiev), pričom boli vysiate všetky potomstvá obsahujúce alelu *Glu-D1d* (98 potomstiev, u ktorých táto alela nebola zistená, boli vysiate z dôvodu, že mali výrazne krátke steblo, prípadne veľmi dobrú odolnosť k chorobám a z tohto dôvodu neboli vylúčené).

Predpokladá sa, že v roku 2009 bude k dispozícii dostatok zožatého zrna pre laboratórne analýzy orientované na stanovení technologických parametrov kvality zrna, prípadne pekárskych testov.

Pekárska kvalita je veľmi komplexný znak, ktorý je okrem viskoelastických charakteristík lepkovej bielkoviny podmienený i radou iných charakteristík. Napríklad je len málo preštudovaná úloha nízkomolekulárnych glutenínov. Problematickým znakom, ktorý u tritikale negatívne ovplyvňuje výslednú kvalitu je zvyčajne vysoká aktivita α -amylázy a s tým spojená nízka odolnosť k prerastaniu. Tá je riadená úplne odlišným genetickým systémom ako akým sú riadené zásobné bielkoviny. V súčasnosti tento systém je len čiastočne preštudovaný. Vhodnou kombináciou donorov nesúcich požadovanú alelu *Glu-D1d* a donorov odolnosti k prerastaniu by malo dôjsť k podstatnému zlepšeniu pekárskej kvality u tritikale. Najväčšiu perspektívu možno očakávať od využitia nových translokácií FC1 a FC2, u ktorých prítomnosť *Glu-D1d*, *Gli-D1* a súčasne odstránenie *Sec1* by mali viesť ku podstatnému zlepšeniu pekárskej kvality u tritikale.

Je dôležité upozorniť, že oboma metódami detekcie (SDS-PAGE, DNA-markery) možno detekovať len prítomnosť požadovanej alely vo vzorke alebo rastline, podľa čoho predpokladáme prítomnosť respektíve alebo neprítomnosť danej translokácie. Pretože translokácie chromozómu 1R boli vytvorené už mnohé (Obr. 1), bude vhodné nájsť spôsoby detekcie, ktoré by umožnili v šľachtiteľskom materiálu rozlišovať jednotlivé typy translokácií navzájom od seba.

Záver

Pomocou DNA markerov bolo v roku 2008 analyzovaných 307 klasových potomstiev v generácii F₄ - F₈ rôznych krížencov odrôd tritikale s donormi translokácie chromozómu 1R, kde tento chromozóm nesie pšeničný segment z chromozómu 1D s HMW gluteninovou alelou *Glu-D1d*. Tá má u pšenice výrazne pozitívny vplyv na technologickú kvalitu zrna a mala by podobným spôsobom zlepšovať kvalitu zrna aj u tritikale. Alela *Glu-D1d* bola potvrdená u 162 potomstiev tritikale, ktoré boli vysiate na jeseň 2008. U týchto potomstiev je možné očakávať zvýšený počet parametrov zlepšenej technologickej kvality nevyhnutných pre výrobu kysnutého pečiva.

Literatúra

- D'Ovidio R, Anderson O. D.: PCR analysis to distinguish between alleles of member of a multigene family correlated with bread-making quality. *Theor. Appl. Genet.* 88, 1994: 759-763.
- Lukaszewski A. J.: Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale. *Crop Sci.* 46, 2006: 2183-2194.
- Martinek P, Vinterová M, Burešová I, Vyhnánek T.: Agronomic and quality characteristics of triticale (*X Triticosecale* Wittmack.) with HMW glutenin subunits 5+10. *J. Cereal Sci.*, 47(1), 2008, 1: 68-78.
- Vinterová M., Bednář J., Ježíšková I., Martinek P.: DNA markers for high molecular weight glutenin subunits 5+10 used in wheat and triticale breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39(3), 2003: 69-72.

PodĎakovanie

Výskum bol podporený výskumným zameraním Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky: MŠMT 2532885901 - etapou E, projektom KONTAKT Česko-slovenskej spolupráce MEB 080827 a projektom Vedeckej garantovej agentúry SR VEGA č. 1/3474/06. Autor príspevku A. Trebichalský ďakuje Ing. Tomášovi Vyhnánkovi, PhD. Z MZLU Brno za pomoc pri využití metodiky DNA markerov na pracovisku Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž za umožnenie vykonania odbornej stáže.

INTRODUKCE A ŠLECHTĚNÍ RODU SANVITALIA LAM.

1. GENOVÉ ZDROJE A SOUČASNÉ SORTIMENTY

INTRODUCTIONS AND BREEDING IN THE GENUS SANVITALIA LAM.

1. GENETIC RESOURCES AND CULTIVAR ASSORTMENTS

Jiří UHER

The genus Sanvitalia Lam. is comprised of six species of annuals or perennials, distributed primarily in Central America. Despite two of them were introduced in the last centuries, only S. procumbens Lam. remain under cultivation till today. However, some garden varieties are showing some differences in heads and rays morphology, and in all probability were developed from strain of hybrid origin. The wild species characteristics, and origin of gardens cultivars are discussed.
Keywords: *Sanvitalia, genepool, wild species, garden varieties*

Úvod

Středoamerický rod *Sanvitalia* Lam. sdružuje vytrvalé i jednoleté byliny charakteristické v subtribu *Zinninae* přetrvávajícími paprsky s téměř zaniklými trubkami a hranatými nažkami s chmýrem zpravidla redukováným ve tři nebo čtyři osiny (KARIS & RYDING, 1994). Ze sedmi druhů akceptovaných TORRESEM (1964) nejspíš jen pět tvoří monofyletickou skupinu, ze zbývajících byl jeden převeden do rodu *Zinnia* L. (STROTHER, 1979). V kulturách zdůmácněla především *S. procumbens* Lam., pěstovaná v řadě kultivarů se žlutými i purpurovými kvítky disku, lemovanými žlutými nebo oranžovými paprsky, jejíž popularita v poslední době nebyvala roste: nebyla-li *Sanvitalia* statistikami VBN před rokem 2000 sledována, jen čtyři roky poté zaujímá 26. pozici mezi parkovými květinami (tab.1). Poté obrat ze 720 000 € pomalu klesá k 560 000 € - i to však stále představuje 1 100 000 rostlin jen na nizozemském trhu.

Taxonomická problematika

Navzdory skutečnosti, že všechny druhy jsou značně variabilní a byly zaznamenány nativní hybridy (Torres, 1974), pro květinářskou praxi stěží budou zajímavé jiné druhy než *S. procumbens* Lam. a *S. versicolor* Gris. s nápadně vyvinutými paprsky úborů, přesahujícími délkou osiny nažek.

Sanvitalia procumbens Lam. (*S. villosa* Cav., *S. acinifolia* DC.) je poléhavá bylina s celokrajnými, štětinatě pýřitými listy; ty bývají u různých populací někdy drobné a téměř jehlicovité, jindy větší a široce vejčité. Stopečkaté úbory jsou podpírány zákrovky z dvaceti nebo méně braktejemi zprvu listotvarými, postupně se zmenšujícími a zužujícími, chránícími početné a zpravidla temně purpurové kvítky disku věnčené až dvanácti pergamenovitými, elipčité vejčitými, žlutými nebo oranžově stínovanými paprsky. Křídlaté a bradavičnaté nažky jsou vícetvaré, po obvodu úboru ploché s třemi osinami, pod diskem tříhranné až čtyřhranné a zpravidla jen s dvěma kratšími osinami; vyrůstají mezi žlutými nebo purpurovými plevinami. *S. procumbens* je ekologicky plastický taxon rostoucí téměř po celém Mexiku (z Chihuahua do Chiapas), Guatemale a Kostarice od pobřeží až k 2600 m výšky v horách. Do kultur byla uvedena roku 1798 a už od roku 1860 jsou nabízeny plnokvěté odrůdy, rozšiřované později jako var. *ligulosa* Voss.

Sanvitalia versicolor Gris. je větvená, vzpřímeně nebo přepladavě rostoucí jednoletka s kopinatými, drsně štětinatými listy. Úbory má přisedlé se zhruba patnácti listotvarými, postupně se zmenšujícími a vejčitými, po obvodu brvitými a při vrcholku často bezbarvými zákrovními listeny. Paprsky lemují žluté disky v menším počtu (asi třináct) a bývají drobnější než u předešlého druhu, bílé nebo blédě žluté, hranatě vejčité s nadvinutými okraji při bázi. Bradavičnaté nažky disku jsou zploštělé, s pýřitými hranami a s 2-4 (5) nestejnými osinami, podpírané blanitými plevinami. *S. versicolor* se morfologicky nápadně podobá populacím *S. procumbens* se žlutými disky, zaznamenanými z Oaxaca; domácí je ale v Bolívii a severní Argentíně v nadmořských výškách 500-2000 m. Roku 1879 byla introdukována vídeňskou botanickou zahradou, dnes již pěstována není.

Ostatní druhy mají jen malé úbory se žlutými, méně početnými a relativně drobnými paprsky kratšími (s výjimkou *S. fruticosa*) než osiny nažek, jistě však mohou být užitečné ve vývinu nových zahradních hybridů a byly proto zařazeny do kolekce genetických zdrojů NCRPIS v Iowa (WIDRLECHNER & al., 1994). K těmto patří *Sanvitalia fruticosa* Hemsl., *S. angustifolia* A.Gray, *S. ocyroides* DC., a možná *S. abertii* A. Gray (tab.2), pokud poslední ze jmenovaných druhů, neobvyklý jednořadým zákrovem a karyotypem, náleží skutečně rodu *Sanvitalia*.

Pěstované odrůdy

Přestože jsou sanvitalie pěstovány více než dvě století a první odrůdy s plnými úbory (známé jako var. *ligulosa* a var. *plenissima compacta*) se objevily bezmála před 150 lety, nebyvalou popularitu ústící v registraci řady nových odrůd zaznamenaly teprve v posledních letech. Nemalou měrou se na rostoucí oblibě podílelo zavedení útlých žlutě květoucích rostlin, rozšířených pod jménem *Sanvitalia* 'Aztec Gold' před patnácti lety (Wicki-Freidl, 1993), které však nejsou skutečnými sanvitaliemi, zjevně náleží rodu *Melampodium*. Skutečné sanvitalie se na současném sortimentu podílejí jen asi patnácti odrůdami se žlutými, oranžovými i bělavými paprsky, uvedenými převážně firmami Syngenta Seeds a Kieft Bloemzaden v posledních deseti letech (tab.3).

