

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

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

Zborník z 15. vedeckej konferencie  
12.–13. november 2008

## Názov: **Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín.**

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

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

### **Autorský kolektív:**

Balážová Želmíra 79, 172	Karlová Kateřina 121	Preťová Anna 40
Bartáčková Veronika 119	Klčová Lenka 104, 124	Psota Vratislav 157
Bartoš Jan 8, 48	Klemš Marek 126, 135, 167	Pšenáková Ivana 159
Bauerová-Hlinková Vladena 108	Kocourková Zuzana 128	Raddová Jana 115
Bednář Jan 188	Kopecský David 48	Rohrer Michal 162
Benková Michaela 81, 104	Kováč Ladislav 130	Rückschloss Lubomír 146
Beňová Zuzana 28	Kovár Marek 132	Ryzí Markéta 137
Bežo Milan 63	Kraic Ján 23	Sachambula Lenka 157
Bobák Milan 108	Kráľová Katarína 19	Salaj Ján 191
Bojnanská Katarína 83, 85	Križanová Klára 104	Sedláček Tibor 67, 128, 164
Bradáčová Anna 125	Krofta Karel 16, 153	Sedlák Petr 32
Brestič Marián 19, 76, 87,	Krška Boris 115	Sedláková Vladimíra 32
Bucher Petr 119	Kubaláková Marie 8	Skálová Dagmar 149, 165
Cieslarová Jaroslava 162	Kučerová Anna 135	Solnická Pavla 126, 167
Černý Ivan 132	Kuna Roman 155	Stavěliková Helena 162
Čílová Daniela 52	Libantová Jana 186	Stemberková Lenka 164
Dančák Martin 170	Lichvárová Mária 146	Surovčík Jozef 19, 76
Doležel Jaroslav 8, 48	Luhová 137	Svitáčková Běla 135
Draguň Marián 44	Malovcová Lubica 19	Šafář Jan 8
Drobná Jarmila 90	Marková Magdaléna 149	Šarhanová Petra 170
Dubas Ewa 191	Martincová Jana 139	Šimková Hana 8
Dunca Juraj 73, 93	Martinek Petr 119, 172	Šramková Zuzana 23, 59
Dušek Karel 95, 121	Masár Štefan 40, 85, 142	Štěpán Zdeněk 126
Dušková Elena 95	Masarovičová Elena 19, 76	Šturdík Ernest 59
Edita Gregová 23	Matušíková Ildikó 155	Trávníček Bohumil 170
Faragó Juraj 28, 97, 99, 159	Medvecká Eva 23	Trebichalský Andrej 171
Faragová Natália 28, 97, 99	Michalík Ivan 184	Uher Jiří 175, 177
Fišerová Helena 126, 135	Mikulíková Daniela 12	Urmínská Dana 183
Galliková Andrea 63	Mistrík Igor 71	Užik Martin 12, 181, 183
Gálová Zdenka 79, 102	Moravčíková Jana 186, 191	Vaculková Eva 185, 190
Gašpárková Lubomíra 159	Múdry Pavol 44, 144	Vachůn Miroslav 115
Gogoláková Anna 155	Muchová Darina 146, 182	Valková Danka 108
Golebiowska 191	Murín Richard 28	Vašek Jakub 52
Gregová Edita 59	Navrátilová Božena 137, 149	Vašut Radim J. 170
Griga Miroslav 167	Nesvadba Vladimír 16, 52, 151, 153	Vejl Pavel 32, 52
Gubiš Jozef 104	Nesvadba Zdeněk 112	Vitková Helena 126
Hajšlová Jana 119	Ohnoutková Ludmila 25	Vivodík Martin 79
Hanáček Pavel 162, 188	Olšovská Katarína 19	Vyhnánek Tomáš 162, 188
Hanusová Martina 164	Ondrejčák František 146	Zifčáková Daša 144
Havrlentová Michaela 106	Palenčárová Eva 102	Zoufalá Jana 52
Heldák Ján 63	Paľove-Balang Peter 71	Žáčková Zuzana 40, 190
Henychová Alena 151, 153	Patzak Josef 153	Žáková Mária 81
Hlinková Andrea 106	Pavlovkin Ján 71	Živčák Marek 87
Hlinková Elena 108	Petřivalský Marek 137	Žofajová Alžbeta 12, 182, 184
Horáčková Simona 112	Pidra Miroslav 115	Žur Iwona 191
Hudcovicová Martina 104	Piršelová Beáta 155	
Hunková Elena 76	Pivková Jana 87	
Chroboková Eva 115	Pížová Klára 25	
Ježek Josef 151	Polák Ondřej 157	
Jirsa Ondřej 119	Polišenská Ivana 112	
Jomová Klaudia 23	Polončíková Zdenka 16, 151	

© SCPV - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 978-80-88872-88-7

# Obsah

## Prednášky

Šafář, J.; Šimková, H.; Kubaláková, M.; Bartoš, J.; Doležel, J.: Genomika pšenice: Výzva pro 21. století.	8
Žofajová, A.; Užík, M.; Mikulíková, D.: Geneticko-šlechtitelské aspekty predzberového porastania pšenice.	12
Nesvadba, V.; Krofta, K.; Polončíková, Z.: Šlechtění chmele ( <i>Humulus lupulus</i> L.) na vysoký obsah desmethylxanthohumolu.	16
Masarovičová, E.; Králová, K.; Malovcová, L.; Surovčík, J.; Brestič, M.; Olšovská, K.: Genotypové rozdiely repky olejky z hľadiska obsahu oleja, kvality oleja a produkcie semien.	19
Medvecká, E.; Jomová, K.; Kraic, J.; Šramková, Z.; Gregová, E.: Technologická kvalita vybratých genotypov tvrdej pšenice	23
Pížová, K.; Ohnoutková, L.: Metabolické inženýrství rostlin: vitamíny, minerální látky.	25
Faragó, J.; Beňová, Z.; Faragová, N.; Murín, R.: Efektívna regenerácia rastlín pšenice letnej ( <i>Triticum aestivum</i> L.) v <i>in vitro</i> kultúre zrejých semien.	28
Sedláková, V.; Sedlák, P.; Vejl, P.: Možnosti využítí polymorfismů genomické, CP a MT DANA pro detekci somatických hybridů bramboru.	32
Žáčková, Z.; Masár, Š.; Preťová, A.: Somaklonálna variabilita kalusov a regenerácia rastlín pochádzajúcich z kultúry izolovaných semenníkov pri ľane.	40
Múdry, P.; Draguň, M.: Effékt iónov kadmia na polymorfizmus enzýmuv klíčencov kukurice siatej ( <i>Zea mays</i> L.).	44
Kopecký, D.; Bartoš, J.; Doležel, J.: Mapování genomů v rámci komplexu <i>Festuca-Lolium</i> .	48
Vašek, J.; Vejl, P.; Nesvadba, V.; Čílová, D.; Zoufalá, J.: Variabilita mikrosatelitních markerů u populace planých forem chmele.	52
Šrámková, Z.; Gregová, E.; Šturdík, E.: Vplyv krajiny pôvodu na diverzitu HMW-glutenínových podjednotiek a gliadínov v odrodách <i>Triticum aestivum</i> L.	59
Heldák, J.; Bežo, M.; Galliková, A.: Dedičnosť rezistencie proti plesni zemiakovej v tetraploidných populáciách ľuľka zemiakového ( <i>Solanum tuberosum</i> L.).	63
Sedláček, T.: Vývoj CAPS markeru rozlišujúceho alely <i>RYM4/RYM5</i> pro šlechtění ozimného ječmene na rezistenci BAYMV	67
Paľove-Balang, P.; Mistrík, I.; Pavlovkin, J.: Vplyv nízkého pH a hliníka na latinskoamerické kultivary ľadenca rožkatého ( <i>Lotus corniculatus</i> ).	71
Dunca, J.: Mechanické vlastnosti obilnín.	73
Hunková, E.; Brestič, M.; Masarovičová, E.; Surovčík, J.; Ferencová, J.: Využitie rastovej analýzy pre hodnotenie genotypových rozdielov kapusty repkovej pravej ( <i>Brassica napus</i> subsp. <i>NAPUS</i> ).	76
<b>Postery</b>	
Balážová, Ž.; Gálová, Z.; Vivodík, M.: Mikrosatelitný polymorfizmus genotypov jačmeňa.	79
Benková, M.; Žáková, M.: Variabilita agro-morfologických znakov a vlastností starších a novších genotypov jarného jačmeňa.	81
Bojnanská, K.: Úroveň odolnosti novošľachtených kmeňov pšenice letnej voči múčnatke trávovej.	83
Bojnanská, K.; Masár, Š.: Odhad napadnutia slovenských registrovaných odrôd pšenice múčnatkou trávovou a hrdzou pšenicovou v rokoch 2005-2008.	85
Brestič, M.; Pivková, J.; Živčák, M.: Genotypové rozdiely citlivosti fotosyntetického aparátu na prostredie.	87
Drobná, J.: Variabilita morfologických a biologických znakov odrôd a divorastúcich populácií ďateliny lúčnej ( <i>Trifolium pratense</i> L.).	90
Dunca, J.: Mechanické vlastnosti jablk.	93
Dušek, K.; Dušková, E.; Karlová, K.: Šlechtění léčivých a aromatických rostlin v České republice.	95

Faragó, J.; Faragová, N.: Tvorba vysoko regenerabilných genotypov jačmeňa siateho rekurentnou selekciou línií odvodených z jedného semena.	97
Fagová, N.; Faragó, J.: Porovnanie početnosti aeróbných baktérií v rizosfére dvoch typov geneticky modifikovaných rastlín lucerny siatej.	99
Gálová, Z.; Palenčárová, E.; Balážová, Ž.: Nutričná kvalita kolekcie genotypov láskavca.	102
Gubiš, J.; Hudcovicová, M.; Klčová, L.; Benková, M.; Križanová, K.: Ramuláriová škvrnitosť listov jačmeňa: Nová choroba na Slovensku.	104
Hlinková, A.; Havrentová, M.: Ovos siaty – plodina 3. tisícročia so širokými možnosťami využitia.	106
Hlinková, E.; BauEROVÁ-Hlinková, V.; Bobák, M.; Valková, D.: Niektoré molekulárne a biochemické vlastnosti PR-4 proteínu syntetizovaného pri interakciách hostiteľ-patogén s rôznym genetickým pozadím.	108
Horáčková, S.; Nesvadba, Z.; Polišenská, I.: Hodnocení výskytu virových zakrslostí obilnin u vybraných odrůd ječmene, pšenice a tritikale.	112
Chroboková, E.; Raddová, J.; Vachůn, M.; Krška, B.; Pidra, M.: Identifikace kultivarů meruněk pomocí mikrosatelitních primerů.	115
Jirsa, O.; Bartáčková, V.; Hajšlová, J.; Bucher, P.; Martinek, P.: Vliv genotypu na obsah akrylamidu v pražených cereáliích	119
Karlová, K.; Dušek, K.: Šlechtění salátu v České republice.	121
Klčová, L.: Molekulárna detekcia puroindolínových génov pšenice.	124
Klemš, M.; Štěpán, Z.; Bradáčová, A.; Solnická, P.; Vítková, H.; Fišerová, H.: Interakce kyseliny abscisové a etylénu v procesu tvorby hlíz lilku bramboru ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) <i>in vitro</i> .	126
Kocourková, Z.; Sedláček, T.: Porovnání reologických metod pro hodnocení kvality těsta pšenice.	128
Kováč, L.: Vhodnosť odrůd d'atelinovín do suchých podmienok východoslovenskej nížiny.	130
Kovár, M.; Černý, I.: Zvyšujú nitrofenoláty toleranciu rastlín čakanky na sucho?.	132
Kučerová, A.; Svitáček, B.; Fišerová, H.; Klemš, M.: Možnosti překonání dormance nažek růží.	135
Luhová, L.; Ryzí, M.; Petřivalský, M.; Navrátilová, B.: Úloha oxidu dusnatého v obranné reakci okurky seté vyvolané přítomností kadmia.	137
Martincová, J.: Hodnotenie suchovzdorných ekotypov tráv a d'atelinovín z hľadiska úrody sušiny a morfológických a kvalitatívnych parametrov.	139
Masár, Š.: Úrodnost' klasu pšenice po inokulácii <i>Stagonospora nodorum</i> .	142
Múdry, P.; Zifčáková, D.: Vplyv iónov kadmia na polymorfizmus enzýmov štyroch kultivarov rumančeka kamilkového [ <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert].	144
Muchová, D.; Ondrejčák, F.; Lichvárová, M.; Rückschloss, E.: Vplyv odrody a environmentálnych podmienok na výskyt chorôb a produktivitu pšenice letnej f. ozimnej.	146
Navrátilová, B.; Skálová, D.; Marková, M.: Izolace protoplastů z mikrospor u rodů <i>Brassica</i> a <i>Cucumis</i> .	149
Nesvadba, V.; Ježek, J.; Polončíková, Z.; Henychová, A.: Variabilita výnosu chmele ( <i>Humulus lupulus</i> L.) u vysokoobsažných genotypů.	151
Nesvadba, V.; Patzak, J.; Krofta, K.; Henychová, A.: Variabilita planých chmelů ( <i>Humulus lupulus</i> L.).	153
Piršelová, B.; Kuna, R.; Gogoláková, A.; Matušíková, I.: Biochemické aspekty účinkov olov a kadmia na korene sóje fazuľovej.	155
Psota, V.; Sachambula, L.; Polák, O.: Vliv posklizňového dozrávání na kvalitu klíčení odrůd sladovnického ječmene.	157
Pšenáková, I.; Faragó, J.; Gašpárková, E.: Dynamika rastu kalusovej kultúry chmeľu obyčajného ( <i>Humulus lupulus</i> L.) <i>in vitro</i> .	159
Rohrer, M.; Cieslarová, J.; Hanáček, P.; Vyhnánek, T.; Stavěliková, H.: Variabilita mikrosatelitních markerů u genových zdrojů papriky ( <i>Capsicum</i> L.)	162
Sedláček, T.; Stemberková, L.; Hanusová, M.: Vyhledávání donorů rezistence jarního ječmene ke rzi ječné a padlí travnímu	164

Skálová, D.: Využití polyplodizace u rodu <i>Cucumis</i> v <i>in vitro</i> opylování.	165
Solnická, P.; Klemš, M.; Griga, M.: Kyselina abscisová a zásobní proteiny v zygotické embtyogenezi hrachu setého ( <i>Pisum sativum</i> L.).	167
Šarhanová, P.; Dančák, M.; Trávníček, B.; Vašut, R.J.: Rod <i>Rubus</i> – Nový pohled na studium apomixie	170
Trebichalský, A.; Martinek, P.; Balážová, Ž.: Využití DNA markerov v šľachtení tritikale na zlepšenú pekársku kvalitu.	172
Uher, J.: Introdukce a šlechtění rodu <i>Sanvitalia</i> Lam. 1. Genové zdroje a současné sortimenty.	176
Uher, J.: Introdukce a šlechtění rodu <i>Sanvitalia</i> Lam. 2. Introdukce, sortiment a taxonomický statut „ <i>Sanvitalia speciosa</i> “	178
Užík, M.; Žofajová, A.; Muchová, D.: Využitie diskriminačnej analýzy na určenie <i>Rht</i> genotypu podľa fenotypových charakteristik.	182
Užík, M.; Michalík, I.; Urminská, D.; Žofajová, A.: Frakčné zloženie bielkovín pri odrodách ozimnej pšenice registrovaných v rokoch 1921-2003.	184
Vaculková, E.; Moravčíková, J.; Libantová, J.: Příprava binárního vektora obsahujícíce.	186
Vyhnánek, T.; Hanáček, P.; Bednář, J.: Kvalitativní a semikvantitativní detekce geneticky modifikované kukuřice pomocí PCR reakce.	188
Žáčková, Z.: Pestovanie olejnin – výhody a nevýhody.	190
Žúr, I.; Dubas, E.; Moravčíková, J.; Golebiowska, G.; Vaculková, E.; Salaj, J.: Efekt opracovania chladom a infekcie <i>Microdochium nivale</i> (Fr., Samuels & Hallett) na glukánázovú aktivitu zimnej odrody triticales (x <i>Triticosecale</i> Wittm.).	191

## GENOMIKA PŠENICE: VÝZVA PRO 21. STOLETÍ WHEAT GENOMICS: CHALLENGE FOR THE 21<sup>ST</sup> CENTURY

Jan ŠAFÁŘ – Hana ŠIMKOVÁ – Marie KUBALÁKOVÁ – Jan BARTOŠ – Jaroslav DOLEŽEL

*The bread wheat is unique among the important agricultural crops in possessing massive genome with a prevalence of dispersed DNA repeats. Polyploidy and the presence of repeats make gene cloning and genome sequencing in wheat extremely difficult. Chromosome genomics simplifies these tasks by targeting single chromosomes and chromosome arms, which represent only a few percent of the nuclear genome. The advantages of this strategy over a whole-genome approach include the avoidance of problems due to the presence of homoeologs, reduction of work to manageable portions, cost efficiency, and an opportunity to structure collaborative projects where individual laboratories work on particular chromosomes. We discuss various applications of flow-sorted chromosomes and assess the potential of chromosome genomics in the Triticeae.*

*Key words: bread wheat, genome, sequencing, chromosome, physical mapping*

### Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.,  $2n = 6x = 42$ ) je jednou z nejdůležitějších plodin světa. Pěstuje se na 17 % zemědělsky obdělávané půdy a je hlavní plodinou pro 40 % světové populace. Pšenice a její produkty pokrývají přibližně 20% denního energetického příjmu lidstva. Navzdory významu této plodiny klesly její zásoby na začátku 21. století na nejnižší úroveň za posledních třicet let. To je výsledkem celé řady nepříznivých okolností, včetně změny klimatu, využívání obilnin na produkci biopaliv a nárůstu světové populace. Východiskem z této situace je šlechtění nových odrůd se zlepšenou odolností vůči chorobám a negativnímu vlivu vnějšího prostředí, které by umožnily produkci v dostatečném množství a kvalitě a za trvale udržitelných podmínek. Klíčem k takovým odrůdám může být podrobná znalost dědičné informace.

Pšenice setá je výjimečná nejen svým společensko-ekonomickým významem, ale i svým jaderným genomem. Žádná jiná plodina srovnatelného významu nemá genom tak velký a zároveň tak složitý. Jedna kopie jejího genomu je představována téměř 17 miliardami párů bází DNA a je asi 35krát větší než genom rýže (*Oryza sativa* L.). Většina genomu pšenice je tvořena různými typy roztroušených mobilních genetických elementů, zatímco geny kódující bílkoviny představují jen asi 2–3 % celkové DNA. Předpokládá se, že pšenice setá vznikla přibližně před 10 000 lety v oblasti Blízkého východu jako výsledek mezidruhové hybridizace tetraploidní pšenice *T. turgidum* ( $2n = 4x = 28$ , genom AABB) s diploidním druhem *Aegilops tauschii* ( $2n = 2x = 14$ , genom DD). Pšenice setá je tedy poměrně nedávno vzniklý allopolyploid se třemi homeologními genomy A, B a D. Protože diploidní rodičovské druhy mají společného předka, jejich genomy jsou si do jisté míry podobné (homeologní). Pro fyzické mapování a klonování genů pšenice představuje velikost genomu, alopolyploidní původ a převaha repetitivních sekvencí DNA značnou komplikaci. Zatím nezodpovězenou otázkou zůstává zdali je vůbec možné tak složitý genom sekvenovat a natolik porozumět jeho funkci, abychom ji uměli cíleně ovlivňovat.

V dalších částech tohoto textu se pokusíme zmapovat současný stav analýzy genomu pšenice a naznačit perspektivy tohoto výzkumu.

### Kolinearita a izolace genů

Ještě nedávno se předpokládalo, že pro izolaci genů z obrovského genomu pšenice by se mohlo využít poznatků o konzervativnosti struktury genů a jejich uspořádání v genomu (tzv. kolinearitě). Po sekvenování genomů *Arabidopsis* a rýže byla na základě makrokolinearity nalezena celá řada úseků DNA nesoucích podobné geny, avšak na detailnější úrovni byla zjištěna celá řada lokálních přestaveb, amplifikací, duplikací genů a včlenění mobilních genetických elementů, zejména traspozónů. Ukazuje se, že genomy obilovin jsou velmi dynamické a že se v průběhu evoluce rychle měnily. Poslední studie naznačují, že možnost izolovat geny na základě kolinearity je značně omezená (FEUILLET a KELLER, 2002). Přesto byly publikovány v poslední době práce oznamující klonování významných genů z komplexního genomu pšenice na základě pozičního klonování (UAUY et al., 2006). Ve snaze identifikovat a klonovat co největší množství genů jsou navrhovány alternativní postupy, jak „přefiltrovat“ genové oblasti z komplexních genomů s vysokým obsahem repetitivní DNA.

Analýza celkové mRNA představuje elegantní způsob jak získat informace o transkribovaných genech vybraného organismu. Sekvenováním komplementární DNA (cDNA), získané zpětným přepisem mRNA, z jednoho konce (~ 500 bází) lze získat tzv. Expressed Sequenced Tags (EST). U pšenice jich byl dosud získán více než jeden milion (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Je však nutné upozornit na to, že v kolekcích EST obvykle chybí vzácné transkripty. Díky tomu, že se jedná o sekvence částí genů, jsou EST zdrojem užitečných molekulárních markerů a jsou často využívány při srovnávací analýze s genomy druhů příbuzných pšenici.

Kromě standardního klonování exprimovaných sekvencí v cDNA knihovnách se v poslední době uplatňují i některé další metody. Jeden z postupů spočívá ve specifické eliminaci metylované (tedy převážně nekódující) DNA z knihoven DNA krátkých inzertů za použití metylačně senzitivních enzymů nebo častěji využitím specifického restriktivně modifikačního systému kmene *Escherichia coli* McrBC (RABINOWICZ et al., 2003). Další postup je založen na reasociaci DNA. Abundantní repetitivní sekvence reasociují nejrychleji, zatímco nízkokopiové sekvence zůstanou po dostatečně dlouhé době jako nereasociovaná jednovlákná, která jsou po převedení na dsDNA klonována v knihovnách DNA krátkých inzertů (PETERSON et al., 2002). Oba postupy jsou používány při sekvenačním projektu kukuřice. Výsledkem obou postupů je produkce genově obohacených knihoven DNA krátkých inzertů, které jsou vhodné zejména pro náhodné sekvenování (tzv. shotgun sekvenování).

Nevýhodou sekvenačních strategií zaměřujících se na nízkokopiové a genově bohaté oblasti je absence topologické informace. Chybí také údaje o okolí genů, které může hrát zásadní roli při regulaci genové exprese. Bez dostupnosti fyzické mapy genomu, která na rozdíl od genetické mapy vyjadřuje skutečnou polohu sekvencí DNA v genomu, je detailní analýza struktury genomu prakticky nemožná.

### *Sekvenování celého genomu*

Pro celkovou znalost genomu se ukazuje, že je potřeba mít informaci o celé, uspořádané sekvenci. Malé genomy některých rostlin byly sekvenovány metodou „whole genome shotgun“. Při použití této metody sekvenování by se však u pšenice jednalo o nesmírně nákladný projekt a vzhledem ke výše zmíněné složitosti genomu není jisté, zda by bylo možné sekvenci genomu z takového množství fragmentů vůbec sestavit. V poslední době se prosazují metody paralelního sekvenování, které jsou podstatně výkonnější (Mardis 2008). Ani při jejich použití však není jasné, zda by bylo možné sekvenci tak složitého genomu sestavit ze čtení, jejichž délky kolísají podle typu použitého sekvenačního systému mezi 35 až 250 bázemi DNA (Pop and Salzberg 2008).

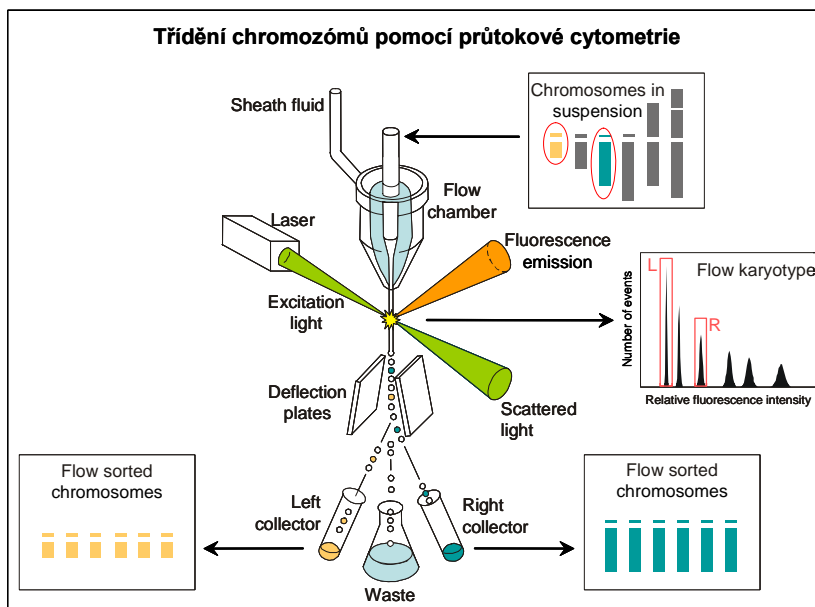
### *Sekvenování s pomocí fyzické mapy*

Jedním z hlavních problémů sekvenování velkého genomu pšenice je uspořádání krátkých čtení ze sekvenátoru. Řešením by mohlo být ukotvování jednotlivých čtení na fyzickou mapu genomu, kterou představují uspořádané překrývající se fragmenty DNA, tzv. kontigy. Fragmenty DNA pocházejí z knihoven DNA s velkými inzerty. V současné době je nejpoužívanějším vektorem pro konstrukci knihoven DNA s velkými inzerty umělý bakteriální chromozóm (BAC). Knihovny klonované v tomto vektoru mají inzerty o velikosti 100kb a větší, což umožňuje pomocí restriktivní analýzy zjistit oblasti překryvů mezi jednotlivými klony, a to i u genomu s vysokým obsahem repetitivní DNA, jaký má pšenice. Pro hexaploidní pšenici je k dispozici několik genomových BAC knihoven a podle rozsahu pokrytí genomu mají 0,3 - 1,2 x 10<sup>6</sup> klonů.

Vlastní fyzická mapa genomu je představována tzv. „Minimal Tiling Path“ (MTP) což je jeden nebo více kontigů s nejmenším možným počtem klonů, které pokrývají celý genom. Pokud je fyzická mapa tvořena více kontigy, které jsou odděleny mezerami, jsou kontigy obvykle navzájem uspořádány ukotvováním na genetickou mapu. Díky obrovskému genomu je však i konstrukce fyzické mapy pšenice velmi obtížný úkol, který by vyžadoval restriktivní analýzu nejméně jednoho a půl miliónu BAC klonů. To je sice technicky proveditelné, ale existují pochybnosti o možnosti sestavit takové množství klonů do kontigů, zejména pokud se bude jednat o klony z navzájem podobných genomů tvořících genom pšenice seté.

### *Fyzické mapy jednotlivých chromozómů*

Obtížnost konstrukce fyzické mapy celého genomu pšenice vedla k vypracování tzv. chromozómové strategie (DOLEŽEL et al. 2007), která předpokládá konstrukci fyzických map zvláště pro každý z 21 chromozómů pšenice, případně pro jejich jednotlivá ramena. Podstatou je rozdělení genomu na jednotlivé části - chromozómy nebo chromozómální ramena pomocí průtokové cytometrie (viz Obr.1). Tak je možné získávat frakce představující i méně než 2 % celého genomu. Následně byl vyvinut protokol pro přípravu vysokomolekulární DNA z tříděných chromozómů a konstrukci BAC knihovny DNA z malého množství DNA, který umožnil konstrukci BAC knihovny specifické pro chromozóm 3B pšenice (ŠAFÁŘ et al., 2004). Šlo o vůbec první chromozómově specifickou knihovnu dlouhých inzertů u rostlin. Aktuální stav konstrukce BAC knihoven specifických pro jednotlivé chromozómy pšenice lze nalézt v tabulce 1. a na web stránce: <http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/LMCC/Resources/resources.html>



Obrázek 1: Schéma třídění mitotických chromozómů pomocí průtokové cytometrie

Výhodou chromozómové strategie je odstranění problémů s výskytem homeologních sekvencí, neboť fyzická mapa je pro každý chromozóm sestavována odděleně. Další předností je malá velikost knihoven. Protože jsou konstruovány z malých částí genomu, stačí jen asi 50 000 klonů k dostatečnému pokrytí ramene chromozómu. Manipulace s tak malými knihovnami je ve srovnání s obrovskými genomovými knihovnami, které mají řádově více klonů, snadná a restriční analýzu všech klonů lze provést během několika týdnů. Stejně tak je snadnější identifikace BAC klonů nesoucích hledaný marker. Nedávno byla na základě chromozómové strategie publikována fyzická mapa chromozómu 3B pšenice, který je více než dvakrát větší než celý genom rýže (Paux *et al.*, 2008).

Tabulka1: Seznam chromozómově specifických BAC DNA knihoven (stav k 1.10. 2008)

Library code*	Species	Variety	Chromosome	Genome fraction	Number of clones	Mean insert size	Coverage
<a href="#">TaaCsp146hA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	1D, 4D, 6D	11.6%	87,168	85 kb	3.4 x
<a href="#">TaaCsp146hB</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	1D, 4D, 6D	11.6%	121,344	102 kb	6.3 x
<a href="#">TaaPav1BShA</a>	<i>T. aestivum</i>	Pavon	1BS	1.9%	65,280	82 kb	14.5 x
<a href="#">TaaCsp3AShA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	3AS	2.1%	55,296	80 kb	12.0 x
<a href="#">TaaCsp3ALhA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	3AL	2.8%	55,296	106 kb	12.3 x
<a href="#">TaaCsp3BFhA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	3B	5.9%	67,968	103 kb	6.2 x
<a href="#">TaaCsp3BFhB</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	3B	5.9%	82,176	126 kb	9.1 x
<a href="#">TaaHop3BFhA</a>	<i>T. aestivum</i>	Hope	3B	5.9%	92,160	78 kb	6.0 x
<a href="#">TaaCsp3DSShA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	3DS	1.9%	36,864	110 kb	11.0 x
<a href="#">TaaCsp3DLhA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	3DL	2.7%	64,512	105 kb	11.2 x
<a href="#">TaaCsp7DSShA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	7DS	2.2%	49,152	114 kb	12.2 x
<a href="#">TaaCsp7DLhA</a>	<i>T. aestivum</i>	CS	7DL	2.0%	50,304	115 kb	14.8 x
<a href="#">SccImp1RShA</a>	<i>S. cereale</i>	Imperial	1RS	5.6%	66,816	72 kb	8.8 x
<a href="#">SccImp1RSbA</a>	<i>S. cereale</i>	Imperial	1RS	5.6%	36,864	75 kb	5.2 x



Výhody existence takovéto mapy využil McNeil et al. při odvození markerů v těsné vazbě na gen *Sr2* (McNEIL et al. 2008).

#### *Přednosti chromozómové strategie*

Možnost třídít jednotlivá ramena chromozómů pšenice nabízí vedle konstrukce BAC knihoven další atraktivní využití. Je možné například chromozómy třídít na mikroskopické sklíčko a použít je pro lokalizaci sekvencí DNA pomocí FISH (KUBALÁKOVÁ et al. 2005). Tato aplikace je vhodná pro ověřování polohy kontigů na chromozómu a odhadování velikosti mezer mezi kontigy. Pro odvozování DaRT markerů (JACCOUD et al. 2001) stačí nanogramová množství DNA, takže je možné je odvozovat přímo z DNA získané z malého počtu chromozómů (připravováno k publikaci). Optimalizovaná metoda reprezentativní amplifikace DNA umožňuje získávat mikrogramová množství DNA z relativně malého počtu tříděných chromozómů (ŠIMKOVÁ et al. 2008). Takto získaná DNA je vhodná pro mapování markerů pomocí DNA čipů (ŠIMKOVÁ et al. 2008) a pro konstrukci knihoven krátkých inzertů za účelem izolace molekulárních markerů z daného chromozómu. Nejnovější výsledky potvrdily možnost použít amplifikovanou chromozómovou DNA pro 454 sekvenování, což otevírá možnosti pro hromadnou izolaci molekulárních markerů (připravováno k publikaci). Na základě tohoto výsledku lze uvažovat o možnosti sekvenovat genom pšenice rameno po rameni. Vzhledem k relativně malé velikosti ramen (224–561 Mbp) a rychlému pokroku sekvenčních technologií je možné, že právě tento postup bude zvolen pro sekvenování genomu této důležité plodiny.

#### **Závěr**

Vzhledem k pokroku při třídění chromozómů a konstrukci chromozómově specifických BAC knihoven lze očekávat, že chromozómová strategie bude stále častěji využívána, a je pravděpodobné, že bude použita i pro sekvenování genomu pšenice. Konstrukce fyzické mapy bude předpokladem pro efektivní analýzy a sekvenování genomu, a to i za použití nových metod sekvenování. Výhodou této strategie je postupná konstrukce fyzické mapy a možnost využívat nově vytvořené materiály bezprostředně po jejich přípravě, aniž by bylo nutné čekat na projekt sekvenování celého genomu.

#### **Literatura**

- DOLEŽEL, J., KUBALÁKOVÁ, M., PAUX, E., BARTOŠ, J. AND FEUILLET, C. (2007) Chromosome-based genomics in cereals. *Chromosome Res.* 15, 51-66.
- FEUILLET C, KELLER B (2002). Comparative Genomics in the grass family: Molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Annals Botany* 89: 3-10
- KUBALÁKOVÁ, M., KOVÁŘOVÁ, P., SUCHÁNKOVÁ, P., ČÍHALÍKOVÁ, J., BARTOŠ, J., LUCRETTI, S., WATANABE, N., KIANIAN, S.F. and DOLEŽEL, J. (2005) Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics* 170, 823-829.
- JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D., KILIAN, A. (2001) Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucl. Acids Res.* 2001 29, e25; doi:10.1093/nar/29.4.e25
- McNEIL, M.D., KOTA, R., PAUX, E., DUNN, D., McLEAN, R., FEUILLET, C., LI, D., KONG, X., LAGU-DAH, E., ZHANG, J.C., JIA, J.Z., SPIELMEYER, W., BELLGARD, M. and APPELS, R. (2008) BAC-derived markers for assaying the stem rust resistance gene, *Sr2*, in wheat breeding programs. *Molecular Breeding* 22:15-24, 2008.
- PAUX, E., SOURDILLE, P., SALSE, J., SAINTENAC, C., CHOLET, F., LEROY, P., KOROL, A., MICHALAK, M., KIANIAN, S., SPIELMEYER, W., LAGUDAH, E., SOMERS, D., KILIAN, A., ALAUX, M., VAUTRIN, S., BERGÈS, H., EVERSOLE, K., APPELS, R., SAFAR, J., ŠIMKOVÁ, H., DOLEŽEL, J., BERNARD, M., FEUILLET, C.: A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. - *Science* 322, 101-104, 2008
- PETERSON, D.G., WESSLER, S.R. and PATERSON, A.H. (2002) Efficient capture of unique sequences from eukaryotic genomes. *Trends Genet.* 18, 547-550.
- POP, M. and SALZBERG, S.L. (2008) Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet.* 24, 142-149.
- RABINOWICZ, P.D., SCHUTZ, K., DEDHIA, N., YORDAN, C., PERNELL, L.D., STEIN, L., MCCOMBIE, W.R. and MARTIENSSSEN, R.A. (1999) Differential methylation of genes and retrotransposons facilitates shotgun sequencing of the maize genome. *Nature Genetics* 23, 305-308.
- ŠAFÁŘ, J., BARTOŠ, J., JANDA, J., BELLEC, A., KUBALÁKOVÁ, M., VALÁRIK, M., PATEYRON, S., WEISEROVÁ, J., TUŠKOVÁ, R., ČÍHALÍKOVÁ, J., VRÁNA, J., ŠIMKOVÁ, H., FAIVRE-RAMPANT, P., SOURDILLE, P., CABOCHE, M., BERNARD, M., DOLEŽEL, J. and CHALHOUB, B. (2004) Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J.* 39, 960-968.
- ŠIMKOVÁ, H., SVENSSON, J.T., CONDAMINE, P., HŘIBOVÁ, E., SUCHÁNKOVÁ, P., BHAT, P.R., BARTOŠ, J., ŠAFÁŘ, J., CLOSE, T.J., DOLEŽEL, J.: Coupling amplified DNA from flow-sorted chromosomes to high-density SNP mapping in barley. - *BMC Genomics* 9: 294, 2008.
- UAUY, C., DISTELFELD, A., FAHIMA, T., et al. - *Science* 314: 1298-1301, 2006

## GENETICKO – ŠĽACHTITEĽSKÉ ASPEKTY PREDZBEROVÉHO PORASTANIA PŠENICE

### GENETIC – BREEDING ASPECTS OF WHEAT PRE – HARVEST SPROUTING

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Martin UŽÍK – Daniela MIKULÍKOVÁ

*Pre – harvest sprouting of wheat grain in spike causes great damages in the years with wet and rainy weather during harvest. Genetic and breeding aspects of this phenomenon are discussed. Near isogenic lines of cultivar Bersee possess GA insensitive dwarf genes were evaluated in grain yield formation traits and in alpha amylase activity. The lowest alpha amylase activity had line with genes Rht–B1b + Rht–D1b. Effects of cultivars, fertilization and years on falling number values were evaluated. On falling number variability, significant effects of cultivar, fertilization and interaction between years and cultivars were revealed. Long term solution of this problem is in development of cultivars tolerate or resistant to pre – harvest sprouting.*

*Key words: wheat, pre – harvest sprouting, alpha amylase, falling number, cultivar*

Predzberové porastanie je klíčenie fyziologicky zrelého zrna obilnín ešte v klase, čo sa vyskytuje v podmienkach chladných a vlhkých pred zberom. V zrne, ktoré je vystavené dlhému obdobiu vlhka, alebo hmle sa iniciuje proces klíčenia počas ktorého škrob a bielkoviny zrna sa rozkladajú. Porastanie môže byť viditeľné (klíčček, korenky), alebo skryté, kedy vizuálne prejavy nie sú navonok detekovateľné, avšak kvalitatívne zmeny sú značné a vedú pri pšenici k deklasovaniu produkcie z kategórie potravinárskej akosti do kategórie krmnej kvality.

Zrážky môžu zapríčiniť poškodenie zrna extenzívnym prerastaním vo väčšine pestovateľských oblastí, avšak niektoré oblasti sú náchylnejšie na výskyt porastania než ostatné. Vo Veľkej Británii ročné straty v dôsledku porastania sú odhadované na 17 miliónov libier (FLINTHAM et al. 2004). Škody na úrode a zníženie kvality zrna v dôsledku porastania sa periodicky vyskytujú u nás (ONDREJČÁK, MUCHOVÁ 2005) a v okolitých štátoch – Maďarsko (BARNARD, BONA 2004), Poľsko (MOS 2004), ČR (KUBÁNEK, HANIŠOVÁ 1990).

V bývalej ČSR ročné škody na úrode zrna predstavovali 10 až 30 %, v niektorých rokoch aj 50 %, pričom porastavosťou zrna boli najviac zasiahnuté podhorská, zemiaková a čiastočne aj repná výrobná oblasť (HANIŠOVÁ, KUBÁNEK 1989). Finančné straty sú značné vzhľadom na cenový rozdiel medzi potravinárskou a nepotravinárskou pšenicom. Hoci na Slovensku v posledných desaťročia priemerné ročné zrážky poklesli, časté sú však zrážky v dobe dozrievania zrna. Globálne zmeny nevedú len k aridizácii ale aj k častým a prudkým zrážkam (UŽÍK 2008).

Pre objektívne hodnotenie porastavosti sa využíva číslo poklesu, ktoré charakterizuje aktivitu alfa amylázy, hydrolytického enzýmu štiepiaceho škrob. Test bol navrhnutý HAGBERGOM (1960) a ukázal sa ako praktickejší na meranie aktivity alfa amylázy než konvenčné chemické metódy, čo potvrdili viacerí autori. Pri hodnotení pekárskej kvality zrna pšenice je číslo poklesu od roku 1995 na Slovensku záväzným ukazovateľom, pričom za optimálnu hodnotu je považovaných 200–300 sekúnd (s). STN požaduje pre pekársku kvalitu minimálne 220 s a pre pečivárske účely by nemala hodnota klesať pod 160 s. V súčasnosti číslo poklesu predstavuje jednu z najdôležitejších charakteristík kvality produktov zrna a vo svete je používané ako všeobecný index v obchode so zrnou pšenice.

V roku 2001 v Malom Šariši ani jedna z 18 testovaných odrôd pšenice nedokázala udržať hodnotu čísla poklesu nad 140 s. Takmer pri polovici odrôd bolo číslo poklesu blízko najnižšej možnej merateľnej hodnoty 60 s (MICHALÍK et al. 2005).

#### Genetický základ

K vyššej odolnosti voči porastaniu môže prispieť niekoľko faktorov: redukovaná úroveň aktivity alfa amylázy v zrne, prítomnosť inhibítorov klíčenia, redukovaná absorpcia vody zrnami, adaptované odozvy na hormóny.

Porastavosť je silne podmienená dormanciou. Dormantné embryá nebudú klíčiť dokonca ani v priaznivých podmienkach. Dormancia zrna pšenice je polygénny znak kontrolovaný tromi R génmi, ktoré súčasne podmieňujú červenú pigmentáciu osemenia NILSON-EHLE (1914). Stupeň dormancie zrna a farba červeného osemenia sú dedené ako pleiotropné efekty dominantných R alel génov lokalizovaných na homeologických lokusoch na chromozómoch 3A, 3B, 3D (FLINTHAM, GALE 1996).

Odrody bielozrnej pšenice sú menej rezistentné ku porastavosti (GROSS et al. 2002), než červenozrne pšenice avšak majú ekonomické výhody pre mlynárov, pretože zrno môže byť zomleté s vyšším extrakčným pomerom (McCAIG, DEPOUW 1992, KOTTEARACHCHI et al. 2006). Biela farba zrna je spájaná s nižším obsahom horkých fenolických zložiek, ktoré sa vyskytujú v povrchových vrstvách zrna. To umožňuje vyššiu výťažnosť múky a získanie produktu s vyšším obsahom vlákniny, minerálov a proteínov. BASSOI et al. (2006) vyhodnotili možnosť získania rekombinovaných inbredných línií pšenice, nezávisle od génov farby z kríženia medzi na porastanie citlivou odrodou Ocepar 18 a 3 rezistentnými odrodami. Výsledky naznačili možnosť selektovať genotypy s vyššou rezistenciou na porastavosť než parentálne línie a nezávisle od génov farby.

Napriek optimistickým náznakom odroda pšenice bieložrná a tolerantná voči porastaniu neexistuje.

### Selekcia

Porastanie zrna pšenice zostáva problémom vo väčšine pestovateľských regiónov, preto je snaha fyziologicky aktívnymi látkami zabrzdiť proces degradácie zrna (MICHALÍK et al. 2004, HUDEC et al. 2006), avšak podľa KETTLEWELL (1993) je relatívne malá možnosť pomocou agronomických techník redukovať porastavosť pred zberom, preto primárnym cieľom šľachtania pšenice je vyvinúť odrody, ktoré sú rezistentné počas vlhkého obdobia zberu.

Porastanie je komplexný znak, ktorý môže byť podmienený génmi v troch rozdielnych pletivách - materská rastlina, endosperm a embryo semena, ktoré patria ku dvom sukcesívnym generáciám (LAWSON et al. 1997), čo sťažuje šľachtanie na rezistenciu. Heritabilita a genetická variabilita musia byť známe, aby sa efektívne využili znaky v programe šľachtania, avšak informácií o štruktúre genetickej variability a kombinačnej schopnosti je málo. Hybridologickú analýzu na odhad *gca* a *sca* vykonali JIANG et al. (2005) a BARNARD (2005). V Japonsku (Hokkaido) v roku 1988 sa začal šľachtiteľský program na vyšľachtenie odrôd pšenice s rezistenciou na poškodenie porastaním (YANAGISAWA et al. 2005). Vykonali selekciu medzi pokročilými líniami v generácii F6 a F8, pričom použili ako selekčné kritéria porastavosť po simulovanom daždi, test klíčivosti a číslo poklesu. Selekciami získali líniu Kitakei 1802, ktorá prekonávala jednu z najrezistentnejších odrôd pšenice Kitakei 1616.

V posledných rokoch sa intenzívne analyzujú RILs medzi genotypmi červenožrnými s toleranciou voči porastaniu a bieložrnými s citlivosťou na porastanie s cieľom mapovania chromozómov a detekcie QTLs, ktoré sú vo väzbe s porastavosťou (ROY et al. 1999, MORI et al. 2005, GROSS et al. 2005, KULWAL et al. 2004, 2005 ai.). Z výsledkov vyplýva, že z 20 chromozómov (na 1D chromozóme neboli zistené QTL) sa chromozómy 3A, 3B, 3D a 4A považujú za významnejšie pre štúdium genetiky dormancie než ostatné chromozómy (GROSS et al. 2002).

### Vzťah medzi *Rht* génmi a porastavosťou

V súčasnosti je známych 21 major génov (*Rht*), ktoré redukujú výšku (McINTOSH et al. 1998). Väčšina z týchto génov boli odvodené ako mutantné formy a nemajú žiadnu šľachtiteľskú hodnotu.

V šľachtení sú využívané gény necitlivé na GA, *Rht-B1b* alebo *Rht-D1b* (pôvodné označenie *Rht 1* a *Rht 2*, lokalizované na krátkych ramenách chromozómov 4B a 4D, jednotlivito) ktoré skracujú steblo a zvyšujú fertilitu klasu (GALE et al. 1975). Na chromozóme 4B\* je alela *Rht-B1c* (pôvodné označenie *Rht 3*), ktorá významne redukuje výšku asi o 50 % s potenciálom veľkého zvýšenia fertility klásku. Alela *Rht-B1c* pozitívne ovplyvňuje tiež kvalitu zrna a to efektívnou inhibíciou alfa amylázy (FLINTHAM et al. 1997). V roku priaznivom pre škody v dôsledku vysokej porastavosti redukcia alfa amylázy predstavovala až 77 % (FLINTHAM, GALE 1982). Alela môže mať významný pozitívny vplyv na zberový index, ale zvýšená fertilita klásku je veľmi senzitívna na prostredie (KERTESZ et al. 1991). Izogénna línia *Rht-B1c* vyššej odrody môže mať vyššiu úrodu v porovnaní s izogénnymi líniami danej odrody s *Rht-B1b* a *Rht-D1b*. MRVA, MARES (1996) zistili, že z génov krátkosteblovosti *Rht 1*, *Rht 2* a *Rht 3*, gén *Rht 3* prejavil najsilnejší vplyv na výšku rastlín a silne inhiboval syntézu novej alfa amylázy v priebehu neskoršieho dozrievania zrna. Gény *Rht 1* a *Rht 2* mali menej výrazný vplyv, ale stále významne redukovali expresiu alfa amylázy. *Rht* alely krátkosteblovosti na krátkych ramenách chromozómov 4B a 4D redukovali aktivitu alfa amylázy bez ovplyvnenia klíčenia.

Uvádžame výsledky hodnotenia súboru blízko izogénnych línii pšenice letnej f. ozimnej s *Rht* alelami krátkosteblovosti necitlivými voči kyseline giberelínovej (GA) (*Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1b + Rht-D1b*, *Rht 3*) a vysokej línie *rht* v genetickom pozadí odrody Bersee. Výsledky sú z vegetácie 2007/08, z nádobového pokusu. Podľa očakávania najvyššiu výšku rastlín mala línia s divou *rht* alelou a najnižšiu línia s génom *Rht 3* (51,4 cm). Línie s génom *Rht-B1b* boli rovnako vysoké ako línie s génom *Rht-D1b*, avšak kumulácia oboch génov v jednom genotype spôsobila skrátenie výšky rastlín asi o 40 %. Pleiotropný efekt *Rht* génov bol pozorovaný pri líniiach s *Rht-B1b* a *Rht-D1b* génmi, ktoré mali najvyššiu fertilitu klasu, avšak pozitívne zmeny v zberovom indexe boli len pri línii s génom *Rht 3* (0,451). Oproti očakávaniu najnižšiu aktivitu alfa amylázy mala línia s génmi *Rht-B1b + Rht-D1b*. Línia s génom *Rht 3* mala porovnateľnú hodnotu s líniou *Rht-D1b*. Najvyššiu hodnotu aktivity alfa amylázy mala línia s divou *rht* alelou.

Tabuľka 1: Priemerné hodnoty znakov izogénnych línií odrody Bersee

Línia	Klasenie (dni od 1.5.)	Výška rastlín (cm)	Počet klasov. rastlinu <sup>-1</sup>	Biomasa (g)	Klas zrná		HI	HTS (g)	A-AMS (U.g <sup>-1</sup> )
					hmotnosť (g)	počet			
Bersee <i>rht</i>	19,5	118,4	1,3	5,5	1,703	44,9	0,387	37,838	118,47
Bersee <i>Rht-B1b</i>	18,7	95,2	1,2	8,7	2,059	53,2	0,279	38,711	114,83
Bersee <i>Rht-D1b</i>	18,9	95,4	1,2	8,6	2,238	57,0	0,301	39,200	108,46
Bersee <i>Rht-B1b + Rht-D1b</i>	23,5	57,5	1,3	4,7	1,607	47,0	0,434	34,051	98,11
Bersee <i>Rht 3</i>	23,4	51,4	1,1	3,9	1,619	43,7	0,451	36,991	109,57

*Faktory ovplyvňujúce číslo poklesu*

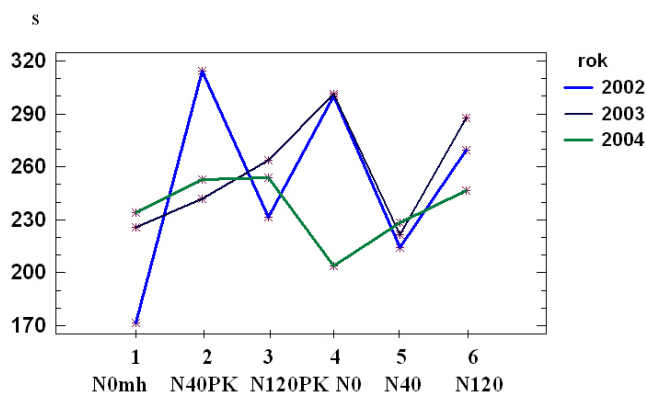
Mnohé práce dokumentovali, že číslo poklesu môžu ovplyvniť rôzne faktory. Dávka dusíkatého hnojenia môže znížiť aj zvýšiť číslo poklesu pšenice (STEWART, DYKE 1993). Avšak tento vplyv je nižší ako vplyvy odrody a klimatických podmienok (SMITH, GOODING 1999). Vyššie číslo poklesu je spojené s vyššou teplotou prostredia v lete (JOHANSSON 2002).

Cieľom nášho výskumu bolo zhodnotiť vplyv odrody, hnojenia a poveternostných podmienok na číslo poklesu domácich vybraných odrôd pšenice. V troch vegetačných rokoch (2001/2, 2002/3, 2003/4) bolo na šiestich variantoch hnojenia (1 – N0 maštalný hnoj (mh), 2 – N40 PK, 3 – N120 PK, 4 – N0, 5 – N40, 6 – N120) v dvoch opakovaníach v poľnom pokuse založenom metódou delených dielcov (parcela variant hnojenia, podparcela odroda) na VŠS Vigľaš – Pstruša hodnotených päť odrôd pšenice letnej f. ozimnej (Viginta, Vanda, Torysa, Malyska, Košútka). Z priemernej vzorky štandardným postupom podľa JCC metódy bolo stanovené číslo poklesu.

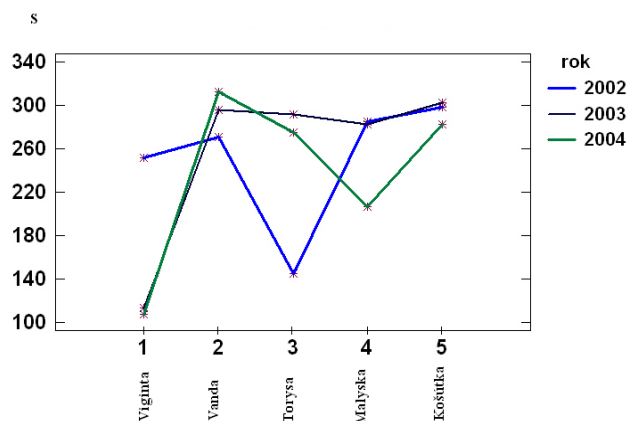
Medzi rokmi neboli významné rozdiely v čísle poklesu (250,2; 257,0; 236,6), napriek tomu, že teplota a zrážky boli v období dozrievania v jednotlivých rokoch rozdielne (tab. 2). Najnižšie hodnoty čísla poklesu boli v roku 2004 (236,6), kedy boli najnižšie teploty a zrážky relatívne najvyššie až na obdobie druhej polovice júla (tab. 2). Hnojenie malo významný vplyv na číslo poklesu len na hranici významnosti, pričom jeho účinok nebol jednoznačný. Medzi variantmi 1 a 4, na ktorých sa nehnojilo, sme neočakávali rozdiely (graf 1). Najvýznamnejší účinok na variabilitu čísla poklesu mala odroda (graf 2 a 3). Najvyššie hodnoty čísla poklesu mali odrody Vanda a Košútka. Odroda Viginta mala neočakávane nízku hodnotu čísla poklesu. Podrobná analýza interakcie odroda x roky ukázala, že len dve odrody Viginta a Torysa rozdielne reagovali na podmienky rokov (graf 2). Odroda Torysa mala podpriemernú hodnotu v roku 2002 a odroda Viginta v rokoch 2003 a 2004. Príčiny rozdielneho chovania odrôd nie sú jasné. Rozdiel medzi najnižšou a najvyššou hodnotou čísla poklesu bol medzi rokmi cca 20 s (236,6 – 257), medzi hnojením 60 s (210,2 – 269,8) a medzi odrodami až 137 s (157,3 – 294,6).

Tabuľka 2: Úhrny zrážok a priemerná teplota v pokusných rokoch na VŠS Vigľaš – Pstruša

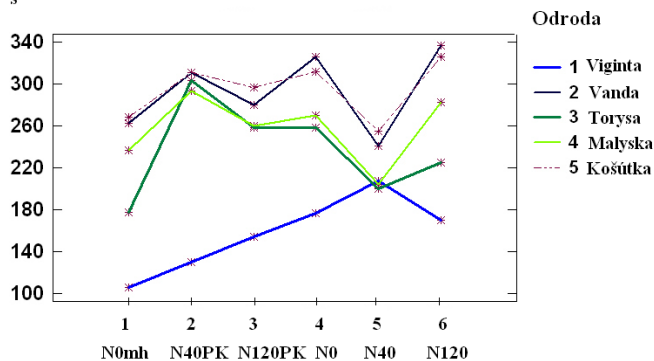
Mesiac, dlhodobý normál	Dekáda	Zrážky (mm)			Teplota (°C)		
		2002	2003	2004	2002	2003	2004
máj	1	8,3	5,1	37,5	15,1	17,2	11,7
62 mm	2	50,3	39,3	7,7	14,8	14,4	12,1
13,2°C	3	25,7	25,3	52,5	16,5	16,0	11,6
$\Sigma / \bar{x}$		<b>84,3</b>	<b>69,7</b>	<b>97,7</b>	<b>15,5</b>	<b>15,9</b>	<b>11,8</b>
jún (6)	1	49,0	7,0	30,7	15,1	19,8	15,8
85 mm	2	13,5	4,4	48,4	14,8	18,8	16,9
16,2°C	3	5,5	1,0	9,0	16,5	18,1	15,8
$\Sigma / \bar{x}$		<b>68,0</b>	<b>12,4</b>	<b>88,1</b>	<b>15,5</b>	<b>18,9</b>	<b>16,2</b>
júl (7)	1	4,0	3,6	23,0	20,3	18,7	17,4
66 mm	2	103,0	24,2	0	20,5	20,1	17,4
17,8°C	3	46,0	121,1	37,1	18,1	20,6	18,7
$\Sigma / \bar{x}$		<b>153,0</b>	<b>148,9</b>	<b>60,1</b>	<b>19,6</b>	<b>19,8</b>	<b>17,8</b>



Graf 1



Graf 2



Graf 3

Číslo poklesu:

Graf 1 – interakcia hnojenie x rok

Graf 2 – interakcia rok x odroda

Graf 3 – interakcia odroda x hnojenie

### Záver

Straty v dôsledku predzberového porastania pšenice sú veľmi vysoké pre pestovateľov a spracovateľov. Je relatívne malá možnosť prostredníctvom agrotechnických opatrení eliminovať porastavosť. Dlhodobé riešenie je vo vyšľachtení odrôd, ktoré sú tolerantné resp. rezistentné voči porastaniu v období medzi zrelosťou a zberom.

Zoznam citovanej literatúry je u autorov príspevku.

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

# ŠLECHTĚNÍ CHMELE (*Humulus lupulus* L.) NA VYSOKÝ OBSAH DESMETHYLXANTHOTHUMOLU HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.) BREEDING AIMED AT HIGH CONTENTS OF DESMETHYLXANTHOTHUMOL (DMX)

Vladimír NESVADBA – Karel KROFTA – Zdenka POLONČÍKOVÁ

*Three bitter female plants (Agnus, Columbus and Admiral) and two male genotypes (99/14 and 00/6) were chosen for diallel breeding. The highest content of DMX was determined in the progenies of "Agnus x male 99/14 and 00/6", resp. But the difference between the progenies is not statistically important. Within combination breeding the highest content of DMX was found out in the genotypes originating from Vital. This progeny shows higher contents of DMX than the other ones with 99% probability. In the second part of the breeding process aimed at high content of DMX we tested hop gene fond as well as contemporary breeding material. In the present cultivated bitter varieties the contents of DMX are only since 0.14 to 0.18% (Agnus, Magnum, Sládek, Dunav, Pioneer, etc.). Within this breeding program we can conclude, that we have managed to obtain a new genotype with very high content of DMX (0.37, resp. 0.27%). In 2008 the first hop variety (Vital) for pharmacy utilization was released. This variety shows high content of pharmaceutically needed compound, DMX (0.3 – 0.4% w.w.). In comparison with other bitter varieties the content is 2-3x higher.*

*Key words: hops, Humulus lupulus L., desmethylxanthohumol, hop breeding, genetic resources, new breeding material.*

## Úvod

Šlechtění chmele má v České republice dlouholetou tradici. První klony Žateckého poloraného červeňáku byly získány už v 19. století Semšem. Od počátku 20. století byla získána řada klonů Žateckého poloraného červeňáku. Od roku 1994 se v ČR začínají uplatňovat nové odrůdy hybridního typu. Do roku 2007 jich bylo registrováno šest. V současné době je preferována řada šlechtitelských cílů. Cílem je získat nové genotypy, které budou vykazovat rezistenci k biotickým a abiotickým faktorům, požadovaný obsah a složení chmelových pryskyřic dle skupin chmelů, vysoký a stabilní výnos, dobré agrotechnické parametry (Nesvadba a Krofta, 2003). Od roku 2006 se šlechtí i pro farmaceutické využití, tj. s vysokým obsahem xanthohumolu a desmethylxanthohumolu (DMX). Ve světě vykazují vysoký obsah xanthohumolu německá odrůda Taurus, anglická odrůda Admiral a česká odrůda Agnus, které mají obsah této látky na úrovni 1 % (Krofta a Nesvadba, 2008). Obsah DMX, u světových odrůd s nejvyšším obsahem DMX (Magnum, Sládek, Dunav, Pioneer atd.), je na úrovni 0,14 až 0,18 % (NESVADBA, 2007).

Je výrazný zájem farmaceutického průmyslu o látky obsažené v chmelových hlávkách. Prenylované flavonoidy mají antioxidační, protizánětlivé, protivirové a antikarcinogenní účinky. Například u xanthohumolu a dehydrocykloxanthohumolu bylo prokázáno aktivační působení na chinonreduktázu. Zmíněný enzym chrání buňky proti toxickým xenobiotikům tím, že redukuje chinony na hydrochinony, které se v těle savců snadněji odbourávají (MIRANDA et al. 2000). Velmi důležitou složkou je DMX, které izomeruje na 8-prenylaringenin. U této složky byl zjištěn inhibiční účinek na cytochrom P450 enzymy, které aktivují působení různých karcinogenů. Kostní resorpce je významně inhibována některými látkami ze chmele, především xanthohumolem a humulonem (TOBE et al., 1997) Uvedené sloučeniny jsou v současné době považovány za perspektivní terapeutické látky proti osteoporóze. Antioxidační vlastnosti prenylovaných flavonoidů byly objeveny při inhibici oxidace „low density“ lipoproteinů, která snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob. Z těchto uvedených důvodů roste zájem farmaceutického průmyslu o chmele, především o odrůdy s vysokými obsahy těchto látek.

## Metodika

Pro křížení byly využity matečné rostliny Agnus (česká odrůda), Columbus (odrůda USA) a Admiral (anglická odrůda) z unikátní polní kolekce genetických zdrojů chmele (MZe 33083/03-300 6.2.1. – MZe ČR). Samčí rostliny byly vybrány z kolekce samčích genotypů. Samčí rostliny byly získány výběrem z potomstev pro křížení na vysoký obsah chmelových pryskyřic. Potomstva z realizovaných křížení byla získána dle metodiky šlechtění chmele Chmelařského institutu Žatec. Získané rostliny byly vysazeny do hybridní školky. Následně byly hodnoceny všechny genotypy v rámci těchto potomstev. Na základě hodnocení byl z každého potomstva vybrán soubor samičích testovaných genotypů. Z každého testovaného genotypu byl získán průměrný vzorek chmelových hlávek. Tyto hlávky byly před analýzami sušeny při konstantní teplotě 55 °C po dobu 8 hodin. Chemické analýzy pro stanovení obsahu i složení chmelových pryskyřic, a obsahu DMX i xanthohumolu v chmelových hlávkách byly provedeny HPLC metodou /EBC 7.7/, (ANALITICA, 1997). Pro hodnocení byly vybrány základní statistické parametry: průměr, pro variabilitu, směrodatná odchylka a stonásobek variačního koeficientu. Pro stanovení průkaznosti rozdílu mezi jednotlivými genotypy v rámci potomstev byl použit t-test. Výsledky byly zpracovány statistickým programem STATISTICA – StatSoft.

## Výsledky a diskuse

V roce 2006 bylo záměrně provedeno dialelní křížení s cílem získat poznatky jak vybrané rodičovské komponenty ovlivňují u potomstev obsah DMX. Byly vybrány 3 vysokoobsažné samiči (Agnus, Columbus, Admiral) a 2 samčí (99/14 a 00/6 – po rodičích s vysokým obsahem DMX) genotypy. Z analýz vyplývá, že Agnus má vyšší obsah DMX než Columbus a Admirál. V tabulce 1 jsou uvedeny průměrné obsahy DMX u jednotlivých potomstev. Je patrné, že průměrné obsahy DMX u potomstev jsou téměř shodné, jsou v rozpětí od 0,10 % do 0,13 %, pouze potomstvo Agnus x 00/6 vykazuje vyšší průměr obsahu DMX (0,18 %) než ostatní potomstva. Tento rozdíl není statisticky významný.

Tabulka 1: Průměrné hodnoty obsahu xanthohumolu a DMX u potomstev testovacího křížení

Matka	Otec	99/14 (0,07 % DMX)	00/6 (0,08 % DMX)
Agnus	(0,18 % DMX)	0,13 %	0,18 %
Columbus	(0,09 % DMX)	0,12 %	0,10 %
Admiral	(0,07 % DMX)	0,13 %	0,11 %

V rámci kombinačního křížení vykazovaly nejvyšší obsah genotypy z křížení H1 (po mateřské odrůdě Agnus). Vyšší obsahy vykazovaly genotypy po odrůdách Columbus, Admirál a nšl. 4849. V rámci hodnocených vzorků se podařilo získat pouze dva genotypy s požadovaným obsahem 0,25 % DMX. Celkem bylo získáno 8 nových genotypů s obsahem DMX nad hranicí 0,20 %. Nejlepší potomstva byla získána po odrůdě Agnus a nšl. 4715. Potomstvo po nšl. 4715 (H 39) vykazuje s 99 % pravděpodobností průkazně vyšší obsah DMX než ostatní potomstva. I když v potomstvech po odrůdě Agnus byla získána řada genotypů s vysokým obsahem DMX, přesto nebyl stanoven statisticky průkazný rozdíl v obsahu DMX k dalším potomstvům. Dosažené výsledky mají dílčí charakter, protože získané vzorky byly vybrány na základě vizuálního hodnocení (obsah lupulinu). Přesto mají velký význam, protože poukazují na které rodičovské komponenty je nutné se v dalších letech zaměřit. Současně se získaly nové poznatky o samčích rostlinách, které mohou být využity pro další křížení na vysoký obsah DMX.

V druhé části šlechtění chmele na vysoký obsah DMX byl testován rozpracovaný šlechtitelský materiál v rámci šlechtitelských školek. Obsah DMX u světových odrůd je na maximální úrovni 0,14 až 0,18 % (Sládek, Dunav, Smena, Cascade, Pioneer atd.). Lze konstatovat, že se podařilo získat genotyp BM 14 s extrémně vysokým obsahem DMX a to 0,46 % (Tab. 2). Další genotypy vykazují opět vysoký obsah DMX 0,37 % (BM 28) resp. 0,27 % (BM 03). V současné době je nutné tyto genotypy testovat v polních podmínkách. V rámci hodnocení šlechtitelského materiálu byl nalezen genotyp pod označením 4715 s vysokým obsahem DMX. Tento genotyp je v registračních pokusech pro vysoký obsah alfa kyselin, ale bohužel vykazuje nižší výnosovou úroveň. Z tohoto důvodu bylo zvažováno vyřazení tohoto genotypu z registračních pokusů a pro šlechtění se stal již neperspektivní. Lze předpokládat, že pro farmaceutické využití bude mít vyšší perspektivu než v pivovarském průmyslu, proto byl tento genotyp registrován pod názvem Vital.

Tabulka 2: Chemické analýzy u genotypů s vysokým obsahem DMX

Označení genotypu	Země původů	Alfa kys. (% hm.)	Beta kys. (% hm.)	Kohumulon (% rel.)	Xanthohumul (% hm.)	DMX (% hm.)
BM 14	ČR	13,8	8,2	32,8	0,79	<b>0,46</b>
BM 28	ČR	9,9	7,0	27,1	0,46	<b>0,37</b>
Vital	ČR	14,5	8,1	22,4	0,60	<b>0,29</b>
BM 03	ČR	10,8	3,5	27,5	0,48	<b>0,27</b>
Sládek	ČR	6,9	6,3	25,4	0,79	<b>0,18</b>
Dunav	Jugoslávie	7,8	4,8	26,1	0,34	<b>0,18</b>
Smena	Rusko	6,3	5,0	25,1	0,38	<b>0,16</b>
Cascade	USA	5,0	7,9	32,4	0,45	<b>0,16</b>
Pioneer	Anglie	10,1	3,9	33,1	0,44	<b>0,15</b>
Atlas	Slovinsko	8,0	4,2	39,3	0,42	<b>0,15</b>
Agnus	ČR	12,1	6,4	34,1	0,92	<b>0,15</b>

Vital je první českou odrůdou pro farmaceutické využití. Vykazuje velmi vysoký obsah farmaceuticky požadované látky DMX (desmethylxanthohumolu) a to 0,3 až 0,4 % hm. Tento obsah je dva až třikrát vyšší než u všech světových odrůd chmele. DMX izomeruje na 8-prenylaringenin, který má antikarcinogenní účinky. Z tohoto důvodu byl zvolen název Vital. Z hlediska pivovarského rozdělení odrůd se jedná o odrůdu vysokoobsažného typu, protože obsah alfa kyselin je 13 až 17 %. V některých lokalitách je obsah alfa kyselin nad 17 %. Tato odrůda je dále charakteristická i vysokým obsahem beta kyselin a to 7 až 10 %. Byla získána

výběrem z potomstva hybridního materiálu. V původu je především zastoupena odrůda Agnus. Vital je charakteristický zelenou barvou révy, vyšším nasazením plodonosných pazochů a vysokou hmotností chmelových hlávek. Tvar chmelové rostliny je pravidelný válec. Jedná se o pozdní odrůdu a je charakteristická velmi dobrou česatelností. V současné době je založena poloprovozní plocha, kde se budou ověřovat další vlastnosti této odrůdy. V Tab. 3 jsou uvedeny výsledky jednotlivých vzorků. Je patrné, že Vital vykazuje průměrný obsah DMX 0,31 % a rozpětí obsahu je 0,27 % až 0,38 % DMX. Dále je zřejmé, že v lokalitě Mukoděly dosahuje velmi vysoký obsah alfa kyselin i vysoký obsah DMX. Je zřejmé, že lokalita bude mít značný vliv na obsah DMX. Dílčí výsledky ze sklizně v roce 2008 opět potvrzují vysoký obsah DMX, který je v rozpětí 0,27 až 0,26 %.

Tabulka 3: Vliv lokality na obsah DMX u odrůdy Vital

Lokalita	Alfa kys. (% hm.)	Beta kys. (% hm.)	DMX (% hm.)
Stekník KŠ	14,5	8,1	0,27
Stekník Za ohradou	13,8	7,2	0,32
Stekník Pod lesem	14,5	7,9	0,30
Mradice	13,6	8,0	0,31
Kněževes	15,0	9,2	0,30
Mukoděly	17,1	10,9	0,38
<b>Průměr</b>	<b>14,7</b>	<b>8,6</b>	<b>0,31</b>

### Závěr

Výsledky poukazují na náročnost šlechtění chmele na vysoký obsah DMX. Získaná potomstva i po rodičích s vysokým obsahem DMX vykazují vysokou variabilitu tohoto znaku a velmi málo genotypů vykazuje požadovaný obsah DMX nad hranicí 0,25 %. Získané dílčí výsledky poukazují na to, že pravděpodobně bude obsah DMX založen polygeně. To znamená, že bude obtížné získat nové genotypy s vysokým obsahem DMX. Dále je patrné, že obsah DMX u odrůdy Vital je ovlivněn prostředím. Z dílčích výsledků v rámci šlechtitelského materiálu je patrné, že Vital má v šlechtitelské školce obsah DMX 0,27 %. Současně byl v této školce nalezen (stejně podmínky) genotyp s obsahem DMX 0,46 %! Dosažené výsledky poukazují, že se daří získat nové genotypy chmele pro farmaceutické využití.

### Literatura:

- Analytica EBC, Metod 7.7, 1997: European Brewery Convention, Getränke Fachverlang,  
 KROFTA K., NESVADBA V., 2008: The contents of xanthohumol and desmethylxanthohumol in genetic sources of hop (*Humulus lupulus L.*). International Scientific meeting Use Genetic Resource of Cultivated Plant. Žatec: 19-23.  
 MIRANDA, C. I. et al., 2000: Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. Cancer Letters 149.  
 NESVADBA, V., KROFTA, K.; 2003: Practical knowledge and criteria influencing effectivity of breeding process in the CR. International Hop Growers Convention, Proceedings of the Scientific Commission, Dorna - Žalec, Slovenia 24 - 27 June 2003: 101 – 105  
 NESVADBA V., 2007: Vliv obsahu a složení chmelových pryskyřic na obsah xanthohumolu a desmethyloxanthohumolu u chmele (*Humulus lupulus L.*). Sborník přednášek Chmelařský kongres 2007.  
 TOBE, H. et al, 1997.: Bone resorption inhibitors from hop extract. Biosci. Biotech. Biochem. 61.

### Poděkování

Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného projektu 2B06011 Vývoj genotypů chmele pro biomedicínální a farmaceutické účely, který podporuje MŠMT ČR. Poděkování patří technickým pracovnícům Marii Slabyhouldkové a Marii Hartmanové, které zajišťovaly technické práce při tvorbě nových genotypů chmele.



# GENOTYPOVÉ ROZDIELY REPKY OLEJKY Z HLADISKA OBSAHU OLEJA, KVALITY OLEJA A PRODUKCIE SEMIEN

## GENOTYPIC DIFFERENCES OF RAPESEED FROM THE ASPECT OF OIL CONTENT, OIL QUALITY AND SEED PRODUCTION

Elena MASAROVIČOVÁ – Katarína KRÁĽOVÁ – Ľubica MALOVCOVÁ – Jozef SUROVČÍK – Marián BRESTIČ – Katarína OLŠOVSKÁ

*Genotypic differences of oil content, oil composition and seed production were studied in six line varieties of Brassica napus L. (ES Astrid, Atlantic, Californium, Labrador, Manitoba and Oponent) which represented 3 major production region of Slovakia. For experiment the standard agrotechnical procedure was used. Seed were sown on August 27, 2007 and harvest has been done on July 11, 2008. It was found that the lowest seed production but also low values of lipids and oil content has var. Californium. This variety together with var. Oponent and Labrador had higher ratio of low molecular components in the oil. For these varieties low values of iodine number as well as phosphorus content were estimated. Content of the most important of fatty acids - oleic acid ranged from 60.02 % (Labrador) to 65.80 % (Atlantic). Seeds of all studied rapeseed varieties had low content of linolenic acid (8.34 – 9.59) which is important for oxidation stability of FAME. From this aspect is var. Atlantic the most suitable for practical application. The content of erucic acid in the oil of tested varieties ranged from < 0,01 do 0,05%.*

*Key words: Brassica napus L., fatty acids, line varieties, rapeseed oil, seed production*

### Úvod

Kapusta repková (repka olejka forma ozimná, *Brassica napus* L. – ďalej len repka) je na Slovensku dôležitou plodinou nielen v potravinárskom, farmaceutickom a chemickom priemysle, ale v súčasnosti získava čoraz viac na význame aj ako energetická plodina (prehľadne MASAROVIČOVÁ et al. 2008). Preto sa pozornosť základného a aplikovaného výskumu sústreďuje na zosúladienie jej produkčných parametrov s kvantitatívnymi a kvalitatívnymi parametrami oleja. Situácia je však o to zložitejšia, že repka patrí medzi naše agrotechnicky najnáročnejšie plodiny (SUROVČÍK, 2000) a jej úrodotvorné prvky (počet rastlín, počet šesľů na rastline, počet semien v šesľuli, hmotnosť tisíc semien) sú vo výraznom inverznom vzťahu. V našom príspevku sme sa zamerali na štúdium genotypových rozdielov (odrodovej variability) repky so zreteľom na obsah oleja, kvalitu oleja a produkciu semien.

### Materiál a metódy

Na experiment sa použili semená šiestich liniových odrôd repky: ES Astrid, Atlantic, Californium, Labrador, Manitoba, a Oponent. Odroda ES Astrid je stredne skorá odroda nízkeho typu s veľmi dobrou odolnosťou proti poliehaniu a vyzimovaniu s rovnomerným dozrievaním semena, vyznačujúca sa vyhovujúcim zdravotným stavom a dobrou technologickou kvalitou. V SR dosahuje najvyššie úrody v repárskej výrobní oblasti (RVO). Obsah oleja v sušine semena dosahuje v priemere 42,8 %. Odroda Atlantic je stredne skorá odroda vysokého typu so stredne dobrou odolnosťou proti poliehaniu, s vyhovujúcou odolnosťou proti vyzimovaniu, s rovnomerným dozrievaním semien a s vyhovujúcou technologickou kvalitou. V SR dosahuje najvyššie úrody v zemiakárskej výrobní oblasti (ZVO). Obsah oleja v sušine semena dosahuje v priemere 44,0 %. Odroda Californium je stredne skorá až skoršia odroda stredne vysokého typu s dobrou odolnosťou proti poliehaniu, ako aj proti vyzimovaniu, s rovnomerným dozrievaním semien, s dobrým zdravotným stavom a vyhovujúcou technologickou kvalitou. V SR dosahuje najnižšie úrody v kukuričnej výrobní oblasti (KVO), úrody v RVO a ZVO sú porovnateľné. Obsah oleja v sušine semena je v priemere 43,3 % (UKSUP, 2003). Odroda Labrador je neskorá odroda nízkeho až stredne vysokého typu, stredne odolná proti poliehaniu, s vyhovujúcou odolnosťou proti vyzimovaniu. Obsah oleja v sušine semena je nízky až stredne vysoký. Vhodná je pre pestovanie vo všetkých výrobných oblastiach (OSEVAUNI, 2008). Odroda Manitoba je neskorá odroda stredne vysokého typu so strednou odolnosťou proti poliehaniu, s vyhovujúcou odolnosťou proti vyzimovaniu, s dobrou rovnomernosťou dozrievania semien, vyhovujúcim zdravotným stavom a vyhovujúcou technologickou kvalitou. V SR dosahuje najnižšie úrody v RVO. Obsah oleja v sušine semena je v priemere 44,2 % (UKSUP, 2003). Oponent je neskorá odroda vysokého typu, stredne odolná proti poliehaniu, s vyhovujúcou odolnosťou proti vyzimovaniu. Vyznačuje sa vysokou plasticitou, a tým aj vysokými úrodami vo všetkých výrobných oblastiach. Obsah oleja v sušine semena je vysoký, v r. 2004 v ČR tento dosiahol až 49,15% (ODRŮDOVÁ SKLADBA A NOVOŠLECHTĚNÍ SDRUŽENÍ „ČESKÁ ŘEPKA“, 2008). Z vyššie uvedených charakteristík vyplýva, že testované odrody repky zastupovali všetky 3 základné výrobné oblasti: kukuričnú (Californium), repársku (Labrador, Manitoba) aj zemiakársku výrobnú oblasť (ES Astrid a Oponent).

Semená sa vysiali po predplodine pšenica ozimná dňa 27.8.2007 na experimentálnych plochách SCPV-VÚRV v Borovciach. Po zbere predplodiny sme vykonali podmiatku tanierovým náradím, pôda sa poorala, zvalcovala a pohnojila hnojivom NPK v dávke 200 kg/ha (15:15:15). Proti burinám sme aplikovali prípravok Triflurex 48 EC v dávke 2 l/ha a zapracovali sme ho do pôdy kompaktorom súčasne s predsejbovou prípravou. Po sejbe (27.08.2007) sme preemergentne aplikovali herbicíd Butisan star v dávke 1,5 l/ha, 09.10.2007 sme aplikovali morforegulátor Caramba v dávke 1 l/ha. Na jar sme porast prihnojili hnojivom Sulfamo 23 (23 % N, 31 % SO<sub>3</sub>, 3% MgO) v dávke 200 kg/ha. Pokus sa realizoval na experimentálnych parcelách (10 m<sup>2</sup>) v 4 opakovaníach. Zber úrody repky sme vykonali 11.07.2008. Zo semien sa odobrala vzorka pre kvalitatívne a kvantitatívne analýzy repkového oleja (obsah oleja v semenách, obsah a zloženie mastných kyselín, resp. u odrôd Californium, Manitoba a Oponent aj číslo zmydelnenia, jódové číslo a obsah fosforu), ktoré vykonalo akreditované pracovisko Štátny veterinárny a potravinový ústav v Bratislave, Skúšobné laboratórium, podľa aktuálnych platných noriem.

## Výsledky a diskusia

Kvalita semien repky je výsledkom pôsobenia 4 faktorov: genetického základu, charakteru lokality, agrotechniky pestovania a priebehu počasia v príslušnom vegetačnom období. Kvalita oleja je determinovaná zložením nenasýtených mastných kyselín, zastúpené sú hlavne kyselina olejová, linolová, linolénová, eruková a eikosenová (prehľadne VAŠÁK et al. 1997). V našej práci sme sa preto zamerali na štúdium obsahu týchto kyselín vo vzťahu k úrode semien 6 líniových odrôd repky, ktoré zastupovali všetky 3 základné výrobné oblasti pestovania plodín na Slovensku.

Zo sledovaných odrôd najnižšiu priemernú úrodu semena vykazovala odroda Californium, vyznačujúca sa aj relatívne nízkym obsahom tuku, čo sa následne prejavilo v nižšej produkcii oleja. Vysokú priemernú úrodu semien a najvyššiu produkciu oleja mala nová česká odroda repky Oponent (Tab.1). Výsledky sú v súlade s údajmi ÚKZUZ, Brno pre rok 2003 a 2004, ktorý udáva 46,24, resp. 49,15 % obsahu oleja v sušine semena uvedenej odrody (ODRŮDOVÁ SKLADBA A NOVOŠLECHTĚNÍ SDRUŽENÍ „ČESKÁ ŘEPKA“, 2008). Na základe produkčných štúdií JAMBOR (2007) tiež odporúča odrodu Oponent ako vhodnú pre ZVO. Číslo zmydelnenia je definované ako množstvo miligramov KOH potrebných na kompletnú premenu 1 gramu tuku na glycerol a mydlo. Číslo zmydelnenia 3 študovaných odrôd klesalo v poradí Californium, Oponent, Labrador, pričom vyššie číslo zmydelnenia indikuje tuk s vyšším podielom nízkomolekulových komponentov (Tab. 1).

Tabuľka 1: Odrodové rozdiely študovaných produkčných parametrov repky a niektorých kvalitatívnych parametrov (číslo zmydelnenia, obsah fosforu a jódové číslo) repkového oleja.