Rostliny náležející skutečně rodu *Sanvitalia* jsou v zahradnické praxi všeobecně rozšiřovány jako *S. procumbens*, odrůdy série 'Sprite' se však přisedlými úbory a konkávně zprohýbanými paprsky (u odrůdy 'Vanilla Sprite' dokonce krémově zbarvenými) blíží charakteristikám druhu *S. versicolor* a nejspíše jde o selekce z hybridních populací, přesívaných holandskými botanickými zahradami od časů, kdy byly ještě oba druhy zastoupeny v kultivaci. Charakteristiky

uvedené v tabulkách jsou zobecňující, všechny z poloplňných odrůd zčásti nakvétají jednoduchými úbory a také plnokvěté odrůdy mají dokonale plné úbory jen v krátkodenních podmínkách, tehdy však současně zastavují vegetativní růst - za dlouhého dne zůstává část úborů nepravidelně vyvinutá.

Uznání a poděkování

Výzkum na rodech *Sanvitalia* a *Melampodium* byl podpořen projektem MzeČR E-97/01-3160-0200. Osobitě díky náleží firmě Kieft Bloemzaden za poskytnutí osiva série 'Sprite'.

Literatura

- KARIS P.O., RYDING O. (1994): Tribe Heliantheae. In Bremer, K. (ed.): Asteraceae cladistics & classification, 559-624. Timber Press, Portland, Oregon
- STROTHER J. L. (1979): Extradition of *Sanvitalia tenuis* to *Zinnia* (Compositae-Heliantheae). Madroño 26: 173-179
- TORRES A.M. (1964): Revision of *Sanvitalia* (Compositae-Heliantheae). Brittonia 16 (4): 417-433
- WICKI-FREIDL, P. (1993): 'Aztekengold' für Beet und Balkon: eine neue *Sanvitalia*-Sorte mit besondere Eigenschaften. Der Gartenbau 114 (1): 24-25
- WIDRLECHNER M.P., ROATH W.W., FUENTES-GRANADOS R.G., CAMPOS A. (1994): Collecting *Cuphea*, *Sanvitalia* and *Zinnia* in Mexico. Plant Genetic Resources Newsletter 98: 10-12

Tabulka 1: VBN statistiky z let 2002-2007 pro rostliny rozšiřované jako *Sanvitalia*¹⁾

rok (pořadí)	<i>S. procumbens</i>	<i>S. 'Cuzco'</i> & ostatní	celkem
2002 (26.)	1 177 000	278 000	1 455 000
2003 (27.)	1 146 200	436 800	1 582 000
2004 (26.)	985 850	398 840	1 384 690
2005 (32.)	707 270	396 370	1 103 640
2006 (34.)	646 015	527 240	1 173 255
2007 (40.)	dosud nepublikováno	dosud nepublikováno	1 090 000

¹⁾ *S. 'Cuzco'* a další kultivary odvozené od *S. 'Aztec Gold'* nejsou skutečnými *sanvitaliemi*

Tabulka 2: Plané druhy rodu *Sanvitalia*

taxon	charakter růstu	paprsky / kv. disku	původ
<i>S. abertii</i> A.Gray	vzpřímený 0.3 m	žluté / žluté	Arizona, do 2500 m
<i>S. angustifolia</i> A.Gray	vzpřímený 0.2 m	žluté / žluté	Mexico, do 2300 m
<i>S. fruticosa</i> Hemsl.	rozložitý 0.2 m	žluté / tm. purpurové	Mexico, do 2000 m
<i>S. ocymoides</i> DC.	vystoupavý 0.2 m	žluté / žluté	Mexico, do 2100 m
<i>S. procumbens</i> Lam.	poléhavý 0.1 m	žluté / tm. purpurové	Mexico, do 2600 m
<i>S. versicolor</i> Gris.	vystoupavý 0.2 m	krémové / zelenavé	Bolivia, do 2000 m

Tabulka 3: Odrůdy rodu *Sanvitalia* v kultivaci

odrůda	distributor	paprsky / kv. disku	typ úboru
Dark Yellow Penny ¹⁾	Grünwald (Sumsan 02)	žluté / tm.purpurové	jednoduchý
Gelber Vogel	Bruno Nebelung	žluté / tm.purpurové	jednoduchý
Golden Penny ¹⁾	Grünwald (Sumsan 01)	žluté / tm.purpurové	jednoduchý
Goldmarie	Syngenta Seeds	žluté / tm.purpurové	jednoduchý
Goldteppich	Syngenta Seeds	žluté / tm.purpurové	poloplňný
Irish Eyes	Syngenta Seeds	žluté / plné úbory	plný
Mandarin Orange	Syngenta Seeds	oranžové / tm.purpurové	jednoduchý
Orange Sprite	Kieft-Pro-Seeds	oranžové / deep purple	jednoduchý
Sunny Double	Fothergills Seeds	žluté / plné úbory	plný
Sunny Orange	Fothergills Seeds	oranžové / tm.purpurové	poloplňný
Tsavo Double Gold ²⁾	Selecta First Class	žluté / plné úbory	plný
Vanilla Sprite	Kieft-Pro-Seeds	krémové / tm. purpurové	poloplňný
Yellow Prince	Hamer	žluté / tm.purpurové	poloplňný
Yellow Sprite	Kieft-Pro-Seeds	žluté / tm.purpurové	poloplňný

¹⁾ ostatní kultivary v sérii, 'Little Penny', 'Lucky Penny' a 'Penny Star', nejsou skutečnými *sanvitaliemi*

²⁾ ostatní kultivary v sérii, 'Tsavo Golden Yellow' a 'Tsavo Yellow Ice', nejsou skutečnými *sanvitaliemi*

INTRODUKCE A ŠLECHTĚNÍ RODU SANVITALIA LAM. 2. INTRODUKCE, SORTIMENT A TAXONOMICKÝ STATUT “SANVITALIA SPECIOSA“

INTRODUCTIONS AND BREEDING IN THE GENUS SANVITALIA LAM. 2. INTRODUCTION AND TAXONOMIC STATUT OF “SANVITALIA SPECIOSA“

Jiří UHER

In last few years, Sanvitalia become economically important bedding plant in Dutch flower statistics. While S. procumbens is a well known species established under cultivation for a long time, the Sanvitalia speciosa is a widespread invalid name only, used for delicate plant of unknown origin introduced fifteen years ago. A number of characters uncomon in the genus Sanvitalia apparently relocate the plant to the genus Melampodium.

Keywords: Sanvitalia, Melampodium, wild species, garden varieties

Úvod

Sanvitalia je ekonomicky významnou parkovou květinou, ročně jen holandskými aukcemi prochází více než 1.2 milionu rostlin s obratem 600 000 €. Téměř polovina z tohoto množství je zastupována útlými rostlinami s drobnými žlutými úbory, uváděnými do kultur zhruba před patnácti lety a označovanými zprvu jako *Sanvitalia* 'Aztec Gold' (Wicki-Freidl, 1993), později s registracemi nových odrůd jako *S. speciosa* (BELL & HAAS, 2005; CAMPPELL & HWU, 2003; CAMPPELL & KIZILKAYA, 2004; GRUNBERG & MCCORMICK-EWOLDT, 2007; LOCKER, 2004), *S. hybrida* (CAMPPELL & KIZILKAYA, 2001; GRUNBERG, 2005), nebo chybně jako *S. procumbens* (GRUNBERG & WHEALY, 2004; BELL & PARA, 2006). Jména *S. speciosa* ani *S. hybrida* nebyla nikdy platně publikována a rostliny samy se od druhů rodu *Sanvitalia* nápadně odlišují rychle vadnoucími paprsky, dvouřadými zákrovy s dimorfními braktejemi a nažkami s chmýrem beze zbytku zaniklým, tedy znaky naznačujícími spíše příslušnost subtribu *Melampodiinae* (KARIS & RYDING, 1994). Paprskové květy přirůstající adaxiální stranou k apexu ovaria (stejně jako nažky paprsků obrostlé vnitřními zákrovními listeny) ukazují pak bezprostředně na rod *Melampodium* L.

Taxonomická problematika

Ze sedmatřiceti druhů rodu *Melampodium*, které v poslední revizi akceptoval STUESSY (1972), byly dosud obecně pěstovány jen kompaktně rostoucí odrůdy po celých tropech zplaňujícího *M. divaricatum* (Rich.) DC. (zpravidla pod jménem *M. paludosum* H. B. & K.) - tento naprosto nepodobný druh sekce *Serratura* má dlouze řapikáté, rhombicky vejčité listy a poměrně veliké úbory s vnějšími zákrovními braktejemi srostlými do třetiny své délky. Taxon rozšiřovaný jako *Sanvitalia speciosa* se zdá být nejbližší jihomexickému *Melampodium montanum* Benth. ze sekce *Rhizomaria*, stonky má však víceméně lysé, podobně jako téměř nesrůstající vnější listeny zákrovu.

Podobné zákrovy jsou charakteristické pro *M. glabribracteatum* Stuessy (sect. *Cupulata*), které se však nápadně liší drobnými úbory nejvýše s 6-8 paprsky a méně než třiceti kvítky disku. Drátovité, svítivě purpurové stonky a téměř nesrostlé vnější zákrovní brakteje má také habituelně podobné *Melampodium americanum* L. z typové sekce *Melampodium*, to však má zákrovy vně štětinatě pýřité, listy zespod bělavě hedvábité a často poněkud laločnaté, kvítky disku oranžové a nažky podstatně větší. *M. americanum* roste po celých amerických tropech a ve smíšených lesích jihomexického státu Oaxaca se v nadmořské výšce 1800-2400 m střetává s *M. montanum*, avšak vzdor skutečnosti, že STUESSY (1979) nachází druhy sekcí *Rhizomaria* a *Melampodium* velmi blízké, jejich přirozená hybridizace se jeví nepravděpodobnou pro značně rozdílný karyotyp (TURNER, 1962; STUESSY, 1971).