Odroda	Priemerná úroda semena ± s $\bar{x}$ [t/ha]	Obsah tuku [%]	Produkcia oleja [t/ha]	Č. zmyd. [mgKOH/kg tuku]	Fosfor [mg/kg]	Jód. č. [%]
ES ASTRID	5,49 ± 0,84	42,5	2,333	-	-	-
ATLANTIC	5,48 ± 0,28	40,9	2,241	-	-	-
CALIFORNIUM	4,54 ± 0,65	42,2	1,916	217,0	6,30	114,0
LABRADOR	5,29 ± 0,62	40,7	2,153	-	-	-
MANITOBA	5,00 ± 0,72	47,9	2,395	206,0	7,03	116,0
OPONENT	5,48 ± 0,85	44,3	2,428	209,0	6,23	116,00

Podľa EN 14214 je maximálna povolená hodnota jódového čísla pre repkový olej 120. Jódové číslo je kvantitatívna miera množstva nenasýtených väzieb prítomných v danom tuku; definované je ako množstvo jódu potrebného saturovať 100 gramov tuku, pričom vyššie hodnoty jódového čísla znamenajú vyššiu mieru nenasýtenosti tuku. Hodnoty uvedeného parametra boli u týchto 3 odrôd vyrovnané (Tab. 1) a zodpovedali kritériám stanoveným v EN 14214 (porovnaj Cvengroš, 2008).

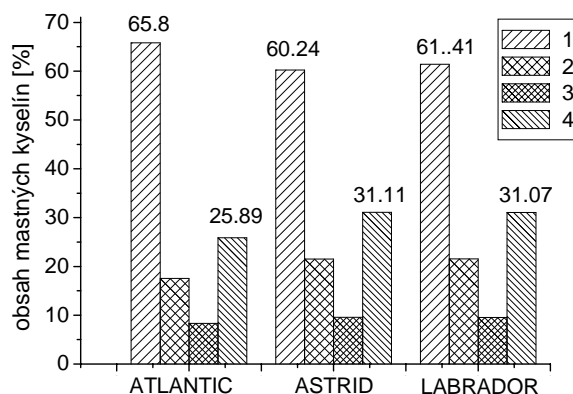
Je známe, že fosfor prítomný v motorových olejoch, resp. v palivách funguje ako katalytický jed. Vytvára tiež popol, ktorý ako brúsna pasta mechanicky poškodzuje motor (Matějovský, 2008). Preto je jeho obsah vo FAME (metyl ester mastných kyselín) determinovaný v prEN 14107 na maximálnu hodnotu 10 mg/kg. Prezentované výsledky (Tab. 1) potvrdzujú nízky obsah fosforu v analyzovaných vzorkách oleja, ktorý sa pohyboval v rozmedzí od 6,23 do 7,03 mg/kg.

Odrodové rozdiely obsahu a zloženia mastných kyselín v repkovom oleji sú zosumarizované v Tab. 2. Obsah najdôležitejšej mastnej kyseliny z hľadiska výroby MERO – mononenásytenej kyseliny olejovej sa u študovaných 6 odrôd pohyboval od 60,02 % (Labrador) do 65,80 % (Atlantic).

Pre posúdenie kvality biokomponentu paliva sú dôležitými parametrami oxidačná stabilita a chladová odolnosť repkového oleja (BUCHTA, 2004). Oxidačnú stabilitu znižuje vyšší podiel polynenasýtených mastných kyselín, a to kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej. Na druhej strane nižší podiel uvedených kyselín znižuje chladovú odolnosť oleja (JEVIČ a ŠEDIVÁ, 2004). Podľa EN 14214 je maximálna povolená hodnota obsahu metylesteru kyseliny linolénovej 12 hm. %. Z tabuľky 2 vyplýva, že v prípade všetkých študovaných vzoriek sú hodnoty tohto parametra evidentne nižšie, pričom sa pohybujú od 8,34 % (Atlantic) do 9,59 % (ES Astrid). Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že olej získaný zo semien odrody Atlantic bude vykazovať najvyššiu oxidačnú stabilitu. U odrôd ES Astrid a Labrador je zjavné zvýšenie obsahu polynenasýtených mastných kyselín na úkor kyseliny olejovej (tab. 2, obr.1). V prípade všetkých 6 študovaných druhov sa obsah kyseliny erukovej pohyboval od < 0,01 do 0,05%, čo spĺňa kritéria STN 46 2300-2.

Tabuľka 2: Odrodové rozdiely obsahu a zloženia mastných kyselín v repkovom oleji.

Odroda	Celkový obsah nasýtených kyselín [%]	Obsah kyseliny olejovej [%]	Obsah kyseliny linolovej [%]	Obsah kyseliny linolénovej [%]	Celk. Obsah polynenasýt. kyselín [%]
ES ASTRID	7,24	60,24	21,52	9,59	31,11
ATLANTIC	6,94	65,80	17,55	8,34	25,89
CALIFORNIUM	6,72	64,04	18,64	9,22	27,96
LABRADOR	7,52	60,02	21,55	9,52	31,07
MANITOBA	6,65	64,60	18,88	8,33	27,21
OPONENT	7,00	62,12	20,08	9,31	29,39



Obrázok 1: Percentuálny podiel kyseliny olejovej (1), linolovej (2) a linolénovej (3), ako aj celkový podiel polynenasýtených mastných kyselín (4) v oleji odrôd repky Atlantic, ES Astrid a Labrador.

## Záver

Produkčné štúdium repky ukázalo, že zo všetkých sledovaných odrôd najnižšiu úrodu semena dosiahla odroda Californium, ktorá sa vyznačovala aj relatívne nízkym obsahom tuku, čo sa následne prejavilo v nižšej produkcii oleja. Na základe stanovenia hodnôt čísla zmydelnenia vyplynulo, že odrody Californium, Oponent a Labrador mali vyšší podiel nízkomolekulových komponentov v oleji. Hodnoty jódového čísla, predstavujúceho vyššiu mieru nenasýtenosti tuku boli u týchto odrôd vyrovnané a obsah fosforu dosahoval nízke hodnoty. Obsah najdôležitejšej mastnej kyseliny z hľadiska výroby FAME (metylester mastných kyselín) – kyseliny olejovej sa pohyboval od 60,02 % (Labrador) do 65,80 % (Atlantic). Semená všetkých študovaných odrôd repky mali nízky obsah kyseliny linolénovej (8,34 -9,59), čo je dôležité pre oxidačnú stabilitu FAME. Z tohto aspektu sa ukázala ako najvhodnejšia odroda Atlantic. V prípade všetkých 6 odrôd sa obsah kyseliny erukovej v oleji stanovil od < 0,01 do 0,05%.

**Pod'akovanie:** Práca bola finančne podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR, grant č. AV 4/2037/08.

### Literatúra:

- BUCHTA, J., 2004: Motorové oleje – biopalivá.  
<http://www.cappo.cz/veletrh2004/buchta2.html>
- CVENGROŠ, T., 2008: Motorové palivá – ich súčasný stav a perspektívy.  
<http://biom.cz/index.shtml?x=2117556>. ISSN: 1801-2655
- EN 14214:2003 (E) Automotive Fuels – FAME for Diesel Engines – Requirements and Test Methods.  
<http://www.biofuels.arc.ab.ca/Biofuels/Specifications/EN+14214+2003/Default.ksi>
- JAMBOR, M., 2007: Výsledky poloprevádzkových odrodových pokusov s ozimnou repkou olejkou.  
<http://www.nasepole.sk/pole11/clanok.asp?ArticleID=20>
- JEVIČ, P., ŠEDIVÁ, Z., 2004: Využití zemědělské produkce k nepotravinářským účelům.  
<http://212.71.135.254/vuzt/vyzkum/2004/jevic1.htm>
- MASAROVIČOVÁ, E., KRÁĽOVÁ, K., BRESTIČ, M., OLŠOVSKÁ, K., 2008: Produkčný potenciál repky olejky v environmentálnych podmienkach Slovenska z hľadiska využitia vo výrobe „FAME“. Motorové palivá 2008. Medzinárodné sympóziu, Tatranské Matliare, 23.-26.6.2008.
- ODRŮDOVÁ SKLADBA A NOVOŠLECHTĚNÍ SDRUŽENÍ „ČESKÁ ŘEPKA“, 2008  
<http://www.ceskarepka.cz/odrudy.htm>
- MATĚJOVSKÝ, V., 2008  
[http://www.agroweb.cz/Obejde-se-zemedelstvi-bez-nafty\\_s253x31672.html](http://www.agroweb.cz/Obejde-se-zemedelstvi-bez-nafty_s253x31672.html)
- OSEVAUNI: Řepka ozimá - liniové odrůdy.  
<http://www.osevauni.cz/osiva/repka-ozima-liniové-odrudy.php>
- SUROVČÍK, J.: Úrodová reakcia repky olejky f. ozimnej na aplikáciu pesticidov. Sborník referátů z XV. České a Slovenské konference o ochraně rostlin. September 12. - 14., 2000, Vyd. Konvoj, p. 253-254.
- UKSUP: Popisy registrovaných odrůd repky olejky. Forma ozimná Extra. 2003  
[www.uksup.sk/download/odrudy/20080725\\_popisy\\_repka.pdf](http://www.uksup.sk/download/odrudy/20080725_popisy_repka.pdf)
- VÁŠÁK J., FÁBRY A., ZUKALOVÁ H., MORBACHER J., BAANYK P. et al., 1997: Systém výroby řepky. Česká a slovenská pěstitelská technologie ozimné řepky pro roky 1997-1999. Vyd. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejin, Praha, ČR, p.116.

## TECHNOLOGICKÁ KVALITA VYBRATÝCH GENOTYPOV TVRDEJ PŠENICE TECHNOLOGICAL QUALITY OF SOME GENOTYPES TRITICUM DURUM

Eva MEDVECKÁ – Klaudia JOMOVÁ – Ján KRAIC – Zuzana ŠRAMKOVÁ – Edita GREGOVÁ

*The quality of special final products made from Triticum durum depends on the content and the composition of gluten. The quality of gluten is determined by protein characteristic. Two types of LMW-GS marked as LMW-1 (linked with  $\gamma$ -42 gliadins) and LMW-2 (linked with  $\gamma$ -45 gliadins) are associated with poor and good technological quality. These alleles are used as molecular markers of technological quality of Triticum durum. We identified in the collection of 95 genotypes of Triticum durum 68 genotypes as LMW-2 type, 7 genotypes as LMW-1 type and 20 genotypes as the another types.*

*Key words:  $\gamma$ -gliadin, technological quality, Triticum durum*

### Úvod

Pšeničné gliadíny (Gli) sú vysokou polymorfickou skupinou zásobných bielkovín semien zložených zo sérií komplexných genetických lokusov nájdených na niekoľkých ramenách chromozómov. Predstavujú gliadínové bielkoviny lepku, ktoré sa nachádzajú v extrakte múky ako monomerické polypeptidy. V praxi boli Gli rozdelené podľa pohyblivosti ku katóde v polyakrylamidovom géli pri pH 3 do skupín označených ako  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadíny. Prítomnosť buď  $\gamma$ -42 alebo  $\gamma$ -45 gliadínu v genotypoch pšenice tvrdej sa výrazne vzťahuje na pevnosť lepku a kvalitu varenia cestovín (DAMINAUX et al., 1978 a KOSMOLAK et al., 1980). Genotypy obsahujúce  $\gamma$ -42 gliadín majú slabú roztiažnosť lepku a slabú kvalitu varenia cestovín v porovnaní s genotypmi obsahujúcimi  $\gamma$ -45 gliadín. Dané genotypy môžu byť ľahko a rýchlo klasifikované pomocou A-PAGE z polovičných semien umožňujúc tak zároveň následné rozmnoženie zo zvyšku zárodka. Väčšina genotypov tvrdej pšenice má buď  $\gamma$ -45 alebo  $\gamma$ -42 gliadínové bandy. Spoločne s týmito dvoma najčastejšími alelickými  $\gamma$ -gliadínmi boli tiež zdokumentované niektoré ďalšie zriedkavo sa vyskytujúce  $\gamma$ -gliadíny:  $\gamma$ -47;  $\gamma$ -43,5;  $\gamma$ -44;  $\gamma$ -44,5;  $\gamma$ -40 (MARGIOTTA et al., 1987; OAK et al., 2002; SISSONS a BATEY, 2003).

### Materiál a metódy

V práci boli použité vybrané genotypy tetraploidnej pšenice tvrdej (*Triticum durum* Desf.). Všetky vzorky genotypov boli získané z kolekcie genetických zdrojov pšenice *Génovej banky semenných druhov Slovenskej republiky* vo Výskumnom ústave rastlinnej výroby v Piešťanoch a z pracovnej kolekcie pšenice tvrdej.

Zásobné bielkoviny sme extrahovali podľa metodiky ISTA (WRIGLEY, 1992) z endospermu polovice suchého a zreleho zrna jednotlivých genotypov. Pri elektroforetickom delení gliadínov sme postupovali podľa referenčnej metódy schválenej medzinárodnou organizáciou (ISTA, DRAPER 1987) s využitím elektrolytu pripraveného zmiešaním glycínu a kyseliny octovej s pH 3,2. Gliadíny boli separované v kontinuálnych polyakrylamidových géloch v kyslom prostredí s pH 3,2 (DRAPER, 1987). Frakcie bielkovín sme farbili v roztoku pripravenom zmiešaním 95 ml 10% kyseliny trichlóroctovej a 5 ml 0,5% roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 v etanole. Genetickú interpretáciu gliadínových profilov analyzovaných vzoriek tvrdej pšenice sme realizovali porovnaním so štandardami tvrdej pšenice (*Triticum durum* Desf.) Basa (LMW-1) a Soldur (LMW-2).

### Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géli uskutočniť analýzy gliadínov pšenice tvrdej a na základe týchto analýz posúdiť technologickú kvalitu vybraných genotypov z hľadiska vhodnosti použitia na výrobu cestovín. V pracovnej kolekcii 80 genotypov a súbore 15 portugalských genotypov pšenice tvrdej (*Triticum durum* Desf.) sme pomocou A-PAGE analýzy zisťovali prítomnosť špecifických gama gliadínov v prolaminovom spektre zásobných bielkovín.

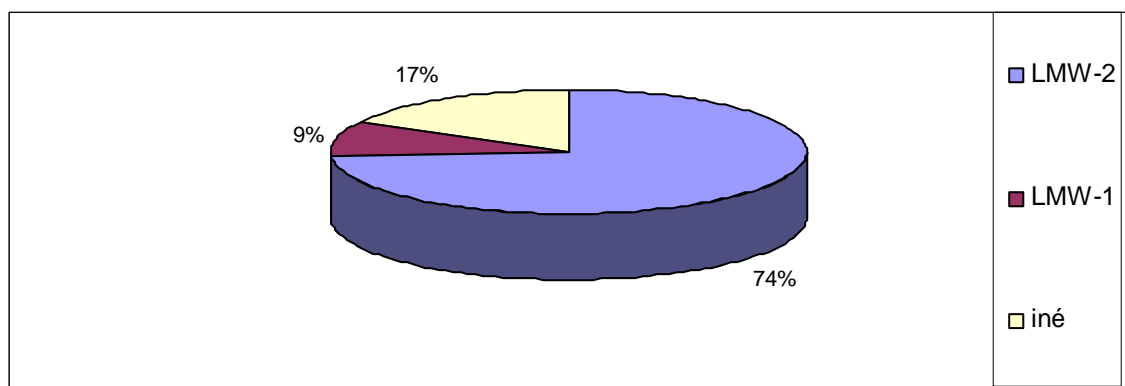
Na základe alelickej kompozície danej lokusom Gli-B1/Glu-B3 možno genotypy tvrdých pšeníc rozdeliť na dva hlavné typy. Prvý typ má v gliadínovom profile inkorporovaný  $\gamma$ -gliadín 42 ( $\gamma$ -42), ktorý je asociovaný s LMW-GS typu 1 (LMW-1). Druhý typ obsahujúci  $\gamma$ -gliadín 45 ( $\gamma$ -45) sa viaže k LMW-GS typu 2 (LMW-2). Dané gliadíny sú markermi dobrej ( $\gamma$ -45) a slabej ( $\gamma$ -42) kvality varenia cestovín.

V súbore 15 portugalských genotypov sme prítomnosť  $\gamma$ -gliadínu 45 zistili v prípade 9 genotypov (tab. 1). Tieto genotypy možno označiť ako LMW-2 genotypy. V danom súbore žiadny z genotypov nevykazoval prítomnosť  $\gamma$ -gliadínu 42, ktorý je ukazovateľom slabej kvality varenia cestovín. K podobným výsledkom dospeli aj iní autori (IGREJAS et al., 1999).

Tabuľka 1: LMW-2 typy portugalských genotypov pšenice tvrdej

Poradové číslo	Genotyp
1.	Agri dur
2.	Aracena
3.	Ariesol
4.	Castico
5.	Epidur
6.	Gramizo
7.	Helvio
8.	Trovador
9.	Valforte

Z pracovnej kolekcie 80 genotypov pšenice tvrdej sme 59 identifikovali ako LMW-2 typ, 7 ako LMW-1 typ a 14 ako iné typy (obrázok 1).



Obrázok 1: Percentuálne zastúpenie jednotlivých LMW-typov analyzovaných 80 genotypov pracovnej kolekcie tvrdej pšenice

## Záver

V našich experimentoch sme zo súboru 15 portugalských genotypov tvrdej pšenice 9 identifikovali ako LMW-2 typy, ktorých múka je vhodná na ďalšie spracovanie pre prípravu cestovín. Z pracovnej kolekcie 80 genotypov tvrdej pšenice možno predikovať nižšiu technologickú kvalitu semoliny a vyššiu technologickú kvalitu semoliny 59 genotypov.

## Literatúra

- DAMIDAUX, R.E. – AUTRAN, J.C. – GRIGANAC, P. – FEILLET, P. 1978. Evidence of relationships useful for breeding between the electrophoretic patterns of gliadins and the viscoelastic properties of the gluten in *Triticum durum* (in French). Desf. CR Acad. Sci. Paris, Ser. D 287, 1978, p. 701-704
- DRAPER, S.R. 1987. ISTA variety committee. Report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986. Seed Sci. Technol., 15, 1987, p. 431-434
- IGREJAS, G. – GUEDES-PINTO, H. – CARNIDE, V. – BRANLARD, G. 1999. The high and low molecular weight glutenin subunits and  $\omega$ -gliadin composition of bread and durum wheats commonly grown in Portugal. Plant Breeding, 118, 1999, p. 297-302
- KOSMOLAK, F.G. – DEXTER, J.E. – MATSUO, R.R. – LEISLE, D. – MARCHYLO, B.A. 1980. A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregrams. Can. J. Plant Sci., 60, 1980, p. 427-432
- MARGIOTTA, B. – COLAPRICO, G. – LAFIANDRA, D. 1987. Variation of protein. in: Proc. 3rd Int. Workshop of Gluten Proteins. R. Lasztity and F. Bekes, Eds. World Scientific: Singapore, 1987, p. 314-330
- OAK, M.D. – TAMHANKAR, S.A. – RAO, V.S. – BHOSALE, S.B. 2002. Allelic variation at Glu-1, Glu-3 and Gli-B1 loci in Indian durum wheats. J. Genet. Breed., 56, 2002, p. 185-192
- SISSONS, M.J. – BATEY, I.L. 2003. Protein and starch properties of some tetraploid wheats. Cereal Chem., 80, 2003, p. 468-475
- WRIGLEY, C.W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: Seed Analysis, 1992, p. 17-41

# METABOLICKÉ INŽENÝRSTVÍ ROSTLIN: VITAMÍNY, MINERÁLNÍ LÁTKY PLANT METABOLIC ENGINEERING: VITAMINS AND MINERALS

Klára PÍŽOVÁ<sup>1</sup> – Ludmila OHNOUTKOVÁ<sup>1,2</sup>

*One of the main aims of cultivation is increasing of food quality. Individual plant metabolic pathways are targets for studying and sequential using of recombinant DNA technology for increasing food nutritional value. This review is focused on using of plant metabolic engineering for purpose of increasing content of vitamins a mineral substances. It describes necessary components of recombinant DNA molecule and the most frequent transformation methods as well. Furthermore there is in details explained how is possible to modulate biosynthetic pathways of vitamins C and E and carotenoids (especially beta-carotene as vitamin A precursor) and next to increase iron content in plants and its utility for human organism.*

*Key words: Recombinant DNA technology; plant transformation; vitamins; minerals.*

This work was supported by the grant No.1M06030 of the Ministry of Education and Sport of the Czech Republic.

## Review

### Úvod

Na počátku historie lidé systematicky vybrali plodiny na kterých závisí jejich výživa a tyto vybrané rostliny jsou dodnes zdrojem živin, vitamínů a minerálních látek potřebných pro naše zdraví. Zemědělci se vždy snažili, aby jejich plodiny měly co nejlepší a nejvýhodnější vlastnosti, mimo jiné aby také měly co největší obsah výživných látek. Moderní genetika a biotechnologie poskytují řadu možností, jak zvýšit kvalitu potravin a stále více se zaměřuje na produkci výživově hodnotných plodin obsahujících vyšší procento vitamínů a minerálních látek (OHNOUTKOVÁ a AYALEW, 2006). Metabolické dráhy mohou být cíleně řízeny a upravovány genetickou modifikací, vnesením určitého transgenu (rekombinantní DNA) do genomu rostliny.

Metabolické inženýrství je definováno jako řízení jedné z mnoha enzymatických reakcí tak, aby produkovaly nové sloučeniny v organismu, zvýšily produkci stávajících sloučenin, nebo zprostředkovaly degradaci určitých sloučenin. Toto mladé odvětví vědy dosáhlo za posledních 32 let velmi výrazného pokroku (DELLA PENNA, 2001).

### *Některé významné transgeny pro zvýšení výživové hodnoty plodin*

Úpravy metabolických drah u vybraných druhů rostlin jsou především soustředěny na důležité vitamíny, mezi které patří vitamín A, vitamín C, vitamín E. U obsahu minerálních látek je to zvýšení obsahu železa a umožnění dostupnosti kationtů z pevné vazby kterou způsobují endogenní fytyáty.

### *Modifikace biosyntézy karotenoidů*

Karotenoidy jsou rostlinné pigmenty nezbytné pro fotosyntézu a fungují jako atraktanty v některých orgánech vyšších rostlin. Obratlovci nedokáží syntetizovat karotenoidy, ale potřebují je pro produkci retinoidů (např. retinalu, hlavního očního pigmentu, nebo retinolu, nejčastější formy vitamínu A). Mezi karotenoidy patří také β-karoten, který je přímým prekurzorem vitamínu A (DUCREUX et al., 2005).

Prvním krokem biosyntézy karotenoidů je kondenzace dvou geranylgeranyl-difosfátů pomocí fytoensyntázy za vzniku fytoenu. Fytoen má devět dvojných vazeb a je dále desaturován na lykopen s třinácti dvojnými vazbami. U bakterií tuto reakci katalyzuje pouze jeden enzym, fytoendesaturáza, která přidává čtyři dvojně vazby, ale u rostlin je potřeba dvou enzymů fytoendesaturázy a ζ-karotendesaturázy, z nichž každý přidává dvě dvojně vazby. Lykopen může být dále cyklizován na obou koncích molekuly, tento krok je větvičím bodem této biosyntetické dráhy (YU et al., 2007). Lykopen je substrátem pro dvě kompetující cyklázy: lykopen ε-cyklázu (ε-CYC), která přidává epsilon kruh na jeden konec lykopenu, a lykopen β-cyklázu (β-CYC), která přidává beta kruh na jeden nebo oba konce lykopenu (DIRETTO et al., 2006). Pokud se vytvoří dva beta kruhy, produktem je β-karoten (tato větev metabolické dráhy je tedy katalyzována pouze β-cyklázou), pokud se vytvoří jeden beta a jeden epsilon kruh, produktem je α-karoten (pro tuto větev metabolické dráhy jsou tedy potřebné obě cyklázy), (SHEWMAKER et al., 1999).

U hospodářsky významných plodin bylo provedeno mnoho pokusů o zvýšení obsahu β-karotenu a to několika způsoby:

- Zvýšení obsahu karotenoidů overexpresí genu pro fytoensyntázu (SHEWMAKER et al., 1999; aj.)
- Zvýšení obsahu karotenoidů overexpresí genu pro lykopen β-cyklázu (ROSATI et al., 2000)
- Zvýšení obsahu karotenoidů potlačením exprese genu pro lykopen ε-cyklázu (DIRETTO et al., 2006; aj.)
- Zvýšení obsahu karotenoidů vložení více genů funkční metabolické dráhy (PAINE et al., 2005; aj.)

### *Modifikace biosyntézy vitamínu C*

Vitamín C (kyselina L-askorbová) je naprosto nezbytná složka lidské potravy, potřebná zvláště pro kardiovaskulární funkce, vývoj buněk imunitního systému, pojivové tkáně a vstřebávání železa. Ačkoliv rostliny

a většina zvířat dokáží sami syntetizovat kyselinu L-askorbovou (L-AsA), lidem chybí L-gulonon-1,4-lakton-oxidoreduktáza, enzym potřebný pro poslední krok syntézy L-AsA. Protože L-AsA nemůže být v těle skladována, musí být pravidelně přijímána z potravy, hlavně z rostlin bohatých na L-AsA. Aktuální doporučená denní dávka vitamínu C pro dospělého člověka je 75 – 90 mg, ale doporučuje se zvýšit na 200 mg. Biosyntetická dráha L-AsA v rostlinách a u živočichů je odlišná. U živočichů je D-glukóza přeměňována na L-AsA přes D-glukoronovou kyselinu, L-gulonovou kyselinu a L-gulonon-1,4-lakton, zatímco u rostlin L-AsA vzniká z D-glukózy přes L-galaktózu a L-galaktonon-1,4-lakton, přímý prekurzor L-AsA (Chen a kol., 2003). V některých rostlinách existuje i další možná biosyntetická dráha L-AsA, a to přes kyselinu D-galakturonovou, kyselinu L-galaktonovou a L-galaktonon-1,4-lakton (AGIUS a kol., 2003).

Ke zvýšení obsahu vitamínů C bylo využito několik způsobů:

- Alternativní cesta biosyntézy kyseliny askorbové v rostlinách (využití genů syntetické dráhy živočichů), (JAIN a NESSLER, 2000)
- Zvýšení obsahu vitamínu C v rostlinách díky zvýšené obnově askorbátu (CHEN et al., 2003)
- Zvýšení obsahu vitamínu C v rostlinách pomocí overexprese reduktázy D-galakturonové kyseliny (AGIUS et al., 2003)

#### *Modifikace biosyntézy vitamínu E*

Vitamín E je důležitý pro lidské zdraví, likviduje volné radikály a zabraňuje tak oxidaci lipidů. Vyšší příjem vitamínu E pomáhá předcházet výskytu kardiovaskulárních onemocnění a některých druhů rakoviny, posiluje imunitní systém a zpomaluje degenerativní účinky stárnutí. Doporučená denní dávka vitamínu E u dospělého člověka je 15 - 30 mg. Nejvyšší aktivitu (100 %) ve funkci vitamínu E má  $\alpha$ -tokoferol, ostatní vykazují nižší aktivitu (50 % pro  $\beta$ -tokoferol, 10 % pro  $\gamma$ -tokoferol a 3 % pro  $\delta$ -tokoferol). Jedinou formou vitamínu E, kterou je lidská krev schopna vázat a přenášet do buněk je  $\alpha$ -tokoferol, jeho přednostní absorpci a rozmístění v lidském organismu zajišťuje specifický protein (CHEN et al., 2006).

První doloženou reakcí biosyntézy tokochromanolů je prenylace kyseliny homogentisové a fityldifosfátu homogentisátfityltransferázou na 2-metyl-6-fytyl-benzochinol, což vede k tvorbě tokoferolů, zatímco prenylace kyseliny homogentisové a geranylgeranyldifosfátu homogentisátgeranylgeranyltransferázou na 2-metyl-6-geranyl-geranylbenzochinol vede k tvorbě tokotrienolů. Produkty těchto reakcí mohou být buď přímo cyklizovány tokoferolcyklázou (TC) za vzniku  $\beta$ - a  $\delta$ -tokochromanolů, nebo nejdříve metylovány metylfitylbenzochinolmetyltransferázou (MPBQMT) a pak cyklizovány (TC) za vzniku  $\alpha$ - a  $\gamma$ -tokochromanolů (KINNEY, 2006).

Hlavním zdrojem vitamínu E je rostlinná strava, především olejniný, které obsahují 330 až 2000 mg tokochromanolů v 1 g oleje. Avšak převládající formou vitamínu E v olejninách je  $\gamma$ -tokoferol, který má pouze desetinu aktivity  $\alpha$ -tokoferolu. Pomocí metabolického inženýrství je možné zvýšit jeho produkci v rostlinách jednak zvýšením intenzity biosyntézy a tím zvýšení celkového obsahu tokochromanolů a také změnou skladby tokochromanolů ve prospěch  $\alpha$ -tokoferolu (CHEN et al., 2006). Byla publikována řada prací zabývajících se zvýšením obsahu a vylepšením skladby vitamínu E pomocí klíčových enzymů jeho biosyntézy:

- Vylepšení obsahu vitamínu E pomocí změny skladby tokochromanolů ve prospěch  $\alpha$ -tokoferolu (CHO et al., 2005)
- Zvýšení celkového obsahu tokochromanolů overexpresí homogentisát-fityltransferázy (KUMAR et al., 2005; aj.)
- Zvýšení celkového obsahu tokochromanolů overexpresí p-hydroxyfenol-pyruvát-dioxygenázy (COLLAKOVA a DELLAPENNA, 2003; aj.)
- Zvýšení celkového obsahu tokochromanolů současnou overexpresí HPPD, HPT a TC (RACLARU et al., 2006)

#### *Rostliny s transgenem pro ferritin pro zvýšení obsahu železa využitelného organismem*

Obsah železa v potravinách je jednou z nejpodrobněji studovaných oblastí dietetiky. Průměrná denní potřeba železa dospělého člověka je 12- 15 mg. V živočišné stravě se železo vyskytuje převážně jako železitý ion a většina je vázaná s hemem a ve střevech se lehce vstřebává, zatímco v rostlinách je především nehemové železo, které se obtížně vstřebává. Podle odhadů je využitelnost hemového železa 15 - 40 % a nehemového 2 – 10 %. Kromě toho některé potraviny obsahují inhibitory vstřebávání železa. Takovými typickými sloučeninami které snižují využitelnost železa jsou kyselina oxalová a fytáty, vyskytující se zvláště v obilninách a luštěninách. Ferritin je jeden z nejdůležitějších proteinů skladujících železo u rostlin i živočichů. Má obrovskou zásobní kapacitu, dokáže skladovat až 4500 atomů železa.

Účinným způsobem jak zvýšit obsah železa v rostlinách je vložení genu pro ferritin do některých plodin. Geny pro ferritin byly izolovány a klonovány už z mnoha rostlinných druhů (GOTO a YOSHIHARA, 2001; aj.).

#### *Zvýšení obsahu fosforu a kationtů*

Hlavním zdrojem fosforu v rostlinách je kyselina fytová, ester *myo*-inositolu a kyseliny fosforečné. V zrnu ječmene se její obsah pohybuje od 0,97 % do 1,16 % a tvoří 70 - 80 % celkového fosforu. Kyselina fytová na sebe váže také ionty železa, manganu, hořčíku, zinku a vápníku a i tyto prvky jsou ve vazbě na kyselinu fytovou



jen těžko využitelné. Jednou z možností jak eliminovat antinutriční efekt fytátu a umožnit dostupnost důležitých minerálních látek je transgenní exprese fytasy.

Rekombinantní fytáza dokázala rozložit endogenní fytáty v endospermu obilnin a množství železa využitelného trávicím traktem se zvýšilo až trojnásobně ve srovnání s netransgenními obilninami (DRAKAKAKI et al., 2005).

## Závěr

Zemědělství představuje široké pole možností pro uplatnění geneticky modifikovaných organismů. Díky umělému výběru člověk měnil genetickou výbavu polních plodin a hospodářských zvířat již od počátků domestikace. Šlechtění bylo a je významným faktorem umožňujícím zvyšování množství produkce a ovlivňuje její stabilitu. Proces transgenozie je možné považovat za jednu z metod, která rozšiřuje genetickou různorodost výchozího šlechtitelského rostlinného materiálu. Je součástí komplexního šlechtitelského postupu 21. století, který má řadu pozitiv, může výrazně zefektivnit celý proces tvorby nových odrůd i ekonomiku jejich pěstování, ale současně se neobejde bez ostatních kroků klasického šlechtění vycházejících z kombinačních a zpětných křížení a současně selekce a komplexního hodnocení materiálů.

## Literatura

- Agius, F., Gonzalez-Lamothe, R., Caballero, J.L., Munoz-Blanco, J., Botella, M.A., Valpuesta V. (2003): Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* 21: 177-181
- Collakova, E., DellaPenna, D. (2003a): Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 632–642
- DellaPenna, D. (2001): Plant metabolic Engineering. *Plant Physiology* 125: 160-163
- Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P., Giuliano, G. (2006): Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuberspecific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol* 6: 13
- Drakakaki, G., Marcel, S., Glahn, R.P., Lund, E.K., Pariagh, S., Fischer, R., Christou, P., Stoger, E. (2005): Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Molecular Biology* 59:869–880
- Ducreux, L.J.M., Morfia, W.L., Hedley, P.E., Shepherd, T., Davies, H.V., Milkám, S., Taylor M.A (2005): Metabolic engineering of high karotenoid potato tubers containing enhanced levels of  $\beta$ -carotene and lutein. *Journal of Experimental Botany* 56: 81-89
- Goto, F., Yoshihara, T. (2001): Improvement of micronutrient contents by genetic engineering – development of high iron content crops. *Plant Biotechnol* 18: 7–15
- Chen, S., Li, H., Liu, G. (2006): Progress of vitamin E metabolic engineering in plants, *Transgenic Research* 15: 655-665
- Chen, Z., Zouny, T.E., Ling, J., Chang, S.Ch., Galie, D.R. (2003): Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3525–3530
- Cho, E.A., Lee, C.A., Kim, Y.S., Baek, S.H., De los Reyes, B.G., Yun, S.J. (2005): Expression of  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase transgene improves tocopherol composition in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Mol Cells* 19: 16–22
- Jain, A.K., Nessler, C.L. (2000): Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol. Breeding* 6: 73-78
- Kinney, A.J. (2006): Metabolic engineering in plants for human health and nutrition. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 130-138
- Kumar, R., Raclaru, M., Schüßeler, T., Gruber, J., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, K.M., Friedt, W., Enders, D., Frentzen, M., Weier D. (2005): Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds. *FEBS Letters* 579: 1357–1364
- Ohnoutková, L., Ayalew, M. (2006) Plant MetabolicEngineering: Vitamins and Minerals. In: Blatná, J., Horna, A., Zima, T. (ed.): The abstract book 6th International Conference Vitamins 2006, Pardubice September 10-13, 443-444
- Paine, J.A., Shipton, C.A., Chaggar, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L., Silverstone, A.L., Drake, R. (2005): Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* 23: 482–487
- Raclaru, M., Gruber, J., Kumar, R., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, M.K., Friedt, W., Frentzen, M., Weier, D. (2006): Increase of the tocopherol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Mol Breeding* 18: 93–107
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B., Giuliano, G. (2000): Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* 24: 413–419
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y. (1999): Seed-specific overexpression of phytoene synthase: Increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal* 20: 401-412
- Yu, B., Lydiate, D.J., Zouny, L.W., Schäfer, U.A., Hannoufa, A. (2007): Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Res.* Sep 13.

# EFEKTÍVNA REGENERÁCIA RASTLÍN PŠENICE LETNEJ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) V *IN VITRO* KULTÚRE ZRELÝCH SEMIEN EFFICIENT PLANT REGENERATION IN WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) USING MATURE EMBRYO CULTURE

Juraj FARAGÓ<sup>1,2</sup> – Zuzana BEŇOVÁ<sup>2</sup> – Natália FARAGOVÁ<sup>1</sup> – Richard MURÍN<sup>3</sup>

*Wheat (Triticum aestivum L.) is one of the most important cereal crops throughout the world. Application of biotechnological tools to genetically improve this crop depends primarily on the availability and efficiency of in vitro regeneration methods. In our research we optimized the technique of mature embryo culture using eight different callus induction media differing in the concentration of maltose (3% vs. 6%) and the type (2,4-D vs. dicamba) and concentration (2,5 mg.l<sup>-1</sup> vs. 5,0 mg.l<sup>-1</sup>) of auxins. Callus induction rate from mature embryos of cv. 'Bobwhite', as well as frequency of embryogenic calli and embryogenic callus lines, were both significantly influenced by the composition of culture media. The highest efficiency of green plant regeneration was obtained on the medium M3Di5 containing 30 g.l<sup>-1</sup> maltose and 5 mg.l<sup>-1</sup> dicamba.*

*Key words: wheat, mature caryopsis, somatic embryogenesis, maltose, auxins*

## Úvod

Na *in vitro* regeneráciu obilnín je možné použiť rôzne druhy explantátov, napr. nezrelé embryá (MATHIAS a SIMPSON, 1986; ŠERHANTOVÁ et al., 2003), zrelé embryá (ZHOU a LEE, 1984; ÖZGEN et al., 1998), listové bázy (ZAMORA a SCOTT, 1983; GLESS et al., 1998), nezrelé súkvetia (MADDOCK et al., 1983, HAVRLENTOVÁ et al., 2001), rastové vrcholy výhonkov (VIERTEL a HESS, 1996) a peľnice (OUYANG et al., 1983, VAGERA a OHNOUTKOVÁ, 1993).

Na genetickú transformáciu pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) sa však v súčasnosti v prevažnej väčšine prípadov používajú *in vitro* regeneračné systémy využívajúce ako explantáty nezrelé embryá (BHALLA et al., 2006). Známymi obmedzeniami používania nezrelých embryí ako východiskových explantátov sú sezónna dostupnosť a ťažkosti s reguláciou pestovateľských podmienok donorových rastlín pre získanie nezrelých embryí vo vhodnom a vyrovnanom vývojovom štádiu. Pretože po prekročení určitého vývojového štádia a veľkosti nezrelé embryá rapídne strácajú regeneračnú schopnosť v *in vitro* kultúre (BHASKARAN a SMITH, 1990; FARAGÓ et al., nepublikované), pre účely indukcie somatickej embryogenézy a genetickej transformácie sa pri pšenici a iných obilninách najčastejšie používajú nezrelé embryá veľkosti 0,5-1,5 mm a veku 10-14 dní po antéze. Použitie zrelých embryí ako východiskových explantátov na *in vitro* regeneráciu obilnín môže obísť všetky problémy, ktoré vznikajú pri používaní nezrelých embryí. Zrelé embryá sú totiž vzhľadom na to, že môžu byť uchovávané vo forme suchých semien dostupné celý rok. Navyše fyziologický stav zrelých embryí vykazuje oveľa nižšiu variabilitu, než fyziologický stav nezrelých embryí (ÖZGEN et al., 1998), čo je dôležitým predpokladom pre reprodukovateľnosť *in vitro* regeneračného systému.

Naším zámerom je preto vypracovať účinný *in vitro* regeneračný systém využívajúci ako východiskový explantát zrelé embryá pri pšenici letnej. V predkladanej práci bolo cieľom zistiť vplyv zloženia kultivačného živného média na *in vitro* regeneračnú schopnosť zrelých embryí pšenice letnej odrody 'Bobwhite'.

## Materiál a metódy

**Rastlinný materiál.** V práci bola použitá odroda 'Bobwhite' pšenice letnej (*T. aestivum* L.). Zrelé semená boli poskytnuté Dr. Jánom Paukom z Cereal Research Non-Profit Co., Szeged (Maďarsko).

**Explantáty.** Ako explantáty boli použité zrelé štítky s emryovou osou, ktoré boli po povrchovej sterilizácii v 0,1 % roztoku HgCl<sub>2</sub> opatrne oddelené skalpelom od endospermu zrna. Výsledný upravený explantát pozostával zo zreleho štítka (*scutellum*) a strednej časti embryovej osi (mezokotyl).

**Živné médiá.** Na kultiváciu explantátov boli použité dva typy živných médií, prvé na indukciu kalogenézy (kalus indukujúce živné médiá, KIM) a druhé na regeneráciu rastlín z indukovaných kalusov (regeneračné médiá, RM). Explantáty pšenice boli ukladané na 8 druhov KIM líšiacich sa koncentráciou maltózy (3% vs. 6%) a druhom (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová [2,4-D] vs. dicamba) a koncentráciou použitého auxínu (2,5 vs. 5,0 mg.l<sup>-1</sup>). Na regeneráciu rastlín z indukovaných kalusov sme použili živné médium MSS (MACHII a kol., 1998).

**Indukcia kalogenézy.** Explantáty pšenice (zrelé štítky s mezokotylovým zbytkom embryovej osi) boli nasádzané embryonálnou časťou v kontakte na kalus indukujúce živné médiá. Na každú variantu KIM bolo nasadených po 64 zrelých embryí pšenice do sklenených Petriho misiek priemeru 10 cm (16 explantátov/PM). Explantáty v primokultúre boli kultivované 28 dní v tme pri teplote 17±2°C.

**Regenerácia rastlín.** Po 28 dňoch kultivácie zrelých embryí na kalus indukujúcich živných médiách boli indukované kalusy subkultivované na regeneračné živné médium MSS. Väčšie kalusy boli delené na menšie kalusové explantáty s priemerom 5±1 mm tak, aby sa zachovalo označenie jednotlivých kalusových línií, t.j. kalusov pochádzajúcich z toho istého kalusu indukovaného na KIM. Kalusy na RM boli kultivované v podmienkach fotoperiody 16 h svetlo/8 h tma a intenzite osvetlenia pribl. 40 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> a pri teplotnom režime 25±1°C za svetla a 20±1°C v tme.

**Experimentálne usporiadanie a hodnotené parametre.** Experiment bol založený vo forme randomizovaných blokov s faktoriálnym usporiadaním 2 koncentrácií maltózy, 2 druhov auxínov a 2 koncentrácií auxínov ( $2 \times 2 \times 2 = 8$  variánt). Za experimentálnu jednotku boli považované Petriho misky obsahujúce 16 zrelých embryí pšenice. Každú variantu experimentu reprezentovali 4 PM. Po 7 a 14 dňoch kultivácie explantátov na kalus indukujúcich médiách bola hodnotená frekvencia klíčiacych embryí. Po 28 dňoch kultivácie explantátov na KIM boli hodnotené frekvencia kalogenézy a index kalogenézy. Po 28 dňoch kultivácie kalusov na RM boli hodnotené nasledovné parametre embryogenézy a regenerácie rastlín z kalusov: frekvencia embryogénnych kalusov a kalusových línií, frekvencia regenerujúcich kalusov a kalusových línií, priemerný počet regenerantov na kultivovaný kalus, pomer albinotických a zelených rastlín, efektívnosť regenerácie a frekvencia rizogenézy.

## Výsledky a diskusia

Celkom bolo na 8 rôznych kalus indukujúcich živných médiách kultivovaných 512 zrelých embryí pšenice letnej odr. 'Bobwhite'. Zrelé embryá tvorili kalusy na všetkých živných médiách a to vo frekvencii 100% (Tab. 1). Priemerný index kalogenézy (indikujúci rýchlosť rastu kalusov) bol  $I_K = 1,65$  a vo všeobecnosti bol vyšší na médiách s auxínom dicamba a s vyššou koncentráciou auxínu. Vyššia koncentrácia maltózy mala stimulačný vplyv na kalogenézu iba na médiách obsahujúcich auxín 2,4-D. Medzi kalusmi indukovanými zo zrelých embryí pšenice na 8 rôznych živných médiách boli zaznamenané rozdiely vo frekvenciách embryogénnych kalusov (Obr. 1A) a vo všeobecnosti vyššie koncentrácie auxínov v kalus indukujúcom živnom médiu inhibovali tvorbu embryogénnych kalusov (s výnimkou médií s 3 % maltózy a auxínom dicambou). Bol tiež zaznamenaný negatívny vplyv vyššej koncentrácie maltózy na výskyt embryogénnych kalusov. Najvyšší výskyt embryogénnych kalusových línií vykazovali kultúry zrelých embryí pšenice odr. 'Bobwhite' na médiách M3D5 (56,5 %). Z hľadiska biotechnologického použitia techniky kultúry zrelých embryí obilnín je najdôležitejším parametrom regenerácia zelených rastlín, t.j. frekvencia regenerujúcich kalusov a kalusových línií, priemerný počet regenerantov na kalus a efektívnosť regenerácie. Zo 403 kalusových línií pšenice hodnotených po 8 týždňoch *in vitro* kultúry bolo regenerujúcich 83 línií, t.j. 20,6 %. Vyššie frekvencie regenerujúcich kalusových línií boli zaznamenané pri kalusoch indukovaných na médiách s auxínom dicamba (Obr. 1B) a s nižším obsahom 2,4-D a dicamby, s výnimkou média M3Di5, kde bol zaznamenaný celkovo najvyšší výskyt regenerujúcich kalusových línií (50,0 %) z 8 testovaných živných médií. K regenerácii zelených výhonkov dochádzalo na všetkých 8 testovaných živných médiách (Obr. 2A,B) a priemerný počet regenerantov na kultivovaný kalus bol 0,25. Celkovo najvyšší priemerný počet regenerantov vykazovali kalusy pšenice indukované na živnom médiu M3Di5 (0,53 regenerantov/kalus). Parameter efektívnosť regenerácie vyjadruje produkciu regenerantov na kultivované zrelé embryo v percentách. Vyššia efektívnosť regenerácie bola zistená na médiách doplnených auxínom dicamba a s nižšou koncentráciou maltózy.

## Záver

V práci sme pomocou optimalizácie zloženia kultivačného živného média a pracovných postupov vyvinuli efektívny *in vitro* regeneračný systém pre regeneráciu rastlín pšenice zo zrelých embryí. Optimalizované zloženie živného média poskytlo účinnosť regenerácie, ktorá je porovnateľná s účinnosťou regenerácie kalusov z nezrelých embryí. Tento systém otvára dvere pre použitie zrelých embryí pšenice, ktoré sú dostupné počas celého roka a pre ktorých produkciu nie sú potrebné finančne a prevádzkovo nákladné klimatizované komory a fytotróny, na genetickú transformáciu tejto plodiny.

## Literatúra

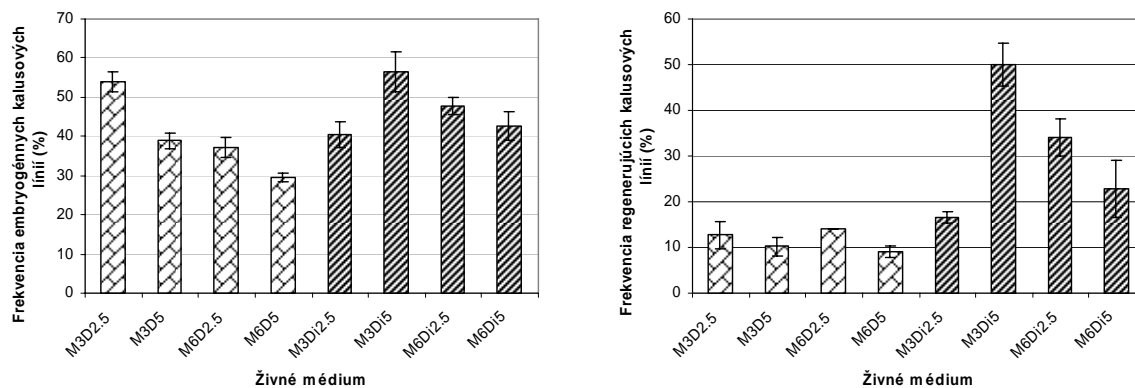
- BHALLA, P.L., OTTENHOF, H.H., SINGH, M.B.: Wheat transformation – an update of recent progress. *Euphytica*, 149, 2006, s.353–366.
- BHASKARAN, S., SMITH, R.H.: Regeneration in cereal tissue culture. *Crop Sci.*, 30, 1990, s. 1328-1336.
- GLESS, C., LÖRZ, H., JÄHNE-GÄRTNER, A.: Establishment of a highly efficient regeneration system from leaf-base segments of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Cell Rep.*, 17, 1998, s. 441-445.
- HAVRENTOVÁ, M., FARAGÓ, J., NEŠŤÁKOVÁ, M.: Regeneration of immature inflorescences of barley *in vitro*. *Biol. Plant.*, 44, 2001, s. 157–159.
- MACHII, H., MIZUNO, H., HIRABAYASHI, T., LI, H., HAGIO, T.: Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. In: *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 53, 1998, s. 67-74.
- MADDOCK, S.E., LANCASTER, V.A., RISIOTT, R., FRANKLIN, J.: Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.*, 34, 1983, s. 915-926.
- MATHIAS, R.J., SIMPSON, E.S.: The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 7, 1986, s. 31-37.
- OUYANG, J., ZHOU, S.M., JIA, S.E.: The response of anther culture to culture temperature in wheat, *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 1983, s. 101-109.
- ÖZGEN, M., TÜRET, M., ALTYNOK, S., SANCAK, C.: Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep.*, 18, 1998, s. 331-335.

ŠERHANTOVÁ, V., EHRENBERGEROVÁ, J., OHNOUTKOVÁ, L.: Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. *Plant Soil. Environ.*, 50, 2004, s. 456–462.  
 VAGERA, J., OHNOUTKOVÁ, L.: *In vitro* production of androgenesis in wheat and barley. *Rost. Výr.*, 39, 1993, s. 97–114.  
 VIETEL, K., HESS, D.: Shoot tips as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 44, 1996, s. 183-188.  
 ZAMORA, A.B., SCOTT, K.J.: Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. *Plant Sci. Lett.*, 29, 1983, s. 183-189.  
 ZHOU, M.D., LEE, T.T.: Selectivity of auxin for induction and growth of callus from embryos of spring and winter wheat. *Can. J. Bot.*, 62, 1984, s. 1393-1397.

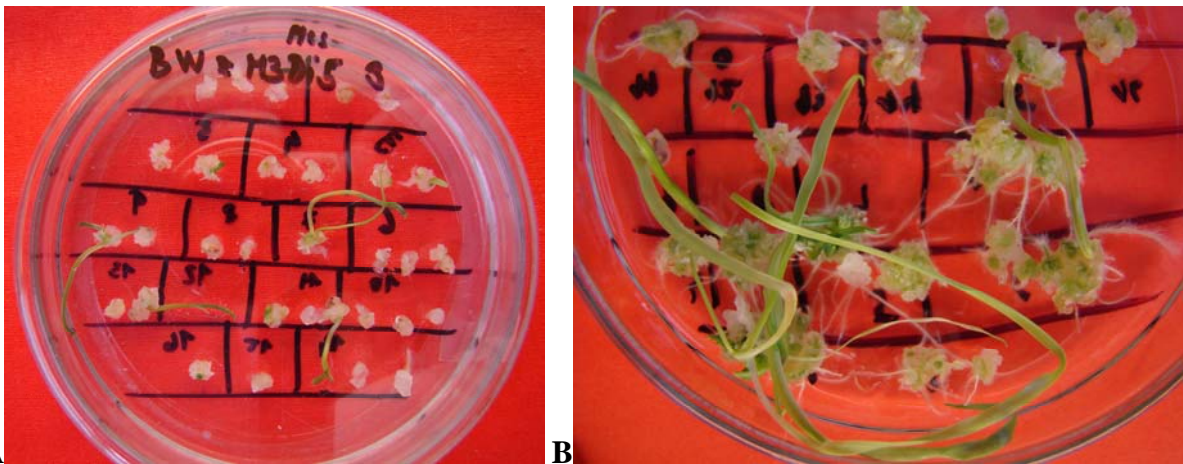
Tabuľka 1: Sumárne výsledky a porovnanie indukcie kalogenézy, somatickej embryogenézy a regenerácie rastlín v *in vitro* kultúre zrelých embryí pšenice letnej (odr. ‘Bobwhite’) v závislosti od použitého živného média.

Médium <sup>1</sup>	Počet explantátov	Počet kalusových línií	Počet kalusov	Frekvencia kalogenézy (%)	Index kalogenézy	Frekvencia embryogén. kalusov (%)	Frekvencia regener. kalusov (%)	Počet regenerantov per kalus
M3D2.5	64	63	82	100	1,281	45,1	9,8	0,256
M3D5	64	59	73	100	1,172	34,2	11,0	0,315
M6D2.5	64	43	78	100	1,625	21,8	7,7	0,090
M6D5	64	44	84	100	1,859	19,1	4,8	0,071
M3Di2.5	64	42	91	100	1,813	26,4	11,0	0,187
M3Di5	64	46	93	100	1,906	35,5	28,0	0,527
M6Di2.5	64	45	98	100	1,609	29,6	16,3	0,286
M6Di5	64	61	126	100	1,969	27,8	11,9	0,230
Celkom	512	403	725	100	1,654	29,8	12,8	0,248

Legenda: <sup>1</sup> Živné médiá MS (podľa Murashige a Skoog, 1962) obsahujúce 200 mg.l<sup>-1</sup> Myo-inozitolu, 2 mg.l<sup>-1</sup> glycínu, 1000 mg.l<sup>-1</sup> kazeinového hydrolyzátu, 500 mg.l<sup>-1</sup> prolínu, 3000 mg.l<sup>-1</sup> Phytagelu a maltózu a rastové regulátory nasledovne: M3 = 30 g.l<sup>-1</sup> maltózy, M6 = 60 g.l<sup>-1</sup> maltózy, D2.5 = 2,5 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D, D5 = 5,0 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D, Di2.5 = 2,5 mg.l<sup>-1</sup> dicamba a Di5 = 5,0 mg.l<sup>-1</sup> dicamba.



Obrázok 1: Frekvencie embryogénnych (A) a regenerujúcich (B) kalusových línií pšenice letnej (odr. ‘Bobwhite’) na rôznych kalus indukujúcich živných médiách líšiacich sa koncentráciou maltózy (M3 = 30 g.l<sup>-1</sup>; M6 = 60 g.l<sup>-1</sup>) a druhom (D = 2,4-D; Di = dicamba) a koncentráciou (2.5 = 2,5 mg.l<sup>-1</sup>; 5 = 5 mg.l<sup>-1</sup>) auxínu po 4 týždňoch na regeneračnom živnom médiu.



**A** **B**  
 Obrázok 2: Regenerácia zelených výhonkov z kalusov pšenice letnej odr. Bobwhite odvodených zo zrelých embryí kultivovaných na kalus indukujúcom živnom médiu M3Di5 po 2 týždňoch kultivácie na regeneračnom médiu MSS (**A**) a po 4 týždňoch kultivácie na médiu MSS (**B**). (Foto: J. Faragó)

# MOŽNOSTI VYUŽITÍ POLYMORFISMŮ GENOMICKÉ, CP A MT DNA PRO DETEKCI SOMATICKÝCH HYBRIDŮ BRAMBORU

## UTILIZATION OPTIONS OF GENOME, CP AND MT DNA POLYMORPHISMS FOR POTATO SOMATIC HYBRIDS DETECTION

Vladimíra SEDLÁKOVÁ – Petr SEDLÁK – Pavel VEJL

*143 diploid and tetraploid genotypes of genus Solanum were characterised with the view of DNA polymorphism using for potential detection of potato somatic hybrids. Restriction analysis of CAPS marker SPUD237 resulted to detection of three variants of amplified nuclear DNA sequence polymorphism differentiate in presence and position of restriction site of AluI restrictase. Likewise, there is possible to differentiate the genotypes of Solanum bulbocastanum from another species on the basis of SSCP analysis of rrn5/rrn18-1 PCR product. RAPD analysis by means of OPN18 primer detected reliably interspecific and intraspecific polymorphism of DNA. Bulk segregation analysis differentiates the genotypes to three general clusters. The first cluster was generated only from all Solanum bulbocastanum genotypes. All these methods seem to be usable for potato somatic hybrids detection and they can be aplicable only in concrete cases. Nevertheless, neither horisontal agarose electrophoresis nor SSCP analysis of intergenic spacer trnL/trnF detected polymorphism of PCR products and these results can predicate sequential conservativeness of this spacer within genus Solanum. No somaclonal variability was detected in plants regenerated from protoplast culture originated from Solanum bulbocastanum 17.*

*Key words: Solanum, CAPS, RAPD, SSCP, somatic hybrids*

### Úvod

Somatická hybridizace představuje způsob překonání sexuální inkompatibility (nekržižitelnosti) mezi druhy rodu *Solanum*, vedoucí k fertilitním rostlinám, které mohou být přímo využity ve šlechtitelských programech [4]. *In vitro* fúzi somatických buněk se očekává překonání prezygotických a některých postzygotických bariér [8]. Existuje mnoho možností, jak může vypadat genom buněk vzniklých fúzí protoplastů dvou druhů rodu *Solanum*. Může docházet k homofúzi, heterofúzi k eliminaci některých chromozómů nebo dokonce celého jádra jednoho druhu. Tyto případy nastávají nejčastěji při následujících buněčných děleních. Fúze rodičovských jader může být rovněž celková nebo pouze částečná [9]. Nejinak je tomu v případě cytoplasmy. U čeledi *Solanaceae* může u somatických hybridů docházet k eliminaci plastidů jednoho rodiče [6]. Bylo prokázáno, že intergenové rekombinace v rámci chloroplastového genomu jsou u vyšších rostlin vzácné oproti vysokému stupni rekombinací v rámci mitochondriálního genomu [3]. Pro komplexní charakterizaci DNA rostlin vzniklých somatickou hybridizací je proto nutné provést analýzu jaderné, chloroplastové i mitochondriální DNA [11].

V současné době se nabízí celá řada molekulárně genetických metod umožňujících studium rostlinné DNA. Pro detekci polymorfismů jaderné DNA lze využít metody CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), která v sobě zahrnuje spojení metod PCR a RFLP. CAPS polymorfismy či SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) jsou často využívané markery nacházející se v genomu ve vazbě na důležité geny řídící hospodářsky významné vlastnosti, jako jsou různé geny rezistence [1]. Další možností studia polymorfismu celkové genomické DNA je metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), která se jeví jako cenově efektivní diagnostická metoda ve šlechtění rostlin [7]. Další možností genetické analýzy aplikované pro studium variability rostlin je využití nekódujících oblastí chloroplastové DNA (cpDNA) a mitochondriální DNA (mtDNA) [2, 10].

Cílem této práce bylo detekovat polymorfismus genomické, chloroplastové a mitochondriální DNA u genetických zdrojů rodu *Solanum* a diploidních klonů bramboru pomocí metod CAPS, RAPD a SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), který by bylo možné využít pro identifikaci somatických hybridů. Druhým cílem byla detekce potenciální somaklonální variability u rostlin vzniklých regenerací protoplastů z genotypů *Solanum bulbocastanum* pomocí metody RAPD.

## Materiál a metody

### Biologický materiál

Celkem 143 genových zdrojů rodu *Solanum* a dihaploidů bramboru bylo získáno z genové banky při Výzkumném ústavu bramborářském s.r.o. v Havlíčkově Brodě. Genové zdroje rodu *Solanum* byly vybrány jako potenciální nositelé genů rezistence k *Phytophthora infestans*. Tato kolekce obsahovala 94 genotypů *S. bulbocastanum* Dun. (PI243345, PI243512, PI275188, PI275192), kde 79 genotypů mělo deklarovanou přítomnost genu rezistence Rpi-blb1 k *Phytophthora infestans*. Součástí kolekce bylo dále 12 genotypů *S. berthaultii* Hawkes. (PI265857, PI265858, PI310925, PI265858, PI498109), po jednom genotypu *S. pinnatisectum* Bitt. (PI275235) a *S. microdontum* Bitt. (PI458356), 9 genotypů *S. polyadenium* Greenm. (PI310963, PI320342), 3 genotypy *S. vernei* Firbas and Ross. (BGRC 015451, BGRC 024732, 07S0300234), 4 genotypy *S. verrucosum* Schlecht. (PI161173) a 11 genotypů *S. tuberosum* L. v diploidní formě (DH 165, 185, 315, 318, 322, 323, 324, 329, 387, 388, 447). Všechny uvedené genotypy byly diploidní ( $2n = 24$ ) a tudíž potenciálně vhodné ke vzniku tetraploidního výchozího materiálu somatickou hybridizací. Dále bylo do kolekce zařazeno 7 tetraploidních genotypů druhů *S. goniocalyx*, *S. sucrose*, *S. andigenum*, *S. mochiquense*, *S. polytrichon*, *S. yungasense* a *S. chacoense* pro rozšíření možnosti detekce mezidruhové variability.

### Analýza DNA

Totální DNA byla vyizolována pomocí izolačního kitu Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen). Složení reakční směsi bylo pro všechny metody a všechny markery stejné. 25  $\mu$ l reakční směsi obsahovalo 1x reakční pufr,  $MgCl_2$  o 2,5 mM koncentraci, 0,3 mM dNTP, 30 ng od každého primeru, 1 jednotka *Taq* polymerázy (Fermentas, Lithuania) a 20 ng DNA.

### PCR analýza

Jako CAPS marker byl pro detekci polymorfismů použit SPUD 237 [1]. Teplotní a časový profil PCR reakce byl následující: 180 s při teplotě 94°C pro první denaturaci následovanou 35 PCR cykly (20 s při 94°C pro denaturaci, 20 s při 55°C pro nasedání primerů (annealing), 45 s při 72°C pro extenzi) a 120 s při teplotě 72°C pro finální extenzi. Štěpení PCR produktu probíhalo pomocí restrikčního enzymu *AluI* (Fermentas) při 37 °C podle instrukcí výrobce.

Pro detekci polymorfismů v rámci chloroplastové a mitochondriální DNA byly použity markery *rrn5/rrn18-1*, *cox1/cox1* [2] a *trnL/trnF* [10]. U markeru *cox1/cox1* bylo pro detekci polymorfismů dále použito restrikční štěpení pomocí enzymů *AluI*, *EcoRV*, *DraI*, *EcoRI*, *HinfI*, *MspI* (*HpaII*), *RsaI*, *XbaI*, *BsuRI* (*HaeIII*), *CfoI* a *AccI*. PCR produkty markerů *rrn5/rrn18-1* a *trnL/trnF* byly dále analyzovány pomocí metody SSCP.

### RAPD analýza

Pro detekci polymorfismů uvedené kolekce genotypů byl použit primer OPN18, který byl na základě podobnosti RAPD profilů jednotlivých genotypů statisticky vyhodnocen metodou shlukové analýzy UPGMA v programu Quantity One (Bio-Rad, USA). Somaklonální variabilita byla hodnocena u genotypu *S. bulbocastanum* 17 a jeho protoplastového regenerantu pomocí sad RAPD primerů OPN, OPH, OPM, OPF a OPG. Teplotní a časový profil PCR reakce byl následující: 180 s při teplotě 94°C pro první denaturaci následovanou 40 PCR cykly (20 s při 94°C pro denaturaci, 45 s při 36,5°C pro nasedání primerů, 105 s při 72°C pro extenzi) a 360 s při teplotě 72°C pro finální extenzi.

Separace PCR produktů probíhala u obou metod v 1 x TBE pufru v 1,5 % horizontálním agarózovém gelu vizualizovaném pomocí ethidium bromidu o koncentraci 0,5  $\mu$ g . ml<sup>-1</sup> elektroforetického pufru. Elektroforeogramy byly dokumentovány pomocí systému GelDoc<sup>TM</sup>XR (Bio-Rad, USA).

### SSCP analýza

Separace PCR produktů markerů *rrn5/rrn18-1* a *trnL/trnF* probíhala na vertikálním 8 % akrylamidovém gelu o rozměrech 16 x 16 x 0,1 v 1 x TBE pufru. Vzorky byly denaturovány 95 % formamidem při 95 °C po dobu 10 min a separovány při 30 W po dobu 210 min v cele DCode (Biorad) při 15 °C a vizualizované pomocí ethidium bromidu (1,5  $\mu$ g . ml<sup>-1</sup>).

## Výsledky a diskuse

CAPS marker SPUD237 je lokalizován v jaderné DNA na pátém chromozómu v genové vazbě s lokusem genu *Nb* udělujícím hypersenzitivní rezistenci bramboru k viru X a lokusem genu rezistence *R1* k *Phytophthora infestans* [1]. Restrikčním štěpením amplikonu SPUD237 enzymem *AluI* byl v analyzované kolekci detekován polymorfismus DNA, kdy byly podchyceny tři hypotetické alely variabilní v přítomnosti a lokalizaci *AluI* restrikčního místa (Obr. 1). Domníváme se, že pomocí těchto výsledků lze prokázat, zda došlo k fúzi jader u rostlin vzniklých somatickou hybridizací. Nicméně, výsledky jsou aplikovatelné pouze v určité kombinaci genotypů jako je například *S. bulbocastanum* 10 + diploid *S. tuberosum* 322 nebo *S. verrucosum* 299 + diploid *S. tuberosum* 387. V této situaci by výsledný genotyp měl obsahovat dvě různé alely a na výsledném elektroforeogramu by se tato skutečnost projevila třemi pozorovatelnými fragmenty DNA. Z obrázku 1 je však

patrné, že na základě tohoto markeru je možno v rámci hodnoceného souboru vytvořit poměrně širokou škálu kombinací somatických hybridů, které by následně bylo velmi snadné tímto markerem identifikovat.

Pomocí primerů vysoce specifických k mtDNA byla amplifikována intergenová sekvence mitochondriálního intergenového mezerníku oddělujícího geny pro 5S a 18S rRNA o velikosti 273bp označovaná jako *rrn5/rrn18-1* [2] [5]. Na horizontální agarózové elektroforéze nebyl u hodnocené kolekce detekován délkový polymorfismus DNA. SSCP analýzou tohoto regionu byly jednoznačně odlišeny genotypy druhu *S. bulbocastanum* od genotypů ostatních druhů. Bylo prokázáno, že vyzolováním totální DNA z různých částí různě starých *in vitro* rostlin se stabilita PCR produktu nemění. Nebyla zaznamenána ani variabilita v SSCP profilu mezi původními genotypy *S. bulbocastanum* (17 a 41) a jejich protoplastovými regeneranty (Reg 1 a 5) (Obr. 2). Tyto výsledky lze potenciálně využít pro detekci somatických hybridů vzniklých fúzí protoplastů mezi genotypy druhů *S. bulbocastanum* a diploidního bramboru.

Marker *cox1/cox1* amplifikuje oblast intronu mitochondriálního cytochrom c oxidázové podjednotky 1 o velikosti 1360bp [2]. Na horizontální agarózové elektroforéze nebyl u hodnocené kolekce detekován délkový polymorfismus DNA. Proto bylo pro další analýzu použito restriční štěpení náhodně vybranými restričními enzymy. Enzym *HinfI* poskytl polymorfismus rozštěpených PCR produktů umožňující odlišení druhu *S. mochiuense* od ostatních genotypů (Obr. 3). Restriční enzymy *AluI*, *RsaI* a *CfoI* štěpily produkty uniformně. Ostatní restriktázy v rámci studovaného intronu nenašly odpovídající restriční místo. Marker *trnL/trnF* podchycuje oblast intergenového mezerníku chloroplastové DNA o velikosti 418bp [10]. Na horizontální agarózové elektroforéze a SSCP analýzou nebyl u hodnocené kolekce detekován ani délkový ani bodový polymorfismus v rámci tohoto úseku. Tyto výsledky prozatím naznačují, že je tato sekvence v rámci rodu *Solanum* vysoce konzervativní. Pro účely detekce somatických hybridů ji zřejmě nebude možno v budoucnu použít.

#### RAPD analýza

Na základě dekamerického primeru OPN18 byla provedena shluková analýza UPGMA v programu Quantity One (Bio-Rad, USA). Výsledný dendrogram (Obr. 4) zahrnuje tři základní shluky genotypů. Do prvního shluku se vyprofilovaly všechny analyzované genotypy druhu *Solanum bulbocastanum*. Do druhé skupiny byla zařazena uniformní podskupina genotypů druhu *S. polyadenium* a dále pak genotypy *S. microdontum* 049, *S. verrucosum* 299 a diploidní *S. tuberosum* DH 322. Třetí skupina vykazovala vyšší variabilitu oproti dvěma předchozím. Byla do ní hlavně přiřazena většina diploidních klonů *S. tuberosum* a zbývající genetické zdroje rodu *Solanum* z testované kolekce. Z výsledků shlukové analýzy je patrné, že RAPD primer OPN18 lze využít pro detekci vnitrodruhové i mezidruhové variability a tím je využitelný v konkrétních případech detekce somatických hybridů bramboru. RAPD analýza byla dále použita k detekci případné somaklonální variability, která hypoteticky může nastat v potomstvech odvozených regenerací z protoplastových kultur. Pomocí 70 dekamerických primerů byla prokázána 100% identita RAPD produktů rostliny vzniklé regenerací z protoplastové kultury a donora buněk *S. bulbocastanum* 17 (Obr. 5). V těchto 70 dvojicích porovnávaných vzorků DNA nebyl nalezen ani jeden RAPD produkt, který by vykazoval polymorfismus. Z těchto výsledků je patrné, že byť je metoda RAPD často považována za obtížně reprodukovatelnou a málo spolehlivou, pro účely detekce variability a za standardních podmínek je poměrně dobře použitelná i dostatečně opakovatelná.

#### Závěr

- CAPS marker SPUD237 lze ve vybraných případech aplikovat k detekci somatických hybridů bramboru na základě jaderné DNA.
- SSCP analýza markeru *rrn5/rrn18-1* umožnila opakovatelně odlišit genotypy *Solanum bulbocastanum* od ostatních druhů.
- Výsledky SSCP analýzy markeru *trnL/trnF* neprokázaly existenci detekovatelného polymorfismu uvnitř tohoto intergenového mezerníku cpDNA a poukazují tak na zřejmě vysokou konzervativnost v rámci rodu *Solanum*.
- Shluková analýza prokázala využitelnost RAPD primeru OPN18 pro detekci vnitrodruhové i mezidruhové variability a tím jeho využitelnost v konkrétních případech detekce somatických hybridů bramboru.
- Byla ověřena stabilita genetické informace u rostlin získaných regenerací z protoplastové kultury klonu 17 *S. bulbocastanum* pomocí 70 RAPD primerů. Tento výsledek je důležitý z hlediska potenciálního využití metody RAPD pro účely selekce somatických hybridů.

#### Poděkování

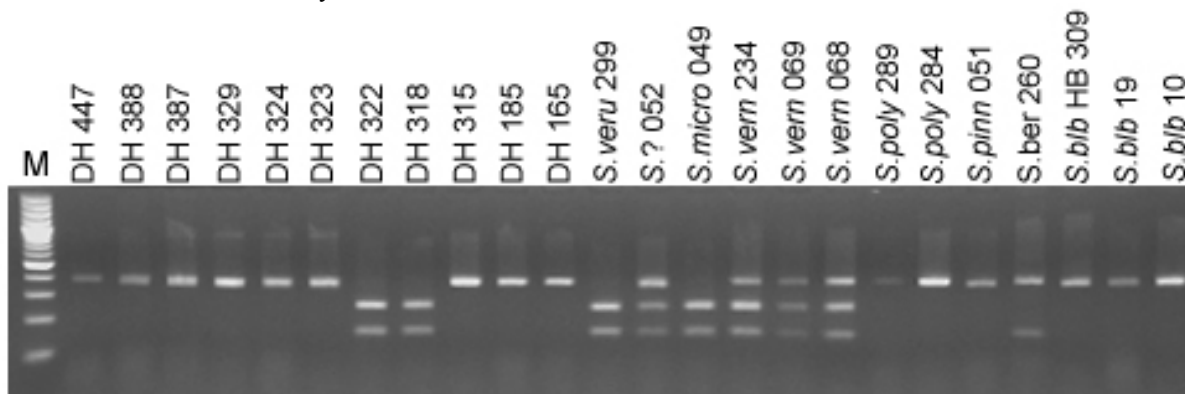
Výsledky byly získány za podpory projektu NAZV MZe ČR číslo QF4107.



## Literatura

- DE JONG, W. – FORSYTH, A. – LEISTER, D. – GEBHARDT, C. – BAULCOMBE, D. C. (1997): A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. In: Theoretical and Applied Genetics, No. 95., 1997, p. 246 – 252.
- DUMINIL, J. – PEMONGE, M. H. – PETIT, R. J. (2002): A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. In: Molecular Ecology Notes 2, 2002, p.428 – 430.
- FEJES, E. – ENGLER, D. – MALIGA, P. (1990): Extensive homologous chloroplast DNA recombination in the pt 14 *Nicotiana* somatic hybrid. In: Theor. Appl. Genet. 97, 1990, p. 28 – 32.
- HELGELSON, J. P. (1992): New genes fo disease resistances through somatic hybridization. In: European Journal of Plant Pathology Vol. 98, 1992, p. 223 – 229.
- HU, D. - LUO, Z. (2006): Polymorphism of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp. In: Scientia Horticulturae 109, 2006, p. 275 - 281.
- LÖSSL, A. – FREI, U. – WENZEL, G. (1994): Interaction between cytoplasmic composition and yield parameters in somatic hybrids of *S. tuberosum* L. In: Theor. Appl. Genet. 89, 1994, p. 873 – 878.
- MASUELLI, R. W. – TANIMOTO, E. Y. – BROWN, C. R. – COMAI, L. (1995): Irregular meiosis in a somatic hybrid between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* detected by species-specific PCR markers and cytological analysis. In: Theor Appl Genet, vol. 91, 1995, pp. 401 – 408.
- ORCZYK, W. – PRZETAKIEWICZ, J. – NADOLSKA-ORCZYK, A. (2003): Somatic hybrids of *Solanum tuberosum* – application to genetics and breeding. In: Plant Cell. Tissue and Organ Culture 74, 2003, p. 1 – 13.
- PIJINACHER, L. P. – FERWERDA, M. A. – PUITE, K. J. – ROEST, S. (1978): Elimination of *Solanum phureja* chromosomes in *Solanum tuberosum* – *Solanum phureja* somatic hybrids. In: Theor. Appl. Genet. 73, 1978, p. 878 – 882.
- TABERLET, P. – GIELLY, L. – PAUTOU, G. – BOUVET, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. In: Plant Molecular Biology, vol. 17, 1991, p. 1105 - 1109.
- TRABELSI, S. – GARGOURI-BOUZID, R. – VEDEL, F. – NATO, A. – LAKHOUA, L. – DRIRA, N. (2005): Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83, 2005, p. 1 – 11.

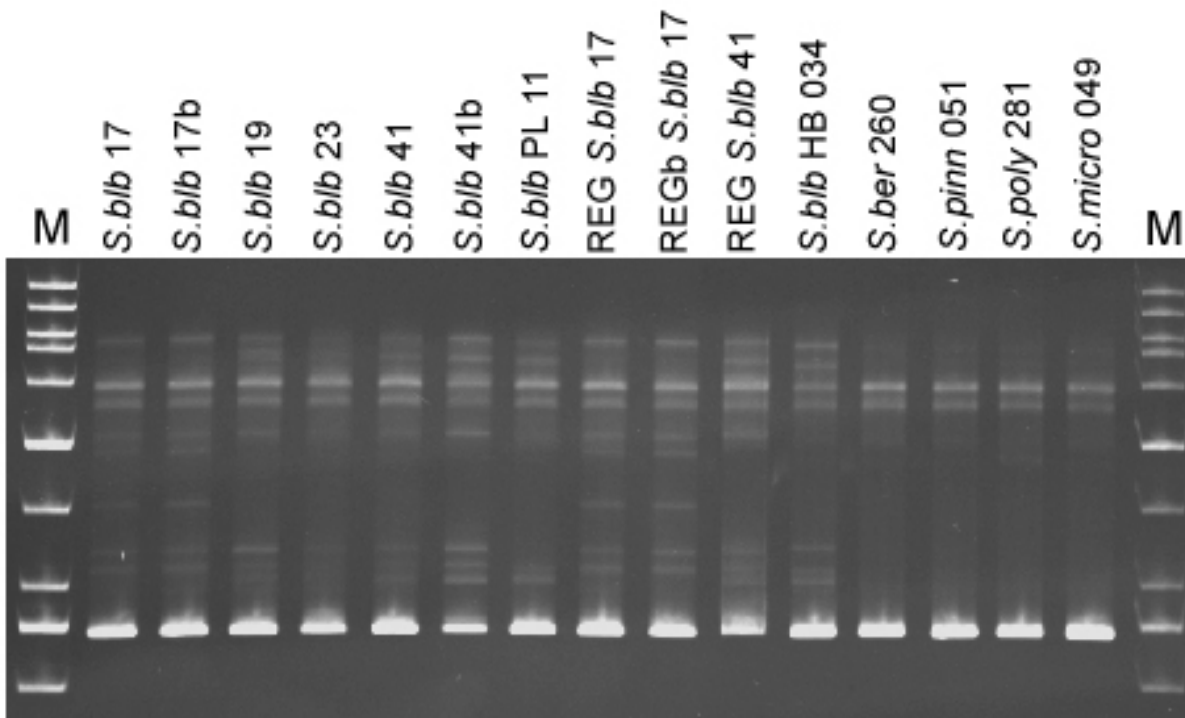
Obrázek 1: Detekce polymorfismů jaderné DNA u genotypů rodu *Solanum* restričním štěpením produktů CAPS markeru SPUD237 enzymem *AluI*



M – velikostní marker Lambda DNA/*Eco471* (*AvaII*)

*S. blb* – *Solanum bulbocastanum*, *S. ber* – *S. berthaultii*, *S. veru* – *S. verrucosum*, *S. micro* – *S. microdontum*, *S. poly* – *S. polyadenium*, *S. vern* – *S. vernei*, *S. pinn* – *S. pinnatisectum*, DH – dihaploid *S. tuberosum*

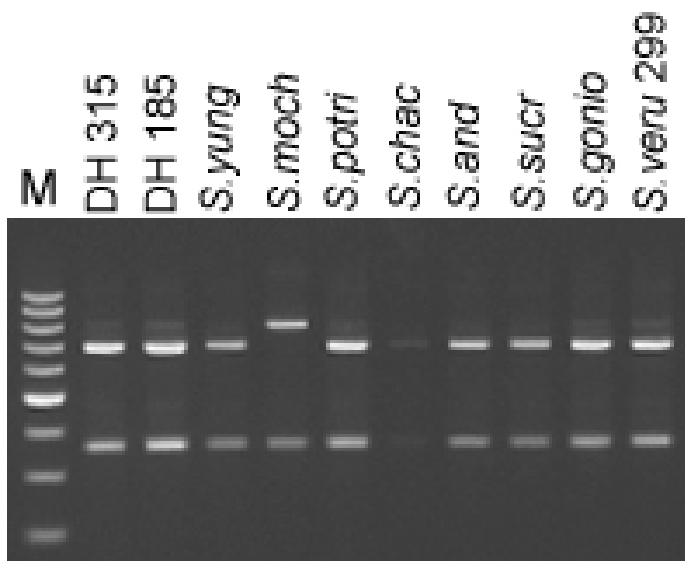
Obrázek 2: Detekce polymorfismů mtDNA u genotypů rodu *Solanum* markerem *rrn5/rrn18-1* pomocí metody SSCP



M – velikostní marker Lambda DNA/*Eco471* (*AvaII*)

*S. blb* – *Solanum bulbocastanum*, *S. ber* – *S. berthaultii*, *S. micro* – *S. microdontum*, *S. poly* – *S. polyadenium*, *S. pinn* – *S. pinnatisectum*, DH – dihaploid *S. tuberosum*, REG – regenerant daného genotypu vzniklý z protoplastových kultur

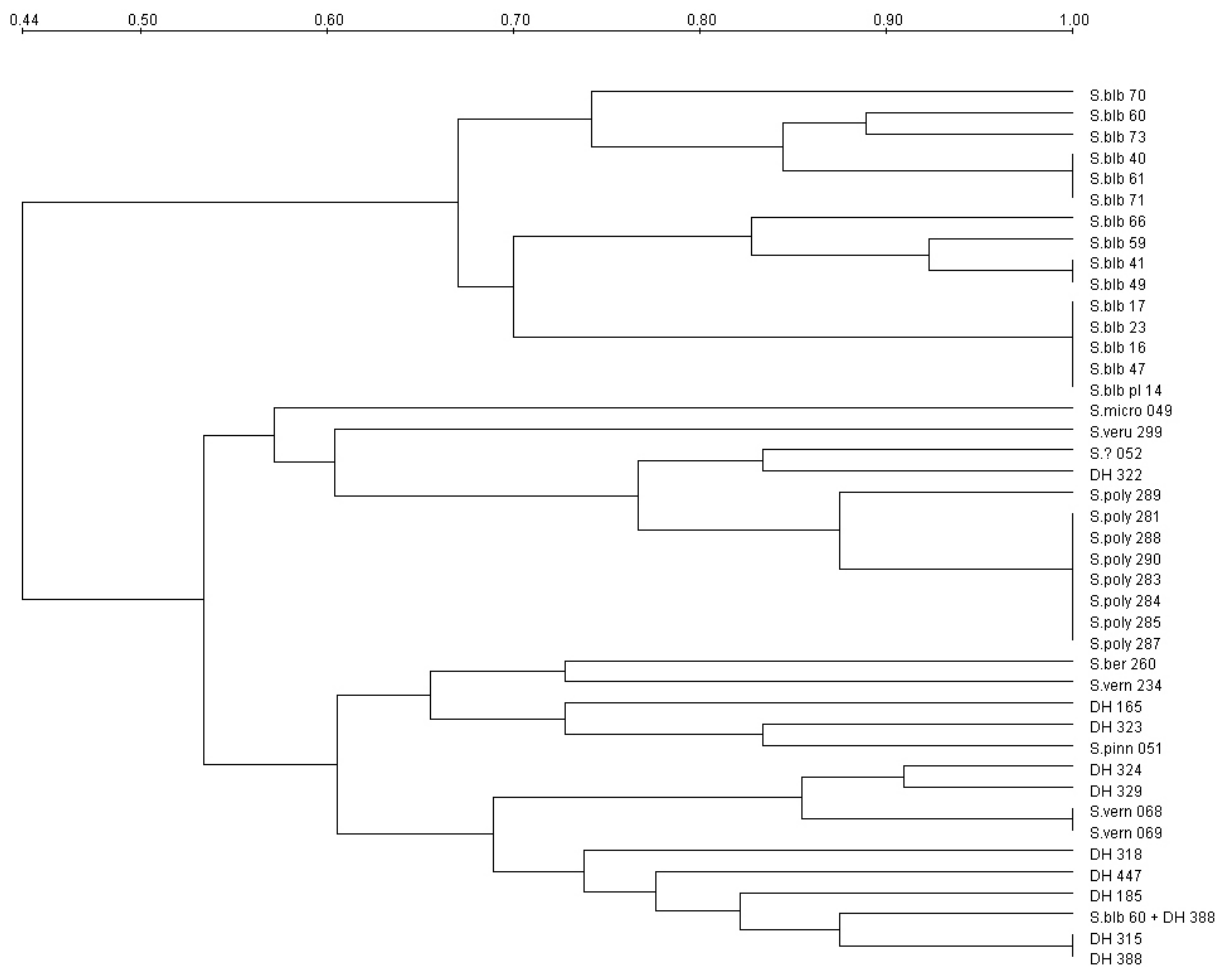
b – varianta téhož genotypu vzniklá izolací DNA z různě starých *in vitro* rostlin