Pěstované odrůdy

Nové *Melampodium* je nedávnou novinkou na evropském květinovém trhu: jako *Sanvitalia* 'Aztec Gold' byly rostliny do uvedeny roku 1991 firmou Hugo Dittmar Samen & Pflanzen ve švýcarském Deitingen (WICKI-FREIDL, 1993), více však o jejich původu známo není. Pod tímto jménem jsou stále nabízeny semenářskými firmami E. Benary Samenzucht, Summer Hill Seeds, Mr. Fothergill Seeds, Vis Seed & Co a dalšími. Už o čtyři roky později nabízí však táž firma první z vegetativně množených odrůd 'Sunbini' (Dittsun), následovanou o dekádu později odrůdou 'Starbini' (CAMPPELL & HWU, 2003; GRUNBERG & MCCORMICK-EWOLDT, 2007). K roku 2004 nabízí své první kultivary 'Ariba' (Wessacomp), 'Tequilla' (Wessateq) a 'Sunny Star' (Wessastar) Heinrich Westhoff v německém Südlahn (LOCKER, 2004; BEEL & HAAS, 2005). Syngenta Seeds přihlásila již v roce 1999 proslulou 'Cuzco Yellow' (Santis 99-3), následovanou o pět let později trojicí 'Cuzco Compact Yellow' (Santanis), 'Cuzco Trailing Yellow' (Santasol) a 'Cuzco Ideal' (Sandeal) (CAMPPELL & KIZILKAYA, 2001 a 2004). V té době se již "Sanvitalia speciosa" stává jednou z nejpobulárnějších balkónových květin a nové odrůdy přihlašují firmy Brandkamp, Florensis International, Selecta First Class, Bruno Nebelung a Danziger - v současné době je (stále pod nesprávným označením Sanvitalia) nabízeno již více než třicet odrůd

(tab.1), lišících se často jen zanedbatelně v délce a šířce paprskových kvítků, ve tvaru a velikosti listů a přepadavým nebo více kompaktním habitem (CFIA, 2007_{AB}). Po nahlédnutí do statistik VBN je zřejmé, že nové *Melampodium*, jakkoli šlechtiteli a množiteli dosud nebylo rozpoznáno, je dnes již daleko nejpěstovanějším druhem rodu a po připočtení dat o obchodu s *M. divaricatum* (Rich.) DC. posune rod *Melampodium* k podobnému umístění v řebříčku tržní úspěšnosti, jakému se díky němu těší dnes rod *Sanvitalia*.

Uznání a poděkování

Výzkum na rodech *Sanvitalia* a *Melampodium* byl podpořen projektem MzeČR E-97/01-3160-0200. Osobitě díky náleží firmě Ernst Benary Samenzucht GmbH za poskytnutí osiva *Sanvitalia* 'Aztec Gold', *Melampodium* 'Derby' a *Melampodium* 'Showstar', a firmě Syngenta Seeds za dodání mladých rostlin *Sanvitalia* 'Cuzco' série.

Literatura

- BELL, K.; HAAS, W.C. (2005): *Sanvitalia* plant named 'Wessacomp'. United States Plant Patent, US PP15.881 P2.
 BELL, K.; PARA, A.H. (2006): *Sanvitalia* plant named 'San Yel'. United States Plant Patent, US PP17.214 P2.
 CAMPELL, B.R.; HWU, J. (2003): *Sanvitalia* plant named 'Dittsun'. United States Plant Patent, US PP14.140 P2.
 CAMPELL, B.R.; KIZILKAYA, M. (2001): *Sanvitalia* plant named 'Santis 999-3'. U.S. Plant Patent, US PP12.297 P2.
 CAMPELL, B.R.; KIZILKAYA, M. (2004): *Sanvitalia* plant named 'Santasol' (S&G 30038). United States Plant Patent, US PP15.210 P2.
 CFIA - Canadian Food Inspection Agency (2007_A): Applications under examination: *Sanvitalia* 'Sandal' and *Sanvitalia* 'Superbini'. Plant Varieties Journal (Ottawa) 65: 154-157.
 CFIA (2007_B): Applications under examination: *Sanvitalia* 'Starbini'. Plant Var. Journal (Ottawa) 62: 507-508.
 GRUNBERG, A.M., WHEALY C.A. (2004): *Sanvitalia* plant named 'QuHa 4015/1'. United States Plant Patent, US PP15.398 P2.
 GRUNBERG, A.M.; MCCORMICK-EWOLDT, S.B. (2007): *Sanvitalia* plant named 'Starbini'. United States Plant Patent, US PP17.869 P2.
 KARIS, P.O.; RYDING, O. (1994): TRIBE HELIANTHEAE. BREMER, K. (ed.): Asteraceae cladistics & classification, 559-624. Timber Press, Portland, Oregon.
 LOCKER, H.J. (2004): Variety of *Sanvitalia* plant named 'Wessastar'. United States Plant Patent, US PP14.799 P3.
 MANILAL, K.S. (1975): A compound capitulum of *Melampodium*. Botanical Journal of the Linnean Society 70 (1): 71-75.
 STUESSY, T.F. (1971): Chromosome numbers and phylogeny in *Melampodium* (Compositae). American Journal of Botany 58 (8): 732-736.
 STUESSY, T.F. (1972): Revision of the genus *Melampodium* (Compositae-Heliantheae). Rhodora 74 (1): 1-70, (2): 169-219.
 STUESSY, T.F. (1979): Cladistics of *Melampodium* (Compositae). Taxon 28 (1, 2/3) 179-195.
 TORRES, A.M. (1964): Revision of *Sanvitalia* (Compositae-Heliantheae). Brittonia 16 (3): 417-433.
 TURNER, B.L.; KING, R.M. (1962): A cytotaxonomic survey of *Melampodium* (Compositae-Heliantheae). American Journal of Botany 49 (3): 263-269.
 WICKI-FREIDL, P. (1993): 'Aztekengold' für Beet und Balkon: eine neue *Sanvitalia*-Sorte mit besondere Eigenschaften. Der Gartenbau 114 (1): 24-25.



Sanvitalia procumbens:
Sanvitalia 'Sprite' série



Melampodium (sect. *Rhizomaria*)
 "Sanvitalia" "Sundance Yellow"



Melampodium divaricatum:
Melampodium 'Derby'



Sanvitalia procumbens:
Sanvitalia 'Sprite' série

Melampodium (sect. Rhizomaria)
"Sanvitalia" 'Sundance Yellow'

Melampodium divaricatum:
Melampodium 'Derby'

Tabuľka 1: Odrůdy rodu *Melampodium* v kultivaci

Komerční jméno	registrační jméno	šlechtitel / distributor	označení v katalozích
Ariba	Wessacomp	HeinrichWesthoff	Sanvitalia speciosa
Aztec Gold		Dittmar Samen Pflanzen	Sanvitalia speciosa*
Cuzco Ideal	Sandéal	Syngenta Seeds	Sanvitalia speciosa*
Cuzco Compact Yellow	Santanis	Syngenta Seeds	Sanvitalia speciosa*
Cuzco Trailing Yellow	Santasol	Syngenta Seeds	Sanvitalia speciosa*
Cuzco Yellow	Santis 99-3	Syngenta Seeds	Sanvitalia speciosa*
Derby		Benary Samenzucht	Melampodium paludosum
Discovery		B.T. World Seeds	Melampodium paludosum
Exp Yell		Brandkamp	Sanvitalia speciosa
Golden Globe		Benary Samenzucht	Melampodium paludosum
Golden Sun		Jungpflanzen Grünewald	Sanvitalia procumbens
Gold Star		Ferry Morse	Melampodium paludosum
Inka		Florensis International	Sanvitalia
Lemon Delight		Takii & Co.	Melampodium paludosum
Little Penny	Grüsanvi 04	Jungpflanzen Grünewald	Sanvitalia speciosa
Little Sun		Michael H. Unger	Sanvitalia hybrida
Lucky Star	Grüsanvi 01	Jungpflanzen Grünewald	Sanvitalia procumbens
Medaillon		Syngenta Seeds	Melampodium paludosum
Melanie		Thompson & Morgan	Melampodium paludosum
Million Gold		Takii & Co.	Melampodium paludosum
Minicushion		Brandkamp	Sanvitalia speciosa
New Sunset		Brandkamp	Sanvitalia speciosa
Penny Star		Jungpflanzen Grünewald	Sanvitalia procumbens
Picador Yellow		Selecta Klemm	Sanvitalia speciosa
Safari		Florensis International	Sanvitalia
Sanvy Super Gold		Dümmen	Sanvitalia speciosa
Selina	Nebosan 434	Bruno Nebelung	Sanvitalia speciosa*
Show Star		Benary Samenzucht	Melampodium paludosum
Solaris	Nebosan 423	Bruno Nebelung	Sanvitalia speciosa*
Sunbini	Dittsun	Dittmar Samen Pflanzen	Sanvitalia

Komerční jméno	registrační jméno	šlechtitel / distributor	označení v katalozích
Sundance Yellow	San Yel	Goldsmith Seeds	Sanvitalia
Sunny Star	Wessastar	HeinrichWesthoff	Sanvitalia speciosa
Starbini	Sunbini Improved	Dittmar Samen Pflanzen	Sanvitalia
Vitali		Flor Elite	Sanvitalia speciosa
Yellow Beauty	QuHa 4015/1	Kieft Bloemzaden	Sanvitalia procumbens
Yellow Spot		Brandkamp	Sanvitalia speciosa
Talya		Danziger	Sanvitalia
Tequilla	Wessateq	HeinrichWesthoff	Sanvitalia procumbens
Tsavo Golden Yellow	KLESP 06163	Selecta First Class	Sanvitalia
Tsavo Yellow Ice	KLESP 06178	Selecta First Class	Sanvitalia

* nověji také v katalozích E. Benary, Syngenta Seeds a Bruno Nebelung chybně jako *Sanvitalia procumbens*

VYUŽITIE DISKRIMINAČNEJ ANALÝZY NA URČENIE *Rht* GENOTYPU PODEA FENOTYPOVÝCH CHARAKTERISTÍK UTILIZATION OF DISCRIMINANT ANALYSIS FOR DETECTION *Rht* GENOTYPE ACCORDING TO PHENOTYPE CHARACTERISTICS

Martin UŽÍK – Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Darina MUCHOVÁ

Using discriminant analysis and combination of 13 evaluated traits, wheat cultivars with Rht-B1b gene from cultivars with Rht-D1b gene were unequivocally separated and also classified with the highest probability cultivars ambiguously detected.
Key words: winter wheat, cultivars, Rht genes, discriminant analysis

Úvod

Zabudovanie *Rht* génu krátkosteblovosti do genotypu rastliny zmenilo nielen výšku, ale aj ďalšie morfológické a fyziologické znaky. V praxi sa využívajú *Rht – B1b* a *Rht – D1b* gény, pričom ich prítomnosť v rastline je možné detekovať pomocou GA testu, avšak ich odlíšenie navzájom je možné len pomocou molekulárnych markerov. Vznikla teda otázka či nie je možné na základe komplexu morfológických znakov odlíšiť odrody s génom *Rht–B1b* od odrôd s génom *Rht–D1b*. Diskriminačná analýza (DA) sa úspešne používa v mnohých oblastiach na odlíšenie rastlín, na základe kombinácie viacerých znakov, prípadne markerov. ETICHA et al. (2006) využili diskriminačnú analýzu kombináciou 7 kvalitatívnych znakov na klasifikáciu rastlín jednotlivých druhov pšeníc v populácii alžírskych pšeníc. KHRAMTSOVA et al. (2003) rozlíšili metódou DA diploidné od aloplodných druhov pšenice. UŽÍK, ŽOFAJOVÁ (2002) aplikovali DA na odlíšenie materských rastlín jačmeňa od domnelých F1 rastlín. Ako diskriminačné premenné sa využívajú tiež molekulárne markery. ZHANG et al. (2005) vyhodnotili potenciál DA na detekciu kandidátov markerov spojených s agronomickými znakmi medzi 218 inbrednými líniami ryže, pričom hodnotili 12 agronomicky dôležitých znakov a použili 60 SSR a 114 RFLP markerov. FAHIMA et al. (1999) pri štúdiu genetickej diverzity pšenice pomocou DA správne klasifikovali línie genotypované markermi do miest pôvodu.