Obrázek 3: Restrikční štěpení PCR produktu markeru *cox1/cox1* enzymem *HinfI*

M – velikostní marker Lambda DNA/Eco471 (*AvaII*)

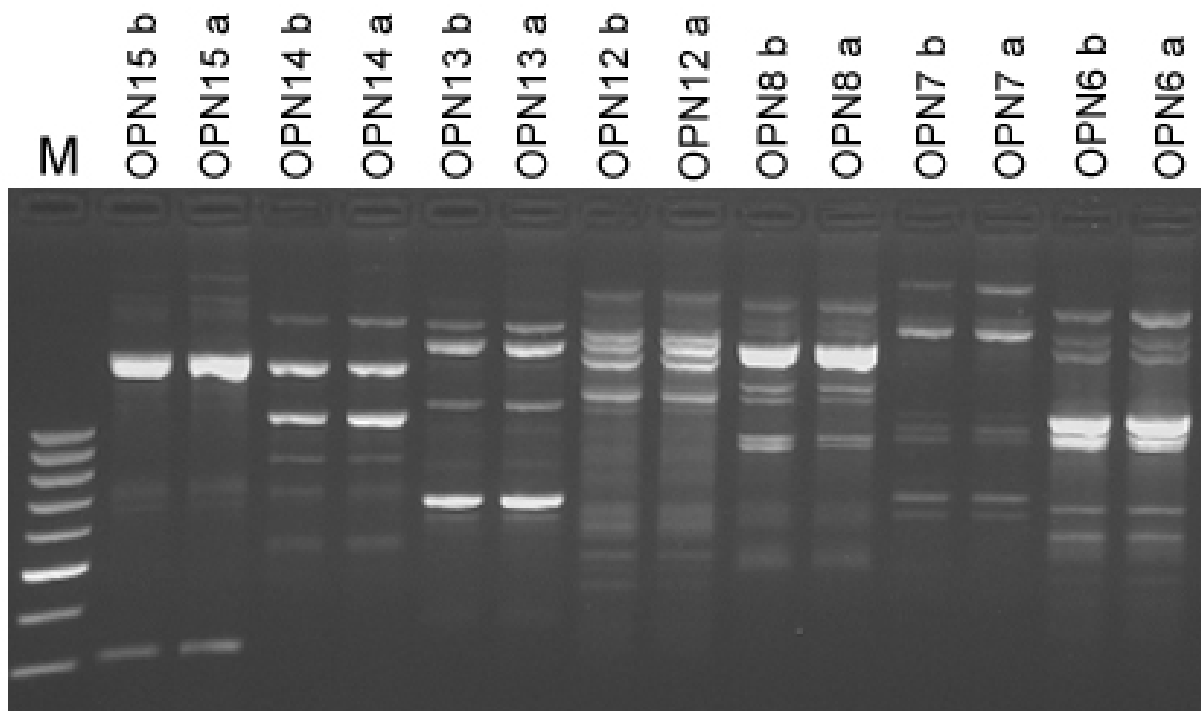
*S. yung* – *S. yungasense*, *S. moch* – *S. mochiquense*, *S. potri* – *S. polytrichon*, *S. chac* – *S. chacoense*, *S. and* – *S. andigenum*, *S. sucr* – *S. sucrense*, *S. gonio* – *S. gonicalyx*, *S. veru* – *S. verrucosum*, DH – dihaploid *S. tuberosum*

Obrázek 4: Shluková analýza genotypů na základě amplifikace RAPD markerů primerem OPN18



*S. blb* – *Solanum bulbocastanum*, *S. ber* – *S. berthaultii*, *S. veru* – *S. verrucosum*, *S. micro* – *S. microdontum*, *S. poly* – *S. polyadenium*, *S. vern* – *S. vernei*, *S. pinn* – *S. pinnatisectum*, DH – dihaploid *S. tuberosum*, *S. blb 60 + DH 388* – směs DNA obou genotypů

Obrázek 5: Detekce somaklonální variability sadou RAPD primerů OPN



a – regenerant vzniklý kultivací protoplastů genotypu *S. bulbocastanum* 17, b – genotyp *S. bulbocastanum* 17

# SOMAKLONÁLNA VARIABILITA KALUSOV A REGENERÁCIA RASTLÍN POCHÁDZAJÚCICH Z KULTÚRY IZOLOVANÝCH SEMENNÍKOV PRI ĽANE

## SOMACLONAL VARIATION OF CALLI AND REGENERATION OF PLANTS ORIGINATED FROM OVARY CULTURE IN FLAX

<sup>1</sup>Zuzana ŽÁČKOVÁ – <sup>2</sup>Štefan MASÁR – <sup>3</sup>Anna PREŤOVÁ

*We aimed to observe and to compare the induction rate of calli and regeneration rate of shoots originated from culture of unpollinated ovaries in flax and somaclonal variation of cells in calli using flow cytometry method. The ploidy level of regenerated plants was also examined. The percentage of induced calli in ovary culture varied from 15,4% in genotype AC Emerson to 32,4% in Viking. Conversely the regeneration rate was higher in AC Emerson (8,8%) rather than in genotype Viking (1,8%). In yellow-green calli the cells were mostly diploid ( $2n=30$  chromosomes) in genotype Viking (83,3%) and in AC Emerson (100%). The cells of dark green calli were of higher ploidy level and contained cells of  $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$ ,  $16n$ . Regeneration of shoots was performed from the haploid and diploid cells in the calli as we found out using karyological analysis on squashes of root tip cells.*

*Key words: somaclonal variation, karyological analysis, flow cytometry, flax*

### Úvod

V *in vitro* kultúrach nezrelých gametofytov dochádza pri niektorých rastlinných druhoch k nepriamej diferenciacii a regenerácii rastlín z buniek kalusu. Variabilita medzi rastlinami regenerovanými z kalusových kultúr môže byť vysoká. Dedičná, somaklonálna variabilita sa prejaví v potomstve regenerovaných rastlín na rozdiel od epigenetickej variability, ktorá sa alebo neprejaví v potomstve, alebo prejaví, ale neskôr sa vytráti v niektorej vývinovej fáze kultúry *in vitro*, najčastejšie pri diferenciacii rastlín (NOVÁK, 1990). V kultúre peľnic pri ľane sa diferenciacia výhonkov realizuje nepriamo, cez fázu kalusu. Dihaploidné rastlinky, ktoré potom regenerujú, sú odvodené z mikrospór (NICHTERLEIN, 2003). V prípade produkcie dihaploidov samičieho pôvodu, vývin začína mitotickým delením vajíčkovej bunky, prípadne ďalších haploidných buniek zárodčného mieška (SHIVANNA, 2003). Gynogenéza bola indukovaná v *in vitro* podmienkach iba pri niektorých rastlinných druhoch (prehľad uvádza Bohanec, 1999). Naším cieľom bolo indukovať túto cestu vývinu pri ľane, sledovať podmienky regenerácie, analyzovať somaklonálnu variabilitu buniek kalusov metódou flow cytometrie a určiť ploidiu regenerovaných rastlín.

### Materiál a metóda

#### Indukcia kalogenézy a regenerácia

Kultúry izolovaných semenníkov sme zakladali ako sme popísali v predchádzajúcej práci (Bartošová a Preťová, 2003). O mesiac sme indukované kalusy rezponzívnych genotypov AC Emerson, Viking izolovali a preniesli na médium MS obohatené o 2,4-D (1mg/l). Na regeneráciu sme ďalej použili MS médium, ktoré obsahovalo 6% sacharózy a zeatín (2mg/l), bezhormónové MS médium, kde sme kultivovali najmä kalusy s výrazne granulárnym povrchom, MS médium s TDZ (0,5mg/l), MS s kombináciou TDZ (0,5mg/l)+BAP (0,5mg/l) a MS s BAP (0,5mg/l). Kalusy s indukovanými výhonmi sme preložili na MS médium so zeatínom (2mg/l). Výhony, ktoré dosiahli výšku okolo 0,8-1cm sme kultivovali na zakoreňovacom bezhormónovom MS médiu s 2% sacharózy a s 0,1% aktívneho uhlia. Regenerujúce kalusy sme spolu s výhonmi podrobili histologickej analýze (BARTOŠOVÁ a PREŤOVÁ, 2003).

#### Zisťovanie obsahu DNA pomocou flow cytometrie

Po štyroch mesiacoch kultivácie kalusov na regeneračnom médiu sme pozorovali, že v kultúre sa objavili kalusy odlišnej farby, žltozelené a sýtozelené. Oba typy kalusov sme oddelene kultivovali a rozdiely medzi nimi sme analyzovali na úrovni DNA metódou flow cytometrie. Vzorky kalusov sme najskôr nadrobno nasekali v petriho miske (približne 20mg). K nim sme pridali 1ml LBO1 pufru a fluorescenčné farbivo 4',6-diamidino-2-fenylyndol (2mg/l). Suspenziu s uvoľnenými jadrami sme prefiltrovali cez polyamidový filter (50 $\mu$ m) a filtrát sme držali na ľade. Nakoniec sme vzorku naniesli do flow cytometra a vyhodnotili výsledky fluorescenčného signálu jadier každého kalusu.

#### Karyologická analýza koreňových špičiek regenerantov

Ploidiu regenerantov sme určili pomocou rýchlych roztlakových preparátov. Odobrali sme korene regenerantov ľanu dĺžky 1-1,5cm a uložili na predpôsobenie do ľadovej vody na 24 hodín. Nasledovala fixácia v zmesi podľa Carnoya, 100% alkohol:ľad. kys. octová (3:1, 7dní). Korene sme opláchlili v destilovanej vode, ďalej macerovali v 1N HCl (60°C, 10min.), opäť opláchlili v destilovanej vode a farbili 90min. Schiffovým činidlom. Nakoniec sme prebytočné farbivo z koreňov vymyli v destilovanej vode (najmenej 1hod.), odrezali koncové časti koreňa, ktoré zahŕňali meristematické bunky a bunky koreňovej čiapočky, roztláčili v kvapke 1%

acetokarmínu a podľa potreby nahriali nad plameňom kahana. Roztlaky sme pozorovali pod mikroskopom AXIOPLAN (Opton, West Germany) s pripojenou ccd kamerou. Výsledky sme analyzovali programom CHROMOVIDAS.

## Výsledky

Indukciu kalusu na segmentoch semenníkov sme pozorovali od 1 do 2 mesiacov počas kultivácie *in vitro*. Úspešnosť indukcie tvorby kalusu bola pri genotypu Viking (32,4%) vyššia ako pri AC Emerson (15,4%). Regenerácia zelených rastlín z kalusovej kultúry pri AC Emerson (8,8%) bola naopak oveľa úspešnejšia ako pri Viking (1,8%) a realizovala sa prednostne cestou organogenézy (obr. 1, 2).

Na riadení s koordináciou metabolizmu rastu a morfogénzy explantátu v *in vitro* kultúre sa významne podieľajú rastlinné hormóny. Zo sledovania účinku fytohormónov na regeneráciu môžeme povedať, že auxín 2,4-D má vplyv na dediferenciáciu buniek kultivovaného pletiva a kalogenézu. Cytokiníny BAP a zeatín ovplyvňujú organogenézu a rast indukovaných štruktúr. TDZ má priaznivý vplyv na indukciu embryám podobných štruktúr (obr. 4) a v kombinácii s BAP podporuje regeneráciu zelených rastlín z indukovaného kalusu.

Fenotyp indukovaných kalusov sa počas kultivácie menil. BEŽO a HRUBÍKOVÁ (1999) uvádzajú znaky, ktorými popisujú morfológické kvalitatívne vlastnosti kalusov: formu, konzistenciu, štruktúru, farbu, tvar, povrch a kvantitatívne vlastnosti: plochu a hrúbku kalusu podľa klasifikátora fenológie explantátových štruktúr (Bežo, 1995). Na základe tejto metodológie môžeme povedať, že indukované kalusy mali na začiatku kultivácie formu nediferencovanej hmoty s indukovanými koreňmi, alebo bez nich (1,3), ich konzistencia bola rozpadavá (1), štruktúra jemnozrnitá (1) a boli rôznej farby od žltej až po zelenú (4, 6, 7). Tvar mali pravidelný guľatý, resp. pologuľatý (1,2), povrch mali matný (5), intenzita rastu bola stredná až vysoká (5,7). Veľkosť kalusu varíovala od malej (3) až po strednú (5). Po 6-7 mesiacoch subkultivácií sme pozorovali tvorbu výhonov a embryám podobných štruktúr na kalusoch (forma 6-7), ktoré boli kompaktné (5), aj rozpadavé (1), s jemnozrnitou štruktúrou (1) a boli zelenej farby (9). Mali pravidelný tvar (7), rástli všetkými smermi strednou intenzitou rastu (5), ich povrch bol matný (5) a boli značne veľké (7,9).

Pri kalusoch rôznej farby sme zistili, že majú odlišný podiel buniek s ploidiou  $2n$  a s vyššími ploidiemi. Žltozelené kalusy genotypu AC Emerson boli diploidné –  $2n$  (100%) ako aj väčšina buniek kalusov genotypu Viking (83,3%). Sýtozelené kalusy oboch genotypov obsahovali aj bunky vyššej ploidiie:  $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$ ,  $16n$  (obr. 5). Na základe výsledkov rýchlych roztlakových preparátov sme mohli určiť, že regenerácia rastlín sa uskutočnila z haploidných a diploidných buniek kalusov. Regeneranty mali 15, ale najčastejšie 30 chromozómov (obr. 3a, b).

## Diskusia

V semenníku ľanu sa nachádza obyčajne 10 vajíčok. Všetky vajíčka nie vždy dozrejú, pretože v *in vivo* podmienkach môže dôjsť k aborcii zygotových embryí. Pri samoopelivých rastlinách môže až 80% oplodnených vajíčok dozrieť (WIENS et al., 1987). Jednou z príčin môže byť aj „rivalita“ medzi vajíčkami, ktorú reguluje aj samotné pletivo semenníka. V *in vitro* podmienkach je vplyv environmentálnych podmienok eliminovaný a cestou gynogenézy je možné získať dihaploidné fertílné rastliny vo veľmi krátkom čase.

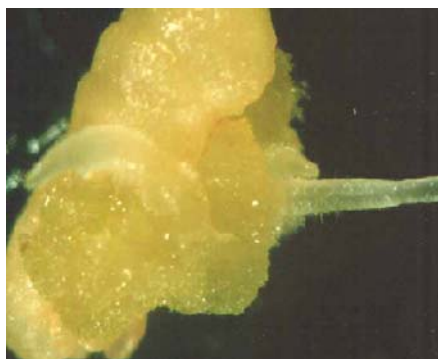
Počas indukcie gynogénneho vývinu v *in vitro* kultúre semenníkov ľanu vo väčšine prípadov pravdepodobne došlo k spontánnej diploidizácii v ranom štádiu. Je známe, že podobne k diploidizácii dochádza pri indukcii tvorby kalusu odvodeného z mikrospór v kultúre peľníc ľanu. Opakovanými subkultiváciami indukovaných kalusov sa stabilizovala ich kompaktná konzistencia, aj ich forma a stimulovala sa tvorba výhonov i embryám podobných štruktúr. Jemnozrnitá štruktúra sa zachovávala. Zelená farba kalusov postupne prevažovala nad žltou. Kalusové kultúry, ako je to v prípade kalusov pochádzajúcich z kultúry peľníc a semenníkov ľanu (OBERT et al., 2004), sú geneticky nestabilné systémy, v ktorých sa silne prejavuje somaklonálna variabilita v obsahu DNA. Somaklonálna variabilita predstavuje takú genetickú variabilitu, ktorá vzniká *in vivo* v rôznych adventívnych meristémoch rastlín, ako aj v *in vitro* pestovaných somatických bunkách, v bunkách kalusov, alebo v jednobunkových systémoch. Hoci mechanizmy vzniku tejto variability ešte nie sú známe, predpokladá sa, že práve prítomnosť rastových látok v kultúre *in vitro* indukuje karyologické zmeny, ako aj zmeny regulácie génov, transpozóny, modifikácie metylačných zmien na DNA, výskyt mutácií majorgénov a minorgénov atď. Jej vznik však závisí nielen od zloženia média, ale aj od doby kultivácie *in vitro*, pretože bunky kalusu majú tendenciu zvyšovať ploidiu v kultúre (MILTON CONSTANTIN, 1981).

## Záver

V sledovanom prípade kultúry izolovaných semenníkov sme pozorovali, že regenerácia bola závislá od genetickej predispozície použitých kultivarov. Účinnosť regenerácie bola nízka, čo je možné zdôvodniť zvyšujúcou sa ploidiou buniek v kaluse, pretože prebiehala prednostne z diploidných buniek cestou organogenézy. Haploidný pôvod a zmeny v expresii proteínov na regenerantoch boli ďalej analyzované na úrovni proteínov (BARTOŠOVÁ et al., 2005).

**Literatúra**

- BARTOŠOVÁ, Z. – OBERT, B. – TAKÁČ, T. – KORMUŤÁK, A. - PREŤOVÁ, A.: Using enzyme polymorphism to identify the gametic origin of flax regenerants. In: Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, vol.47/1, 2005, p. 173-178
- BARTOŠOVÁ, Z. – PREŤOVÁ, A.: Indukcia kalogenézy v kultúre izolovaných semenníkov a peľníc vybraných odrôd ľanu siateho. In: Zb. z 10. odb. seminára. Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín, 2003, s. 25-28
- BEŽO, M.: Analýza fenotypovej variability explantátových kultúr pomocou počítačového zobrazenia. In: Biotechnol. metódy v šľachtení rastlín. Zbor. Ref. z 4. vedec. Konf. BIOS'95, s. 5-11
- BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K.: Phenotypic markers obtained for embryogenic callus cells by cultivation. In: Acta fytotechnica et zootechnica 2, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 1999, p. 29-32
- BOHANEC, B. – JAKŠE, M.: Variation in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. In: Plant Cell Reports, 1999, vol. 18, p. 737-742
- MILTON CONSTANTIN, J.: Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. In: Environmental and Exp. Botany, 1981, vol. 21, n. 3/4, p. 359-368
- NICHTERLEIN, K.: Anther culture of linseed (*Linum usitatissimum* L.). In: Maluszynski, M.; Kasha, K. J.; Forster, B. P.; Szarejko, I. (eds.), Doubled haploid production in crop plants, Kluwer Acad. Publ., IAEA, 2003, p. 249-254
- NOVÁK, F. J.: Explantátové kultúry a jejich využití ve šlechtění rostlin. 1. vyd., Praha, Academia, 1990, s. 208
- OBERT, B. – DEDIČOVÁ, B. – HRICOVÁ, A. – ŠAMAJ, J. – PREŤOVÁ, A.: Flax anther culture: effect of genotype, cold treatment and media. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, vol. 79, p. 233-238
- SHIVANNA, K. R.: Production of haploids through gynogenesis. In: Shivanna, K. R. (ed.), Pollen Biology and Biotechnology, Enfield, 2003, p. 227-229
- WIENS, D. – CALVIN, C., L. – WILSON, C., A.- DAVERN, C., I. – FRANK, D. – SEAVEY, S., R.: Reproductive success, spontaneous embryo abortion and genetic load in flowering plants. In: Oecologia, 1987, vol. 71, p. 501-509



Obr. 1 Indukovaná kalogenéza a organogenéza na segmente semenníka (Viking).



Obr. 2 Histologický rez organogénnym kalusom (Viking).



a



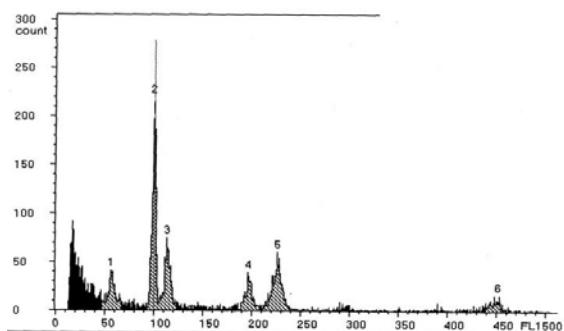
b

Obr. 3 a, b Karyológia regenerantov (zv. 100x). Haploidná bunka genotypu Viking (a) v metafáze mitózy a dihaploidná bunka AC Emerson (b) v anafáze mitózy.





Obr. 4 Embryu podobná štruktúra na regenerujúcom segmente semenníka (genotyp AC Emerson).



Obr. 5 Ploidia buniek kalusu tmavozelenej farby (n=30 chromozómov): 2n (1; 21,7%), vnútorný štandard (2,4), 4n (3; 32,2%), 8n (5; 36,1%), 16n (6; 10%)

### Pod'akovanie

Chceme sa poďakovať ústavu biologických a ekologických vied UPJŠ Košice, kde sa realizovalo flow cytometrické meranie ploidie kalusov ľanu.

# EFEKT IÓNOV KADMIA NA POLYMORFIZMUS ENZÝMOV KLÍČENCOV KUKURICE SIATEJ (*ZEA MAYS* L.) EFFECT OF IONS OF CADMIUM ON THE ENZYME POLYMORPHISM IN SEEDLINGS OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.)

Pavol MÚDRY – Marián DRAGÚŇ

*During 2005 - 2008 we have devoted attention to influence of different concentrations of cadmium ions (0, 15, 60, 240 and 960  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  in full Hoagland solutions) on enzyme polymorphism of ten enzymes – acid phosphatase (ACP), alcohol dehydrogenase (ADH), CAT–catalase, DIA–diaphorase, GOT–glutamateoxaloacetatetransaminase, isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD), phosphoglucoisomerase (PGI) and phosphoglucomutase (PGM) – in coleoptiles (5 days cultivation), in leaf blades of developed leaves and in the central parts of primary root systems of seedlings (14 days of cultivation) of two self-pollinated maize (*Zea mays* L.) lines and their single-cross. From analyses and their genetical interpretation resulted: a) the biological material was homogeneous on the basis of enzyme polymorphism, self-pollinated lines had homozygous constitution in each analysed locus and hybrid had three loci (*Acp1*: 2/4, *Idh2*: 4/6 and *Pgd1*: 2/3.8) with heterozygous constitution, b) ions of cadmium negatively influenced seedling growth and development, concentration of 960  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  Cd was toxic and stopped further growth and development of maize seedlings after five days cultivation, c) the coincidence of constitutions in all analysed loci responsible for enzyme polymorphism expression supported their genotypic, organ and ontogenetic stability at high doses of cadmium ions (Table 1 and 2).*

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

## Úvod

Polymorfizmus enzýmov živých systémov je známy už päť desaťročí. Prakticky pri všetkých organizmoch s vlastným systémom enzýmov možno predpokladať existenciu polymorfizmu enzýmov. Genetická podmienenosť biosyntézy, kodominantná expresia génov a dostatočný rozsah variability do značnej miery ovplyvňujú ich výskum v teoretických a aplikačných oblastiach. Jednou z aplikačných oblastí najčastejšieho využitia polymorfizmu enzýmov je ich aplikácia ako molekulárnych markerov genotypovej identity a homogenity. V tomto prípade zvlášť dôležitú úlohu zohráva štandardizácia podmienok analýz vo vzťahu ku kultivačným podmienkam a k ontogenetickému stavu biologickej vzorky.

Kukurica siata (*Zea mays* L.) patrí k našim kľúčovým poľnohospodárskym plodinám a je po pšenici a ryži treťou najvýznamnejšou plodinou z celosvetového hľadiska. K významným exogénnym faktorom ovplyvňujúcim rast a vývin poľnohospodárskych plodín všeobecne, a teda aj ich produkčných schopností, patria xenobiotiká (cudzorodé látky), ku ktorým patria aj ťažké kovy (hlavne Cd, Pb, Hg, Ni, Zn, Cu). Toxicita iónov ťažkých kovov môže byť spôsobená väzbou kovov na sulfanylové skupiny v proteínoch (vrátane enzýmov), čo sa prejaví inhibíciou aktivity enzýmov alebo porušením ich štruktúry (VAN ASSCHE, CLIJSTERS 1990). Inhibícia enzýmov toxickými kovmi môže byť spôsobená maskovaním katalyticky aktívnych skupín alebo denaturáciou bielkovín. Okrem toho nadbytok toxických kovov môže stimulovať formovanie radikálov a reaktívnych kyslíkových skupín (DIETZ et al., 1999; GALLEGO et al., 1996).

Kadmium je neesenciálnym prvkom pre rastliny (VERKLEIJ, SCHAT 1990) a jedným z potenciálne najrizikovejších kovových polutantov, pretože je extrémne toxický pre rastliny, živočíchov a ľudí (CIESLINSKI et al. 1996). Zmeny aktivity enzýmov v skorých etapách rastu a vývinu kukurice vyvolané vyššími koncentraciami kadmia sú rozsiahlo študované a publikované. Na druhej strane však je potrebné poznamenať, že sa venuje málo pozornosti biochemickej a ekofyziologickej úlohe a významu multiplicity enzýmov vo vzťahu k vyšším koncentraciám kadmia (napr. vo vzťahu k rezistencii kultivarov).

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

## Materiál a metódy

V rokoch 2005-2008 sme uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov dvoch rodičovských samoopelivých línií Lč. 3098 (♀) a Lč. 3150 (♂) a ich dvojlíniového hybridu Sc 3098 x 3150 kukurice siatej (*Zea mays* L.), ktorých biologickú identitu garantovala a pre experimentálnu prácu poskytla slovenská firma Sempol Holding a. s., Trnava (Ing. Miloslav Masnica, PhD.). Analýzu a genetickú interpretáciu polymorfizmu enzýmov sme uskutočnili štandardizovanou metódou horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle (STUBER a kol., 1988). Klíčenie zrn trvalo päť dní a následná kultivácia klíčencov štrnásť dní v termostate na filtračnom papieri v Petriho miskách za tmy a pri teplote 25 °C. Experimentálne varianty reprezentovali klíčence kultivované v 12,5 ml plného Hoaglandovho roztoku bez a s prídavkom kadmia vo forme  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , a to v koncentraciách: 0, 15, 60, 240 a 960  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Po piatich dňoch kultivácie analyzované vzorky tvorili

koleoptily (11 mm dlhé segmenty), po štrnástich dňoch časti listových čepeľí primárnych listov (150 mg) a stredné úseky primárnych koreňových systémov (250 mg).

Analýzy polymorfizmu kyslej fosfatázy (ACP, E.C. 3.1.3.2) a malátdehydrogenázy (MDH, E.C. 1.1.1.37) sme uskutočnili v systéme tlmivého roztoku B (L-histidín a kyselina citrónová, pH 5,7), alkoholdehydrogenázy (ADH, E.C. 1.1.1.1), katalázy (CAT, E.C. 1.11.1.6) a glutamát-oxaloacetáttransaminázy (GOT, E.C. 2.6.1.1) v systéme C (kyselina boritá a hydroxid lítny, pH 8,3), diaforázy (DIA, E.C. 1.6.99.2) v systéme F (trizma zásada a kyselina citrónová, pH 7,0), izocitrátdehydrogenázy (IDH, E.C. 1.1.1.42), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD, E.C. 1.1.1.44), fosfoglucoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1) v systéme D (L-histidín a kyselina citrónová, pH 6,5).

## Výsledky a diskusia

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

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

Výsledky analýz a ich genetickej interpretácie sú uvedené v tabuľke 1 a 2. Z nich vyplýva, že vzorky rodičovských líniových materiálov a ich dvojlíniového hybridu sú homogénne a identické na základe porovnania fingerprintov z predošlých analýz. Samoopelivé línie vo všetkých analyzovaných lokusoch majú homozygotnú konštitúciu, kým ich dvojlíniový hybrid má tri lokusy s heterozygotnou konštitúciou Acp1: 2/4, Idh2: 4/6 a Pgd1: 2/3.8. Tým spĺňajú kritériá línií a hybridov aj z hľadiska biochemickej diverzity. Ostatné analyzované lokusy (Adh1, Mdh1, 2, 3, 4, 5, Mmm, Idh1, Pgd2, Pgi1, Pgm1 a 2) sú vo všetkých vzorkách monomorfne. Nedochádza ku kvalitatívnym zmenám v zastúpení izoenzýmov v analyzovaných lokusoch a nezaznamenali sme ani expresiu iných lokusov analyzovaných druhov enzýmov, napriek použitým extrémnym dávkam Cd v živnom médiu. To však nevylučuje zmeny na úrovni koncentrácií, resp. aktivít detekovaných izoforiem. Na interorgánovej úrovni sme tiež nezaznamenali žiadne výraznejšie zmeny. Zhodnosť konštitúcie analyzovaných lokusov zodpovedných za expresiu polymorfizmu enzýmov potvrdzuje ich genotypovú, orgánovú a ontogenetickú stabilitu aj za pôsobenia vysokých dávok iónov kadmia.

## Záver

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

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

## Literatúra

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

MÚDRY, P. - DRAGÚŇ, M. - KRÁLOVÁ, K. - MASAROVÍČOVÁ, E.: Effect of cadmium on the activity of some enzymes in vascular plants. Proceedings, 27<sup>th</sup> International Symposium Industrial Toxicology 2007, Bratislava 30. May – 1. June 2007, ISBN 978-80- 227-2654-2, 342-347.

STUBER, C.W. – WENDEL, J.F. – GOODMAN, M.M. – SMITH, J.S.C.: Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin 286, North Carolina Agric. Res. Service, North Carolina State University, Raleigh, 1988, 1-87.

VAN ASSCHE, F. - CLIJSTERS, H.: Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ., 13, 1990, 195-200.

VERKLEIJ, J.A.C. - SCHAT, H.: Mechanisms of metal tolerance in higher plants, 1990, 179–194 In: SHAW, A.J. (Ed.) Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. Boca Raton, CRC Press.

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

Genotyp Orgán	Koncentrácia Cd ( $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) Doba klíčenia	Poč. anal. vzoriek	Enzýmy, lokusy a alely													
			ACP Acp1	ADH Adh1	CAT Cat3	DIA Dia1	2	MDH Mdh1	2	3	4	5	Mmm			
<b>Lč. 3098 (♀)</b>	<b>5 dní klíčenia (10)</b>															
koleoptila (7)	0	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	15	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	60	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	240	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	960	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Lč. 3150 (♂)</b>	<b>5 dní klíčenia</b>															
koleoptila	0	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	15	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	60	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	240	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	960	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Sc Lč. 3098 x Lč. 3150</b>	<b>5 dní klíčenia</b>															
koleoptila	0	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	15	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	60	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	240	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koleoptila	960	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Lč. 3098 (♀)</b>	<b>14 dní klíčenia (11)</b>															
vyvinutý list (8)	0	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	15	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	60	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	240	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Lč. 3150 (♂)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>															
vyvinutý list	0	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	15	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	60	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	240	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Sc Lč. 3098 x Lč. 3150</b>	<b>14 dní klíčenia</b>															
vyvinutý list	0	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	15	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	60	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
vyvinutý list	240	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Lč. 3098 (♀)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>															
koreňový systém (9)	0	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	15	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	60	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	240	1	2	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Lč. 3150 (♂)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>															
koreňový systém	0	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	15	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	60	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	240	1	4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
<b>Sc Lč. 3098 x Lč. 3150</b>	<b>14 dní klíčenia</b>															
koreňový systém	0	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	15	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	60	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	
koreňový systém	240	1	2/4	4	9	8	4	6	3	16	12	12	12	12	M	

Tabuľka 2: Polymorfizmus enzýmov (GOT, IDH, PGD, PGI a PGM) orgánov klíčencov troch genotypov kukurice siatej (*Zea mays* L.) kultivovaných pri rôznych koncentráciách kadmia

Genotyp Orgán	Koncentrácia Cd ( $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) Doba klíčenia	Poč. anal. vzoriek	Enzýmy, lokusy a alely										
			GOT Got1	2	3	IDH Idh1	2	PGD Pgd1	2	PGI Pgi1	PGM Pgm1	2	
<b>Lč. 3098 (♀)</b>	<b>5 dní klíčenia</b>												
koleoptila	0	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koleoptila	15	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koleoptila	60	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koleoptila	240	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koleoptila	960	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
<b>Lč. 3150 (♂)</b>	<b>5 dní klíčenia</b>												
koleoptila	0	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koleoptila	15	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koleoptila	60	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koleoptila	240	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koleoptila	960	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
<b>Sc Lč. 3098 x Lč. 3150</b>	<b>5 dní klíčenia</b>												
koleoptila	0	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koleoptila	15	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koleoptila	60	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koleoptila	240	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koleoptila	960	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
<b>Lč. 3098 (♀)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>												
vyvinutý list	0	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
vyvinutý list	15	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
vyvinutý list	60	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
vyvinutý list	240	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
<b>Lč. 3150 (♂)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>												
vyvinutý list	0	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
vyvinutý list	15	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
vyvinutý list	60	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
vyvinutý list	240	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
<b>Sc Lč. 3098 x Lč. 3150</b>	<b>14 dní klíčenia</b>												
vyvinutý list	0	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
vyvinutý list	15	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
vyvinutý list	60	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
vyvinutý list	240	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
<b>Lč. 3098 (♀)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>												
koreňový systém	0	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koreňový systém	15	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koreňový systém	60	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
koreňový systém	240	1	4	4	4	4	6	3.8	5	4	9	4	
<b>Lč. 3150 (♂)</b>	<b>14 dní klíčenia</b>												
koreňový systém	0	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koreňový systém	15	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koreňový systém	60	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
koreňový systém	240	1	4	4	4	4	4	2	5	4	9	4	
<b>Sc Lč. 3098 x Lč. 3150</b>	<b>14 dní klíčenia</b>												
koreňový systém	0	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koreňový systém	15	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koreňový systém	60	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	
koreňový systém	240	1	4	4	4	4	4/6	2/3.8	5	4	9	4	

## MAPOVÁNÍ GENOMŮ V RÁMCI KOMPLEXU *FESTUCA-LOLIUM* GENOME MAPPING WITHIN THE *FESTUCA-LOLIUM* COMPLEX

David KOPECKÝ – Jan BARTOŠ – Jaroslav DOLEŽEL

*Species within the Festuca-Lolium complex are agronomically important. The intergeneric hybrids Festuca × Lolium may combine desirable characters of their parents and the Festulolium cultivars are very popular as forage and turf. Due to permissive chromosome pairing, meiosis in such hybrids is regular with high frequency of intergeneric recombination. Parental chromosomes can be readily distinguished in Lolium – Festuca hybrids by genomic in situ hybridization (GISH). However, GISH has a defined limit of resolution and cannot identify small intergenomic exchanges. To increase the resolution level in tracking intergenomic recombination in Festuloliums, we have developed a DArT (Diversity Array Technology) chip for five important species of the complex (F. pratensis, F. arundinacea, F. glaucescens, L. perenne and L. multiflorum). In the first marker discovery experiment performed with 40 genotypes per species (with the exception of F. glaucescens for which only 7 genotypes were used) we identified 2638 markers of which 631 are specific for Festuca and 517 for Lolium. To allocate these DArT markers to individual chromosomes and chromosome bins of F. pratensis, we have developed a series of seven single chromosome substitution and recombinant lines of F. pratensis in tetraploid L. multiflorum. The use of recombination lines with different length of introgressed Festuca chromosome segments enabled mapping DArT markers to particular chromosome regions. The resources developed in this work will facilitate development of genetic maps in Festuca and Lolium and the analysis of genomic constitution and its evolution during breeding the Festuca × Lolium hybrids.*

*Key words: introgression, meiosis, DArT chip, grass breeding, Lolium x Festuca, genomic in situ hybridization*

### Úvod

Jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) jsou často využívány jako pícninové a travníkové trávy zejména pro jejich rychlý vývin na jaře, vysoký obsah nutričních látek, dobrou stravitelnost, tmavě zelenou barvu a uniformitu. Jejich velkou slabinou je však relativně nízká tolerance k různým abiotickým i biotickým stresům. Vesměs reciprokými vlastnostmi k oběma jílkům se vyznačují druhy kostřav (JAUHAR, 1993). Ve šlechtění se nejčastěji využívá kostřava luční (*Festuca pratensis*) a kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea*). Zástupci obou rodů se spolu mohou křížit z vzniku fertálních hybridů, které souhrnně označujeme jako *Festulolium*. Jejich genomové složení (zastoupení rodičovských genomů) lze zjistit několika metodami. Jako velice efektivní se ukázala genomové *in situ* hybridizace (GISH), která umožňuje vizualizovat rodičovský chromatin na metafázních chromozómech hybridu (KOPECKÝ et al. 2008a). Tato metoda ale naráží na rozlišovací limity, které mohou být i několik Mb (LUKASZEWSKI et al., 2005). Takto velké a menší segmenty chromozómů introgresované z jednoho rodiče do druhého nemusí být spolehlivě identifikovány. Další možností určení genomového složení hybridu je využití molekulárních markerů. Celá řada markerů je k dispozici pro oba druhy jílků (HAYWARD et al., 1998; HIRATA et al., 2006), bohužel poměrně malé množství markerů bylo dosud odvozeno pro kostřavy (ALM et al., 2003). Z tohoto důvodu jsme vytvořili DArT chip a na této studii demonstrováme jeho použití.

### Materiál a metody

Pro tento projekt bylo použito 40 genotypů (odrůd a ekotypů) z každého druhu *L. perenne*, *L. multiflorum*, *F. pratensis*, *F. arundinacea* a 7 genotypů *F. glaucescens*. Z těchto položek byl vytvořen DArT chip (bližší informace na [www.diversityarrays.com](http://www.diversityarrays.com)).

Pro ukotvování DArT markerů na jednotlivé chromozómy jsme použili substituční linie, kde v tetraploidním jílků (*L. multiflorum*) byl nahrazen jeden chromozóm jílků homeologním chromozómem kostřavy (*F. pratensis*). Všechny sedm linií (pro všech sedm chromozómů *F. pratensis*) bylo dále zpětně kříženo s tetraploidním jílkem a bylo získáno cca 30 rekombinačních linií s různě dlouhými rekombinovanými segmenty chromozómu *F. pratensis*. Čtrnáct rekombinačních linií pro chromozóm N (homeologní chromozóm 3 v chromozómové nomenklatuře Triticeae) bylo použito k pilotní studii detailního ukotvování DArT markerů na jednotlivé segmenty chromozómů („biny“).

Pro zjištění jedinečnosti substitučních linií byly použity metoda GISH a FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace). Pro tyto cytologické analýzy byly odebrány kořenové špičky jednotlivých rostlin rostoucích v hydroponickém roztoku. Kořenové špičky byly umístěny ve zkumavkách s ledovou vodou po 26–28 hodin a pak přeneseny do fixáže (absolutní alkohol a ledová kyselina octová v poměru 3:1). Pro genomickou *in situ* hybridizaci byl použit protokol MASOUDI-NEJAD et al. (2002). Jako sonda byla použita DNA kostřavy luční značená digoxigeninem. DNA jílků byla použita jako blokovácí DNA. Standardní poměr sondy a blokovácí DNA byl 1:150. Detekce hybridizačního signálu byla provedena Anti-DIG-FITC konjugátem a chromozómy byly podbarveny pomocí propidium jodidu. Po zjištění přítomnosti jednoho substituovaného chromozómu *F. pratensis* byl mikroskopický preparát vymyt podle metod SCHWARZACHER a HESLOP-HARRISON (2000) a pro další hybridizaci byla použita trojice sond (45S-rDNA, 5S-rDNA a BAC klon 1G18), která umožňuje identifikovat všech sedm chromozómů *F. pratensis* (Obr. 1; KOPECKÝ et al., 2008b).

## Výsledky a diskuze

Z celkového množství 7680 sond odvozených z metyl-filtrovaných genomových reprezentací bylo získáno 2638 polymorfních DArT markerů. Z těchto markerů bylo 631 specifických pro rod *Festuca* a 517 specifických pro rod *Lolium* (viz Obr. 2). Pomocí subsitučních linií bylo identifikováno 272 markerů specifických pro jednotlivé chromozomy kostřavy luční. Tyto markery jsou chromozómově i druhově (pro *F. pratensis*) specifické a lze je snadno aplikovat při analýze hybridů. Pomocí rekombinačních linií chromozómu 3 byla demonstrována možnost ukotvení chromozómově a druhově specifických markerů na jednotlivé chromozómové biny (viz Obr. 3). Z celkového počtu 14 linií se podařilo sestavit 9 chromozómových binů, které obsahují 1-8 DArT markerů.