Cieľom práce bolo zistiť: stupeň významnosti jednotlivých znakov pre diskrimináciu a klasifikáciu odrôd, možnosť pomocou fenotypických znakov odlíšiť odrody s génom *Rht–B1b* od odrôd s génom *Rht–D1b* metódou diskriminačnej analýzy, možnosť podľa fenotypických znakov zaradiť odrody s neidentifikovaným genotypom do určitej genotypovej triedy pomocou klasifikačnej diskriminačnej funkcie odhadnutej z kalibračného súboru.

Materiál a metódy

V pokuse v rokoch 2005/06 a 2006/07 na VŠS Malý Šariš bolo skúšaných 30 odrôd pšenice letnej f. ozimnej (tab. 1), ktoré boli zaradené do 4 genotypových *Rht* tried (ŽOFAJOVÁ et al. 2007). Do diskriminačnej analýzy boli zaradené znaky – hmotnosť slamy, hmotnosť klasov, hmotnosť biomasy, hmotnosť zrna, HTZ, počet zrn.klas⁻¹, počet klasov.m⁻², dĺžka klasu, počet kláskov, výška rastliny, zberový index, klasenie, bielkoviny, mokrý lepok. Z odrôd z tried 1 – 3 sme zostavili kalibračný súbor na výpočet parametrov diskriminačnej funkcie, podľa ktorej sa zaradili genotypy s neurčitým *Rht* genotypom.

Tabuľka 1: Zoznam hodnotených odrôd a ich rozdelenie podľa genotypových *Rht* tried

Trieda	Počet odrôd	Odrody a ich pôvod
1 (<i>rht</i>)	3	Altos (DEU), Haldor (DEU), Manhattan (DEU),
2 (<i>Rht – B1b</i>)	4	Hermann (DEU), Mv Suba (HUN), Occitan (FRA), Shaan M 8121 (CHN)
3 (<i>Rht – D1b</i>)	17	Andalou (FRA), Aubusson (FRA), Baltimor (FRA), Barroko (GBR), Bastide (FRA), Caphorn (GBR), Catalan (FRA), Forban (FRA), Grisby (FRA), Hamac (FRA), Chequer (GBR), Korund (DEU), Levis (CHE), Smuggler (GBR), Verdon (FRA), Vercors (FRA), Vergain (FRA)
4 (neidentifikované)	6	Craclin (FRA), Cubus (DEU), Harrow (GBR), Isidor (FRA), Noah (DEU), Shamrock (GBR)

Výsledky

Pokúsili sme sa vytvoriť homogénne skupiny odrôd pomocou diskriminačnej analýzy. Z 23 odrôd ktoré boli podľa *Rht* alelu jednoznačne charakterizované sme vytvorili kalibračný súbor o troch triedach, z ktorého sa odhadli diskriminačné koeficienty pre klasifikáciu a diskrimináciu genotypov. Pre všetky tri skupiny najvyššiu hodnotu pre klasifikáciu mali koeficienty odvodené od znakov v poradí: hmotnosť zrna na klas, zberový index, hmotnosť 1000 zrn, počet zrn na klas, prípadne dĺžka klasu. Hodnota koeficienta na klasifikáciu odvodená z výšky mala podstatne menšiu dôležitosť a obsah bielkovín viac diskriminoval odrody

ako obsah mokrého lepku. Pomocou uvedených znakov podarilo sa odrody kalibračného súboru jednoznačne zatriediť do troch predikovaných skupín *rht*, *Rht-B1b* a *Rht-D1b* (tab. 2). Pomocou dvoch funkcií (os x a os y) je možné odrody v rovine roztriediť do skupín. Odrody kalibračného súboru zaradené do pozorovaných tried podľa stanoveného *Rht* génu boli zhodne zaradené do predikovaných skupín tiež pomocou morfológických znakov so 100 % spoľahlivosťou (tab. 2). Na jednoznačnú klasifikáciu a diskrimináciu odrôd do skupín nepostačovali ani také dva významné znaky ako výška rastlín a zberový index, v ktorých došlo k najvýraznejším zmenám zabudovaním *Rht* génov krátkosteblovosti, pretože od ostatných skupín sa mohli odlíšiť len odrody skupiny 1. O odrodách, pri ktorých neboli *Rht* alely jednoznačne detekované sme v prvom kroku predpokladali, že vytvárajú samostatnú skupinu. Ako však vyplýva z tabuľky 2, predpoklad sa nepotvrdil. Podľa klasifikačných funkcií pre 4 triedy podarilo sa len 80 % odrôd správne zaradiť a podľa diskriminačných funkcií odrody zo skupiny 4 sa zaradili do skupín 2 a 3 a všetky tri skupiny (2, 3, 4) vytvorili jednu nediferencovanú skupinu. V ďalšom kroku sme predpokladali, že neidentifikované odrody patria buď do skupiny 2 (*Rht-B1b*) alebo do skupiny 3 (*Rht-D1b*). Pomocou klasifikačných a diskriminačných funkcií odhadnutých z kalibračného súboru podarilo sa všetkých 30 odrôd jednoznačne zatriediť do 3 tried, pričom zo skupiny 4, dve odrody boli zaradené do skupiny 2 a 5 odrôd do skupiny 3. Pomocou diskriminačných funkcií sa tri skupiny odrôd podarilo priestorovo od seba separovať.

Tabuľka 2: Klasifikačná tabuľka

Pozorované skupiny	Veľkosť skupiny	Predikované pre skupiny			
		1 (<i>rht</i>)	2 (<i>Rht-B1b</i>)	3 (<i>Rht-D1b</i>)	4 (nezaradené)
Kalibračný súbor					
1 (<i>rht</i>)	3	100,0	0	0	
2 (<i>Rht-B1b</i>)	3	0	100,0	0	
3 (<i>Rht-D1b</i>)	17	0	0	100,0	
Správne klasifikovaných – 100,0 %					
Nekalibrovaný súbor					
1 (<i>rht</i>)	3	100,0	0	0	0
2 (<i>Rht-B1b</i>)	4	0	75,0	25,0	0
3 (<i>Rht-D1b</i>)	17	0	0	76,47	23,53
4 (nezaradené)	6	0	16,67	0	83,33
Správne klasifikovaných – 80,0 %					
Kalibrovaný súbor					
1 (<i>rht</i>)	3	100,0	0	0	
2 (<i>Rht-B1b</i>)	5	0	100,0	0	
3 (<i>Rht-D1b</i>)	22	0	0	100,0	
Správne klasifikovaných – 100,0 %					

Záver

Metódou DA kombináciou všetkých hodnotených znakov podarilo sa jednoznačne od seba separovať odrody s génom *Rht-B1b* od odrôd s génom *Rht-D1b* a zaradiť do určitej skupiny s najvyššou pravdepodobnosťou odrody nejednoznačne detekované.

Literatúra

- ETICHA, F. – BELAY, G. – BEKELE, E. (2006): Species diversity in wheat landrace populations from two regions of Ethiopia. In: Genetic Resources and Crop Evolution, vol. 53, 2006, pp. 387–393.
- FAHIMA, T. – SUN, G. L. – BEHARAV, A. – KRUGMAN, T. – BEILES, A. – NEVO, E. (1999): RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. In: Theor. Appl. Genet., vol. 98, 1999, pp. 434–447.
- KHRAMTSOVA, E. V. – KISELEVA, I. S. – LYUBOMUDROVA, E. A. – MALKOVA, N. V. (2003): Optimization of the leaf mesophyll structure in allopolyploid and diploid wheat species. In: Russian Journal of Plant Physiology, vol. 50, 2003, N. 1, pp. 19–27.
- UŽÍK, M. – ŽOFAJOVÁ, A. (2002): Možnosti využitia diskriminačnej analýzy v šľachtení rastlín. In: Biometrické metódy a modely v súčasnej vede a výskume : Sborník referátů XV. letní školy biometriky, Lednice, 2. 9. - 6. 9. 2002. Brno : ÚKZÚZ, 2002, pp. 321–329.
- ZHANG, N. – XU, Y. – AKASH, M. – MCCOUCH, S. – OARD, J. H. (2005): Identification of candidate markers associated with agronomic traits in rice using discriminant analysis. In: Theor. Appl. Genet., vol. 110, 2005, pp. 721–729.
- ŽOFAJOVÁ, A. – MIHÁLIK, D. – ŠAJGALÍK, M. – MUCHOVÁ, D. – LICHVÁROVÁ, M. – ONDREJČÁK, F. – UŽÍK, M. (2007): Hodnotenie vybraných rodičovských odrôd pšenice letnej f. ozimnej. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : zborník zo 14. vedeckej konferencie, 13. - 14. november 2007. - Piešťany : SCPV-VÚRV, 2007. - ISBN 978-80-88872-65-8, pp. 83–85.

FRAKČNÉ ZLOŽENIE BIELKOVÍN PRI ODRODÁCH OZIMNEJ PŠENICE REGISTROVANÝCH V ROKOCH 1921 – 2003

FRACTION COMPOSITION OF PROTEINS AT WINTER WHEAT CULTIVARS REGISTERED IN THE YEARS 1921 – 2003

Martin UŽÍK – Ivan MICHALÍK – Dana URMINSKÁ – Alžbeta ŽOFAJOVÁ

Fastening on the former research, where N uptake and protein content were analysed in the set of old and modern cultivars, in the present paper effect of N fertilization and cultivars on grain protein composition were evaluated. Old cultivars had higher bread making quality as higher grain protein content and higher prolamins and glutelins content.

Key words: albumins, globulins, prolamins, glutelins, winter wheat, cultivars

Introduction

Grain protein content is one of the most important attributes in bread making quality. Generally, the modern cultivars present less grain protein content than their predecessor, suggesting that breeding may have reduced baking quality while improving yield (CALDERINI, SLAFER 1998, ORTIZ MONASTERIO et al. 1997, UŽÍK, ŽOFAJOVÁ 2003).

Grain proteins in wheat are related to the unique properties of its flour for bread making (STONE, SAVIN 1999) and are influenced by both the genotype and the environment (GOODING et al. 2003). It has been shown that grain protein content alone does not necessarily determine dough quality. Grain quality is complex trait resulting from the interactions between numerous protein components.

Fastening on the former research (UŽÍK, ŽOFAJOVÁ 2007) where N uptake and translocation were analysed in relation to protein and gluten content in cultivars registered in the years 1921 – 2003, in the present paper on the same cultivar set the effects of genotype and nitrogen supply on grain protein composition are analysed.

Material and methods

With ten winter wheat cultivars registered in the years 1921 to 2003 (Table 3, 4) pot experiment in 2 replications and on 4 variants of N nutrition (N 0, N 50, N 100, N 150) was established. N content in grain groats and other characteristics were determined in the average samples from two replications. N content was determined according to Kjeldahl and protein N content according to Barstein and albumins, globulins, prolamins, glutelins and residue of nitrogen were determined according to MICHALÍK (2002). The data were evaluated by Statgrafics plus for Windows.

Results

Modern cultivars had higher N uptake per plant and more effective N translocation into grain, but considering higher grain yield, N grain concentration and protein content were lower than in old cultivars (UŽÍK, ŽOFAJOVÁ 2003). N grain content was increased linearly with increasing N supply until to the dose N 150 kg ha⁻¹ (Table 1).

Table 1: Effect of N supply on N grain content and on protein fractions

N kg ha ⁻¹	*N	**N	*Proteins	**Proteins	Al. and glob.	Prolamins	Glutelins
0	1.919	1.60	11.01a	9.16	0.36	0.51	0.58
50	2.170	1.81	12.25b	10.34	0.39	0.61	0.64
100	2.520	2.04	14.17c	11.65	0.43	0.74	0.70
150	2.582	2.21	14.57c	12.62	0.44	0.80	0.77
LSD _{0.05}		0.11	0.94	0.61	0.02	0.06	0.05

* SCPV – VÚRV Piešťany, ** SPU Nitra

Increasing N doses did not increase N content proportionally in all protein fractions. N supply relative decreased albumins and globulins content (from 22.99 to 20.09%) but increased prolamins content (from 32.12 do 36.41) while content of glutelins and residue of nitrogen were relative stabile (100% = % N) (Table 2).

Table 2: Effects of N fertilization on N grain content and in protein fractions (in %)

N kg ha ⁻¹	*N	**N	Al. and glob.	Prolamins	Glutelins	Residue of N
0	1.919	1.60	22.99	32.12	36.27	8.62
50	2.170	1.81	22.08	34.02	35.46	8.44
100	2.520	2.04	21.33	36.17	34.32	8.18
150	2.582	2.21	20.09	36.41	35.15	8.35
LSD _{0.05}		0.11	0.85	1.37	1.63	0.51

* SCPV – VÚRV Piešťany, ** SPU Nitra

Grain N content of cultivars decreased with the year of registration. Cultivars registered in the years 1921 to 1960 had N grain content about 2.7 % while modern cultivars (Solaris) registered after 1976 had only from 1.97 to 2.26 % (date from SPU are about 18 % lower than from VÚRV, but correlation coefficient between them was very high 0.99). N content in protein fraction was changed with N content in total proteins but not proportionally (Table 3). The lower protein content was the relative lower prolamins and glutelins content were and on the contrary albumins and globulins content were increased and unexpectedly also insoluble residue of nitrogen (Table 4).

Table 3: N grain content and protein fractions in % (100 % dry matter) according to cultivars

Cultivar	*N	*Proteins	**N	** Proteins	Al. and glob.	Prolamins	Glutelins	Residue of N
Slov. 777	2.714	15.36	2.27	12.98	0.47	0.78	0.82	0.17
Slov. B	2.700	15.29	2.23	12.72	0.46	0.76	0.83	0.16
Diana	2.760	15.10	2.28	13.02	0.49	0.79	0.82	0.17
Solaris	2.260	13.13	1.89	10.80	0.46	0.74	0.53	0.15
Košútka	1.970	11.04	1.69	9.63	0.33	0.59	0.60	0.15
Viginta	2.220	12.75	1.81	10.36	0.37	0.62	0.65	0.16
Torysa	2.090	11.64	1.74	9.95	0.39	0.63	0.57	0.15
Astella	2.268	13.30	1.91	10.92	0.40	0.68	0.65	0.17
Vanda	1.982	10.87	1.65	9.43	0.36	0.54	0.59	0.15
Axis	1.988	11.56	1.68	9.61	0.36	0.52	0.64	0.15

Table 4: N grain content and its portion in protein fractions in % according to cultivars (100 %= % N)

Cultivar	*N	**N	Al. and glob.	Prolamins	Glutelins	Residue of N
Slov. 777	2.714	2.27	20.86	34.69	36.72	7.74
Slov. B	2.700	2.23	20.85	34.12	37.77	7.26
Diana	2.760	2.28	21.48	34.37	36.67	7.48
Solaris	2.260	1.89	24.42	38.89	28.49	8.20
Košútka	1.970	1.69	19.80	35.22	35.93	9.06
Viginta	2.220	1.81	20.80	34.14	36.21	8.85
Torysa	2.090	1.74	22.67	35.83	32.87	8.63
Astella	2.268	1.91	21.49	35.35	34.29	8.87
Vanda	1.982	1.65	22.18	32.91	35.90	9.01
Axis	1.988	1.68	21.67	31.29	38.14	8.90

Conclusion

Grain weight, protein content and its fractions were modified by N supply. The percentage of proteins and prolamins in the grain were increased with the increase of nitrogen supply and also the quantity of proteins and prolamins per grain were positively affected by N fertilization. The proportion of prolamins and glutelins in grain protein was highly dependent on cultivar. Modern cultivars had lower N grain content, lower prolamins and glutelins content create gluten and are responsible for bread making quality. In opposite modern cultivars had higher content of albumins and globulins than older cultivars.

Literature

- CALDERINI, D. F. – SLAFER, G.A. (1998): Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. In: Field crops research, 57, 1998, 3, pp. 335–347.
- GOODING, M.J. – ELLIS, R. H. – SHEWRY, P.R. – SCHOFIELD, J.D. (2003): Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. In: Journal of Cereal Science 37, 2003, 3, pp. 295-309.
- MICHALÍK, I. (2002): Unifikovaná metóda diskontinuálnej frakcionácie bielkovinového komplexu zrna obilnín. In: Agriculture (Poľnohospodárstvo), 48, 2002, 7, pp. 333–341
- ORTIZ-MONASTERIO, R. – SAYRE, K.D. – RAJARAM, S. – McMAHON, M. (1997): Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four nitrogen rates. Crop Sci, 37, 1997, pp. 898-904.
- STONE, P.J. – SAVIN, R. (1999): Grain quality and its physiological determinants. In: Wheat: A physiological ecological approach to understand yield and its determining process at the crop level of organization. Editors: E.H. Satorre & G.A. Slafer, Food Product Press, New York, USA.
- UŽÍK, M. – ŽOFAJOVÁ, A. (2003): Pokrok v agronomických znakoch pri česko-slovenských odrodách pšenice letnej f. ozimnej povolených v rokoch 1923–1995. In: Acta fytotechnica et zootechnica, 6, 2003, 4, pp. 93-100.
- UŽÍK, M. – ŽOFAJOVÁ, A. (2007): Translocation of dry matter in ten winter wheat cultivars released in the years 1921–2003. In: Cer. Res. Commun., 35, 2007, 4, pp.1583–1592.

PRÍPRAVA BINÁRNEHO VEKTORA OBSAHUJÚCEHO MIESTO-ŠPECIFICKÝ REKOMBINAČNÝ SYSTÉM PRE ZÍSKANIE MARKER-FREE TRANSGÉNNÝCH RASTLÍN.

THE PREPARATION OF PLANT TRANSFORMATION VECTOR CONTAINING SITE-SPECIFIC RECOMBINATION SYSTEM FOR OBTAINING OF THE MARKER-FREE TRANSGENIC PLANTS

Eva VACULKOVÁ – Jana MORAVČÍKOVÁ – Jana LIBANTOVÁ

To excise an antibiotic selectable marker gene from transgenic plants, a new binary vector pEV8 was prepared. In this vector, the plant intron-containing gene coding for Cre site-specific recombinase under the control of a seed-specific cruciferin C (cruC) promoter from Arabidopsis thaliana and neomycinphosphotransferase gene (nptII), as a selectable marker gene under the control of the nopalinesynthetase (nos) promoter, were flanked by two lox sequences as recombination sites in direct orientation. Out of this lox-embedded cassette, in the inverted orientation to the cru/cre^{INT} expression unit, was as a gene of interest introduced the reporter beta-glucuronidase (gus) gene under the control of the light-inducible Lha3St.1 promoter from potato. Before the using of binary vector to plant transformation, the utility of this system had been verified in E. coli by supplying Cre recombinase from another compatible plasmid in the same bacterial cell. The correct excision of the lox-embedded sequence in E.coli was detected by restriction analyses.

Key-words: Cre/lox system, antibiotic marker gene, binary expression vector

Úvod

Búrľivé diskusie týkajúce sa možného nepriaznivého vplyvu voľného toku génov do životného prostredia sprevádzajú zavádzanie geneticky modifikovaných plodín do súčasného poľnohospodárstva. Nebezpečenstvo môže predstavovať neočakávaná invázia transgénnych rastlín do životného prostredia, prípadná možná toxicita alebo alergicitá transgénnych proteínov. Najväčšie obavy z úniku (trans)génov sa týkajú predovšetkým génov rezistencie k antibiotikám. Tieto gény sa používajú pri selekcii transformovaných buniek od netransformovaných počas procesu regenerácie transgéennej rastliny v podmienkach *in vitro*. Prítomnosť týchto génov je po úspešnej selekcii v genóme transgénnych rastlín nežiaduca. Jednou z možností ako riešiť tento problém je odstrániť selekčné markerové gény z genómu transgénnych rastlín po ukončení transformačného a regeneračného procesu. Jedným z možných spôsobov odstránenia selekčných génov je využitie miesto-špecifických rekombinačných systémov, medzi ktoré patrí aj Cre/lox rekombinačný systém. V prípade, že cre rekombinázový gén je pod kontrolou pletivovo-špecifického promotora a selekčný markerový gén je súčasťou tej istej T-DNA oblasti ohraničenej lox sekvenciami orientovanými ako priame opakovania, takýto systém umožňuje účinné odstránenie selekčného génu v presne danom období vývoja rastlín. Jednou z výhod takéhoto systému je odstránenie markerového génu bez akéhokoľvek vonkajšieho stimulu. Ďalšou je fakt, že expresia cre rekombinázového génu je ohraničená na relatívne krátke časové obdobie čo znižuje možnosť negatívneho vplyvu prítomnosti vysokej hladiny Cre proteínu na morfológiu a vývoj rastlín.