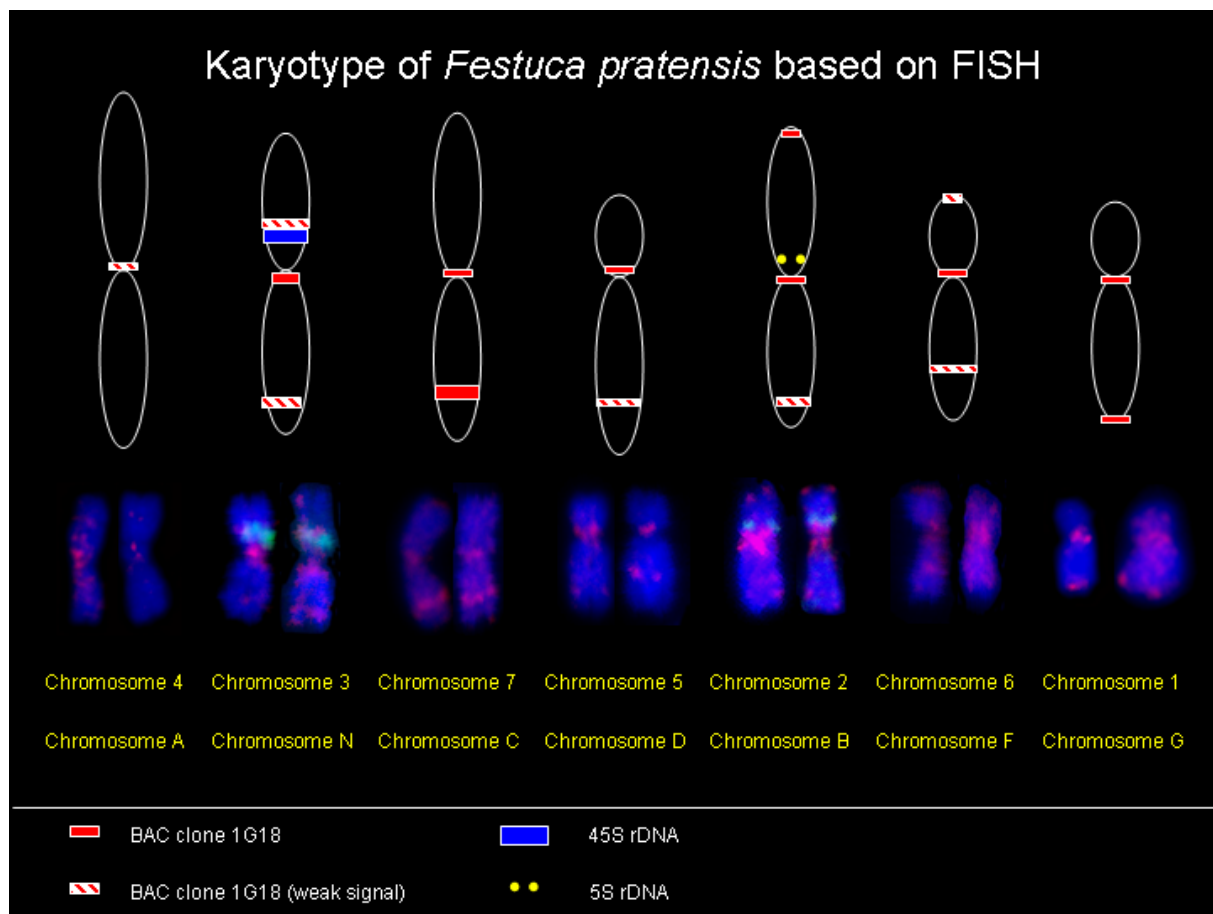
Ve spojení s analýzou mapovací populace *F. pratensis* bude možné určit fyzickou i genetickou polohu jednotlivých markerů. To zajistí potřebné předpoklady pro úspěšné fyzické a genetické mapování daného druhu. Podobnou strategii mapování prezentovali KING et al. (2006), kteří takto lokalizovali AFLP, RFLP a SSR markery ukotvené na genetické mapě. Velkou výhodou DArT markerů je jejich velké množství a velmi nízká cena za „datapoint“.

## Závěr

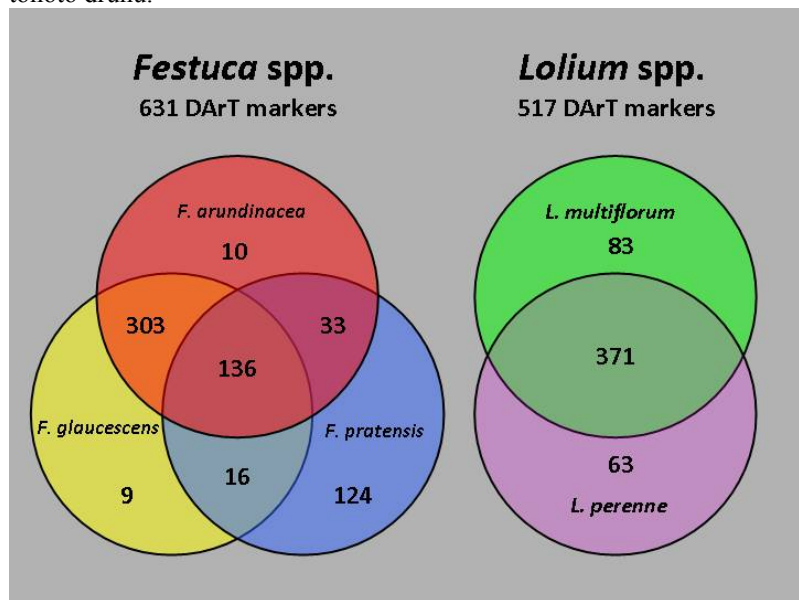
Tato práce demonstruje perspektivní metodu určení genomového složení různých hybridů v rámci komplexu *Festuca-Lolium* pomocí DArT markerů. Vytvoření značného množství molekulárních markerů umožní identifikaci markerů v těsné vazbě na agronomicky významné znaky, jejich umístění na genetické mapě a fyzickou lokalizaci na chromozomy pomocí rekombinačních linií.

## Literatura

- ALM, V. - FANG, C. - BUSSO, C.S. et al.: A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other *Poaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 2003, 25-40
- HAYWARD M.D. – FORSTER, J.W. – JONES, J.G. et al.: Genetic analysis of *Lolium*. I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map. *Plant Breeding* 117, 1998, 451-455
- HIRATA, M. – CAI, H.W. – INOUE, M et al.: Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theoretical and Applied Genetics* 113, 2006, 270-279.
- KING, J. – ARMSTEAD, I.P. – DONNISON, I.S. et al.: Introgression mapping in the grasses. *Chromosome Research* 15, 2007, 105-113.
- KOPECKÝ, D. - LUKASZEWSKI, A.J. – DOLEŽEL, J.: Cytogenetics of Festulolium (*Festuca* × *Lolium* hybrids). *Cytogenetics and Genome Research* 120, 2008a, 370-383
- KOPECKÝ, D. - LUKASZEWSKI, A.J. – DOLEŽEL, J.: Meiotic behavior of individual chromosomes of *Festuca pratensis* in tetraploid *Lolium multiflorum*. *Chromosome Research* DOI: 10.1007/s10577-008-1256-0, 2008b.
- LUKASZEWSKI, A.J. – LAPINSKI, B. – RYBKA, K.: Limitations of in situ hybridization with total genomic DNA in routine screening for alien introgressions in wheat. *Cytogenetics and Genome Research* 109, 2005, 373-377.
- MASOUDI-NEJAD, A. – NASUDA, S. – McINTOSH, R.A. – ENDO, T.R.: Transfer of rye chromosome segments to wheat by a gametocidal system. *Chromosome Res.* 10, 2002, 349-357

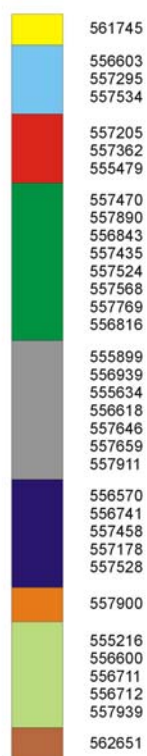


Obrázek 1: Karyotyp kostřavy luční (*Festuca pratensis* Huds.). Morfologie chromozómů a fluorescenční *in situ* hybridizace tří sond (45S-rDNA, 5S-rDNA a BAC klon 1G18) umožnila identifikaci všech sedmi chromozómů tohoto druhu.



Obrázek 2: Rodově a druhově specifické DArT markery vyvinuté v rámci tohoto projektu.



**Chromosome N (3)**

Obrázek 3: DArT markery ukotvené na jednotlivé biny chromozómu N (chromozóm 3 v chromozómovej nomenklatúre Triticeae).

# VARIABILITA MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ U POPULACE PLANÝCH FOREM CHMELE

## MICROSATELLITE MARKERS VARIABILITY IN POPULATION OF WILD HOPS

Jakub VAŠEK – Pavel VEJL – Vladimír NESVADBA – Daniela ČÍLOVÁ – Jana ZOUFALÁ

*Hop (Humulus lupulus L.) is dioecious, perennial climbing plant belongs to family Cannabaceae. It is essential for brewing industry because of large amount bitter substances and other (polyphenolic etc.) substances. To study genetic diversity and variability between two populations of wild hops and hybrid progeny it was analyzed 159 genotypes by two microsatellite markers. It was identified total of 15 polymorphic alleles (5 for locus HIGA3 and 10 for locus HIGA4) with an average 7,5 allele per locus. The average  $H_O$  was 0,623 (for Vinařická hora) and 0,641 (hybrid progeny). The study has showed higher genetic diversity of population Vinařická hora against population of hybrid progeny, though there were only slight differences in average heterozygosity over all loci. Nine polymorphic alleles has proven that population Vinařická hora is really natural population created by more than two parent's components. Also it was found that four genotypes of hybrid progeny – 111, 141, 182 and 241 don't have any of declared father's alleles.*

*Key words: hop (Humulus lupulus L.), microsatellites, genetic diversity, allelic polymorphism*

### Úvod

Mikrosatelity neboli SSR (Simple Sequence Repeat) jsou krátké (1-5 bp) opakující se sekvence DNA. Jejich charakteristickým znakem je výskyt v eukaryotních organismech, náhodné rozptýlení v celém genomu a vysoká variabilita [14]. Předpokládá se, že tato variabilita je způsobena rozdílem v délce opakující se sekvence, kterou lze snadno detekovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Mikrosatelity jsou kodominantní, multialelické a polymorfní [10]. Díky těmto vlastnostem se považují za vysoce informativní a přesné, přestože může docházet k chybné interpretaci výsledků [11].

V současné době jsou tyto markery široce rozšířené v různých oblastech genetického výzkumu nejen u rostlin. Jejich využití sahá od charakterizace jednotlivých genotypů, genetického fingerprintingu, určování příbuznosti, přes mapování genomu, studia variability až po různé populační studie.

Chmel (*Humulus lupulus L.*) je dvoudomá, vytrvalá rostlina řazená do čeledi *Cannabaceae*. Je esenciálně nezbytnou rostlinou především pro pivovarnický průmysl, který zpracovává chmelové hlávky s vysokým obsahem tzv. hořkých látek a dalších, které ovlivňují chuť výsledného produktu. Pro úspěšné šlechtění je nezbytné shromáždit velké množství co nejvariabilnějšího genetického materiálu k zvýšení pravděpodobnosti získání genotypů požadovaných vlastností. Nezbytnou součástí je také přesná charakterizace genetických zdrojů z hlediska vzájemné příbuznosti posuzující kulturní a plané chmely navzájem [4];[13] a také z hlediska genetické diverzity chmelů z různých oblastí [12]. Se zvyšujícím se uplatněním planých chmelů jakožto donorů požadovaných vlastností a zájmem o poznání vývoje chmele jako takového, narůstá také potřeba studií zaměřených na evoluci [7].

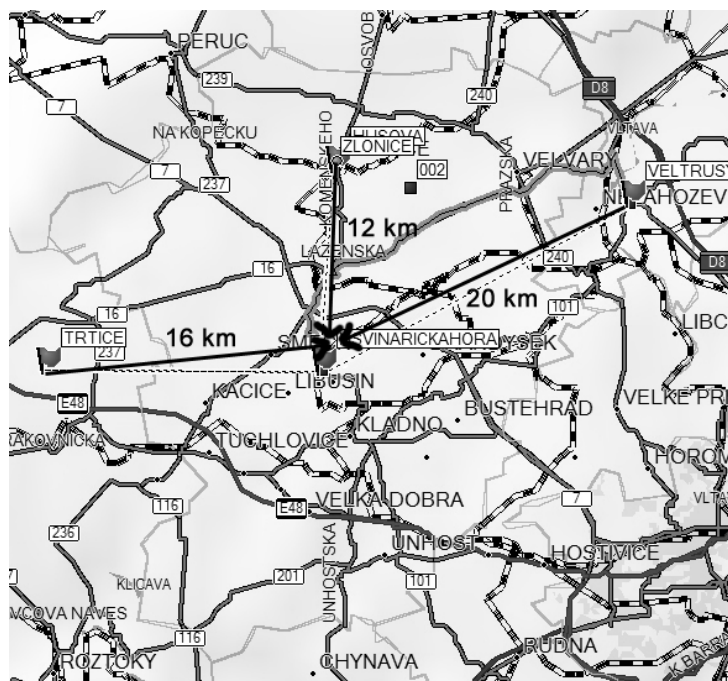
Cílem práce byla optimalizace a aplikace dvou mikrosatelitních markerů k zjištění variability a vzájemné příbuznosti mezi populací chmelů záměrného křížení a izolované populace planého chmele.

### Materiál a metody

#### Rostlinný materiál

První testovanou populací bylo 120 rostlin z kombinačního křížení prováděného v Chmelařském institutu s.r.o. v Žatci. Mateřskou komponentou byl genotyp s označením 4715. Jedná se o novošlechtění českého původu, které je v registračním řízení s navrženým jménem Vital. Otcovskou komponentou byl hybrid 00/15. Potomci byli značeni třímístným číslem dle evidence Chmelařského institutu. Mezi testované genotypy patřily tyto: č.111-129, 131-139, 141-161, 163-193, 208, 210-225, 228-248.

Druhá testovaná populace planých chmelů byla získána sběrem v oblasti Vinařické hory, která se nachází v katastru obce Třebichovice ve středních Čechách. Vinařická hora (50° 11' severní šířky, 14° 04' východní délky, 358 m n. m.) Lokalita je situována na úbočí třetihorního stratovulkánu. Populace se vyskytovala na ploše přibližně 60 m<sup>2</sup>. Rostliny vytvářely součást ekologického stanoviště společně se stromy a keři rodu *Prunus*, *Acer*, *Ligustrum* a *Crataegus*. V rámci této populace byly odebrány rostliny, které vykazovaly znaky jednoletých semenáčů. Z obrázku 1 vyplývá, že nejbližší lokality s komerčně pěstovaným chmelem se nacházejí ve vzdálenosti 12 km (Zlonice), 16 km (Třtice) a 20 km (Veltrusy). Z historických záznamů rovněž nevyplývá, že by v této lokalitě byl pěstován chmel. Lze tudíž předpokládat, že se nejedná o zplnělé formy chmele. Celkově bylo testováno 39 rostlin z této oblasti (VH 1-38, VH 40).



Obrázek 1: Mapa oblasti Vinařická hora: zvýrazněné jsou vzdálenosti nejbližších lokalit s komerčně pěstovaným chmelem

#### *Izolace, amplifikace a separace DNA*

DNA byla izolována z mladých listů kitem DNAsy Plant Mini Kit (Qiagen, SRN), přičemž na začátku izolace bylo přidáno 100 mg polyvinylpyrrolidonu (PVP). Z důvodu vysokého obsahu inhibičních látek bylo nutné u některých genotypů izolační postup opakovat a upravit přidáním 20% roztoku PVP před aplikací AP2 pufru a tzv. odsolovacího pufru [5] před aplikací AW pufru. Variabilita byla testována pomocí SSR metody, přičemž byly použity 2 páry primerů pro lokus HIGA3 a HIGA4 [3]. Reakční směs o celkovém objemu 12,5  $\mu$ l obsahovala 80 ng DNA a 0,5 U *Taq* polymerasy (Boehringer Mannheim, SRN). Koncentrace ostatních složek reakce byla následující: 1x KCl PCR pufr, 3 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTP, 0,4  $\mu$ M každý primer, 2 mM PCR Enhancer (TopBio, Česká republika), 0,008  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA. Amplifikace mikrosatelitních markerů byla provedena tzv. Touchdown PCR (TD-PCR) metodou a proběhla v termocykleru DNA Engine (Bio-Rad, USA) v těchto krocích: počáteční denaturace při 95  $^{\circ}C$  po dobu 4 minut, 12 cyklů se opakovaly fáze denaturace při 94  $^{\circ}C$  45 s, annealingu při 68,5  $^{\circ}C$  (pro primer HIGA3) nebo 63,5  $^{\circ}C$  (pro primer HIGA4) přičemž byla snižována teplota o 0,5  $^{\circ}C$ /cyklus po dobu 45 s a následovala elongace 1 min 30 s. Následovalo 16 cyklů kdy se opakovala denaturace při 94  $^{\circ}C$  45 s, annealing při 63  $^{\circ}C$  (pro primer HIGA3) nebo 58  $^{\circ}C$  (pro primer HIGA4) 45 s a elongace při 72  $^{\circ}C$  1 min 30 s. Finální elongace proběhla při 72  $^{\circ}C$  a trvala 8 minut. Posledním krokem bylo ochlazení vzorků na 4  $^{\circ}C$ . Optimální annealační teplota každého primeru byla zjišťována pomocí teplotního gradientu od 2  $^{\circ}C$  nižší teploty od optima dle [3] do +10  $^{\circ}C$  publikovaného optima. Separace vzorků byla provedena na vertikální elektroforetické cele Sequi - Gene II (Bio-Rad, USA) v 6 % w/v denaturačním (s obsahem 8M močoviny) akrylamidovém gelu v 1x TBE pufru. Amplifikované vzorky byly před nanesením na gel smíchány nanášecím denaturačním roztokem [1] v poměru 1:1 a podrobeny denaturaci 5 min. při 94  $^{\circ}C$ . Následně bylo přidáno ekvivalentní množství nanášecího denaturačního roztoku [1] naředěného vodou v poměru 1:1 pro snížení koncentrace amplifikované sekvence DNA. Separace vzorků probíhala 2 hodiny při 70 W. Nakonec byla použita metoda barvení stříbrem [1] a po zaschnutí byl výsledek zdokumentován a digitalizován pomocí scanneru HP scanjet 4500c (Hewlett-Packard, USA).

#### *Identifikace pohlaví*

Jako součást testování variability populací byla provedena PCR identifikace pohlaví všech rostlin. Byl použit molekulární marker dle [9] a metodika podle [8].

#### *Statistické vyhodnocení dat*

Pro porovnání skutečné a očekávané četnosti jednotlivých alel v modelové populaci kombinačního křížení byla použita metoda  $\chi^2$ -testu. Deskriptivní statistika populací byla provedena pomocí programu TFGA (Tools For Population Genetic Analyses) ver.1.3 [6].

## Výsledky a diskuse

Výběr populace vzniklé záměrným křížením dvou známých rodičovských komponent byl důležitý z několika důvodů. Umožnil ověření správnosti interpretace získaných dat, jednoznačnou identifikaci populace a charakterizaci potomstva křížení pro každý mikrosatelitní marker. Vzájemné srovnání s přirozenou populací z oblasti Vinařické hory ukázalo četnost výskytu jednotlivých alel a stupeň variability každého lokusu. Navíc studie ukázala některé překvapivé výsledky, podrobněji popsáné u každého markeru.

### Charakteristika mikrosatelitních markerů

Celkový počet genotypů v obou hodnocených populacích byl 159 jedinců. U této kolekce genotypů bylo celkově u dvou SSR markerů deklarováno 15 polymorfních alel. Tomuto údaji odpovídá průměrný počet 7,5 alel na 1 SSR lokus. Podle [3] byly tyto primery testovány na 39 kulturních a planých chmelech, přičemž pro lokus HIGA3 bylo nalezeno 6 alel a pro HIGA4 9 alel. Testováním 25 lokusů získal [12] od 5 do 31 polymorfních alel dle příslušného lokusu a v průměru 10,6 alely na lokus. Tyto výsledky poukazují na vysoký stupeň polymorfismu SSR markerů u chmele. Z toho vyplývá, že stačí relativně malý počet mikrosatelitních markerů na dostatečnou identifikaci, jak dokazuje [2], kde udává, že i 5 mikrosatelitních markerů určí příslušný kultivar chmele. U všech genotypů docházelo po optimalizaci ke kvalitní amplifikaci primerů pro lokus HIGA4, ale pro lokus HIGA3 se objevily mezi oběma populacemi kvalitativní rozdíly, nicméně u obou bylo možné identifikovat jednotlivé alely. Celkový stupeň heterozygosity pro oba lokusy se mezi populacemi příliš nelišil jak je patrné z tab.1, přestože by se dal očekávat vyšší stupeň u populace lokality Vinařická hora díky většímu počtu polymorfních alel. Nicméně výskyt 9-ti polymorfních alel prokázal vyšší stupeň genetické diverzity populace z Vinařické hory a je důkazem, že daná populace vznikla z více než dvou rodičovských komponent, ačkoliv se vyskytuje na relativně malé ploše 60 m<sup>2</sup>.

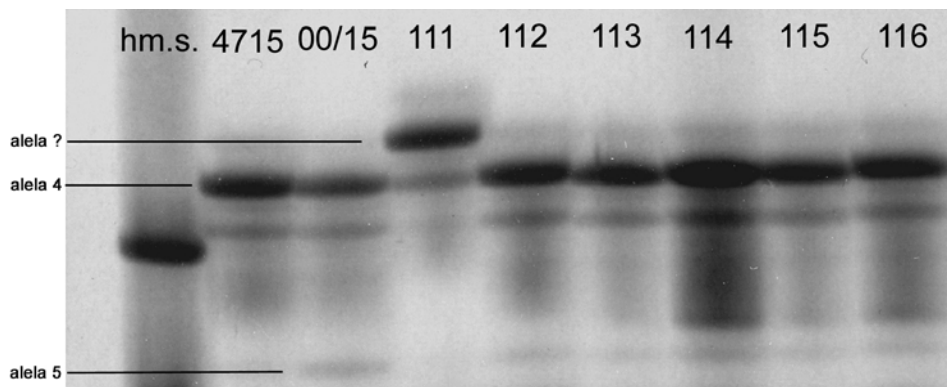
Tabulka 1: Stupeň heterozygosity pro oba lokusy

Populace 1 – kombinační křížení 4715 x 00/15	
průměrná $H_E^{(1)}$	0,620
průměrná $H_O^{(2)}$	0,623
průměrná $H_{DC}^{(3)}$	1,000
Populace 2 – Vinařická hora	
průměrná $H_E^{(1)}$	0,633
průměrná $H_O^{(2)}$	0,641
průměrná $H_{DC}^{(3)}$	1,000

(<sup>1</sup>) heterozygosity očekávaná, (<sup>2</sup>) heterozygosity pozorovaná, (<sup>3</sup>) heterozygosity kalkulovaná

### Lokus HIGA3

Test tohoto mikrosatelitního markeru ukázal, že rodiče jsou identičtí heterozygoti v daném lokusu tj. mají 2 různé alely, které jsou v tab. 2 označeny čísly 4 a 5. Teoreticky bylo předpokládáno, že u všech potomků z tohoto křížení by měla být identická sestava SSR alel 4 a 5. Byla však zjištěna překvapivá skutečnost a to sice, že potomek č. 111 se v obou alelách liší od ostatních, jak je patrné rovněž z obr.2.



Obrázek 2: Kombinační křížení pro lokus HIGA3 s nehodnoceným genotypem 111

Možným vysvetlením je opylenie jinou samčí rostlinou, než která je deklarována jako otcovská komponenta 00/15. Výsledek molekulární analýzy může být důkazem toho, že ani používané izolační postupy při záměrném křížení nedokáží 100% zabránit nežádoucímu cizosprašení. Příliš vysokou variabilitu tento marker neukázal ani uvnitř populace chmelů z oblasti Vinařické hory. U této populace byly zjištěny 3 polymorfni SSR alely, přičemž u všech se vyskytovala alela označená č.1 a rozdíly byly zjištěny pouze ve výskytu alely č.2 nebo č.3. Frekvence jednotlivých alel a další statistické údaje jsou uvedeny v tab. 2.

Tabulka 2: Deskriptivní statistika pro lokus HIGA3

<b>Populace 1 – kombinační křížení 4715 x 00/15</b>				
<b>Lokus HIGA3</b>	<b>počet pozorování na lokus<sup>(b)</sup> = 114</b>			
<b>alely</b>	<b>počet pozorování</b>	<b>frekvence alel</b>	<b>počet heterozygotů</b>	<b>frekvence heterozygotů</b>
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	114	0,5	114	1
5	114	0,5	114	1
$H_E^{(1)}$	0,5000		<b>opakovaný motiv sekvenované alely</b>	
$H_O^{(2)}$	0,5022			
$H_{bc}^{(3)}$	1,0000			
<b>Populace 2 – Vinařická hora</b>				
<b>Lokus HIGA3</b>	<b>počet pozorování na lokus = 39</b>			
<b>alely</b>	<b>počet pozorování</b>	<b>frekvence alel</b>	<b>počet heterozygotů</b>	<b>frekvence heterozygotů</b>
1	39	0,5	39	1
2	8	0,1026	8	0,2051
3	31	0,3974	31	0,79
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
$H_E^{(1)}$	0,5815		<b>opakovaný motiv sekvenované alely</b>	
$H_O^{(2)}$	0,5891			
$H_{bc}^{(3)}$	1,0000			
<b>(GA)<sub>11</sub></b>				

(<sup>1</sup>) heterozygosita očekávaná, (<sup>2</sup>) heterozygosita pozorovaná, (<sup>3</sup>) heterozygosita kalkulovaná

Třebaže variabilita uvnitř populací pro tento mikrosatelitní marker byla relativně malá, při srovnání obou populací pomocí rodičů kombinačního křížení, jakožto referenčních vzorků, se ukázalo, že nemají společnou ani jednu z identifikovaných alel. Celkově tedy bylo rozlišeno 5 různých alel.

#### Lokus HIGA4

Bylo zjištěno, že každý z rodičů kombinačního křížení je v daném lokusu heterozygotní. Mateřská komponenta 4715 nesla alely 8 a 10, otcovská komponenta alely 7 a 9. Mikrosatelitní marker tedy ukázal maximální možný polymorfismus – v potomstvu tohoto křížení segregovaly 4 různé SSR alely. V přirozené populaci pocházející z lokality Vinařická hora bylo detekováno dalších 6 SSR alel, které se odlišovaly od alel populace vzniklé záměrným křížením. Tyto alely jsou v následující tabulce označeny čísly 1-6. Tento výsledek odpovídá pracovní hypotéze, že populace původem z Vinařické hory je geneticky poměrně variabilní, což by mohlo nasvědčovat tomu, že se jedná o přirozenou populaci šířící se sexuálním rozmnožováním většího počtu geneticky odlišných rodičů. Frekvence jednotlivých alel a další údaje uvádí tab. 3.

Tabulka 3 : Deskriptivní statistika pro lokus HIGA4

Populace 1 – kombinační křížení 4715 x 00/15				
Lokus HIGA4	počet pozorování na lokus = 114			
alely	počet pozorování	frekvence alel	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	41	0,1798	41	0,3596
8	55	0,2412	55	0,4825
9	73	0,3202	73	0,6404
10	59	0,2588	59	0,5175
$H_E^{(1)}$	0,7400		opakovaný motiv sekvenované alely	
$H_O^{(2)}$	0,7433			
$H_{DC}^{(3)}$	1,0000			
Populace 2 – Vinařická hora				
Lokus HIGA4	počet pozorování na lokus = 39			
alely	počet pozorování	frekvence alel	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
1	1	0,0128	1	0,0256
2	3	0,0385	3	0,0769
3	30	0,3846	30	0,7692
4	2	0,0256	2	0,0513
5	29	0,3718	29	0,7436
6	13	0,1667	13	0,3333
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
$H_E^{(1)}$	0,6838		opakovaný motiv sekvenované alely	
$H_O^{(2)}$	0,6926			
$H_{DC}^{(3)}$	1,0000			

(<sup>1</sup>) heterozygosita očekávaná, (<sup>2</sup>) heterozygosita pozorovaná, (<sup>3</sup>) heterozygosita kalkulovaná

Pomocí  $\chi^2$ -testu bylo zjišťováno jestli segregace jednotlivých alel v populaci odpovídá teoretickému štěpnému poměru 1:1:1:1. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

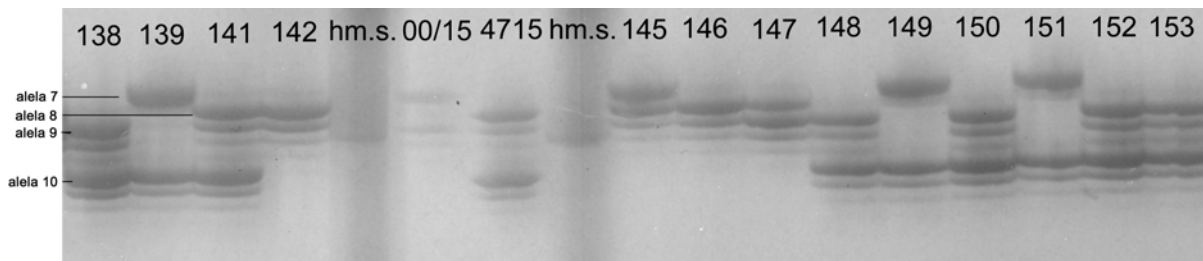
Tabulka 4: Výsledky  $\chi^2$ -testu u populace kombinačního křížení genotypů 4715 a 00/15

genotypy dle alel	skutečná četnost	teoretická četnost	d <sup>(a)</sup>	d <sup>2(b)</sup>	$\chi^2$	$\Sigma \chi^2$	interval P
7, 8	22	28,5	-6,5	42,25	1,482	10,009	0,05-0,01
7, 10	19	28,5	-9,5	90,25	3,167		
8, 9	33	28,5	4,5	20,25	0,711		
9, 10	40	28,5	11,5	132,25	4,649		
<b>celkem</b>	114						

(<sup>a</sup>) diference, (<sup>b</sup>) diference<sup>2</sup>

Jak je z této tabulky patrné, skutečný štěpný poměr se shoduje s teoretickým s pravděpodobností P < 0,05. Daný

výsledok môže byť ovplyvnen relatívne malým souborem hodnocených rastlín a také tím, že jednotlivé rastliny pred vysázením na pokusnou chmelnici byly předpěstovány ve sklenicích a zde se neklíčící semena a špatně rostoucí jedinci vyřazovali, což mohlo ovlivnit frekvenci jednotlivých alel. Z celkového množství 120 rostlín kombinačního křížení bylo  $\chi^2$ -testem vyhodnoceno 114. Do hodnocení nebyly zařazeny rodičovské komponenty, genotyp č. 111 u kterého byly zjištěny rozdíly i pro tento mikrosatelitní marker a tři další genotypy 141, 182 a 241. U těchto tří genotypů byl zjištěn výskyt obou mateřských alel 8 a 10. Tato skutečnost je v rozporu s pohlavním rozmnožováním chmele. Jinými slovy deklarovaná otcovská komponenta 00/15 nemohla být biologickým otcem těchto jedinců – obr. 3.



Obrázek 3: Kombinační křížení pro lokus HIGA4

Pro původ těchto genotypů se nabízí několik vysvětlení. Problémy selhání izolace a následného nežádoucího částečného cizosprašení byly již diskutovány u lokusu HIGA3. Pokud došlo k nežádoucímu opylení několika kvítků samčím genotypem, který měl alespoň jednu alelu shodnou s mateřskou rostlinou, potom část potomstva tohoto křížení by byla nerozlišitelná od mateřského genotypu v lokusu HIGA4. Není rovněž vyloučena existence apomixie. Teorie apomixie byla následně vyloučena díky otestování molekulárním markerem na identifikaci pohlaví, kdy bylo zjištěno, že jeden z těchto genotypů (241) je samčího pohlaví. Z těchto důvodů je považováno za nejpravděpodobnější příčinu cizosprašení jinou samčí rostlinou.

### Závěr

- Pro lokus HIGA3 byly identifikováno 5 alel a pro lokus HIGA4 10 polymorfních alel.
- Byl porovnán stupeň heterozygosity populace vzniklé záměrným kombinačním křížením a přirozené populace planých chmelů. Přirozená populace z Vinařické hory vykazovala výskyt 9 polymorfních alel, což svědčí o genetické diverzitě této izolované populace.
- Byly identifikovány 4 genotypy kombinačního křížení (111, 141, 182 a 241) s alelickými sestavami, které neodpovídaly pravosti deklarované otcovské komponenty.
- Použitá metoda prokázala svůj potenciál pro šlechtění

### Poděkování:

Tato studie byla podpořena následujícími grantovými projekty: Studium variability genových zdrojů chmele pomocí SSR markerů (Study of variability gene resources of hop by SSR markers) (GAFAPPZ-ČZU v Praze) a výzkumným záměrem MSM 1486434701.

### Literatura

- BENBOUZA, H. - JACQUEMIN, J.-M. - BAUDOIN, J.-P. - MERGEAI, G. (2006): Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. In: Biotechnol. Agron. Soc. Environ., vol. 10, 2006, N. 2, pp. 77-81, ISSN 1780-4507.
- ČERENAK, A. - JAKŠE, J. - JAVORNIK, B. (2004): Identification and Differentiation of Hop Varieties Using Simple Sequence Repeat Markers. In: J. Am. Soc. Brew. Chem., vol. 62, 2004, N. 1, pp.1-7, ISSN 0361-0470.
- JAKŠE, J. - BANDELJ, D. - JAVORNIK, B. (2002): Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). In: Mol. Ecol. Notes, vol. 2, 2002, N. 4, pp. 544-546, ISSN 1471-8286.
- JAKŠE, J. - SATOVIC, S. - JAVORNIK, B. (2004): Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). In: Genome, vol. 47, 2004, N. 5, pp. 889-899, ISSN 1480-3321.
- LANDERGOTT, U. - NACIRI, Y. - SCHNELLER, J.J. - HOLDEREGGER, R. (2006): Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg., Theoretical and Applied Genetics, vol. 113, 2006, N. 3, pp. 453-465, ISSN 1432-2242.
- MILLER, M.P. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) ver. 1,3: A Windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data.
- MURAMAKI, A. - DARBY, P. - JAVORNIK, B. - PAIS, M. S. S. - SEIGNER, E. - LUTZ, A. - SVOBODA, P.

- (2006a): Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. In: *Heredity*, vol. 97, 2006, N. 1, pp. 66-74, ISSN 1365-2540.
- PATZAK, J. - VEJL, P. - SKUPINOVÁ, S. - NESVADBA, V. (2002): Identification of sex in F<sub>1</sub> progenies of hop (*Humulus lupulus* L.) by molecular marker. In: *Plant Production*, vol. 48, 2002, N. 7, pp. 318-321, ISSN 0370-663X.
- POLLEY, A. - SEIGNER, E., GANAL, M.W. (1997): Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. In: *Genome*, vol. 40, 1997, N. 3, pp. 357-361, ISSN 1480-3321.
- POWELL, W. - MACHRAY, G.C. - PROVAN, J. (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. In: *Trends Plant Sci.*, vol. 1, 1996, N. 7, pp. 215-222, ISSN 1360-1385.
- SMITH, J.R. - CARPTEN, J.D. - BROWNSTEIN, M.J. - GHOSH, M. - MAGNUSON, V.L. - GILBERT, D.A. - TRENT, J.M. - COLLINS, F.S. (1995): Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. In: *Genome Res.*, vol. 5, 1995, N. 3, pp. 312-317, ISSN 1549-5477.
- STAJNER, N. - JAKŠE, J. - KOZJAK, P. - JAVORNIK, B. (2005): The isolation and characterization of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). In: *Plant Science*, vol. 168, 2005, N. 1, pp. 213-221, ISSN 0168-9452.
- STAJNER, N. - SATOVIC, Z. - CERENAK, A. - JAVORNIK, B. (2007): Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. In: *Euphytica*, vol. 161, 2007, N.1-2, pp. 301-311, ISSN 1573-5060.
- TAUTZ, D. - RENZ, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. In: *Nucl. Acids Res.*, vol. 12, 1984, N. 10, pp. 4127-4138, ISSN 1362-4962.



# VPLYV KRAJINY PÔVODU NA DIVERZITU HMW-GLUTENÍNŮVÝCH PODJEJNOTIEK A GLIADÍNŮV V ODRÔDÁCH *TRITICUM AESTIVUM* L. GENETIC DIVERSITY OF HMW-GLUTENIN SUBUNITS AND GLIADINS IN *TRITICUM AESTIVUM* L. IN RELATION TO THE COUNTRY OF ORIGIN

Zuzana ŠRAMKOVÁ – Edita GREGOVÁ – Ernest ŠTURDÍK

*The genetic diversity of high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits was investigated in 57 cultivars of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) originated from six countries using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE). A total of 15 alleles/allelic pairs were detected, resulting in 24 different allele combinations occurring at various frequencies depending on country of origin. Allele "null" was the most frequent (43-100%) subunit at *Glu-A1* locus in wheat cultivars from all of the six countries. Consequently, the results also suggested that the higher variations occurred at *Glu-B1* locus compared to *Glu-A1* and *Glu-D1*. Rare alleles such as 7, 18, 20, 22 and 13+16 were found at *Glu-B1* locus. Allele 4+12 was observed at *Glu-D1* loci in cultivar *Nugaines* from the USA. There was also used separation of gliadins by A-PAGE for detection of secalin block, which was observed in 5 genotypes from Slovakia (*Veldava*, *Verita*), Ukraine (*Mirleben*, *Mironovskaja ulucennaja*) and Italy (*Dorico*).*

*Keywords: A-PAGE, gliadins, glutenins, SDS-PAGE, *Triticum aestivum* L.*

## Úvod

Hexaploidná pšenica (*Triticum aestivum* L.) obsahuje zásobné bielkoviny, ktoré majú na rozdiel od ostatných obilnín jedinečnú schopnosť tvoriť lepok- bielkovinový komplex, bez ktorého by nebola možná príprava kysnutého cesta. Hlavnými frakciami lepku sú gliadíny a gluteníny. Gluteníny sú vďaka SH-skupinám prítomným v polypeptidových reťazcoch schopné formovať intra- aj intermolekulové disulfidové väzby, čím vznikajú polymérne bielkovinové štruktúry. Podľa molekulovej hmotnosti sa gluteníny rozdeľujú na glutenínové podjednotky s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW-GS) a glutenínové podjednotky s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMW-GS) (BIETZ a WALL, 1972). HMW-GS sú kódované lokusmi *Glu-1*, lokalizovanými na dlhých ramenách chromozómov skupiny 1 (lokusy *Glu-A1*, *Glu-B1* a *Glu-D1*). Gény na *Glu-1* lokusoch kódujú dva typy HMW-glutenínových podjednotiek: x-typ s vyššou molekulovou hmotnosťou a y-typ s menšou molekulovou hmotnosťou. Keďže *Glu-1* lokusy vykazujú značnú genetickú variabilitu, HMW-GS sa využívajú aj ako markery pri identifikácii, diferenciacii a charakterizácii jednotlivých odrôd a genotypov. Zistilo sa tiež, že existuje súvislosť medzi jednotlivými alelami kódujúcimi HMW-GS a chlebopekárskou kvalitou pšeničných odrôd. Na kvalitu múky vplyva nielen kvantitatívne ale aj kvalitatívne zastúpenie jednotlivých HMW-GS a ich vzájomná kombinácia (SHEWRY et al., 2006).

Výsledky viacerých štúdií ukázali, že polymorfizmus alel kódovaných *Glu-1* lokusmi závisí od regiónu, z ktorého daná odroda pšenice pochádza. Kompozícia HMW-GS u odrôd z rôznych oblastí sveta často odráža najmä to, na aký účel boli dané odrody využívané (NAKAMURA, 2000; XU et al., 2008). Napríklad alelický pár 1Dx5 + 1Dy10, ktorý má významne pozitívny vplyv na chlebopekárske vlastnosti múky, sa v európskych odrodách vyskytuje v podstatne vyššej frekvencii než u ázijských odrôd. Rozšírený výskyt páru 1Dx2 + 1Dy12 (negatívny vplyv na chlebopekársku kvalitu) u japonských a čínskych odrôd svedčí o tom, že tieto odrody boli šľachtené prevažne pre výrobu rezancov (LIU et al., 2007).

Na vlastnosti cesta pripraveného zo pšeničnej múky majú významný vplyv aj gliadíny, ktoré predstavujú až 40% z celkového množstva bielkovín v múke. Z hľadiska chlebopekárskej kvality má význam prítomnosť pšenično-ražnej translokácie 1BL/1RS, ktorej následkom je expresia ražných sekalínov v pšeničnom endosperme. Sekalíny znižujú chlebopekársku kvalitu pšeničných múk.