Materiály a metódy

Technikami rekombinantnej DNA sme beta-glukuronidázový (*gus*) gén pod kontrolou svetlo-citlivého (*Lhca3St.1*) promotora ligovali do binárneho vektora pUCAP (VAN ENGELEN a kol., 1995), čím sme vytvorili vektorovú konštrukciu pEV5. Cre rekombinázový gén s vnesenou intrónovou sekvenciou (*cre^{INT}*) pod kontrolou semeno-špecifického kruciferínového promotora spolu s jednou loxP sekvenciou sme ligovali do binárneho vektora pUN (VACULKOVÁ et al., 2007), čím sme získali konštrukciu pJL11. Následne sme fragmenty z oboch vektorov ligovali do binárneho vektora pUN tak, aby ich poradie bolo vo vektore pEV6 od pravej k ľavej hranici T-DNA nasledovné:

-GUS gén/Lhca3St.1 + loxP + cru/CRE^{INT} gén-

Výslednú vektorovú konštrukciu pEV8 sme pripravili ligáciou fragmentov z vektora pEV6 a pEV1 (Moravčíková et al. 2008), ktorý obsahoval selekčný neomycínfosfotransferázový (*nptII*) gén pod kontrolou nopalínsyntetázového (*nos*) promotora a jednu loxP sekvenciu, do binárneho vektora pUN. Poradie regulačných sekvencií a génov vo výslednej vektorovej konštrukcii pEV8 bolo od pravej k ľavej hraničnej sekvencii T-DNA nasledovné:

-loxP + NPTII gén/nos + CRE^{INT} gén/cru + loxP + Lha3St.1/GUS gén-

Výsledky a diskusia

Na riadenie expresie cielených génov “genes of interest“ sa v miesto-špecifických rekombinačných systémoch najčastejšie využíva konštitutívny 35S promótor izolovaný z pôvodcu vírusovej žilkovej mozaiky karfiolu (CaMV), ktorý zabezpečuje vysokú hladinu expresie transgénu. Viacerí autori uvádzajú (SUZUKI et al. 2001; ZHENG et al., 2007), že aktivita mnohých pletivovo-špecifických promotórov môže byť ektopicky

ovplyvnená výskytom enhancerov takýchto silných promótorov, ak sa nachádzajú v ich blízkosti. S možnosťou ektopického ovplyvnenia špecifickosti aktivity kruciferínového promótoru v Cre/lox systéme sme sa stretli v našej predchádzajúcej práci (MORAVČÍKOVÁ et al., 2008).

S cieľom objasniť miery vplyvu CAMV35S promótoru na aktivitu kruciferínového promótoru v našej predchádzajúcej práci sme pripravili rastlinnú vektorovú konštrukciu pEV8, v ktorej sme na riadenie expresie génu záujmu (*gus* gén) použili svetlo-citlivý *Lhca3St.1* promótor izolovaný z rastlín zemiaku. Výslednú vektorovú konštrukciu pEV8 sme pripravili klonovaním vo viacerých stupňoch s cieľom vytvorenia vhodných restriktčných miest pre dosiahnutie správnej orientácie všetkých regulačných sekvencií a expresných jednotiek vo vektore pEV8. Restriktčnou analýzou pomocou vhodne volených restriktčných endonukleáz sme overili správnosť integrácie vnesených fragmentov v *E. coli*, ako aj funkčnosť Cre/lox systému v baktériách po transformácii plazmidov pEV8 a pMH303 do *E. coli*. Plazmid pMH303 obsahoval Cre rekombinázu pod kontrolou CAMV 35S promótoru, čím bola zabezpečená aktivita Cre rekombinázy v bunkách baktérií.

Záver

Pripravili sme binárnu vektorovú konštrukciu pEV8 s miesto-špecifickým Cre/lox rekombinačným systémom, v ktorej je gén záujmu pod kontrolou svetlom indukovaného (*Lhca3St.1*) promótoru. Účinnosť zostrihu sekvencie DNA ohraničenej dvoma *loxP* rekombinačnými miestami sme odskúšali aj v baktériách. Následne uskutočníme transformácie rastlín tabaku s cieľom zistiť efektívnosť zostrihu selektívneho markerového génu v semenách rastlín, ako aj možnosť výskytu ektopickej aktivity kruciferínového promótoru a s tým aj mieru vplyvu CAMV 35S promótoru na ektopickú aktivitu *cre* promótoru v predchádzajúcej práci.

Literatúra

- Van ENGELN, F.A. – MOLTHOF, J.W. – CONNER, A.J. – NAP, J.P. – PEREIRA, A. – STIEKEMA, W.J. pBINplus: an improved plant transformation vector based on pBIN 19. *Transg. Res.* 4, 1995, 288-290
- MORAVČÍKOVÁ, J. – VACULKOVÁ, E. – BAUER, M. – LIBANTOVÁ, J. Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision Cre/loxP strategy focused on the generation of marker-free transgenic plants. *Theor Appl. Genet.* (v tlači) DOI 10.1007/s00122-008-0866-4
- SUZUKI, M. – KAO, C.Y. – COCCIOLONE, S. – McCARTY, D.R. Maize VP1 complements Arabidopsis *abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *Plant J.* 28, 2001, 409-418
- VACULKOVÁ, E. – MORAVČÍKOVÁ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – BAUER, M. – LIBANTOVÁ, J. A modified low copy number binary vector pUN for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Biol. Plantarum* 51, 2007, 538-540
- ZHENG, X. – DENG, W. – LUO, K. – DUAN, H. – CHEN, Y. – McAVOY, R. – SONG, S. – PEI, Y. – LI, Y. The cauliflower mosaic virus (CAMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Rep.* 26, 2007, 1195-1203

Táto práca bola vypracovaná v rámci VEGA projektu 2/0011/08.

KVALITATIVNÍ A SEMIKVANTITATIVNÍ DETEKCE GENETICKY MODIFIKOVANÉ KUKUŘICE POMOCÍ PCR REAKCE * QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED MAIZE BY PCR REACTION*

Tomáš VYHNÁNEK – Pavel HANÁČEK – Jan BEDNÁŘ

Genetically modified maize is grown extensively in the world today. Qualitative and semi-quantitative polymerase-chain reaction-based methods to detect genetically modified maize (MON 810 Yield Gard corn) were applied to processed education at Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno (MUF Brno). In this study we reported the optimisation of qualitative and semi-quantitative detection of insect resistant corn variety (MON810) for technical equipment in Department of Plant Biology at MUF Brno.

Key words: qualitative detection, semi-quantitative detection, transgenic maize, MON810

Úvod

S rozvojem pěstování geneticky modifikovaných rostlin (GMR) roste i požadavek (ze zákona) na jejich identifikaci, rozlišení a značení. Detekci transgenu lze provádět pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Kvalitativní detekci GMR, tzn. rozlišení modifikovaných a nemodifikovaných odrůd, lze provést na základě specifické PCR pro oblasti použitého konstruktů (VAUGHN et al., 2005). Aplikaci metodiky u hybridů kukuřice odvozených od MON810 uvádějí HOLCK et al. (2002) a HERNÁNDEZ et al. (2003). Pro přesnou kvantifikaci DNA z GMR ve vzorku osiva nebo v produktu je pak nutné realizovat, přístrojově a materiálově finančně náročnější, real-time PCR (MA et al., 2005; YANG et al., 2005).

Cílem práce byla optimalizace kvalitativní a semikvantitativní detekce Bt-kukuřice (MON810) pomocí PCR pro výukové účely.

Materiál a metody

Pro kvalitativní a semikvantitativní detekci geneticky modifikované kukuřice byly použity dva genotypy kukuřice firmy Monsanto. Jednalo se o modifikovaný hybrid na bázi MON810 a nemodifikovanou kontrolu (izogenní linie ke GM kukuřici). Získané osivo bylo předmětem „MTA“ mezi Monsanto Europe s.a. a MZLU v Brně ze dne 26.5.2008. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu DNAeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen) z napěstovaných rostlin ve fázi jednoho listu (10 dní staré rostliny). Napěstování a izolace genomové DNA probíhala v prostorách určených pro práci s GMO. Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna spektrofotometricky. Pro analýzy bylo použito primery popsané GREINEREM et al. (2005). Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahuje: 30 ng templátové DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5 µM každého primeru a 0,1 mM každého dNTP. Teplotní a časový profil reakce byl: 1 cyklus 95°C – 600 s; 40x (95°C – 30 s, 64°C – 30 s, 72°C – 30 s); 72°C – 420 s. V případě semikvantitativního stanovení byl odebrán vzorek amplifikačního produktu po 26., 28., 30., 32., 34. a 40. cyklu. Pro vizualizaci produktů byla využita elektroforéza na 1,5% agarozovém gelu (barvení ethidiumbromidem). Výsledné elektroforetogramy byly digitalizovány pomocí CCD kamery a PC.

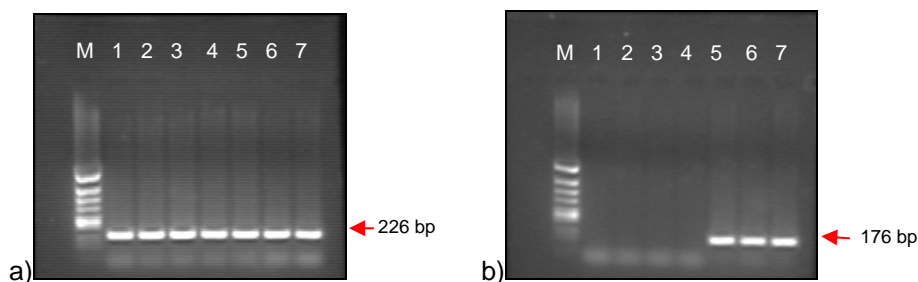
Výsledky a diskuse

Prvním krokem pro zavedení PCR-metod detekce GM kukuřice byla optimalizace protokolu pro detekci kukuřičného genomu a detekci specifické oblasti geneticky modifikované kukuřice MON810. Různí autoři popsalí mnoho primerových kombinací, které mohou sloužit k tomuto účelu. My jsme vybrali pro detekci genomu kukuřice primery IVR1-F a IVR1-R (*invertase gene*), které verifikují přítomnost kukuřičného genomu produktem o velikosti 226 bp (obr. 1a). Pro kvalitativní detekci kukuřice MON810 byla vybrána sekvence CaMV promotoru (primery VW01 a VW03), kdy přítomnost verifikuje produkt o velikost 178 bp (obr. 1b).