Cieľom našej práce bolo (i) charakterizovať HMW-GS kompozíciu u vybraných amerických a európskych odrôd *Triticum aestivum* L. a (ii) analýzou gliadínov zistiť v tomto súbore prítomnosť 1BL/1RS translokácie.

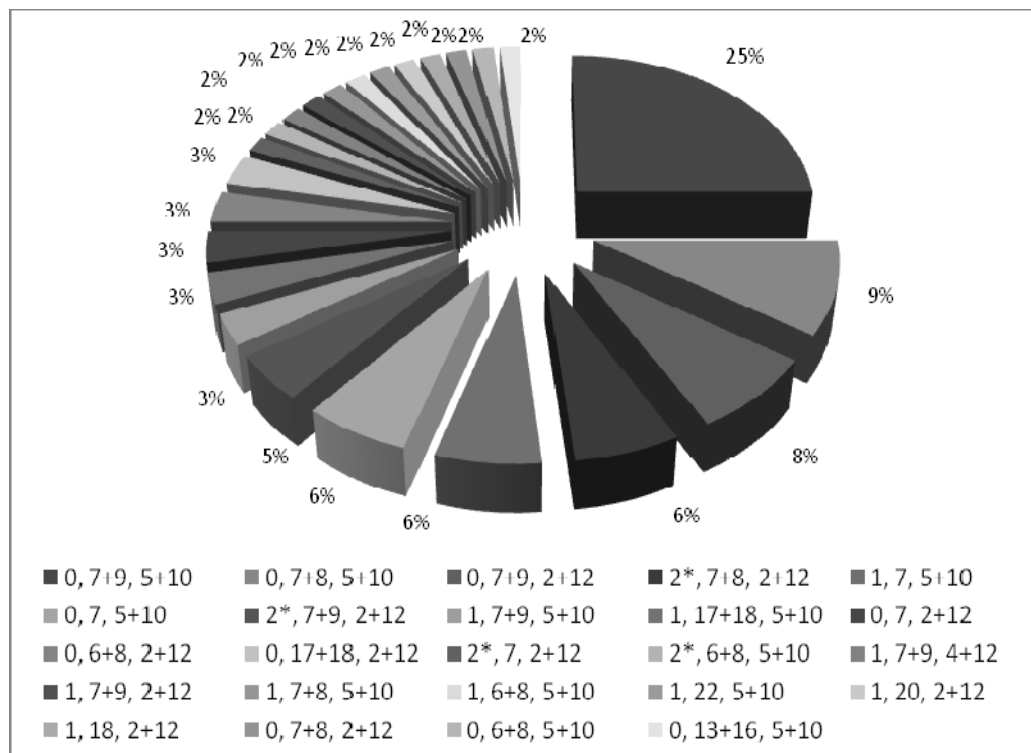
## Materiál a metódy

Ako experimentálny materiál boli použité vybrané genotypy hexaploidnej pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L. spp. *aestivum*). Analyzovaný súbor obsahoval 57 odrôd pšenice, pôvodom zo 6 štátov (USA, Francúzsko, Taliansko, Slovenská republika, Ukrajina, Rusko). Všetky vzorky boli získané z kolekcie genetických zdrojov pšenice Génovej banky semenných druhov Slovenskej republiky vo Výskumnom ústave rastlinnej výroby v Piešťanoch.

Analýza zásobných bielkovín bola realizovaná podľa štandardnej metodiky ISTA. HMW-gluteníny boli analyzované metódou SDS-PAGE (WRIGLEY, 1992), gliadíny technikou A-PAGE (DRAPER, 1987). Genetická interpretácia alelického popisu lokusov kódujúcich HMW-GS bola robená podľa katalógu alel pre HMW-GS (PAYNE a LAWRENCE, 1983).

## Výsledky a diskusia

V súbore 57 odrôd pšenice (*Triticum aestivum* L.) sme identifikovali 24 rôznych kombinácií HMW-glutenínových podjednotiek (Obr.1). Najfrekvencovanejšia bola kombinácia 0, 7+9, 5+10 (Glu-skóre 7), a to predovšetkým u slovenských, ukrajinských a ruských odrôd. Medzi talianskymi, francúzskymi a americkými odrodami sme nezistili prítomnosť HMW-GS fenotypov, ktoré by boli pre danú krajinu dominantné. Medzi francúzskymi, ukrajinskými a talianskymi odrodami sme identifikovali fenotypy s kombináciami HMW-GS 1, 17+18, 5+10 a 1, 7+8, 5+10 (Obr.1). Odrody s týmito profilmi HMW-GS dosahujú na základe bodového hodnotiaceho systému podľa Payneho (PAYNE et al., 1987) maximálnu hodnotu Glu-skóre 10. Z hľadiska chlebopekárskej kvality sú odrody s takouto kombináciou alel veľmi žiaduce.



Obrázok 1: Frekvencia HMW-GS fenotypov v súbore analyzovaných odrôd pšenice (*Triticum aestivum* L.)

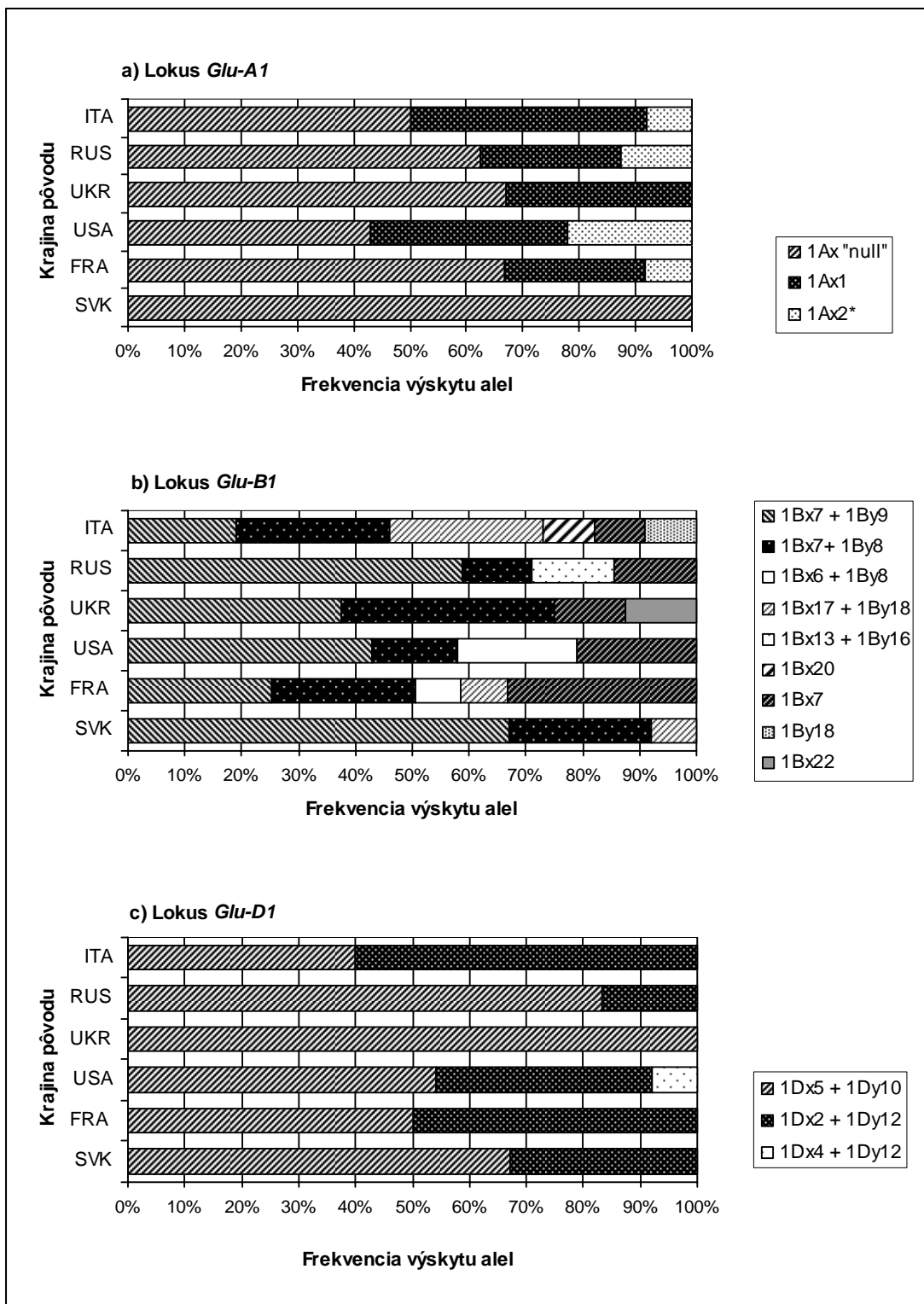
V analyzovanom súbore odrôd *Triticum aestivum* L. sme identifikovali 15 rôznych alel/alelických párov kódovaných *Glu-1* lokusmi: 3 na lokuse *Glu-A1*, 9 na lokuse *Glu-B1* a 3 na lokuse *Glu-D1* (Obr.2).

Na lokuse *Glu-A1* sme identifikovali všetky tri alely (nulová alela, 1 a 2\*), pričom najfrekvencovanejšia bola nulová alela (Obr.2a). Zistili sme, že v analyzovanom súbore všeobecne málo frekvencovaná alela 2\*, ktorá je žiaduca z hľadiska chlebopekárskej kvality, sa v najväčšej miere vyskytuje u amerických genotypov. Na druhej strane, žiadna odroda z 12-členného súboru slovenských genotypov neobsahuje žiaduce alely 2\* resp. 1.

Vysoký polymorfizmus sme pozorovali pri lokuse *Glu-B1*, kde sme identifikovali alely 7, 18, 20, 22 a alelické páry 6+8, 7+8, 7+9, 13+16 a 17+18 (Obr.2b). S najvyššou frekvenciou sa na tomto lokuse vyskytovali alelické páry 7+9, 7+8 a samostatná alela 7, závislosti od krajiny pôvodu. Zriedkavé alely 18 a 20 sme pozorovali len u talianskych odrôd. Alelický pár 13+16, ktorý pozitívne prispieva ku technologickej kvalite pšeničnej múky, sme našli len v súbore ruských odrôd. Ďalší alelický pár 17+18, ktorý má taktiež pozitívny vplyv na chlebopekársku kvalitu, sme identifikovali u odrôd pochádzajúcich z Francúzska, Slovenska a Talianska.

Na lokuse *Glu-D1* prevládala alelický pár 5+10. Výnimku predstavovali talianske odrody, u ktorých na lokuse *Glu-D1* dominoval alelický pár 2+12 (Obr.2c). Alelický pár 5+10 na rozdiel od podjednotiek 2+12 pozitívne vplyva na chlebopekársku kvalitu pšenice, preto z tohto hľadiska je vysoká frekvencia jeho výskytu veľmi žiadaná. Zriedkavo sa vyskytujúci pár 4+12 sme identifikovali u americkej odrody Nugaines (Obr.2c).

Analýzou gliadínov pomocou A-PAGE sme zisťovali prítomnosť pšenično-ražnej translokácie 1BL/1RS v danom súbore odrôd. Sekalínový blok sme identifikovali u 2 slovenských odrôd (Veldava, Verita), 2 ukrajinských odrôd (Mirleben, Mironovskaja ulucennaja) a jednej odrody z Talianska (Dorico). Prítomnosť tohto bielkovinového bloku je nežiaduca, pretože znižuje chlebopekárske vlastnosti pšeničnej múky.



Obrázok 2: Frekvencia výskytu alel/alelických párov na lokusoch a) *Glu-A1*, b) *Glu-B1* a c) *Glu-D1* v odrodách *Triticum aestivum* L. pochádzajúcich z Talianska (ITA), Ruska (RUS), Ukrajiny (UKR), Spojených štátov amerických (USA), Francúzska (FRA) a Slovenska (SVK).

## Záver

Analýzovaný súbor genetických zdrojov *Triticum aestivum* L. vykazoval vysokú variabilitu HMW-glutenínových podjednotiek v závislosti od krajiny pôvodu. Celkovo sme identifikovali 24 rôznych profilov HMW-GS. Najvyšší polymorfizmus sme zaznamenali pri lokuse *Glu-B1*, pričom sme pozorovali aj výskyt zriedkavých alel/alelických párov- 7, 18, 20, 22, 13+16, 17+18. Najvyššie hodnoty Glu-skóre, ktoré vypovedá o technologickej kvalite, dosahovali pšenice pochádzajúce z Francúzska, Ukrajiny a Talianska. Vysoká frekvencia výskytu alelického páru 5+10 na lokuse *Glu-D1* vypovedá o pozitívnom smerovaní šľachtiteľských zámerov. Ďalšou možnosťou v zlepšovaní technologickej kvality pšenice pre pekársku prax je nahradenie nulovej alely na lokuse *Glu-A1* alelami 1 a 2\*, ktoré prispievajú k zvýšeniu chlebopekárskej kvality. Prítomnosť chlebopekársky nežiaducej translokácie 1BL/1RS sme pozorovali len u niektorých odrôd pochádzajúcich zo Slovenska, Ukrajiny a Talianska.

## Literatúra

- BIETZ, J. A., WALL, J. S.: Wheat gluten subunits: Molecular weights determined by sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, 49, 1972, s. 416-430.
- DRAPER, S.: ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivars identification 1983-1986. *Seed Sci. Technol.*, 15, 1987, s. 431-434.
- LIU, Y., XIONG, Z.-Y., HE, Y.-G., SHEWRY, P. R., HE, G.-Y.: Genetic diversity of HMW glutenin subunit in Chinese common wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces from Hubei province. *Gen. Res. Crop Evol.*, 54, 2007, s. 865-874.
- NAKAMURA, H.: Allelic variation at high-molecular-weight glutenin subunit loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* in Japanese and Chinese hexaploid wheat. *Euphytica*, 112, 2000, s. 187-193.
- PAYNE, P. I., LAWRENCE, G. J.: Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, 11, 1983, s. 29-35.
- PAYNE, P. I., SEEKINGS, J. A., WORLAND, M. G., JARVIS, M. G., HOLT, L. M.: Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effects on breadmaking quality in wheat: Analysis of F5 progeny from Chinese Spring x Chinese Spring (Hope 1A). *J. Cereal Sci.*, 6, 1987, s. 103-118.
- SHEWRY, P. R., HALFORD, N.G., LAFIANDRA, D.: The high-molecular-weight subunits of glutenin. str. 143-170. In: Wrigly, C., Bekes, F., Bushuk, W.(eds) *Gliadin and glutenin, the unique balance of wheat*. AACC International, Minnestota, USA, 2006, 466 s.
- WRIGLEY, C. W.: Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Heidelberg, Springer-Verlag, 1992, s. 17-41.
- XU, L.-L., LI, W., WEI, Y.-M., ZHENG, Y.-L.: Genetic diversity of HMW glutenin subunits in diploid, tetraploid and hexaploid *Triticum* species, 2008, *In Press*.

**DEDIČNOSŤ REZISTENCIE PROTI PLESNI ZEMIAKOVEJ  
V TETRAPLOIDNÝCH POPULÁCIÁCH ĽUĽKA ZEMIAKOVÉHO  
(*SOLANUM TUBEROSUM*, L.)  
INHERITANCE OF RESISTANCE TO LATE BLIGHT IN TETRAPLOID POTATO  
POPULATIONS (*SOLANUM TUBEROSUM*, L.)**

Ján HELDÁK – Milan BEŽO – Andrea GALLIKOVÁ

*A total of 718 potato genotypes from 10 crosses were evaluated for their reaction to isolates of *Phytophthora infestans*. The evaluation was carried out using detached leaf method. The isolates of *Phytophthora infestans* possessed 9 - 10 virulences. Virulences to R1, R3, R4, R6, R7, R10 and R11 were present in all isolates. They differed only in the presence or absence of virulences to R2, R5 and R8. Increasing of resistance to late blight in potato virus Y (PVY) resistant genotypes was related to resistance of parental genotypes and genetic background as well. The most of resistant and highly resistant genotypes were identified in the combinations where one of parents was variety Cicero, Alva and Gloria. Resistant and highly resistant genotypes were selected for breeding purposes.*

*Keywords: potato, late blight, *Phytophthora infestans*, resistance*

### Úvod

Ochorenia spôsobené plesňou zemiakovou (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) na listoch, stonkách a hľuzách sa vyskytujú prakticky všade, kde sa ľuľok zemiakový pestuje. Chemická ochrana proti plesni zemiakovej je finančne náročná, a aby efektívne chránila porasty, musí sa precízne aplikovať počas celého vegetačného obdobia. Ak sa v ochrane proti plesni zemiakovej vyskytnú nedostatky, môže dôjsť k úplnému zničeniu porastov a úplnej strate úrody (UMAERUS, UMAERUS, 1994).

*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary patrí medzi heterotalické oomycéty, ktoré ľahko prekonávajú rezistenciu v ľuľku zemiakovom vytváraním nových komplexných rás a tiež veľmi rýchle dokážu získavať rezistenciu proti používaným fungicídum. V uplynulom storočí bolo identifikovaných 11 rasovo-špecifických génov v divorastúcom druhu *Solanum demissum* a niektoré z nich sa introdukovali do kultúrnych foriem ľuľka zemiakového. Zistilo sa, že odrody s R génmi proti plesni zemiakovej sú neefektívne, pretože nové populácie patogéna rýchlo prekonali túto formu rezistencie. Jedným z efektívnych zdrojov, ktorého gény rezistencie boli introdukované do genetických zdrojov ľuľka zemiakového, sa ukázal *Solanum berthaultii* (Rauscher et al., 2006). V posledných rokoch prebieha intenzívny výskum vzťahu plesň zemiaková – ľuľok zemiakový v potomstve divorastúceho druhu *Solanum bulbocastanum*. V jeho potomstve bolo identifikovaných niekoľko génov rezistencie, lokalizovaných na chromozóme IV, VI a VIII (Van der VOSSSEN et al., 2005).

Okrem rezistencie založenej na R génoch bola popísaná aj kvantitatívna (polygénna, poľná) rezistencia v genetických zdrojoch, ktorá nie je rasovo špecifická a považuje sa za trvalejšiu ako rezistencia ovládaná R génmi (Van der VOSSSEN et al., 2005). Tento typ rezistencie bol zistený v *Solanum demissum* a *Solanum stoloniferum*, neskôr aj v ďalších divorastúcich druhoch ako *Solanum phureja* a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* a bol introdukovaný do kultúrnych foriem ľuľka zemiakového. Pre minimalizáciu strát spôsobených plesňou zemiakovou sa v súčasnosti v šľachtení pracuje najmä s vysokými stupňami rezistencie a v selekcii sa uplatňuje len kritérium redukcie rastu patogéna. Redukcia rastu patogéna sa vyjadruje plochou pod progresívnou krivkou vývoja choroby (AUDPC) alebo bonitačným stupňom pri lístkovom teste.

V súčasnosti dominujú v porastoch ľuľka zemiakového na Slovensku dva patogény. Okrem plesne zemiakovej má veľký negatívny dopad na vývoj rastliny a tvorbu úrody aj vírus Y zemiaka (PVY). Perspektívu pre uplatnenie v agroekologických podmienkach Slovenska majú nové odrody, ktoré budú rezistentné aj proti obom patogénom. Cieľom práce bolo zhodnotiť dedičnosť rezistencie proti plesni zemiakovej v genotypoch s extrémnou rezistenciou proti PVY.

### Materiál a metódy

Pre hodnotenie rezistencie proti plesni zemiakovej bol vybraný súbor tetraploidných genotypov ľuľka zemiakového so zastúpením v jednotlivých skupinách rezistencie proti plesni zemiakovej na listoch (tab. 1). Jednotlivé genotypy boli krížené medzi sebou, ale recipročné kríženie sa nerealizovalo. Semená sa získali z 10 kombinácií (tab. 3) a vysiali v skleníku. Vybraný počet vzídených rastlín z každej kombinácie sa hodnotil na rezistenciu proti plesni zemiakovej metódou podľa ZARYCKEJ (2001). Na infekciu boli použitá zmes izolátov s 9 – 10 virulencnými faktormi (A: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11; B: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11; C: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11; D: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11). Výsledky boli vyhodnotené analýzou variancie.

Tabuľka 1: Stupne rezistencie proti plesni zemiakovej v odrodách a klonoch použitých v krížení

Genotyp	Stupeň rezistencie (1-9)	Genotyp	Stupeň rezistencie (1-9)
Alva (Ry)	7-8 rezistentný (R)	Gloria	5-6 stredne rezistentný (MR)
Bobr (Ry)	5-6 stredne rezistentný (MR)	Mirakel	3-4 stredne náchylný (MS)
Bolesta	7-8 rezistentný (R)	Svella	3-4 stredne náchylný (MS)
C2264	5-6 stredne rezistentný (MR)	VL 17/03	3-4 stredne náchylný (MS)
CA978	7-8 rezistentný (R)	White Lady (Ry)	7-8 rezistentný (R)
Cicero	7-8 rezistentný (R)	Y02/5 (Ry)	7-8 rezistentný (R)
Forelle (Ry)	5-6 stredne rezistentný (MR)	Y02/90 (Ry)	7-8 rezistentný (R)

### Výsledky a diskusia

Krížením odrôd a klonov (tab. 1) sa získali semená len z 10 kombinácií (tab. 3). S ohľadom na výber genotypov s dvoma typmi rezistencie sa naplnil predpoklad, že úspešnosť kríženia bude malá s malou produkciou semien. Genotypy s extrémnou rezistenciou proti PVY, pochádzajúcou zo *Solanum stoloniferum*, boli peľovo sterilné, čo významne ovplyvnilo úspešnosť kríženia. Tvorba semien súvisí aj s EBN (endosperm balance number) a pre úspešnú fertilizáciu musí byť splnená podmienka, aby vzájomný pomer EBN jednotlivých genotypov v rodičovskej kombinácii bol 2:1. Oba uvedené faktory sa podieľali na výslednom efekte získania semien z jednotlivých kombinácií.

Horizontálnu rezistenciu proti plesni zemiakovej ovplyvňuje množstvo faktorov a jedným z rozhodujúcich sú izoláty plesne zemiakovej. Reakcia genotypov ľuľka zemiakového na infekciu plesňou zemiakovou súvisí s komplexom virulencných faktorov, s ktorým jednotlivé izoláty plesne zemiakovej disponujú. V priebehu troch rokov sa hodnotila štruktúra virulencných faktorov v slovenských izolátoch plesne zemiakovej. Viac ako 50% izolátov cirkulujúcich v agroekologických podmienkach Slovenska malo 9 – 10 virulencných faktorov. Všetky izoláty mali virulencné faktory R1, R3, R4, R6, R7, R10 a R11 rozdiely boli len v prítomnosti alebo absencii virulencných faktorov R2, R5 a R8. Zmes 4 izolátov bola použitá pri vyhodnotení reakcie jednotlivých genotypov pochádzajúcich z 2 kombinácií kríženia. Pri zastúpení 9 – 10 virulencných faktorov v jednotlivých izolátoch sa nepreukázal vplyv izolátov na stupeň rezistencie, ktorý bol hodnotený v laboratórnych podmienkach (tab. 2). Toto zastúpenie jednotlivých izolátov pri infekcii listov rodičovských genotypov vyvolalo obrannú reakciu, ktorá zodpovedala stupňom rezistencie proti plesni zemiakovej deklarovanej pri hodnotení genetických zdrojov v poľných podmienkach.

Tabuľka 2: Analýza rozptylu stupňov rezistencie proti plesni zemiakovej v dvoch kombináciách kríženia infikovaných tromi izolátmi plesne zemiakovej

Zdroj variability	Suma štvorcov	Počet stupňov voľnosti	Priemerný štvorec	F hodnota	Hladina preukaznosti
A: kombinácia kríženia	1,60	1	1,60	0,387	0,5416
B: izoláty plesne	12,97	2	6,49	1,566	0,2123
Interakcia A x B	12,41	2	6,21	1,509	0,2246
rezíduum	592,22	144	4,11		
celkom	619,21	149			

Rozdiely medzi stupňami rezistencie určenými v poľných podmienkach vyplývajú z rôznych faktorov. V prípade vhodných podmienok pre rozvoj infekcie má rozhodujúci vplyv štruktúra izolátov plesne zemiakovej (FILIPPOV et al., 2004). V spektre 150 genotypov pochádzajúcich z dvoch typov kríženia (Y02/5 x Cicero; Y02/90 x Cicero) sa neprejavili rozdiely v stanovenom stupni rezistencie v závislosti od použitého izolátu plesne zemiakovej. Hoci sa jednotlivé izoláty líšili v z hľadiska zloženia virulencných faktorov, účinok základných siedmich virulencných faktorov prevážil nad vplyvom premenlivých virulencných faktorov. Medziročnikové rozdiely sa nemusia prejavovať, ak sa v jednotlivých rokoch použijú kompatibilné rasy plesne zemiakovej (SIMMONDS, WASTIE, 1987).

Priemerná hodnota rezistencie v populácii 713 genotypov z 10 kríženia bola 6,05 a medzi jednotlivými kombináciami boli štatisticky preukazné rozdiely (tab. 4). V kombináciách kríženia stredne rezistentných (MR) a stredne náchylných (MS) genotypov bola priemerná hodnota rezistencie 4,75 a bola o 36,8% nižšia ako priemerná hodnota rezistencie v kombináciách kríženia rezistentných (R) a stredne rezistentných genotypov (MR). Skupina semenáčov z kombinácií kríženia rezistentných genotypov (R x R) mala priemernú hodnotu rezistencie o 10,8% vyššiu ako skupina genotypov z kríženia R x MR.

V rozpore s predpokladom sa zistili nižšie priemerné hodnoty rezistencie niektorých kombinácií kríženia R x R v porovnaní s hodnotami kombinácií kríženia R x MR (tab. 4). Priemerná hodnota rezistencie v kombináciách

Alva x Gloria a White Lady x Gloria bola vyššia ako v kombináciách Y02/05 x Cicero a Y02/90 x Cicero. Tieto rozdiely mohli byť dôsledkom skutočnosti, že genotyp s vyšším stupňom rezistencie mohol mať aj R-gény proti niektorým rasám patogéna, ktoré mohli prekonať izoláty plesne zemiakovej, vlastniace zodpovedajúce virulénne faktory.

Tabuľka 3: Analýza rozptylu stupňov rezistencie proti plesni zemiakovej v desiatich kombináciách kríženia

Zdroj variability	Suma štvorcov	Počet stupňov voľnosti	Priemerný štvorec	F hodnota	Hladina preukaznosti
medzi kombináciami	859,97	9	95,55	27,766	0,0000
v kombináciách	2436,50	708	3,44		
celkom	3296,47	717			

Odroda Alva, ktorá má R2 gén, je rezistentná proti väčšine izolátov plesne zemiakovej, s výnimkou izolátov, ktoré majú virulénny faktor R2, prekonávajúci gén R2 v hostiteľskej rastline. Aj aditívny model zvyšovania horizontálnej rezistencie proti plesni zemiakovej mohol v konečnom dôsledku zabezpečiť vyššie zhodnotenie kombinácie. Tomuto modelu vyhovuje odroda Gloria, ktorá mohla prispieť k zvýšeniu priemernej hodnoty rezistencie v kombináciách Alva x Gloria a White Lady x Gloria. Najvyššie hodnoty sa zistili v tých kombináciách, v ktorých bola odroda Cicero samičím komponentom. Z celkového množstva kombinácií až 70% kombinácií patrilo do skupiny stredne rezistentných a do aj v tých prípadoch kríženia, keď oba rodičovské genotypy boli rezistentné. Len 2 kombinácie mali priemernú hodnotu rezistencie vyššiu ako 7 pre zaradenie do skupiny rezistentných kombinácií.

Tabuľka 4. Priemerné hodnoty stupňov rezistencie v desiatich kombináciách kríženia

Kombinácia	Priemerná hodnota rezistencie (1 – 9)
Forelle x Svella (MR x MS)	4,15 a
Bolesta x Mirakel (R x MS)	5,20 b
Bobr x VL 17/03 (MR x MS)	5,36 b
Alva x C 2264 (R x MR)	6,20 c
Y02/05 x Cicero (R x R)	6,38 cd
Alva x Gloria (R x MR)	6,43 cd
Y02/90 x Cicero (R x R)	6,77 cd
White Lady x Gloria (R x MR)	6,86 d
Cicero x Cicero (R x R)	7,76 e
Cicero x VL978 (R x R)	7,95 e

rozdielne písmená za priemernými hodnotami znamenajú potvrdenie štatisticky preukazných rozdielov

Všetky testované genotypy boli rozdelené do piatich skupín rezistencie (tab. 5). Viac ako 50% zastúpenie genotypov s vysokou rezistenciou mali kombinácie kríženia, v ktorých bola samičím komponentom rezistentná odroda Cicero. Genotypy s vysokou rezistenciou proti plesni zemiakovej boli zistené v ďalších štyroch kombináciách, v ktorých boli zastúpené odrody Cicero, White Lady a Bobr.

Tabuľka 5: Zastúpenie genotypov v jednotlivých skupinách rezistencie proti plesni zemiakovej

Kombinácia	Zastúpenie genotypov v bonitačných skupinách (%)				
	9,0	7,0–8,9	5,0–6,9	3,0–4,9	1,0–2,9
Forelle x Svella (MR x MS)	0,0	0,0	43,9	38,8	17,3
Bolesta x Mirakel (R x MS)	0,0	16,0	48,0	31,0	5,0
Alva x Gloria (R x MR)	0,0	53,0	28,0	16,0	3,0
Bobr x VL 17/03 (MR x MS)	2,9	18,6	50,0	20,0	8,6
White Lady x Gloria (R x MR)	4,0	66,0	8,0	18,0	4,0
Y02/5 x Cicero (R x R)	5,6	55,6	13,9	13,9	11,1
Y02/90 x Cicero (R x R)	11,6	44,9	29,0	14,5	0,0
Alva x C2264 (R x MR)	23,0	34,0	10,0	17,0	16,0
Cicero x CA978 (R x R)	52,2	30,4	15,2	2,2	0,0
Cicero x Cicero (R x R)	61,2	22,4	4,1	4,1	8,2

9 – vysoko rezistentný; 7 – 8,9 – rezistentný; 5 – 6,9 – stredne rezistentný; 3 – 4,9 – stredne náchylný; 1 – 2,9 – náchylný genotyp.

Kombinácia Alva x C2264 mala menšiu priemernú hodnotu rezistencie (6,2), v porovnaní s kombináciou Alva x Gloria (6,43), ale na druhej strane mala kombinácia Alva x C2264 až o 23% viac vysoko rezistentných genotypov ako kombinácia Alva x Gloria. Podobné rozdiely medzi kombináciami sa zistili aj v prípade odrody kombinácií Alva x Gloria a White Lady x Gloria. Rezistentné genotypy (7 – 8,9) mali najvyššie zastúpenie v tých kombináciách, kde samčiami partnermi boli odrody Gloria a Cicero. Množstvo rezistentných genotypov v bonitačných skupinách 7,0 – 8,9 a 9,0 súviselo nielen s rezistenciou rodičovských genotypov ale aj genetickým pozadím. Výsledky naznačili, že je možné získať genotypy s vysokou rezistenciou proti plesni zemiakovej a extrémnou rezistenciou proti plesni zemiakovej, pričom efektívnosť získania genotypov spĺňajúcich kritérium pre rezistenciu proti obom patogénom bolo výrazne nižšie ako pri získavaní genotypov len s vysokou rezistenciou proti plesni zemiakovej.

## Záver

Hodnotenie stupňa rezistencie v laboratórnych podmienkach je porovnateľné so stupňami rezistencie určenými v optimálnych vonkajších podmienkach. Výhody laboratórneho testu spočívajú v štandardnej stabilite podmienok priebehu testov, ktoré nie sú závislé od poveternostných podmienok a v možnosti selekcie rezistentných genotypov aj v najmladších šľachtiteľských generáciách. Zvyšovanie rezistencie proti plesni zemiakovej v genotypoch s extrémnou rezistenciou súvisí s rezistenciou rodičovských genotypov a ich genetickým pozadím. Medzi vytvorenými genotypmi vo všetkých kombináciách boli identifikované rezistentné genotypy (7 – 8) a genotypy s vysokou rezistenciou proti plesni zemiakovej (9), ktoré sú vhodné pre ďalšie šľachtiteľské využitie.

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

## Literatúra

- FILIPPOV, A. V. – GUREVICH, B. I. – KOZLOVSKY, B. E. – KUZNETSOVA, M. A. – ROGOZHIN, A. N. – SPIGLAZOVA, S. Y. – SMETANINA, M. A. – SMIRNOV, A. N. 2004. A rapid method for evaluation of partial potato resistance to late blight and of aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates originated from different region. In: Plant breeding and seed sciences, 50, 2004, s.29-41.
- UMAERUS, V. – UMAERUS, M. 1994. Inheritance of resistance to late blight. In: BRADSHAW, J. E. – MACKAY, G. R. Potato genetics. Wallingford: CAB International. s. 365 -402. ISBN 0 85198 869 5.
- VAN DER VOSSSEN, E. – SIKKEMA, A. - TE LINTEL HEKKERT, B. – GROS, J. – STEVENS, P. – MUSKENS, M. – WOUTERS, D. – PEREIRA, A. – STIEKEMA, W. ALLEFS, S. 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. Plant J., 36, 2003, s. 867–882.
- VAN DER VOSSSEN, E. – GROS, J.E. – SIKKEMA, A. – MUSKENS, M. – WOUTERS, D.- WOLTERS, P. – PEREIRA, A. – ALLEFS, S. 2005. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. In: Plant J., 44, 2005, s. 208–222.
- ZARYCKA, H. 2001. Evaluation of resistance to *Phytophthora infestans* in detached leaflet assay. In: The methods of evaluation and selection applied in potato research and breeding. Monografie I rozprawy naukowe IHAR. Blonie: Plant Breeding and Acclimatization Institute Radzikow, 2001, str. 75-77, ISBN 83-900965-8-7.



# DEVELOPMENT OF CAPS MARKER DISTINGUISHING *RYM4*/*RYM5* ALLELES FOR BREEDING TO BAYMV RESISTANCE IN WINTER BARLEY

## VÝVOJ CAPS MARKERU ROZLIŠUJÍCÍHO ALELY *RYM4*/*RYM5* PRO ŠLECHTĚNÍ OZIMÉHO JEČMENE NA REZISTENCI K BAYMV

Tibor SEDLÁČEK

*Barley mosaic virus complex (BaYMV, BaMMV, BaYMV-2) are considered to be one of the most economically important viruses affecting winter barley in western Europe. Resistance is to be considered as the only possibility to ensure winter barley cultivation in the expanding area of fields infected by these viruses. Resistance is based on recessive genes rym4 (conferring resistance to BaMMV and BaYMV) and rym5 (conferring resistance to strain BaYMV-2) in European cultivars. Molecular marker Bmac29 allowing selection for these alleles has been described. Breakdown of linkage between Bmac29 and rym4/rym5 locus already has been observed. Our aim was to develop more precise breeder friendly CAPS marker which would be able to distinguish rym4/rym5 alleles.*

*Key words: barley, resistance, breeding, MAS, BaYMV, BaMMV*

### Introduction

Barley mosaic virus complex (BaYMV, BaMMV, BaYMV-2) are considered to be one of the most economically important viruses affecting winter barley in western Europe. Due to transmission of the agents of barley yellow mosaic virus disease by the fungal vector *Polymyxa graminis* (KANYUKA et al., 2003), which has been detected viruliferous up to a soil depth of about 60 cm, chemical measures against the disease are neither efficient nor economic. Therefore, resistance – besides being the most cost effective and environmentally friendly approach of plant protection in general – has to be considered as the only possibility to ensure winter barley cultivation in the expanding area of fields infected by these viruses. Up to now, eight independent genetic loci distributed over the barley genome have been identified that confer mostly recessive resistance to either one or several strains of this virus complex (WERNER et al., 2003). Resistance is based on recessive genes *rym4* (conferring resistance to BaMMV and BaYMV) and *rym5* (conferring resistance to strain BaYMV-2) in European cultivars. These genes are allelic forms of the Hv-eIF4E gene (STEIN et al., 2005). Presence of this disease has not been described yet in Czech republic. Registration of winter barley variety is possible only when a resistance to BaYMV is present. Molecular marker Bmac29 closed to the Hv-eIF4E locus distinguishing these alleles has been published (GRANER et al., 1999), therefore marker-assisted selection can be used for breeding for resistance to the Barley yellow mosaic virus complex. Unfortunately breaking of linkage between Bmac29 and Hv-eIF4E locus has been already observed (KÚHNE et al., 2003). Our aim was to develop more precise breeder friendly CAPS marker which would be able to distinguish *rym4/rym5* alleles exactly at the mutation points in the Hv-eIF4E gene.

### Materials and Methods

A set of 24 winter barley lines with alleles *rym4*, *rym5* and susceptible to BaMV complex was selected from trials of plant breeding station Lužany, SELGEN, a.s. Presence of alleles was determined by field test in infection field (MARÍK et al., 2008). Two pieces of leaf long 3cm were collected from individual plants and dried at 40°C. DNA was extracted from these segments by CTAB method (KEB-LLANES et al., 2002). PCR primers were designed from GenBank sequence AY661558 using FastPCR software (KALENDAR, 2008). SNP2CAPS software (THIEL et al., 2004) was used for finding a restriction endonuclease specific for *rym4/rym5* mutation. PPP Master mix (Top-Bio) was used for PCR. Protocol was as follows: initial denaturation 95°C 5min; denaturation 95°C 15s, annealing 60°C 30s, extension 72°C 45s for 35 cycles; final extension 72°C 8min. Restriction endonucleases *AvaI* and *AvaII* (Fast Digest, Fermentas) were used for restriction analysis at 37°C for 4h. PCR and restriction products were analyzed on 2% agarose and 6% acrylamide gels and visualized by ethidium bromide under UV light.

### Results and discussion

STEIN et al. (2005) identified Hv-EIF4e gene mutations to be specific for *rym4/rym5* resistance. For overview of gene scheme see figure 1.

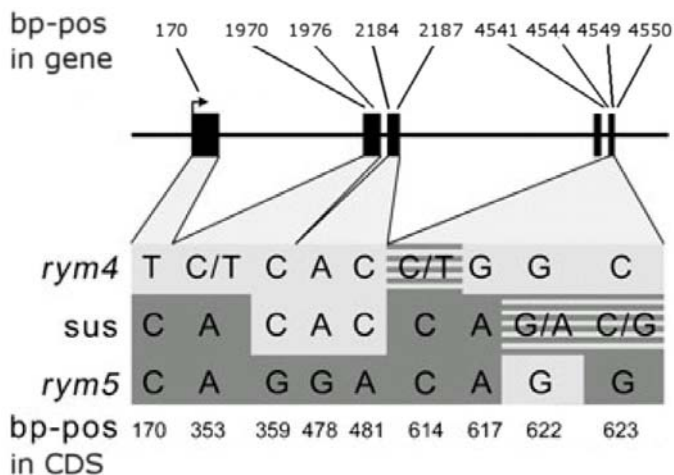


Figure 1: Hv-eIF4E gene scheme, black boxes indicate exons, SNPs indicate mutation specific for *rym4/rym5* allele, adopted from Stein et al. (2005).

Gene Hv-eIF4E is quite large and design of specific PCR primers for product covering whole gene could be a problem. Set of duplex PCRs covering exons 1, 2 and 3 was therefore designed. Compatible primer pairs *rym4F*, *rym4R*, *rym5F* and *rym5R* were selected from output of FastPCR software (KALENDAR, 2008). Sequence of primers are specified in table 1.

Table 1: Primer sequences

Primer	Sequence	Expected length of PCR product
<i>rym4F</i>	5'-ATGGCGGAGGACACGGAGACGA	586 bp
<i>rym4R</i>	5'-CTTGAAGGTAGGAAACCCTGGCGT	
<i>rym5F</i>	5'-AGCTGCTGAATAGTGTGTGTT	1034 bp
<i>rym5R</i>	5'-ACTGATCAATTCACGTAGCCTC	

Mutation at 170bp in exon1 specific for *rym4* allele and mutation at 478bp in exon3 specific for *rym5* allele were selected as a target for restriction analysis. Restriction analysis was done by SNP2CAPS software (Thiel et al., 2004). Restriction endonucleases *AvaI* and *AVaII* with products specific for *rym4/rym5* allele was selected from software output. When susceptible allele is present, both PCR product are cleaved, so fragments 170, 416, 349 and 685bp are present. When *rym4* allele is present, only PCR product of exon1 is cleaved so fragments 349, 586 and 685bp are present. When *rym5* allele is present, only PCR product of exon2 and 3 is cleaved so fragments 170, 416, 1034bp are present. Predicted sizes of restriction fragment are summarized in table 2.

Table 2: Predicted sizes of restriction fragments

	170	416	349	586	685	1034
Rym	X	X	X		X	
<i>rym4</i>			X	X	X	
<i>rym5</i>	X	X				X

Annealing temperature was computed in FastPCR software (KALENDAR, 2008) and verified experimentally.

In contrary to the predicted size 586bp for *rym4F/rym4R*, observed PCR product size was about 200bp. Because restriction site was still present in this PCR product, it was possible to use it for identification of *rym4* allele. The same situation was for *rym5F/rym5R* where predicted size was 1034bp and observed size was about 320bp. Predicted PCR fragments were verified by *in silico* PCR at <http://insilico.ehu.es> (BIKANDI et al., 2004) with the same sizes of predicted fragments as from FastPCR software (KALENDAR, 2008). Difference between predicted and observed size could be caused by error in published Hv-eIF4E sequence. Furthermore, non-specific PCR product was observed (fig. 2). Observed PCR products and restriction fragments are separable on 6% acrylamide gels (Mega-gel, C.B.S. Scientific) when used as duplex PCR reaction, and therefore fulfills requirements. More precise results could be achieved by design of new primer sets.

Designed marker was verified on set of 24 winter barley lines with identified alleles of resistance (MAŘÍK et al., 2008). Results are summarized in table 3 and sample electrophoreogram is shown in figure 2.

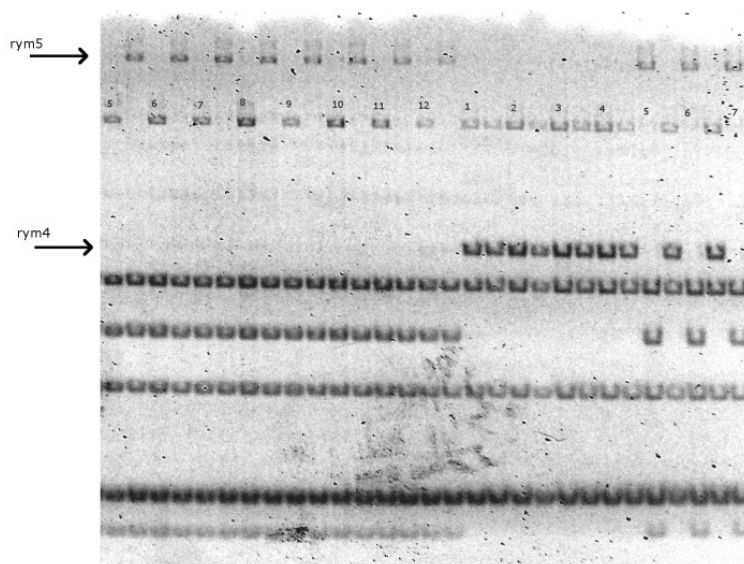


Figure 2: Electrophoresis of duplex CAPS marker on set of winter barley lines with identified allele – separation of *rym4/rym5* alleles

Table 3: Comparison of identified allele and duplex CAPS marker

Sample	Okal	Luxor	Luran	Alissa	Laverda	Fridericus	Alinghi	Camera	Reni 2003	Reni 2006	Caravan	SG-L 00/185/A/04	SG-L 00/185/A/06	SG-L 00/185/B/06	SG-L 00/185/C/07	Kondrat-2	RU 01 109/1/8/2	RU 01 111/2/06	RU 01 115/3/8/2	RU 01 115/4/5/1	RU 01 116/1/2/3	RU 01 199/1/6/1	SG-RU 01.111/06	SG-RU 01.117/06
Field test	-	-	4	4	4	4	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	5	5	4	5	5	4	4	5
CAPS	-	-	4	4	4	4	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	5	5	4	5	5	4	4	5

- = susceptible, 4 = *rym4*, 5 = *rym5*

Results showed perfect correspondence of CAPS marker to the identified allele and therefore full specificity for identification of *rym4/rym5* alleles. It makes this marker ideal for use in breeding for resistance to BaMV complex.

## Conclusions

Developed duplex CAPS marker is able to distinguish *rym4/rym5* alleles exactly at the mutation points in Hv-eIF4E gene. Identified alleles are fully corresponding to the field tests. It makes this marker ideal for use in breeding for resistance to BaMV complex.

## References

- BIKANDI, J., SAN MILLÁN, R., REMENTERIA, A., AND GARAIJAR, J. (2004): *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction; *Bioinformatics*; 20; 5; 798-9
- GRANER A., STRENG S., KELLERMANN A., SHIEMANN A., BAUER E., WAUGH R., PELLIO B., ORDON F. (1999): Molecular mapping and genetic fine-structure of the *rym5* locus encoding resistance to different strains of the Barley Yellow Mosaic Virus Complex; *Theor Appl Genet*, 98: 285-290
- KALENDAR R. (2008): FastPCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein; [www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm)
- KANYUKA K., WARD E. AND ADAMS M. J. (2003): Polymyxa graminis and the cereal viruses it transmits: a research challenge; *Mol. Plant Pathol.*; 4; 393 - 406
- KEB-LLANES M., GONZÁLEZ G., CHI-MANZARENO B., INFANTE D. (2002): A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical pplants; *Plant Molecular Biology Reporter*; 3; 299a-299e
- KÚHNE T., SHI N., PROESSELLER G., ADAMS M.J., KANYUKA K. (2003): The ability of a bymovirus to overcome the *rym4* - mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1; *Journal of General Virology*; 84; 2853-2859
- MAŘÍK P., CHRPOVÁ J., PRÁŠIL I. T., PRÁŠILOVÁ P., ŠNEJDAR Z., SEDLÁČEK T. (2008): Šlechtění ozimého ječmene na rezistenci k biotickým a abiotickým stresům; in *Významné choroby hlavních hospodářských plodin*; CMSSA ed.; ISBN: 978-80-87011-44-7; pp.21-27

- STEIN N., PEROVIC D., KUMLEHN J., PELLIO B., STRACKE S., STRENG S., ORDON F. AND GRANER A. (2005): The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.); *The Plant Journal*; 42; 912 – 922
- THIEL T., KOTA R., GROSSE I., STEIN N., GRANER A. (2004): SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development; *Nucleic Acid Research*; 32; 1; e5
- WERNER K., FRIEDT W., LAUBACH E., WAUGH R. AND ORDON F. (2003): Dissection of resistance to soil-borne yellow-mosaic-inducing viruses of barley (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in a complex breeders cross by means of SSRs and simultaneous mapping of BaYMV/BaYMV-2 resistance of var. „Chikurinibaraki 1“; *Theor. Appl. Genet.* 106, 1425 - 1432

## VPLYV NÍZKEHO PH A HLINÍKA NA LATINSKOAMERICKÉ KULTIVARY ĽADENCA ROŽKATÉHO (*LOTUS CORNICULATUS*). EFFECT OF LOW PH AND ALUMINUM ON THE LATIN-AMERICAN CULTIVARS OF *LOTUS CORNICULATUS*.

Peter PAĽOVE-BALANG\* – Igor MISTRÍK – Ján PAVLOVKIN

*In South America, livestock feeding rely mainly on grazing systems, and therefore grassland productivity determines livestock production. The pastures have usually low fertility and are exposed to continuous low pH and Al stresses, especially in south part of Brazil and Chile. Among legumes, forage Lotus species have greater potential for adaptation to environmentally-constrained areas of Latin America.*

*Our project is integrating partners from EU and Latin America to help increase the Lotus productivity and nutritional value for livestock production. The main objectives of the project are to generate new and important knowledge on the molecular biology, physiology and metabolism on the model and cultivated Lotus species under stress conditions, collect and test the available plant material and its nitrogen-fixing symbiont, find the phenotypes with contrasting tolerance to abiotic stresses and use them for breeding.*

*The characterization of Lotus response to Al stress started with the analysis of the growth response. It was found, that the Lotus corniculatus cv. St. Gabriel (U) and Lotus corniculatus cv. Draco are more sensitive, than cv. St. Gabriel (B), UFRGS, which are used in Brazil as well as the Est. Ganador from Uruguay. The membrane potential measurement showed stronger decrease of membrane potential of root cortical cells and leakage of ions in putative sensitive cultivars, suggesting lose of semipermeability of cell membranes. The active membrane potential was affected mainly by decrease of activity of the ATP pumps and so could cause lower growth of the cells in root prolongation zone.*

*Kľúčové slová: foradge, Lotus sp., acid soil, aluminum*

### Úvod

V oblasti Južnej Ameriky je chov hovädzieho dobytká najdôležitejším odvetvím živočíšnej výroby a je založený na pastevnom systéme. Ako pastviny sa využívajú väčšinou málo úrodné, s nízkym obsahom dusíka aj fosforu, a preto nevhodné pre rastlinnú výrobu. Výskum zameraný na zvýšenie produktivity týchto pastvín je v Južnej Amerike vysoko aktuálny. Mnohé z pôd, hlavne v Brazílii a Čile, majú nízke pôdne pH. Pri nízkom pH sa hliník uvoľňuje do pôdneho roztoku a je pre rastliny toxický. V rámci bôbových rastlín má rod ľadenec (*Lotus* sp.) relatívne najväčší potenciál prispôsobiť sa týmto nepriaznivým faktorom (CORREA et al. 2001, VOIGT & MOSJIDIS 2002) a navyše obsahuje významné množstvo tanínov, ktoré blahodarne pôsobia na metabolizmus hovädzieho dobytká.

Projekt LOTASSA (*LOTus Adaptation and Sustainability in South America*) spája vedecké sily Európy a Južnej Ameriky v záujme zvýšenia produktivity juhoamerických pastvín. Hlavnými cieľmi projektu je získanie nových dôležitých fyziologických, biochemických a molekulárno-biologických poznatkov v odpovedi modelových aj kultivovaných druhov a kultivarov rodu *Lotus* na stresové faktory. Zbiera a testuje sa dostupný rastlinný materiál ako aj významné línie symbiontov, aby bolo možné nájsť najviac tolerantné a citlivé genotypy a použiť ich na šľachtenie.

### Materiál a metódy

Stonkové odrezky a *Lotus corniculatus* (odrody Draco, San Gabriel (U), Sao Gabriel (B) a UFRGS) dlhé 5 cm sme zakorenili vo vermikulite v kontrolovaných podmienkach v rastovej komore (20 °C, rel. vlhkosť 50%, fotoperiódá 16h/8h a osvetlenie 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ ) a zalievali médiom „Hornum“ (HANDBERG & STOUGAARD 1992). Po 10 dňoch sme ich preniesli do hydroponického roztoku, ktorý obsahoval 1/10 Hornum s miernou modifikáciou koncentrácie niektorých zlúčenín (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a 0,5 mM KCl). Hydroponický roztok bol prevzdušňovaný a vymieňaný každé 2 dni. Po 8 dňoch sme rastliny preniesli do nových roztokov, ktoré obsahovali 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 mM KCl a 0-10 mM  $\text{AlCl}_3$ , pričom pH roztokov bolo udržiavané na hodnote 4,0 alebo 5,5 ( $\pm 0.2$ ) počas celého experimentu. Rast koreňa bol stanovený ako priemerný prírastok dĺžky koreňa 15 rastlín za 5 dní.

Membránový potenciál bol meraný v kortikálnych bunkách koreňa, 2-5 mm od špičky štandardnými mikroelektrodovými technikami (PAVLOVKIN et al. 1993) v roztoku obsahujúcom 0,1 mM KCl, 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  a  $\text{AlCl}_3$ . Difúzny potenciál bol meraný za anoxie použitím plyného dusíka (PAVLOVKIN et al. 1986). Aktivita ATP púmp bola stanovovaná po ich aktivácii 15  $\mu\text{M}$  fusikocínom (v 0.1 % etanole).

### Výsledky a diskusia

Vo forme  $\text{Al}^{3+}$  má hliník výrazný negatívny účinok na rast koreňa a príjem živín (MARIANO et al. 2005, Matsumoto 2000). Porovnávaním rastu poľnohospodársky významných kultivarov druhu *Lotus corniculatus* poskytnutých od juhoamerických partnerov (Monica Rebuffo, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay) sme

zistili, že odrody Sao Gabriel (B) a UFGRS používané v Brazílii a uruguayská odroda Estanzuela Ganador preukázali v našich podmienkach väčšiu mieru tolerancie na hliník ako uruguayské odrody San Gabriel (U) a Draco (tab. 1). Vyššia tolerancia brazílskych kultivarov (Sao Gabriel (B) a UFGRS) bola potvrdená aj poľných podmienkach našimi brazílskymi partnermi (Miguel Dall'Agnol pers. comm).

V citlivejších kultivároch (Draco, San Gabriel (U)) ale čiastočne aj v odrode Est. Ganador došlo vplyvom 5-dňového pôsobenia nízkeho pH ku signifikantnému zníženiu hodnoty kľudového membránového potenciálu kortikálnych buniek koreňa, kým v odrode ako Sao Gabriel (B) došlo len k jeho miernemu zníženiu a v odrode UFGRS zostal nezmenený.

Krátkodobé pôsobenie hliníka (niekoľko minút) vyvolávalo v citlivých odrodách oveľa výraznejšie zmeny potenciálu, čo je pravdepodobne prejavom určitého druhu poplašného signálu v týchto bunkách spojeného s otváraním Ca-kanálov a prieniku vápnika do cytoplazmy. Tento predpoklad potvrdzovala aj zjavná korelácia medzi veľkosťou počiatočného signálu a schopnosťou udržať si kľudový membránový potenciál aj po dlhšej, 5-dňovej aplikácii hliníka. Výraznejší pokles membránového potenciálu citlivých odrôd bol spôsobený najmä poklesom difúzneho potenciálu. Pri porovnaní najcitlivejšej odrody (Draco) s najtolerantnejšou (UFGRS) bolo pri odrode Draco pozorované zvýšené vyplavovanie iónov (najmä  $K^+$ ) čo poukazuje na zvýšenú permeabilitu bunkovej membrány. Aktívny potenciál a aktivita ATP-púmp bola menej ovplyvnená, avšak celková aktivita ATP púmp bola v citlivej odrode vplyvom hliníka signifikantne nižšia, čo môže vplyvať nielen na príjem iónov koreňom, ale aj na rast bunkovej steny a predlžovanie buniek koreňa.

Tabuľka 1: Relatívny prírastok dĺžky koreňa rôznych kultivarov *Lotus corniculatus* v % oproti kontrole za 5 dní aplikácie 0,5 mM hliníka vo forme  $AlCl_3$  (priemer dvoch nezávislých pokusov, v každom po 15 rastlín).

NÁZOV KULTIVARU	RELATÍVNY PRÍRASTOK OPROTI KONTROLE (PRI PH 4,0) (%)
Draco	77,1
San Gabriel (U)	81,8
Est. Ganador	86,8
Sao Gabriel (B)	90,75
UFGRS	86,5

## Súhrn

Náš výskum sa sústredil na porovnanie vplyvu nízkeho pH a hliníka na vybrané Latinskoamerické kultivary ľadence rožkatého. Analyzovali sme rast rastlín pri týchto podmienkach, pričom odrody *Lotus corniculatus* cv. St. Gabriel (U) and *Lotus corniculatus* cv. Draco boli senzitivnejšie, ako odrody St. Gabriel (B), UFGRS a Est. Ganador. Merania membránového potenciálu dokázali rýchlejší pokles difúzneho potenciálu vplyvom Al v prípade citlivých odrôd, ako aj vyššiu mieru vyplavovania iónov, čo poukazuje na zvýšenú permeabilitu membrán. Čiastočne bola ovplyvnená aj aktívna zložka membránového potenciálu, a to hlavne nižšou aktivitou ATP pump v citlivých odrodách, čo môže mať priamy vplyv na rast buniek v predlžovacej zóne koreňa.

Táto práca bola podporená Európskym projektom LOTASSA FP6-2005-INCO-DEV2-517617.

## Literatúra

- CORREA, O.S., ARANDA, A. & BARNEIX, A.J. 2001. Effects of pH on growth of two forage legumes. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1367-1375.
- HANDBERG, K. & STOUGAARD, J. 1992. *Lotus japonicus* an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetic. *Plant Journal*, 2: 487-496.
- MARIANO, E. & KETJENS, G. 2005. Long-Term effects of aluminum exposure on nutrient uptake by maize genotypes differing in aluminum tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 323-333.
- MATSUMOTO, H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*, 200: 1-46.
- PAVLOVKIN J., MISTRÍK I., ZAJCHENKO, A.M. & DUGOVIČ, L. 1993. Some aspects of phytotoxic action of trichothecene mycotoxin roridin H on corn roots. *Biologia* 48: 435-439.
- PAVLOVKIN, J., NOVACKY, A. & ULLRICH-EBERIUS, C.-I. 1986. Membrane potential changes during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol. Plant. Pathol.* 28: 125-135.
- VOIGT, P.W. & MOSJIDIS, J.A. 2002. Acid-Soil resistance of forage legumes as assessed a soil-on-Agar Method. *Crop Science*, 42: 1631-1639.

## MECHANICKÉ VLASTNOSTI STEBIEL OBILNÍN MECHANICAL PROPERTIES OF CEREALS STEM

Juraj DUNCA

*In this work are introduced measured mechanical properties stems of cereals: length of plant, external diameter internode of stems, thickness of wall, resonant frequency and calculated firmness bending coefficient  $k_2$ . In this paper measuring methods of elasticity properties of wheat stems are presented. By dynamic method resonance frequencies was obtained of wheat stems.*

*Keywords: firmness bending coefficient  $k_2$ , resonant frequency, modulus of elasticity, mechanical properties, resonant of methods*

### Úvod

Mechanické vlastnosti stebiel obilnín sú dôležitým faktorom z viacerých hľadísk. Predovšetkým rozmerové charakteristiky stebiel pšeníc a to: dĺžka rastliny, dĺžka stebľa, hrúbka stebľa a hrúbka steny stebľa. Dôležité sú otázky pevnosti a pružnosti, pretože pri výmlate dochádza pri prechode mlátiacim mechanizmom k trhaniu, deformácii a ohýbaniu stebiel. Otázka pevnosti a pružnosti má význam aj z hľadiska poliehania stebiel. (DUNCA, 2003; DUNCA, 2006). Príčiny poliehania obilnín rozoberá práca (PRUCKOVÁ, UCHANOVÁ, 1976).

### Materiál a metódy

Pružné vlastnosti stebiel obilnín sú charakterizované modulmi pružnosti. Metódy merania pružných vlastností stebiel obilnín delíme na statické a dynamické. Dynamické metódy sú oveľa presnejšie ako statické metódy, vzhľadom na malé deformácie pri meraní.

Medzi statické metódy patria:

- a) metóda využívajúca Hookov zákon
- b) metóda ohybu
- c) metóda priehybu

Medzi dynamické metódy patria:

- a) rezonančná metóda pozdĺžnych kmitov
- b) rezonančná metóda priečných kmitov
- c) ultrazvuková (impulzová) metóda

Pri statických metódach je možné zostrojiť krivku závislosti deformácie od napätia, čo nie je možné pri dynamických metódach. Objektom meraní a vyhodnotení bol biologický materiál: stebľa pšenice. Zisťovali sa významné pružné vlastnosti stebiel pšenice: rezonančné frekvencie a vypočítal sa koeficient pevnosti v ohybe stebiel pšenice. Biologický materiál stebľa pšeníc rôznych odrôd nám dodal VÚRV Piešťany. Merania sme uskutočnili v laboratórnych podmienkach na Katedre fyziky MF SPU v Nitre. Merali sme vonkajšie priemery internódií stebiel pšenice pod klasom, hrúbky steny internódií, dĺžky rastliny pšenice vybraných odrôd. Koeficienty pevnosti stebiel sme vypočítali podľa vzorca (DUNCA, 2007). Rezonančnou dynamickou metódou sme určovali rezonančné frekvencie 1. internódií stebiel pšenice vybraných odrôd

$$k_2 = \frac{f^2 S}{l^3}, \quad (1)$$

kde

$l$  – dĺžka vzorky (m),

$f$  – rezonančná frekvencia (Hz),

$S$  – plocha v priečnom reze internódiu stebľa ( $\text{mm}^2$ )

$$S = \frac{\pi}{4} (d_2^2 - d_1^2), \quad (2)$$

kde

$d_2$  – vonkajší priemer internódiu stebľa pšenice,

$d_1$  – vnútorný priemer internódiu stebľa pšenice.

### Výsledky a diskusia

V tabuľke 1 na ilustráciu uvádzame v laboratórnych podmienkach namerané hodnoty rezonančných frekvencií, vonkajšie priemery a vnútorné priemery internódií stebiel pšenice odrody VICKING. Ďalej namerané dĺžky rastliny potrebne k výpočtu koeficienta pevnosti stebľa a vypočítané koeficienty pevnosti v ohybe označené  $k_2$ . V poslednom riadku tabuľky sú uvedené priemerné hodnoty nameraných veličín. Podobne v tabuľke 2 na ilustráciu sú uvedené výsledky meraní pre odrodu NOUGAT. Domáce a zahraničné skúsenosti ukazujú, že odolnosť proti poliehaniu závisí od dĺžky stebľa rastliny (PRUCKOVÁ et al., 1976). Ďalej závisí

od plochy v priečnom reze a od pružných vlastností vyjadrených rezonančnými frekvenciami a modulmi pružnosti.

### Záver

Mechanické vlastnosti majú dôležitú úlohu pri riešení otázok odolnosti obilnín proti poliehaniu. V práci sú uvedené namerané mechanické veličiny charakterizujúce vlastnosti stebiel pšenice. Ďalej je uvedený vzorec na výpočet koeficienta pevnosti stebra v ohybe.

### Literatúra

- DUNCA, J.: Fyzikálne vlastnosti stebiel pšenice. In: Zborník z 10. odborného seminára, Piešťany, VÚRV, 2003, s. 90 – 91.
- DUNCA, J. – DUNCOVÁ, A. – ŠVEC, O.: Využitie niektorých matematických metód pri štúdiu fyzikálnych vlastností stebiel obilnín. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z 12. odborného seminára, Piešťany, VÚRV, 2005.
- DUNCA, J. – DUNCOVÁ, A. – ŠVEC, O.: Fyzikálne vlastnosti stebiel obilnín. In: Nové poznatky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z 13. vedeckej konferencie, Piešťany, VÚRV, 2006.
- DUNCA, J.: Mechanické vlastnosti biologických materiálov. Monografia. Vydavateľ: SPU v Nitre (2007), ISBN 978-80-552-983-3.
- PRUCKOVOVÁ, M. G. – UCHANOVOVÁ, O. I.: Nové odrody ozimnej pšenice. Príroda, Bratislava, 1976, 302 s.

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

Tabuľka 1: Mechanické vlastnosti stebiel pšenice odrody (ITA) VICKING

n	f [Hz]	d <sub>2</sub> [mm]	d <sub>1</sub> [mm]	l <sub>r</sub> [mm]	k <sub>2</sub>
1.	240,1	3,45	2,65	800	3,47-04
2.	234,2	3,10	2,34	770	3,11-04
3.	242,1	2,90	2,08	880	3,17-04
4.	273,0	3,40	2,24	900	4,32-04
5.	268,9	3,44	2,62	920	2,99-04
6.	278,4	3,60	2,74	780	5,59-04
7.	270,6	3,21	2,41	810	3,92-04
8.	272,8	3,65	2,65	890	4,29-04
9.	267,8	3,44	2,44	930	3,41-04
10.	274,4	2,73	1,87	820	3,43-04
11.	271,7	3,51	2,71	910	3,15-04
12.	274,2	3,42	2,56	745	5,81-04
13.	270,5	3,03	2,31	930	2,27-04
14.	280,3	3,65	2,71	855	4,81-04
15.	280,2	3,15	2,35	925	2,83-04
16.	281,4	2,88	2,18	880	2,65-04
17.	271,3	3,00	2,24	890	2,68-04
18.	278,6	2,98	2,28	890	2,61-04
19.	274,7	2,62	2,00	820	2,48-04
20.	276,2	2,90	2,00	840	3,62-04
$\Sigma$	5381,4	64,06	47,38	17185	70,70-04
$\bar{x}$	269,1	3,20	2,37	859,3	3,53-04



Tabuľka 2: Mechanické vlastnosti stebiel pšenice odrody (FRA) NOUGAT

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

## VYUŽITIE RASTOVEJ ANALÝZY PRE HODNOTENIE GENOTYPOVÝCH ROZDIELOV KAPUSTY REPKOVEJ PRAVEJ (*BRASSICA NAPUS* SUBSP. *NAPUS*) THE GROWTH ANALYSIS USING FOR ASSESMENT OF DIFFERENCES IN VARIOUS GENOTYPES OF OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS* SUBSP. *NAPUS*)

Elena HUNKOVÁ – Marián BRESTIČ – Elena MASAROVÍČOVÁ – Jozef SUROVČÍK – Jana FERENCOVÁ

*The growth analysis of various genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus* subsp. *napus*) was done. Genotypes grown in 2008 years on experimental station in Borovce (SCAR – RICP Piešťany, west Slovakia, maize grown region, Luvi-Haplic Chernozem, 167 m above sea level), were as follows: Asgard (Germany), Californium (France), Catalina (France), Magali (France), Manitoba (France), Ontario (Italy), Oponent (Czech Republic), Rodeo (Germany), Rohan (Germany), Talisman (Denmark). 160 kg N-P-K fertilisers . ha<sup>-1</sup> in autumn and 62 kg N.ha<sup>-1</sup> in spring were applied under oilseed rape. The highest values of NAR, CGR, pod number and pod dry matter reached genotype Magali, Rodeo and Catalina. The lowest values of these parameters achieved genotype Oponent, then Rohan, Asgard and Ontario.*

*Key words: winter oilseed rape, genotypes, growth analysis, NAR, CGR, pod number, pod dry matter*

### Úvod

Rast a vývoj kapusty repkovej pravej je charakterizovaný biologicko - pestovateľskou makrofenologickou škálou, stanovenou na základe vonkajších morfológických znakov a ich premien, pričom trvanie jednotlivých fenologických fáz je presnejšie určené v závislosti na klimatických a pôdnych faktoroch (FÁBRY et al., 1975). Produkčný proces je geneticky podmienený v rôznom rozsahu prostredníctvom genetickej regulácie dĺžky ontogenézy a jej jednotlivých etáp, príjmu živín a vody, asimilácie, transportu asimilátov a minerálnych látok, odolnosti proti chorobám a škodcom atď. (KOSTREJ et al., 1998). Vhodný výber genotypu a príslušná technológia pestovania má zabezpečiť maximálnu absorpciu slnečného žiarenia asimilačnými orgánmi v poraste, vysokú účinnosť využitia absorbovaného slnečného žiarenia vo fotosyntéze a distribúciu väčšiny dostupných asimilátov do hospodársky významnej morfológickej alebo chemickej frakcie rastliny (PETR et al., 1987). Vysoký stupeň genetickej podmienenosti pri formovaní porastu plodín znižuje vplyv prostredia a naopak (KOSTREJ et al., 1998).

### Materiál a metódy

V roku 2008 bol založený pracovníkmi SCPV – VÚRV Piešťany poľný pokus s kapustou repkovou pravou, forma ozimná v Borovciach. Experimentálna báza SCPV - VÚRV Piešťany v Borovciach sa nachádza na úrodných pôdach kukuričnej výrobnnej oblasti, v nadmorskej výške 167 m. Územie má kontinentálny charakter podnebia s priemerom zrážok 593 mm za rok (za vegetáciu 358 mm) a s priemerom teploty vzduchu 9,2°C za rok (za vegetáciu 15,5°C). Pôda je černoziem hnedozemná s 1,8 -2,0%-ným obsahom humusu, s pH 6,35 – 7,2 (ŽÁK, LEHOČKÁ, KLIMEKOVÁ et al., 2006). V pokuse boli pestované genotypy kapusty repkovej pravej rôznej proveniencie. Na parcelky o rozmeroch 10 m<sup>2</sup> (1,25 x 8 m) v štyroch opakovaniach boli na jeseň aplikované N-P-K hnojivá v dávke 160 kg.ha<sup>-1</sup>. Na jar boli prihnojované dusíkom v dávke 62 kg.ha<sup>-1</sup> (údaje z experimentálnej stanice Borovce). Z nich boli pre účely rastovej analýzy odoberané rastliny pracovníkmi Katedry fyziológie rastlín SPU v Nitre (24.4., 29.4., 13.5., 27.5., 3.6. a 16.6. 2008). Z pestovaných genotypov boli vybrané nasledovné: Asgard (Nemecko), Californium (Francúzsko), Catalina (Francúzsko), Magali (Francúzsko), Manitoba (Francúzsko), Ontario (Taliansko), Oponent (Česká republika), Rodeo (Nemecko), Rohan (Nemecko), Talisman (Dánsko). Zisťovaná bola výška rastlín, plocha listov (pomocou skenera), počet listov, počet bočných vetiev, počet šesťúľ, celková sušina rastlín, celková sušina listov a sušina šesťúľ (v priemere na 1 rastlinu a prepočítaná na 1 m<sup>2</sup> podľa priemerného počtu rastlín zistených pri jarom hodnotení na 1 m<sup>2</sup> – údaje z experimentálnej stanice Borovce). V zmysle metodiky ŠESTÁK, ČATSKÝ et al. (1966) boli z nameraných hodnôt vypočítané rastové parametre LAI, LAR, SLA, SLW, AGR, NAR, RGR, CGR, LAD. Zistené hodnoty parametrov boli použité pre porovnanie rozdielov medzi jednotlivými genotypmi. Pre rozsiahlosť údajov sme sa v tomto príspevku zamerali iba na hodnotenie vybraných parametrov.

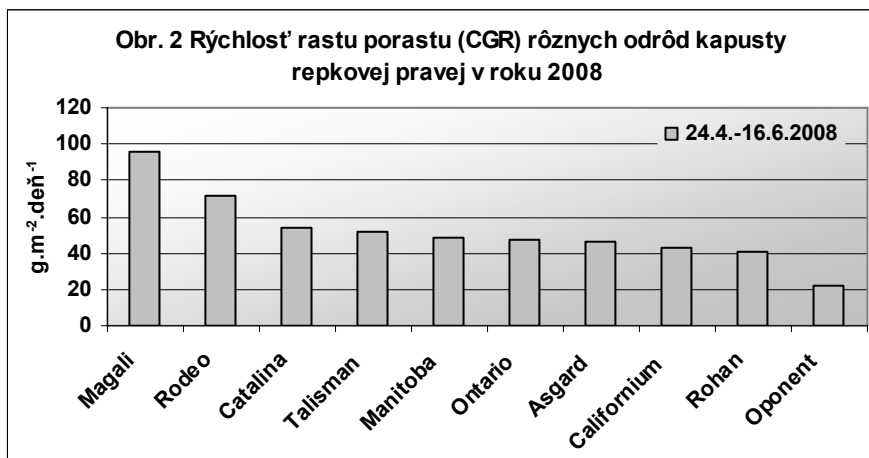
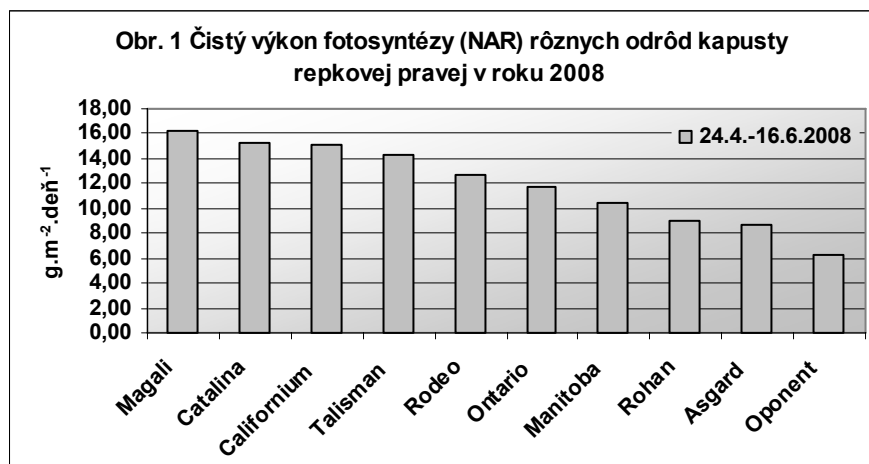
### Výsledky a diskusia

Na rastový a vývinový cyklus kapusty repkovej pravej významne vplyva teplota a svetlo. Tieto faktory urýchľujú alebo spomaľujú fyziologické a biochemické procesy rastlín, čo sa prejavuje na rýchlosti rastu a vývinovom cykle tejto olejiny. Od začiatku vegetačného obdobia je narastanie jej listovej plochy intenzívne. Na začiatku zimy a počas nej sa rapídne znižuje. Rastliny často prezimujú bez listov. Druhé obdobie narastania listov začína na začiatku jarného obdobia. Najvyššiu hodnotu dosahuje listová plocha začiatkom mája a najvyššie prírastky v jesennom období do mrazov medzi prvou a poslednou dekadou novembra a napokon medzi prvou a druhou dekadou apríla. Špecifická rýchlosť rastu listov je pomerne vysoká na začiatku vegetačného obdobia, cez zimu sú hodnoty mínusové a na jar začiatkom apríla dosahuje najvyššie hodnoty

(KOSTREJ et al., 1998). Intenzita svetla ovplyvňuje aj kvalitatívne znaky, ako sú pomer koreňa ku stonke, hrúbku stonky a listov a tvorbu cievnych pletív (FÁBRY et al., 1975).

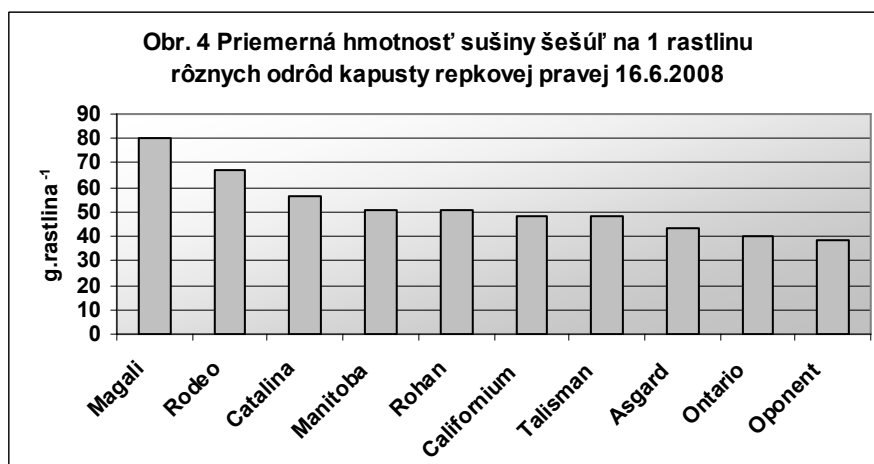
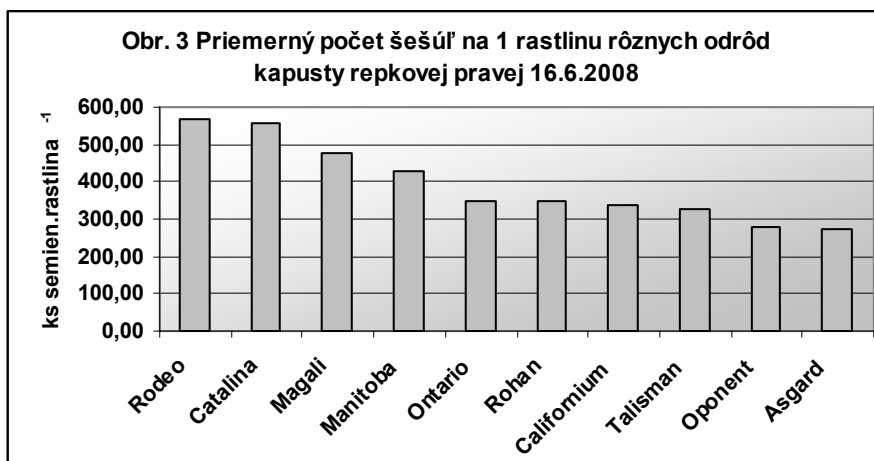
V priebehu sledovaného vegetačného obdobia kapusty repkovej pravej (24.4. – 16.6. 2008) sme zaznamenali vysoké hodnoty parametra NAR. Čistý výkon fotosyntézy počas vegetácie kôľšie a najväčšie hodnoty NAR sa dosahujú v septembri a v apríli, 9 - 10 g.m<sup>-2</sup>.deň<sup>-1</sup> (KOSTREJ et al., 1998, ŠVIHRA, BANAI TÓTH, 1975). Naproti tomu nami zistené hodnoty boli v priebehu vegetácie vyššie (obr.1), najmä u odrody Magali, Catalina, Californium a Talisman, najnižšie hodnoty NAR preukázala odroda Oponent.

Prírastok sušiny na plochu CGR závisí od veľkosti a výkonnosti listovej plochy. V jesennom a jarnom období dosahuje hodnotu 16 - 18 g.m<sup>-2</sup>.deň<sup>-1</sup> (KOSTREJ et al., 1998). My sme však zistili vyššie hodnoty tohto parametra (obr. 2), a to najmä u odrody Magali, Rodeo, Catalina a Talisman. Okrem odrody Oponent boli ostatné odrody pomerne vyrovnané v hodnotách parametra CGR. Najnižšiu hodnotu parametra CGR dosiahla odroda Oponent.



Základnou biologickou charakteristikou, ktorá má vplyv na fyziológiu tvorby úrody je postupné dozrievanie šesúľ a semien na rastline. Vzhľadom na rôznorodosť genotypov sme sa zamerali na vyhodnotenie počtu a hmotnosti sušiny šesúľ na 1 rastlinu v poslednom odbere - 16.6. 2008 (obr. 3, obr.4).

Najvyšší priemerný počet šesúľ na 1 rastlinu sme zistili u odrody Rodeo, potom nasledovali Catalina, Magali a Manitoba. Ontario, Rohan, Californium a Talisman boli v tomto prvku značne vyrovnané. Najnižší počet šesúľ na 1 rastlinu pripadol na odrodu Asgard a potom na Oponent (obr. 3). Najvyššiu priemernú hmotnosť sušiny šesúľ na 1 rastlinu sme zaznamenali u odrody Magali, nasledovali odrody Rodeo a Catalina. Odrody Manitoba, Rohan, Californium a Talisman boli v tomto parametri do značnej miery vyrovnané. Nižšie hodnoty preukázali Asgard a Ontario a napokon Oponent (obr. 4).



DIEPENBROCK (2000) uvádza, že hustota rastlín reguluje úrodovorné prvky a následne úrodu jednotlivých rastlín. Rovnomerné rozmiestnenie rastlín na jednotku plochy je nevyhnutnou podmienkou stability úrod. Počet šesťúľ na rastlinu je rozhodujúci pre úrodu semien. Táto charakteristika je v konečnom dôsledku viac determinovaná prežitím vetiev, pukov, kvetov a mladých šesťúľ, ako potenciálnym počtom kvetov a šesťúľ. Počet semien v šesťuliach je v korelácii dĺžkou šesťúľ. Dĺžka šesťúľ môže byť preto vhodným prvkom pre nepriamu selekciu v šľachtení kapusty repkovej pravej.

## Záver

Na základe hodnotenia vybraných parametrov rastovej analýzy môžeme usúdiť, že do agroekologických podmienok pestovania v kukuričnej výrobní oblasti na Slovensku sú vhodnejšie francúzske odrody Magali, Catalina a nemecká odroda Rodeo, než Asgard, Rohan, Ontario a Oponent. Odrôda Oponent navyše prejavila najnižšie hodnoty u troch zo štyroch sledovaných parametrov - NAR, CGR aj sušiny šesťúľ.

V jednotlivých fyziologických parametroch sa ukázala významná odrodová variabilita. Z hľadiska ďalšieho štúdia bude potrebné spresniť ich vzťah k faktorom prostredia, ako aj k regulačným mechanizmom primárnych procesov produkcie biomasy.

## Literatúra

- DIEPENBROCK, W.: Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. In: Field Crops Research, oč. 67, 2000, č. 1, s. 35-49.
- FÁBRY a kol.: Řepka, hořčice, mák a slunečnice. Praha : SZN, 1975. 358 s.
- KOSTREJ, A. a kol.: Ekofyziológia produkčného procesu porastu a plodín. Nitra : SPU v Nitre, 1998. 187 s. ISBN 80-7137-528-4
- PETR, J. a kol.: Počasí a výnosy. Praha : SZN, 1987. 368 s.
- ŠESTÁK, Z. – ČATSKÝ, J.: Metody studia fotosyntetické produkce rostlin. Praha : Academia, 1966. 359 s.
- ŠVIHRA, J. – BANAI TÓTH, P.: Rastovo-produkčný proces ozimnej repky (*Brassica napus* L.) v podmienkach južného Slovenska. In: Rostlinná výroba, roč. 21, 1975, č. 9, s. 923-928.
- ŽÁK, Š. – LEHOČKÁ, Z. – KLIMEKOVÁ, M. – BUŠO, R.: Bilancia pôdnej organickej hmoty v konvenčnom a bezorbovom obrábaní pôdy. In: Zborník vedeckých prác SCPV – Úae Michalovce, č. 22, 2006, s. 183-192, ISBN 80-88872-60-X.

**Pod'akovanie:** Príspevok bol podporený grantom AV č. 4/2037/08.