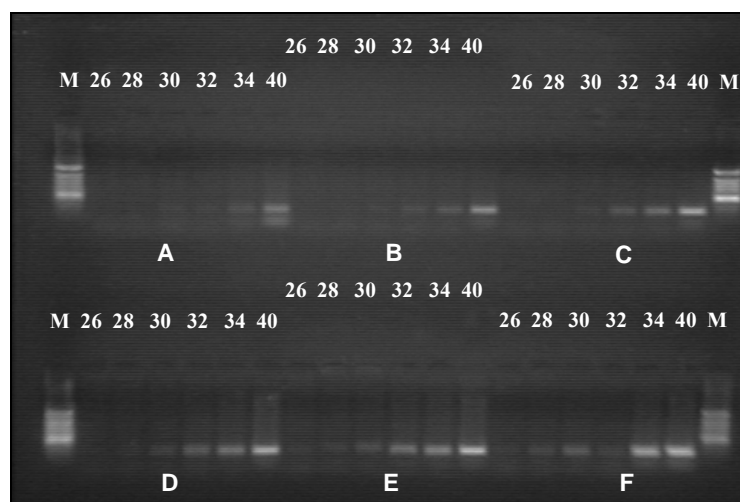
V další části naší práce jsme přistoupili k optimalizaci semikvantitativní detekce Bt-kukuřice. Byla vytvořena řada směsných vzorků s různým podílem genomu geneticky modifikované kukuřice v analyzovaném vzorku. Jako detekční limit se nám jevila podle našich výsledků hranice 1%. Stejný detekční limit při použití shodných primerů uvádějí Greiner et al. (2005). Následně byl optimalizován odběr vzorků pro semikvantitativní detekci Bt-kukuřice ve vzorku. Na základě dosažených výsledků můžeme doporučit odběr amplifikačního produktu mezi 26. až 34. cyklem (obr. 2).

Závěr

V práci jsou prezentovány výsledky optimalizace kvalitativní a semikvantitativní detekce Bt-kukuřice (MON 810). Optimalizované protokoly umožní využití postupů v praktické výuce genetických předmětů na Ústavu biologie rostlin AF MZLU v Brně a jsou přípravným krokem pro zavedení praktických úloh pro kvantifikaci geneticky modifikovaných organismů pomocí real-time PCR.



Obrázek 1: (a) specifická detekce kukuřičného genomu, (b) specifická detekce GM kukuřice
M – velikostní marker; 1 až 4 – izogenní linie kukuřice; 5 až 7 – GM kukuřice



Obrázek 2: Elektroforetogram vzorků s rozdílným procentickým zastoupením GM kukuřice ve vzorku po 26., 28., 30., 32, 34. a 40. cyklu
A – 1%; B – 5%; C – 10%; D – 25%; E – 50%, F – 100% obsah GM kukuřice ve vzorku

Literatura

- Greiner, R., Konietzny, U., Villavicencio, A.L.C.H. (2005) Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16: 753-759.
- Hernández, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P., Farrado, A. (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res.*, 12: 179-189.
- Holck, A., Va, M., Didierjaen, L., Rudi, K. (2002) 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *Eur. Food Res. Technol.*, 214: 449-453.
- Ma, B.L., Subedi, K., Evenson, L., Stewart, G. (2005) Evaluation of detection methods for genetically modified traits in genotypes resistant to European corn borer and herbicides. *J. Environ. Sci. and Health*, 40: 663-644.
- Yang, L., Xu, S., Pan, A., Yin Ch., Zhang, K., Wang, Z., Zhou, Z., Zhang, C. (2005) Event Specific Qualitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Genetically Modified MON863 Maize Based on the 5'-Transgene Integration Sequence. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9312-9318.
- Vaughn, T., Cavato, T., Brar, G., Coombe, T., Degoooy, T., Ford, D.S., Groth, M., Howe, A., Johnson, S., Kolacz, K., Pilcher, C., Purcell, J., Romano, C., English, I., Pershing, A.J. (2005) Method of controlling corn rootworm feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize. *Crop Sci.*, 45: 931-938.

*Práce vznikla za finanční podpory rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1686/F4a/2008.

PESTOVANIE OLEJNÍN – VÝHODY A NEVÝHODY BREEDING OF OIL SEED CROPS – THE ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

Zuzana ŽÁČKOVÁ

*Breeding of flax or linseed (*Linum usitatissimum* L.) started around 5,000 years ago. The ancient Egyptians used the inside of flax stem to make linen cloth. Linseed has also been pressed to make oils for industrial use. Whole seeds have been used to feed the animals and also to be consumed by people all over the world. Flax is one of those plants that has many uses: as a flower, for health and medicinal use, a grain crop, making fabrics, and in home gardens as "True Blue" flowers. Linseed is the nature's richest source of omega-3 fatty acid.*

Rapeseed is grown sparingly for young leaves used as potherb; more generally grown as forage for livestock feed, and as a source of rapeseed oil. Rapeseed oil has potential market in detergent lubrication oils, emulsifying agents, polyamide fibers, and resins, and as a vegetable wax substitute. The most common use for the oil is still in the production of erucic acid, a fatty acid used in turn in the manufacture of other chemicals. Sprouts are used dietetically and as seasoning.

Key words: flax, rapeseed, oil

Ľan siaty (*Linum usitatissimum* L.)

Pestovať ľan je relatívne nenáročné, ale kultivary sú často náchylné na hubovité ochorenia, špecifické snete a hrdze. Ak pozorujeme zmeny na materiáli, je potrebné použiť určitý fungicíd, alebo obmedziť polievanie, príp. zabezpečiť cirkuláciu vzduchu medzi hriadkami. Zdravé semená ľanu sa vysievajú do riadkov vzdialených 30-40cm, nakoľko byle sú značne vysoké. Epigeické klíčenie semien, je možné pozorovať v priebehu 3-7 dní v závislosti od environmentálnych faktorov. Vegetačné obdobie ľanu siateho trvá od mája, a končí v druhej polovici júna a na začiatku júla. Posledný mesiac, keď sa zakladajú kvetné púčiky, tzv. butonizácia, veľmi závisí na dĺžke dňa (termonastie). Kvet ľanu je rozlíšený na kalich a korunu bledo modrej až tmavo modrej farby, príp. bielej. V obojpohlavnom kvete je časté samoopelenie, čím sa podstatne znižuje variabilita v nasledujúcej generácii. Cudzoopelenie hmyzom je tiež možné, ale jeho frekvencia je nízka. Plodmi sú tobolky, v ktorých dozrievajú semená najčastejšie hnedej farby (niektoré odrody majú žlté semená). V jednej tobolke dozrieva 6-10 semien. Semená sú hladké, oválne so zašpicatým koncom veľkosti okolo 2,5 x 5,0 x 1,5mm (MILLAM et al., 2005). Dozrievanie semien a embryogenéza *in vivo* sú ovplyvnené viacerými vonkajšími faktormi. Nasleduje desikácia a dormancia semien.

Zygotická embryogenéza ľanu *in vitro* bola popísaná v niekoľkých prácach (PREŤOVÁ et al., 2000). Ľan je možné využiť pre štúdium priamej i nepriamej embryogenézy (PREŤOVÁ a OBERT, 2003).

Repka olejná (*Brassica napus* var. *napus* L.)

V našich podmienkach sa repka vysieva ako ozimná forma (*bienis*) do úrodných pôd. Pestovanie nie je náročné, podmienkou je dostatok fosforu a draslíka v pôde. Najvhodnejšie sú oblasti s teplými a slnečnými dňami a chladnými nocami. Semená sú dosť malé a vysievajú sa do riadkov vzdialených asi 30-40cm, často spolu s granulárnym hnojivom. Dôležitá v čase klíčenia repky je vonkajšia teplota a príjemné nočné mrazy (-2 °C) jej vyhovujú. Vegetačné obdobie začína v apríli, alebo na začiatku mája, najneskôr v ojedinelých prípadoch na začiatku júna. Repka olejná sa často vysieva po vegetácii ľanu, kukurici, zemiakoch, ale nikdy nie po slnečnici, opäť po repke olejnej alebo horčici bielej. Pravdepodobne to súvisí s obsahom živín v pôde. Úroda semien sa zberá v čase, keď sú semená zrelé, žltej farby. Repka olejná je zväčša samoopelivá (70%), ale v dôsledku toho, že je medonosná rastlina, je často opeľovaná včelami a cudzoopelivosť je potom relatívne častá (až 30%). Porast rastlín je náchylný na celé spektrum hubovitých a vírusových ochorení, ako aj pre cicavý a žravý hmyz.

Výhodou pestovania je, že repka pozitívne ovplyvňuje život v pôde, vodný režim, v zime tiež zabraňuje vyplavovaniu nitrátov. Čiastočne na rizikových pôdach má aj protierózne vlastnosti a do určitej miery pomáha zvyšovať obsah humusu v pôde.

Záver

Pestovanie oboch olejníň nie je náročné, ale z dôvodu klimatických zmien je ľan siaty nahrádzaný inými olejninami ako napr. repkou olejnou, ktorá je vhodná pre pestovanie na celom Slovensku od južných obalstí až po severné. Avšak jej pestovanie tiež znamená nadmerné zvyšovanie dusičňanov v pôdach.

Literatúra

- MILLAM, S. – OBERT, B. – PREŤOVÁ, A.: Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* L. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, vol. 82, p. 93-103
- PREŤOVÁ, A. – HAJDÚCH, M. – OBERT, B.: Some characteristics of flax embryo development in situ and in vitro. In: Acta Biologica Cracoviensia, 2000, vol. 42, n. 2, p. 45-53
- PREŤOVÁ, A. – OBERT, B.: Flax (*Linum usitatissimum* L.) – a plant system for study of embryogenesis. In: Acta Biologica Cracoviensia, 2003, vol. 45, n. 1, p. 15-18

EFFECT OF COLD HARDENING AND *MICRODOCHIUM NIVALE* (FR., SAMUELS & HALLETT) INFECTION ON GLUCANASE ACTIVITY IN WINTER TRITICALE (*X TRITICOSECALE* WITTM.)

EFEKT OPRACOVANIA CHLADOM A INFEKCIE *MICRODOCHIUM NIVALE* (FR., SAMUELS & HALLETT) NA GLUKANÁZOVÚ AKTIVITU ZIMNEJ ODRODY TRITICALE (*X TRITICOSECALE* WITTM.)

Iwona ŻUR – Ewa DUBAS – Jana MORAVČÍKOVÁ – Gabriela GOLEBIEWSKA – Eva VACULKOVÁ – Ján SALAJ

Microdochium nivale is the most widespread snow mould fungus in Europe. Previous studies indicated that resistance of plants to *M. nivale* is coupled to proper period of cold acclimation probably by producing special proteins. Many of them are grouped as a Pathogenesis Related Proteins (PR proteins). Plant glucanases (PR 2 group) catalyze the hydrolysis of the polysaccharide β -1,3-glucan that represent major components of many fungal cell walls. Therefore it has been suggested that they can be involved in protecting plants against fungal pathogen. To investigate a possible role of glucanases in defence response against *M. nivale*, one susceptible and one resistant cultivar of winter triticale, were subjected to glucanase activity assays toward laminarin as a substrate.

Keywords: β -1,3-glucanase defence response, PR proteins, *Microdochium nivale*, snow mould

Introduction

Pink snow mould (*Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallett) is one of the most serious diseases of winter cereals and forage grasses in moderate and cold climatic areas. The resistance level to this fungus is genetically controlled and in many economically important crop cultivars is not satisfactory what cause serious decrease in yield quantity and quality. The plant-pathogen interactions are not fully understood but it was shown that maximal snow mould resistance develops only in cold-hardened plants. It has been detected that the hardening process is associated with accumulation of carbohydrate, particularly fructans (YOSHIDA et al. 1998). Moreover, plants synthesize an array of pathogenesis-related (PR) proteins in response to both biotic and abiotic stresses including β -1,3-glucanases, chitinases or peroxidases (YUN et al. 1997). The glucanases (PR-2 group) catalyze the hydrolysis of the polysaccharide β -1,3-glucan that represent major components of many fungal cell walls. Therefore it has been suggested that these enzymes may be involved in protecting of plants against fungal pathogens (BEERHUES and KOMBRINK, 1994). It was also proposed that β -1,3-glucanases might have a function of antifreeze proteins (HON et al. 1994).

In order to investigate the role of β -1,3 glucanases in defence response against fungal pathogen *M. nivale*, two winter cultivars (Hewo and Magnat) of triticale were subjected to glucanase activity assay.

Material and Methods

Two winter triticale (*x Triticosecale* Wittm., $2n = 6x = 42$) cultivars differed in resistance to *M. nivale* were under the study: susceptible cv. Magnat and relatively resistant cv. Hewo. The experiments were carried out according to the 'cold chamber' method (CORMACK and LEBEAU, 1959 modified by PRONCZUK, 1987). The plants were subjected to a prehardening (12°C/ 12°C, 8h/16h light, 14 days) and hardening (4°C/ 4°C, 8h/ 16 h light, 28 days). Control, non-hardened plants were grown at 16°C/ 12°C, 8h/ 16h light for 21 days until acquiring the same developmental stage as cold-hardened plants before inoculation. Inoculum of high virulence monospore isolate of *Microdochium nivale* No. 38z/5a/01 was produced via modified PRONCZUK and PRONCZUK (1987) method.

For glucanase activity assay, the crude proteins were isolated from non-infected and infected (5 and 7 days after inoculation) plants using an extraction buffer containing 0.1 mol/l sodium acetate pH 5.0 and 0.02% β -mercaptoethanol. Protein concentration was determined according to BRADFORD (1976). The glucanase activity was analysed by the dinitrosalicylic acid (DNS) method (MILLER, 1959) with slight modifications. Each reaction consisting of 100 μ l of crude protein extract and 100 μ l of 2% laminarin (Sigma) as a substrate was incubated at 37°C for 1 hour. The reaction was terminated by addition of 900 μ l of DNS reagent and boiling for 5 min. Following cooling to room temperature, the contents were diluted 1:20 and the absorbance was measured at 500 nm. The glucanase activity was calculated as nanomoles of liberated reducing sugar per hour per milligram of soluble protein.

Results and discussion

Different pathogenesis related proteins have been observed to play role in defence response against *Microdochium nivale* infection in winter cereals. This includes: chitinase, endochitinase, β -1,3 glucanase in

winter rye (HIILOVAARA-TEIJO et al., 1999); chitinase, endochitinase, β -1,3 glucanase, PR1-a protein and peroxidase in winter wheat (ERGON et al., 1997) and winter wheat thaumatin - like proteins (KUWABARA et al., 2002). To test the contribution of β -1,3 glucanases to fungal resistance against *M. nivale*, crude proteins isolated from two infected cultivars Magnat and Hewo (sensitive and resistant, respectively) were subjected to glucanase activity assays. Non-infected plants were used as a control.

Our preliminary results indicated the increase of glucanase activities under the low temperature treatment during 28-day hardening for both cultivars (Magnat and Hewo). The possible involvement of the hardening in acquiring the resistance to snow mould will be discussed.

However, inoculation with *M. nivale* did not influence glucanase activity in leaves of susceptible cultivar 'Magnat' and even decreased it in relatively resistant cultivar 'Hewo'. No significant differences between sensitive and resistant cultivar have been observed. Glucanase activity in seedling crowns was also not influenced by the pathogen infection, however significantly higher enzyme activity was detected in relatively resistant cultivar 'Hewo'.

Table 1: Results of glucanase activity assays.

Plant material		Glucanase activity [nmol/h/mg] \pm Sd			
		non-infected		infected	
		5 days	7 days	5 days	7 days
Magnat	leaves	18,9 \pm 3,1 ab	27,1 \pm 2,7 abc	16,9 \pm 2,7 a	26,8 \pm 1,5 abc
Hewo	leaves	29,7 \pm 4,7 bc	36,9 \pm 3,2 c	16,9 \pm 2,7 a	22,4 \pm 4,8 ab
Magnat	crown	14,4 \pm 3,5 a	17,5 \pm 5,4 a	17,4 \pm 2,0 a	11,1 \pm 3,8 a
Hewo	crown	30,3 \pm 3,5 b	22, \pm 4,8 ab	20,8 \pm 1,7 ab	16,3 \pm 5,0 a

Literature

- BEERHUES, L. - KOMBRINK, E. (1994) Plant Mol. Biol. 24, 353-367
 BRADFORD, M.M. (1976) Anal. Biochem 72:248-54
 CORMACK, M.W. – LEBEAU, J.B (1959) Bot. 37:685-693
 HIILOVAARA-TEIJO, M. – HANNUKKALA, A. – GRIFFITH, M. – TU, X-M. – PIHAKASKI-MAUNSBACH, K. (1999) Plant Physiol. 121: 665-673
 HON, W.C. – GRIFFITH, M. - CHONG, P. - YANG, D.S.C. (1994) Plant Physiol. 109:879-889
 KUWABARA, C. – TAKEZAWA, D. – SHIMADA, T. – HAMADA, T. – FUJIKAWA, S. – ARAKAWA K. (2002) Physiol. Plantarum 115:101-110
 MILLER, G.L. (1959). Anal. Chem. 31: 426
 PROŃCZUK M. - PROŃCZUK, K. (1987). Mat. XXVII Sesji Nauk. IOR Poznań IOR: 95-99
 YOSHIDA, M. - ABE, J. - MORIYAMA, M - KUWABARA, T. (1998) Physiol. Plantarum 103:8-16
 YUN, D.J. - BRESSAN, R.A. - HASEGAWA, P.M. (1997). Plant Breeding reviews 14:39-88

Acknowledgment

The research was supported by the IPP PAS - IPGB SAS bilateral project no. 27: "Studies of selected physiological and molecular parameters involved in plant resistance to fungal pathogens" and Slovak Grant Agency VEGA (No. 2/0011/08).

Zborník: 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

Vydavateľ: SCPV - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

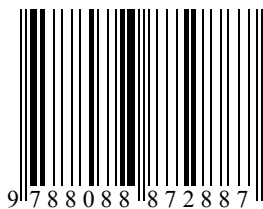
Typografia: Jarmila Poništová

Náklad: 90

Rok vydania: 2008

Rukopisy neprešli odbornou ani jazykovou úpravou.
Za odborný obsah zodpovedajú autori.

ISBN 978-80-88872-88-7



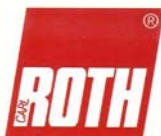
Spotrebný materiál – prístroje - chemikálie

DELTALAB

- *komplet plastový spotrebný materiál do laboratória - mikroskúmavky pre PCR, 96 platne pre amplifikáciu, fólie na platne, stojany a krabičky na mikroskúmavky, kryoskúmavky, stojany a krabičky na kryoskúmavky, centrifugačné skúmavky, stojany na centrifugačné skúmavky, stojany a krabičky pre PCR skúmavky, špičky, špičky s filtrom serologické pipety, stričky, transferové pipety, mikroplatne, Petriho misky, fľašky, zásobné nádoby, sáčky do autoklávov, nádoby na laboratórny odpad, mikropipety, prenosné nízko teplotné boxy na mikroskúmavky, prenosné zmrazovače buniek, dávkovače atd.*



- *plastový materiál pre bunkové kultúry aj so špeciálnym povrchom, kultivačné fľašky, kultivačné platne, kultivačné misky, kultivačné mikroplatne, stripy, serologické pipety, kultivačné skúmavky, kultivačné fľašky na podložkách, centrifugačné skúmavky, mikroplatne - ELISA, atd.*



- *prístroje - vortexy, trepačky, miešadlá, horuce platne, stolové centrifúgy ...*
- *filtre a filtračná technika - membránové filtre pre mikrobiálnu analýzu, filtre na striekačky, filtre na fľašky, filtračná technika atd.*
- *biochemikálie - agaróza – rozne druhy na rozne aplikácie, akrylamid, biologické pufre, ELFO markery, farbičky na gél, blotovacie membrány, membrány pre dialýzu, dialyzačné jednotky, kity pre DNA/RNA izolácie, veci pre DNA/RNA analýzu, veci pre izoláciu proteínov a kvantifikáciu proteínov, Western Blot, aminokyseliny, antibiotiká, enzýmy a ich substráty a inhibitory, médiá, farbičky a indikátory, rozpúšťadlá, vitamíny, agar, živné pody atd.*

podrobnejšia ponuka na
www.oasis-lab.sk

